



USO DE *CLICK CHEMISTRY* PARA A BIOCONJUGAÇÃO DE POLÍMEROS
VISANDO AO TRATAMENTO DO CÂNCER

Débora Vieira Way

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Rio de Janeiro

Agosto de 2017

USO DE *CLICK CHEMISTRY* PARA A BIOCONJUGAÇÃO DE POLÍMEROS
VISANDO AO TRATAMENTO DO CÂNCER

Débora Vieira Way

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Prof. Márcio Nele, D.Sc.

Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha, D.Sc.

Dra. Laís Bastos da Fonseca, D.Sc.

Dra. Tailane Moreira Sant'Anna, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

AGOSTO DE 2017

Way, Débora Vieira

Uso de *Click Chemistry* para a Bioconjugação de Polímeros Visando ao Tratamento do Câncer/ Débora Vieira Way. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2007.

XIX, 206 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 152-178.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. *Click chemistry*. 3. Bioconjugação. I. Way, Débora Vieira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Agradecimentos

A meus pais, Bianca e Steven, por me darem todo o carinho, compreensão, apoio e incentivo do mundo! Meu amor e gratidão são muito maiores do que consigo expressar.

A Daniel, meu irmão, por ser meu parceiro de todas as horas e por ouvir minhas histórias de laboratório e (fingir?) se interessar por elas.

A Antonio, meu amor, que me faz querer ser melhor como pessoa e como profissional.

A Sabrina, minha BFF louca e amada, que me suporta em todos os sentidos mesmo de tão longe.

A meu para sempre “tio Zé”, por me ensinar a ter uma visão otimista dos resultados, por guiar meus passos desde a iniciação científica e por todo o carinho que sempre me deu.

A meus amigos Fred e Tina por se fazerem sempre presentes nos bons e maus momentos dessa nossa longa jornada.

Aos amigos conquistados no PEQ. Jorge e Lu, vocês são para sempre; meu carinho por vocês é imensurável. Ray, minha companheira, minha amigona, meu braço direito, você mora no meu coração!! Lu, Thamis, Iza, Gu, Debs, Tailane, Paulinha, Anderson, Anitcha, Dirrrrceu, Bárbara, Marina, Alessandra, Beth, Luiza, Lari, Rhana, Nathalie, Thamyres... obrigada por tudo. Vocês todos são muito especiais!

A todos os colegas do laboratório, que, além de alegrarem meus dias, sanaram minhas dúvidas e dividiram comigo também seus questionamentos, me motivando a entender seus problemas e buscar soluções. Obrigada por me ensinarem tanto!

A Eduardo Miguez (IMA) pela enorme paciência e boa vontade, não só para realizar as análises de RMN, mas para também me ajudar a interpretar os resultados.

E a todos aqueles que contribuíram com essa Tese de Doutorado.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

USO DE *CLICK CHEMISTRY* PARA A BIOCONJUGAÇÃO DE POLÍMEROS
VISANDO AO TRATAMENTO DO CÂNCER

Débora Vieira Way

Agosto/2017

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Programa: Engenharia Química

O tratamento do câncer é feito basicamente por meio de quimioterapia, que pode causar enormes prejuízos à saúde do paciente, uma vez que os fármacos atacam não somente as células doentes, mas também as células saudáveis. Por isso, estratégias para direcionamento dos fármacos a seus devidos alvos vêm ganhando muita atenção nos últimos anos porque permitem atuações mais eficientes dos princípios ativos. Nesse trabalho foram estudadas reações de bioconjugação a sistemas poliméricos empregando *click chemistry* do tipo tiol-eno, que é uma reação simples, rápida, estereoespecífica e que não faz uso de reagentes tóxicos. Os resultados indicam que ainda há muito a ser estudado acerca da *click chemistry* e que existem muitas inconsistências e lacunas na literatura. Algumas das questões relevantes levantadas neste trabalho envolvem a utilização de solventes tóxicos, a falta de dados sobre efeitos de iniciadores, a extrema complexidade das reações propostas na literatura e outros temas. Dos sistemas testados, ficou comprovada a reação tiol-eno entre o estireno e o ácido-3-mercaptopropiônico e entre a maleimida e polímeros produzidos via polimerização RAFT. Ademais, ficou claro que o uso de sistemas copolímeros pode tornar a captação celular até 8 vezes maior, constituindo sistemas promissores para o uso em aplicações sítio-dirigidas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

CLICK CHEMISTRY FOR POLYMER BIOCONJUGATION AIMING AT CANCER TREATMENT

Débora Vieira Way

August/2017

Advisor: José Carlos Costa da Silva Pinto

Department: Chemical Engineering

Cancer treatment is performed primarily through chemotherapy. Chemotherapy, however, can cause other damages to the patient's health, as the drugs can affect both the diseased and healthy cells. Therefore, targeted release strategies have gained significant attention recently because they allow for more efficient outcomes. In the present work, polymer bioconjugation was performed with help of thiol-ene click chemistry reactions. Click reactions are by definition simple, quick, stereospecific and do not require toxic reagents usage. However, obtained results indicate that many aspects still must be studied about click reactions and that many gaps and inconsistencies found in the literature must be discussed. Some of the most relevant issues raised in the present work are the use of toxic solvents, the lack of information about the use of different kinds of initiators and the fact that the proposed click reactions within the literature are extremely complex. Among all the tested systems, the thiol-ene reaction between styrene and 3-mercaptopropionic acid and between maleimide and functionalized polymers produced by RAFT polymerization were shown to work appropriately. It also became clear that the use of copolymer systems can lead to cell uptakes that are up to 8 times higher, constituting promising alternatives for use in targeted drug delivery applications.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
1.1. INTRODUÇÃO	1
1.2. MOTIVAÇÃO	4
1.3. OBJETIVO	6
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
1.5. ESTRUTURA DA PROPOSTA DE TESE	6
1.6. INFORMAÇÕES SOBRE A TESE	7
CAPÍTULO II.....	8
2.1. POLÍMEROS	8
2.2. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO VIA RADICAIS LIVRES	9
2.3. LIBERAÇÃO CONTROLADA E SÍTIO-DIRIGIDA DE FÁRMACOS.....	11
2.3.1. <i>Direcionamento passivo</i>	15
2.3.2. <i>Direcionamento ativo</i>	17
2.4. BIOCONJUGAÇÃO	18
2.5. CLICK-CHEMISTRY	24
2.6. TIPOS DE REAÇÃO <i>CLICK CHEMISTRY</i>	25
2.6.1. <i>Cicloadição de Huisgen</i>	25
2.6.2. <i>Cicloadição [3+2]</i>	27
2.6.3. <i>Reação de Diels-Alder</i>	28
2.6.4. <i>Reação de condensação de aldeídos e cetonas com α-aminas</i>	30
2.6.5. <i>Reação de Staudinger</i>	31
2.6.6. <i>Reações tiol-eno e tiol-ino (tiol-x)</i>	32
2.7. A <i>CLICK CHEMISTRY</i> E OS POLÍMEROS.....	36
2.8. FUNCIONALIZAÇÃO DE POLÍMEROS	38
2.9. COMENTÁRIOS FINAIS.....	39
CAPÍTULO III	43
3.1. MATERIAIS	43
3.1.1. <i>Reagentes</i>	43
3.1.2. <i>Equipamentos e acessórios</i>	45
3.2. MÉTODOS	46
3.2.1. <i>Reações de polimerização em massa</i>	46
3.2.2. <i>Reações para testar a click chemistry</i>	47
3.2.2.1. <i>Reação tiol-eno com estireno</i>	47

3.2.2.2. Reações tiol-eno com L-cisteína.....	48
3.2.2.3. Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido ascórbico	48
3.2.2.4. Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido acético	49
3.2.2.5. Reações tiol-eno com cloridrato de cisteína (Cis-Cl)	49
3.2.2.6. Reações tiol-eno com ácido-3-mercaptopropiônico	49
3.3. CARACTERIZAÇÃO	50
3.3.1. Conversão por gravimetria	50
3.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	50
3.3.3. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	51
3.3.4. Testes de Solubilidade.....	51
3.3.5. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	52
3.3.6. Quantificação de SH livre com Reagente de Ellman	52
CAPÍTULO IV.....	55
4.1. TESTES PARA INSERIR DUPLA TERMINAL NAS CADEIAS POLIMÉRICAS	55
4.2. REAÇÕES DE <i>CLICK CHEMISTRY</i> DO TIPO TIOL-ENO	73
4.2.1. Reações <i>click tiol-eno</i> com estireno	73
4.2.2. Reação tiol-eno com L-cisteína	77
4.2.3. Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido ascórbico	93
4.2.4. Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido acético	96
4.2.5. Reações tiol-eno com cloridrato de cisteína	97
4.2.6. Reações tiol-eno com polímero contendo duplas ligações pendentes.....	100
4.2.7. Reação tiol-eno com DVB.....	102
4.2.8. Reação do estireno com L-cisteína.....	106
4.3. COMENTÁRIOS FINAIS.....	107
CAPÍTULO V	109
5.1. POLIMERIZAÇÃO RAFT	109
5.2. TÉCNICAS DE POLIMERIZAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS	113
5.3. A POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO CONVENCIONAL PARA O ENCAPSULAMENTO DE FÁRMACOS	116
5.4. <i>CLICK</i> TIOL-MICHAEL	118
5.5. COMENTÁRIOS FINAIS.....	120
CAPÍTULO VI.....	121
6.1. MATERIAIS	121
6.1.1. Reagentes	121
6.1.2. Equipamentos e acessórios	122
6.2. MÉTODOS	123
6.2.1. Reações de polimerização RAFT em miniemulsão	124

6.2.2. Bioconjugação.....	125
6.2.3. Protocolo de Marcação com Rodamina B.....	125
6.2.4. Ensaios de Captação Celular.....	127
6.3. CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	128
6.3.1. Gravimetria.....	128
6.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	128
6.3.3. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	129
6.3.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	129
6.3.5. Quantificação de grupamentos tiol livres dos polímeros RAFT.....	129
6.3.6. Ângulo de Contato.....	131
CAPÍTULO VII.....	132
7.1. REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO.....	133
7.2. Bioconjugação.....	145
CAPÍTULO VIII.....	149
8.1. CONCLUSÕES.....	149
8.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	150
CAPÍTULO IX.....	152
APÊNDICE I.....	179
A.1. CÁLCULO DA SEÇÃO 3.2.2.1.....	179
A2. CÁLCULOS DA SEÇÃO 3.2.2.2.....	180
A3. CÁLCULOS DA SEÇÃO 3.2.2.3.....	182
A4. CÁLCULOS DA SEÇÃO 3.2.2.5.....	183
A5. CÁLCULOS DA SEÇÃO 3.2.2.6.....	184
APÊNDICE II.....	186
APÊNDICE III.....	204

Índice de Figuras

Figura 1 – Histórico do número de publicações no período compreendido entre 1997 e 2017, segundo a base do <i>Science Direct</i> . Busca empregando as palavras-chave “polymer” e “biomedical applications” em 19 de abril de 2017.	1
Figura 2 – Mapa de pesquisas em fase de testes clínicos acerca de liberação modificada no mundo (Adaptado de NIH, 2017a).	3
Figura 3 - Mapa de pesquisas em fase de testes clínicos acerca de liberação modificada na América do Sul (Adaptado de NIH, 2017b).	4
Figura 4 – Mecanismo convencional de polimerização via radicais livres. I é o iniciador, M é o monômero, R· é o radical primário, P· é a cadeia em crescimento e P é a cadeia polimérica inativa (MACHADO, 2007; ODIAN, 2004).	10
Figura 5 – Comparação entre os perfis da liberação convencional e da liberação controlada (adaptado de DREW UNIVERSITY, 2014).	12
Figura 6 – Esquema da bioconjugação de nanotubos de carbono com um anticorpo monoclonal por meio de BSA (Adaptado de HEITER <i>et al.</i> , 2009).	20
Figura 7 – Rota usual da bioconjugação com proteínas. Adaptado de STEPHANOPOULOS & FRANCIS (2011).	23
Figura 8 – Representação de uma reação de Huisgen.	26
Figura 9 – Representação de uma reação de [3+2] cicloadição.	27
Figura 10 – Representação de uma reação Diels-Alder.	29
Figura 11 – Representação de reações de condensação de aldeídos e cetonas com hidrazidas e hidroxilaminas (Adaptado de LAHANN, 2009).	30
Figura 12 – Representação de uma reação de Staudinger.	31
Figura 13 – Representação de uma reação tiol-eno.	32
Figura 14 – Mecanismo das reações tiol-eno.	33
Figura 15 – Representação de uma reação tiol-ino.	34
Figura 16 – Estrutura química da cisteína.	42
Figura 17 – Curva de calibração para o Reagente de Ellman com o cloridrato de cisteína.	53
Figura 18 – Esquema da reação proposta no Capítulo IV.	55
Figura 19 – Estruturas químicas dos comonômeros usados nas copolimerizações estudadas: (a) 1,5-hexadieno; (b) dimetacrilato de etilenoglicol; (c) divinilbenzeno. ...	56

Figura 20 – Conversões de monômero nas reações poliestireno puro e de poli(estireno-co-hexadieno).	58
Figura 21 – Comparação das conversões de monômero nas reações de poli(estireno-co-1,5-hexadieno) e de poli(estireno-co-divinilbenzeno).....	59
Figura 22 - Comparação das conversões de monômero nas reações de poliestireno e de poli(estireno-co-EGDMA).	59
Figura 23 – Fotografias dos produtos das reações I (a) e II (b).....	60
Figura 24 - Fotografias dos produtos das reações III (a) e IV (b).	61
Figura 25 – Espectro de RMN do poliestireno puro após 4h30 de reação.	62
Figura 26 – Correspondência entre a estrutura do PS puro e respectivo espectro de RMN.	63
Figura 27 – Espectro de RMN do produto após 4h30 de reação do poli(estireno-co-1,5-hexadieno) antes da lavagem com tolueno.	64
Figura 28 – Espectro de H-RMN padrão do 1,5-hexadieno (CHEMICALBOOK, 2008).	65
Figura 29 - Espectro de H-RMN do produto após 4h30 de reação do poli(estireno-co-1,5-hexadieno) após a lavagem com tolueno.....	66
Figura 30 - Correspondência entre a estrutura do 1,5-hexadieno e respectivo espectro de H-RMN.....	66
Figura 31 - Gráfico de GPC do PS e do P(S-co-HD) após 4h30 de reação.....	67
Figura 32 –Espectros de FTIR dos produtos das reações I a IV.....	69
Figura 33 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações I e II.	71
Figura 34 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações I e III.	72
Figura 35 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações I e IV.....	72
Figura 36 – Espectros de FTIR dos reagentes MPA, DMF e estireno e dos produtos líquido e sólido da reação A.	75
Figura 37 – Distribuição de massas molares do produto final sólido da Reação A.	76
Figura 38 – Respostas normalizadas dos detectores de IR e UV para a análise de GPC da Reação A.....	77
Figura 39 – Estrutura química da L-cisteína.	79

Figura 40 – Possíveis produtos da reação entre L-cisteína e 1,5-hexadieno com os diferentes iniciadores estudados.	80
Figura 41 – Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações de L-cisteína com 1,5-hexadieno e com os diferentes iniciadores.	81
Figura 42 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações 1 e 2.	82
Figura 43 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações 1 e 3.	83
Figura 44 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações 2 e 3.	83
Figura 45 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com cisteína e DVB e com os diferentes iniciadores.	85
Figura 46 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com L-cisteína e EGDMA e com os diferentes iniciadores.	86
Figura 47 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com L-cisteína e BPO e com os diferentes dienos estudados.	87
Figura 48 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com L-cisteína e AIBN e com os diferentes dienos estudados	87
Figura 49 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com L-cisteína e K ₂ S ₂ O ₈ e com os diferentes dienos estudados.	88
Figura 50 – Espectros de FTIR das reações entre a L-cisteína e os diferentes iniciadores testados na ausência dos dienos.....	89
Figura 51 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 13, 14 e 15 e da L-cisteína... 91	91
Figura 52 - Espectros de FTIR dos produtos das reações 16, 17 e 18 e da L-cisteína. .. 91	91
Figura 53 - Espectros de FTIR dos produtos das reações 11 e 15 e da L-cisteína. 92	92
Figura 54 – Espectro de FTIR da L-cisteína pura. 93	93
Figura 55 – Espectros de FTIR para a avaliação da reação da L-cisteína com o ácido ascórbico com o tempo. 94	94
Figura 56 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 19 a 21. 95	95
Figura 57 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 22 a 24. 96	96
Figura 58 - Avaliação da reação da L-cisteína com o ácido acético com o tempo. 97	97
Figura 59 – Reação com reagente de Ellman. (a) branco; (b) cloridrato de cisteína não reduzido; (c) cloridrato de cisteína reduzido com borohidreto de sódio. 99	99

Figura 60 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 25 e 26.	99
Figura 61 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 27 e 28.	100
Figura 62 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 29 a 31.	102
Figura 63 – Espectros de FTIR dos produtos da Reação 32.	103
Figura 64 – Distribuição de massa molar do produto da Reação 32.	104
Figura 65 – Resultados de GPC do produto da Reação 32.	105
Figura 66 – Resultados de GPC para os reagentes estireno e MPA confrontados com o produto da Reação 32.	105
Figura 67 - Resultados de GPC para os reagentes DVB, AIBN e DMF confrontados com o produto da Reação 32.	106
Figura 68 – Espectro de FTIR da reação 33.	107
Figura 69 – Histórico do número de publicações entre os anos de 1999 e 2017 segundo a ISI <i>Web of Science</i> (busca pela expressão “RAFT <i>polymerization</i> ”). Consulta realizada em 27 de junho de 2017.	110
Figura 70 – Mecanismo da polimerização RAFT.	111
Figura 71 – Estrutura química genérica dos agentes RAFT.	112
Figura 72 – Esquema das etapas de bioconjugação.	126
Figura 73 – Esquema da marcação com a rodamina B.	127
Figura 74 – Curva de calibração construída com o reagente de Ellman.	130
Figura 75 – Esquema da reação do Capítulo VII.	132
Figura 76 – Distribuição de tamanhos de partícula das reações R1 a R6.	134
Figura 77 – (a) Emulsão de PMMA sem RAFT; (b) solução de MMA + agente RAFT antes da sonicação; (c) emulsão de MMA + agente RAFT após sonicação.	135
Figura 78 – Conversão das reações R1 a R6.	136
Figura 79 – Cromatogramas da reação R6.	139
Figura 80 – ¹ H RMN dos produtos das reações R1 e R3.	140
Figura 81 – Estruturas químicas dos (co)polímeros e suas respectivas correspondências com as análises de ¹ H RMN.	140
Figura 82 – Análises de ¹ H RMN dos produtos das reações R2, R4 e R6.	141
Figura 83 – Mn x conversão para as reações RAFT.	143
Figura 84 - Mn x conversão das reações convencionais.	144
Figura 85 – Fotografia da emulsão contendo a amostra A marcada com a rodamina B.	147

Figura 86 – Resultados dos ensaios de captação celular.	148
Figura 87 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 4 e 5.	186
Figura 88 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 4 e 6.	187
Figura 89 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 5 e 6.	187
Figura 90 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 7 e 8.	188
Figura 91 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 7 e 9.	188
Figura 92 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 8 e 9.	189
Figura 93 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 1 e 4.	189
Figura 94 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 1 e 7.	190
Figura 95 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 4 e 7.	190
Figura 96 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 2 e 5.	191
Figura 97 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 2 e 8.	191
Figura 98 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 5 e 8.	192
Figura 99 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 3 e 6.	192
Figura 100 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 3 e 9.	193
Figura 101 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 6 e 9.	193
Figura 102 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 10 e 11.	194

Figura 103 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 10 e 12.....	194
Figura 104 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 11 e 12.....	195
Figura 105 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 13 e 14.....	195
Figura 106 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 13 e 15.....	196
Figura 107 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 14 e 15.....	196
Figura 108 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 16 e 17.....	197
Figura 109 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 16 e 18.....	197
Figura 110 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 17 e 18.....	198
Figura 111 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 19 e 20.....	198
Figura 112 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 19 e 21.....	199
Figura 113 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 20 e 21.....	199
Figura 114 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 22 e 23.....	200
Figura 115 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 22 e 24.....	200
Figura 116 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 23 e 24.....	201
Figura 117 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 25 e 26.....	201
Figura 118 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 27 e 28.....	202

Figura 119 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações P(S-co-EGDMA) e da reação 29.	202
Figura 120 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações P(S-co-EGDMA) e da reação 30.	203
Figura 121 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações P(S-co-EGDMA) e da reação 31.	203
Figura 122 – Cromatograma de GPC do produto da reação R1.....	204
Figura 123 – Cromatograma de GPC do produto da reação R2.....	204
Figura 124 – Cromatograma de GPC do produto da reação R3.....	205
Figura 125 – Cromatograma de GPC do produto da reação R4.....	205
Figura 126 – Cromatograma de GPC do produto da reação R5.....	206
Figura 127 – Cromatograma de GPC do produto da reação R6.....	206

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Amostras usadas para a calibração com cloridrato de cisteína.....	53
Tabela 2 – Reações de polimerização realizadas.....	58
Tabela 3 - Posição dos picos de H-RMN para o poliestireno (adaptado de BRANDOLINI & HILLS, 2000).	63
Tabela 4 – Posição dos picos de H-RMN para o 1,5-hexadieno (adaptado de CHEMICALBOOK, 2008).....	65
Tabela 5 – Resultados de GPC do PS e do P(S-co-HD) após 4h30 de reação.	68
Tabela 6 – Lista de reações <i>click chemistry</i> teste realizadas.	79
Tabela 7 – Lista de reações conduzidas a temperatura mais baixa (70 °C).....	90
Tabela 8 – Lista de reações realizadas com ácido ascórbico.....	95
Tabela 9 – Reações conduzidas com cloridrato de cisteína.....	98
Tabela 10 – Resultado da redução com reagente de Ellman.	98
Tabela 11 – Reações entre polímero contendo duplas pendentes e o MPA.	101
Tabela 12 – Reatividade dos agentes RAFT para cada tipo de monômero (Adaptado de SIGMA-ALDRICH, 2017).....	113
Tabela 13 – Amostras preparadas para construir a curva de calibração com cloridrato de cisteína.....	130
Tabela 14 – Lista de reações de polimerização realizadas.	133
Tabela 15 – Resultados de conversão, massa molar numérica teórica e calculada, índice de polidispersão e tamanho médio de partícula dos produtos após 300 min de reação.	137
Tabela 16 - Medidas de ângulo de contato dos polímeros.	144
Tabela 17 – Descrição das amostras submetidas aos ensaios de captação celular.	145
Tabela 18 – Resultados de eficiência de bioconjugação para as reações conduzidas com o reagente maleimida-PEG-NHS.	146

Índice de Siglas

Sigla	Significado
AA	Ácido acrílico
AIBN	Azobisisobutironitrila
AM	Ácido metacrílico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATRP	Polimerização radicalar por transferência de átomos
BPO	Peróxido de benzoíla
BSA	Albumina de soro bovino
CMC	Concentração micelar crítica
CPBD	2-ciano-2-propil-benzoditioato
DA	Diels Alder
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOX	Doxorrubicina
DVB	Divinilbenzeno
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol
EPR	Evidenciada permeabilidade e retenção
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HD	1,5-hexadieno
HER	Receptor do fator de crescimento epitelial humano
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HQ	Hidroquinona
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mAb	Anticorpo monoclonal
MMA	Metacrilato de metila
MPA	Ácido-3-mercaptopropiônico
NHS	N-hidroxí-succinimida

NIH	National Institutes of Health
NMP	Polimerização mediada por nitróxido
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Poli(etileno glicol)
PLA	Poli(ácido lático)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PNIPAM	Poli(N-isopropilacrilamida)
PVAc	Poli(acetato de vinila)
RAFT	Transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TGA	Termogravimetria
THF	Tetrahidrofurano
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

Capítulo I

Introdução

1.1. Introdução

Nas últimas décadas, o estudo da utilização de polímeros para aplicações médicas e farmacêuticas cresceu exponencialmente em todo o mundo, o que pode ser comprovado pelo aumento no número de publicações dos últimos 20 anos, indicado na Figura 1. Além disso, somente no período compreendido entre o dia 1º de janeiro e o dia 19 de abril de 2017 já haviam sido publicados 2005 trabalhos relacionados ao uso de polímeros para aplicações biomédicas, o que indica que o crescimento observado nos últimos 20 anos continua pronunciado.

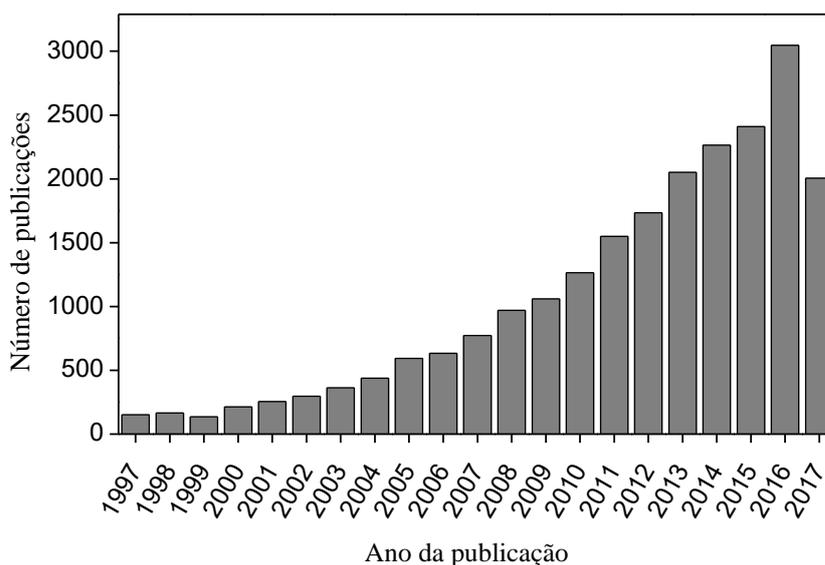


Figura 1 – Histórico do número de publicações no período compreendido entre 1997 e 2017, segundo a base do *Science Direct*. Busca empregando as palavras-chave “polymer” e “biomedical applications” em 19 de abril de 2017.

Esse crescimento é resultado das inúmeras possibilidades, em termos de propriedades físicas e químicas, oferecidas pelos polímeros. Muitos polímeros são

biocompatíveis, biodegradáveis e podem ter suas propriedades físicas, ópticas e mecânicas manipuladas conforme a aplicação pretendida, além de poderem ter a composição química da superfície facilmente alterada (SANTOS, 2007). Por isso, esses materiais despertam grande interesse das indústrias médica e farmacêutica. Em particular, uma das palavras mais comumente associadas a polímeros nos tempos atuais é a funcionalização, que consiste na inserção de grupos funcionais reativos para posterior interação/reação com outros compostos (FENG *et al.*, 2013; PEIXOTO, 2013).

Nesse contexto, merece ser ressaltado o uso de materiais poliméricos para o encapsulamento de fármacos e para a bioconjugação¹ a biomoléculas, visando ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e/ou sítio-direcionada para o tratamento de diversas doenças, em especial do câncer (UHRICH *et al.*, 1999; SANCHIS *et al.*, 2010).

O câncer é hoje uma das doenças que mais matam no mundo e o tratamento, quando não é possível intervir cirurgicamente, é realizado em grande parte por meio de quimioterapia². A quimioterapia, no entanto, está longe de ser totalmente bem-sucedida, uma vez que falta a esta técnica um detalhe primordial: apresentar toxicidade seletiva (FANG *et al.*, 2011). De maneira mais clara, o principal problema desse tipo de tratamento é que os fármacos empregados destroem não só as células doentes, mas também as saudáveis. Falta, portanto, uma atuação mais específica nos tumores, o que diminuiria os efeitos colaterais e aumentaria a eficiência do tratamento. Por isso, vem sendo estudado o uso de sistemas de liberação “inteligentes”, que liberam o quimioterápico controladamente e/ou diretamente em um sítio específico (no caso do câncer, no tumor) (BÖHNE & BECK-SICKINGER, 2015). Para alcançar tamanha especificidade, a associação de polímeros a biomoléculas capazes de reconhecer e se ligar de maneira precisa a tumores vem sendo intensamente estudada.

¹ Ligação entre ao menos uma molécula de origem biológica a compostos sintéticos e/ou biológicos, sendo que as propriedades das moléculas iniciais são individualmente preservadas. No contexto proposto, o termo é usado como sinônimo da associação de polímeros a biomoléculas.

² É o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, para o tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada mais especificamente de quimioterapia antineoplásica.

Dentro do universo da bioconjugação, cabe destacar o crescente interesse pelas recém descobertas reações de *click chemistry*, que consistem num grupo de reações que vem sendo descritas como rápidas, estereoespecíficas e de altíssima seletividade, além de não exigirem o uso de solventes tóxicos (HEIN *et al.*, 2008; SHARPLESS *et al.*, 2001). Com essa descrição fica simples entender o motivo de tamanho interesse. O fato de que por definição essas reações não empregam solventes tóxicos e promovem a produção de quantidade ínfima de subprodutos parece fazer da *click chemistry* o tipo ideal de reação para aplicações médicas e farmacêuticas.

A Figura 2 apresenta o número de estudos acerca de liberação modificada já em fase clínica em todo o mundo. No total, são 5177 pesquisas em andamento ou já concluídas, registradas pelo National Institutes of Health (NIH) até janeiro de 2017 (NIH, 2017a).

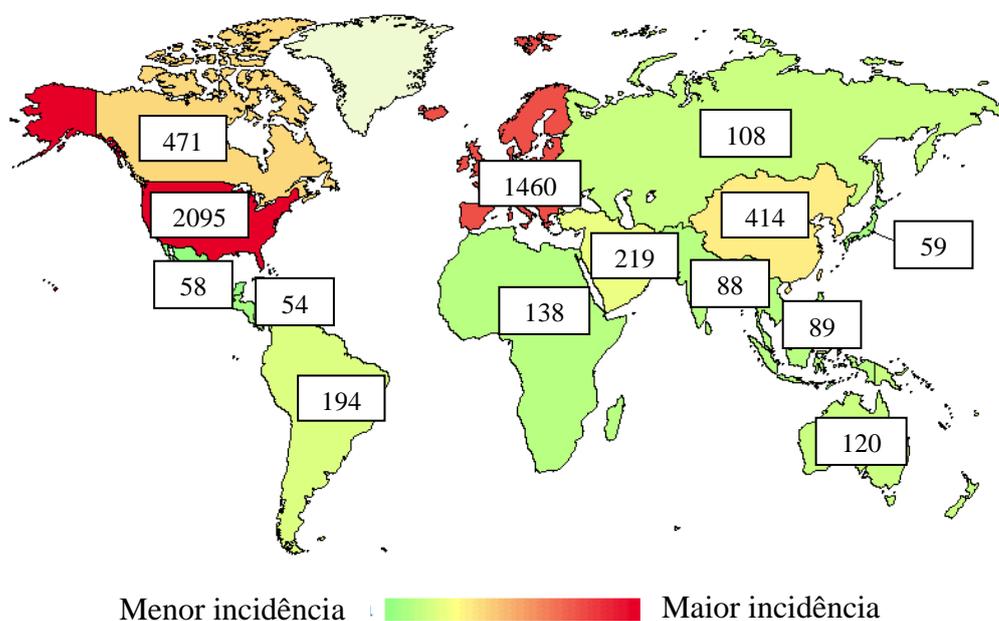


Figura 2 – Mapa de pesquisas em fase de testes clínicos acerca de liberação modificada no mundo³ (Adaptado de NIH, 2017a).

No Brasil, como indicado na Figura 3, são 144 registros, o que representa apenas pouco mais de 2% do número total de registros mundiais. Dessa forma, há motivação

³ Incluindo liberação controlada e sítio-dirigida.

bastante forte para o desenvolvimento de mais pesquisas brasileiras sobre sistemas de liberação controlada e/ou sítio-direcionadas.

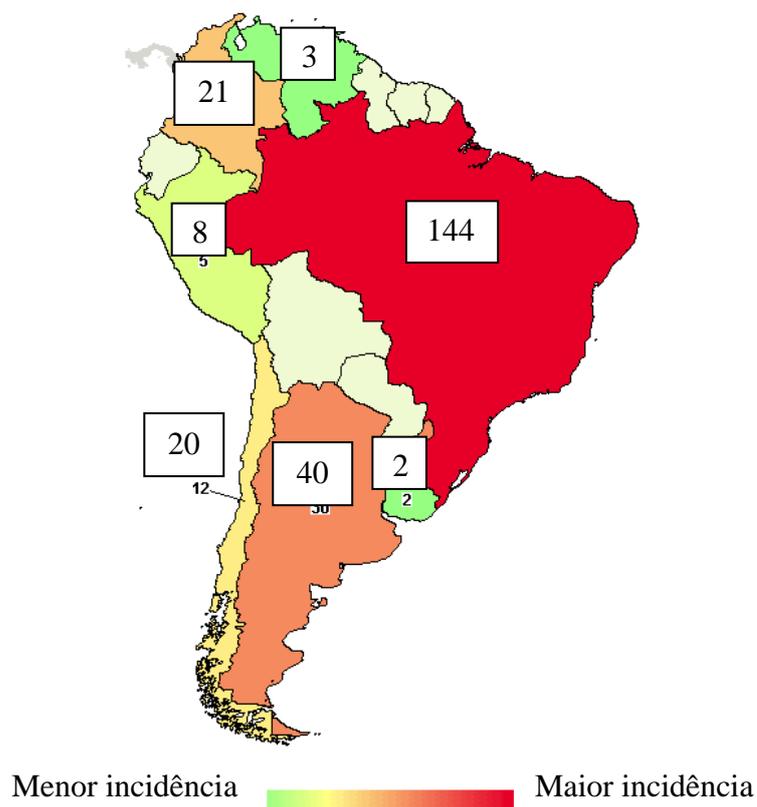


Figura 3 - Mapa de pesquisas em fase de testes clínicos acerca de liberação modificada na América do Sul (Adaptado de NIH, 2017b).

No futuro, estima-se que esses sistemas de liberação de fármacos compostos por polímeros associados a biomoléculas e a fármacos venham a possibilitar a cura de diversos tipos de câncer, minimizando os efeitos colaterais, potencializando o efeito do fármaco e diminuindo as doses necessárias para o tratamento (BÖHNE & BECK-SICKINGER, 2015).

1.2. Motivação

Como discutido anteriormente, o câncer é uma das doenças que mais matam em todo o mundo e o tratamento é feito basicamente por meio de quimioterapia. A quimioterapia, entretanto, pode causar enormes prejuízos colaterais à saúde do paciente,

já que os fármacos atacam não somente as células doentes, mas também as células saudáveis. Por isso, ao longo das últimas décadas foi possível observar uma tendência continuada para o surgimento de um novo olhar acerca do tratamento do câncer, que está diretamente associado à observação da necessidade de uma atuação mais específica dos fármacos, para diminuir os efeitos colaterais, permitir a diminuição da dosagem e tornar o tratamento mais eficiente.

Dessa maneira, há hoje grupos de pesquisa que ainda defendem o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento dos mais variados tipos de câncer. No entanto, as atenções começam a se voltar com maior intensidade para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação dos quimioterápicos já existentes (PREOBRAZHENSKAYA *et al.*, 2006). Esse desenvolvimento, entretanto, ainda se encontra nos estágios iniciais e há pouquíssimos estudos clínicos concluídos até o momento (NIH, 2017a; NIH, 2017b), a despeito do enorme interesse pelo tema. Dessa maneira, todo e qualquer conhecimento que possa ser agregado pode acelerar o desenvolvimento de sistemas de liberação diferenciados, ou, mais especificamente, de sistemas de liberação sítio-dirigidos.

Há, portanto, forte motivação para o estudo e desenvolvimento de sistemas de liberação com atuação específica (sítio-dirigidos) para o tratamento do câncer. Isso é particularmente verdadeiro no Brasil, em que esse tipo de pesquisa corresponde a apenas cerca de 2% dos registros mundiais, quando se comparam as Figuras 2 e 3. Em particular, a etapa de bioconjugação das biomoléculas aos polímeros exige bastante cuidado durante o desenvolvimento desses sistemas, pois há sempre o risco de comprometer a atividade das biomoléculas, que são muito sensíveis.

Apesar de haver técnicas de bioconjugação já muito bem estabelecidas, há apenas 2 produtos comerciais no mercado que alcançaram simultaneamente os objetivos de atingir o alvo de interesse e de realizar a liberação do quimioterápico (ANSELMO & MITRAGOTRI, 2014). São eles o KADYCLA® e o ADCETRIS® (ANSELMO & MITRAGOTRI, 2014). No entanto, nenhum dos dois envolve ainda o uso de polímeros, o que comprovadamente poderia melhorar o desempenho do produto (SIEPMANN *et al.*, 2012). Dessa maneira, há a necessidade de aprofundar os estudos acerca desse tema e, se possível, propor novas rotas que permitam fazer a ligação entre biomoléculas e polímeros, como por exemplo rotas que façam uso da *click chemistry*.

1.3. Objetivo

O objetivo principal deste trabalho consistiu em utilizar reações de *click chemistry*⁴ para realizar a conjugação de biomoléculas a polímeros funcionalizados. No trabalho foi proposto o uso da cisteína e da albumina de soro bovino como modelos para investigar rotas de bioconjugação para o posterior desenvolvimento de um sistema de liberação sítio-dirigida eficiente para o tratamento de câncer.

1.4. Objetivos específicos

Os objetivos específicos perseguidos pelo presente estudo foram:

- i) Produzir polímeros funcionalizados capazes de serem bioconjugados a biomoléculas;
- ii) Realizar a conjugação entre polímero e biomolécula por meio de reações do tipo *click chemistry*, empregando biomoléculas modelo;
- iii) Avaliar a ocorrência das reações de bioconjugação;
- iv) Realizar ensaios de captação celular para avaliação da eficiência dos sistemas propostos.

1.5. Estrutura da proposta de tese

A proposta de tese está estruturada em nove capítulos, incluindo este primeiro capítulo, que apresenta uma breve introdução, os objetivos e a motivação para o desenvolvimento do estudo. No Capítulo II é apresentada uma extensa revisão bibliográfica referente à primeira parte do trabalho, que contempla uma das rotas de bioconjugação testadas: a reação tiol-eno. No Capítulo III são descritos os materiais e métodos empregados na primeira etapa da tese. Nele são apresentados com detalhes os procedimentos adotados nesta primeira rota de bioconjugação testada. Os resultados de todos os testes da primeira parte são apresentados e discutidos no Capítulo IV. O Capítulo V apresenta uma revisão bibliográfica complementar e que se refere exclusivamente à

⁴ São reações rápidas, específicas, de alto rendimento, que empregam reagentes não tóxicos e resultam em produtos também não tóxicos.

segunda rota de bioconjugação contemplada neste trabalho: a rota tiol-maleimida. É importante ressaltar que, apesar dessa nova revisão bibliográfica ser focada mais especificamente na segunda etapa, a primeira revisão apresentada no Capítulo II é mais abrangente. Dessa maneira, muitas das informações contidas no Capítulo II são importantes para a compreensão da segunda parte do trabalho, embora não sejam repetidas para não tornar a leitura demasiadamente longa e repetitiva. No Capítulo VI são apresentados os materiais e métodos referentes à segunda parte do trabalho, seguida pelos resultados e discussões no Capítulo VII. As conclusões e sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo VIII. Finalmente, no Capítulo IX são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas em toda a tese.

Vale ressaltar que a decisão de separar o trabalho em duas partes distintas foi tomada para facilitar a compreensão do leitor. No entanto, as duas partes da tese estão interconectadas e apresentam o mesmo objetivo em comum.

1.6. Informações sobre a tese

A presente tese foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol) vinculado ao Programa de Engenharia Química da COPPE/ UFRJ. Neste local foram realizados todos os experimentos e praticamente todas as análises de caracterização dos materiais. As análises de RMN apresentadas no Capítulo IV foram realizadas no Laboratório de RMN do Instituto de Macromoléculas (IMA) também situado na UFRJ. As análises de RMN incluídas no Capítulo VII foram realizadas no Laboratório Multiusuário de RMN em Solução localizado no Instituto de Química (IQ) da UFRJ. Os ensaios de captação celular foram realizados no Laboratório de Microbiologia Celular da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica: Parte I

2.1. Polímeros

Polímero, segundo a definição do dicionário Aurélio (2014), é um “tipo de molécula formada quando duas ou mais moléculas chamadas monômeros se combinam umas com as outras”. Ainda segundo o dicionário, “um polímero pode conter milhares de monômeros”. Complementando a definição de forma mais científica, pode-se dizer que os polímeros são macromoléculas formadas pela ligação entre moléculas menores, chamadas monômeros, que se conectam por meio de ligações químicas covalentes formadas nas reações de polimerização (ODIAN, 2004; MANO, 1985).

Ao longo da história, os polímeros foram sendo gradativamente incorporados às áreas médica e farmacêutica porque são de fácil produção, podem ter a composição química da superfície alterada facilmente para fornecer propriedades bastante distintas dos materiais originais, podem ser biocompatíveis, podem ser biodegradáveis e apresentam excelentes propriedades ópticas e mecânicas (ODIAN, 2004). Além disso, para o caso de aplicações relacionadas à liberação controlada e/ou sítio-dirigida de fármacos, os polímeros apresentam outra vantagem em relação aos demais materiais: a possibilidade de realizar o encapsulamento *in situ* de princípios ativos (NGWULUKA, 2010).

Como exemplos de aplicações de materiais poliméricos nessas áreas, pode-se citar o uso de resinas acrílicas, normalmente à base de poli(metacrilato de metila) ou poli(ácido acrílico), para produção de cimentos ósseos, lentes de contato, agentes embolizantes e resinas dentárias (FRAZER *et al.*, 2005; SANTOS, 2007). Além disso, os polímeros vêm também sendo empregados amplamente na engenharia de tecidos e na liberação controlada de fármacos (KAMALY *et al.*, 2016; KOHANE & LANGER, 2008).

No caso específico das aplicações farmacêuticas, foco da presente proposta, os polímeros podem se apresentar sob a forma de filmes para liberação transdérmica, sob a forma de partículas secas ou em suspensão/emulsão para aplicação intramuscular, oral ou

intravenosa, ou ainda sob a forma de implantes para liberação via subcutânea (HANS & LOWMAN, 2002; GAUMET *et al.*, 2008). Os sistemas mais estudados, no entanto, são aqueles que fazem uso dos polímeros na forma de pequenas partículas, cujos tamanhos dependem da aplicação desejada. Para aplicações intramusculares ou subcutâneas, os tamanhos médios variam entre 20-100 μm . Administrações via intravenosa requerem partículas com diâmetros significativamente menores que 5 μm , para que não causem embolia, uma vez que os capilares sanguíneos apresentam diâmetros em torno de 5-6 μm (HANS & LOWMAN, 2002). Quanto à forma de eliminar esses materiais, vale ressaltar que partículas menores que 20-30 nm são filtradas pelos rins e eliminadas na urina, enquanto as partículas maiores são eliminadas nas fezes, absorvidas pelo organismo ou retiradas cirurgicamente (GAUMET *et al.*, 2008).

2.2. Reações de polimerização via radicais livres

A poliadição via radicais livres é muito empregada para a produção de polímeros para aplicações farmacêuticas (KADAJJI & BETAGERI, 2011). Nas poliadições, o polímero cresce rapidamente, pois as reações acontecem em cadeia; além disso, não há a formação de subprodutos (ODIAN, 2004). O mecanismo das reações de polimerização via radicais livres pode ser didaticamente dividido em três etapas, que compreendem a iniciação, a propagação e a terminação, como mostra a Figura 4. A etapa de iniciação compreende a geração de radicais livres pela decomposição (normalmente térmica) do iniciador (ODIAN, 2004). Na etapa de propagação, os radicais formados reagem com as moléculas de monômero, que são incorporadas à cadeia em crescimento. O crescimento da cadeia continua até que ocorra um dos mecanismos usuais de terminação: terminação por combinação, quando dois radicais se combinam; ou terminação por desproporcionamento, quando há a transferência de um átomo de hidrogênio de uma cadeia em crescimento para outra (ODIAN, 2004). A etapa de transferência de cadeia ocorre quando a cadeia em crescimento reage com uma molécula do meio, seja um monômero, um polímero, uma molécula de solvente ou uma impureza do sistema, resultando na interrupção do crescimento da cadeia e dando início a uma nova cadeia polimérica (NEVES, 2002).

Dentre as técnicas de polimerização via radicais livres, a técnica de polimerização mais simples é a polimerização em massa. Nesse tipo de reação são adicionados ao

sistema simplesmente o(s) monômero(s) e o iniciador. A etapa de iniciação normalmente ocorre por meio da elevação da temperatura, como já mencionado, mas pode ser adicionado um agente ativador em casos específicos, quando não se deseja elevar a temperatura do meio (CANEVAROLO, 2006; MANO, 1985).

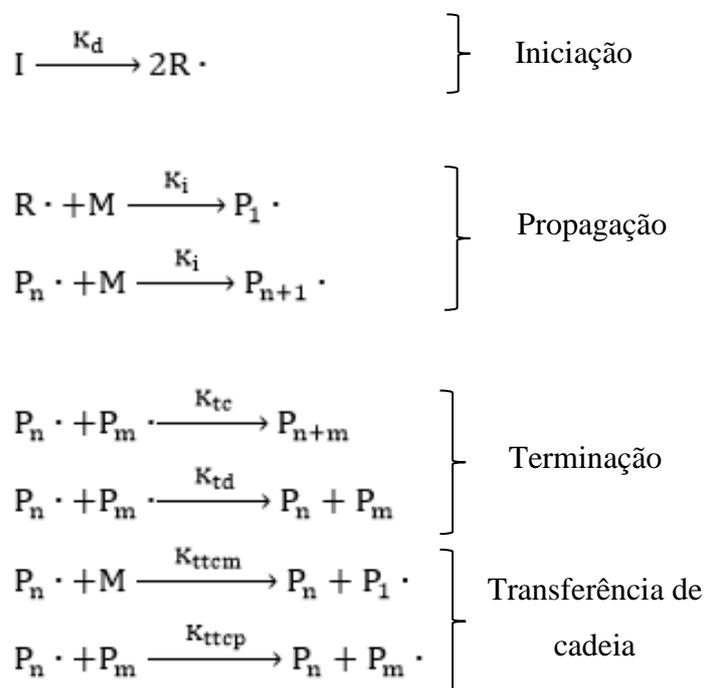


Figura 4 – Mecanismo convencional de polimerização via radicais livres. I é o iniciador, M é o monômero, R· é o radical primário, P· é a cadeia em crescimento e P é a cadeia polimérica inativa (MACHADO, 2007; ODIAN, 2004).

As principais desvantagens da polimerização em massa são o fato de não ser possível produzir polímeros na forma de partículas e também o fato de a transferência de calor ser dificultada, devido ao aumento pronunciado da viscosidade do meio com o progresso da reação. As grandes vantagens do uso dessa técnica residem no fato de que não são empregados solventes ou qualquer outro componente que possa afetar a cinética da reação e no fato de ser uma técnica extremamente simples (CANEVAROLO, 2006). A polimerização em massa é, portanto, muito empregada para a realização de estudos cinéticos e para a avaliação de possíveis interações entre polímero e fármaco, por exemplo, pois elimina interações com agentes surfactantes, solventes e demais compostos empregados em outras técnicas de polimerização.

2.3. Liberação controlada e sítio-dirigida de fármacos

Nessa tese não foi realizado o encapsulamento de nenhum fármaco, uma vez que o objetivo principal foi estudar a ligação dos polímeros a biomoléculas. No entanto, como a principal motivação para o desenvolvimento do trabalho foi a posterior aplicação em sistemas de liberação diferenciados, cabe aqui uma revisão sobre esse tema de maneira a contextualizar o trabalho e convencer o leitor acerca da importância dos sistemas propostos.

Os sistemas de liberação controlada de fármacos permitem, como o próprio nome sugere, maior controle da exposição do fármaco ao longo do tempo durante a aplicação. Além disso, permitem em alguns casos a passagem do fármaco através de barreiras fisiológicas, previnem a eliminação precoce do princípio ativo, reduzem os efeitos colaterais e reduzem o número de doses de medicamento a serem administradas (SIEPMANN *et al.*, 2012). O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos tem como principais objetivos modificar a farmacodinâmica⁵, potencializando dessa forma o efeito terapêutico do fármaco; modificar a farmacocinética⁶, garantindo assim o controle da absorção e a distribuição tecidual do princípio ativo; e reduzir os efeitos toxicológicos dos compostos (HENRIQUE *et al.*, 2006). Além disso, podem, por meio de uma técnica conhecida como encapsulamento, mascarar odor e cor indesejados e evitar a fotodegradação e a oxidação dos fármacos (DESAI *et al.*, 1996; ESPOSITO *et al.* 1996; WAY, 2013). Dessa forma, os sistemas de liberação controlada vêm sendo muito estudados, principalmente para aplicações relacionadas ao tratamento do câncer, visando à diminuição dos efeitos colaterais, aumento da especificidade e diminuição das doses.

A grande vantagem dos sistemas de liberação controlada de fármacos é que eles podem manter a dose do princípio ativo dentro da faixa terapêutica por períodos prolongados. Nas formas de administração convencionais, ocorrem picos de concentração

⁵ Estuda os efeitos bioquímicos e fisiológicos dos fármacos no organismo, além de seus mecanismos de ação e a relação existente entre a concentração e os efeitos dos princípios ativos.

⁶ Estuda as etapas de administração, absorção, biotransformação, biodisponibilidade e excreção dos fármacos; ou seja, o caminho que os fármacos percorrem no organismo.

e pode ocorrer de a dose ultrapassar o limite terapêutico e atingir uma concentração plasmática tóxica para o indivíduo. Além disso, quando o medicamento é administrado em múltiplas doses, a concentração no plasma pode atingir nível subterapêutico antes que a dose seguinte seja administrada, como indica a Figura 5, o que pode prejudicar o tratamento.

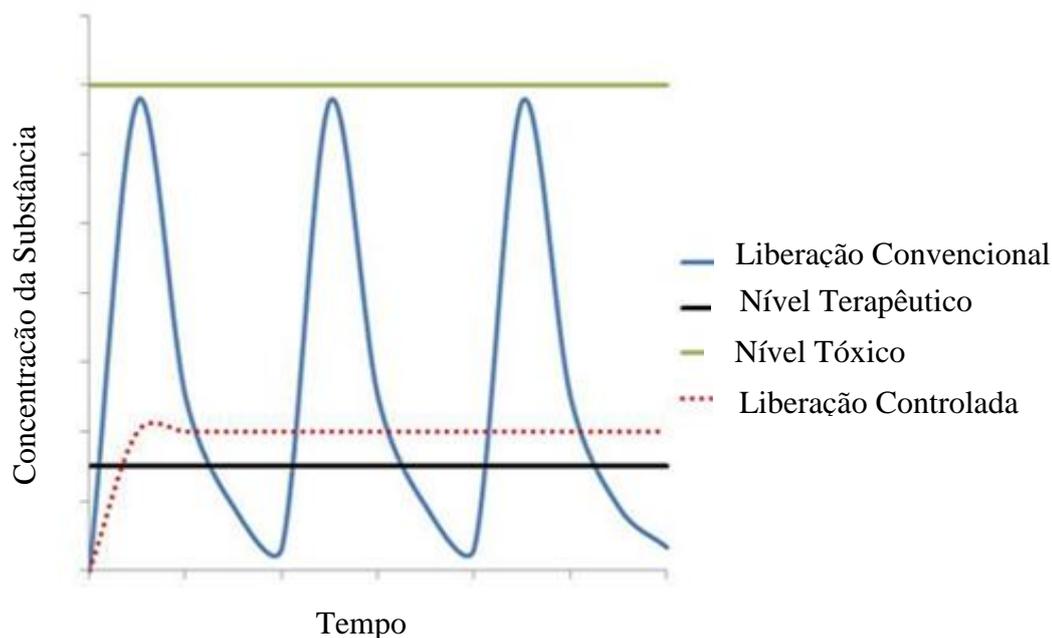


Figura 5 – Comparação entre os perfis da liberação convencional e da liberação controlada (adaptado de DREW UNIVERSITY, 2014).

Tomando como exemplo o fármaco doxorrubicina (DOX), um dos quimioterápicos mais empregados no tratamento do câncer (ALMEIDA *et al.*, 2005), é possível localizar muito facilmente trabalhos que visaram ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. A DOX causa, assim como quase todos os quimioterápicos, inúmeros efeitos colaterais nos pacientes. Mais especificamente, cerca de 10 a 11% dos pacientes tratados com doxorrubicina desenvolvem cardiomiopatia e o índice de morte dentre esses pacientes é de aproximadamente 50% (CHATTERJEE *et al.*, 2010; OCTAVIA *et al.*, 2012). Devido, portanto, à elevada incidência de desenvolvimento de problemas cardíacos, as doses de doxorrubicina costumam ser limitadas (CHATTERJEE *et al.*, 2010). Algumas estratégias vêm sendo adotadas por grupos de pesquisa para tentar contornar o problema da limitação da dose da doxorrubicina com sistemas de liberação diferenciados.

HRUBÝ *et al.* (2005) estudaram a utilização de um copolímero anfifílico em bloco de poli(óxido de etileno) com poli(alil glicidil éter) para formular um sistema de liberação controlada de doxorrubicina sensível a variações de pH. Os autores empregaram os grupamentos amino e cetona da doxorrubicina para permitir a conjugação do fármaco ao polímero. Para isso, foram inseridos nos copolímeros grupos hidrazida que, após a conjugação com a DOX, formam grupos hidrazonas, que são sensíveis a variações de pH. Foram feitos testes de liberação *in vitro* do ativo em diferentes pHs e ficou comprovado que a liberação é mais rápida em pH 5,0 do que em pH 7,4. Esse resultado é muito interessante, porque o pH dos tumores é mais ácido (em torno de 5,0) do que o pH do plasma sanguíneo (aproximadamente 7,4), o que tornaria a liberação muito mais localizada, reduzindo assim os efeitos adversos causados pelo fármaco.

KATAOKA *et al.* (2000) também estudaram o encapsulamento da doxorrubicina em copolímeros em bloco anfifílicos, como copolímeros de poli(etileno glicol) e poli(β -benzil-L-aspartato). Os autores obtiveram micelas de tamanho médio variando entre 50-70 nm e carregadas com 15 a 20% de doxorrubicina. Assim como HRUBÝ *et al.* (2005), KATAOKA *et al.* (2000) também perceberam uma aceleração na liberação do fármaco em pHs mais próximos de 5,0. O uso das micelas permitiu o aumento do tempo de circulação da DOX, provavelmente, segundo os autores, por causa da diminuição da captação das micelas pelo sistema reticuloendotelial por um mecanismo de estabilização estérica. Os testes *in vivo* mostraram que o sistema proposto apresentou atividade antitumoral mais elevada, quando comparado com o uso da DOX livre. Os autores ressaltaram também que a estabilidade do sistema era ainda maior quando a concentração de quimioterápico era aumentada, ocorrendo o encapsulamento também de derivados (dímeros) do fármaco nas micelas.

RAHMAN *et al.* (1986) realizaram um estudo *in vivo* em ratos, comparando o uso de lipossomas carregados com cardiolipina⁷ e doxorrubicina com o uso de doxorrubicina livre. Os autores mostraram que, além de alterar substancialmente a farmacocinética do fármaco, tornando a liberação mais lenta e aumentando em quatro vezes o tempo de meia-

⁷ A cardiolipina é um dos componentes da parte interna da membrana mitocondrial cardíaca dos mamíferos. Além disso, a cardiolipina também é uma molécula que apresenta antigenicidade, que é a capacidade de estimular a produção de anticorpos.

vida no plasma, o encapsulamento também proporcionou uma redução da toxicidade da DOX, indicada pela diminuição do tempo de meia-vida do fármaco nos tecidos cardíacos.

AKBARZADEH *et al.* (2012) estudaram a utilização de nanopartículas magnéticas recobertas com poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido metacrílico) para a liberação controlada de doxorubicina. Os testes de liberação *in vitro* mostraram que, após 200 h a 37 °C, 43% da doxorubicina foi liberada e que o percentual liberado aumentou quando foi aumentada também a temperatura do meio. Os autores realizaram também testes de citotoxicidade das nanopartículas recobertas e os resultados indicaram que o sistema estudado é biocompatível. Mais testes serão ainda realizados, para determinar se as partículas são capazes de atingir o tumor do câncer de pulmão, alvo predeterminado pelos autores.

BOUHADIR *et al.* (2001) estudaram a utilização de hidrogéis de alginato de sódio de baixa massa molar reticulados com adipato de dihidrazida. Os hidrogéis foram carregados com três diferentes quimioterápicos modelo (doxorubicina, metotrexato e mitoxantrona) e cada um deles foi ligado ao polímero de alginato de uma maneira diferente. Em especial para o caso da doxorubicina, a estratégia empregada foi a ligação covalente entre as hidrazidas do agente reticulante e a cetona da posição C13 da DOX. Os testes de liberação *in vitro* indicaram que, variando a concentração de adipato de hidrazida, é possível controlar o perfil de liberação dos fármacos e que a doxorubicina aparentemente interage covalentemente e ionicamente com o polímero proposto.

OLIVEIRA *et al.* (2012) estudaram o encapsulamento de amoxicilina e doxorubicina em partículas de copolímeros de poli(metacrilato de metila) (PMMA) e poli(acetato de vinila) (PVAc) produzidas em suspensão. O autor relatou que as reações com doxorubicina afetaram a morfologia das partículas produzidas e a cinética da reação. Mais especificamente, a DOX parece exercer um efeito inibitório sobre a reação de polimerização (especialmente com o PVAc). Segundo OLIVEIRA *et al.* (2012), esse efeito inibitório pode ser ocasionado pela própria estrutura do fármaco, que se assemelha aos inibidores habitualmente empregados em reações de polimerização, ou ainda por conta de efeitos de difusão e efeito gel da reação, que são alterados quando o antineoplásico é utilizado. Além disso, os autores destacaram uma possível interação entre o polímero e a DOX, observada por meio do aumento da massa molar dos produtos, indicando um possível efeito reticulador das cadeias.

Os trabalhos apresentados acima são exemplos que ilustram o desenvolvimento de sistemas de liberação diferenciados. Alguns deles fizeram uso de polímeros “inteligentes”, que são aqueles capazes de responder a estímulos, como a variação de temperatura ou de pH. Outros fizeram uso da técnica de encapsulamento com polímeros já bastante empregados pela indústria farmacêutica, como o PMMA. Em todos os casos apresentados, no entanto, o objetivo perseguido foi a obtenção de um perfil de liberação prolongado ou simplesmente o aumento do tempo de circulação do fármaco no organismo.

No entanto, quando se estudam sistemas de liberação para tratamento de neoplasias, fala-se muito de sistemas de liberação sítio-dirigidos. A liberação sítio-dirigida ou *in situ* permite que o fármaco seja levado até um local específico do tecido celular. Para que isso ocorra, os carreadores são modificados superficialmente, de forma que uma determinada biomolécula permita o reconhecimento do alvo da partícula, onde deve ocorrer a liberação do fármaco. Vale ressaltar que nem sempre a liberação sítio-dirigida visa a controlar a taxa de liberação do fármaco, como nos sistemas de liberação controlada. Usualmente, os sistemas sítio-dirigidos podem ser alcançados com auxílio de estratégias de direcionamento a um alvo, o que é conhecido como vetorização (DUMITRIU, 2001; DREW UNIVERSITY, 2014; PEIXOTO, 2013).

São duas as estratégias de direcionamento mais empregadas nos sistemas de liberação sítio-dirigida. Uma delas, o direcionamento ativo, emprega ligantes direcionais, como anticorpos, aptâmeros⁸ e outras biomoléculas; enquanto a outra, o direcionamento passivo, se aproveita do efeito de evidenciada permeabilidade e retenção (KIM *et al.*, 2009), que será melhor definido adiante. As duas estratégias são discutidas separadamente a seguir.

2.3.1. Direcionamento passivo

As células cancerosas crescem muito rapidamente e podem entrar na corrente sanguínea e invadir os tecidos (metástase). Um tumor primário ou secundário tem origem a partir de uma única célula anormal e, para crescer, se alimenta de oxigênio e nutrientes

⁸ São pequenos trechos de DNA ou RNA que se ligam especificamente a moléculas alvo específicas.

das células sadias adjacentes. Quando o tamanho do tumor atinge cerca de 150-200 μm , no entanto, as células mais internas não conseguem mais receber esses nutrientes. Nessa fase, os tumores produzem um fator de crescimento vascular endotelial conhecido como VEGF, que estimula a angiogênese, que é a criação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes (DUNCAN, 1999). É a angiogênese que permite a continuação do crescimento tumoral, já que, uma vez vascularizadas, as células mutantes continuam recebendo alimento e podem assim se multiplicar. A vascularização tumoral, no entanto, ocorre de forma tão rápida, que as células não conseguem se organizar adequadamente, o que possibilita o surgimento de espaços vazios entre elas e faz com que o tumor se torne altamente permeável. Além disso, é reportado também um aumento na produção de fatores de permeabilidade vascular nos tumores (FANG *et al.*, 2011). Paralelamente, outra consequência do crescimento acelerado é a ausência de drenagem linfática na região tumoral, o que ocasiona uma retenção de 10 a 200 vezes maior das moléculas que conseguem permear as células doentes, quando comparado com as células sadias (MAEDA *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 2011). O efeito causado pela combinação desses fatores foi descrito pela primeira vez por MATSUMURA & MAEDA (1986) e é conhecido como efeito de evidenciada permeabilidade e retenção (EPR). O efeito EPR vem sendo bastante estudado para possíveis aplicações em sistemas de liberação de fármacos antineoplásicos.

Para que o efeito EPR seja aproveitado de maneira eficiente, as moléculas não podem apresentar baixa massa molar (da ordem de centenas de Da). Isso ocorre porque as células sadias também apresentam alguma permeabilidade. Assim, moléculas pequenas, como os fármacos que são usados na quimioterapia, não fazem a discriminação entre as células sadias e as células doentes. Por esse motivo, elas devem ser grandes o suficiente para que penetrem apenas nas células doentes, em função da elevada permeabilidade do tecido (MAEDA, 2001). Consequentemente, como os polímeros apresentam elevada massa molar, esses materiais vêm sendo bastante estudados para uso como veículos para a entrega do fármaco diretamente no tumor. Para aproveitar o efeito EPR, o fármaco deve conseguir circular no organismo por ao menos 6 horas. Para isso, ela deve ter tamanho superior a cerca de 40 KDa, para que não seja filtrada nos rins e eliminada na urina (MAEDA *et al.*, 2006). Além disso, costuma-se recomendar que os quimioterápicos não sejam positivamente carregados, uma vez que os vasos sanguíneos apresentam carga negativa. Caso isso ocorra, o fármaco pode ser adsorvido na superfície

dos vasos e ter seu tempo de meia vida diminuído, o que não é interessante (MAEDA *et al.*, 2001). No entanto, há estudos que indicam aumento do tempo de meia vida em sistemas positivamente e negativamente carregados. Por isso, generalizações acerca desse tema devem ser evitadas (FANG *et al.*, 2011). Vale ressaltar também que moléculas demasiadamente grandes (tamanho superior a 800 KDa) também apresentam restrições para as aplicações pretendidas, como será discutido adiante (SEYMOUR *et al.*, 1995).

Há alguns mediadores vasculares que estão diretamente ligados ao efeito EPR: a quinina, o VEGF, o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻). A presença ou ausência desses mediadores pode ajudar a modular a intensidade do efeito de evidenciada permeabilidade e retenção (FANG *et al.*, 2011). Esses mediadores são normalmente produzidos pelos tumores e a presença deles intensifica o efeito EPR (FANG *et al.*, 2011).

O uso do efeito EPR simplesmente, no entanto, pode acarretar alguns problemas. Sabe-se que os tumores apresentam heterogeneidade patofisiológica⁹ e, dessa forma, não se pode garantir que os efeitos de permeabilidade e retenção serão “sentidos” em toda a extensão tumoral. Isso costuma ser particularmente verdade, por exemplo, na região central dos cânceres metastáticos (FANG *et al.*, 2011). Dessa maneira, o ideal é combinar os efeitos do direcionamento passivo com os do direcionamento ativo, para potencializar o desempenho do sistema de liberação.

2.3.2. Direcionamento ativo

A sinalização ativa consiste em ligar química ou fisicamente uma biomolécula à superfície dos sistemas de liberação. A biomolécula deve ser escolhida de maneira adequada a cada caso, para que atue de maneira específica em cada tipo de neoplasia. Isso ocorre porque, como já discutido, cada tumor expressa algum tipo de substância em maior quantidade. Por isso, um vetor específico para o câncer de mama, por exemplo, dificilmente atuará no tumor de câncer de fígado, estômago ou próstata (MAEDA *et al.*, 2009).

Uma preocupação relevante quando a sinalização ativa é realizada é se o sistema final será capaz de penetrar nas células, já que, ao ligar a biomolécula à superfície, o

⁹ Patofisiologia é o estudo do conjunto de alterações funcionais que acompanham determinada doença ou síndrome.

conjunto aumenta consideravelmente de tamanho. O tamanho máximo dos vetores em aplicações para o tratamento de câncer é motivo de debate. Há relatos de que moléculas de 20 a 800 KDa foram capazes de penetrar em células tumorais (MAEDA *et al*, 2009; SEYMOUR *et al.*, 1995). Além disso, há estudos também de partículas de tamanhos variando entre 200 nm e 1,2 µm que penetraram nos tumores (DUNCAN, 1999). Dessa forma, é preciso atentar para o fato de que, apesar de o senso comum indicar que moléculas e/ou partículas grandes em demasia não podem ser usadas para aplicações para tratamento do câncer, as pesquisas indicam que a dificuldade de penetrar na célula pode também estar associada a outros fatores. Vale ressaltar também que o tamanho a que os estudos se referem é o tamanho total da molécula após a bioconjugação entre polímero, biomolécula e/ou fármaco.

A sinalização ativa é normalmente perseguida empregando técnicas de bioconjugação, como será abordado a seguir.

2.4. Bioconjugação

A bioconjugação é a ligação entre ao menos uma molécula de origem biológica a compostos sintéticos e/ou biológicos, que forma um novo complexo, sendo que as propriedades das moléculas iniciais são individualmente preservadas (BRASIL JÚNIOR, 2010). A bioconjugação é empregada na liberação de fármacos para realizar a vetorização dos sistemas de liberação. Em outras palavras, ao sistema de liberação estudado liga-se uma biomolécula capaz de reconhecer e fixar-se ao alvo desejado, de maneira a fazer com que a atuação do sistema seja específica (DIMITRIU, 2001).

A biomolécula escolhida para a realização da bioconjugação depende do alvo a ser atingido. No caso de aplicações para o tratamento do câncer, por exemplo, em que cada tumor superexpressa uma determinada molécula, a escolha da biomolécula está condicionada ao conhecimento de que tipo de tumor será o alvo.

Alguns exemplos de biomoléculas usadas com essa finalidade são: anticorpos monoclonais, aptâmeros, proteínas e affibodies®¹⁰. Dentre essas moléculas, sem dúvida

¹⁰ Affibody® é um pequeno trecho de um anticorpo, que se liga especificamente a seu respectivo antígeno, porém chega a ser cerca de 10 vezes menor que um anticorpo comum.

as mais estudadas são os anticorpos monoclonais (mAbs) ou os affibodies®, porque podem ser empregados com ou sem a associação a quimioterápicos. Quando não são incluídos antineoplásicos, no entanto, o sistema não é curativo e consegue apenas atuar impedindo o crescimento ou retraindo levemente o tumor, uma vez que os mAbs apresentam baixa citotoxicidade e baixa penetração nos tumores (IYER & KADAMBI, 2011). Segundo PEPPAS & BLANCHETTE (2004), até o ano do estudo havia apenas 6 medicamentos comerciais de liberação dirigida que empregavam anticorpos como vetores para tumores, mas nenhum dos medicamentos citados conjugava também um antineoplásico no sistema. Hoje já há ao menos dois medicamentos comerciais que realizam a liberação sítio-dirigida. O KADCYCLA® é um conjugado anticorpo-fármaco e foi aprovado pela FDA em 2013 (ANSELMO & MITRAGOTRI, 2014). O medicamento oferece tratamento para câncer de mama cujos tumores são HER2 positivos, empregando o fármaco mertansina (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016a). O KADCYCLA® é capaz de reconhecer os tumores porque à sua estrutura está ligado o trastuzumab, um anticorpo monoclonal IgG¹¹ específico para receptores HER2¹² (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016). O ADCETRIS® também é um conjugado anticorpo-fármaco indicado para o tratamento de linfoma Hodgkin CD30¹³ positivo e foi aprovado pela FDA em 2011 (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016b). O fármaco empregado é o monometil auristatina E (ANSELMO & MITRAGOTRI, 2014).

Vale ressaltar que o uso de anticorpos monoclonais pode ser muito imprevisível, porque a produção dos anticorpos é difícil e operacionalmente imprevisível, além de variar de batelada para batelada, principalmente quando o processo é escalonado. Por isso, apesar de já haver produto comercial resultante da bioconjugação entre um anticorpo monoclonal e um polímero desde 1997 (JAMES & DUBS, 1997) e das pesquisas acerca do tema serem intensas, as dificuldades apresentadas anteriormente surgem como algumas desvantagens do uso dessas biomoléculas (FAROKHZAD *et al.*, 2006).

A seguir são apresentados alguns estudos que visaram a combinar a liberação de fármacos antineoplásicos com atuações dirigidas.

¹¹ IgG, ou imunoglobulina G, é um anticorpo que recebe a subclassificação de IgG1 quando corresponde a 70% do total de IgG.

¹² HER2 é o receptor tipo 2 do factor de crescimento epidérmico humano.

¹³ CD30 é um tipo de antígeno.

HEISTER *et al.* (2009) estudaram o desenvolvimento de um potencial sistema de liberação sítio-direcionada de doxorubicina, empregando nanotubos de carbono de parede simples, bioconjugados a um anticorpo monoclonal com auxílio da albumina de soro bovino (BSA). A BSA tinha como função atuar como um ligante multifuncional entre os nanotubos e os anticorpos, como mostra a Figura 6. Os autores, no entanto, reportaram que o sistema não foi capaz de cruzar as barreiras celulares, permanecendo retido no citoplasma.

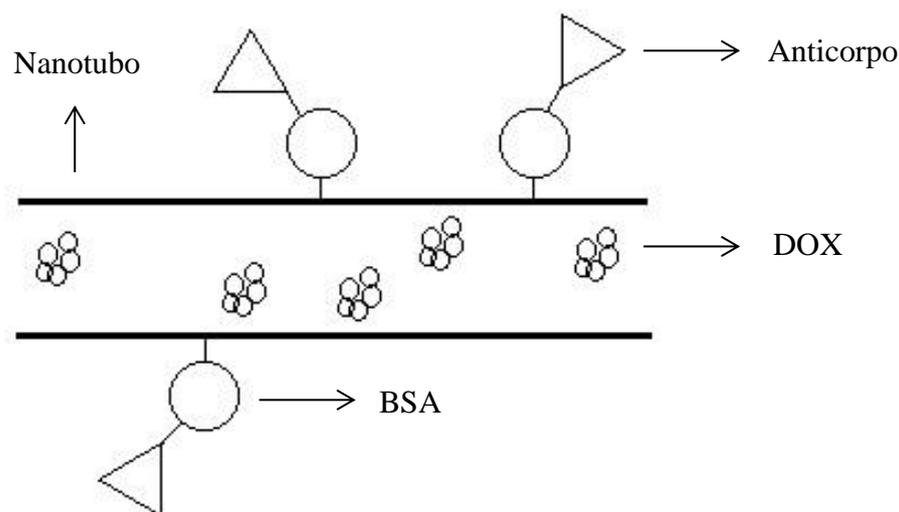


Figura 6 – Esquema da bioconjugação de nanotubos de carbono com um anticorpo monoclonal por meio de BSA (Adaptado de HEITER *et al.*, 2009).

LU *et al.* (2009) estudaram o uso de nanopartículas poliméricas bioconjugadas a padrões contendo Arg-Gly-Asp¹⁴ (RGD) para atingir as células epiteliais dos olhos. Esses padrões são vitais para os receptores envolvidos na adesão celular e, portanto, influenciam a migração, crescimento e diferenciação celular. Como as proteínas RGD impedem as integrinas¹⁵ de se ligarem a seus respectivos ligantes, o que causa a morte das células

¹⁴ A sequência Arg-Gly-Asp (arginina-glicina-asparagina) consiste em um peptídeo que é reconhecido por diferentes receptores de superfície da estrutura celular.

¹⁵ Proteínas de adesão presentes na membrana celular.

endoteliais, elas vêm sendo muito estudadas em aplicações para o tratamento do câncer, uma vez que seriam capazes de matar os vasos sanguíneos recém-formados nos tumores.

RÍHOVÁ *et al.* (2003) desenvolveram um sistema de N-2-hidroxipropil-metacrilamida conjugado a um peptídeo biodegradável, (GlyPheLeuGly) IgG, e à doxorrubicina para o tratamento de câncer. Os autores realizaram testes em 4 pacientes e mostraram progressos, observados por meio da redução dos tumores. Além disso, mostraram também que a doxorrubicina se ligou bem ao polímero e não circulou livremente na corrente sanguínea.

ALEXIS *et al.* (2008) produziram um polímero com estrutura casca-núcleo de poli(ácido láctico)/poli(etileno glicol) (PLA/PEG), encapsularam paclitaxel e bioconjugaram o sistema a um affibody®. Os autores usaram 5% em base molar da biomolécula e reportaram que o sistema proposto tem potencial para ser usado no tratamento de cânceres em que o fator de crescimento epitelial humano (HER-2) é superexpresso. Segundo VAN DER VEN *et al.* (2012), que também estudaram o uso de um affibody® como vetor para o tumor do câncer de mama, mas com objetivo que avaliar se o monitoramento do sistema poderia ser realizado por meio de diagnóstico por imagem, o HER-2 é superexpresso em aproximadamente 25-30% dos tumores do câncer de mama.

GÖSTRING *et al.* (2012) produziram vários affibodies® com afinidade por HER-3 (receptor do fator de crescimento epitelial humano) e testaram a ligação específica entre as duas moléculas com auxílio de citometria de fluxo e microscopia. Os autores reportaram que as ligações foram conseguidas com sucesso. Além disso, GÖSTRING *et al.* (2012) reportaram a existência de 2 anticorpos para HER-3 que estavam em testes clínicos. Um deles, no entanto, parecia não estar apresentando resultados positivos em termos de citotoxicidade adequada para aprovação.

MATSUMURA *et al.* (2004) produziram micelas de PEG com doxorrubicina e a bioconjugaram a ácido poliaspártico. Na realidade, o PEG, quando bioconjugado ao ácido poliaspártico, forma um copolímero em bloco que se organiza na forma de micela quando colocado em meio aquoso. Experimentos *in vitro* mostram que os sistemas foram capazes de reduzir os tumores em até 50%.

Em termos do estabelecimento de rotas bem definidas para a bioconjugação, vale ressaltar que, para a bioconjugação de proteínas, já há uma rota razoavelmente bem estabelecida, apresentada na Figura 7. Contudo, o tema da bioconjugação é bastante

extenso, não cabendo a ideia de que é possível estabelecer um procedimento padrão para todos os possíveis casos de interesse.

Dessa maneira, deve ficar claro que a técnica de bioconjugação vem sendo muito estudada e que vários grupos já reportaram sucesso das tentativas de ligar biomoléculas a compostos poliméricos. Isso indica que essas reações são viáveis e que merecem continuar sendo estudadas.

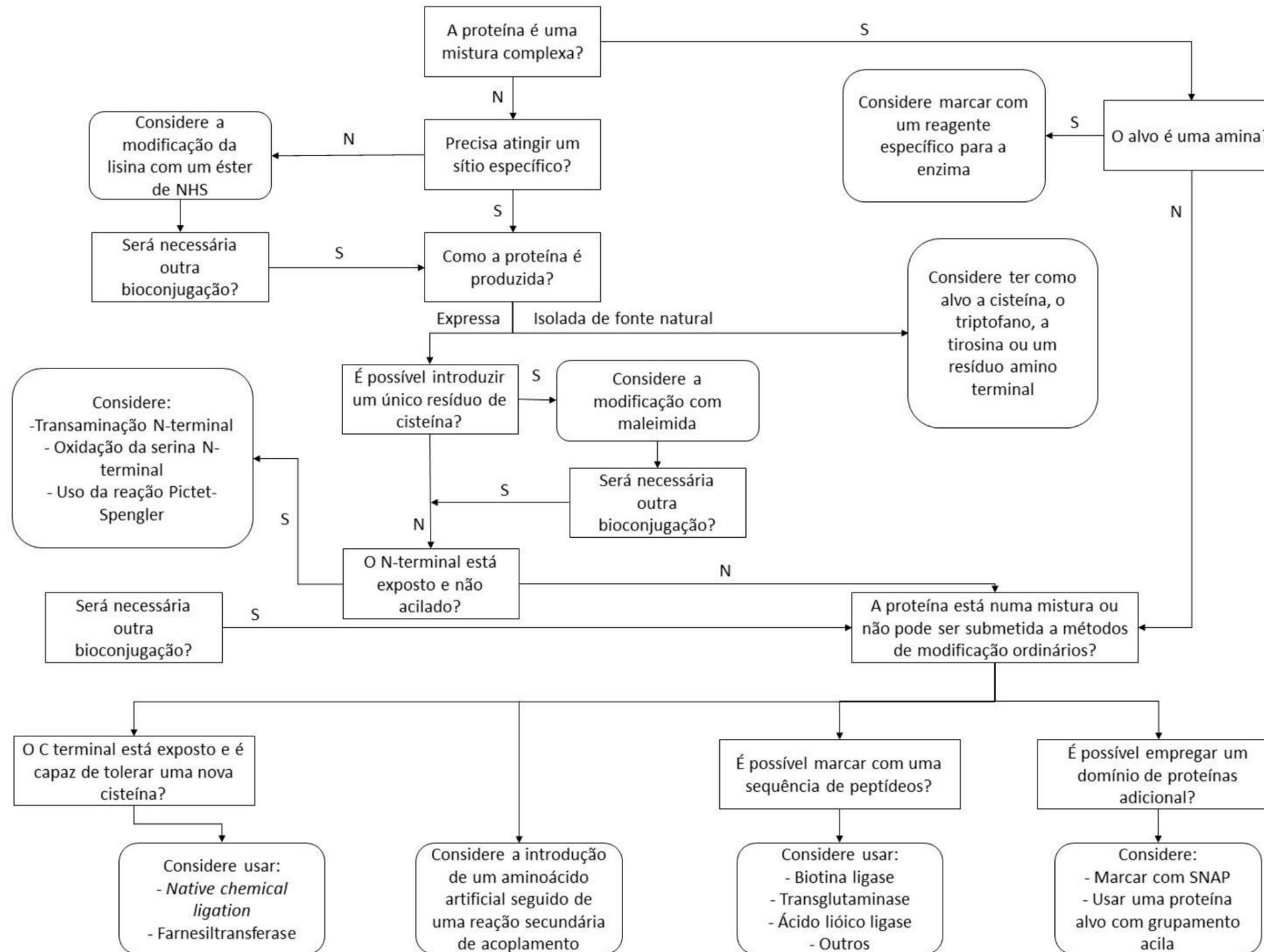


Figura 7 – Rota usual da bioconjugação com proteínas. Adaptado de STEPHANOPOULOS & FRANCIS (2011).

2.5. Click-chemistry

Uma das grandes preocupações para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos é a questão da reprodutibilidade e previsibilidade da liberação. No entanto, para tornar os sistemas de liberação previsíveis e reprodutíveis, é preciso conhecer muito bem as estruturas dos materiais empregados, as ligações que formam com os princípios ativos e a maneira com que ambos interagem com os meios biológicos. Para atingir tamanho grau de perfeição, a ciência vem se especializando a cada dia. Uma das maiores descobertas feitas recentemente e que traz uma enorme contribuição para a indústria farmacêutica foi a *click chemistry* (KOLB & SHARPLESS, 2003).

O desenvolvimento da *click chemistry* se deu a partir da observação na natureza de que as proteínas, ácidos nucleicos e demais biomoléculas preferem as ligações carbono-heteroátomo às ligações carbono-carbono. Com o objetivo de imitar o comportamento da natureza, portanto, foram desenvolvidas as reações *click*. Vale ressaltar, no entanto, que na natureza, essas reações são reversíveis, enquanto na *click chemistry* elas são irreversíveis (NWE & BRECHBIEL, 2009).

A primeira definição de *click chemistry* foi feita por K. B. Sharpless em trabalho publicado por KOLB *et al.* (2001). Segundo os autores, as reações do tipo *click chemistry* são simples, rápidas, versáteis, apresentam altos rendimentos e são também estereoespecíficas (mas não necessariamente enantiosseletivas). Por conta dessas características, vêm sendo chamadas de LEGO[®] da química (KOWOLLIK & INGLIS, 2009), como uma analogia à facilidade de montagem e encaixe perfeito dos bloquinhos de brinquedo. Além disso, as reações devem gerar produtos inofensivos, que podem ser removidos preferencialmente sem uso de técnicas cromatográficas, e devem ser conduzidas na ausência de solventes ou na presença de solventes atóxicos. Outra exigência para ser classificada como reação *click* é de que devem empregar reagentes estáveis e de simples obtenção. Vale ressaltar também que idealmente o processo deve ser insensível a interações com oxigênio e água (KOLB *et al.* 2001; GALO, 2012; FREITAS *et al.*, 2011).

As reações do tipo *click* podem ainda receber a classificação de bio-ortogonais, quando não interagem com as funcionalidades presentes nos sistemas biológicos. Mais especificamente, para ser bio-ortogonal, a reação deve ocorrer em meio aquoso, não envolver reagentes ou catalisadores tóxicos e envolver grupos funcionais que não estejam

presentes naturalmente em organismos vivos e que sejam inertes ao meio em condições fisiológicas (KOLB *et al.* 2001; LAHANN, 2009). O conceito de bio-ortogonalidade, no entanto, é bastante contraditório na literatura. A reação de Staudinger, por exemplo, que é catalisada por cobre e será discutida adiante, é apresentada como bio-ortogonal, mesmo sendo o cobre um metal pesado que está associado a uma série de distúrbios neurológicos como, por exemplo, o mal de Alzheimer (STRAUSAK *et al.*, 2001). Além disso, muitos grupos de pesquisa vêm classificando reações como de *click chemistry*, mas empregam uma enorme variedade de solventes tóxicos nos processos, o que não é aceitável pela definição proposta. Dessa maneira, nota-se que muito ainda deve ser discutido a respeito dessas novas reações, classificadas como *click chemistry*. No entanto, os benefícios e possibilidades oferecidos por essas reações são enormes; por isso, essas reações merecem ser estudadas com profundidade.

2.6. Tipos de reação *click chemistry*

No campo da bioconjugação, a ideia de que uma reação simples e de alta eficiência possa ser explorada para imobilizar ativos biológicos sobre partículas poliméricas é extremamente atraente e justifica o interesse pela *click chemistry* no presente trabalho.

A seguir são apresentadas as principais reações do tipo *click chemistry* conhecidas.

2.6.1. Cicloadição de Huisgen

A reação de Huisgen, também conhecida como cicloadição 1,3-dipolar ou ainda como CuAAC, é sem dúvida a *click chemistry* mais empregada dentre todas as reações *click* já apresentadas na literatura. Ela consiste na reação entre um alcino terminal ou interno e uma azida. Além disso, é catalisada por cobre e dá origem a 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos (LAHAN, 2009; FREITAS *et al.*, 2011), como apresentado na Figura 8.

O uso do catalisador de cobre, geralmente Cu(I), faz com que haja uma modificação no mecanismo formação do 1,2,3-triazol, que passa a ser dividido em uma série de rápidas etapas que envolvem intermediários polares, cujas estruturas definem a regioespecificidade da reação. A energia de formação dos intermediários define a velocidade da reação, que pode chegar a ser 10^7 vezes mais rápida que a velocidade da reação não catalisada (CANDUZINI, 2012; FREITAS *et al.*, 2011).

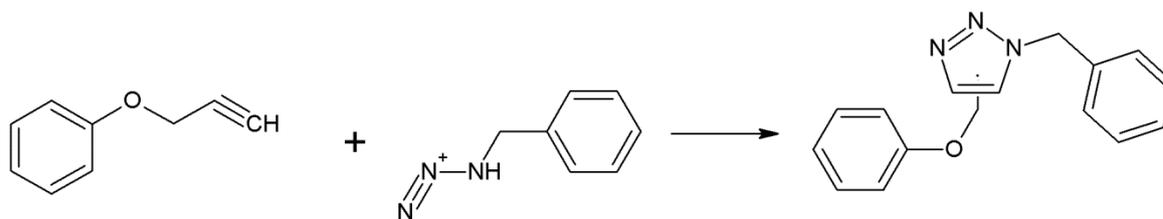


Figura 8 – Representação de uma reação de Huisgen.

Em termos de reatividade dos reagentes, vale ressaltar que a reação é facilitada quando são usadas aminas primárias ou secundárias. Isso ocorre porque a amina terciária introduz uma dificuldade de acesso, por conta do impedimento estérico. Além disso, os alcinos que contêm apenas grupamentos alquila tendem a ser menos reativos que os alcinos que apresentam grupamentos α -carbonílicos.

KOLB *et al.* (2001) observaram que, quando água era empregada como solvente, os reagentes não precisavam necessariamente estar solubilizados no meio. Para que a reação ocorresse de maneira eficiente, bastava que houvesse uma agitação eficiente para manter os materiais homogeneamente suspensos. No entanto, muitos autores são contrários a essa observação e empregam solventes orgânicos como tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), piridina, tolueno e hexano para realizar as reações em solução. Essa prática, no entanto, fere a definição de *click chemistry*, como já discutido anteriormente. Vale ressaltar que solventes que contêm grupos nitrila devem ser evitados, pois podem competir com o alcino na etapa de coordenação com o cobre (FREITAS *et al.*, 2011).

Apesar da utilização do catalisador permitir o aumento do rendimento e da seletividade da reação, além de diminuir o tempo reacional, vale destacar que a reação CuAAC apresenta algumas desvantagens. A principal desvantagem é que o cobre está associado, como já discutido anteriormente, ao desenvolvimento de hepatite, mal de Alzheimer, dentre outras doenças neurológicas, o que dificulta sua aplicação na indústria farmacêutica (STRAUSAK *et al.*, 2001). Dessa maneira, não serão aqui reportados os principais trabalhos publicados sobre a reação, uma vez que a utilização do Cu em sistemas vivos não parece ser adequado. No entanto, vale ressaltar o esforço de EISSA & KHOSRAVI (2011), que estudaram pela primeira vez a utilização da reação de Huisgen como técnica de polimerização para copolimerizar componentes hidrofílicos e hidrofóbicos baseados em poli(etileno glicol) e trealose. Os autores, preocupados com a

questão da toxicidade, empregaram fios de cobre, em lugar dos sais comumente usados, e reportaram sucesso na polimerização. Assim, após a reação, o fio de Cu era retirado do meio sem que houvesse a contaminação.

A reação de Huisgen também apresenta outras desvantagens, como a instabilidade termodinâmica dos sais de Cu(I), que normalmente exige que as reações sejam conduzidas sob atmosferas inertes e condições anidras, o que é inconveniente. Essa questão, no entanto, pode ser contornada empregando sais de Cu(II). Nesse caso, há relatos de reações que ocorrem sem a influência de oxigênio atmosférico e até mesmo em meio aquoso (FREITAS *et al.*, 2011). Outra desvantagem da reação catalisada é que as azidas, um dos reagentes principais, são em grande maioria tóxicas e/ou explosivas (LAHAN, 2009). Dessa forma, apesar de a reação CuAAC ser usada praticamente como sinônimo de *click chemistry*, deve ficar claro que há outras reações classificadas como *click* que podem ser mais apropriadas para aplicações médicas e farmacêuticas. As principais reações conhecidas serão apresentadas adiante.

2.6.2. Cicloadição [3+2]

A cicloadição [3+2], apresentada na Figura 9, nada mais é do que a reação de cicloadição 1,3-dipolar, que foi discutida anteriormente, sem a utilização do catalisador de cobre. Originalmente a reação foi observada por Michael em 1893 e desenvolvida posteriormente por Huisgen em 1967. Por isso, ela também é conhecida como a versão clássica da reação de Huisgen, porque só depois de muitos anos é que o catalisador de cobre começou a ser empregado (FREITAS *et al.*, 2011).

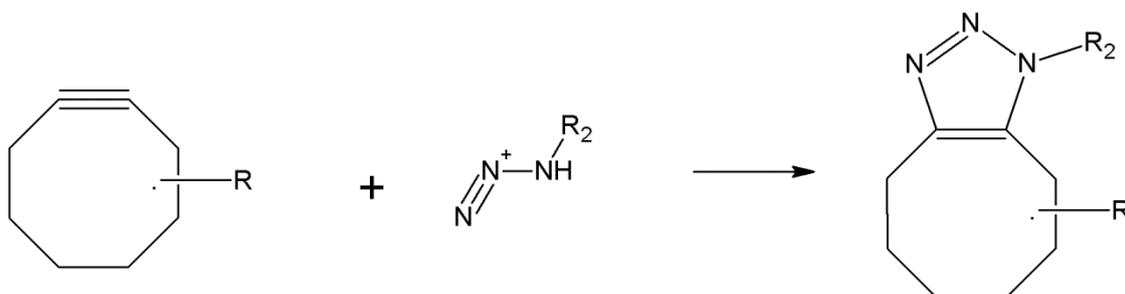


Figura 9 – Representação de uma reação de [3+2] cicloadição.

A reação térmica de Huisgen apresenta entalpias de formação entre -50 e -65 Kcal mol⁻¹, sendo, portanto, exotérmica. No entanto, a energia de ativação, que é da ordem de 25 Kcal mol⁻¹, faz com que as velocidades de reação sejam baixas para reagentes não ativados. Além disso, as diferenças de energia entre os orbitais de fronteira em determinados casos (um deles é apresentado a seguir) fazem com que sejam produzidas misturas regioisoméricas de triazóis (FREITAS *et al.*, 2011).

O método é mais vantajoso para aplicações médicas e farmacêuticas, quando comparado à reação CuAAC, devido à não utilização do cobre. No entanto, são necessários altos tempos reacionais e altas temperaturas, o que pode inviabilizar uma aplicação farmacêutica, caso sejam empregados biomoléculas ou fármacos sensíveis a condições mais extremas. Além disso, o rendimento é baixo (contrariando a ideia de *click chemistry*) e há formação de uma mistura de regioisômeros triazólicos 1,4 e 1,5-dissubstituídos quando alcinos assimétricos estão envolvidos no processo, o que não acontece na reação catalisada (FREITAS *et al.*, 2011).

2.6.3. Reação de Diels-Alder

Em 1950, Otto Diels e Kurt Alder receberam o Prêmio Nobel pela descoberta da reação de [4+2] cicloadição entre dienos e dienófilos, que mais tarde recebeu o nome de reação Diels-Alder, em homenagem a seus descobridores (HIZAL *et al.*, 2011).

A reação Diels-Alder (DA), apresentada na Figura 10, é muito utilizada para a produção de polímeros com arquiteturas moleculares complexas, cujas estruturas são difíceis de serem obtidas por outras rotas. Nesse sentido, observa-se que em geral são empregados variados dienos na reação; no entanto, a escolha do dienófilo fica quase que exclusivamente restrita à utilização de derivados de maleimida, devido à elevada reatividade, estabilidade e facilidade de incorporação nos materiais poliméricos (HIZAL *et al.*, 2011).

A temperatura afeta a reação Diels-Alder, dependendo das características dos reagentes empregados. Dessa maneira, a combinação dieno/dienófilo pode influenciar diretamente as condições reacionais e determinar a viabilidade da reação, dependendo do sistema a ser estudado. Muitas das reações DA estudadas até o momento e reportadas na literatura utilizam temperaturas entre 100 e 200 °C (HIZAL *et al.*, 2011), o que tornaria a reação inviável no caso de uma possível aplicação para a bioconjugação entre polímero e

biomolécula. No entanto, também são reportadas algumas reações, como entre o difurfuriladipato e o bismaleimidodifeniletano, que podem ocorrer a temperaturas entre 25-70 °C (TERAMOTO *et al.*, 2010; KURAMOTO *et al.*, 1994). Além disso, vale ressaltar que a reação não costuma ser afetada pela presença de outros grupos funcionais, como aminas, hidroxilas, carbonilas e carboxilas (TERAMOTO *et al.*, 2010).

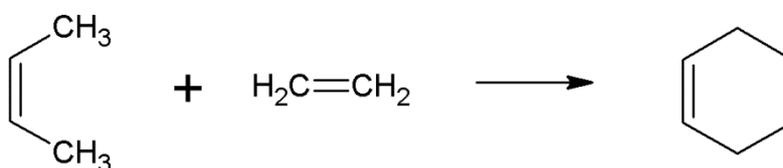


Figura 10 – Representação de uma reação Diels-Alder.

Apesar da maior aplicação da reação Diels-Alder ocorrer na produção de polímeros reticulados e/ou complexos, há grupos que estudam a reação para bioconjugação de biomoléculas, como peptídeos, proteínas e carboidratos. Nesse caso, a reação normalmente se dá em fase aquosa e a biomolécula precisa ser modificada, de forma a apresentar a ligação dupla característica da reação. Um dos materiais usados para modificação das biomoléculas, por exemplo, é o 2,4-hexadieniléster (HERMANSON, 2013).

A reação Diels-Alder foi apresentada pela primeira vez em 1948 e cerca de 10 anos depois foi descrita também pela primeira vez a reação Diels-Alder inversa. As principais características dessa reação são que a demanda de elétrons é inversa, a reação é irreversível, rápida e apresenta altíssimos rendimentos, não emprega catalisador e ocorre a temperatura ambiente. Com relação à classificação, diz-se que a demanda de elétrons é inversa porque na DA convencional os dienos são ricos em elétrons e os dienófilos são pobres em elétrons, enquanto que na DA inversa os dienos são pobres em elétrons e os dienófilos são ricos em elétrons (PIPKORN *et al.*, 2011).

Uma das principais desvantagens do uso da reação Diels-Alder para bioconjugação é o fato de ser necessário modificar a biomolécula. Apesar de em alguns casos a modificação parecer trivial, há sempre um risco muito grande associado à manipulação de proteínas, peptídeos e carboidratos, pois essas moléculas apresentam

estrutura tridimensional complexa. Dessa maneira, uma pequena alteração na estrutura pode acarretar em perda irreversível de atividade.

2.6.4. Reação de condensação de aldeídos e cetonas com α -aminas

Historicamente, a primeira reação tratada como bio-ortogonal foi a de condensação de aldeídos e cetonas com aminas presentes em sistemas biológicos. Entretanto, embora essa reação seja possível, ela é termodinamicamente desfavorável na presença de água (SLETTEN & BERTOZZI, 2009). Por isso, ao invés de aminas convencionais, começou-se a utilizar α -aminas¹⁶, como hidrazidas e hidroxilaminas, que permitem que o equilíbrio seja bastante deslocado para a produção de hidrazonas e oximas, como apresentado na Figura 11 (LAHANN, 2009).

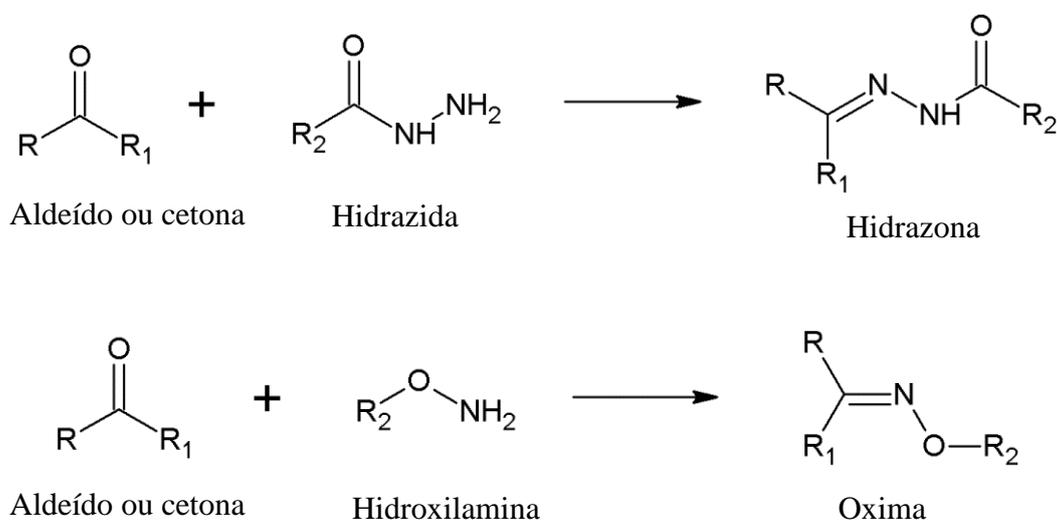


Figura 11 – Representação de reações de condensação de aldeídos e cetonas com hidrazidas e hidroxilaminas (Adaptado de LAHANN, 2009).

Essa reação não é totalmente bio-ortogonal, entretanto, devido ao fato de ocorrer preferencialmente em pH 3 a 6, ao invés de ocorrer em pH fisiológico (pH 7,4). Além

¹⁶ As α -aminas são aminas cujo heteroátomo é mais nucleofílico que aminas convencionais.

disso, apesar dos grupos funcionais aldeído e cetona não estarem presentes na superfície celular, eles aparecem como metabólitos intracelulares. Por conta disso, a utilização desse tipo de reação para bioconjugação em sistemas vivos é limitada (SLETTEN & BERTOZZI, 2009; LAHANN, 2009).

2.6.5. Reação de Staudinger

A reação de Staudinger, descoberta em 1919, foi nomeada em homenagem a seu inventor, Hermann Staudinger, mas só foi modificada de maneira a apresentar o procedimento atual por Saxon e Bertozzi em 2000 (BERKEL *et al.*, 2011). Ela é uma reação verdadeiramente bio-ortogonal, já que nenhum de seus reagentes ou produtos interage com o meio biológico e consiste na ligação entre azidas orgânicas e fosfinas terciárias, como indicado na Figura 12 (SAXON & BERTOZZI, 2000; ZHANG & ZHANG, 2013).

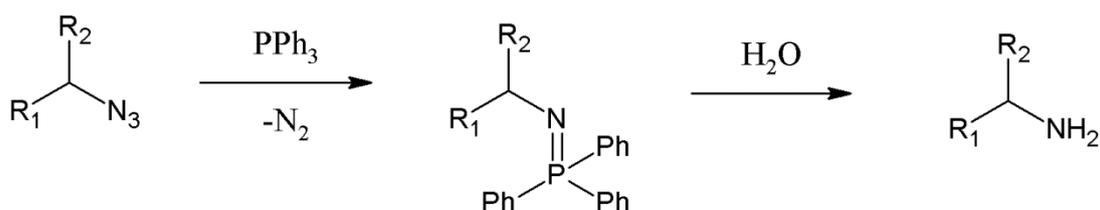


Figura 12 – Representação de uma reação de Staudinger.

As principais desvantagens desse tipo de reação são que as fosfinas são oxidadas lentamente pelo ar em sistemas vivos. Além disso, as fosfinas podem ser metabolizadas pelas enzimas do citocromo P450¹⁷. Outro problema associado a esse tipo de reação é que a manipulação das azidas orgânicas deve ser feita com extrema cautela, uma vez que elas são em grande maioria explosivas (LAHAN, 2009).

¹⁷ Citocromo P450 é uma superfamília ampla e diversificada de proteínas responsáveis por oxidar um grande número de substâncias para torná-las mais polares e hidrossolúveis.

2.6.6. Reações tiol-eno e tiol-ino (tiol-x)

As reações tiol-eno são reações de hidrotiolação de alcenos, como indica a Figura 13. Esse tipo de reação apresenta como principal característica o fato de poder ocorrer por iniciação radicalar, por processos catalíticos mediados por nucleófilos, ácidos e bases (recebem o nome de reações Tiol-Michael) ou ainda apenas na presença de solventes polares, como a água e o DMF. Além disso, a variedade de alcenos que pode ser empregada é grande e inclui tanto alcenos ativados¹⁸ quanto não ativados. Ao menos teoricamente, qualquer tiol pode ser usado na reação, o que facilita a escolha dos reagentes (LOWE, 2010).

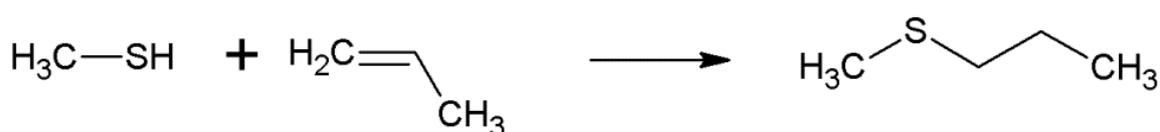


Figura 13 – Representação de uma reação tiol-eno.

O procedimento mais adotado para a condução das reações tiol-eno é o que faz uso de iniciadores radicalares. Nessas reações é mais comum empregar fotoiniciadores, mas os iniciadores térmicos também podem ser utilizados. Dessa maneira, o mecanismo reacional é como o de uma polimerização via radicais livres e apresenta as etapas de iniciação, propagação e terminação. Os mecanismos da polimerização e da reação tiol-eno podem ser comparados observando a Figura 4 e a Figura 14. M, representado na Figura 4, nesse caso, representa a molécula que contém o grupamento tiol. Vale ressaltar que a adição ocorre segundo orientação anti-Markovnikov (LOWE, 2010).

¹⁸ Alcenos ativados são aqueles que apresentam deficiência de elétrons devido à presença de grupos laterais que os atraem.

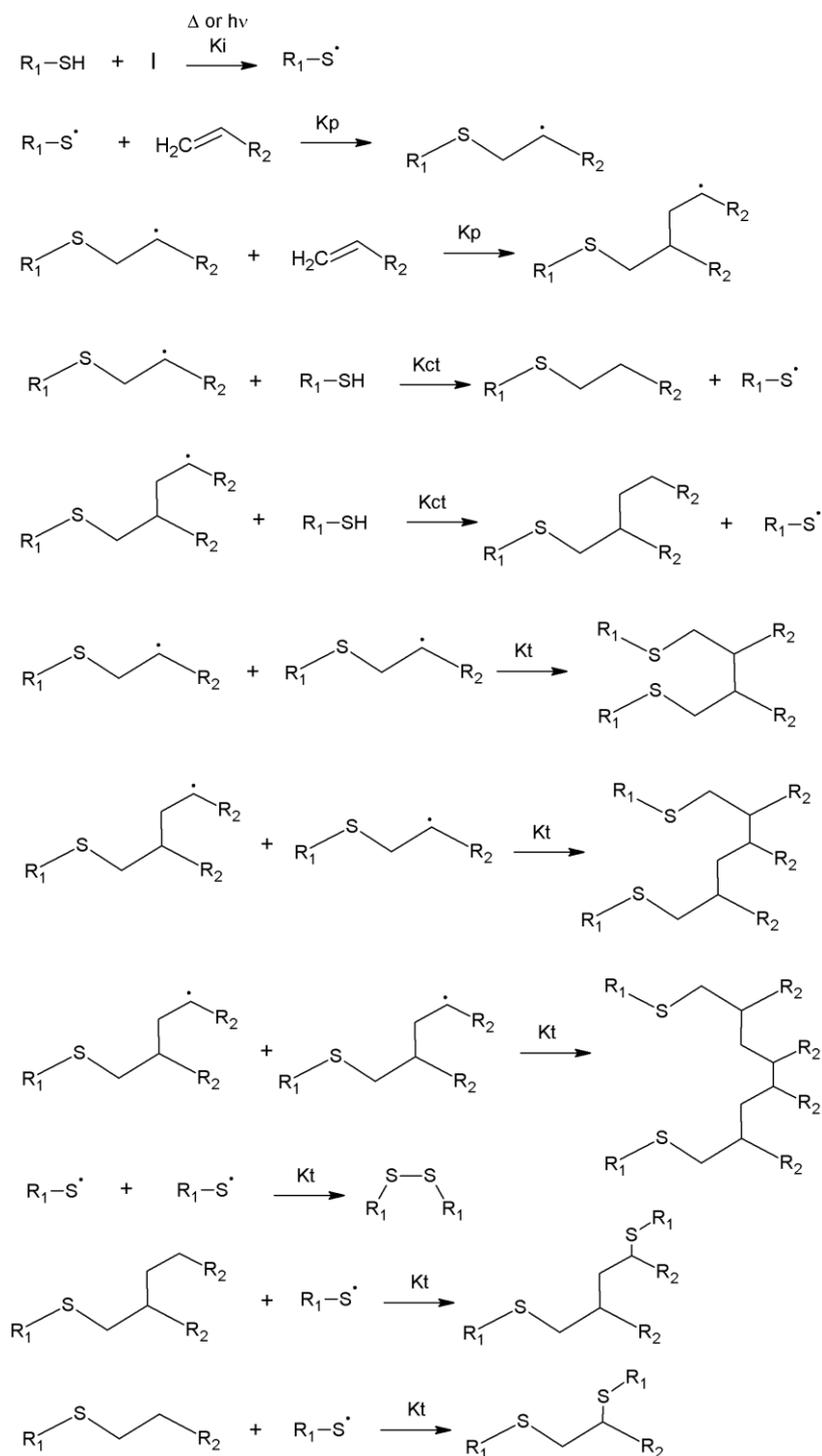


Figura 14 – Mecanismo das reações tiol-eno.

Há uma escala de reatividade dos tióis com os alcenos que serve como base para a escolha adequada dos reagentes que se deseja empregar e ela é apresentada a seguir, em ordem decrescente de reatividade: norborneno > vinil éter > propenil > alceno ~ vinil

éster > N-vinilamida > aliléter ~ aliltriazina ~ alilisocianurato > acrilato > maleimidas N-substituídas > acrilonitrila ~ metacrilatos > estireno > dienos conjugados (HOYLE *et al.*, 2004). Essa escala vale para os três tióis mais estudados: alquil 3-mercaptopropionatos, alquil tioglicolatos e alquiltióis, sendo que os dois primeiros são mais reativos que o terceiro. Além disso, há relatos de que alcenos terminais chegam a ser até 18 vezes mais reativos que alcenos internos, embora a reação possa ocorrer com qualquer tipo de dupla ligação (HOYLE *et al.*, 2004). Muitos reagentes apresentam problemas, como elevada toxicidade, inflamabilidade ou corrosividade. Dessa maneira, embora a busca pela dupla tiol-eno ideal para a reação deva ser iniciada observando a ordem de reatividade, deve-se atentar para o fato de que esses reagentes são em sua grande maioria bastante perigosos.

São muitos os fatores que influenciam a cinética das reações tiol-eno. Entre eles estão a polaridade e o pH do solvente utilizado, a concentração e força do ácido ou base empregado como catalisador e o tamanho da cadeia e número de substituintes dos reagentes (impedimento estérico). No entanto, o tempo reacional costuma ser da ordem de segundos, mesmo em condições de temperatura e pressão ambientes (NAIR *et al.*, 2014). Vale ressaltar também que a reação não costuma ser afetada pela presença de oxigênio atmosférico.

As reações tiol-ino são reações de hidrotiolação de alcinos e ocorrem de maneira muito similar à reação tiol-eno. A principal diferença entre elas é basicamente a estrutura de um dos reagentes principais: utiliza-se um alceno na tiol-eno e um alcino na tiol-ino. Essa diferença faz com que as reações tiol-ino sejam muito empregadas para produção de polímeros com estruturas complexas e reticuladas. Isso ocorre porque, mesmo após a reação com a molécula que contém o grupamento tiol, o produto formado continua contendo uma dupla ligação (como apresentado na Figura 15), que pode reagir novamente com outra mercaptana, como em uma reação tiol-eno (BROSNAN & SCHLAAD, 2014; LOWE *et al.*, 2010).



Figura 15 – Representação de uma reação tiol-ino.

Em termos cinéticos, há relatos de que a primeira etapa da reação tiol-ino, que dá origem a um sulfeto vinílico, é cerca de três vezes mais lenta que a reação a segunda etapa da reação (LOWE *et al.*, 2010).

A seguir serão apresentados alguns dos principais trabalhos já publicados acerca das reações do tipo tiol-eno, já que esta reação foi a escolhida para a realização dos experimentos deste trabalho.

GOLDMANN *et al.* (2009) estudaram a funcionalização de micropartículas de poli(divinilbenzeno) por meio da reação tiol-eno. Os autores reportaram a presença de duplas ligações terminais na estrutura capazes de fazer ligações com as moléculas de tiol testadas. Nesse caso, foram usados AIBN como iniciador e solventes orgânicos, de maneira que o sistema reacional era homogêneo.

ANTONIUK *et al.* (2014) reportaram o uso de *click chemistry* do tipo tiol-eno para ligar pequenas moléculas de PEG-acrilato à β -ciclodextrina e à dextrana. A ideia dos autores era empregar o polímero como espaçador entre as biomoléculas, para que elas fossem conjugadas posteriormente a outros materiais, utilizando outras reações do tipo *click*. O sistema proposto apresentou bons resultados em termos de reconhecimento pelo alvo, sendo, portanto, adequado para aplicação na liberação sitio-direcionada de fármacos.

BOYER *et al.* (2009) estudaram a aplicação da reação tiol-eno para modificação dos polímeros produzidos via polimerização RAFT¹⁹. Nesse tipo de polimerização, o produto final contém grupamentos tiol em sua estrutura, o que em muitos casos é desvantajoso. Os autores realizaram a reação na presença de DMF e, apesar da reação *click* ocorrer como esperado, BOYER *et al.* (2009) reportaram a ocorrência de muitas reações laterais, com a formação de subprodutos indesejados.

SO YOUNG *et al.* (2014) estudaram a possibilidade de modular as propriedades térmicas e mecânicas de polímeros à base de metacrilato, empregando a reação tiol-eno. Para isso, os polímeros foram modificados com auxílio de cloreto de pentenoíla para inserir duplas ligações terminais na cadeia. Em seguida, era realizada a reação *click*. Os autores mostraram que foi possível modular as propriedades pretendidas com sucesso.

¹⁹ Transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação (RAFT) é uma técnica de polimerização que permite sintetizar polímeros com excelente controle da distribuição do tamanho das cadeias.

KILLOPS *et al.* (2008) produziram dendrímeros por meio das reações *click chemistry* tiol-eno, que foram usadas para funcionalizar os grupamentos terminais das cadeias. Algumas das reações foram conduzidas em solventes tóxicos, mas em uma delas, em que foi empregado o ácido tioglicólico, a reação foi conduzida em meio aquoso. Todas as reações estudadas foram catalisadas pelo 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona, um fotoiniciador.

CAMPOS *et al.* (2008) estudaram a inserção de duplas ligações terminais em diversos polímeros via polimerização do tipo RAFT e ATRP²⁰ e em seguida testaram a eficiência das reações tiol-eno iniciadas termicamente e fotoquimicamente. Os autores realizaram as reações *click* em solução e reportaram que, apesar de a reação poder ocorrer sem adição de solventes, no momento em que eles eram empregados costumava ser necessário realizar purga com nitrogênio para prevenir a oxidação do iniciador. Além disso, CAMPOS *et al.* (2008) descobriram que a reação fotoiniciada resultou em maiores rendimentos, maior seletividade e menores tempos de reação. No entanto, apesar de o trabalho ser bastante completo e interessante, vale ressaltar que os polímeros obtidos foram produzidos depois de uma série de etapas que empregavam solventes e reagentes tóxicos. Dessa maneira, seria interessante simplificar o processo de inserção das duplas ligações nos materiais.

Os trabalhos descritos anteriormente mostram que a reação *click chemistry* do tipo tiol-eno, assim como as demais, vêm sendo muito estudadas para as mais diferentes aplicações. Além disso, esse tipo de reação parece permitir a utilização de uma gama enorme de reagentes, tanto do tipo tiol quando do tipo alceno.

2.7. A *click chemistry* e os polímeros

A *click chemistry* vem sendo muito estudada para a produção de polímeros com arquiteturas moleculares complexas. No entanto, não cabe aqui uma revisão sobre o assunto, uma vez que essa aplicação da *click* não é tema do estudo. Contudo, as reações *click* podem ser também empregadas para a realização da conjugação do polímero à

²⁰ Polimerização radicalar por transferência de átomos (ATRP) é uma técnica de polimerização que permite sintetizar polímeros com excelente controle da distribuição do tamanho das cadeias.

biomolécula. Alguns dos principais trabalhos que fazem uso dessa aplicação são comentados a seguir.

ORTEGA *et al.* (2013) estudaram a bioconjugação da heparina, um polissacarídeo, com a poli(N-isopropil-acrilamida), um hidrogel. Para realizar a bioconjugação, os autores escolheram a reação de Huisgen catalisada. Vale ressaltar que, para que fosse possível realizar a reação *click*, foi necessário modificar a biomolécula de maneira a inserir uma tripla ligação na estrutura do polissacarídeo. O produto obtido após a bioconjugação provou ser sensível a alterações de temperatura e de pH.

LUTZ *et al.* (2006) bioconjugaram o poli(oligo-etilenoglicol-acrilato) a um pequeno peptídeo (GGRGDG), também empregando a reação catalisada de Huisgen. Assim como no caso de ORTEGA *et al.* (2013), foi necessário realizar a modificação da biomolécula, de maneira a inserir um grupo alcino na estrutura. Vale ressaltar que a etapa de modificação nesse caso específico fez uso de um solvente que é aceito pela indústria farmacêutica, a N-metil-2-pirrolidona. No entanto, na etapa de modificação do peptídeo foram empregadas substâncias tóxicas, como o diclorometano e a acetonitrila. Os autores propuseram que a rota estudada fosse considerada como rota universal para a conjugação de polímeros a biomoléculas. No entanto, essa generalização parece bastante precipitada, porque ao usar polímeros e/ou biomoléculas diferentes das estudadas, vários fatores podem ser alterados, como a solubilidade dos componentes nos solventes estudados e a reatividade.

PARRISH *et al.* (2005) sintetizaram copolímeros à base de lactonas e outros monômeros insaturados, de maneira a produzir polímeros com insaturações pendentes. Em seguida os autores bioconjugaram os polímeros a peptídeos RGD modificados, de maneira a conter um grupo azida na estrutura. Mais uma vez, no entanto, foi empregado um solvente tóxico no processo.

O'CONNOR *et al.* (2014) estudaram a bioconjugação de peptídeos RGD ao poli(alil glicidil éter) via reação de Huisgen catalisada e via reação tiol-eno. O'CONNOR *et al.* (2014) primeiro testaram a reação tiol-eno, mas não obtiveram sucesso, o que foi atribuído à necessidade de existirem resíduos terminais livres de cisteína no meio. Os autores sugeriram que os resíduos podiam estar comprometidos em ligações dissulfeto ou ainda que havia dificuldades de acesso por conta de impedimento estérico. Em seguida, foi testada a reação catalisada por cobre e também não foi observada a ocorrência da *click*

chemistry. Os autores sugeriram então que o poli(alil glicidil éter) podia não ser adequado para a aplicação em bioconjugação nas condições testadas.

O trabalho de O'CONNOR *et al.* (2014) mostra que, apesar de a literatura indicar que as reações *click* são simples, a execução das reações pode não ser trivial. Além disso, muitos dos grupos de pesquisa fizeram uso de solventes tóxicos para obter sucesso, o que fere a definição original de *click chemistry* (KOLB *et al.*, 2001).

2.8. Funcionalização de polímeros

A técnica de funcionalização consiste em modificar um dado material de maneira a inserir grupos funcionais reativos em sua estrutura, para que ele possa ser empregado posteriormente, por exemplo, em reações de bioconjugação. Principalmente quando se trata da *click chemistry*, a etapa de funcionalização do polímero e/ou da biomolécula torna-se praticamente obrigatória. Isso ocorre porque as reações *click* exigem que os materiais contenham grupos funcionais reativos pouco comuns, como azidas, fosfinas ou duplas ligações pendentes. No caso dos polímeros, isso é particularmente verdadeiro, uma vez que as duplas ligações são tipicamente consumidas durante a polimerização. Nas últimas seções, vários exemplos de trabalhos que realizaram a etapa de funcionalização antes das reações do tipo *click* foram citados. Aqui são citados alguns outros trabalhos que funcionalizaram polímeros com objetivos variados.

SU *et al.* (2011) estudaram a resposta de sistemas de liberação sensíveis a alterações de pH. Os autores aproveitaram o fato de que o antineoplástico escolhido, o bortezomib, reage com o 1,2-diidroxibenzeno de forma reversível, quando o pH do meio é reduzido. Por isso, SU *et al.* (2011) testaram o uso de poli(etileno glicol) derivatizado com moléculas de 1,2-diidroxibenzeno e bioconjugadas a biotina. Os testes de citotoxicidade em células tumorais e sadias indicaram que o sistema atuou de maneira específica, agindo preferencialmente nas células tumorais.

PEIXOTO (2013) estudou a modificação da superfície de partículas de poli(metacrilato de metila) por meio da copolimerização com ácido acrílico, ácido metacrílico, 2-dimetilamino etil metacrilato e 2-hidroxietil metacrilato. Os resultados dos testes de adsorção com albumina de soro bovino (BSA) indicaram que os materiais foram capazes de imobilizar cerca de 15 a 35% da solução de proteína inicial. Foram também

feitos testes de viabilidade celular *in vitro*, que indicaram que os adsorventes produzidos não são tóxicos.

BICAK *et al.* (2006) modificaram primeiro o monômero, antes de realizar a polimerização. O objetivo principal dos autores consistiu em inserir duplas ligações pendentes na estrutura do material. Para isso, reagiram o anidrido maleico com a alilamina e provaram que apenas as insaturações referentes ao anidrido maleico participaram das reações de polimerização, enquanto as duplas ligações da alilamina permaneceram disponíveis.

UYGUN *et al.* (2010), por sua vez, produziram copolímero de estireno com 3-bromo-1-propeno contendo duplas ligações pendentes na presença de AIBN. O objetivo dos autores foi inserir as insaturações para utilizar esse polímero posteriormente em reações de bioconjugação via reação tiol-eno.

DAS & THEATO (2016) publicaram um artigo de revisão que apresenta variadas maneiras de adicionar grupamentos éster ativados a polímeros. Em especial, o uso de monômeros contendo N-hidroxisuccinimida (NHS) atrai muito a atenção dos pesquisadores com esse objetivo. Os autores também ressaltam que técnicas mais avançadas de polimerização, como a ATRP e a NMP, que são respectivamente polimerização radicalar por transferência de átomos e polimerização mediada por nitróxido, iniciaram uma nova era na síntese de polímeros. Essas novas técnicas permitem o desenvolvimento de estruturas funcionalizadas altamente complexas.

Dessa maneira, fica clara a importância da técnica de funcionalização dos polímeros para as mais variadas aplicações. Vale ressaltar que as biomoléculas também podem ser modificadas de maneira a conterem grupos funcionais de interesse para a bioconjugação. No entanto, como já discutido, elas apresentam estrutura muito complexa e são muito sensíveis. Dessa maneira, qualquer tentativa de modificação pode ocasionar perda irreversível de atividade. Portanto, nesse trabalho buscamos evitar a manipulação de biomoléculas.

2.9. Comentários Finais

É inquestionável que é necessário buscar novas alternativas para tratar o câncer, já que, além de ser uma das doenças que mais mata no mundo, o tratamento empregado atualmente pode causar outros prejuízos à saúde do paciente. Dessa maneira, grupos de

pesquisa em todo o mundo vêm estudando o uso de sistemas de liberação sítio-direcionados com o objetivo de contornar esse problema. No entanto, apesar do enorme interesse pelo tema, apenas alguns poucos sistemas de liberação que propõem conjugados anticorpo-fármaco já tiveram aprovação para comercialização. Além disso, nenhum sistema que tenha unido as técnicas de encapsulamento de fármacos em sistemas poliméricos com a técnica de vetorização empregando biomoléculas obteve sucesso até hoje.

Com relação à bioconjugação entre os polímeros e os vetores, um dos tipos de reação mais atuais e que despertou bastante interesse dos pesquisadores foi a *click chemistry* (KOLB & SHARPLESS, 2003). A *click chemistry* tornou-se popular por apresentar algumas vantagens, como o fato de ser simples, atóxica, de alto rendimento e alta especificidade (KOLB *et al.*, 2001).

No entanto, foram observadas também pequenas inconsistências e algumas falhas ou lacunas não preenchidas pela literatura acerca da *click chemistry*. Uma das inconsistências detectadas foi a de que não há consenso a respeito de se é necessário conduzir o experimento em solução para que haja reação. Há grupos que reportam sucesso utilizando sistemas heterogêneos (KOLB *et al.*, 2001; CAMPOS *et al.*, 2008), mas a grande maioria dos autores apenas realiza as reações em solução sem nem mesmo discutir essa possível necessidade. KOLB *et al.* (2001) reportaram que, quando a água é utilizada como solvente, a solubilização dos reagentes no meio pode não ser necessária. Os autores defendem que apenas a agitação, se conduzida de maneira eficiente, já seria capaz de manter os materiais sólidos suspensos e garantir a ocorrência da reação. Outro exemplo bem-sucedido da *click chemistry* em meio heterogêneo foi reportado por DECAN *et al.* (2014) que estudaram o uso de nanopartículas de cobre como catalisador para reações do tipo CuAAC. Os autores observaram que apenas um evento catalítico foi detectado por nanopartícula em um dado período e que o produto formado tinha tempo de residência de cerca de 3 segundos na superfície do catalisador. ZHAO *et al.* (2010) por sua vez, estudaram a modificação da celulose em seu estado sólido nativo via *click chemistry* do tipo tiol-eno fotoiniciada. Na reação, a celulose sólida foi adicionada a uma solução de 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona e irradiada por 1 hora e os autores também reportaram o sucesso da reação.

Apesar, portanto, de existirem trabalhos que reportaram o sucesso de reações *click* em meio heterogêneo, a grande maioria das publicações realizou os experimentos em

meio homogêneo (ARSLAN *et al.*, 2014; AL KAABI & VAN REENEN, 2009; PIPKORN *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2011; FARLEY & SAUNDERS, 2014; CAMPOS *et al.*, 2008; CLAUDINO *et al.*, 2012; GOLDMANN *et al.*, 2009). Na realidade, alguns autores utilizam como justificativa para a não ocorrência de *click* em suas reações o fato de os reagentes serem incompatíveis com os solventes empregados, o que torna o meio heterogêneo (MAGENAU *et al.*, 2010). Dessa maneira, fica claro que não parece haver consenso sobre a necessidade ou não de se conduzir reações *click* em solução. Nesse ponto, vale ressaltar que muitos produtos poliméricos são obtidos na forma de suspensões ou emulsões em água, o que justifica a necessidade de conduzir reações em ambientes heterogêneos.

Além disso, um dos maiores problemas em conduzir as reações em meio homogêneo reside no fato dos solventes empregados serem altamente tóxicos. Alguns exemplos dos solventes mais utilizados e reportados na literatura são: THF, DMF, clorofórmio, diclorometano e outros tão ou mais tóxicos que os solventes já citados. Essa prática, além de inviabilizar a aplicação dos materiais em produtos farmacêuticos, fere diretamente a definição de *click chemistry*, que não permite o uso de solventes tóxicos. Ademais, a realização das reações em meio heterogêneo permite a obtenção do material sob a forma de látex ou ainda na forma de pequenas partículas após a secagem. Essa condição se aproxima muito da maior parte das aplicações que envolvem bioconjugação. Portanto, a possibilidade de realizar as reações tiol-eno em meio heterogêneo seria muito vantajosa para o desenvolvimento de produtos médicos e farmacêuticos.

Outro aspecto prático comumente negligenciado e que se refere mais especificamente às reações tiol-eno é o efeito do uso de diferentes iniciadores radiculares. O mecanismo das reações tiol-eno não especifica o tipo de iniciador gerador de radicais livres mais adequado, o que provavelmente explica o fato de o AIBN ser quase que exclusivamente utilizado como iniciador térmico nas reações reportadas na literatura. Na realidade, pouquíssimos autores apresentaram tentativas de emprego de outros iniciadores térmicos, como o persulfato de potássio e o peróxido de benzoflona, apesar do uso desses materiais ser muito mais usual em operações reais da indústria, devido aos preços reduzidos e aos procedimentos de manuseio mais seguros (UYGUN *et al.*, 2010).

Adicionalmente, as reações *click* já reportadas e relacionadas à conjugação de polímeros são extremamente complexas e normalmente requerem a execução de

múltiplas etapas de reação e purificação (BOYER *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2008). Isso faz com que o procedimento se torne muito complexo e de difícil reprodução.

No presente trabalho, um dos objetivos principais foi, portanto, o de conduzir reações tiol-eno em meio heterogêneo de maneira simples e fazendo uso de reagentes comuns e não-tóxicos (sempre que possível). Por isso, nesta primeira parte do trabalho foi proposto uso da reação de *click chemistry* do tipo tiol-eno para realizar a bioconjugação de polímeros contendo duplas ligações pendentes a moléculas de cisteína, que contém grupamentos SH em sua estrutura, que é um resíduo comum em muitas biomoléculas reais. Por essa razão, a cisteína, cuja estrutura química é apresentada na Figura 16, é usada aqui como molécula modelo para o estudo.

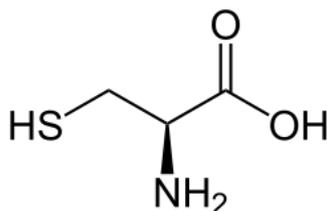


Figura 16 – Estrutura química da cisteína.

Capítulo III

Materiais e Métodos: Parte I

3.1. Materiais

Os materiais utilizados nos experimentos preliminares conduzidos no presente trabalho e suas respectivas origens e purezas são listados a seguir.

3.1.1. Reagentes

Todos os reagentes empregados na primeira parte do trabalho são descritos a seguir. É importante ressaltar que nenhum deles passou por etapas de purificação antes de serem utilizados. A pureza é reportada sempre em base mássica.

- 1,5-Hexadieno da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 97%;
- Ácido acético da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,7%;
- Ácido ascórbico da marca Proquimios (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,7%;
- Ácido-3-mercaptopropiônico da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Água destilada, usada como meio de dispersão nas reações;
- Azobisisobutironitrila de marca Akzo Nobel (Holanda) com pureza mínima de 99%;
- Borohidreto de sódio da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;

- Cloridrato de cisteína da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 98%;
- Clorofórmio deuterado da marca Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Estados Unidos) e pureza mínima de 99,8%;
- Diclorometano da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 97%;
- Dimetilsulfóxido da marca Nuclear (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Divinilbenzeno (mistura de isômeros do tipo orto-divinilbenzeno e para-divinilbenzeno) da marca Merck (Alemanha) com pureza mínima de 65% e contendo etil-estireno (até 35%) e estabilizado por 4-tert-butil-pirocatecol (até 0,25%);
- Estireno da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Etanol da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,8%;
- Dimetacrilato de etilenoglicol da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) e pureza mínima de 98%;
- L-Cisteína da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) e pureza mínima de 97% (Lote:MKBH3198V);
- N,N-dimetilformamida da marca VETEC (Rio e Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Peróxido de benzoíla da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99% e contendo 25% de umidade;
- Persulfato de potássio da marca Proquimios (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;

- Tetrahidrofurano da marca Tedia (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Tolueno da marca Tedia (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,5%.

3.1.2. Equipamentos e acessórios

- Placa de agitação (IKA, modelo C-MAG HS7, Alemanha) com controle de temperatura por meio de termopar (IKA, modelo ETS-D5) - Utilizada para agitação e controle de temperatura das reações;
- Balança analítica com capacidade para pesar materiais de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A, Brasil) - Utilizada na pesagem de reagentes e produtos reacionais;
- Bécheres com capacidades variando entre 50-500 mL, utilizados para preparo de soluções e pesagem de reagentes;
- Tubos de ensaio;
- Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (Thermo, modelo Nicolet 6700 equipado com detector DTGS KBr, Estados Unidos) – Utilizado para análises de FTIR das amostras;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (Varian Mercury, modelo VX300, com frequência de 300.2 MHz e sonda de 5 mm, Estados Unidos) – Utilizado para determinar as estruturas químicas dos produtos formados.
- Cromatógrafo de Permeação em Gel (Viscotek, modelo VE2001 GPC Solvent/Sample Module equipado com uma pré-coluna Shodex KF-G, duas colunas Shodex KF-804 e uma coluna Shodex KF-805, além de detector refratométrico Viscotek, modelo VE3580, e detector UV Viscotek, modelo 2500, setado para 255nm e equipado com lâmpada de deutério, Estados Unidos) – Utilizado para determinação das massas molares dos polímeros.

3.2. Métodos

Os experimentos foram conduzidos sempre seguindo duas frentes. Um conjunto de experimentos visava a inserir ligações duplas terminais nas cadeias poliméricas estudadas, enquanto outro conjunto de experimentos visava a testar a ocorrência de reações *click* tiol-eno. Os procedimentos adotados para cada uma das reações são descritos detalhadamente a seguir.

3.2.1. Reações de polimerização em massa

Foram realizadas reações de polimerização em massa do estireno com e sem a adição de diferentes comonômeros divinílicos para avaliar a possibilidade de inserção de ligações duplas pendentes na cadeia polimérica, visando à posterior bioconjugação via *click chemistry* do tipo tiol-eno. Os comonômeros testados foram o 1,5-hexadieno, o divinilbenzeno (DVB) e o dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA). As reações foram conduzidas em tubos de ensaio a 85 °C e tiveram duração de 4h30min. Optou-se por iniciar os testes com a polimerização em massa porque ela é mais simples e está sujeita a menor influência da presença de outros componentes (ODIAN, 2004).

Para que fosse possível acompanhar a cinética das reações, o procedimento foi conduzido em múltiplos tubos de ensaio contendo a mistura reacional mãe previamente preparada com 1g do iniciador peróxido de benzoíla e 25 g de estireno (nos casos em que foi realizada copolimerização, 5% do estireno foi substituído pelo respectivo comonômero). Após a solubilização do iniciador na solução mãe em um bécher, a cada tubo de ensaio foram adicionados 2 g da mistura e colocados em um banho de etilenoglicol já na temperatura de reação. A opção pelo banho de etileno glicol foi feita para facilitar a limpeza do tubo antes da pesagem, minimizando os erros experimentais. A utilização de silicone dificulta a limpeza e introduz um erro de pesagem que pode comprometer o cálculo da conversão.

Cada tubo então era retirado em tempos pré-determinados (10 min, 30 min, 1h, 1h30min, 2h, 2h30min, 3h, 3h30min, 4h e 4h30min) e a eles eram adicionadas 10 gotas de solução alcoólica 1% p/V de hidroquinona (HQ) para parar a reação. Foi utilizada solução alcóolica ao invés de aquosa para agilizar a secagem do material dentro dos tubos

de ensaio. Vale ressaltar também que a receita empregada foi baseada em trabalho anterior do grupo (CIRILO, 2013).

A elevada concentração de iniciador, quase 4%, foi empregada por causa da temperatura relativamente baixa da reação. Além disso, foram empregados 5% de comonômero porque não se desejava alterar muito as propriedades do poliestireno. A intenção foi apenas inserir algumas ligações duplas pendentes nas cadeias poliméricas. Por isso, a concentração do comonômero não precisava ser muito elevada e poderia até ser inferior a 5%, mas optou-se por esse valor para facilitar a detecção da copolimerização de maneira inequívoca. Sabe-se que a presença de 5% de comonômero divinílico pode eventualmente levar à formação de uma estrutura completamente reticulada (ELLIOTT & BOWMAN, 2001).

3.2.2. Reações para testar a *click chemistry*

A seguir são apresentadas as metodologias empregadas para cada variação nos experimentos que visavam a reproduzir reações tiol-eno. Vale ressaltar que os subtítulos são idênticos aos subtítulos dos resultados correspondentes que são apresentados no próximo Capítulo. Isso foi feito de maneira a facilitar a compreensão e a identificação de cada reação testada.

3.2.2.1. Reação tiol-eno com estireno

Inicialmente 2,36 g de AIBN foram dissolvidos em 15 g de DMF. Em seguida, 0,42 g de estireno e 6,09 g de MPA foram adicionados a essa solução. A solução final foi transferida para um balão de fundo redondo acoplado a um condensador e mantida a 80 °C sob agitação magnética (600 rpm) durante 4 horas. A temperatura do condensador foi mantida a 10 °C e o produto final foi seco em estufa de recirculação durante 72 horas a temperatura ambiente e, em seguida, lavado com acetona. As massas de cada reagente foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 10:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010). Os cálculos realizados para a determinação das massas de cada reagente são apresentados no Apêndice I.

3.2.2.2. Reações tiol-eno com L-cisteína

A um balão de fundo redondo acoplado a um condensador foram adicionados 10 g de água destilada, 1,21 g de L-cisteína e HD (0,21 g), DVB (0,33 g) ou EGDMA (0,50 g). Essa mistura foi submetida a aquecimento até atingir a temperatura de 85 °C ou 70 °C, a depender da condição experimental pretendida. Após atingir a temperatura, BPO (0,61 g), AIBN (0,41 g) ou K₂S₂O₈ (0,68 g) foram adicionados ao balão para dar início à reação. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética (600 rpm) por 1h30min. A temperatura do condensador foi mantida a 110 °C e os produtos foram secos em estufa de recirculação à temperatura ambiente por 24 horas. As massas de cada reagente foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 2:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010). Os cálculos realizados para a determinação das massas de cada reagente são apresentados no Apêndice I.

3.2.2.3. Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido ascórbico

10 g de água destilada, 1,21 g de L-cisteína e 1,21 g de ácido ascórbico foram misturados em um bécher e mantidos sob agitação magnética constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, essa mistura foi transferida para um balão de fundo redondo e foi adicionado DVB (0,130 g) ou EGDMA (0,198 g). O balão foi então acoplado a um condensador mantido a 10 °C e inserido em um banho de silicone a 70 °C. Após atingir a temperatura desejada, BPO (0,61 g), AIBN (0,41 g) ou K₂S₂O₈ (0,68 g) foram adicionados ao balão para dar início à reação. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética (600 rpm) por 1h30min. Os produtos foram secos em estufa de recirculação à temperatura ambiente por 24 horas. As massas de cada reagente foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 5:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010). Os cálculos realizados para a determinação das massas de cada reagente são apresentados no Apêndice I.

3.2.2.4. Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido acético

10 g de água destilada, 1,21 g de L-cisteína e 1,21 g de ácido acético foram misturados em um bécher e mantidos sob agitação magnética constante durante 4 horas a temperatura ambiente. Alíquotas foram retiradas após 1, 2, 3 e 4 horas de reação.

3.2.2.5. Reações tiol-eno com cloridrato de cisteína (Cis-Cl)

A um balão de fundo redondo acoplado a um condensador foram adicionados 30 g de água destilada, 1,57 g de cloridrato de cisteína e 0,25 g de EGDMA. Após aquecer a mistura até 70 °C, AIBN (0,82 g) ou K₂S₂O₈ (1,35 g) foi adicionado ao balão. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética (600 rpm) e a 70 °C durante 4 horas. O condensador foi mantido a 10 °C durante toda a reação e os produtos obtidos foram secos em estufa de recirculação a temperatura ambiente. Em alguns casos, em que o cloridrato de cisteína foi reduzido com borohidreto de sódio, a mesma massa de água e Cis-Cl foi adicionado ao balão, mas 1,13 g de borohidreto de sódio também foi adicionado e a mistura mantida por 2 horas sob agitação magnética constante a temperatura ambiente. Após esse procedimento, os demais reagentes foram adicionados e a reação foi conduzida como descrita acima. As massas de cada reagente foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 4:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010). Os cálculos realizados para a determinação das massas de cada reagente são apresentados no Apêndice I.

3.2.2.6. Reações tiol-eno com ácido-3-mercaptopropiônico

A um balão de fundo redondo acoplado a um condensador mantido a 10 °C, foram adicionados 0,2 g de poli(estireno-co-EGDMA), que foi previamente preparado e contém duplas ligações pendentes, 2,5 g de DMF, DCM ou THF e 4 mg de MPA. A mistura foi inserida em um banho a 80 °C e em seguida foram adicionados 3 mg de AIBN para dar início à reação. O meio reacional foi mantido sob agitação magnética (600 rpm) por 4 horas. Os produtos foram secos em estufa de recirculação a temperatura ambiente. As massas de cada reagente foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-

eno deveria ser de 10:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010). Os cálculos realizados para a determinação das massas de cada reagente são apresentados no Apêndice I.

3.3. Caracterização

3.3.1. Conversão por gravimetria

O cálculo das conversões de reações de polimerização por gravimetria se baseia no fato de que todo o monômero convertido se transforma em polímero, admitindo-se que não há formação de subprodutos. Dessa maneira, por meio da pesagem do sistema em múltiplas etapas do processo, é possível determinar a conversão. Mais especificamente, é necessário realizar a pesagem do tubo de ensaio vazio, do tubo com a amostra antes da reação e do tubo com a amostra e a solução de hidroquinona após a reação. Os tubos foram secos à temperatura ambiente em estufa de recirculação e em estufa à vácuo até peso constante para determinação da conversão.

A seguir são apresentados os cálculos necessários para fazer essa determinação.

$$\text{Monômero em cada tubo} = \text{massa inicial de amostra} - \text{massa do tubo} - \text{massa de BPO} \quad (1)$$

$$\text{Polímero em cada tubo} = \text{massa após secagem} - \text{massa do tubo} - M1 \quad (2)$$

em que:

$$M1 = \text{Massa de HQ a descontar} = 0,1 * \text{massa de HQ pesada} \quad (3)$$

$$\text{Massa de BPO} = \frac{\text{massa de BPO total pesada}}{\text{massa monômero total} + \text{massa BPO total}} * \text{massa inicial de amostra} \quad (4)$$

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{\text{Polímero em cada tubo}}{\text{Monômero em cada tubo}} * 100 \quad (5)$$

3.3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear é uma técnica analítica que permite determinar a estrutura química do material estudado por meio da análise da posição dos picos obtidos no espectro de RMN (DAVIS, 2004). A técnica se baseia na ocorrência de transição entre

níveis energéticos, quando o núcleo atômico é submetido a um campo magnético variante e intenso. Quando o núcleo excitado retorna a seu nível de energia normal, fenômeno conhecido como relaxação, é possível detectar essa energia “extra” emitida. Como cada elemento químico emite sinais diferentes, a depender da massa do átomo e do ambiente eletrônico construído pelos átomos que são vizinhos a ele, é possível determinar o tipo de ligação que está presente no material e quantificar essas ligações (GONSALVES *et al.*, 2007; WAY, 2011).

O preparo das amostras para as análises de RMN de hidrogênio foi feito solubilizando 15 mg de amostra em 0,8 mL de clorofórmio deuterado. Foram usados tubos de 5 mm nas análises, que foram realizadas a temperatura ambiente em um equipamento Varian Mercury, modelo VX300, com frequência de 300.2 MHz e sonda de 5 mm.

3.3.3. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de infravermelho se baseia no fato de que os átomos vibram em frequências no espectro eletromagnético definidas, de acordo com a estrutura química que formam. A depender de quais são os átomos vizinhos, a frequência de vibração e/ou tipo de vibração de cada átomo varia. Assim, a partir da análise das bandas fornecidas pelo espectro de FTIR da amostra, é possível, por exemplo, identificar compostos químicos, detectar o surgimento ou desaparecimento de um ou mais grupos funcionais decorrentes de reações químicas e avaliar a pureza dos produtos (NYQUIST, 2001).

As análises de infravermelho foram realizadas na região do infravermelho médio (4000- 400 cm^{-1}) com resolução de 4 cm^{-1} em um equipamento Thermo, modelo Nicolet 6700 equipado com acessório ATR Smart Orbit® em modo de reflectância, que garante aplicação de pressão constante nas amostras e dispensa o preparo de pastilhas de KBr. Cada espectro foi registrado como resultado da média de 128 leituras.

3.3.4. Testes de Solubilidade

Foram feitos testes de solubilidade dos produtos das reações *click* testadas para avaliar a possibilidade de realizar análises de RMN e análises cromatográficas. Para

realização dos testes, foram adicionados 10 mg de amostra a 1 mL de solvente em um tubo de ensaio, que foi então mantido em um agitador por 48h. As amostras foram aquecidas até 60 °C. A detecção de material sólido em suspensão foi feita visualmente.

3.3.5. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A técnica de cromatografia de permeação em gel é uma técnica utilizada para determinação das distribuições de massas molares e das massas molares médias dos polímeros. Para sua realização, cada amostra é solubilizada em um solvente adequado e então injetada em uma coluna porosa. As moléculas maiores permeiam mais rapidamente pela coluna e são detectadas primeiro na saída, uma vez que, por serem grandes, não penetram o interior dos poros da fase gel. Já as moléculas menores percorrem um caminho muito mais longo, porque tendem a percolar os poros do gel que preenche a coluna. Dessa forma, se a coluna foi calibrada com um padrão de massa molar conhecida, é possível determinar as massas molares do polímero a ser analisado a partir dos tempos em que as moléculas são detectadas na saída da coluna, chamados tempos de retenção (ODIAN, 2004).

O equipamento foi calibrado com padrões de poliestireno com massas molares na faixa de 376 a 1×10^6 Da. O cromatógrafo foi equipado com uma pré-coluna Shodex KF-G, duas colunas Shodex KF-804 e uma coluna Shodex KF-805, além de detector refratométrico Viscotek, modelo VE3580, e detector UV Viscotek, modelo 2500, setado para 255nm e equipado com lâmpada de deutério. O preparo das amostras consistiu na solubilização de cerca 5 mg do polímero em cerca de 5 mL de THF. A solução obtida foi filtrada em um filtro de teflon com poros de 0,45 μ m. Essa solução filtrada foi então injetada no cromatógrafo. As seguintes condições de análise foram utilizadas

- Volume de injeção: 200 μ L;
- Vazão de operação: 1 mL/minuto;
- Temperatura das colunas: 40 °C.

3.3.6. Quantificação de SH livre com Reagente de Ellman

A quantificação do grupo tiol livre (SH) pode ser feita com auxílio do ácido 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzóico), também conhecido como reagente de Ellman, e o

procedimento é descrito em muitos protocolos. A reação entre o reagente de Ellman e os grupamentos sulfidríla origina um composto com coloração amarela, e, portanto, a quantificação pode ser realizada por meio de medidas de cromatografia UV. As análises apresentadas nessa tese foram realizadas com base em um protocolo da Thermo Scientific (THERMO SCIENTIFIC, 2017) por ser um procedimento já bem conhecido e documentado. A curva de calibração foi construída com base na Tabela 1 e a curva é apresentada na Figura 17.

Tabela 1 – Amostras usadas para a calibração com cloridrato de cisteína.

Amostra	Volume de tampão (mL)	Cisteína cloridrato	Concentração (mM)
A	100	26,34 mg	1,5
B	5	25 mL da amostra A	1,25
C	10	20 mL da amostra A	1,0
D	15	15 mL da amostra A	0,75
E	20	10 mL da amostra A	0,5
F	25	5 mL da amostra A	0,25
G	30	-	0

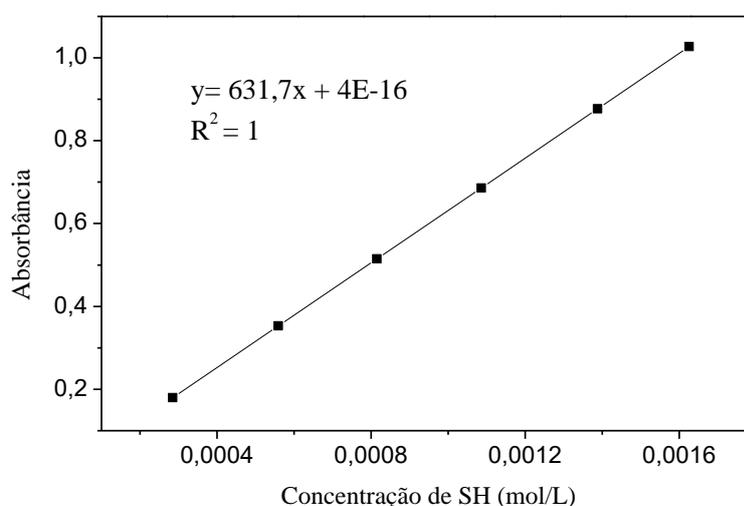


Figura 17 – Curva de calibração para o Reagente de Ellman com o cloridrato de cisteína.

Primeiramente foi preparada uma solução tampão 0,1 M de fosfato de sódio pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA. Em seguida foram preparadas as soluções da Tabela 1. Por fim, foi preparada também uma solução contendo 4 mg do reagente de Ellman em 1 mL do tampão contendo EDTA.

Para a leitura no UV (Lambda 35, Perkin Elmer, Estados Unidos), o preparo se deu adicionando 250 μ L de cada amostra da curva, 2,5 mL de tampão e 50 μ L da solução de Ellman. Todas as misturas foram feitas em tubos Falcon, agitadas e incubadas por 15 minutos na temperatura ambiente. A leitura então foi realizada no comprimento de onda de 412 nm. Vale ressaltar que é muito comum haver contaminação dos tubos com compostos contendo enxofre. Por isso, recomenda-se que os tubos usados sejam sempre novos ou muito bem lavados e secos antes da realização das análises.

Capítulo IV

Resultados e Discussão: Parte I

Neste Capítulo são apresentados os resultados referentes à primeira rota de bioconjugação testada ao longo do desenvolvimento deste trabalho. A reação escolhida, como já discutido, foi a reação de *click chemistry* do tipo tiol-eno. A Figura 18 retrata de maneira simples o objetivo, que consistiu em empregar polímeros contendo duplas ligações pendentes para a ligação via *click chemistry* a moléculas de cisteína, que contém grupamentos SH. Dessa maneira, ao longo deste Capítulo IV são apresentados os resultados e discussões referentes às duas etapas em que o trabalho foi dividido nessa primeira rota. Inicialmente será apresentada a etapa de modificação de polímeros para inserção de duplas ligações terminais; em seguida, será discutida a etapa de testes das reações *click* tiol-eno propostas.



Figura 18 – Esquema da reação proposta no Capítulo IV.

4.1. Testes para inserir dupla terminal nas cadeias poliméricas

A etapa de inserção de duplas ligações pendentes nos polímeros foi realizada por meio de reações de copolimerização, que são apresentadas e discutidas a seguir. O estireno foi escolhido como monômero principal porque ele apresenta cinética bem

conhecida de polimerização e pode ser usado como *benchmark* para testes (SALAMONE, 1996; ODIAN, 2004; SOLJIC *et al.*, 2009).

Os comonômeros empregados foram o 1,5-hexadieno (HD), o divinilbenzeno (DVB) e o dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA). O 1,5-hexadieno foi escolhido porque ele apresenta caráter hidrofóbico, o que pode ser vantajoso para a bioconjugação de determinadas biomoléculas e/ou fármacos (FILICE *et al.*, 2011). O DVB foi escolhido por ser um dos agentes reticulantes de polímeros mais estudados (KUDRA & STRUMILLO, 1998; SOUSA & BARBOSA, 2008). O EGDMA foi escolhido por ser um agente reticulante já largamente empregado para aplicações biomédicas (SCHMALZ & BINDSLEV, 2009). Por serem bifuncionais, a expectativa era que pelo menos uma parte das ligações duplas ficasse disponível na cadeia após a copolimerização, para posterior utilização na reação *click* tiol-eno visando à bioconjugação. Essa hipótese é consistente com a teoria de FLORY (1953) e STOCKMAYER (1944), que propõem que a reticulação dos polímeros se dá em 3 etapas: (i) são formadas estruturas lineares com grupos laterais pendentes; (ii) a estrutura do polímero cresce e começam a surgir ramificações; (iii) ocorre a reticulação propriamente dita. As estruturas dos comonômeros são apresentadas na Figura 19.

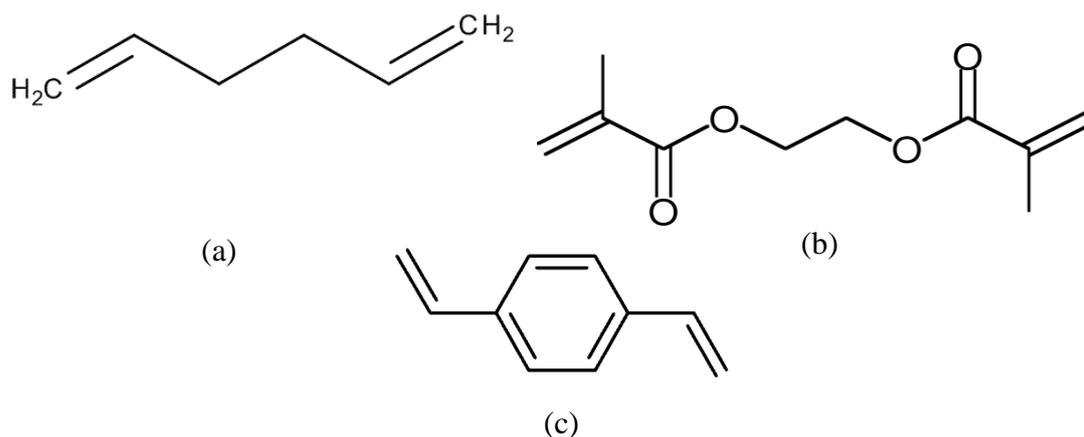


Figura 19 – Estruturas químicas dos comonômeros usados nas copolimerizações estudadas: (a) 1,5-hexadieno; (b) dimetacrilato de etilenoglicol; (c) divinilbenzeno.

Com relação a dados da literatura acerca da copolimerização entre o estireno e os monômeros vinílicos escolhidos, vale ressaltar que não foram encontrados dados da

copolimerização via radicais livres com o 1,5-hexadieno. Essa falta de informação pode indicar que a copolimerização não acontece ou que ela é tão pouco importante que não tem sido estudada. Como no caso da aplicação para esse trabalho não é necessária a presença de muitas insaturações na estrutura do polímero, optou-se por testar a inserção mesmo com ausência de dados da literatura.

Com relação à copolimerização com o DVB, sabe-se que a razão de reatividade (r_1)²¹ entre estireno e DVB é de 0,26 (BRANDRUP, 1999), o que indica que a copolimerização ocorre preferencialmente à homopolimerização do estireno. Além disso, por ser bifuncional, o DVB atua como reticulante (KUDRA & STRUMILLO, 1998; SOUSA & BARBOSA, 2008). Com relação à copolimerização com o EGDMA, sabe-se que a razão de reatividade (r_1) entre estireno e o EGDMA é de 0,40 (FRICK & RUDIN, 1981) e que ele também atua como reticulante, uma vez que também é um monômero bifuncional (SCHMALZ & BINDSLEV, 2009).

Há muitos trabalhos publicados acerca da copolimerização do estireno com o EGDMA, mas não foi encontrada nenhuma referência sobre a presença de duplas ligações pendentes nesses materiais. Por isso, a realização das reações foi de suma importância para avaliar a inserção das insaturações. No entanto, há relatos de que a copolimerização do estireno com o DVB é incompleta e de que há a presença de ligações duplas pendentes na estrutura (KUN & KUNIN, 1968), o que reforça a hipótese levantada neste trabalho de que seria possível empregar os copolímeros na reação tiol-eno.

Foram realizadas, portanto, quatro reações, sendo uma de homopolimerização do estireno e três de copolimerização do estireno com o HD, o DVB ou o EGDMA, como indicado na Tabela 2.

Com relação à caracterização dos materiais produzidos, inicialmente foi investigado se houve a copolimerização por meio da análise do produto final (produto após 4h30min de reação). Em seguida, as amostras foram analisadas por FTIR para verificar a presença ou não da dupla ligação pendente. Todos os resultados são apresentados a seguir.

Dando início, portanto, à discussão da caracterização dos produtos formados, pode ser observado na Figura 20 que as velocidades das reações I e II são bastante

²¹ $r_1 = k_{11}/k_{12}$. Sendo que $M_1 \cdot + M_1 \xrightarrow{k_{11}} M_1M_1 \cdot$ e $M_1 \cdot + M_2 \xrightarrow{k_{12}} M_1M_2 \cdot$

similares. Isso indica que o 1,5-hexadieno não inibe a reação, mas também não garante que ocorreu copolimerização, porque apenas 5% de estireno foi substituído por 1,5-hexadieno na reação e as conversões ficam próximas de 100%.

Tabela 2 – Reações de polimerização realizadas.

Reação	Comonômero	Produto desejado
I	-	PS
II	1,5-hexadieno	P(S-co-HD)
III	Divinilbenzeno	P(S-co-DVB)
IV	Etilenoglicol dimetacrilato	P(S-co-EGDMA)

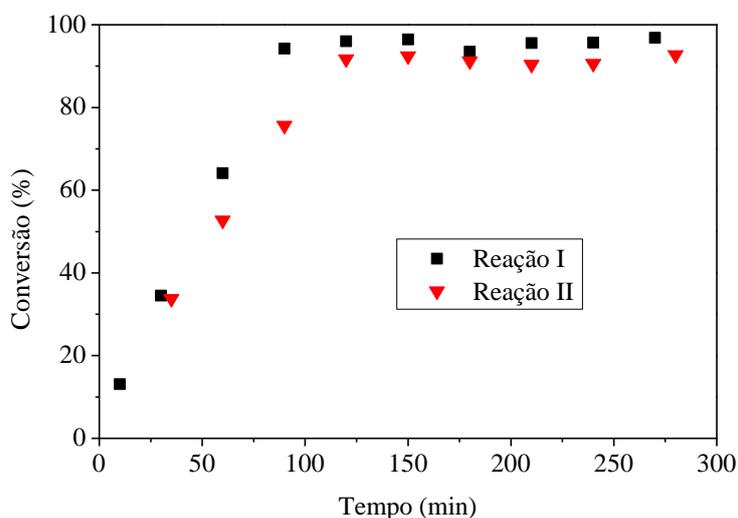


Figura 20 – Conversões de monômero nas reações poliestireno puro e de poli(estireno-co-hexadieno).

Na Figura 21 são comparadas as velocidades das reações II e III. Nesse caso, ao contrário do anterior, é possível observar diferença na conversão, principalmente nos instantes iniciais da reação. Esse resultado é consistente com dados da literatura, que indicam que a taxa de reação quando 5% DVB é empregado aumenta em cerca de 13%

em relação à taxa de reação do poliestireno homopolímero (STOREY, 1965; CIRILO, 2013). A presença do DVB, portanto, acelera a polimerização, enquanto a presença do 1,5-hexadieno não influencia a velocidade de reação. Na Figura 22 é apresentado o perfil de velocidade da reação IV. Vale ressaltar que há também uma indicação de aceleração da reação nos instantes iniciais, assim como no caso da reação com o DVB, o que também está consistente com os dados da literatura (STOREY, 1965).

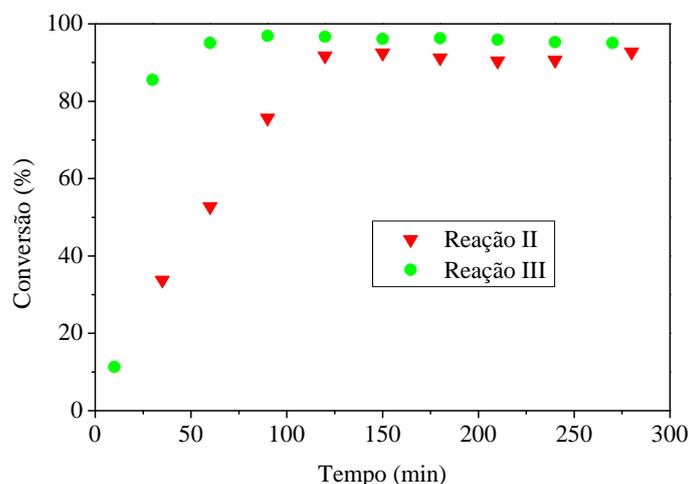


Figura 21 – Comparação das conversões de monômero nas reações de poli(estireno-co-1,5-hexadieno) e de poli(estireno-co-divinilbenzeno).

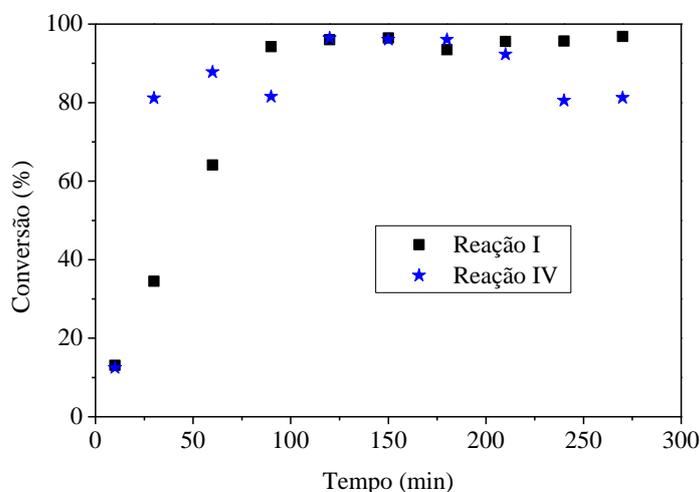
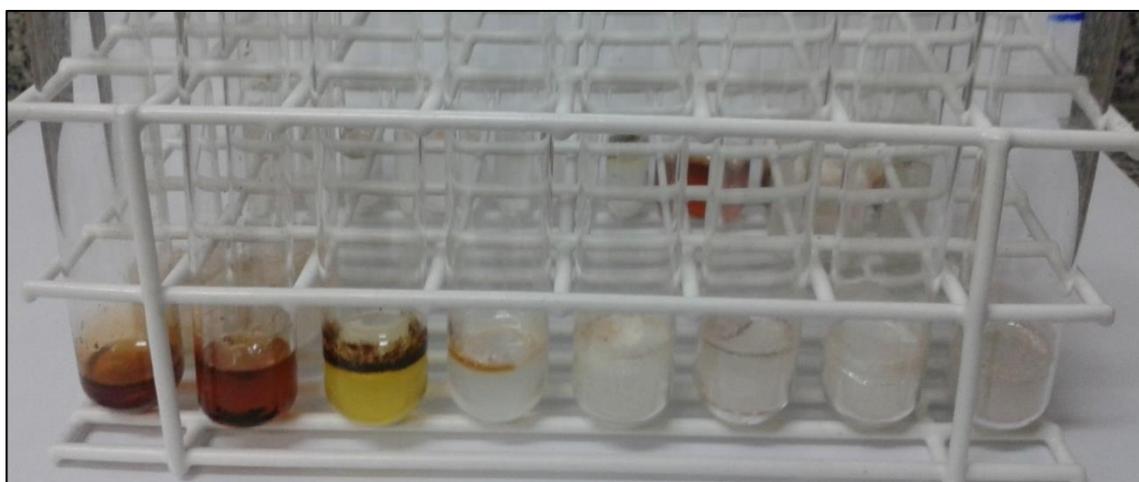


Figura 22 - Comparação das conversões de monômero nas reações de poliestireno e de poli(estireno-co-EGDMA).

A Figura 23 e a Figura 24 ilustram os produtos finais de cada “alíquota” retirada ao longo da reação.



(a)

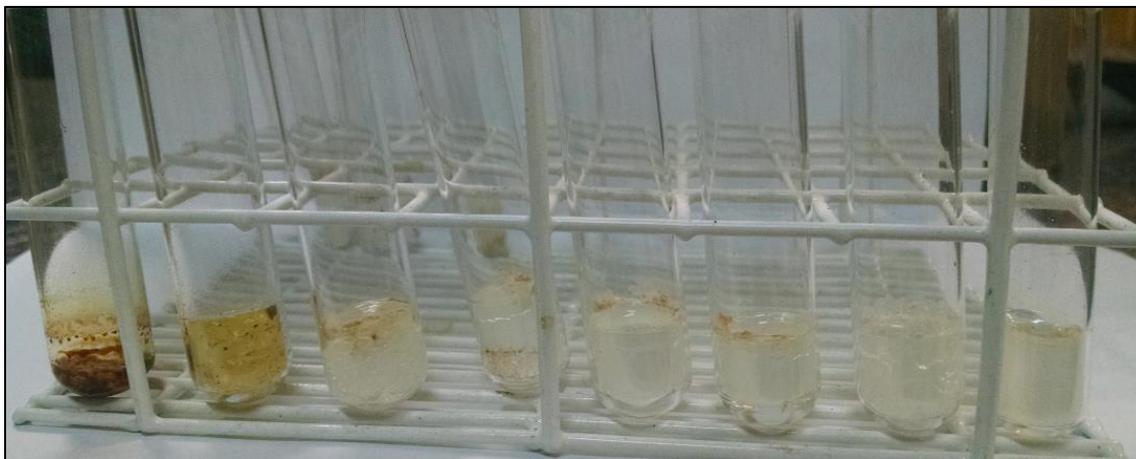


(b)

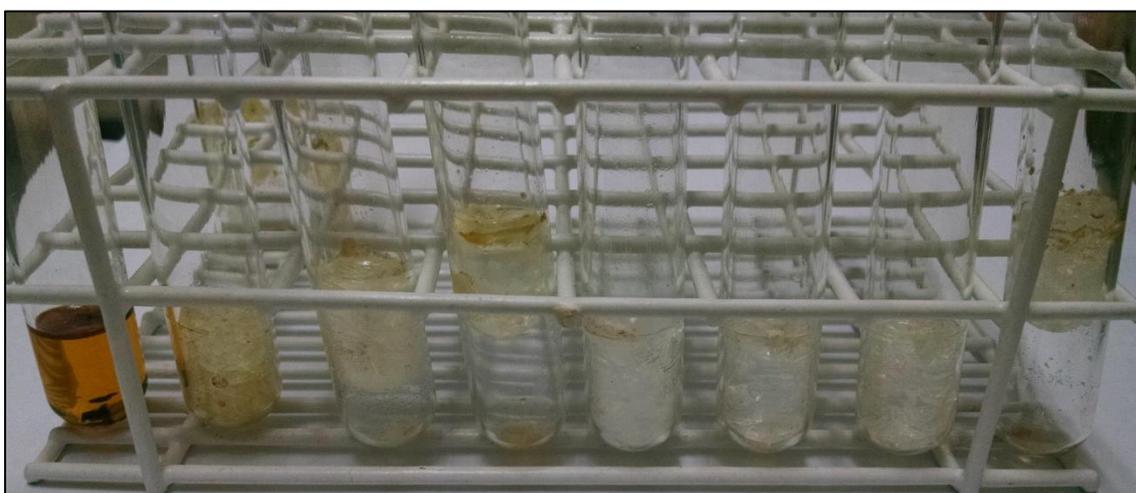
Figura 23 – Fotografias dos produtos das reações I (a) e II (b).

As medidas de conversão podem ser confirmadas observando a alteração na coloração dos produtos. Quanto maior é a conversão, mais próxima é a cor final da cor do polímero (branco). Quanto menor é a conversão, mais avermelhado é o produto, devido à degradação do iniciador que não participou da reação e à interação com a hidroquinona adicionada para interromper a reação. Vale ressaltar que há uma leve diferença no aspecto dos primeiros tubos entre as reações, quando se comparam as reações I e II. Isso provavelmente se deve ao fato de que as “alíquotas” iniciais não foram

retiradas no mesmo tempo de reação. A diferença observada não reflete, portanto, a influência do comonômero estudado. No entanto, a reação com DVB apresentou cinética mais rápida, como discutido anteriormente com auxílio dos gráficos de conversão.



(a)



(b)

Figura 24 - Fotografias dos produtos das reações III (a) e IV (b).

As Figuras 23 e 24, portanto, oferecem uma confirmação visual dos resultados cinéticos apresentados. Já a reação com EGDMA, cuja velocidade inicial de reação foi ainda maior, apresentou produtos com aspecto final quebradiço, diferente dos demais polímeros produzidos; em alguns casos os produtos expandiram, como pode ser observado na Figura 24 (b). Isso provavelmente é consequência de reticulação das cadeias pelo EGDMA, que faz com que a viscosidade do meio aumente muito rapidamente, o que

dificulta a movimentação das moléculas. Dessa maneira, como o efeito gel é mais acentuado, em alguns casos o meio ferve, por conta do aumento descontrolado de temperatura, o que parece ter acontecido com o copolímero P(S-co-EGDMA). Vale ressaltar também que na Figura 24 é observada uma aparente queda na conversão em alguns tubos. Essa queda se deve ao fato de que, durante a fase de expansão do meio, o material não mais ficou em contato com o banho de etilenoglicol e, portanto, não esteve mais submetido às mesmas condições de reação dos demais.

Para confirmar a ocorrência ou não de copolimerização com o 1,5-hexadieno, foram realizadas análises de H-RMN apenas dos produtos obtidos após 4h30min de reação. Analisando a Figura 25, que ilustra o espectro de H-RMN do homopolímero de PS, é possível observar a presença de três conjuntos de picos.

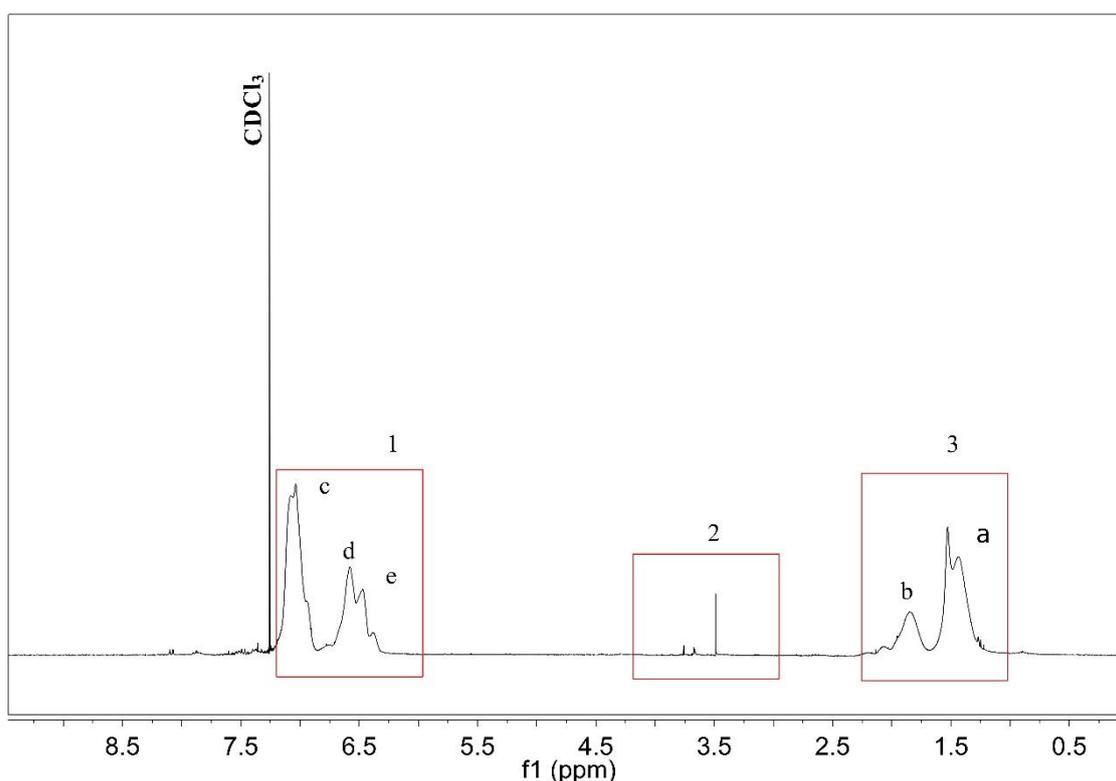


Figura 25 – Espectro de RMN do poliestireno puro após 4h30 de reação.

Os grupos assinalados como 1 e 3 são característicos do poliestireno, sendo 1 referente aos anéis aromáticos presentes nas cadeias de PS e 3 referente ao segmento linear das cadeias do polímero, como indicado na Figura 26 e na Tabela 2. O número 2 assinalado no espectro não corresponde ao polímero e diz respeito à presença de pequenas

quantidades de impureza na amostra (como resíduo de iniciador, por exemplo). Os picos largos de H-RMN indicam a formação de estruturas atáticas e aleatórias no produto final, como esperado em reações de radicais livres (BRANDOLINI & HILLS, 2000).

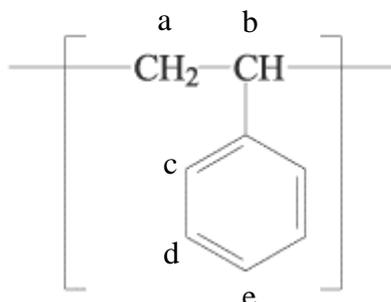


Figura 26 – Correspondência entre a estrutura do PS puro e respectivo espectro de RMN.

Tabela 3 - Posição dos picos de H-RMN para o poliestireno (adaptado de BRANDOLINI & HILLS, 2000).

Pico	Posição (ppm)
A	1,7
B	2,3
C	7,0
D	7,5
E	7,5

Vale destacar que a posição dos picos apresentada na Tabela 3 não corresponde exatamente à posição das análises de H-RMN realizadas, porque as condições de análise empregadas por BRANDOLINI & HILLS (2000) foram um pouco diferentes das empregadas neste trabalho.

Quando a Figura 27, referente ao H-RMN do produto da reação II, é analisada, observa-se a presença dos mesmos grupos de picos (1, 2 e 3) discriminados anteriormente. Contudo, observam-se também dois novos grupos, que são assinalados como 4. O fato de múltiplos picos serem observados nos grupos marcados como 4 podem sugerir a incorporação de 1,5-hexadieno no copolímero, já que a estrutura aleatória das cadeias favorece a formação de diferentes estruturas diádicas no produto final, justificando os múltiplos picos de átomos similares de hidrogênio (BOVEY & MIRAU, 1996). No entanto, observando o espectro de H-RMN do 1,5-hexadieno apresentado na Figura 28, é possível perceber que há o desdobramento dos picos mesmo quando é feita a análise do 1,5-hexadieno puro. Portanto, para determinar se o surgimento dos grupos assinalados como 4 estava associado à copolimerização ou apenas à presença de 1,5-hexadieno residual na amostra, o produto foi dissolvido em tolueno e precipitado novamente por meio da adição de etanol. Seguindo esse procedimento, todo o hexadieno residual que porventura houvesse ficado retido na estrutura do polímero seria extraído e não mais surgiria na análise de H-RMN.

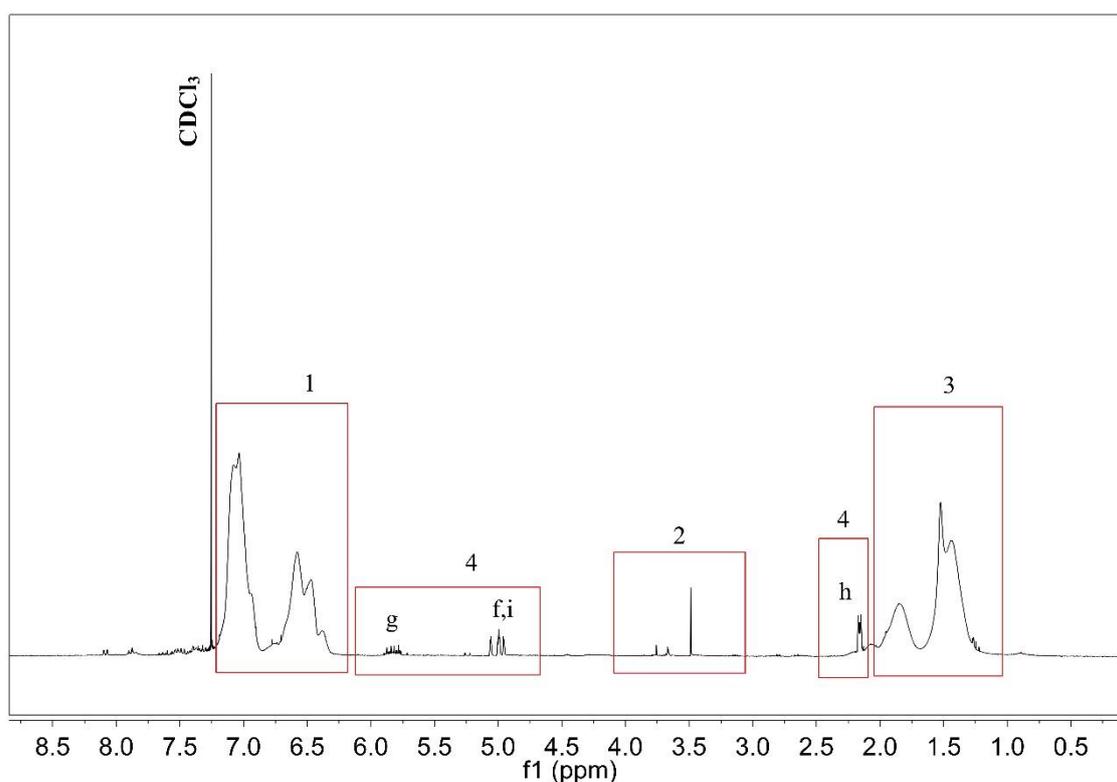


Figura 27 – Espectro de RMN do produto após 4h30 de reação do poli(estireno-co-1,5-hexadieno) antes da lavagem com tolueno.

O novo espectro, obtido após a “lavagem” é apresentado na Figura 29. A correspondência entre os picos de H-RMN do 1,5-hexadieno com a estrutura química é apresentada na Figura 30 e na Tabela 4.

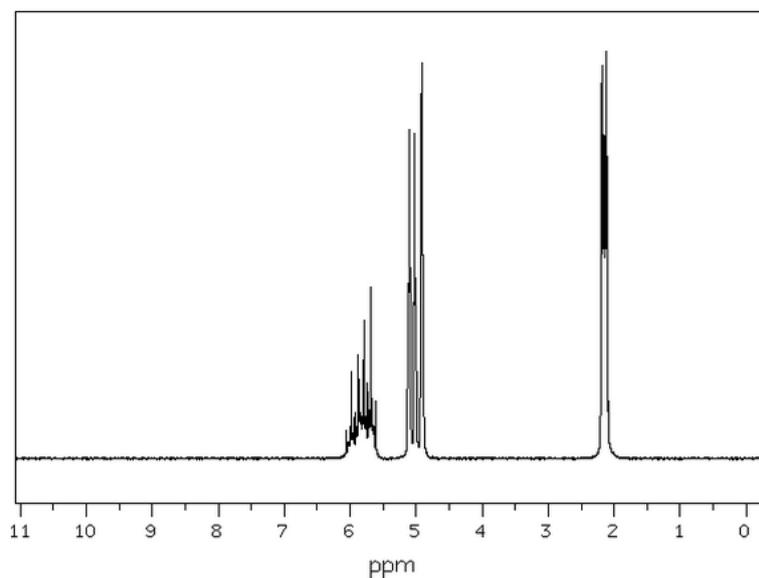


Figura 28 – Espectro de H-RMN padrão do 1,5-hexadieno (CHEMICALBOOK, 2008).

Tabela 4 – Posição dos picos de H-RMN para o 1,5-hexadieno (adaptado de CHEMICALBOOK, 2008).

Pico	Posição (ppm)
f	4,95
g	5,81
h	2,15
i	4,99
j	2,00

A Figura 29 mostra que, após a lavagem do material, os picos assinalados anteriormente com o número 4 não mais aparecem no espectro. Isso indica que pode não

ter havido copolimerização, já que o 1,5-hexadieno detectado na análise encontrava-se simplesmente aprisionado no polímero produzido e foi extraído facilmente com um procedimento de solubilização seguido da reprecipitação do material. Entretanto, a detecção da copolimerização também pode ter sido dificultada porque os picos que a caracterizam (-CH₂-) estão posicionados próximos a 2 ppm (YOKO *et al.*, 1994) podendo estar encobertos pelo sinal mais forte das ligações do poliestireno.

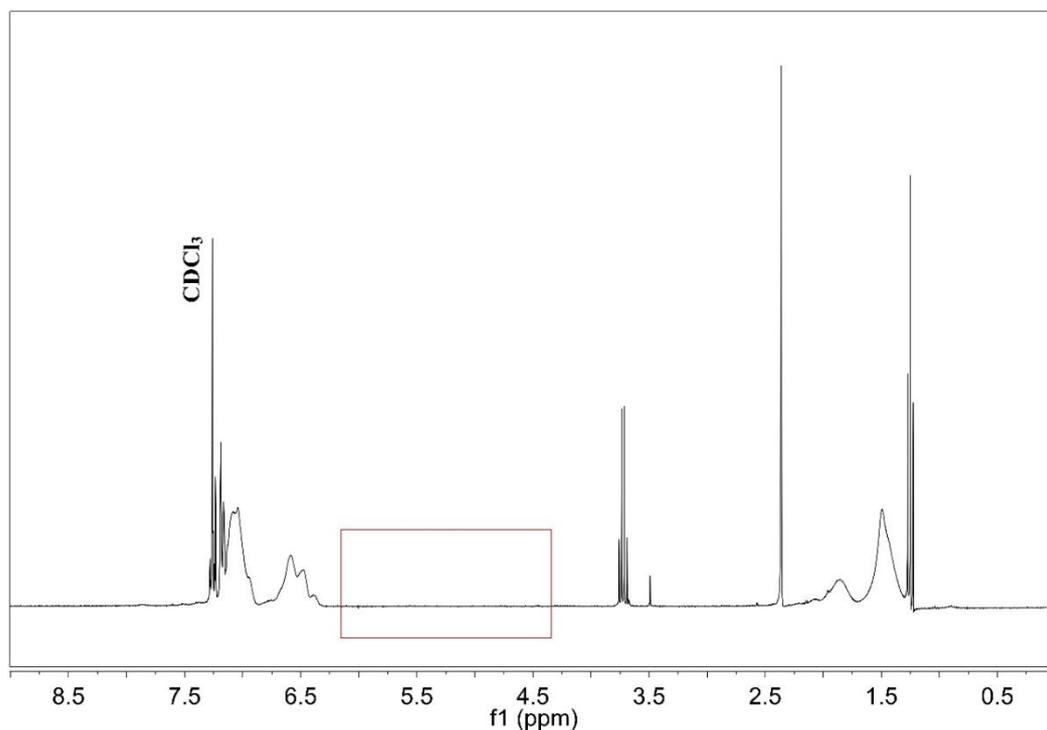


Figura 29 - Espectro de H-RMN do produto após 4h30 de reação do poli(estireno-co-1,5-hexadieno) após a lavagem com tolueno.

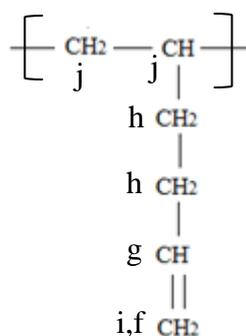


Figura 30 - Correspondência entre a estrutura do 1,5-hexadieno e respectivo espectro de H-RMN.

Vale ressaltar que os novos picos que surgem na análise do produto lavado são referentes ao tolueno e etanol usados para solubilização e precipitação do P(S-co-HD). O procedimento de secagem empregado não foi capaz de retirar completamente os componentes adicionados. No entanto, a presença desses picos em nada compromete o resultado da análise, que visava apenas confirmar a ocorrência da copolimerização. Vale destacar também que o espectro apresentado na Figura 29 apresenta diferenças sutis na região do grupo 3, que corresponde ao segmento linear do poliestireno. Isso também ocorre provavelmente por causa da presença de tolueno residual usado na solubilização.

Além das medidas de conversão e das análises de H-RMN, foram feitas análises de cromatografia de permeação em gel do PS e do P(S-co-HD), produtos das reações I e II respectivamente. Os resultados são apresentados na Tabela 5 e na Figura 31. A Figura 31 indica que as curvas de distribuição de massas molares ponderais médias dos produtos das reações I e II são muito similares e que ambas as distribuições são unimodais.

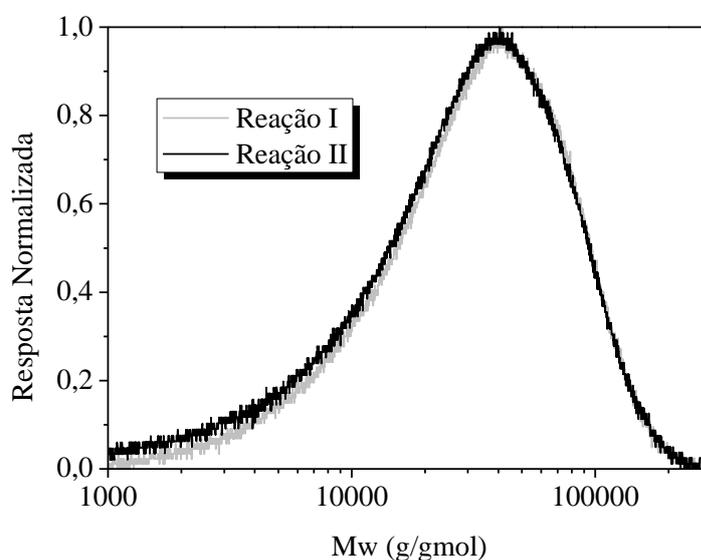


Figura 31 - Gráfico de GPC do PS e do P(S-co-HD) após 4h30 de reação.

Apesar da grande similaridade observada no gráfico de GPC, quando se observam os resultados expressos na Tabela 5, há a indicação de que, ao contrário do que sugeriu a análise de H-RMN, o hexadieno parece exercer influência sobre o andamento da reação com o estireno, uma vez que é observada a diminuição das massas molares médias e um alargamento da distribuição de massas molares, quando comparado ao PS homopolímero.

Dessa maneira, não parece conclusivo afirmar que não ocorreu copolimerização do estireno com o 1,5-hexadieno com os resultados obtidos. Por isso, análises de FTIR foram também realizadas para confirmar a ocorrência da copolimerização e determinar se houve inserção das duplas ligações pendentes, como apresentado adiante.

Tabela 5 – Resultados de GPC do PS e do P(S-co-HD) após 4h30 de reação.

Polímero	Mn (g/gmol)	Mw (g/gmol)	Mz (g/gmol)	Mn/Mw
PS	19884	45768	75998	2,303
P(S-co-HD)	10524	42859	71252	4,072

Com relação aos produtos da reação com DVB e EGDMA, reações III e IV respectivamente, não foi possível realizar as análises de H-RMN ou GPC porque os materiais não foram solúveis em clorofórmio, HFIP ou THF. Isso indica a ocorrência de reticulação e, portanto, de copolimerização. Se a reticulação ocorre em quantidade demasiada, além de ser impossível solubilizar o polímero, é possível que não restem ligações duplas pendentes para proceder com a bioconjugação. De qualquer forma, a existência de material reticulado parece indicar a inserção eficiente dos monômeros divinílicos na estrutura molecular do PS. A baixa solubilidade do material obtido em solventes orgânicos não compromete o uso das partículas poliméricas na maior parte das aplicações de interesse.

Foram realizadas, portanto, análises de FTIR com o objetivo não só de comprovar a copolimerização, mas também de observar se houve a inserção das duplas ligações pendentes almejadas. Com relação à observação da inserção de duplas ligações pendentes, vale destacar que a visualização das bandas dessas ligações por meio da técnica de FTIR pode não ser possível em casos em que as insaturações estejam presentes em baixas concentrações, o que indica que a análise de FTIR pode não ser conclusiva. Na Figura 32 é possível observar que os espectros são bastante similares, o que dificulta a determinação da ocorrência de copolimerização. Esse resultado já era esperado, já que não havia dados na literatura acerca da copolimerização via radicais livre do estireno com o HD, o que nos leva a acreditar que a copolimerização é muito pouco pronunciada. Além disso, a estrutura química do DVB é muito similar à do estireno, o que provavelmente

ocasiona a superposição das bandas características das ligações, dificultando a detecção por FTIR. No caso da reação III, com DVB, entretanto, a insolubilidade do produto em THF, clorofórmio e HFIP já caracteriza a ocorrência de copolimerização. Apenas para o caso da reação IV foi possível confirmar a ocorrência da copolimerização por meio da banda em 1723 cm^{-1} , que surge devido à presença do estiramento C=O em ésteres (SHARMA, 2004), e que só poderia estar presente no caso do EGDMA ter sido inserido na cadeia.

Apesar da enorme similaridade entre os espectros há, no entanto, algumas poucas diferenças entre eles e que foram assinaladas na Figura 32 como, por exemplo, a presença de um dublete em 2360 cm^{-1} nos produtos das reações I e II, que é correspondente ao estiramento assimétrico da molécula de CO_2 adsorvida nos polímeros (SRIKANTH & CHUANG, 2013). A presença da banda de CO_2 nesses casos é comumente associada às condições operacionais e poderia ser eliminada com a realização de uma purga, se a atmosfera fosse controlada no equipamento.

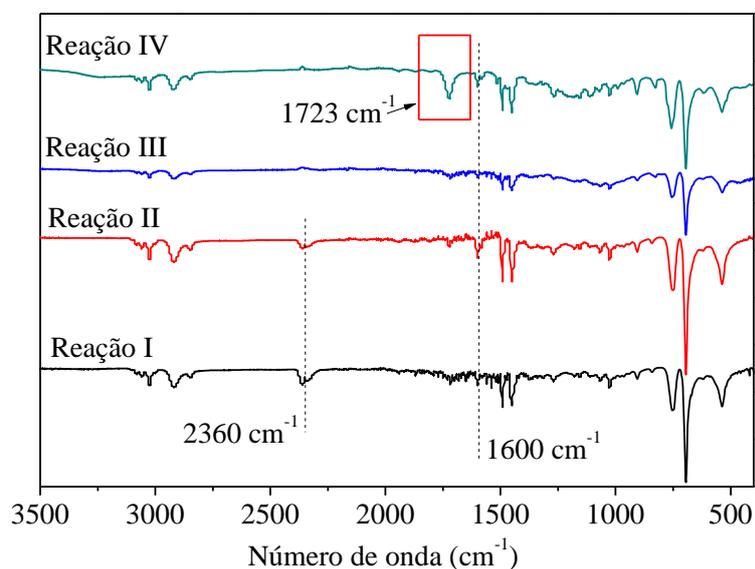


Figura 32 –Espectros de FTIR dos produtos das reações I a IV.

Além disso, foi assinalada também no gráfico a presença de uma banda em 1600 cm^{-1} , referente às ligações C-C em aromáticos (SINDHU, 2006). No entanto, o resultado mais marcante é a presença de uma banda em 1723 cm^{-1} no produto da reação IV, conduzida com EGDMA. Essa banda é característica do estiramento C=O em ésteres α -

β -insaturados (SHARMA, 2004). Dessa maneira, como o EGDMA apresenta essa função nas duas extremidades da sua estrutura, como pode ser observado na Figura 19, parece razoável admitir que houve não somente copolimerização no caso da reação IV, mas também houve a inserção da dupla pendente almejada. Isso foi possível porque como o EGDMA é bifuncional, ele permite que uma extremidade participe da copolimerização enquanto a outra extremidade pode permanecer com a dupla ligação pendente inalterada. A banda das ligações duplas do DVB, que fica localizada em 985 cm^{-1} , não foi detectada no espectro da reação III, assim como a banda das insaturações do 1,5-hexadieno, localizada entre $1620\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$, não foi observada no espectro de FTIR da reação II. Como discutido anteriormente, no entanto, isso não quer dizer que não houve inserção das duplas ligações. Isso pode ser comprovado com um cálculo simples, apresentado a seguir para o caso em que o DVB foi adicionado como comonômero na concentração de 5%. Usando 100 moléculas como base de cálculo, tem-se que:

$$\text{Estireno} = 95 \text{ moléculas} \quad (6)$$

$$\text{DVB} = 5 \text{ moléculas} \quad (7)$$

Como o estireno apresenta 8 carbonos em sua estrutura química e o DVB, por sua vez, apresenta 10 carbonos, tem-se que:

$$\text{Estireno} = 95 * 8 = 760 \text{ carbonos} \quad (8)$$

$$\text{DVB} = 5 * 10 = 50 \text{ carbonos} \quad (9)$$

$$\text{Número total de carbonos} = 760 + 50 = 810 \text{ carbonos} \quad (10)$$

No entanto, apenas dois carbonos do DVB apresentam insaturações. Dessa maneira, $5 * 2$ é igual a 10 carbonos contendo duplas ligações. Com isso, apenas 10 carbonos de um total de 810 carbonos contidos na mistura contêm insaturações. Esse valor corresponde a 0,01% de carbonos contendo duplas ligações, o que em geral, está muito abaixo do limite de detecção do FTIR. Para o caso do EGDMA, a dupla ligação provavelmente foi detectada porque a intensidade da banda relativa à instauração é muito

intensa, o que não ocorre para os demais comonômeros estudados. Como a concentração de insaturações tende a ser baixa, principalmente nos casos em que a copolimerização não foi pronunciada, a detecção por análises de FTIR pode não ser conclusiva.

De maneira a avaliar de forma quantitativa a similaridade entre os espectros das reações I e II foi construída a Figura 33, em que os valores de transmitância dos espectros de FTIR das respectivas reações são confrontados, dando origem a um gráfico em que o coeficiente de correlação é igual a 0,876. O mesmo procedimento foi realizado para comparar os produtos das reações I e III e as reações I e IV, como mostrado na Figura 34 e na Figura 35. O coeficiente de correlação apresentado na Figura 34 indica que o produto da reação III apresenta diferenças mais significativas quando comparado à reação I do que a reação II, em que o 1,5-hexadieno foi usado como comonômero. As diferenças são ainda maiores quando os produtos das reações I e IV são confrontados. Esse resultado é apresentado na Figura 35, em que o coeficiente de correlação obtido foi 0,600. A análise dos coeficientes de correlação corrobora a análise anterior de que a copolimerização com o 1,5-hexadieno parece ser pouco expressiva, mas permite dizer que a copolimerização com o DVB e o EGDMA são mais pronunciadas, pois quanto menor é o coeficiente de correlação, maiores são as diferenças entre os produtos.

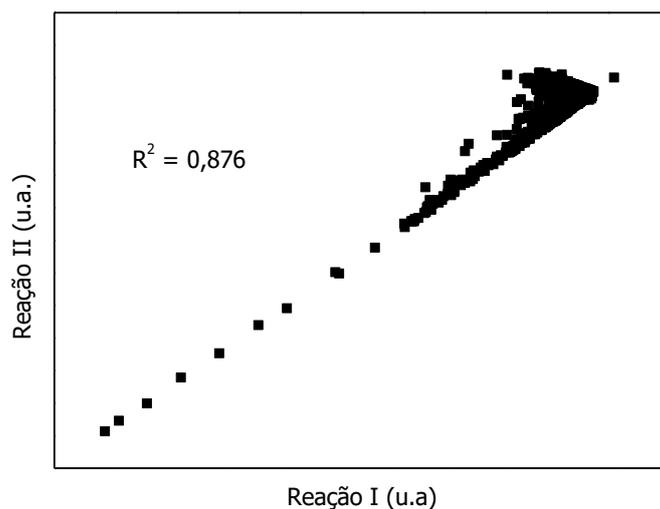


Figura 33 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações I e II.

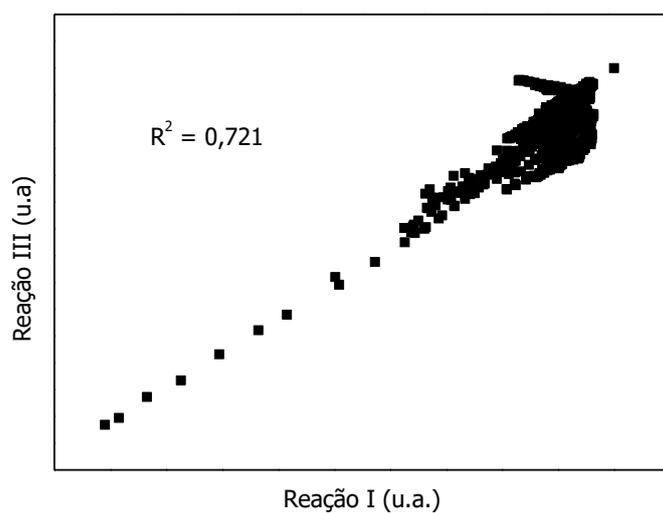


Figura 34 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações I e III.

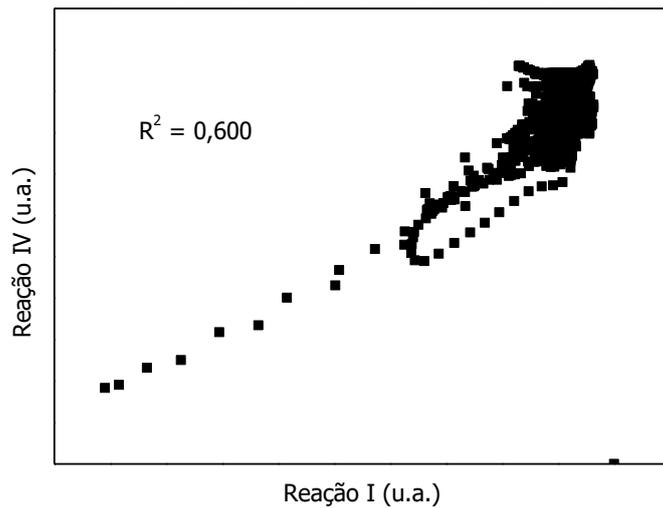


Figura 35 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações I e IV.

Dessa maneira, os resultados dessa primeira etapa da divisão do trabalho referente à inserção de duplas ligações pendentes na estrutura de polímeros indicam que foi possível inserir os monômeros bifuncionais DVB e EGDMA por meio da copolimerização do estireno. Esse material será posteriormente testado nas reações de bioconjugação empregando a reação de *click chemistry* do tipo tiol-eno.

4.2. Reações de *click chemistry* do tipo tiol-eno

Ao longo da Seção 4.2 serão apresentadas todas as reações tiol-eno propostas nesse Capítulo. Para facilitar a correspondência com o Capítulo III, todos os subtítulos a seguir são iguais àqueles apresentados na descrição da metodologia de cada uma das reações.

4.2.1. Reações *click* tiol-eno com estireno

Esse primeiro grupo de reações tiol-eno teve como principal objetivo a obtenção de um *benchmark* que pudesse ser usado como referência para todas as reações posteriores. Após uma extensa revisão da literatura acerca de reações do tipo *click chemistry*, foi possível observar que havia dentre os trabalhos certas semelhanças. Essas semelhanças foram usadas como ponto de partida para os primeiros experimentos projetados e que buscavam realizar uma reação tiol-eno com sucesso. As semelhanças observadas foram:

- A proporção tiol-eno empregada para obter os melhores rendimentos parece se situar entre 2:1 e 10:1 em equivalente molar (CAMPOS *et al.*, 2008, KOO *et al.*, 2010);
- A proporção de catalisador indicada é de 0,1 a 1 equivalente molar em relação ao grupamento tiol (KOO *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2008);
- O catalisador mais frequentemente usado nas reações conduzidas com iniciação térmica é o AIBN (CAMPOS *et al.*, 2008; GOLDMANN *et al.*, 2009, KOO *et al.*, 2010).

Além disso, a literatura apresenta uma escala de reatividade das moléculas insaturadas: norboneno > vinil éter > vinil éster > alil éter > acrilato > maleimida N-substituída > metacrilato > estireno > dienos conjugados (COLE *et al.*, 2013; HOYLE & BOWMAN, 2010; NORTHOP & COFFEY, 2012; HOYLE *et al.*, 2004). De acordo com essa escala, o estireno pode ser empregado com sucesso em reações tiol-eno. Por isso o estireno foi escolhido como reagente para a reação A, porque, além de ser uma opção viável, o estireno é um reagente barato e apresenta um modelo de polimerização já muito bem estudado.

Para completar o par tiol-eno, o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) foi escolhido como fonte de grupamentos SH, por já ter sido empregado em muitas reações bem-sucedidas reportadas na literatura (ARNOLD *et al.*, 2014; UYGUN *et al.*, 2010).

A reação A foi conduzida empregando DMF como solvente, uma vez que ele é comumente empregado na literatura em reações tiol-eno. Além disso, como descrito na Seção 3.2.2.1, o estireno e o MPA foram adicionados na proporção 10:1 e o AIBN foi adicionado na proporção iniciador:tiol de 1:2. O produto final foi seco em estufa de recirculação a temperatura ambiente e lavado com acetona antes da realização de análise de FTIR. Vale ressaltar que após 72h de secagem na estufa, ainda havia um pouco de produto líquido residual. Então foi realizada também uma análise de FTIR do líquido restante. Os dois espectros em questão são apresentados na Figura 36, junto com os espectros dos reagentes para fins de comparação.

Observando a Figura 36 é possível notar a presença de uma banda localizada em 699 cm^{-1} , que está marcada no gráfico e aparece tanto no produto líquido como no produto sólido da Reação A. Como a banda característica da ligação C-S, que é a ligação que caracterizaria a ocorrência da *click chemistry*, ocorre tipicamente em 692 cm^{-1} (CHANDRAN *et al.*, 2012), há indicação de que a reação tiol-eno ocorreu. O deslocamento observado de 692 para 699 cm^{-1} é normal em análises de FTIR e está relacionado a interações com outros componentes do meio (MISTRY, 2009). Observando ainda a Figura 36, nota-se que o produto líquido residual da Reação A parece ser uma mistura entre o solvente da reação (DMF), o MPA e o produto da *click chemistry*. Além disso, nenhum dos dois produtos apresentam evidências da presença de estireno residual, já que as bandas características da dupla ligação do estireno deveriam estar presentes em 1630 cm^{-1} , 910 cm^{-1} ou 990 cm^{-1} (BARTHOLIN *et al.*, 1981). Dessa maneira parece correto admitir que as moléculas de estireno foram eficientemente convertidas em

produtos da reação tiol-eno com o MPA, embora possam ainda existir resíduos não convertidos.

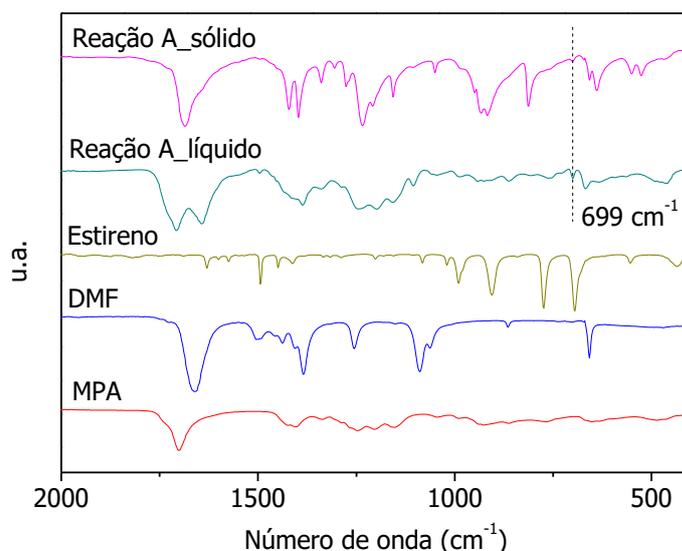


Figura 36 – Espectros de FTIR dos reagentes MPA, DMF e estireno e dos produtos líquido e sólido da reação A.

Uma das grandes preocupações deste trabalho era de que pudesse haver uma competição entre a reação *click* e a reação de polimerização dos compostos contendo duplas ligações, nesse caso específico, o estireno. Dessa maneira, foi realizada uma análise de GPC, cujos resultados são apresentados na Figura 37 e na Figura 38, para detectar a possível presença de poliestireno no produto sólido final da Reação A.

Como pode ser observado na Figura 37, apenas um produto foi detectado na análise de GPC e a massa molar média calculada foi de 222 g/gmol. Isso é indicação clara de que não houve polimerização do estireno; caso contrário, as massas molares médias encontradas seriam muito superiores. Além disso, outro resultado interessante aponta que o índice de polidispersão foi igual a 1,08, o que significa que quase a totalidade das moléculas apresentam a mesma massa molar. O fato de o índice de polidispersão ser baixo também sugere que não ocorreu polimerização, porque o IP de reações de polimerização via radicais livres é tipicamente 2 ou maior que 2 (ODIAN, 2004). A Figura 37 também mostra que o produto obtido parece ser puro, uma vez que apenas foi detectado um pico estreito. Essa observação é confirmada na Figura 38, que apresenta a curva do detector de UV, que também apresenta apenas um pico estreito que surge exatamente ao mesmo

tempo do pico de IR, o que indica que correspondem ao mesmo composto. Outro resultado interessante dessa análise é que a massa molar calculada, 222 g/gmol, é essencialmente igual à soma das massas molares do estireno e do MPA (MPA= 106,14 g/gmol e estireno= 104,15 g/gmol), quando são considerados os erros associados às análises de GPC costumam ser da ordem de 10% (MORI & BARTH, 1999). Esse resultado mais uma vez sugere que o produto de reação é resultado da *click chemistry* entre MPA e estireno. Dessa maneira, a Reação A foi usada como *benchmark* para as demais reações tiol-eno propostas trabalho.

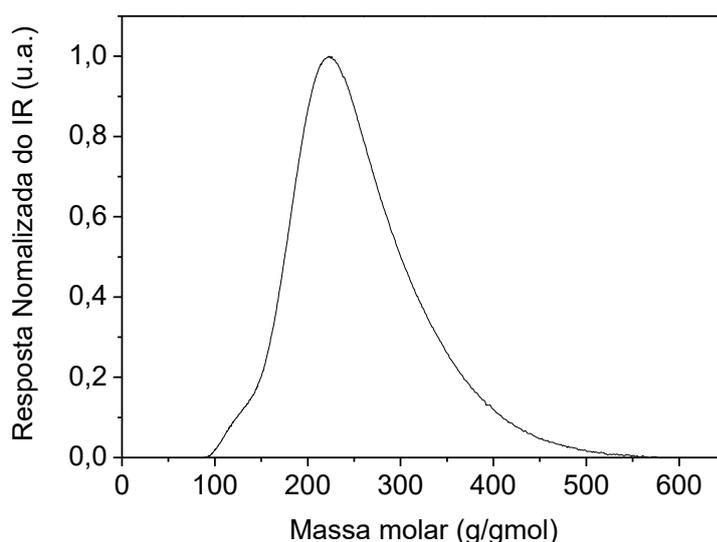


Figura 37 – Distribuição de massas molares do produto final sólido da Reação A.

Ao longo das próximas seções são apresentadas diversas modificações da Reação A. As modificações foram propostas visando a aproximar a reação de condições reais para aplicações em bioconjugação, que exigem principalmente foco em controle da toxicidade e viabilidade técnica e ambiental. Ao longo do texto todas as alterações serão apresentadas e justificadas.

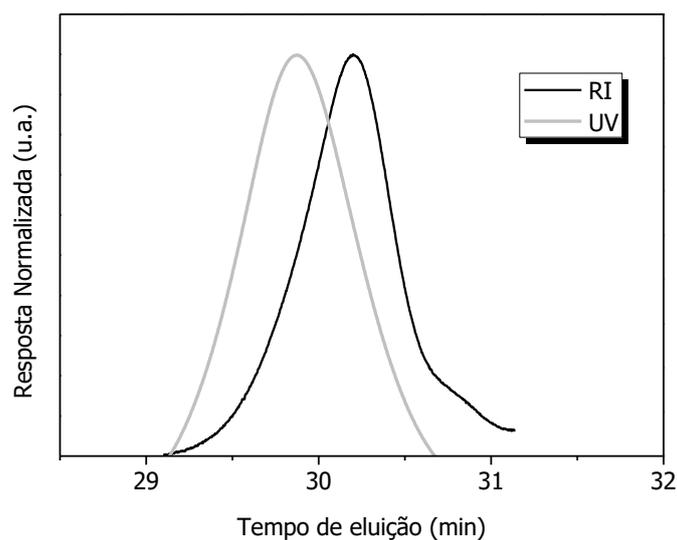


Figura 38 – Respostas normalizadas dos detectores de IR e UV para a análise de GPC da Reação A.

4.2.2. Reação tiol-eno com L-cisteína

Com base na discussão anterior foram propostas modificações da Reação A usada como *benchmark*, de maneira a aproximar a reação de condições reais de operação visando a aplicações em bioconjugação, como disposto a seguir:

- (i) O estireno foi substituído por monômeros divinílicos (DVB, HD ou EGDMA), de maneira a observar se eles também seriam reativos como o estireno. Essa modificação é importante porque, como os reagentes propostos são bifuncionais, eles podem ser usados para inserir duplas ligações nos polímeros, como apresentado anteriormente; afinal, sem a inserção de duplas ligações nos polímeros, a etapa de bioconjugação não é possível da maneira como foi proposta nesse trabalho (vide Figura 18).
- (ii) O ácido 3-mercaptopropiônico empregado na Reação A foi substituído pela L-cisteína, que está presente como constituinte de muitas biomoléculas e, portanto, funciona como um modelo melhor que o MPA para análise de bioconjugação. Além disso, o MPA é tóxico e não é encontrado em proteínas, aminoácidos ou anticorpos.

- (iii) A razão tiol:eno em equivalente molar foi diminuída para 2:1 já que em aplicações reais em bioconjugação os grupamentos tiol estão tipicamente presentes nas biomoléculas (que são normalmente muito caras e fornecidas em quantidades da ordem de dezenas de miligramas), enquanto as duplas ligações são tipicamente fornecidas pela matriz polimérica. Como consequência disso, espera-se que a razão tiol:eno seja baixa em aplicações reais de bioconjugação.
- (iv) O solvente DMF foi substituído por água, uma vez que empregar solventes tóxicos fere diretamente a definição de *click chemistry* e que aplicações em bioconjugação exigem o uso de solventes atóxicos. Dessa maneira, vale ressaltar que todas as reações serão conduzidas em meio heterogêneo porque, com exceção do persulfato de potássio e do EGDMA, que são completamente solúveis em água, e da L-cisteína empregada, cuja solubilidade em água observada era baixa, todos os demais reagentes são insolúveis em água. Assim, em alguns casos o sistema pode ser formado por até 3 fases diferentes (fase orgânica, fase líquida e fase sólida) já que a L-cisteína é insolúvel nos dienos estudados. Finalmente, vale lembrar que a realização de reações *click* em meio heterogêneo não é bem retratada na literatura, apesar de meios heterogêneos serem esperados na maior parte dos problemas envolvendo bioconjugação.
- (v) O AIBN foi mantido como iniciador da reação; no entanto, outros iniciadores foram também testados para avaliar se as reações iriam transcorrer de forma similar. A proporção de iniciador foi mantida em 0,5 equivalente molar em relação ao tiol.

A Tabela 6 indica os reagentes empregados em cada uma das reações conduzidas com as modificações citadas acima. Vale ressaltar que a escolha da L-cisteína foi particularmente cuidadosa, uma vez que ela foi usada nos experimentos como molécula modelo e havia a preocupação de não selecionar um material tóxico para a realização dos testes. A L-cisteína, por ser um aminoácido, além de não ser tóxica, é uma molécula pequena, apresenta o grupamento tiol necessário para a reação e está presente na composição de proteínas, anticorpos e outras biomoléculas de interesse. A estrutura química da L-cisteína é apresentada na Figura 39, em que fica clara a presença do grupamento SH requerido para as reações de bioconjugação propostas.

Tabela 6 – Lista de reações *click chemistry* teste realizadas.

Reação	Dieno	Iniciador	Tiol	Temperatura
1	1,5-hexadieno	BPO	L-Cisteína	85 °C
2	1,5-hexadieno	AIBN	L-Cisteína	85 °C
3	1,5-hexadieno	K ₂ S ₂ O ₈	L-Cisteína	85 °C
4	DVB	BPO	L-Cisteína	85 °C
5	DVB	AIBN	L-Cisteína	85 °C
6	DVB	K ₂ S ₂ O ₈	L-Cisteína	85 °C
7	EGDMA	BPO	L-Cisteína	85 °C
8	EGDMA	AIBN	L-Cisteína	85 °C
9	EGDMA	K ₂ S ₂ O ₈	L-Cisteína	85 °C
10	-	BPO	L-Cisteína	85 °C
11	-	AIBN	L-Cisteína	85 °C
12	-	K ₂ S ₂ O ₈	L-Cisteína	85 °C

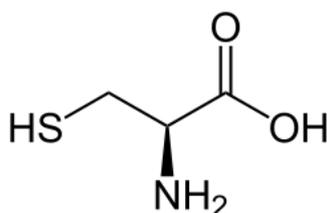


Figura 39 – Estrutura química da L-cisteína.

Vale ressaltar também que a literatura praticamente não apresenta referências sobre a utilização dos comonômeros testados em reações *click*. SPEVACEK *et al.* (2013)

ressaltaram a possibilidade de empregar o 1,5-hexadieno e o EGDMA em reações tiol-eno, mas não realizaram a ligação especificamente com a cisteína. XU & BOYER (2015) também estudaram a reação *click* com o 1,5-hexadieno, mas conjugado ao (etilenodioxí)dietanotiol. HOYLE & BOWMAN (2010) mostraram que a L-cisteína pode ser usada na reação tiol-eno. No entanto, não foram encontradas referências específicas que fizessem uso dos dienos estudados especificamente com a L-cisteína.

Na Figura 40 é apresentado um esquema de alguns dos possíveis produtos da reação entre o 1,5-hexadieno e a L-cisteína na presença dos iniciadores térmicos testados. Os produtos destacados seriam os provenientes da reação *click* em uma extremidade ou nas duas extremidades da molécula de 1,5-hexadieno, enquanto o outro produto seria resultante da reação entre duas moléculas de L-cisteína, formando a cistina. A formação de cistina é, segundo a literatura, bastante comum (BINKLEY & VIGNEAU, 1942; HOGG, 1999).

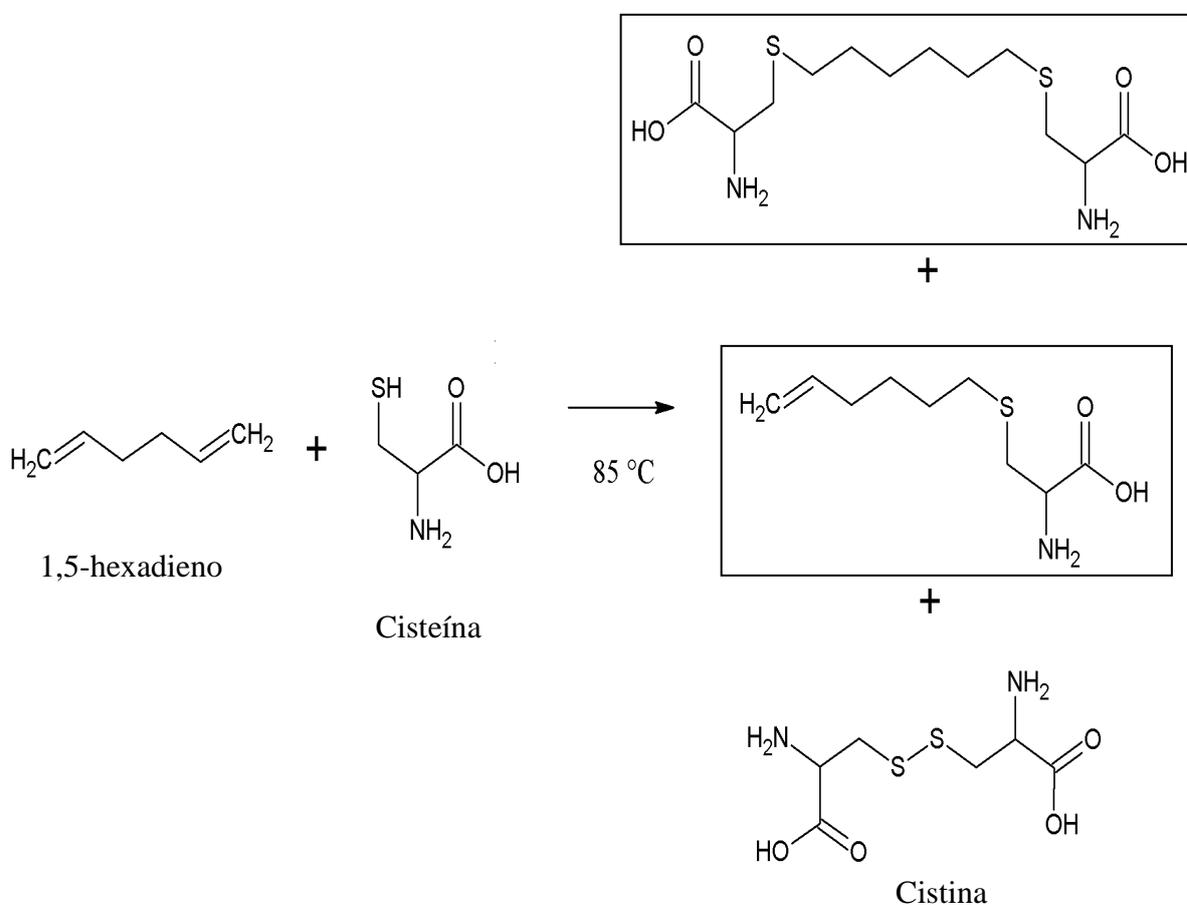


Figura 40 – Possíveis produtos da reação entre L-cisteína e 1,5-hexadieno com os diferentes iniciadores estudados.

Em uma reação *click* conduzida com sucesso, a expectativa era de que houvesse a formação dos produtos destacados na Figura 40 com maior seletividade. Esquemas similares de reação podem ser pensados para os demais monômeros divinílicos estudados, apenas substituindo o HD pelo respectivo dieno.

Para avaliar a formação dos produtos em questão, foram realizadas análises de FTIR das amostras das reações conduzidas com 1,5-hexadieno e com os diferentes iniciadores estudados. Os espectros de FTIR são apresentados na Figura 41, sendo também apresentado o espectro da L-cisteína e do 1,5-hexadieno usados como reagentes para fins de comparação. Apesar de as diferenças entre os espectros serem inúmeras, indicando a formação de diferentes produtos, focou-se principalmente na detecção das bandas que determinariam a ocorrência das ligações *click*, porque esse constitui o objetivo principal do trabalho.

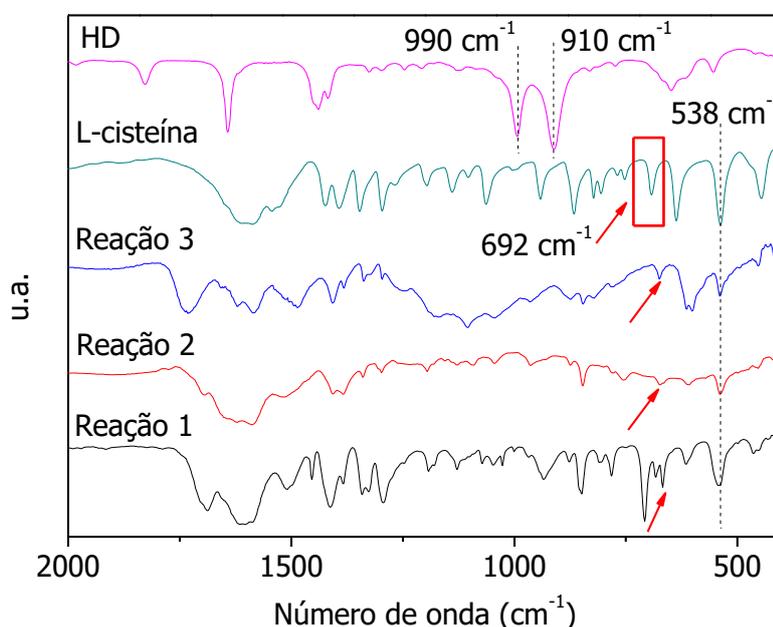


Figura 41 – Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações de L-cisteína com 1,5-hexadieno e com os diferentes iniciadores.

A banda que indica a presença de ligações C-S é a banda posicionada em 692 cm^{-1} (CHANDRAN *et al.*, 2012). Caso ocorra a reação *click*, a expectativa é a observação de um aumento dessa banda nos espectros das reações, quando comparados ao espectro da cisteína pura. No entanto, esse aumento não foi observado, como indicam as marcações

na Figura 41. Outra informação importante é o fato de que a banda referente às ligações S-S, presente em 538 cm^{-1} (DEVI *et al.*, 2010), também se mantém praticamente inalterada, o que praticamente exclui a possibilidade de estar havendo formação adicional de cistina (produto da ligação entre duas moléculas de cisteína). Além disso, deve-se observar também a clara influência que os iniciadores exercem nos produtos obtidos, uma vez que os espectros apresentam diferenças muito significativas. Em particular, quando se observam as Figuras 42, 43 e 44, em que os dados de transmitância das análises de FTIR são analisados para cada par de reações, fica claro que os produtos obtidos são muito diferentes uma vez que não parece haver nenhuma correlação entre os dados apesar de a única diferença entre as reações ser o tipo de iniciador empregado. Esse fato indica que os iniciadores podem exercer grande influência nos produtos de reações de *click chemistry* do tipo tiol-eno.

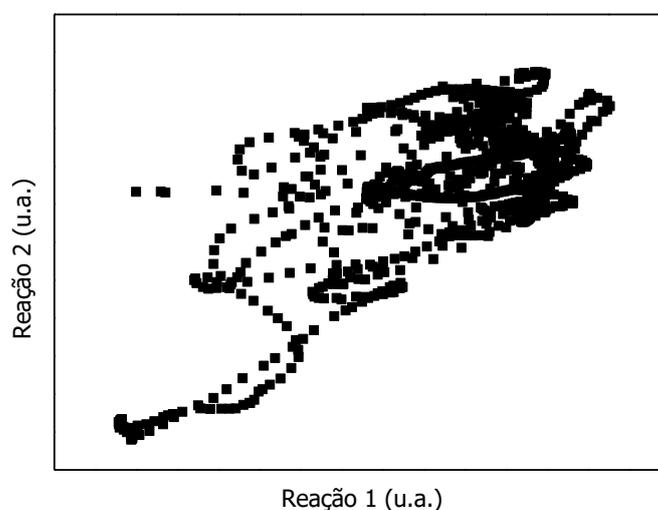


Figura 42 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações 1 e 2.

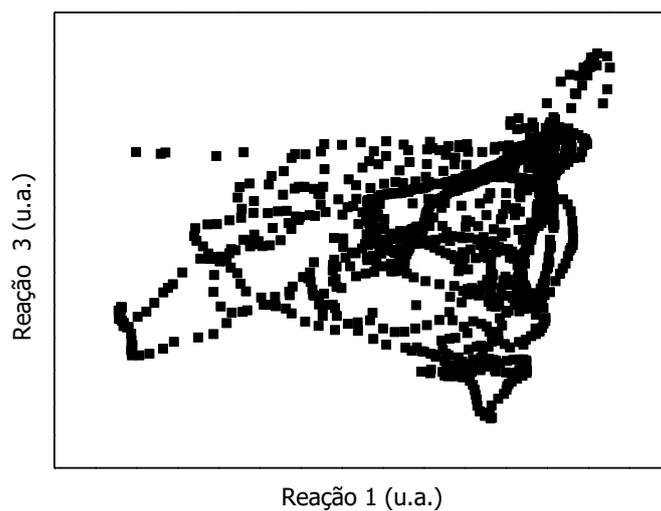


Figura 43 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações 1 e 3.

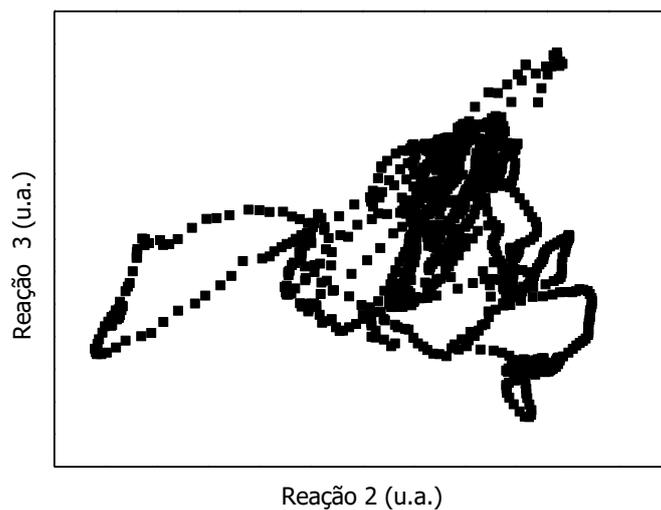


Figura 44 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR das reações 2 e 3.

Essa observação em particular indica que ainda há muitas lacunas a serem preenchidas na literatura da *click chemistry*. Não há trabalhos que apresentem e/ou

expliquem esse resultado, o que mostra claramente a importância de entender mais sobre a formação dos radicais e sua interação com os demais reagentes.

Dessa maneira, aparentemente não ocorreu a ligação tiol-eno quando o 1,5-hexadieno foi empregado com os diferentes iniciadores estudados, já que não houve crescimento da banda da ligação C-S. Ademais, devido à extrema complexidade dos espectros, não foi possível determinar a composição exata dos produtos obtidos. Também é possível notar na Figura 41 que houve o consumo das duplas ligações do HD nas reações 1, 2 e 3 porque as bandas características que deveriam aparecer em 910 e 990 cm^{-1} (MAZZEO, 2011) não estão presentes em nenhum dos produtos. O consumo das duplas ligações pode ser resultado, por exemplo, da polimerização do 1,5-hexadieno, uma vez que não há indícios de ter ocorrido *click chemistry*.

No entanto, vale ressaltar que o espectro da reação 1 se assemelha mais ao espectro da L-cisteína do que os demais. Isso pode ser resultado da temperatura usada nos experimentos. A 85 °C, o BPO se decompõe mais vagarosamente que o AIBN e o persulfato de potássio (BRANDRUP *et al.*, 1999). Dessa maneira, as reações com o AIBN e o persulfato podem estar prejudicando a reação devido à produção rápida e excessiva de radicais livres no meio.

Analisando os espectros de FTIR das amostras com DVB, também é possível concluir que não ocorreu a ligação entre a cisteína e o divinilbenzeno, já que a banda de C-S também não apresentou aumento de intensidade, como mostram as marcações na Figura 45. Mais uma vez a complexidade dos materiais obtidos dificultou o reconhecimento dos produtos das reações. O mesmo ocorreu para as reações com EGDMA, cujos espectros de FTIR são apresentados na Figura 46. Mais uma vez não foi observada aparentemente a ocorrência de ligação *click*.

Quando DVB e EGDMA foram usados como dienos, no entanto, é possível mais uma vez observar a influência exercida pelo tipo de iniciador utilizado, o que indica que a baixa especificidade da reação tiol-eno não depende somente do dieno, o que pode ser considerado como uma importante conclusão. Os gráficos das correlações entre cada par de reações são apresentados no Apêndice II. Mais uma vez também os espectros dos produtos obtidos quando o BPO foi empregado são mais semelhantes ao FTIR da L-cisteína pura, o que também sugere que os efeitos causados pelo BPO também são independentes do tipo de dieno estudado. Ademais, os produtos sólidos obtidos nas

reações 4 a 9 não foram solúveis em nenhum dos solventes testados, assim como os produtos das reações 1 a 3. Também é importante ressaltar que a banda associada às duplas ligações do DVB presentes em 985 cm^{-1} (IHRE & LARSON, 2003) não aparecem nos produtos 4, 5 e 6, o que sugere que foram consumidas em reações laterais que podem incluir, por exemplo, a polimerização do DVB.

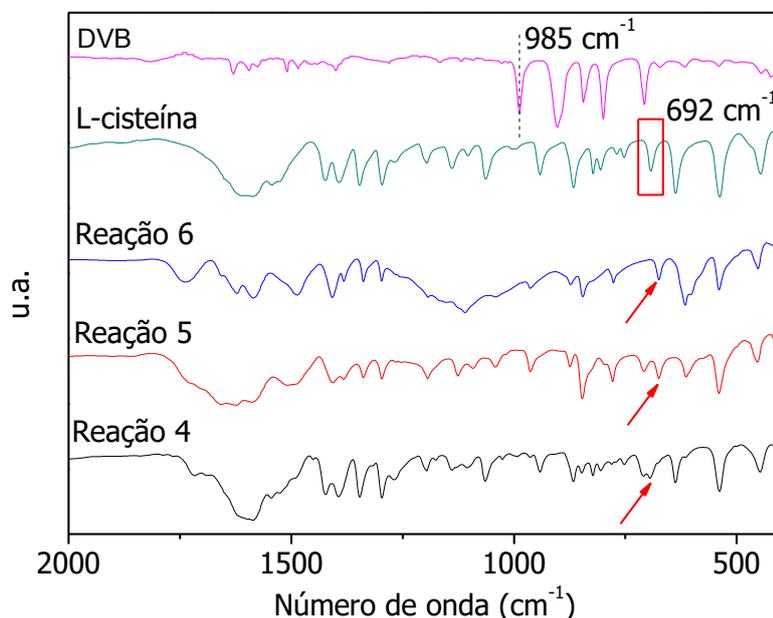


Figura 45 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com cisteína e DVB e com os diferentes iniciadores.

Resultados similares foram observados para o EGDMA, já que a banda relativa às duplas ligações e que se apresenta em 1641 cm^{-1} (URBAN *et al.*, 2007) não parece nos produtos 7, 8 e 9, como assinalado na Figura 46. Mais uma vez isso indica que, como aparentemente não houve *click*, as duplas foram consumidas em reações laterais que podem incluir a polimerização do EGDMA, assim como discutido para os demais dienos. Ademais, também foi assinalada na Figura 46 a presença da banda em 1720 cm^{-1} (HUSSIEN, 2014) associada à presença de grupos carbonila, o que indica a presença de EGDMA nos produtos finais. Esse resultado parece corroborar a hipótese de que uma das reações laterais obtidas é a polimerização dos dienos estudados.

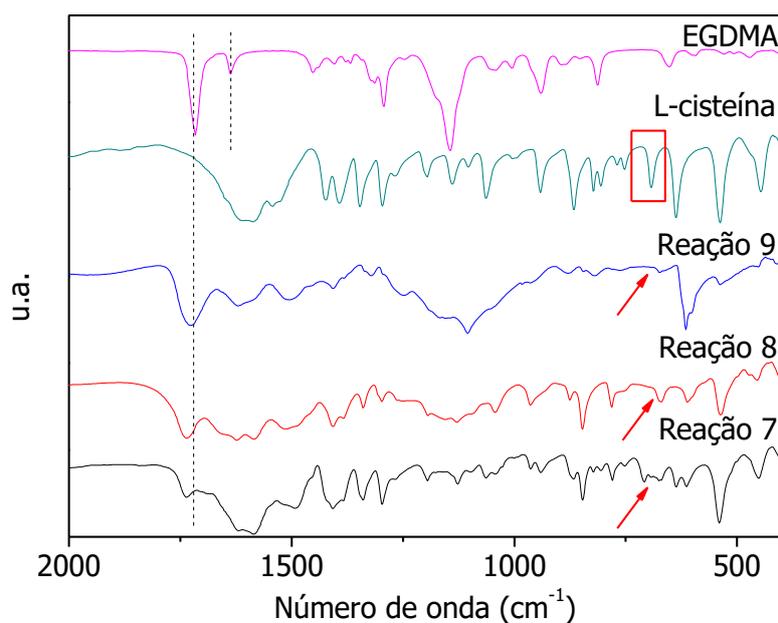


Figura 46 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com L-cisteína e EGDMA e com os diferentes iniciadores.

Assim como no caso da reação com o 1,5-hexadieno, também foi observado nas reações com DVB e com EGDMA que os espectros da reação com o peróxido de benzoíla se assemelharam mais ao da cisteína. Isso reforça a teoria de que pode estar havendo uma geração excessiva de radicais livres nas reações com o AIBN e o persulfato.

Para avaliar a influência dos iniciadores nas reações, novos gráficos de FTIR foram montados com a intenção de observar se os produtos formados variavam quando os dienos eram trocados. Os resultados de FTIR para as reações com o peróxido de benzoíla como iniciador são apresentados na Figura 47. Os gráficos das correlações entre cada par de reações são apresentados no Apêndice II.

A Figura 47 mostra que, quando as análises das reações com o BPO são agrupadas, há uma similaridade muito maior entre os espectros, apresentando baixa sensibilidade à presença dos diferentes dienos. Isso motivou a construção de gráficos similares com os demais iniciadores. A Figura 48 e a Figura 49 indicam que os espectros são muito mais similares quando agrupados por tipo de iniciador, assim como discutido para o caso do peróxido de benzoíla. Os gráficos das correlações entre cada par de reações são apresentados no Apêndice II. Esses resultados reforçam a ideia de que reações

realizadas com diferentes iniciadores podem seguir diferentes rotas de reação, o que ainda não foi discutido na literatura.

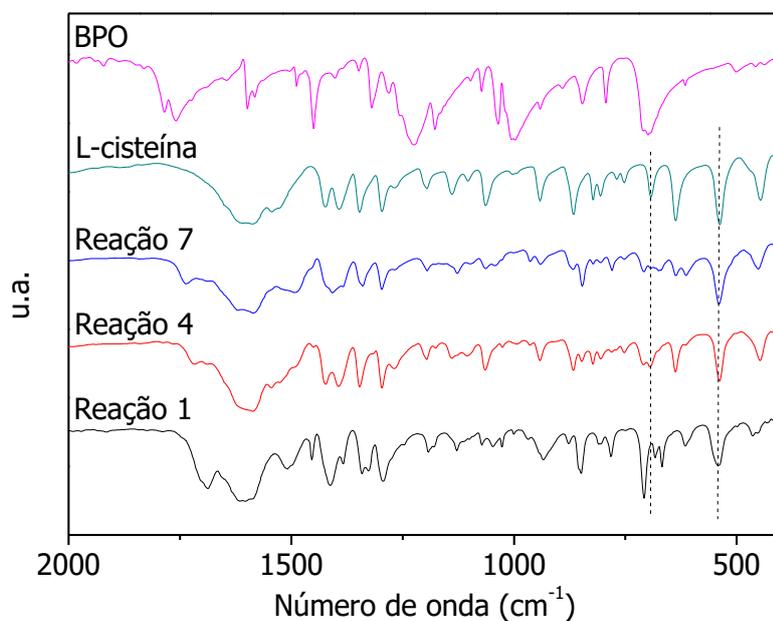


Figura 47 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com L-cisteína e BPO e com os diferentes dienos estudados.

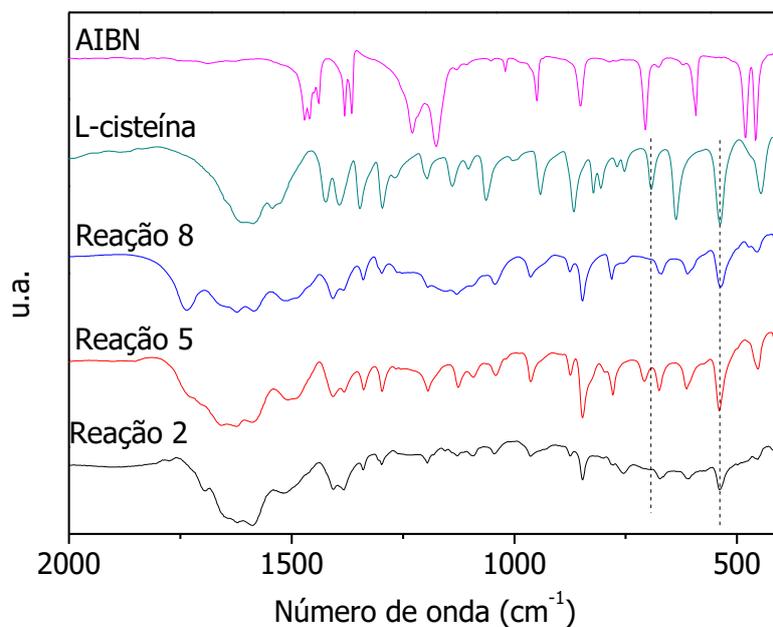


Figura 48 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com L-cisteína e AIBN e com os diferentes dienos estudados

Os resultados também sugerem que os dienos podem não reagir com a L-cisteína gerando produtos de *click chemistry* tiol-eno quando em meio heterogêneo. Dessa maneira, foram feitos novos experimentos, em que nenhum dieno foi utilizado, para avaliar se os produtos formados seriam os mesmos dos correspondentes às reações anteriores.

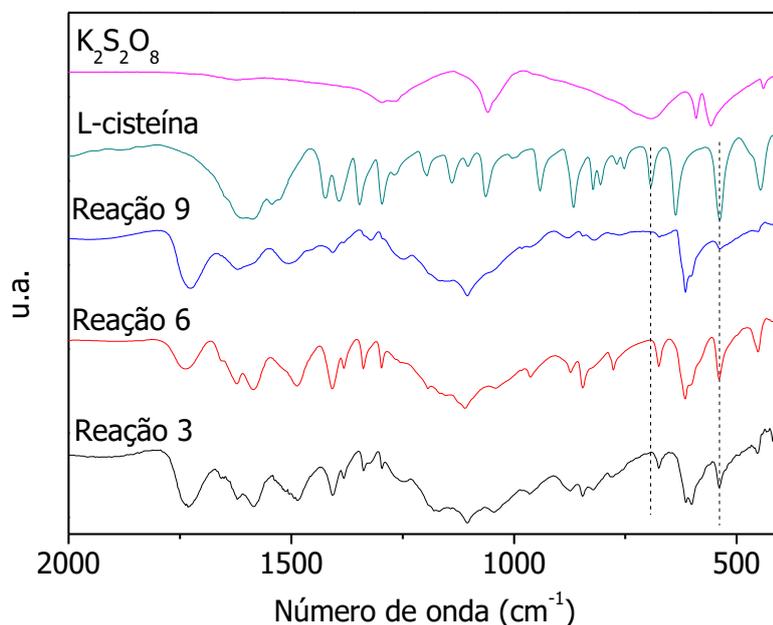


Figura 49 - Comparação dos espectros de FTIR dos produtos das reações conduzidas com L-cisteína e $K_2S_2O_8$ e com os diferentes dienos estudados.

Na Figura 50 são apresentados os espectros de FTIR das novas reações em que não foram empregados dienos. Observa-se que os produtos formados não são os mesmos das reações 1 a 9. Isso mostra que a mistura de produtos formados é ainda mais complexa do que o imaginado e comprova que os dienos participam da reação e, portanto, exercem influência na formação dos produtos. Além disso, comprova também que os iniciadores interagem de maneiras diferentes com a L-cisteína, levando à formação de produtos diversos. Os gráficos das correlações entre cada par de reações são apresentados no Apêndice II. De qualquer maneira, pode-se concluir que aparentemente realmente não ocorre *click chemistry* tiol-eno nas reações de 1 a 9, uma vez que não foi detectada variação na banda referente às ligações C-S, que confirmaria a ocorrência da reação.

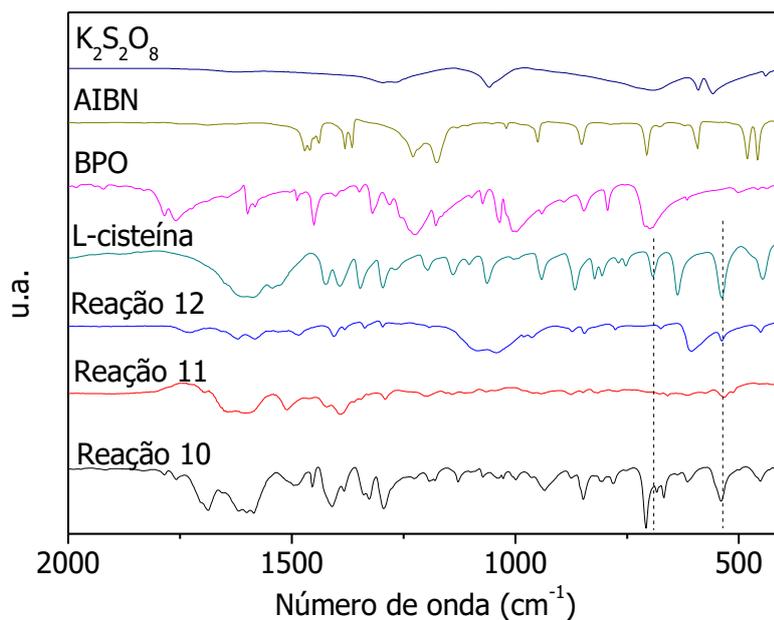


Figura 50 – Espectros de FTIR das reações entre a L-cisteína e os diferentes iniciadores testados na ausência dos dienos.

Com base na discussão anterior, parece razoável dizer que as reações tiol-eno propostas nessa seção não apresentam as características necessárias para serem classificadas como reações *click chemistry* nas condições testadas. Além disso, ficou claro que tanto os iniciadores quanto os dienos exercem influência na reação, que levou à formação de uma mistura complexa de produtos com baixa (ou nenhuma) seletividade para a formação da ligação C-S. Esses efeitos nunca foram discutidos pela literatura e são importantes para o desenvolvimento de sistemas bioconjugados em meio heterogêneo.

Para avaliar então a hipótese levantada de que estaria havendo uma geração excessiva de radicais livres quando AIBN e persulfato de potássio foram empregados, foram realizadas novas reações a temperaturas mais baixas. O peróxido de benzoíla não foi estudado nesse caso porque a taxa de geração de radicais a 70 °C é muito baixa. Além disso, como já foi apresentado anteriormente, o 1,5-hexadieno não foi capaz de inserir duplas ligações pendentes nas condições testadas, de maneira que não parece fazer sentido continuar avaliando o comportamento do 1,5-hexadieno nas reações *click*. Dessa maneira, apenas DVB e EGDMA foram testados como dienos no grupo de reações apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Lista de reações conduzidas a temperatura mais baixa (70 °C).

Reação	Dieno	Iniciador	Tiol	Temperatura
13	DVB	AIBN	L-cisteína	70 °C
14	EGDMA	AIBN	L-cisteína	70 °C
15	-	AIBN	L-cisteína	70 °C
16	DVB	K ₂ S ₂ O ₈	L-cisteína	70 °C
17	EGDMA	K ₂ S ₂ O ₈	L-cisteína	70 °C
18	-	K ₂ S ₂ O ₈	L-cisteína	70 °C

Os espectros de FTIR dos produtos apresentados na Tabela 7 são apresentados na Figura 51 e na Figura 52, podendo ser observado que não houve a formação da banda característica da ligação C-S em 692 cm⁻¹ (CHANDRAN *et al.*, 2012). Além disso, também não ocorreu a presença de dienos residuais no produto, já que as bandas características das duplas ligações do EGDMA em 1641 cm⁻¹ e do DVB em 985 cm⁻¹ também não foram detectadas nos produtos, indicando o consumo de ambos os monômeros em reações laterais (URBAN *et al.*, 2007; IHRE & LARSON, 2003). Entretanto, a presença da banda característica de grupamentos carbonila em 1720 cm⁻¹ (HUSSIEN, 2014) pode ser observada nos produtos das reações 14 e 17, indicando que o EGDMA foi incorporado aos produtos.

De maneira a comparar mais claramente o efeito causado pela diminuição da temperatura, os espectros de FTIR das reações 11 e 15, que foram conduzidas a 85 °C e a 70 °C, respectivamente, foram agrupados e são apresentados na Figura 53. Os espectros indicam que a diminuição da temperatura afetou a formação dos produtos, o que reforça a hipótese de que a taxa de geração de radicais livres afeta o curso da reação. No entanto, apesar desse resultado nunca ter sido apresentado na literatura de *click chemistry*, não é exatamente surpresa que a concentração de radicais livres no meio possa levar à ocorrência de reações laterais indesejadas. Esse importante aspecto da reação ainda não foi avaliado de forma apropriada na literatura consultada.

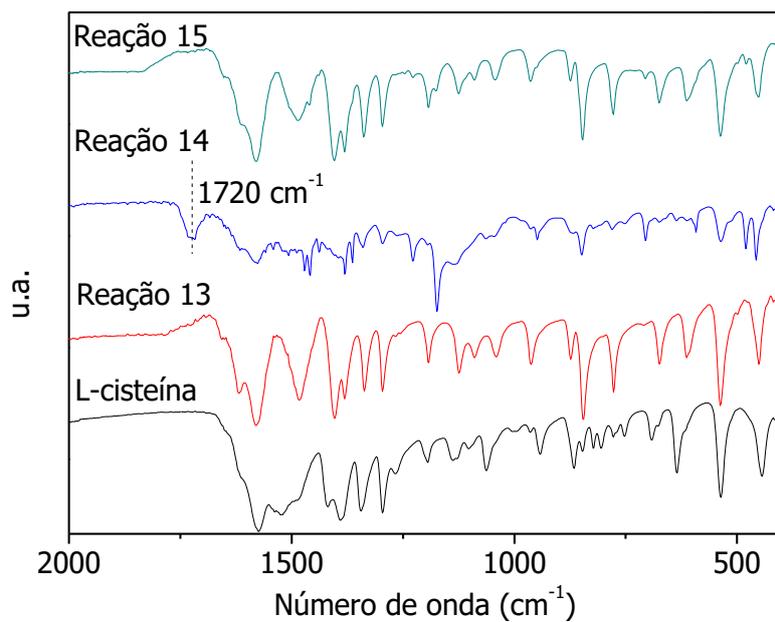


Figura 51 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 13, 14 e 15 e da L-cisteína.

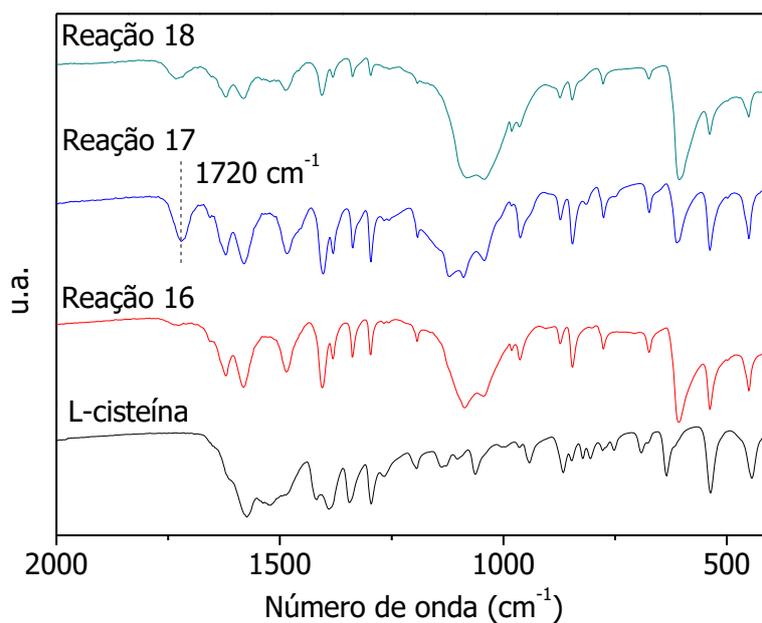


Figura 52 - Espectros de FTIR dos produtos das reações 16, 17 e 18 e da L-cisteína.

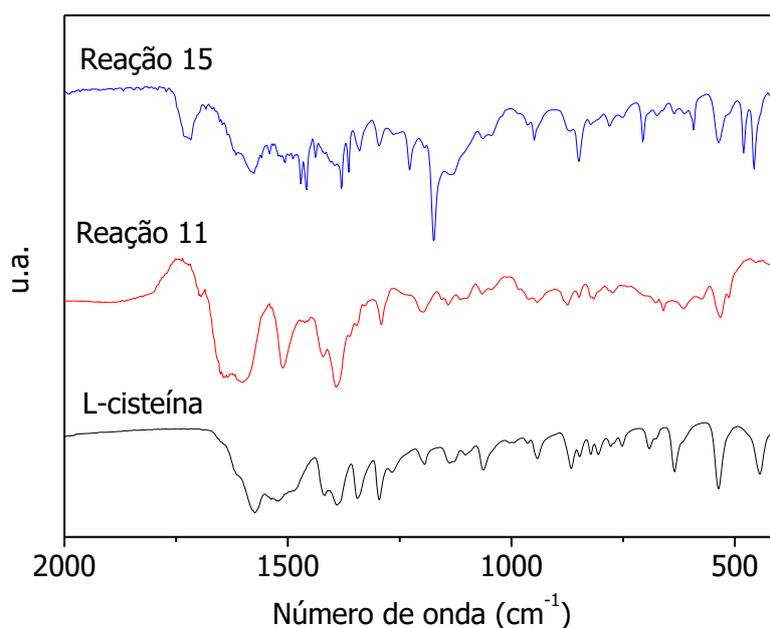


Figura 53 - Espectros de FTIR dos produtos das reações 11 e 15 e da L-cisteína.

Além das análises de FTIR, foram feitos também testes de solubilidade de todos os produtos obtidos. Os solventes testados foram água, HCl, THF, clorofórmio, etanol, metanol, n-hexano e acetona. Os testes visavam à realização de análises de cromatografia para a identificação dos compostos. No entanto, nenhum dos solventes testados foi capaz de solubilizar as amostras. Esse resultado é mais um indício de que as reações resultam em misturas complexas de produtos, possivelmente contendo material reticulado, o que é contrário à definição de *click chemistry*.

Uma das hipóteses levantadas para a não ocorrência da reação *click* pretendida foi o fato de a banda de ligação dissulfeto da L-cisteína pura (538 cm^{-1}) (DEVI *et al.*, 2010) ser uma das mais intensas de seu espectro, como pode ser observado na marcação pontilhada na Figura 54. Além disso, a banda de ligação S-H presente em 2551 cm^{-1} , que deveria ser bastante pronunciada, indicando que haveria grupos tiol livres disponíveis (SOCRATES, 2006), é pouco intensa. Dessa maneira, é possível que grande parte dos tióis livres da cisteína estejam comprometidos com as ligações S-S, impedindo que a reação *click* aconteça. Esse fato também é confirmado pela baixa solubilidade observada para a L-cisteína empregada nos experimentos. A solubilidade da L-cisteína em água é alta (277 g/L) enquanto a solubilidade da cistina é baixa ($0,112\text{ g/L}$) como a observada nos experimentos realizados (SIGMA, 2017; PUBCHEM, 2017). Por isso, pode ser que

seja necessário reduzir a L-cisteína para liberar os grupos SH antes de realizar a reação tiol-eno. Essa ação, no entanto, torna o processo comercial menos competitivo e não muda o fato de que uma vasta gama de reações laterais pode ocorrer quando os reagentes são colocados em contato.

Outra possível causa para a não ocorrência de reação *click* é o fato de as reações terem sido conduzidas em meio heterogêneo. No entanto, conduzir as reações em meio homogêneo constituiria uma grande desvantagem para a conjugação de polímeros a biomoléculas, uma vez que aplicações médicas e farmacêuticas normalmente requerem a produção de micro e nanopartículas que são produzidas em meio heterogêneo. Dessa maneira, investigou-se o efeito da redução da cisteína nos produtos das reações conduzidas em meio heterogêneo.

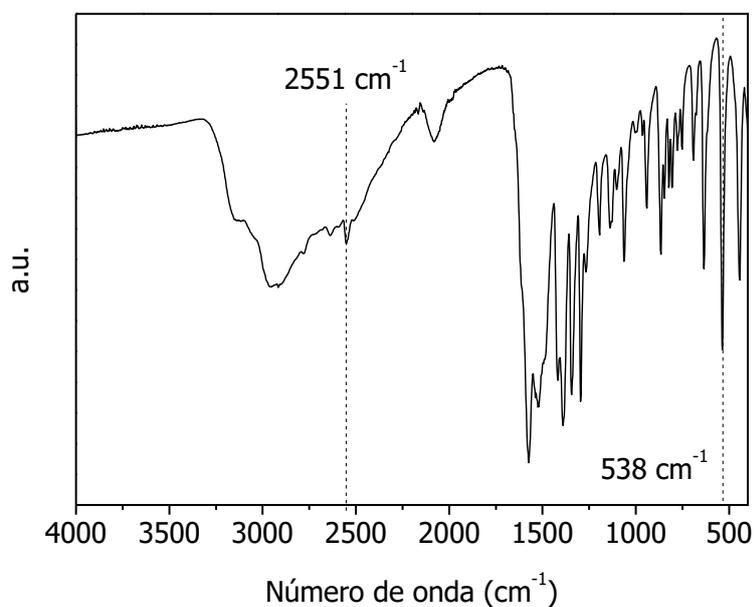


Figura 54 – Espectro de FTIR da L-cisteína pura.

4.2.3. Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido ascórbico

Para testar a hipótese levantada de que os grupamentos SH da L-cisteína estariam comprometidos em ligações dissulfeto, novas reações foram realizadas, adicionando-se ácido ascórbico (vitamina C) ao meio. Sabe-se que a vitamina C é capaz de reduzir as moléculas de cistina *in situ* (TACHAPRUTINUM *et al.*, 2014), fazendo com que os

grupamentos tiol fiquem novamente livres. Dessa maneira, a utilização do ácido ascórbico constituiria uma opção não tóxica para a redução da L-cisteína.

Primeiramente foi feito um teste para avaliar o tempo de atuação do ácido ascórbico. Dessa maneira, os experimentos foram conduzidos por períodos diferentes e os resultados são apresentados na Figura 55.

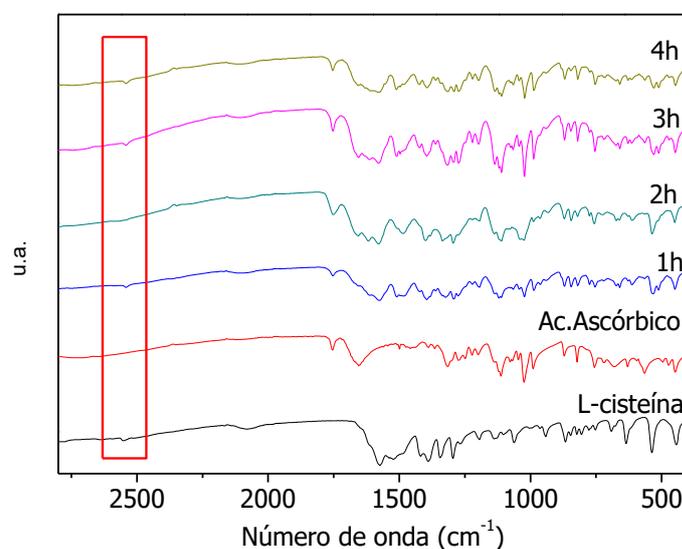


Figura 55 – Espectros de FTIR para a avaliação da reação da L-cisteína com o ácido ascórbico com o tempo.

É possível observar na série temporal que após 2 horas de reação houve alteração no espectro dos produtos, mas que depois desse tempo a vitamina C parece não ter exercido efeito significativo sobre a dinâmica da reação. Isso indica que o ácido ascórbico altera de alguma maneira o produto final. No entanto, a banda que caracteriza a ligação SH, comumente presente em $2550\text{-}2560\text{ cm}^{-1}$ (SOCRATES, 2006), não se alterou com o tratamento conduzido com ácido ascórbico. Isso pode indicar que a vitamina C não reduz a L-cisteína nas condições testadas. Para confirmar os resultados, algumas reações adicionais foram realizadas. Vale ressaltar que nessas reações, o pré-tratamento com ácido ascórbico foi conduzido por uma hora. A lista de reações conduzidas com prévio tratamento com ácido ascórbico é apresentada na Tabela 8. Vale ressaltar que essas reações foram realizadas de maneira idêntica às anteriores, apenas inserindo uma etapa de tratamento com o ácido ascórbico antes da reação visando à redução ao menos parcial das ligações dissulfeto da L-cisteína.

Tabela 8 – Lista de reações realizadas com ácido ascórbico.

Reação	Dieno	Iniciador	Tiol	Temperatura
19	DVB	BPO	L-cisteína	70 °C
20	DVB	AIBN	L-cisteína	70 °C
21	DVB	K ₂ S ₂ O ₈	L-cisteína	70 °C
22	EGDMA	BPO	L-cisteína	70 °C
23	EGDMA	AIBN	L-cisteína	70 °C
24	EGDMA	K ₂ S ₂ O ₈	L-cisteína	70 °C

Os resultados das reações 19 a 21, conduzidas com DVB como dieno, são apresentadas na Figura 56 e indicam que não ocorreu reação *click chemistry* tiol-eno, porque não houve surgimento da nenhuma banda em 692 cm⁻¹, que é a banda da ligação C-S (CHANDRAN *et al.*, 2012). Esse resultado já era esperado, já que não havia sido detectado aumento pronunciado da banda da ligação SH durante o tratamento com a vitamina C, como discutido anteriormente.

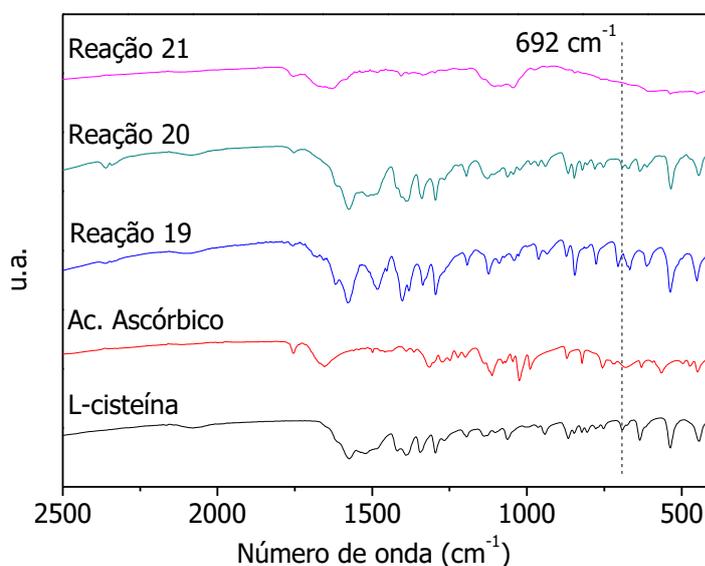


Figura 56 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 19 a 21.

O mesmo resultado foi observado para as reações conduzidas com o EGDMA como dieno, como apresentado na Figura 57. Mais uma vez não houve formação de produto da reação tiol-eno, o que é comprovado pela ausência de banda posicionada em 692 cm^{-1} (CHANDRAN *et al.*, 2012). O ácido ascórbico, portanto, não parece ter atuado como agente redutor efetivo das ligações dissulfeto da L-cisteína nas condições testadas, não alterando de forma expressiva os resultados obtidos. Os gráficos das correlações entre cada par de reações são apresentados no Apêndice II.

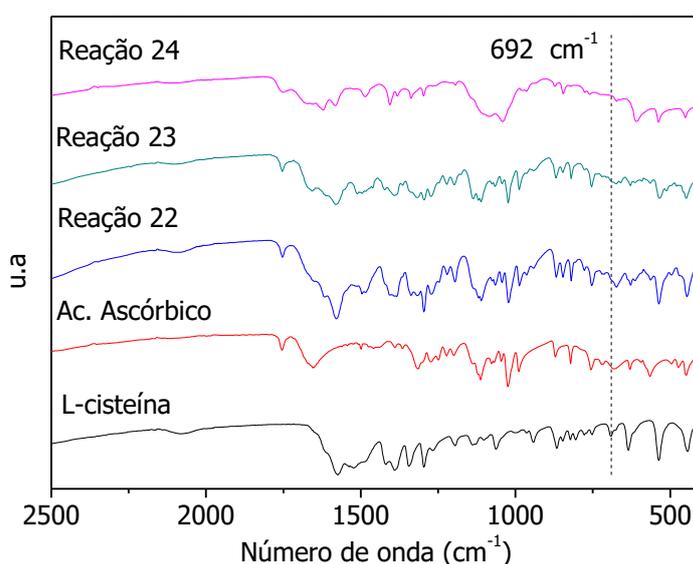


Figura 57 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 22 a 24.

4.2.4. Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido acético

Como o ácido ascórbico não foi capaz de reduzir as ligações dissulfeto nas condições testadas, utilizou-se para outro agente potencialmente redutor das ligações dissulfeto contidas na L-cisteína: o ácido acético. Assim como no caso anterior, o pré-tratamento da L-cisteína foi realizado por diferentes períodos para avaliar se haveria o aumento da banda característica da ligação SH. Os resultados são apresentados na Figura 58.

Como pode ser observado na Figura 58, assim como no caso do ácido ascórbico, não houve aparentemente redução das ligações dissulfeto, porque não houve aumento da banda posicionada em 2551 cm^{-1} . Dessa maneira, nesse caso não foram realizadas reações testando a reação *click chemistry* tiol-eno já que as mesmas não foram bem-sucedidas no

caso anterior, em que o crescimento da banda da ligação SH após o pré-tratamento também não foi observado.

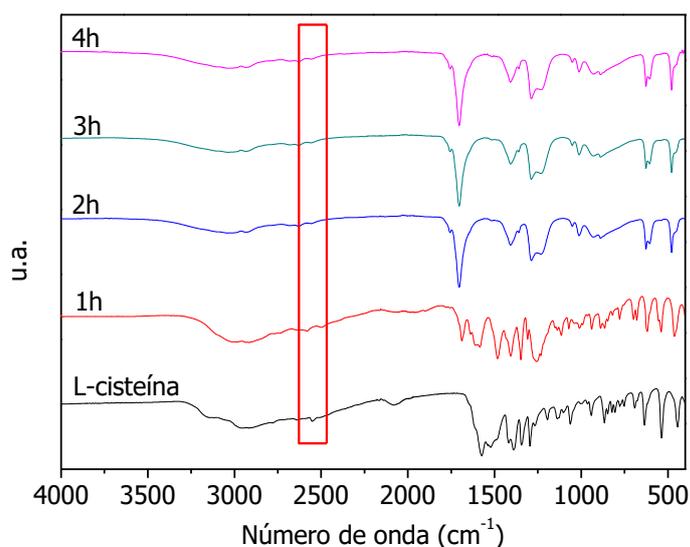


Figura 58 - Avaliação da reação da L-cisteína com o ácido acético com o tempo.

4.2.5. Reações tiol-eno com cloridrato de cisteína

Como nem o ácido ascórbico nem o ácido acético foram capazes de reduzir a L-cisteína nas condições testadas, utilizou-se para um novo agente redutor: o borohidreto de sódio. No entanto, como já discutido anteriormente, outra possibilidade para o fato de não ter sido observada a ocorrência de *click chemistry* é o fato de a reação ter sido conduzida em meio heterogêneo. Dessa maneira, nessa seção foi proposta a substituição da L-cisteína pelo cloridrato de cisteína, que é solúvel em água. As reações são apresentadas na Tabela 9.

Vale ressaltar que as reações 27 e 28 ocorrem em meio homogêneo, como na reação A (*benchmark*), já que todos os reagentes empregados são solúveis em água. As reações 25 e 26 foram conduzidas para efeito de comparação, uma vez que o AIBN é o iniciador mais estudado em reações *click*. No entanto, o AIBN não é hidrossolúvel e o meio é, portanto, heterogêneo. Além disso, nas reações 26 e 28 houve pré-tratamento para redução das ligações dissulfeto do cloridrato de cisteína. Outro detalhe que merece atenção é de que nesta seção a abordagem para determinar a eficiência da reação de

redução foi modificada. Ao invés de tentar observar o aumento da banda de ligações SH em espectros de FTIR, os grupamentos tiol livres foram quantificados com auxílio do reagente de Ellman. Os resultados da quantificação referente à concentração de 0,75mM de cloridrato de cisteína são apresentados na Tabela 10 e indicam que o borohidreto de sódio é um agente redutor eficiente nas condições testadas já que, após a redução, observou-se um aumento de mais de 100 vezes na concentração de SH livre.

Tabela 9 – Reações conduzidas com cloridrato de cisteína.

Reação	Dieno	Iniciador	Tiol	Borohidreto
25	EGDMA	AIBN	Cis-Cl	Não
26	EGDMA	AIBN	Cis-Cl	Sim
27	EGDMA	K ₂ S ₂ O ₈	Cis-Cl	Não
28	EGDMA	K ₂ S ₂ O ₈	Cis-Cl	Sim

Tabela 10 – Resultado da redução com reagente de Ellman.

Amostra	Absorbância	Diluição	Concentração de SH (mol/L)
Cloridrato de Cisteína não reduzida	0,515	-	8,15*10 ⁻⁴
Cloridrato de Cisteína reduzida	0,761	90 vezes	1,08*10 ⁻¹

É importante dizer que o reagente de Ellman reage com as sulfidrilas livres, gerando uma coloração amarelada. Por isso, apenas observando a alteração na coloração das soluções já é possível notar que ocorreu aumento na concentração dos grupos SH livres, como mostra a Figura 59.

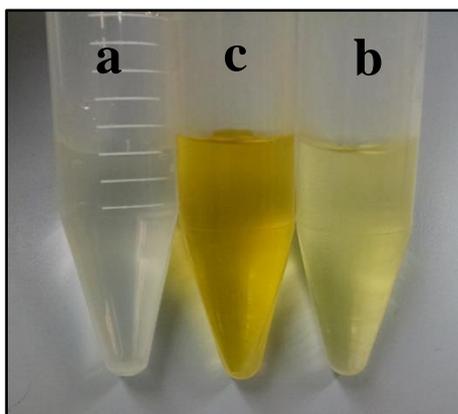


Figura 59 – Reação com reagente de Ellman. (a) branco; (b) cloridrato de cisteína não reduzido; (c) cloridrato de cisteína reduzido com borohidreto de sódio.

Os espectros de FTIR dos produtos das reações são apresentados na Figura 60 e na Figura 61. Os resultados indicam que as duplas ligações contidas no EGDMA e que aparecem em 1641 cm^{-1} aparentemente não foram completamente consumidas. Além disso, também não foi possível detectar a presença de ligações C-S (692 cm^{-1}) (CHANDRAN *et al.*, 2012). O consumo incompleto das ligações vinílicas para o caso das reações 25 e 26 poderia ser explicado pelo fato de o iniciador não ser solúvel em água. No entanto, nas reações 27 e 28, que ocorrem em meio homogêneo, também não foi observado o consumo completo das duplas ligações, o que indica que o par tiol-eno escolhido aparentemente não é reativo.

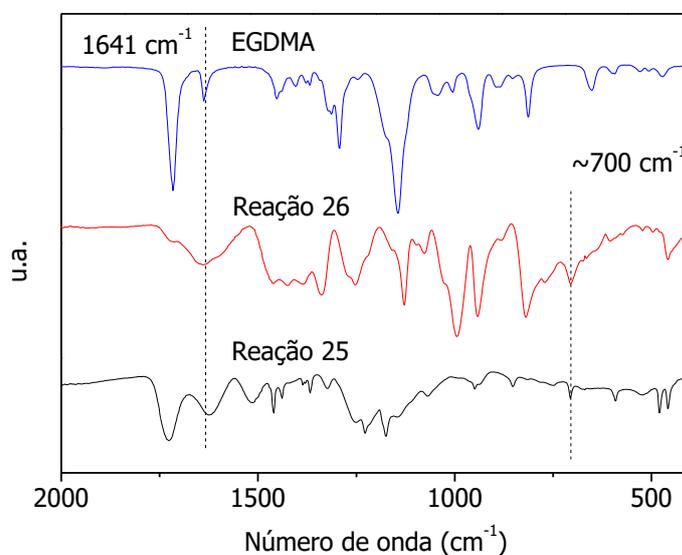


Figura 60 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 25 e 26.

Baseado nos espectros de FTIR das reações 25 e 26 apresentados na Figura 60, é possível inferir que foram formados cloroalcanos devido ao surgimento de banda em 700 cm^{-1} (HUSSIEN, 2014). Isso é mais uma prova da formação de subprodutos, ao invés da formação do produto *click* de interesse. É importante notar que a redução do cloridrato de cisteína, apesar de eficiente, não levou à obtenção dos produtos da reação tiol-eno com alta seletividade, o que indica que os resultados anteriormente reportados não necessariamente estão relacionados somente ao grau de oxidação da L-cisteína.

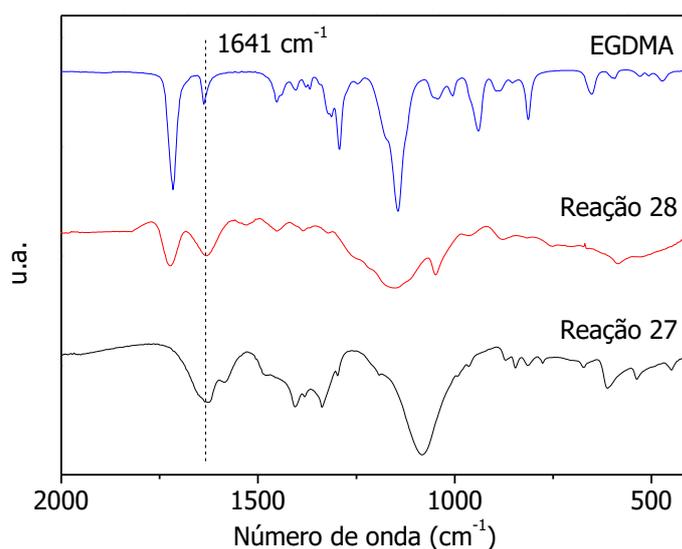


Figura 61 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 27 e 28.

Dessa maneira, a modificação de reagente proposta e a eficiente redução das ligações dissulfeto não foram capazes de garantir a obtenção dos produtos da *click chemistry* tiol-eno.

4.2.6. Reações tiol-eno com polímero contendo duplas ligações pendentes

De maneira a continuar a investigar os motivos pelos quais, com a exceção da reação usada como *benchmark*, nenhuma outra apresentou sinais de sucesso da reação tiol-eno, foi proposta a reprodução de um experimento bem-sucedido da literatura. No experimento em questão, o ácido-3-mercaptopropiônico (MPA) foi reagido com copolímero de estireno com 3-bromo-1-propeno contendo duplas ligações pendentes na presença de AIBN. A reação foi conduzida a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em meio homogêneo, proporcionado

pelo uso de diclorometano como solvente (UYGUN *et al.*, 2010). Os autores reportam conversão de 87% após 4 horas de reação (UYGUN *et al.*, 2010).

Por isso, o copolímero de poli(estireno-co-dimetacrilato de etilenoglicol) apresentado na Seção 4.1 foi utilizado como substituto ao copolímero empregado por UYGUN *et al.* (2010), uma vez que foi comprovada a inserção de duplas ligações pendentes em sua estrutura. A reação foi conduzida nas mesmas condições e com todos os demais reagentes reportados pelos autores. Além do diclorometano, outros dois solventes comumente reportados na literatura da *click chemistry* foram estudados, como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Reações entre polímero contendo duplas pendentes e o MPA.

Reação	Alceno	Iniciador	Tiol	Solvente
29	P(S-co-EGDMA)	AIBN	MPA	DCM
30	P(S-co-EGDMA)	AIBN	MPA	THF
31	P(S-co-EGDMA)	AIBN	MPA	DMF

As análises de FTIR dos produtos são apresentadas na Figura 62. É importante ressaltar que as reações 29 e 30 foram conduzidas em meio homogêneo, enquanto a reação 31 foi conduzida em meio heterogêneo devido à insolubilidade do polímero em DMF. Os resultados mostram que a banda referente às duplas ligações pendentes presente em 1723 cm^{-1} permanece na estrutura após as reações 29 e 31, o que é indicação de que a ligação C-S não foi formada. Já na reação 30, pode ter havido o consumo das ligações duplas, mas devido à interferência do polímero na banda que caracteriza a ligação C-S (692 cm^{-1}), não foi possível confirmar de maneira inequívoca a ocorrência de *click* durante a reação 30.

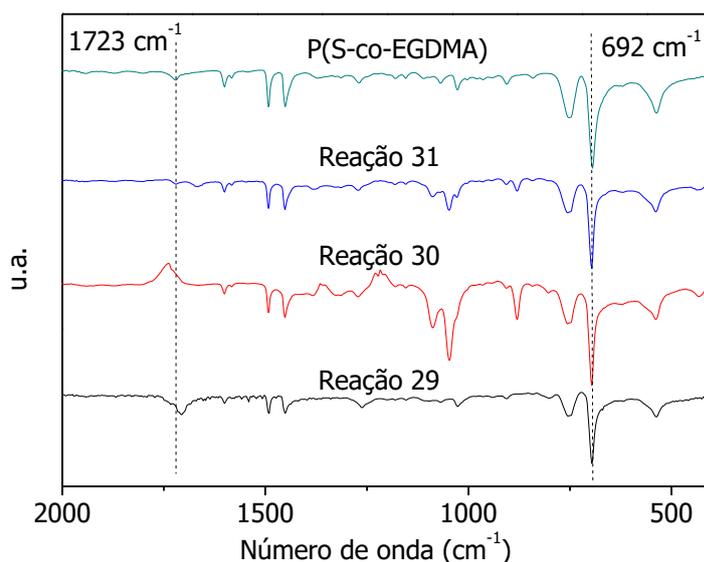


Figura 62 – Espectros de FTIR dos produtos das reações 29 a 31.

É importante ressaltar que a reação 29, em que não foi observado qualquer indício de *click chemistry*, é a reação mais similar àquela bem-sucedida conduzida por UYGUN et al. (2010). A principal e única diferença consiste na composição do copolímero utilizado. No entanto, essa diferença não deveria interferir no resultado final, já que o P(S-co-EGDMA) empregado neste trabalho também contém duplas ligações pendentes e é solúvel em DCM. Esse resultado mais uma vez indica que as reações *click* dependem da natureza e da concentração das espécies envolvidas na reação. Além disso fica claro que o fato de o meio ser homogêneo não é garantia de que uma reação *click* tiol-eno seja bem-sucedida.

4.2.7. Reação tiol-eno com DVB

Após as muitas tentativas de obter produtos de *click chemistry* em condições distintas da Reação A, foi feita uma nova proposta substituindo apenas o estireno usado na reação A por DVB, de maneira a observar se o estireno de fato apresenta características diferenciadas em termos de reatividade. Com isso, de maneira a manter concentrações similares de duplas ligações, 0,27 g de divinilbenzeno foi adicionado ao meio reacional,

ao invés de 0,42 g de estireno como reportado na parte experimental. Esse experimento foi nomeado Reação 32 e os resultados de FTIR são apresentados na Figura 63.

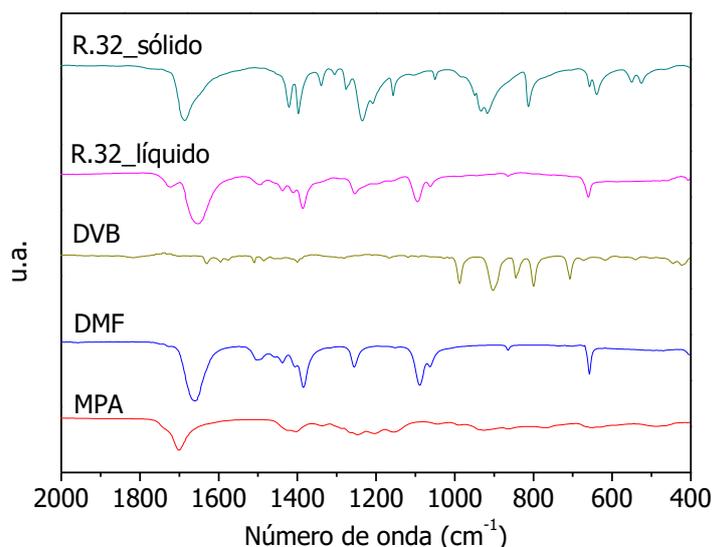


Figura 63 – Espectros de FTIR dos produtos da Reação 32.

Assim como na Reação A, as análises de FTIR dos produtos da Reação 32 foram realizadas tanto para o produto sólido quanto para o produto líquido remanescente da etapa de secagem. Surpreendentemente não houve o aparecimento da banda em 692 cm^{-1} característica da ligação C-S (CHANDRAN *et al.*, 2012). Além disso, ao contrário do que ocorreu na Reação A, na Reação 32 o produto líquido residual parece ser composto quase que exclusivamente de DMF, o solvente utilizado. Dessa maneira, ficou claro que a fonte de ligações vinílicas afeta significativamente o curso da reação *click chemistry* tiol-eno.

Neste caso, como o produto sólido da reação 32 mostrou-se solúvel em THF, foi possível realizar análises de GPC, cujo resultado é apresentado na Figura 64. A massa molar média numérica obtida foi de 302 g/gmol , com índice de polidispersão de 1,07. No entanto, diferentemente do que foi observado para a Reação A, na Reação 32 a massa molar calculada foi diferente da soma das massas molares dos reagentes DVB e MPA ($130,19\text{ g/gmol}$ e $106,14\text{ g/gmol}$ respectivamente). Na realidade, o valor calculado de 302 g/gmol está mais próximo da massa molar de um dímero do divinilbenzeno, especialmente se for considerada a adição de um fragmento do radical de AIBN (NC_4H_6

= 68 g/mol). Isso é mais um indicativo de que não houve formação de produto da reação de *click chemistry* nesse caso, mas a dimerização do DVB.

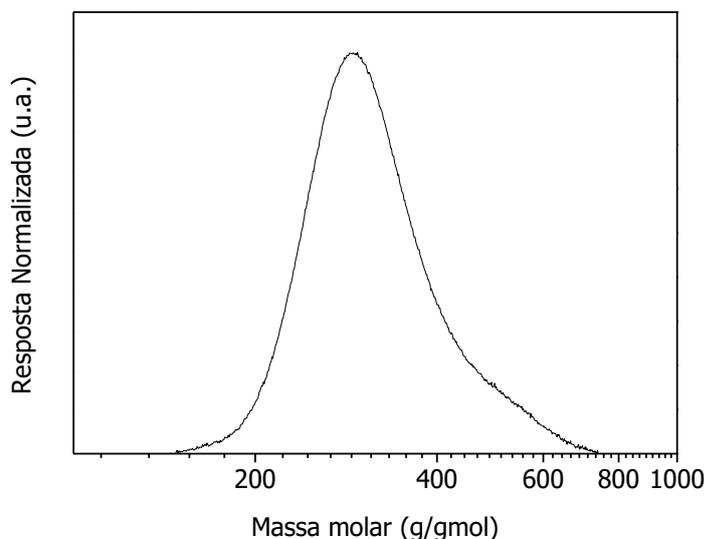


Figura 64 – Distribuição de massa molar do produto da Reação 32.

Observando com maiores detalhes o resultado de GPC com detector de UV apresentado na Figura 65, pode ser notada uma banda intensa, que foi detectada também no detector de RI e está associada a produtos com massa molar numérica média de 302 g/gmol, como já discutido. No entanto, o detector de UV também captou uma pequena banda, deslocada para massas molares menores. Essa banda pode estar relacionada à presença de AIBN decomposto. O AIBN apresenta tipicamente uma banda de absorção localizada em 365 nm (ZHENZHONG *et al.*, 2015), mas durante a decomposição essa banda reportada pela literatura é gradualmente deslocada para comprimentos de onda próximos a 255 nm (ZHENZHONG *et al.*, 2015; PABIN-SZAFKO & WIŚNIEWSKA, 2011), que foi o comprimento de onda utilizado na análise de GPC. Essa banda menor pode, portanto, ser associada à presença de AIBN decomposto, o que estaria de acordo com a massa molar mais baixa observada.

Entretanto, a banda pequena pode também estar relacionada à presença de solventes residuais. Para excluir essa possibilidade, os reagentes da Reação 32 foram solubilizados em THF e injetados no cromatógrafo. Os resultados são apresentados na Figura 66 e na Figura 67 e indicam que nenhuma das curvas observadas ou qualquer combinação entre elas corresponde à curva do produto da Reação 32.

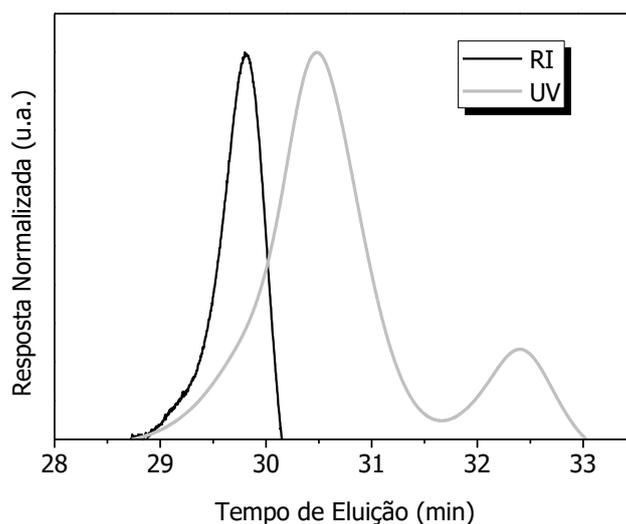


Figura 65 – Resultados de GPC do produto da Reação 32.

O sinal de UV fornecido pelo detector e apresentado na Figura 65 indicou a existência de múltiplos produtos de reação, cujas massas molares diferem em cerca de 150 g/gmol, indicando que a polimerização pode competir com a reação *click*. Portanto, mantendo uma perspectiva ampla, não é possível assegurar que a reação de *click chemistry* constitui a rota mais rápida e/ou preferencial nos sistemas propostos. Possivelmente a reação de *click chemistry* tiol-eno pode não constituir a rota preferencial em muitos sistemas reacionais.

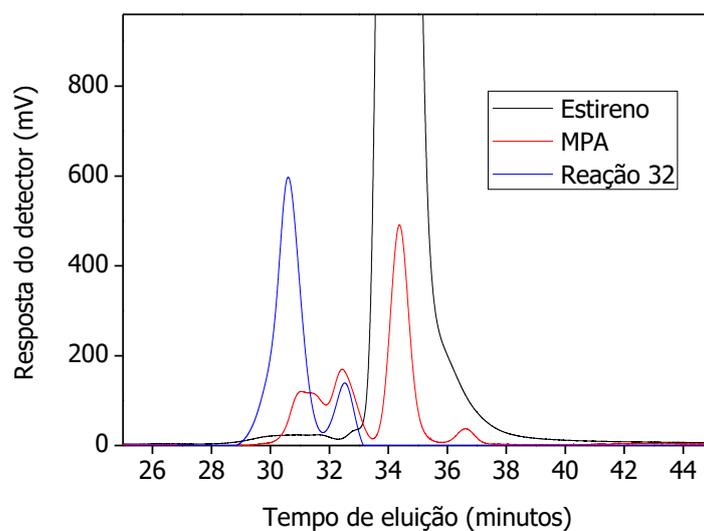


Figura 66 – Resultados de GPC para os reagentes estireno e MPA confrontados com o produto da Reação 32.

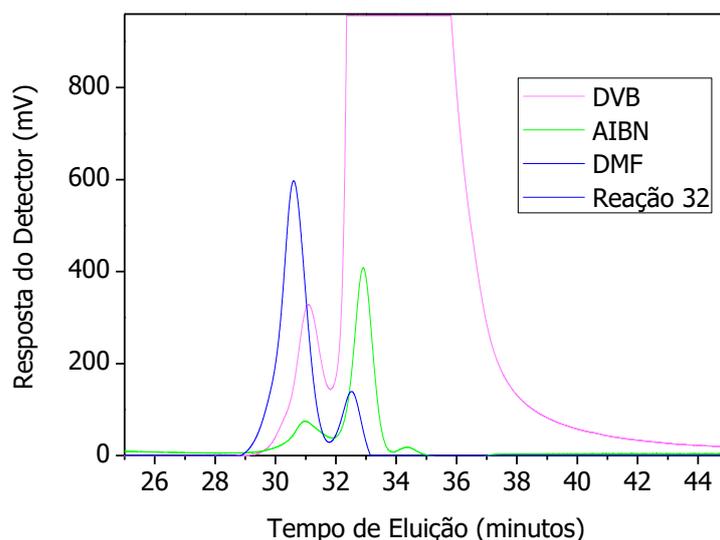


Figura 67 - Resultados de GPC para os reagentes DVB, AIBN e DMF confrontados com o produto da Reação 32.

4.2.8. Reação do estireno com L-cisteína

O estireno aparentemente exerceu um papel fundamental na reação tiol-eno dentre os sistemas apresentados, uma vez que apenas na Reação A (*benchmark*) foi detectado produto da *click chemistry*. Dessa maneira, a Reação 5 foi reproduzida substituindo o DVB pelo estireno para observar se os resultados discutidos para a Reação 5 (meio heterogêneo, redução do tiol e tipo de iniciador) ainda seriam relevantes após a substituição, ou se a principal causa da não ocorrência de reação seria simplesmente a baixa reatividade característica do DVB.

O espectro de FTIR do produto dessa nova reação, chamada de Reação 33, é apresentado na Figura 68. Como marcado no gráfico, foi detectada uma banda em 696 cm^{-1} no produto da Reação 33 que pode estar ligada à formação de produto de *click chemistry*. No entanto, devido às bandas características do estireno e do poliestireno na mesma região espectral (URBANIÁK-DOMAGALA, 2012), não foi possível caracterizar de maneira inequívoca o produto. Além disso, não foi possível realizar análises de GPC como na seção anterior, porque o produto não era solúvel em solventes analíticos usuais, o que inviabilizou as análises de GPC e de RMN, mas indica uma vez mais a produção de mistura complexa de produtos no meio reacional.

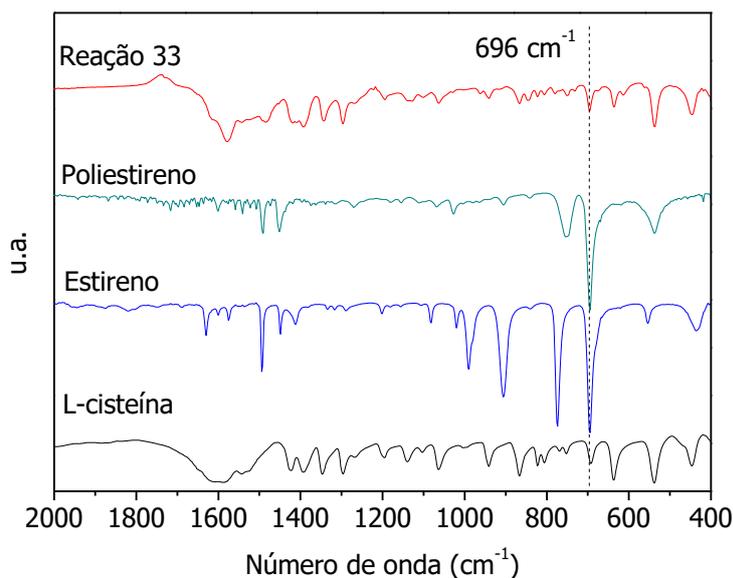


Figura 68 – Espectro de FTIR da reação 33.

4.3. Comentários Finais

Com base nos resultados apresentados ao longo deste Capítulo IV fica claro que existem muitos aspectos da reação tiol-eno a serem estudados. Em particular deve ser avaliado o efeito causado pelo uso de diferentes iniciadores, que exerceram grande influência nos produtos finais de reação em todos os casos testados, levando à formação de misturas complexas e diferentes de produtos. Esse aspecto tem sido negligenciado, como se a natureza do iniciador não fosse importante para o sucesso da reação *click* tiol-eno, ao contrário do que foi observado no presente trabalho. Além disso, a literatura explora em demasia o uso de AIBN nas reações tiol-eno, porém são raros os trabalhos que apresentam resultados com outros iniciadores, o que provavelmente justifica a falta de informação sobre o tema. Dessa maneira, cabe um estudo mais aprofundado do efeito dos iniciadores nas reações de *click chemistry* do tipo tiol-eno de maneira a preencher essa lacuna deixada pela literatura.

Outro efeito negligenciado pela literatura e que mostrou ter importância para as reações tiol-eno foi o efeito da taxa de reação, que também está ligado direta e indiretamente aos iniciadores utilizados. A concentração de radicais livres no meio pode afetar diretamente os produtos finais de reação, levando à ocorrência de reações laterais,

por exemplo. Indiretamente, esse aspecto também significa que a temperatura da reação pode exercer enorme impacto sobre o andamento da reação *click* tiol-eno, outro ponto pouco discutido na literatura.

Além disso, não está claro se existe a necessidade de conduzir as reações tiol-eno em meio homogêneo. Além da falta de consenso entre grupos de pesquisa acerca desse tema, outras questões relevantes merecem destaque, como o fato de a utilização de solventes tóxicos ser inadequada para aplicações em bioconjugação e o fato de aplicações médicas e farmacêuticas normalmente exigirem que o material se encontre na forma de micro ou nanopartículas, em que a reação em meio heterogêneo é requerida.

Com relação especificamente ao uso de solventes tóxicos, é importante ressaltar que diversos autores empregam solventes em seus procedimentos experimentais, o que vai contra a definição de *click chemistry*.

Por fim, a rota para bioconjugação por meio de reação tiol-eno, apesar de muito atraente, pode ser ineficiente, uma vez que as reações parecem ocorrer somente com pares específicos de reagentes, como foi o caso do par MPA/estireno na presença de AIBN. Os diferentes dienos testados aparentemente não foram reativos nas condições utilizadas, apesar de não haverem restrições quanto ao uso de qualquer tipo de reagente (seja tiol ou eno) reportadas na literatura. Dessa maneira a reação *click* tiol-eno não deveria ser tratada como uma reação eficiente de forma genérica, mas particular, para construir um procedimento operacional para a bioconjugação de proteínas com suportes poliméricos, já que os resultados obtidos sugerem que apenas alguns poucos sistemas de reação são efetivamente bem sucedidos.

Há, portanto, muitos aspectos relevantes a serem discutidos acerca da reação tiol-eno, o que justifica a continuidade do estudo explorando uma outra rota de funcionalização, como analisado nos próximos capítulos, uma vez que a rota tiol-eno parece não ser a melhor rota de bioconjugação com base nos sistemas testados.

Capítulo V

Revisão Bibliográfica: Parte II

5.1. Polimerização RAFT

A técnica de polimerização por transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação, tradicionalmente conhecida como polimerização RAFT, é uma técnica que permite a síntese de polímeros com estruturas complexas e controladas (BARNER-KOWOLLIK, 2008). Há hoje diversas técnicas que permitem sintetizar polímeros com arquitetura bem definida. Entre elas estão a polimerização radicalar controlada por transferência de átomo (ATRP), a polimerização mediada por nitróxido (NMP) e a polimerização RAFT (BARNER-KOWOLLIK, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A técnica RAFT, no entanto, é a considerada mais robusta e versátil, sendo possível utilizá-la para polimerizar de forma controlada uma ampla gama de monômeros (MOAD *et al.*, 2008). A Figura 69 mostra a evolução histórica do número de publicações envolvendo polimerização RAFT ao longo dos últimos 20 anos e o aumento continuado pelo interesse na técnica.

Uma das principais desvantagens da técnica de polimerização radicalar convencional é o fato de que as cadeias poliméricas obtidas são bastante heterogêneas, uma vez que não é possível exercer controle preciso sobre a estrutura das cadeias formadas (SEMSARILAR & PERRIER, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Na polimerização radicalar convencional, as cadeias crescem muito rapidamente e logo se envolvem em reações de terminação, dando origem às cadeias mortas ou inativas (ODIAN, 2004). Com isso, os índices de polidispersão são superiores a 1,5, dando origem a uma distribuição razoavelmente larga de tamanhos de cadeia (ODIAN, 2004). Idealmente, quando são abordadas aplicações médicas e farmacêuticas de polímeros, espera-se que as distribuições sejam tão uniformes quanto possível, pois baixos índices de polidispersão significam que os materiais são mais homogêneos e conseqüentemente apresentam comportamento mais previsível e reprodutível (MOREIRA, 2015). Dessa maneira, as polimerizações controladas, que apresentam como grande vantagem a

possibilidade de controlar de forma mais precisa a distribuição das massas molares (BARNER-KOWOLLIK, 2008), surgem como uma excelente alternativa para a produção desses materiais destinados a aplicações mais nobres.

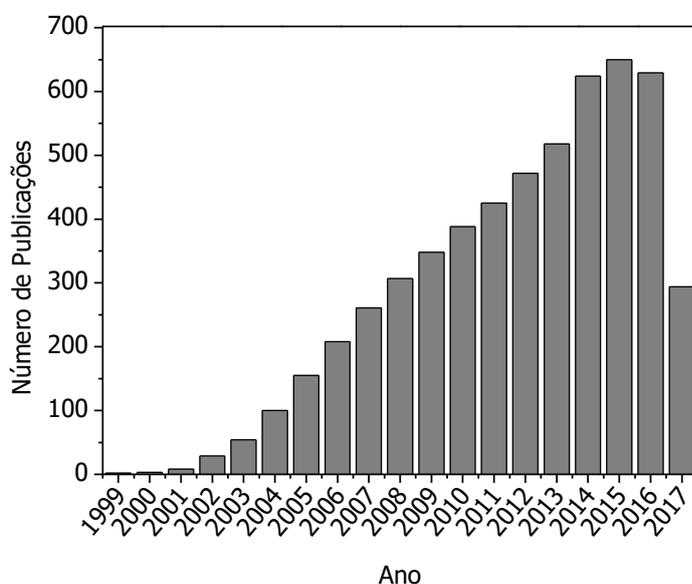


Figura 69 – Histórico do número de publicações entre os anos de 1999 e 2017 segundo a ISI Web of Science (busca pela expressão “RAFT polymerization”). Consulta realizada em 27 de junho de 2017.

O mecanismo de polimerização RAFT, esquematizado na Figura 70, compreende etapas de iniciação, transferência reversível de cadeia, re-iniciação, equilíbrio de cadeia e terminação (SEMSARILAR & PERRIER, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Na etapa de iniciação, assim como na polimerização radicalar convencional, o iniciador se decompõe em radicais livres, que reagem com monômeros e geram pequenas cadeias vivas que promovem o crescimento. Na etapa de transferência reversível de cadeia, as cadeias vivas reagem preferencialmente com o agente RAFT, que pode então retornar a conformação inicial ou liberar um radical no meio (BARNER-KOWOLLIK, 2008). O radical pode atuar na etapa de reiniciação e, caso ele seja liberado, também formar novas cadeias dormentes, que podem ser novamente ativadas com sob ação de outra molécula ativa, na etapa que é conhecida como a de equilíbrio de cadeia (MOAD *et al.*, 2009). O controle do crescimento é garantido porque as condições que ocasionam a terminação das cadeias são controladas, de forma que as taxas de terminação bimoleculares são mantidas a níveis

reduzidos por conta de baixa concentração de espécies ativas disponíveis no meio (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Assim, as cadeias têm oportunidade de crescer porque são mantidas preferencialmente em estágio dormente, sendo constantemente ativadas e desativadas (BARNER-KOWOLLIK, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Vale ressaltar, no entanto, que só é correto dizer que a polimerização RAFT foi de fato controlada quando o crescimento da massa molar numérica apresenta relação linear com a conversão, como esperado em sistemas vivos de poliadição (MOREIRA *et al.*, 2014).

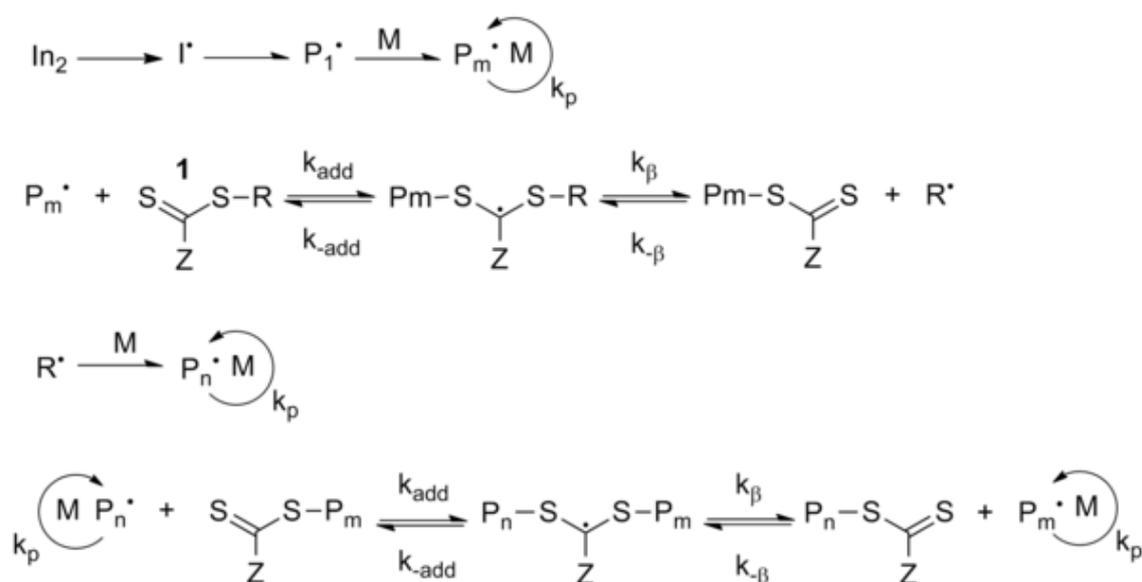


Figura 70 – Mecanismo da polimerização RAFT.

Observando o mecanismo da reação, apresentado na Figura 70, é possível notar que parte da estrutura do agente RAFT permanece na cadeia polimérica após a reação. Alguns grupos de pesquisa estudam maneiras de retirar esses grupamentos por aminólise, redução ou eliminação térmica (MOAD *et al.*, 2005), já que são potencialmente tóxicos. No entanto, vale ressaltar que a presença desses grupamentos terminais na cadeia abre um excelente campo de oportunidades na área da bioconjugação (RAHMAN & GRAJALES, 2016). Isso ocorre porque os grupos terminais tiocarboníltio remanescentes podem ser reduzidos e envolvidos em reações com biomoléculas após a polimerização (MOREIRA *et al.*, 2014). Assim, o que pode ser visto como uma desvantagem para alguns, torna-se uma enorme vantagem, quando observado do ponto de vista da

funcionalização de estruturas poliméricas, já que o polímero RAFT nada mais é que uma estrutura polimérica funcionalizada.

Os reagentes RAFT são essencialmente agentes de transferência de cadeia, sendo que os agentes RAFT mais utilizados são os ditioésteres, os tritioarbonetos e os ditiocarbamatos (BARNER-KOWOLLIK, 2008). A solubilidade e reatividade de cada agente depende de um grupo R e um grupo Z (MOAD *et al.*, 2008), como representado na Figura 71. O grupo R deve ser facilmente quebrado homoliticamente para gerar radicais capazes de atuar também na etapa de reiniciação. É, portanto, um grupo de saída. Já o grupamento Z é responsável pela reatividade da ligação C=S (MOAD *et al.*, 2008). Portanto, é de se esperar que a escolha do agente RAFT seja crucial para cada tipo de monômero, uma vez que cada agente tem uma reatividade característica. A Tabela 12 mostra algumas dessas correspondências já conhecidas.

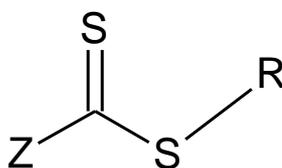


Figura 71 – Estrutura química genérica dos agentes RAFT.

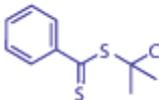
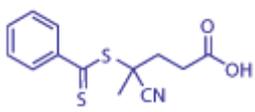
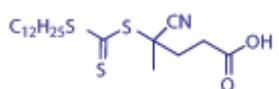
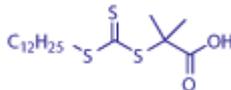
Na polimerização RAFT é possível prever a massa molar final dos polímeros porque o número de cadeias é controlado pela concentração de agente de transferência adicionado. Essa previsão é feita por meio da Equação 11 (SVENSON & PRUD'HOMME, 2012), apresentada a seguir.

$$Mn = \frac{[M]_0}{[RAFT]_0} * \alpha * MM_{mon\acute{o}mero} + MM_{RAFT} \quad (11)$$

em que:

$[M]_0$ é a concentração molar inicial dos monômeros; $[RAFT]_0$ é a concentração molar inicial do agente RAFT; α é a conversão dos monômeros; $MM_{mon\acute{o}mero}$ é a massa molar do monômero; e MM_{RAFT} é a massa molar do agente RAFT.

Tabela 12 – Reatividade dos agentes RAFT para cada tipo de monômero (Adaptado de SIGMA-ALDRICH, 2017).

Agente RAFT	Estirenos	Acrilatos	Metacrilatos	Metacrilamidas
	+++	+++	-	-
	++	+	+++	+++
	++	+	+++	+++
	+++	++	+++	+++
	+++	++	+++	+++
	+++	+++	+	+

Com base nas informações apresentadas a respeito da técnica RAFT, fica claro que ela garante maior controle, reprodutibilidade e homogeneidade dos produtos. Com isso, o emprego da polimerização controlada parece ser uma excelente alternativa à polimerização convencional em casos de aplicações médicas e farmacêuticas.

5.2. Técnicas de Polimerização para produção de partículas

Devido à importância que as partículas têm nas aplicações da indústria farmacêutica, as principais formas de produção de micro e nanopartículas poliméricas são discutidas a seguir.

São inúmeras as técnicas de polimerização que permitem a formação de polímeros na forma de partículas. Cada uma delas, no entanto, apresenta uma particularidade, que faz com que o material final tenha propriedades diferenciadas. Dessa maneira, como a forma e tamanho das partículas poliméricas exercem enorme influência nas propriedades

finais do produto (SANTOS, 2007; SUN *et al.*, 2010; WAY, 2011), a escolha da técnica de polimerização a ser empregada é de suma importância para obter o desempenho desejado.

A técnica de polimerização em suspensão, por exemplo, permite a produção de partículas esféricas na forma de pérolas com tamanhos médios variando na faixa de 1-1000 μm (JAHANZAD *et al.*, 2004). A reação envolve o preparo de duas fases: uma aquosa e uma orgânica. Na polimerização em suspensão conhecida como convencional, a fase aquosa é chamada também de fase contínua e contém, além da água, um agente estabilizante. Já a fase orgânica, também conhecida como fase dispersa, contém além do(s) monômero(s), um iniciador que, quando submetido a temperaturas elevadas, se decompõe, gerando radicais livres que dão início à reação de polimerização (ODIAN, 2004).

Na polimerização em suspensão, a reação ocorre dentro das gotas de monômero, que são estabilizadas pelo agente de suspensão presente na fase aquosa. Por isso, é imprescindível que a concentração de agente estabilizante seja suficiente para que a coalescência das gotas seja minimizada ou idealmente impedida. É imprescindível também que a velocidade de agitação do sistema seja capaz de promover a quebra das gotas grandes em gotas com tamanhos menores, contribuindo com a manutenção da estabilidade do meio. O equilíbrio entre esses fenômenos de quebra e coalescência das gotas é responsável pela distribuição de tamanhos final das partículas poliméricas formadas (ODIAN, 2004).

Nos casos em que os monômeros são solúveis na fase aquosa, a polimerização em suspensão ocorre na forma de suspensão inversa. Nesse caso, a fase dispersa deve conter água, iniciador e monômero(s), enquanto a fase contínua contém um óleo e o agente de suspensão (CANEVAROLO, 2006).

Outra técnica de polimerização empregada para obtenção de partículas esféricas é a polimerização em emulsão (também conhecida como macroemulsão), cujas partículas finais são obtidas na faixa compreendida tipicamente entre 50 nm e 1 μm (GALVAN *et al.*, 1995). Nessa técnica, assim como na suspensão, ocorre a mistura de duas fases: orgânica e aquosa. Além do monômero, da fase aquosa contínua e do iniciador, devem ser adicionados também ao meio um surfactante (sabão) e um agente tamponante, que serve para impedir a acidificação do meio causada pela decomposição do iniciador (ODIAN, 2004). No caso da emulsão convencional, vale ressaltar que o iniciador deve

ser solúvel na fase aquosa, ao contrário da suspensão, em que o iniciador é solúvel na fase orgânica. O surfactante é adicionado em concentração acima da concentração micelar crítica (CMC), formando micelas (GALVAN, 1995). Por isso, quando há a mistura das duas fases, formam-se grandes gotas de monômero (1-10 μm) estabilizadas pelo surfactante, restando moléculas do sabão não dissolvidas, que se organizam na forma de pequenas micelas, quando a concentração é suficientemente alta (acima da CMC). As grandes gotas de monômero funcionam, portanto, como reservatórios que abastecem as micelas, onde ocorre efetivamente o início da polimerização. Dessa forma, as partículas poliméricas formadas pela nucleação das micelas vão crescendo ao longo da reação, alimentadas pelo monômero de maneira gradual, de acordo com o equilíbrio termodinâmico que se estabelece (ODIAN, 2004). A nucleação preferencial das micelas ocorre por conta da área específica elevada das pequenas partículas, que capturam de forma mais eficiente os radicais formados no meio aquoso.

Outra técnica de polimerização também bastante empregada para a produção de nanopartículas é a polimerização em miniemulsão, usada para produzir partículas com tamanhos na faixa característica de 50 a 500 nm (MITTAL, 2011). Na polimerização em miniemulsão, o sistema também é formado por duas fases, mas apresenta algumas diferenças em relação às polimerizações em suspensão e emulsão já apresentadas. O iniciador, por exemplo, é frequentemente solúvel na fase orgânica, ao invés da fase aquosa, como na emulsão convencional. Isso ocorre porque na miniemulsão não são formadas micelas (a concentração de surfactante usada deve ser inferior à CMC), o que faz com que a reação ocorra dentro das gotas de monômero. Para que as partículas formadas tenham tamanho na escala nanométrica, as duas fases são misturadas antes do início da reação, empregando equipamentos de dispersão com alta energia de cisalhamento, como o turrax (agitador de alto cisalhamento), o homogeneizador ou o ultrassonicador (MITTAL, 2011). Como as gotas de monômero já estão formadas nessa pré-mistura e não há a formação de micelas, como na polimerização em emulsão, o tamanho das partículas não varia muito ao longo da reação. Portanto, a distribuição inicial de gotas costuma ser muito parecida com a distribuição final de partículas após a polimerização (LAMPROU, 2006; PEIXOTO, 2013).

A miniemulsão é termodinamicamente instável e pode sofrer desestabilização por dois diferentes mecanismos: a degradação difusional (*Ostwald ripening*) e a coalescência das gotas (SCHORK *et al.*, 2005). Por isso, é usado um agente hidrofóbico como

coestabilizante, que dificulta a difusão do monômero para a fase aquosa, o que pode provocar a migração de monômero das gotas menores para as gotas maiores. Além disso, assim como na polimerização em emulsão, outro agente usado para manter a estabilidade das miniemulsões é o surfactante, que é um agente anfifílico que se organiza de forma a deixar a parte apolar da molécula voltada para a fase orgânica e sua parte polar voltada para a fase aquosa. Esse mecanismo cria uma espécie de “película protetora” que dificulta a coalescência das gotas de monômero (SCHORK *et al.*, 2005; MITTAL, 2011). Além disso, o surfactante forma uma camada polar sobre a superfície das partículas, causando a proteção por repulsão eletrostática. Finalmente, o emulsificante reduz a tensão interfacial, facilitando a estabilização de partículas menores (ODIAN, 2004; SCHORK *et al.*, 2005).

5.3. A polimerização em miniemulsão convencional para o encapsulamento de fármacos

Todas as técnicas apresentadas para a produção de polímeros na forma de pequenas partículas podem ser empregadas para a polimerização de monômeros hidrofílicos ou hidrofóbicos (ODIAN, 2004). Por meio da técnica de miniemulsão, no entanto, é possível obter um látex, que a princípio pode ser diretamente administrado no paciente, sem a necessidade de dispersar o material em outros excipientes farmacêuticos. Finalmente, polímeros produzidos em miniemulsão permitem a incorporação *in situ* de fármacos nas partículas (GALVAN, 1995; SCHORK *et al.*, 2005). A incorporação *in situ* configura uma grande vantagem em relação aos métodos que não adicionam os princípios ativos no momento da reação, pois diminuem o número de etapas, o que torna o processo mais simples e economicamente competitivo. No entanto, a adição de fármacos concomitante à reação de polimerização pode ocasionar efeitos indesejados, como a inibição da polimerização, a perda de atividade do ativo e/ou a interação entre o fármaco e os demais componentes presentes no meio reacional (GALVAN, 1995).

A seguir são apresentados alguns dos trabalhos que empregam a técnica de miniemulsão para fins de encapsulamento de fármacos. Vale ressaltar que, apesar do enorme interesse pelo tema, não há uma literatura tão extensa que relacione a polimerização em miniemulsão com o encapsulamento de fármacos. São encontrados trabalhos que empregam a técnica para o encapsulamento de aromas (THEISINGER *et*

al., 2009), partículas magnéticas (XU *et al.*, 2003; ROMIO *et al.*, 2012), sílica (LAMI *et al.*, 2012), pigmentos (LELU *et al.*, 2003) e outros compostos orgânicos e inorgânicos (WEISS & LANDFESTER, 2010; LANDFESTER & CRESPIY, 2013). Esses trabalhos comprovam a capacidade da técnica de miniemulsão de encapsular os mais variados materiais. No entanto, vale destacar que há ainda muito o que ser estudado acerca desse tema, em especial quando se trata de encapsulamento de fármacos.

MENDES *et al.* (2012) estudaram o uso de partículas de PMMA preparadas em miniemulsão. Os autores realizaram testes de citotoxicidade com os polímeros para avaliar sua biocompatibilidade e obtiveram resultados positivos, que indicam que o material pode ser empregado para a aplicações médicas e farmacêuticas.

HUANG *et al.* (2007) compararam as técnicas de emulsão e miniemulsão para o encapsulamento de paclitaxel, um fármaco hidrofóbico, em partículas de poli(n-butil-ciano-acrilato) e os resultados indicam que a técnica de miniemulsão foi capaz de encapsular o antineoplásico com maior eficiência.

LORCA *et al.* (2012) encapsularam a benzofenona-3, um filtro solar, em partículas de PMMA produzidas em miniemulsão. Os autores reportaram que a eficiência de encapsulamento foi de praticamente 100%, que as partículas formadas apresentaram morfologia esférica e que as miniemulsões permaneciam estáveis, sem a separação de fases, por até 6 meses. LORCA *et al.* (2012) notaram também que a benzofenona-3 interagiu com o meio e provocou o crescimento das cadeias de PMMA mesmo sem a presença de iniciador, o que pode ser vantajoso, pois a incorporação do filtro solar ao polímero impediria a absorção pela pele.

FONSECA *et al.* (2013) estudaram o encapsulamento *in situ* de praziquantel em nanopartículas de PMMA produzidas em miniemulsão. Os autores compararam o uso do homogeneizador de alta pressão com o uso do turrax e determinaram que, para o caso estudado, o uso do homogeneizador era mais adequado, pois permitiu a produção de miniemulsões mais estáveis, com distribuição de tamanhos de partícula mais estreitas e com maiores eficiências de encapsulamento.

LEE *et al.* (2014) desenvolveram um sistema de liberação de paclitaxel encapsulado em nanopartículas de poli(n-butil-ciano-acrilato) produzidas em miniemulsão. Os inventores também compararam as técnicas de emulsão e miniemulsão, assim como HUANG *et al.* (2007), e concluíram que, no caso da emulsão tradicional, a eficiência de encapsulamento foi de 18%, enquanto na miniemulsão a eficiência de

encapsulamento foi de 56%. Vale ressaltar que LEE *et al.* (2014) empregaram apenas 1% (p/p) de fármaco em relação ao monômero, o que consiste em uma carga pequena de fármaco no sistema de liberação. Entretanto, como as doses de antineoplásicos utilizadas no tratamento dos pacientes são baixas, pode não ser necessário aumentar a carga proposta.

ZUBRIS *et al.* (2013) estudaram o encapsulamento de paclitaxel em partículas formadas pela polimerização em miniemulsão do monômero 5-metil-2-(2,4,6-trimetoxifenil)-[1,3]-5-dioxanil-metil metacrilato. Os autores comprovaram que o sistema proposto apresenta melhores resultados em termos de eficiência e toxicidade, quando comparado à administração do paclitaxel puro.

ISHKUH *et al.* (2014) propuseram um sistema de liberação de paclitaxel empregando partículas de poli(ácido metacrílico-co-metacrilato de metila-co-trimetacrilato de trimetilol propano) e afirmam que o sistema tem potencial para a aplicação pretendida.

OLIVEIRA (2011) estudou o encapsulamento de doxorrubicina em partículas de copolímeros de poli(metacrilato de metila) com poli(acetato de vinila) produzidas em miniemulsão. O autor observou alterações na morfologia dos polímeros quando o fármaco era incorporado e também observou interação, possivelmente um efeito de reticulação, entre o quimioterápico e o polímero.

5.4. Click Tiol-Michael

No Capítulo II foi apresentada uma extensa revisão bibliográfica acerca das reações de *click chemistry*. No entanto, dentro do conjunto de reações do tipo tiol-eno, há uma variante, chamada tiol-Michael, que foi propositalmente negligenciada anteriormente e será abordada aqui com maiores detalhes.

A reação tiol-Michael é, como já mencionado, muito similar à reação tiol-eno. A principal diferença é que, nesse caso particular, é empregada uma base ou um nucleófilo que media a adição do grupamento tiol na cadeia (LI *et al.*, 2014). Além disso, autores reportaram que é mais comum observar a ocorrência de reações laterais em reações tiol-eno do que em reações tiol-Michael; por isso, essa reação vem atraindo enorme atenção dos pesquisadores (NAIR *et al.*, 2014).

Mais especificamente dentro do conjunto de reações tiol-Michael encontra-se a reação tiol-maleimida, que é a reação desse tipo mais estudada e que parece ser a mais adequada para aplicações em bioconjugação, uma vez que tipicamente ocorre em meio aquoso e a temperatura ambiente (NARAIN, 2014; THEATO & KLOK, 2013). Nas reações tiol-maleimida, como o próprio nome sugere, ocorre a reação entre moléculas contendo grupamentos tiol e moléculas de maleimida (e seus derivados) (HERMANSON, 2013). Além da possibilidade de a reação ser ativada por um nucleófilo ou uma base, a reação tiol-maleimida também pode ser conduzida com um iniciador radicalar, embora nesse caso as taxas de reação sejam mais lentas (NORTHROP *et al.*, 2015).

A seguir serão apresentados alguns trabalhos que empregaram a reação tiol-maleimida com sucesso, em especial para aplicações em bioconjugação, que constitui o principal foco desta tese.

THEATO & KLOK (2013) estudaram o uso da reação tiol-maleimida para a conjugação de BSA e OVA em polímeros de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) produzidos por polimerização RAFT. Os autores reportaram sucesso na reação de bioconjugação. Em particular, os autores usaram um derivado de maleimida para ligar anticorpos monoclonais contendo resíduos de cisteína a um sistema de liberação de fármaco, ADC-Brentuximab vedotin, aprovado pela FDA (BERNARDIM *et al.*, 2016; SENTER & SIEVERS, 2012).

ABEL & MCCORMICK (2016) estudaram a reação entre o 2-etil-mercaptopropionato e a N-metil-maleimida e reportaram 100% de conversão após 90 minutos de reação em DMSO. Ademais, os autores também reportaram reações envolvendo polímeros produzidos por técnica RAFT e indicaram que a redução do polímero pode ser feita sem a adição de agente redutor. ABEL & MCCORMICK (2016) afirmaram que a reação tiol-maleimida ocorre simplesmente na presença da maleimida, mas que esse procedimento facilita a ocorrência de reações laterais. Portanto, para obter produtos *click* mais puros, deve ser usado um agente redutor para disponibilizar grupamentos tiol antes da adição da maleimida.

ZIMMERMAN *et al.* (2010) apresentaram um protocolo para realizar a bioconjugação de proteínas contendo resíduos de cisteína a superfícies funcionalizadas com grupos amino, empregando como espaçador moléculas de maleimida-PEG-NHS.

MOREIRA (2015) estudou a utilização de um a molécula espaçadora de maleimida-PEG-NHS para realizar a bioconjugação entre a BSA e cadeias de

poli(metacrilato de metila) produzidas por polimerização RAFT. Esse estudo, em particular, foi usado como base para os experimentos discutidos ao longo do Capítulo VII.

5.5. Comentários Finais

Com base na revisão complementar apresentada acima ao longo deste Capítulo V, pode-se afirmar que polímeros produzidos por polimerização RAFT apresentam inúmeras vantagens técnicas em relação aos produzidos por polimerizações convencionais, quando se tratam de aplicações médicas e farmacêuticas. Dentre essas vantagens estão o fato de o material ser mais homogêneo e o fato de a estrutura final já ser funcionalizada, bastando uma reação de redução para que os polímeros sejam facilmente conjugados a biomoléculas.

A etapa de bioconjugação pode ser realizada por meio da reação tiol-maleimida, que surge como uma reação especial dentro do grupo tiol-eno e parece fornecer resultados positivos e mais compatíveis com a definição de *click chemistry*, ao contrário do que foi observado e discutido no Capítulo IV. Por conta disso, na segunda etapa do trabalho serão empregados polímeros produzidos por polimerização RAFT para conjugação a biomoléculas empregando a reação tiol-maleimida.

Capítulo VI

Materiais e Métodos: Parte II

6.1. Materiais

Os materiais utilizados nos experimentos da segunda parte do presente trabalho e suas respectivas origens e purezas são listados a seguir. Como no Capítulo III, as purezas são apresentadas em base mássica e os materiais foram usados como recebidos, sem purificação adicional.

6.1.1. Reagentes

- 2-ciano-2-propil-benzoditioato (CPBD) da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 97%;
- Ácido acrílico (AA) da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Ácido metacrílico (AM) foi fornecido pela Industria Química Taubaté (São Paulo, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Albumina de soro bovino (BSA) da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 95%;
- Água destilada;
- Azobisisobutironitrila (AIBN) de marca Akzo Nobel (Holanda) com pureza mínima de 99%;
- Bicarbonato de sódio da marca Proquimios (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,7%;
- Borohidreto de sódio da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;

- Cloridrato de cisteína da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 98%;
- Clorofórmio deuterado (CDCl_3) da marca Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Estados Unidos) e pureza mínima de 99,8%;
- Dimetil sulfóxido (DMSO) da marca Nuclear (Brazil) com pureza mínima da 99%;
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) *High Glucose* da marca LGC (São Paulo, Brasil);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com dosagem mínima de 90% e contendo até 10% de água;
- Fosfato de potássio dibásico da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 98%;
- Hexadecano (HXD) da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Hidroquinona da marca Tedia (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99%;
- Isotiocianato de rodamina B da marca Sigma-Aldrich (Rio de Janeiro, Brasil) foi adquirido como uma mistura de isômeros;
- Maleimida-PEG-NHS Mw 5000 da marca NanoCS (Cheshire, Reino Unido), com pureza mínima de 99%;
- Metacrilato de metila (MMA) da marca VETEC (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,5%;
- Tetrahidrofurano (THF) da marca Tedia (Brasil) com pureza mínima de 99%. Impureza: água;

6.1.2. Equipamentos e acessórios

- Placa de agitação (IKA, modelo C-MAG HS7, Alemanha) com controle de temperatura por meio de termopar (IKA, modelo ETS-D5) - Utilizada para agitação e controle de temperatura das reações;

- Balança analítica com capacidade para pesar materiais de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A, Itália) - Utilizada na pesagem de reagentes e produtos reacionais;
- Bécheres com capacidades variando entre 50-500 mL, utilizados para preparo de soluções e pesagem de reagentes;
- Sonicador (Branson, modelo 450D, com potência máxima de 400W, Brasil) – Utilizado nas reações de polimerização;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (Bruker, modelo Avance III, com frequência de 400 MHz e sonda de 5 mm, Alemanha) – Utilizado para determinar as estruturas químicas dos produtos formados.
- Cromatógrafo de Permeação em Gel (Viscotec, modelo VE2001 GPC Solvent/Sample Module, com 1 pré-coluna Shodex KF-G, 2 colunas Shodex KF-804 e uma coluna Shodex KF-805, detector refratométrico Viscotec, modelo VE3580 e detector de UV Viscotek, modelo 2500, Estados Unidos) – Utilizado para determinação das massas molares dos polímeros;
- Analisador de tamanhos de partícula por espalhamento dinâmico de luz (Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS, Reino Unido) – Utilizado para determinação da distribuição de tamanhos de partícula dos polímeros;
- Centrífuga (Thermo Scientific, modelo Megafuge 16R, Estados Unidos) – Utilizada na etapa de bioconjugação para centrifugação das amostras;
- Analisador de ângulo de contato (Dataphysics goniometer, modelo OCA15, Alemanha) – Utilizado para determinação do ângulo de contato das amostras;
- Citômetro de fluxo (Becton & Dickinson, modelo FACS Calibur, Estados Unidos) – Utilizado nos ensaios de captação celular;

6.2. Métodos

Os experimentos da segunda parte deste trabalho foram divididos também em duas frentes. A primeira etapa consistiu em produzir e caracterizar os polímeros que seriam empregados posteriormente nas reações de bioconjugação. A segunda etapa consistiu nas reações de bioconjugação propriamente ditas. Todas as etapas de produção e caracterização dos produtos são descritas a seguir.

6.2.1. Reações de polimerização RAFT em miniemulsão

As receitas das reações de polimerização realizadas neste trabalho tiveram como base o trabalho de MOREIRA (2015). Primeiramente foi preparada uma solução aquosa contendo 80 g de água destilada, 1 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,1 g de bicarbonato de sódio. Em seguida, uma solução orgânica contendo 19,11 g de MMA, 0,0784 g de AIBN, 0,6 g de hexadecano e 0,2144 g de 2-ciano-2-propil-ditiobenzoato (agente RAFT) também foi preparada. É importante ressaltar que, quando reações de copolimerização foram visadas, 15% da massa de MMA foi substituída pelo comonômero de interesse (AA ou MA). Além disso, nas reações de polimerização convencionais o agente RAFT não foi adicionado.

Após a completa solubilização de ambas as soluções, a solução aquosa foi transferida para o bécher que continha a solução orgânica e a mistura submetida a agitação magnética de 500 rpm durante 15 minutos para a formação de uma pré-emulsão. A pré-emulsão foi então submetida a uma etapa de sonicação por 10 minutos a 70W (potência que corresponde a amplitude de 70% no equipamento utilizado). Durante a sonicação, o sistema foi mantido em banho de gelo para impedir o aumento da temperatura e consequente polimerização do material. Além disso, a mistura também foi mantida sob agitação magnética de 500 rpm para facilitar tanto a homogeneização quanto a transferência de calor da emulsão.

A emulsão resultante desse processo foi então transferida para um balão de fundo redondo tampado com um septo de borracha, em que duas agulhas foram inseridas. À primeira agulha, inserida de maneira a mergulhar na emulsão, foi conectada uma linha de $N_{2(g)}$ para inertizar o meio. A segunda agulha, que não foi mergulhada na emulsão, ficou aberta para o ambiente, já que tinha como objetivo apenas manter a pressão do sistema constante. O processo de inertização foi conduzido durante 1 hora. Durante esse período, o sistema permaneceu em banho de gelo e sob agitação magnética (~500rpm).

Após esse procedimento, o balão foi transferido para um banho mantido a 80 °C e a reação foi conduzida por 5 horas sob agitação magnética (500 rpm). Durante a reação foram retiradas alíquotas para determinação da conversão por gravimetria (cerca de 2 mL de amostra) e para acompanhamento da evolução dos tamanhos de partícula (cerca de 0,2 mL de amostra). Às alíquotas destinadas à determinação da conversão foram adicionadas 5 gotas de solução aquosa de hidroquinona 1% p/V para impedir o progresso da reação.

Já nas alíquotas destinadas ao acompanhamento dos tamanhos de partícula não foi feita adição de qualquer outro componente, para não interferir nos resultados.

6.2.2. Bioconjugação

Primeiramente, para promover a redução dos grupos sulfidrilas, foram adicionados 500 mg do látex polimérico, 5 mL de água destilada e 0,189 g de borohidreto de sódio a um bécher de 50 mL. O bécher foi tampado com Parafilm e mantido em *shaker* a 25 °C e 100 rpm por duas horas. Após esse procedimento, foram adicionados à mistura 85 µL de ácido clorídrico concentrado e 0,087 g de fosfato de potássio dibásico de potássio. O pH foi ajustado para 5,5 com HCl (1M) ou NaOH (40%).

Paralelamente, foi preparada uma solução aquosa com pH 5,5, à qual foram adicionados 10 mg/mL de maleimida-PEG-NHS Mw 5000. Em seguida, 30 µL da solução foram adicionados a 50 µL da mistura resultante do processo de redução dos grupos sulfidrilas dos polímeros. O Eppendorf contendo a mistura das duas soluções foi mantido em *shaker* a 25 °C a 100 rpm por 30 minutos.

Por fim, 35 µL de uma solução aquosa contendo 10 mg/mL de BSA foram adicionados à mistura, mantida em *shaker* a 37 °C e 100 rpm por 24 horas. Após as 24 horas, todas as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos a 15 °C e lavadas 3 vezes com 100 mL de água destilada. O produto final foi mantido seco e armazenado na geladeira. O esquema desse procedimento é apresentado na Figura 72.

6.2.3. Protocolo de Marcação com Rodamina B

As nanopartículas poliméricas conjugadas à BSA foram marcadas com Rodamina B, uma molécula fluorescente, de maneira a serem detectadas posteriormente nos ensaios de captação celular, como mostrado na Figura 73. Para isso, foi preparada uma solução 10 µg/µL de Rodamina B em DMSO. Em seguida, ao polímero bioconjugado resultante do procedimento descrito na Seção 6.2.2. foram adicionados 100 µL de tampão de bicarbonato 0,1M pH 9,0 e 75 µL da solução de Rodamina B. O material foi incubado em *shaker* a 25 °C e 100 rpm durante 1h e em seguida lavado e centrifugado 3 vezes com a solução tampão de bicarbonato pH 9,0. O produto final foi mantido na geladeira suspenso em solução tampão bicarbonato 0,1M pH 9,0.

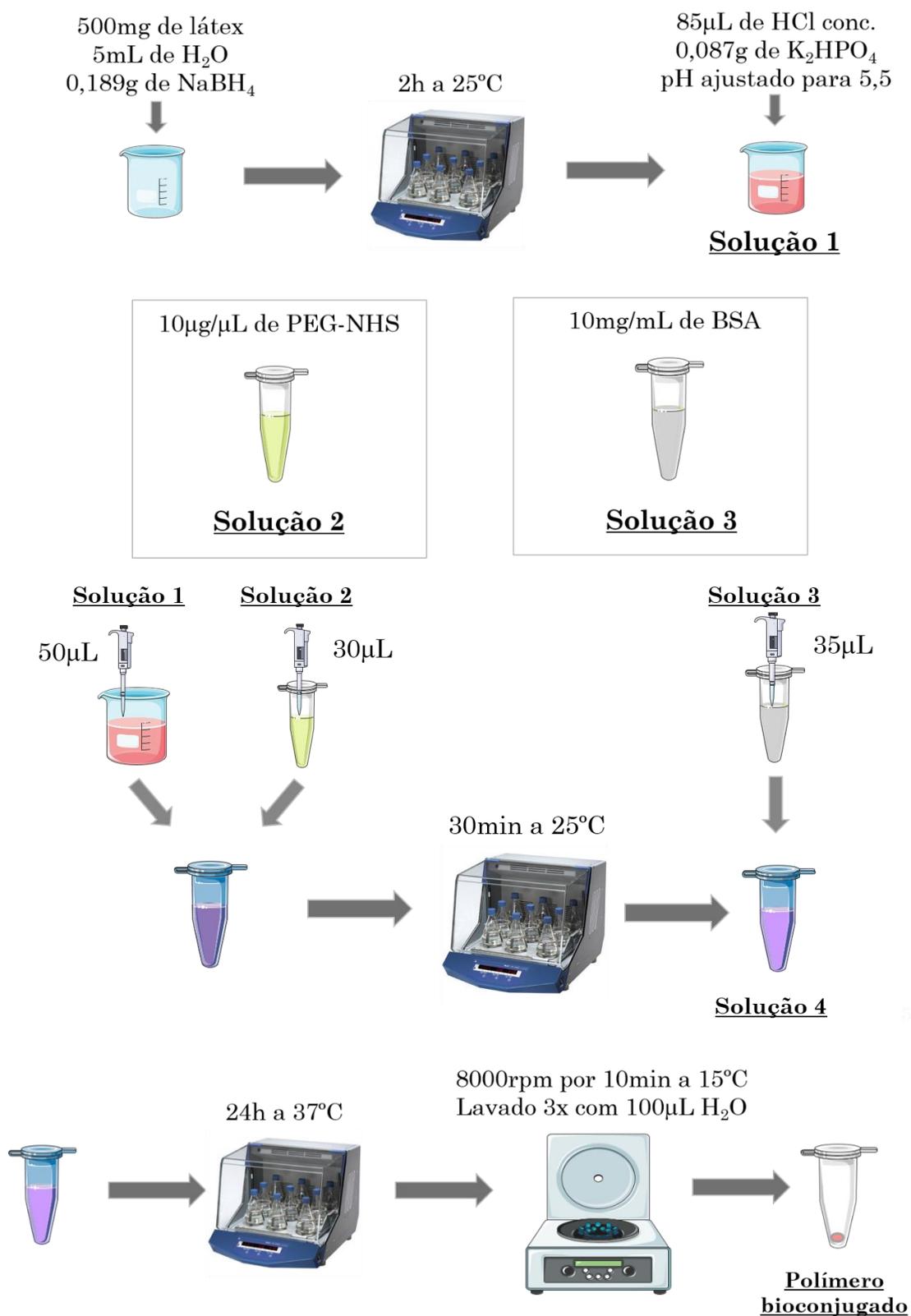


Figura 72 – Esquema das etapas de bioconjugação.

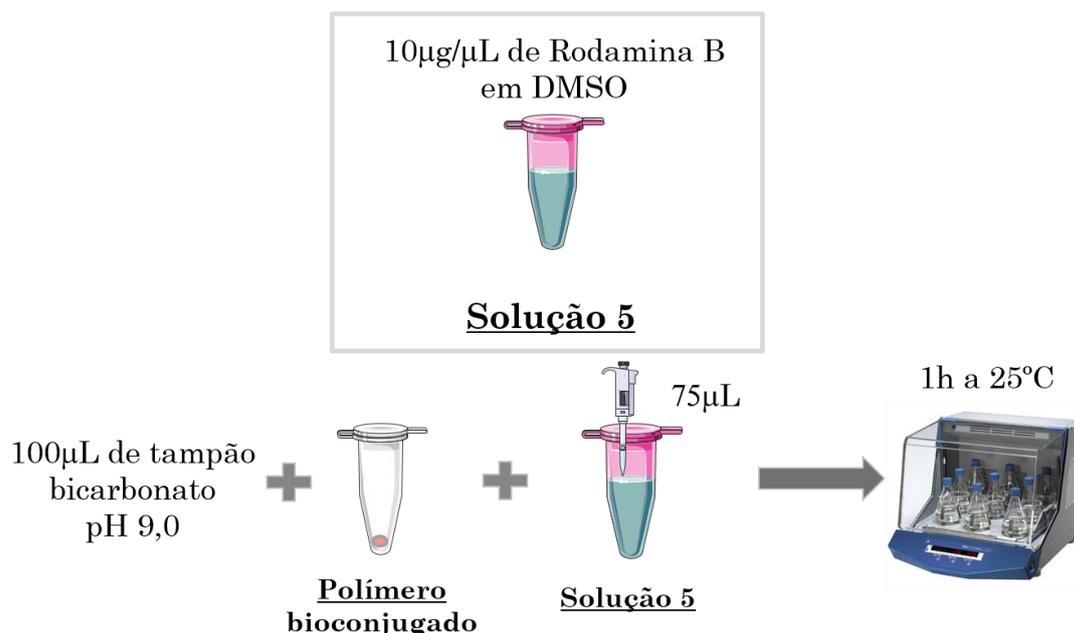


Figura 73 – Esquema da marcação com a rodamina B.

6.2.4. Ensaios de Captação Celular

Com o objetivo de observar a captação celular de nanopartículas de polímero bioconjugadas, macrófagos da linhagem celular RAW 267.4 de camundongo foram cultivados em meio DMEM *high glucose* enriquecido com 10% soro fetal bovino em tampão fosfato salino (PBS) e expostos às nanoesferas bioconjugadas e revestidas com Rodamina B. O sistema foi incubado por 3h em frasco de cultura celular a 37 °C. Após incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para retirada de células mortas. Em seguida, as células que permaneceram na superfície dos frascos foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico e transferidas para tampão 10% de soro fetal bovino em PBS em tubos de citometria, colocadas em gelo e registradas imediatamente em FACS Calibur (BD, Franklin Lakes, USA). Foram registradas 100000 células por amostra em canal de fluorescência relativa FL3. A aquisição de macrófagos não expostos foi realizada para estipulação do *gate* positivo²².

²² *gate* positivo corresponde à população de interesse que é detectada ligada ao marcador fluorescente no citômetro.

6.3. Caracterização dos Polímeros

Os polímeros foram caracterizados pelas técnicas descritas a seguir.

6.3.1. Gravimetria

A técnica de gravimetria foi descrita na Seção 3.3.1. Aqui serão apresentados, portanto, apenas os cálculos adaptados para a reação em miniemulsão. Foram feitas algumas pesagens ao longo do processo para determinar a conversão. As pesagens são relacionadas abaixo:

$$M1 = \text{massa do cadinho vazio} \quad (12)$$

$$M2 = M1 + \text{massa de solução de hidroquinona} \quad (13)$$

$$M3 = M2 + \text{massa de amostra tomada em cada alíquota} \quad (14)$$

$$M4 = M1 + \text{amostra seca} \quad (15)$$

$$\text{Massa de amostra na alíquota} = M3 - M2 \quad (16)$$

$$\text{Massa de amostra seca} = M4 - M1 \quad (17)$$

$$\text{Fração orgânica} = \frac{\text{massa total de monômero da reação}}{\text{massa total da reação}} \quad (18)$$

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{\text{Massa de amostra seca}}{\text{Massa de amostra na alíquota} * \text{fração orgânica}} * 100 \quad (19)$$

6.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As distribuições de tamanho de partícula foram determinadas empregando espalhamento dinâmico de luz. As amostras foram preparadas diluindo 1 gota do latex polimérico produzido em água deionizada. A quantidade de água adicionada foi medida de maneira a obedecer ao limite máximo de volume permitido pelo equipamento que correspondia a cerca de 2 cm de altura na cubeta de vidro de descrição 8G. Todas as análises foram conduzidas a 25 °C.

6.3.3. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A técnica de GPC já foi brevemente descrita na Seção 3.2.5. O preparo das amostras para GPC foi feito solubilizando 9 mg de amostra em 3 mL de THF. Antes da injeção, as soluções foram filtradas com filtro de seringa de 0,22 µm.

6.3.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de RMN já foi brevemente descrita na Seção 3.2.2. O preparo das amostras para as análises de RMN de hidrogênio foi feito solubilizando 15 mg de amostra em 0,8 mL de clorofórmio deuterado. Foram usados tubos de 5 mm nas análises, que foram realizadas a temperatura ambiente.

6.3.5. Quantificação de grupamentos tiol livres dos polímeros RAFT

A quantificação de grupamentos tiol livre é comumente realizada empregando o reagente de Ellman e seguindo um protocolo já bem estabelecido (ELLMAN, 1959; THERMO SCIENTIFIC, 2017). A técnica se baseia no fato de que o ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico), também conhecido como reagente de Ellman, reage com grupamentos sulfidríla, formando um produto de coloração amarela que pode ser quantificado empregando espectrometria UV. Para isso, é necessário preparar uma curva de calibração com cloridrato cisteína.

Para a construção da curva de calibração, primeiro foi preparada uma solução tampão 0,1 M de fosfato de sódio pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA. Em seguida foram preparadas as soluções, indicadas na Tabela 13. A solução de reagente de Ellman foi preparada solubilizando 4 mg do ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) em 1 mL do tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo EDTA.

Por fim, a 250 µL de cada amostra indicada na Tabela 13 foram adicionados 2,5 mL da solução tampão e 50 mL da solução de Ellman. As misturas foram agitadas e incubadas por 15 minutos e em seguida foi medida a absorbância das amostras no comprimento de onda de 412 nm. A curva de calibração obtida é apresentada na Figura 74.

Tabela 13 – Amostras preparadas para construir a curva de calibração com cloridrato de cisteína.

Amostra	Volume de tampão (mL)	Cisteína cloridrato	Concentração (mM)
A	100	26,34 mg	1,5
B	5	25 mL da amostra A	1,25
C	10	20 mL da amostra A	1,0
D	15	15 mL da amostra A	0,75
E	20	10 mL da amostra A	0,5
F	25	5 mL da amostra A	0,25
G	30	-	0

Para promover a redução das ligações dissulfeto dos polímeros produzidos por polimerização RAFT e assim permitir a bioconjugação e a quantificação dos grupamentos tiol livres, foram adicionados 500 mg do látex polimérico, 5 mL de água destilada e 0,189 g de borohidreto de sódio a um bécher de 50 mL. O bécher foi tampado com Parafilm e mantido em *shaker* a 25 °C e 100 rpm por duas horas. Após esse procedimento, foram adicionados à mistura 85 µL de ácido clorídrico concentrado e 0,087 g de fosfato de potássio dibásico de potássio. O pH foi ajustado para 8,0 com HCl (1M) ou NaOH (40%).

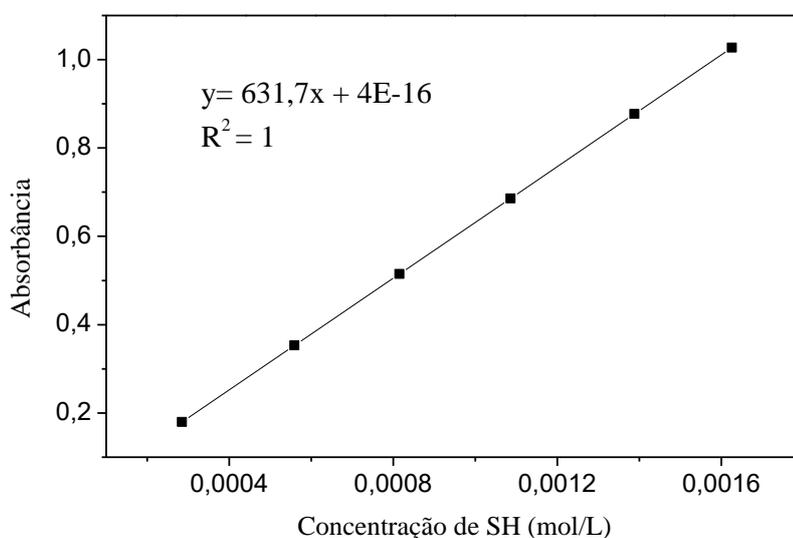


Figura 74 – Curva de calibração construída com o reagente de Ellman.

Para determinar a concentração de SH livre em cada amostra desconhecida, a 250 mL da amostra reduzida foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 8,0 contendo EDTA e 50 mL da solução de Ellman. Essa mistura foi agitada e incubada por 15 minutos e em seguida foi medida a absorbância no comprimento de onda de 412 nm. Nos casos em que a medida não se adequou à curva de calibração, foram feitas diluições para minimizar eventuais erros de análise.

6.3.6. Ângulo de Contato

Um goniômetro é um equipamento utilizado para medir o ângulo formado entre superfícies refletoras de um cristal ou prisma (FORT & PATTERSON, 1963). Mais especificamente, ele é equipado com uma câmera que filma o momento em que uma gota de líquido é depositada em uma superfície e depois calcula o ângulo formado entre elas. O ângulo de contato está diretamente relacionado à molhabilidade da superfície e, portanto, à sua afinidade com o líquido testado. Dessa maneira, quando o líquido em questão é a água, o resultado obtido com o goniômetro permite determinar o grau de hidrofiliabilidade da superfície (FORT & PATTERSON, 1963).

Para a realização das medidas de ângulo de contato, uma pequena parte da emulsão polimérica (cerca de 3 a 5 mL) foi seca em estufa de recirculação à temperatura ambiente e em seguida macerada com auxílio de gral e pistilo para a obtenção de finas partículas. As partículas obtidas foram então colocadas em uma lâmina de microscópio e prensadas com auxílio de uma outra lâmina limpa, até que fosse possível obter uma superfície completamente lisa e livre de imperfeições. Uma gota de água destilada foi então depositada na superfície preparada, como anteriormente descrito, para a realização das medidas de ângulo de contato.

Capítulo VII

Resultados e Discussão: Parte II

Depois de tentar realizar a bioconjugação da cisteína a monômeros bifuncionais e a polímeros contendo duplas ligações pendentes, tornou-se necessário modificar a rota empregada para a bioconjugação, como discutido anteriormente. Dessa maneira, ao longo do Capítulo VII serão apresentados os resultados e discussões referentes também à utilização de reações *click chemistry* do tipo tiol-eno, mas mais especificamente de reações do tipo tiol-maleimida. Para isso, foi feita uma inversão com relação ao que foi apresentado no Capítulo IV: os grupamentos tiol livres estarão agora presentes na estrutura do polímero, enquanto as duplas ligações serão fornecidas por moléculas de maleimida. Mais uma vez o trabalho foi dividido em duas partes, sendo a primeira relacionada à produção dos materiais poliméricos e a segunda relacionada à realização da bioconjugação via reações *click*. Vale ressaltar que, para que fosse possível ligar moléculas de albumina de soro bovino à estrutura do polímero, foi empregado um espaçador de maleimida-PEG-NHS, como pode ser observado no esquema simplificado da Figura 75.

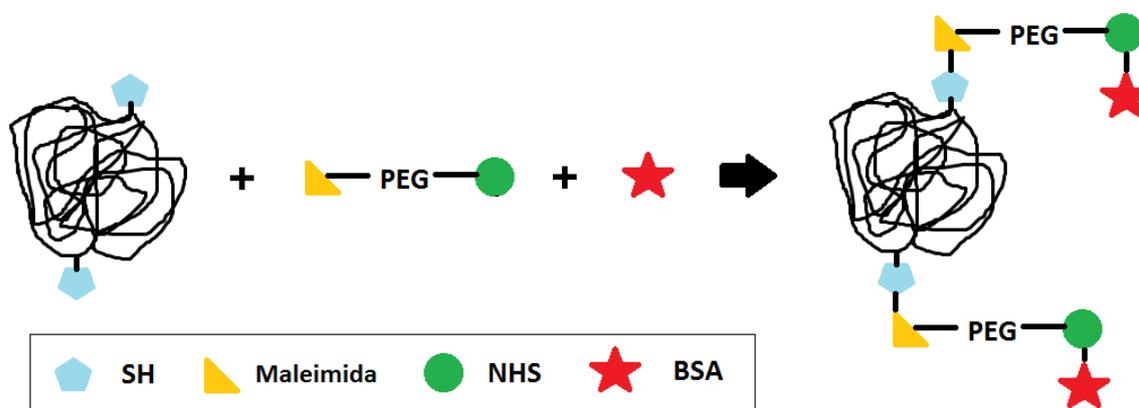


Figura 75 – Esquema da reação do Capítulo VII.

7.1. Reações de Polimerização

De maneira a obter os polímeros que seriam usados ao longo dos experimentos deste capítulo, foram realizadas algumas reações de polimerização. Todas elas foram conduzidas com e sem o uso de agente RAFT para fins de comparação. O metacrilato de metila (MMA) foi escolhido como monômero principal por ser biocompatível e por já ser largamente empregado nas áreas médica e farmacêutica. As reações são apresentadas na Tabela 14, em que se pode observar que, apesar de o MMA ter sido usado como monômero principal, em alguns casos 15% foi substituído por um comonômero. Essa substituição foi feita com o intuito de aumentar a hidrofiliabilidade dos polímeros, o que sabidamente prolonga o tempo de circulação na corrente sanguínea e aumenta a aceitação das células. No entanto, quando se trata de polimerização RAFT, não é trivial dizer que a copolimerização em miniemulsão é possível, uma vez que o agente RAFT apresenta diferentes reatividades para cada monômero. Além disso, a inserção de comonômero pode afetar não só a copolimerização, mas também o controle do crescimento das cadeias proporcionado por esse tipo de reação.

Tabela 14 – Lista de reações de polimerização realizadas.

Reação	Comonômero	RAFT
R1	-	Não
R2	-	Sim
R3	Ácido Acrílico	Não
R4	Ácido Acrílico	Sim
R5	Ácido Metacrílico	Não
R6	Ácido Metacrílico	Sim

É importante reportar, no entanto, que não foram observados problemas com a estabilidade das miniemulsões durante as reações de copolimerização, o que quer dizer que em todos os casos foi possível obter nanopartículas e sistemas estáveis por grande período de repouso. Essa informação é especialmente importante, já que não parece haver nenhum dado na literatura com as combinações de monômeros e agente RAFT propostos

nesse trabalho. A Figura 76 mostra as distribuições de tamanho de partícula dos produtos finais de todos os experimentos apresentados na Tabela 14.

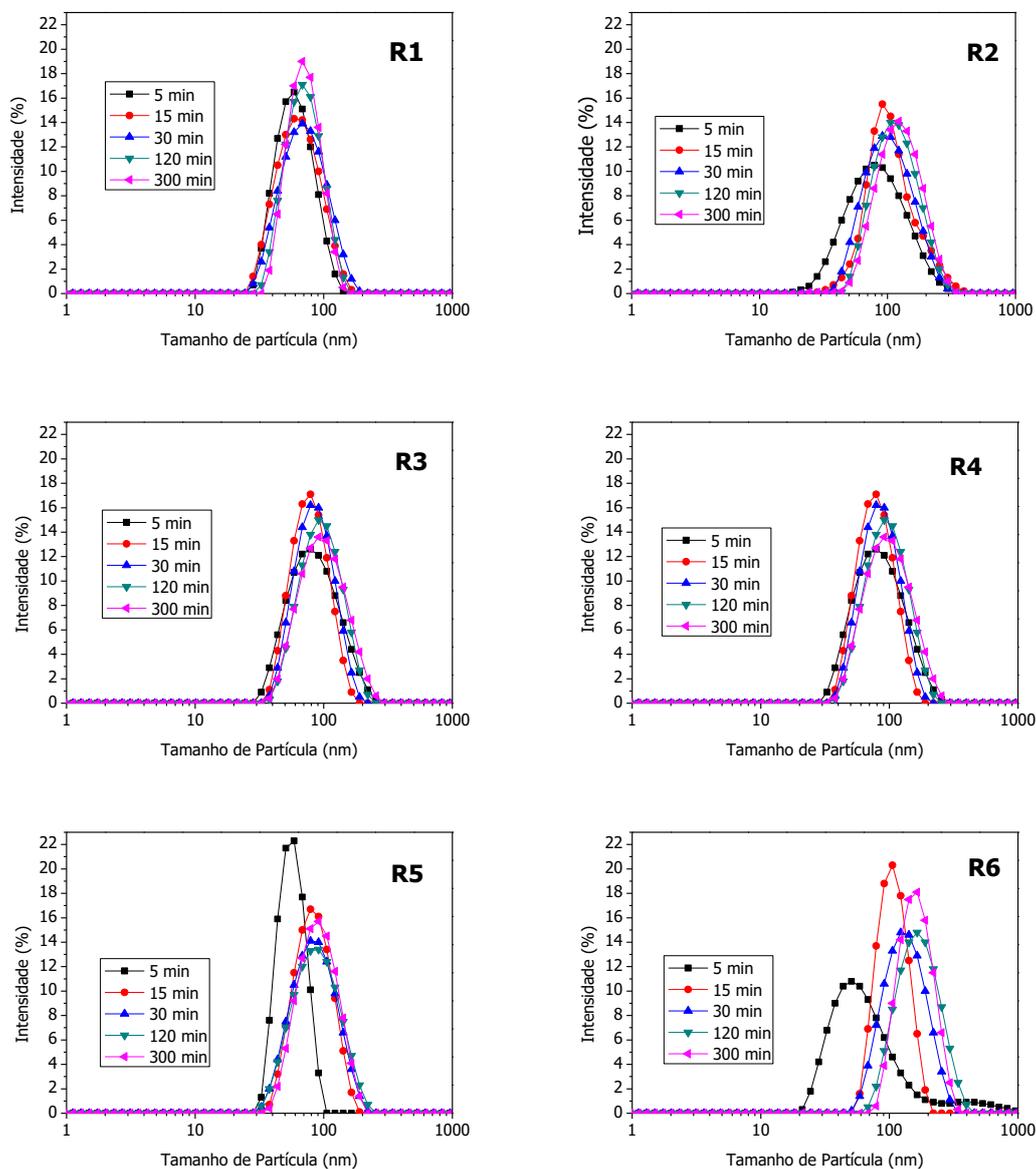


Figura 76 – Distribuição de tamanhos de partícula das reações R1 a R6.

Reações de polimerização em miniemulsão têm como característica o fato de o tamanho das partículas permanecer praticamente constante do início ao fim da reação (ODIAN, 2004). Dessa maneira, é possível observar na Figura 76 que as distribuições de tamanhos de partícula permaneceram constantes nas reações R1 a R4, indicando que a

receita da reação estava bem ajustada para os sistemas propostos. O ácido metacrílico, no entanto, parece causar uma leve desestabilização da miniemulsão que pode ser observado pelo aumento dos tamanhos de partícula com o tempo para as reações R5 e R6. Isso pode estar relacionado à alta solubilidade do ácido metacrílico em água ou simplesmente à desestabilização da miniemulsão causada pela adição do comonômero. Entretanto, como mesmo com essa leve desestabilização ainda foi possível obter partículas com tamanhos médios abaixo de 200 nm, tamanho acima do qual a aplicação desejada seria inviável, não foi feita qualquer intervenção na receita da reação.

Um dado interessante sobre as reações em que o agente RAFT foi empregado é que foi notada alteração na coloração da emulsão, que tradicionalmente é branca. Isso ocorre porque o RAFT apresenta coloração vermelha e, depois de homogeneizada, a miniemulsão torna-se rosa, como mostra a Figura 77.

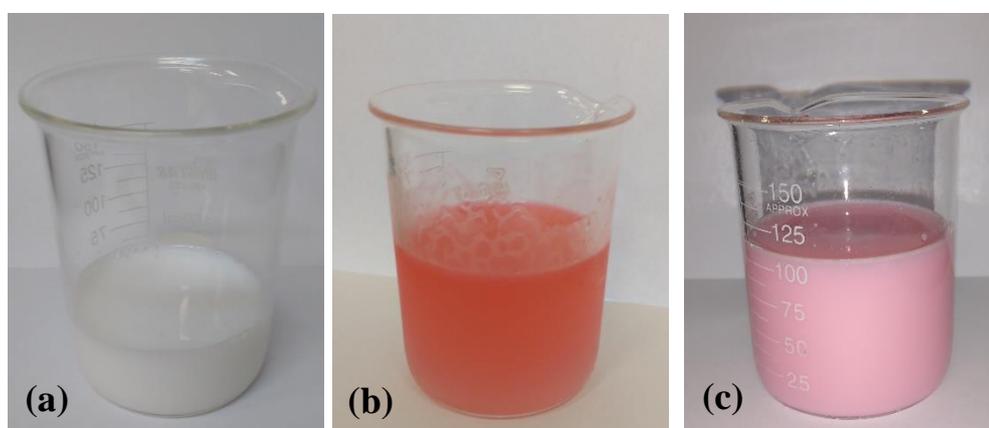


Figura 77 – (a) Emulsão de PMMA sem RAFT; (b) solução de MMA + agente RAFT antes da sonicação; (c) emulsão de MMA + agente RAFT após sonicação.

Complementando a caracterização dos polímeros, na Figura 78 é apresentada a evolução da conversão das reações R1 a R6 com o tempo. O gráfico de conversão indica, como esperado, que o consumo de monômero(s) é mais lento quando o agente RAFT é adicionado no meio. Esse efeito é devido ao mecanismo da reação, que inclui etapas de ativação e desativação dos radicais nas cadeias em crescimento. A Figura 78 também indica que todas as reações parecem ter atingido a conversão completa. Mais especificamente, as reações de polimerização convencionais atingiram a conversão

completa antes de 30 minutos de reação, enquanto as polimerizações RAFT atingiram o equilíbrio por volta de 90 minutos de reação.

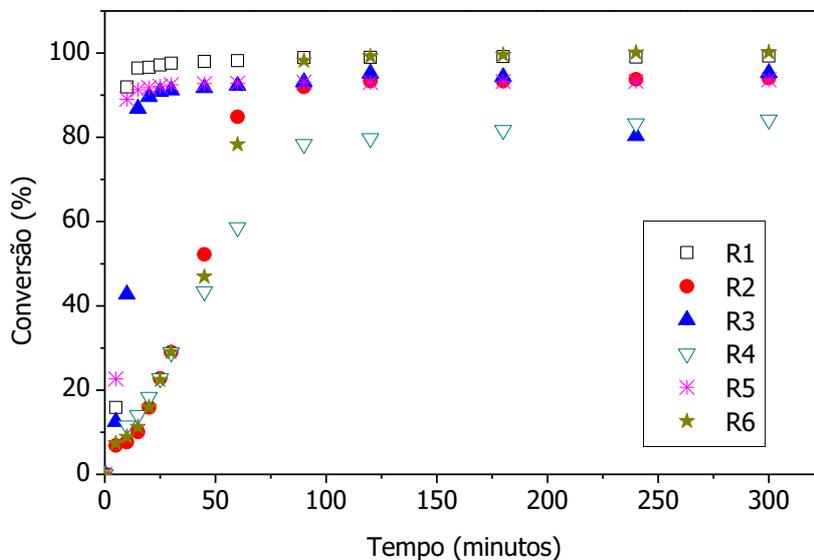


Figura 78 – Conversão das reações R1 a R6.

Como pode ser observado na Figura 78 e na Tabela 15, todas as reações atingiram conversões próximas a 100% com exceção da R4, em que foi realizada polimerização RAFT com adição de ácido acrílico como comonômero. Isso pode indicar que não ocorreu copolimerização na reação R4, mas para confirmar se a baixa conversão poderia ter sido causada por outros efeitos, mais informações são necessárias. De acordo com MISHRA & YAGCI (2008), a constante de decomposição (K_d) do AIBN em metacrilato de metila a 50 °C e 70 °C são respectivamente $97 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ e $3100 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$. Extrapolando para 80 °C, que foi a temperatura usada nas reações R1 a R6 e usando o tempo de meia vida ($t_{1/2} = 0,693/K_d$) (ODIAN, 2004), é possível concluir que o tempo de meia vida para o AIBN nas condições de reação é igual a 1,27 horas. Dessa maneira, a baixa conversão observada para a R4 não está relacionada à prematura extinção de radicais livres no meio reacional.

A Tabela 15 também apresenta os resultados de GPC dos produtos de R1 a R6 após 5 horas de reação. Como esperado, as massas molares numéricas das reações de polimerização convencionais são até duas ordens de grandeza maiores do que as massas

molares dos produtos RAFT, o que está relacionado aos diferentes mecanismos de reação. Os cromatogramas das 6 reações são apresentados no Apêndice III. Além disso, para fins de comparação, foram calculadas as massas molares numéricas teóricas dos produtos das reações RAFT com auxílio da Equação 20 e da Equação 21 (SVENSON & PRUD'HOMME, 2012). Esses resultados também foram inseridos na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados de conversão, massa molar numérica teórica e calculada, índice de polidispersão e tamanho médio de partícula dos produtos após 300 min de reação.

Reação	Conversão (%)	Mn teórico (g/gmol)	Mn (g/gmol)	IP	Tamanho médio de partícula (nm)
R1	99	-	1,13*10 ⁶	1,93	73
R2	94	1,98*10 ⁴	1,89*10 ⁴	1,13	131
R3	95	-	6,11*10 ⁵	3,33	104
R4	84	1,67*10 ⁴	1,60*10 ⁴	1,57	105
R5	94	-	2,31*10 ⁶	1,62	94
R6	100	2,00*10 ⁴	1,34*10 ⁴	1,50	166

$$Mn = \frac{[M]_0}{[RAFT]_0} * \alpha * MM_{mon\acute{o}mero} + MM_{RAFT} \quad (20)$$

em que:

[M]₀ é a concentração molar inicial dos monômeros; [RAFT]₀ e a concentração molar inicial do agente RAFT; α é a conversão dos monômeros; MM_{monômero} é a massa molar do monômero; MM_{RAFT} é a massa molar do agente RAFT.

É importante ressaltar que nas reações 4 e 6, em que dois diferentes monômeros foram utilizados, a $MM_{\text{monômero}}$ foi calculada segundo a Equação 21.

$$\frac{1}{MM} = \frac{w}{MM_{\text{MMA}}} + \frac{(1-w)}{MM_{\text{Com}}} \quad (21)$$

em que:

MM é a massa molar média; w é a fração mássica; MM_{MMA} é a massa molar do MMA; e MM_{Com} é a massa molar do comonômero.

Analisando os dados citados, pode-se observar que com exceção da reação R6, as massas molares reais são muito similares às massas molares teóricas. A diferença obtida para a reação R6, no entanto, não significa que a reação RAFT não foi bem-sucedida. Na realidade, esse efeito pode ser indicação de que o ácido metacrílico migrou para a fase aquosa e também homopolimerizou. Isso faria com que a massa molar obtida fosse ligeiramente menor que a massa molar teórica, porque o AIBN não é solúvel em água e a polimerização na fase contínua tenderia consumir parte do monômero.

Quando o cromatograma da reação R6 é observado na Figura 79, pode-se observar um ombro localizado na região de massas molares mais baixas. Além disso, se o ombro é desconsiderado e os cálculos são refeitos, a nova massa molar numérica obtida é igual a $1.8 \cdot 10^4$ g/gmol, muito próximo ao M_n teórico. Além disso, quando o ombro é desconsiderado, o índice de polidispersão cai de 1,5 para 1,14, indicando que a reação RAFT controla o crescimento das cadeias na fase dispersa. Esse é, portanto, mais um indício de que houve migração de parte do ácido metacrílico para a água e que ocorreu alguma homopolimerização na fase contínua.

Outro resultado interessante da Tabela 15 é o índice de polidispersão. Em todos os casos em que o agente RAFT foi empregado houve diminuição do IP em relação à reação de polimerização convencional correspondente. Isso mostra que a adição dos comonômero não exerceu impacto negativo no curso das reações RAFT, ou o IP continuaria similar ao das reações convencionais. Além disso, a diminuição do índice de polidispersão indica que as reações RAFT foram bem-sucedidas, no sentido de que foram

capazes de controlar o crescimento das cadeias e consequentemente de estreitar a distribuição de massas molares.

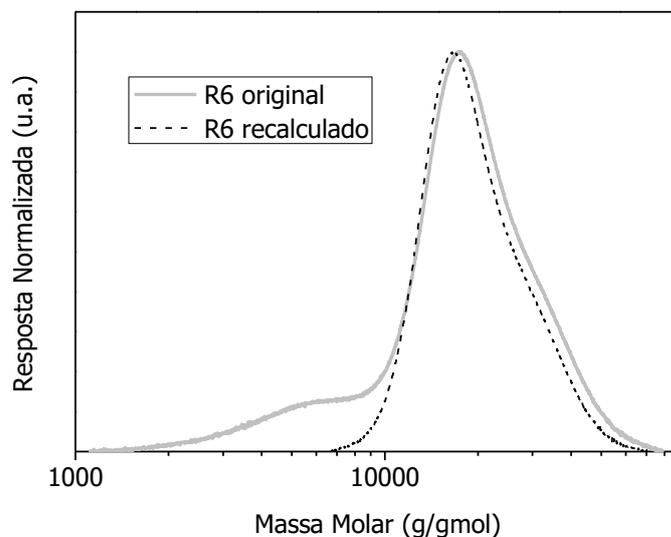


Figura 79 – Cromatogramas da reação R6.

Ainda sobre a Tabela 15, pode-se notar que quando a reação R1 é comparada à reação R2 e a reação R5 é comparada à reação R6, há um aumento significativo do tamanho médio de partícula. Isso provavelmente acontece porque as reações RAFT são mais lentas que as polimerizações convencionais, como já discutido. Assim, como as miniemulsões são termodinamicamente instáveis (CHE MAN *et al.*, 2013), parece razoável imaginar que à medida que o tempo de reação aumenta, o tamanho de partícula aumenta também. Entretanto, quando a mesma comparação é feita entre as reações R3 e R4, essa diferença não é observada, o que pode ser sinal de que o ácido acrílico migrou em parte para a fase aquosa e de que não houve copolimerização. Para confirmar essa hipótese, foram realizadas análises de ^1H RMN e os resultados para as reações de polimerização convencionais são apresentados na Figura 80. Além disso, na Figura 81 é feita a correspondência entre os resultados de ^1H RMN e as estruturas químicas dos (co)polímeros.

Observando os espectros dos produtos obtidos nas reações R1 e R3 apresentados na Figura 80 e a correspondência com a estrutura química na Figura 81, é possível notar que todos os picos característicos do PMMA aparecem nos espectros (MAZUREK *et al.*, 2015; WHITE & FILSKO, 1982). Na reação R3, no entanto, foi observado o surgimento

de um pico em 2,17 ppm relacionado ao próton do CH do poli(ácido acrílico) (STRANDMAN *et al.*, 2006). Combinando essa informação ao fato de que há diferenças nas intensidades dos outros picos em comparação ao PMMA puro, pode-se afirmar que de fato ocorreu a copolimerização.

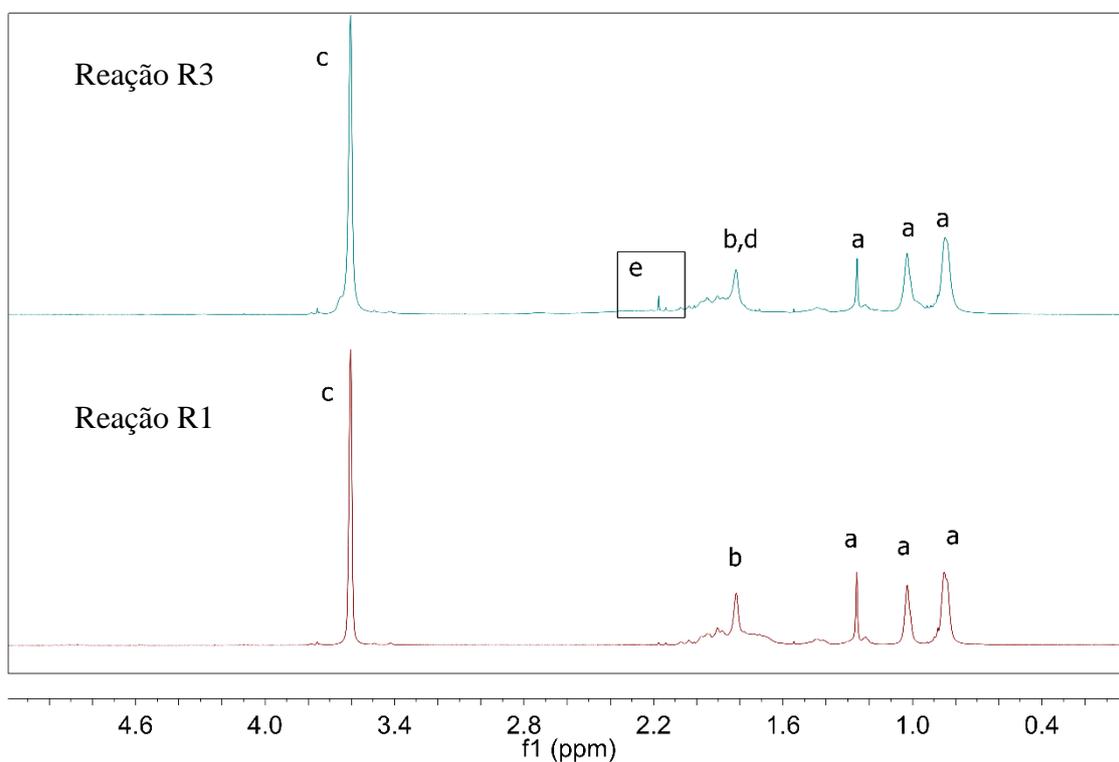


Figura 80 – ^1H RMN dos produtos das reações R1 e R3.

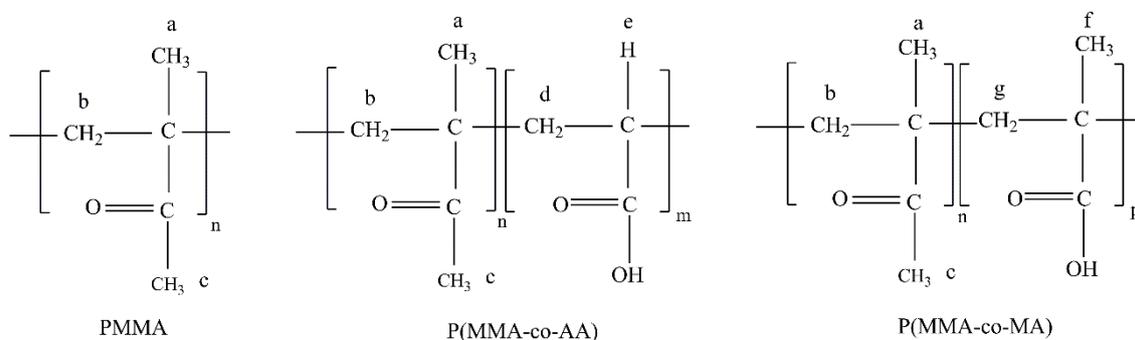


Figura 81 – Estruturas químicas dos (co)polímeros e suas respectivas correspondências com as análises de ^1H RMN.

O produto da reação R5 não solubilizou em CDCl_3 e, portanto, a análise de ^1H RMN não foi possível. Entretanto, essa informação já evidencia que houve modificação na estrutura química causada pela inserção de ácido metacrílico nas cadeias.

Na Figura 82 são apresentados os espectros de ^1H RNM das reações RAFT. Como já discutido para a reação R1, o produto da reação R2 também apresentou todos os picos característicos do PMMA (MAZUREK *et al.*, 2015; WHITE & FILSKO, 1982). Quando o produto da R4 é analisado, entretanto, pode-se observar que, além das diferenças nas intensidades dos picos em relação ao produto da reação R2, o pico observado no produto da reação R3 não parece estar presente. Esse resultado corrobora a hipótese de que pode não ter havido copolimerização expressiva com ácido acrílico quando o agente RAFT foi adicionado.

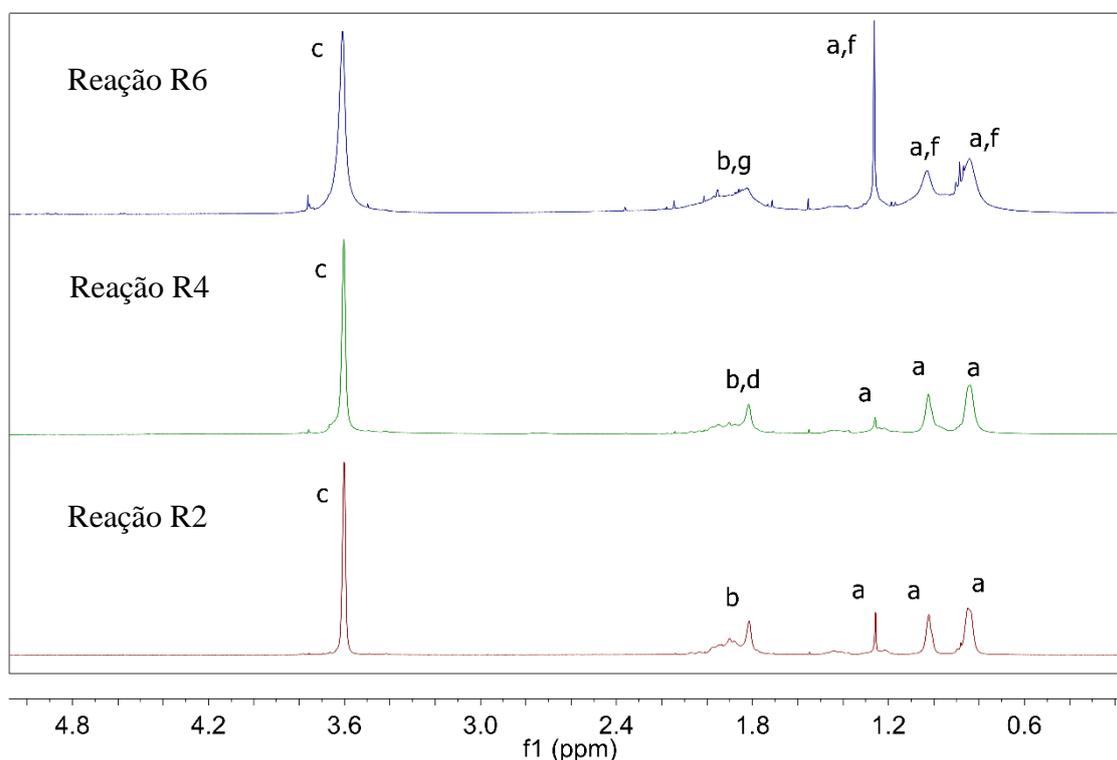


Figura 82 – Análises de ^1H RMN dos produtos das reações R2, R4 e R6.

Apesar do que aconteceu com o produto da reação R5, o produto da reação R6 solubilizou ao menos parcialmente em clorofórmio. O espectro de ^1H RMN do produto da reação R6 indica que não houve o aparecimento de picos diferentes dos picos característicos do PMMA puro, o que pode ser resultante da similaridade entre as

estruturas químicas do metacrilato de metila e do ácido metacrílico. Não obstante, há diferenças expressivas não somente nas intensidades dos picos, mas também na largura dos picos, quando comparados aos picos do espectro do homopolímero (R2). Isso indica a provável ocorrência de modificações na estrutura química do polímero.

Nesse ponto é importante ressaltar que os produtos das reações R5 e R6, em que o ácido metacrílico foi adicionado, apresentaram solubilidades diferentes em CDCl_3 . Isso não era esperado, considerando que a única diferença entre as reações foi a utilização do agente RAFT. No entanto, o fato de que o produto da reação R5 apresentou-se completamente insolúvel é provavelmente fruto da copolimerização; caso contrário, ao menos parte do produto (relativo ao PMMA puro) deveria ter solubilizado. Como a conversão da reação R6 atingiu 100%, fica claro que o agente RAFT exerceu alguma influência na reação de polimerização. É possível que parte do ácido metacrílico tenha migrado para a fase aquosa e homopolimerizado quando o agente RAFT foi adicionado. Como o AM é muito solúvel em água (89 g/L) e a reação R6 é mais lenta que a reação R5, haveria tempo suficiente para essa migração acontecer durante a polimerização RAFT. Assim, na reação R5 a reação principal parece ser a copolimerização, enquanto na reação R6 parecem ocorrer preferencialmente duas homopolimerizações independentes (sendo uma na fase dispersa e outra na fase contínua). Isso, entretanto, não quer dizer que não tenha havido copolimerização na reação R6. Na verdade, como parte do produto da reação R6 também permaneceu insolúvel em clorofórmio, parece razoável inferir que a fração insolúvel é resultado da copolimerização entre o MMA e o AM.

É importante enfatizar que as razões de reatividade entre o MMA⁽¹⁾ e o AA⁽²⁾ são iguais a $r_1=1,5$ e $r_2=0,25$. Além disso, as razões de reatividade entre o AM⁽¹⁾ e o MMA⁽²⁾ são $r_1=1,355$ e $r_2=0,767$ (HONG & MCHUGH, 1988). Isso quer dizer que o ácido acrílico prefere reagir com o MMA ao invés de reagir com outra molécula de AA. Enquanto isso, o ácido metacrílico prefere homopolimerizar, ao invés de copolimerizar com o metacrilato de metila. Além disso, o agente RAFT escolhido reage de maneira mais eficiente com metacrilatos do que com acrilatos (SIGMA-ALDRICH, 2017). Isso pode ser outra causa das diferenças de reatividade observadas entre os comonômeros.

É importante ressaltar que, apesar de as copolimerizações RAFT não terem acontecido como desejado, o objetivo principal deste trabalho era produzir polímeros mais hidrofílicos, com índices de polidispersão menores e com grupamentos SH em sua estrutura, para que pudessem ser usados em reações de bioconjugação posteriormente.

Dessa maneira, foi dada continuidade à caracterização dos produtos formados para determinar se todos os objetivos almejados foram alcançados.

A Figura 83 mostra que o agente RAFT escolhido foi capaz de controlar de maneira eficiente todas as reações de (co)polimerização, uma vez que a massa molar numérica cresceu linearmente com a conversão, como é característico de polimerizações RAFT bem-sucedidas.

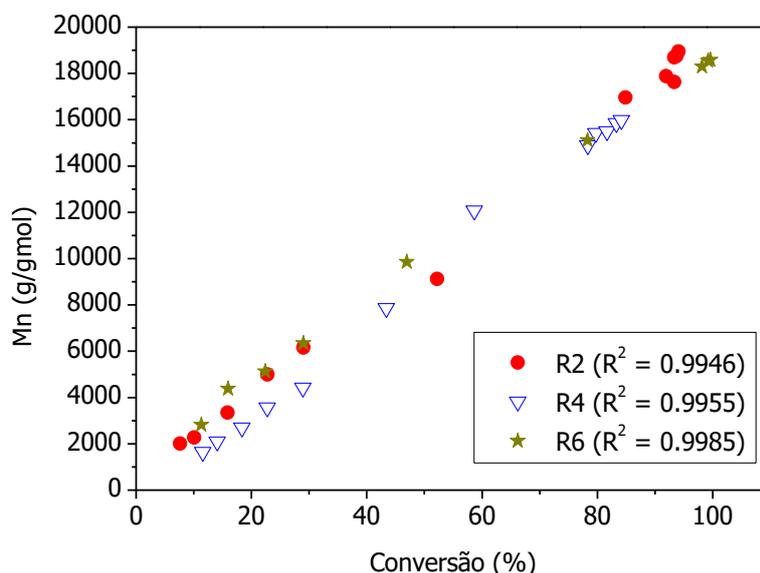


Figura 83 – Mn x conversão para as reações RAFT.

Para as reações de polimerização convencionais, a dependência linear entre o Mn e a conversão não foi observada, como pode ser visto na Figura 84. Quando o agente RAFT não foi adicionado, as cadeias cresceram extremamente rápido e a massa molar numérica nos primeiros instantes de reação foi muito similar à massa molar final. Esses resultados indicam mais uma vez que o 2-ciano-2-propil-ditiobenzoato foi capaz de controlar adequadamente as reações RAFT.

Como discutido anteriormente, um dos principais objetivos deste trabalho era tornar os polímeros mais hidrofílicos para posteriormente bioconjugá-los à BSA e avaliar o efeito dessas modificações em testes de captação celular. Por isso, foram realizadas medidas de ângulo de contato dos polímeros com água destilada para determinar suas respectivas hidrofílicidades. Esses resultados são apresentados na Tabela 16.

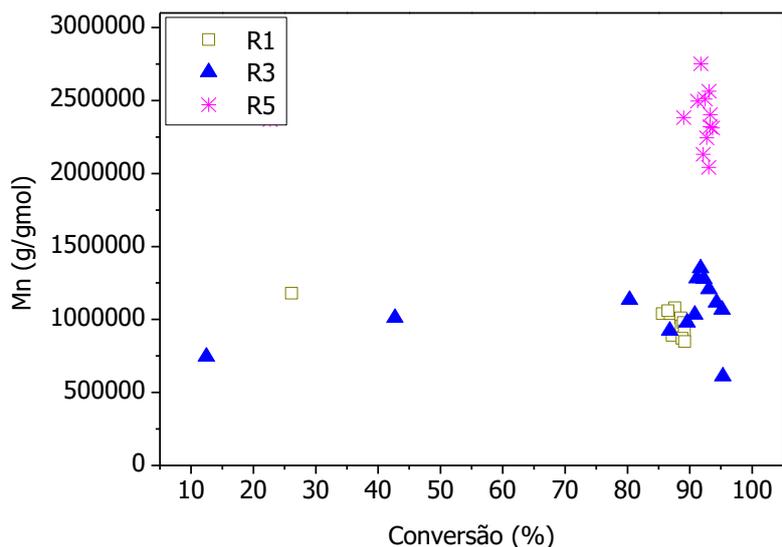


Figura 84 - Mn x conversão das reações convencionais.

Tabela 16 - Medidas de ângulo de contato dos polímeros.

Reação	Ângulo de Contato
R1	77°
R2	75°
R3	39°
R4	53°
R5	39°
R6	35°

Os resultados apresentados na Tabela 16 indicam claramente que a adição dos comonômeros foi capaz de aumentar a afinidade dos polímeros com a água. Isso pode ser observado pela expressiva diminuição nos valores de ângulo de contato quando os copolímeros são comparados aos produtos das reações R1 e R2, em que apenas o MMA foi empregado. Além disso, a adição do agente RAFT não parece ter exercido qualquer efeito significativo na hidrofiliabilidade dos materiais. Isso parece bastante razoável, uma vez que apenas uma molécula do 2-ciano-2-propil-ditiobenzoato permanece em cada cadeia polimérica formada. Assim, a presença do agente RAFT não deveria realmente modificar os valores de ângulo de contato. Também é importante notar que, quando se

observam os resultados das reações R3 e R4, nota-se que o valor de ângulo de contato para o produto da reação R4 está entre os valores obtidos para os homopolímeros e para a reação de polimerização convencional contendo ácido acrílico (R3). Essa informação, combinada às discussões anteriores, indica que parece ter havido copolimerização apenas parcial com ácido acrílico, quando o agente RAFT foi adicionado.

7.2. Bioconjugação

Uma vez que os polímeros foram produzidos e a caracterização concluída, foram preparadas amostras para realização dos ensaios de captação celular. As amostras, que foram divididas em dois grupos, são apresentadas na Tabela 17. O primeiro grupo, composto pelas amostras A, B e C, foi submetido à reação com a molécula espaçadora maleimida-PEG-NHS. Isso significa que a biomolécula supostamente foi quimicamente ligada às partículas poliméricas, como discutido anteriormente. O segundo grupo, composto pelas amostras D, E e F, foi preparado apenas misturando o látex à solução de BSA. Dessa maneira, a BSA nesse caso encontra-se simplesmente adsorvida na superfície das nanopartículas (PEIXOTO, 2013). É importante ressaltar que a única diferença entre os dois procedimentos é supressão da etapa de adição da molécula espaçadora. Todo o restante do procedimento apresentado na seção experimental foi conduzido exatamente da mesma forma para todas as amostras. A divisão em dois grupos teve como objetivo observar se haveria diferenças nos ensaios de captação celular.

Tabela 17 – Descrição das amostras submetidas aos ensaios de captação celular.

Amostra	Descrição
A	R2 + maleimida-PEG-NHS + BSA
B	R4 + maleimida-PEG-NHS + BSA
C	R6 + maleimida-PEG-NHS + BSA
D	R2 + BSA
E	R4 + BSA
F	R6 + BSA

Para determinar a concentração de BSA que foi adsorvida e/ou quimicamente ligada a cada sistema, foram realizados ensaios de quantificação pelo método de Bradford com o sobrenadante resultante de cada amostra após múltiplas etapas de lavagem e centrifugação antes da marcação com a rodamina B. A concentração obtida para cada amostra foi então subtraída da quantidade total de BSA adicionada, resultando em dados de eficiência de bioconjugação, que são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados de eficiência de bioconjugação para as reações conduzidas com o reagente maleimida-PEG-NHS.

Amostra	Eficiência de bioconjugação
A	93%
B	85%
C	85%
PMMA*	77%

* CAMPOS (2016) apresentou o resultado de eficiência de bioconjugação PMMA com a BSA observando apenas o fenômeno de adsorção, o que corresponde à amostra D descrita neste trabalho.

Os resultados apresentados na Tabela 18 mostram que quando a molécula espaçadora de maleimida-PEG-NHS foi utilizada, as eficiências de encapsulamento foram altíssimas, o que indica que em todos os casos, ao menos 85% da BSA está ligada ou adsorvida na partícula polimérica. O dado de eficiência de bioconjugação para os sistemas em que apenas o fenômeno de adsorção foi avaliado foi obtido do trabalho de CAMPOS (2016) para o polimetacrilato de metila homopolímero. Como a adição de comonomero não parece ter influenciado em demasia os resultados das amostras A, B e C, parece correto admitir que os resultados para as amostras D, E e F também seriam semelhantes aos obtidos por CAMPOS (2016). Com isso, a utilização da molécula espaçadora não parece ter aumentado significativamente a eficiência de bioconjugação dos polímeros com a BSA, uma vez que os resultados apresentados na Tabela 18 são bastante similares. O fato de as concentrações de BSA serem semelhantes em todos os casos é interessante para os ensaios de captação celular, uma vez que a variação na concentração de BSA pode afetar diretamente a captação das partículas pelos macrófagos.

Com isso, os resultados dos ensaios de captação celular realizados tiveram o efeito da concentração de BSA muito reduzido, o que permitiu a observação do efeito da variação de outras variáveis, como a composição química e a hidrofiliicidade dos polímeros.

A Figura 85 ilustra o aspecto das amostras antes da lavagem, porém pós marcação com a rodamina B para a realização dos ensaios de captação celular.



Figura 85 – Fotografia da emulsão contendo a amostra A marcada com a rodamina B.

Os resultados das análises de captação celular são apresentados na Figura 86. Para analisar os resultados da Figura 86, é importante agrupar as amostras de diferentes maneiras. Confrontando primeiramente as amostras em que a molécula espaçadora foi usada, com as amostras em que apenas o fenômeno de adsorção era esperado, como no par de amostras A e D, é possível observar que há aumento na captação das partículas pelos macrófagos quando a molécula de maleimida-PEG-NHS é usada. Esse aumento foi notado também para os demais pares de amostras de reação (B e F; C e F), o que indica que a biomolécula possivelmente foi ligada aos polímeros com ajuda do espaçador maleimida-PEG-NHS, uma vez que ocasionou aumento da captação celular quando comparado aos sistemas em que apenas o fenômeno de adsorção foi avaliado. Isso pode ter sido ocasionado porque quando a maleimida-PEG-NHS é empregada, as ligações são supostamente mais fortes do que as ocasionadas pela adsorção da BSA à superfície das partículas. Dessa maneira, a utilização da molécula de maleimida-PEG-NHS ocasionou efeito benéfico para os sistemas bioconjugados, já que permitiu maior captação das nanopartículas. Vale ressaltar que os macrófagos são empregados nesse trabalho apenas como modelo e que, portanto, o efeito descrito como benéfico está relacionado ao fato de que há interesse em que as nanopartículas sejam internalizadas quando células tumorais

mais específicas forem estudadas. No entanto, a captação excessiva pelos macrófagos não constitui uma vantagem porque, caso o sistema bioconjugado seja captado pelos macrófagos, a atuação será inespecífica, uma vez que os macrófagos estão presentes na corrente sanguínea como um todo.

Comparando as amostras A, B e C, observa-se que o polímero que apresentou melhor desempenho foi o copolímero contendo ácido metacrílico, seguido pelo poli(metacrilato de metila) e finalmente pelo copolímero contendo ácido acrílico. O mesmo comportamento é notado quando são comparadas as amostras D, E e F. Os resultados são consistentes e indicam que parece haver preferência por parte dos macrófagos pelo produto da reação R6, que foi o material com ângulo de contato mais baixo. Isso parece sugerir que o aumento da hidrofiliabilidade dos polímeros melhorou o desempenho do sistema. No entanto, o produto da reação R4 apresentou ângulo de contato inferior ao produto da reação R2, porém foi o menos captado pelas células, o que indica que a hidrofiliabilidade pode não ser o único fator que ocasionou o aumento da eficiência do sistema. O aumento na captação pode ter sido causado pela presença de grupamentos ácidos provenientes do ácido metacrílico disponíveis na superfície das partículas, que pode ter facilitado de alguma maneira a captação pelos macrófagos.

Além disso, os resultados apresentados na Figura 86 indicam que o copolímero contendo ácido metacrílico foi bem captado pelos macrófagos, já que 85% das células foram consideradas positivas, o que quer dizer que os polímeros bioconjugados foram internalizados pelas células e, conseqüentemente, detectados em seu interior.

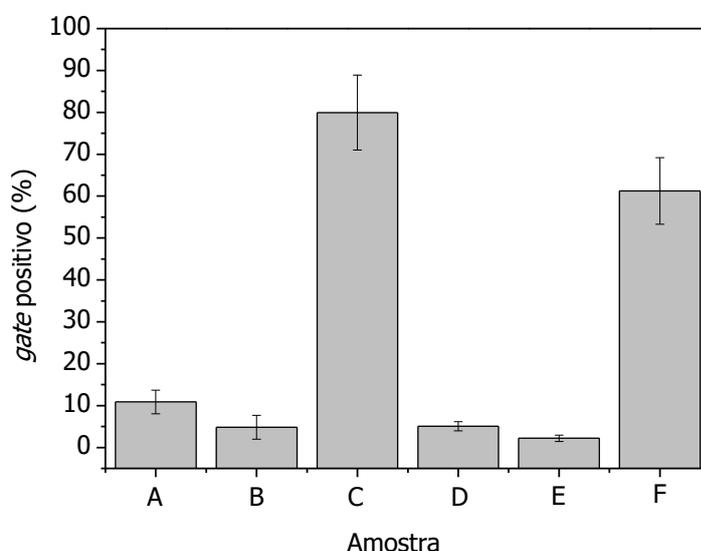


Figura 86 – Resultados dos ensaios de captação celular.

Capítulo VIII

Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

8.1. Conclusões

Na primeira parte do trabalho foram realizados testes visando à inserção de ligações duplas pendentes no poliestireno via copolimerização, de maneira a proceder posteriormente com a bioconjugação de moléculas de cisteína, que contém grupamentos tiol em sua estrutura. Com relação aos polímeros produzidos, os resultados indicaram que houve a inserção de duplas ligações pendentes quando o EGDMA foi empregado como co-mônômero e que, portanto, ele poderia ser empregado nas reações tiol-eno.

A grande contribuição da etapa das reações que tiveram como objetivo testar a ocorrência de ligações *click chemistry* do tipo tiol-eno com HD, DVB e EGDMA, consistiu no fato de que foi observado que ao contrário do que sugere a literatura, as reações *click* não são tão simples quanto parecem. Há questões, como o uso de solventes altamente tóxicos, que ferem diretamente a definição de *click chemistry*. No entanto, múltiplos solventes são empregados indiscriminadamente nos trabalhos reportados. Além disso, ficou claro que nem todos os iniciadores podem ser usados em reações tiol-eno e que o uso de diferentes iniciadores conduz à formação de mistura complexa de produtos muito diferentes entre si. Por fim, a escolha do par de reagentes tiol-eno parece ser fundamental para garantir a eficiência da reação de *click chemistry* que não deve, portanto, ser tratada de maneira genérica, mas particular, já que a *click chemistry* do tipo tiol-eno parece não ocorrer de maneira específica em todos os casos. Dependendo da reatividade entre os materiais escolhidos, a reação *click* pode não ser preferencial e conduzir à formação de subprodutos. No caso das reações testadas na primeira etapa do trabalho foi detectada *click chemistry* tiol-eno no caso em que o estireno reagiu com o ácido-3-mercaptopropionico na presença de AIBN. Há, portanto, muitos desafios acerca da *click chemistry* ainda não solucionados e pouco explorados e reportados na literatura, o que justificou o estudo de outra rota de reação.

Na segunda etapa do trabalho foram estudados (co)polímeros produzidos por polimerização RAFT em reações de bioconjugação via *click chemistry* do tipo tiol-

maleimida. Vale destacar que a adição do agente RAFT parece ter prejudicado parcialmente a inserção de ácido acrílico nas cadeias poliméricas, mas que a copolimerização com ácido metacrílico foi bem-sucedida. As reações de copolimerização permitiram o aumento da hidrofiliabilidade dos polímeros, como almejado. Os ângulos de contato dos copolímeros contendo ácido metacrílico foram maiores que os ângulos de contato dos copolímeros contendo ácido acrílico, o que provavelmente está relacionado ao fato de que o ácido acrílico parece ter migrado para a água, o que possivelmente diminuiu a inserção de grupamentos ácidos na cadeia polimérica.

Os resultados também indicaram que o uso da molécula espaçadora de maleimida-PEG-NHS beneficiou os sistemas bioconjugados, uma vez que quando comparado aos sistemas em que apenas o fenômeno de adsorção foi estudado, a captação celular foi superior. O aumento da hidrofiliabilidade não parece ter sido o fator determinante para o aumento da captação celular. Além disso, foi observado que a utilização de ácido metacrílico na composição dos polímeros fez com que a internalização das partículas fosse muito superior à internalização com os demais polímeros estudados. Isso indica que de alguma forma, a presença do ácido metacrílico na superfície facilita a captação pelos macrófagos.

8.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Como sugestões para trabalhos futuros serão apresentados alguns temas que ainda podem ser mais aprofundados e que trariam enorme contribuição para a comunidade científica.

Primeiramente cabe um estudo sobre a avaliação do efeito dos diferentes iniciadores nas reações de *click chemistry* do tipo tiol-eno. Ao longo deste trabalho ficou claro que o mecanismo de reação que propõe simplesmente que o iniciador se decompõe em radicais livres e inicia a etapa de propagação não é trivial. Os diferentes tipos de iniciadores exerceram diferentes funções em cada reação e com isso, os produtos formados foram completamente diferentes. Dessa maneira é importante estudar que tipos de iniciadores são válidos para as reações *click* e também seus mecanismos de atuação.

Ademais, vale aprofundar também a discussão sobre a necessidade de se conduzirem reações tiol-eno em meio homogêneo.

Com relação à bem-sucedida reação de bioconjugação com a molécula de maleimida-PEG-NHS, é importante conduzir um estudo com outras biomoléculas mais específicas para a vetorização para tumores e avaliar a eficiência dos sistemas com células cancerosas. Além disso, pode ainda ser realizado o encapsulamento de antineoplásicos.

Vale ressaltar, portanto, que ainda há muito a ser estudado acerca desse tema, que é muito rico e apresenta potencial de desenvolvimento constante.

Capítulo IX

Referências Bibliográficas

ABEL, B.A., MCCORMICK, C.L., 2016, “‘One-Pot’ Aminolysis/Thiol–Maleimide End-Group Functionalization of RAFT Polymers: Identifying and Preventing Michael Addition Side Reactions”, *Macromolecules*, v.49, pp. 6193-6202.

AKBARZADEH, A., ZARGHAMI, N., MIKAEILI, H., ASGARI, D., GOGANIAN, A., *et al.*, 2012, “Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of novel polymer-coated magnetic nanoparticles for controlled delivery of doxorubicin”, *Nanotechnology, Science and Applications*, v.5, pp. 13-25.

ALEXIS, F., BASTO, P., NISSEMBAUM, E., RADOVIC-MORENO, A. *et al.*, 2008, “HER-2-Targeted Nanoparticle-Affibody Bioconjugates for Cancer Therapy”, *Chem Med Chem*, v. 3, pp. 1839-1843.

AL-KAABI, K., VAN REENEN, A.J., 2009, “Synthesis of Poly(methyl methacrylate-glycidyl azide) Graft Copolymers Using N, N-Dithiocarbamate-Mediated Iniferters”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 114, pp. 398-403.

ALMEIDA, V., LEITÃO, A., REINA, L., MONTANARI, C., DONNICI, C., 2005, “Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução”, *Química Nova*, v. 28, pp. 118-129.

AMERICAN CANCER SOCIETY, Doxorubicin. Disponível em: <<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/guidetocancerdrugs/doxorubicin>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

ANSELMO, A., MITRAGOTRI, S., 2014, “An Overview of Clinical and Commercial Impact of Drug Delivery Systems”, *Journal of Controlled Release*, v. 190, pp. 15-28.

ANTONIUK, I., VOLET, G., WINTGENS, V., AMIEL, C., 2014, “Synthesis of a new dextran-PEG-b-cyclodextrin host polymer using ‘Click’ chemistry”, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, v.80, pp. 93–100.

ARCAMONE, F., CASSINELI, G., FANTINI, G., GREIN, A., OREZZI, P., POL, C., SPALLA, C., 1969, “Adriamycin, 14-Hydroxudaunomycin, a New Antitumor Antibiotic from *S.peuceticus* var. *caesius*”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 11, pp. 1101-1110.

ARNOLD, R.M., PATTON, D.L., POPIK, V.V., 2014, “A Dynamic Duo: Pairing Click Chemistry and Postpolymerization Modification To Design Complex Surfaces”, *Accounts of Chemical Reasearch*, v. 47(10), pp. 2999-3008.

ARSLAN, M., GOK, O., SANYAL, R., SANYAL, A., 2014, “Clickable Poly(ethylene glycol)-Based Copolymers Using Azide–Alkyne Click Cycloaddition-Mediated Step-Growth Polymerization”, *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 215, pp. 2237–2247.

BARNER-KOWOLLIK, C., 2008, *Handbook of RAFT Polimerization*, 1st edition, Wiley-VCH, Weinheim.

BARROS, A.C.S.D., BARBOSA, E.M., GEBRIM, L.H., et al., 2001, “Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama”, *Projeto Diretrizes*, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.

BARTHOLIN, M., BOISSIER, M., DUBOIS, J., 1981, “Styrene-Divinylbenzene Copolymers, 3 Revisited IR Analysis”, *Die Makromolekulare Chemie*, v. 182, pp. 2075-2085.

BERKEL, S., ELDDIJK, M., HEST, J., 2011, “Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation”, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 50, pp. 8806-8827.

BERNARDIM, B., CAL, P.M.S., MATOS, M.J., OLIVEIRA B.L., MARTÍNÉZ-SÁEZ, N., ALBUQUERQUE, I., PERKINS, E., CORZANA, F., BURTOLOSO, A.C.B., JIMÉNEZ-OSÉS, G., BERNARDES, G., 2016, “Stoichiometric and irreversible cysteine-selective protein modification using carbonylacrylic reagents”, *Nature Communications*, v. 7, pp. 1-9.

BESTETI, M.D., 2009, “*Produção e Caracterização de Partículas Casca-Núcleo Obtidas pela Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão*”, Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

BICAK, N., GAZI, M., KARAGOZ, B., 2006, “New water-soluble polymer with allyl pendant groups”, *Designed Monomers and Polymers*, v. 9, pp. 193–200.

BINKLEY, F., VIGNEAU, V., 1942, “The formation of cysteine from homocysteine and serine by liver tissue of rats”, *Journal of Biology Chemistry*, v. 144, pp. 507-511.

BÖHME, D., BECK-SICKINGER, A., 2015, “Drug delivery and release systems for targeted tumor therapy”, *Journal of Peptide Science*, v. 21, pp. 186-200.

BONADONNA, G., VALAGUSSA, P., MOLITERNI, A., ZAMBETTI, M., BRAMBILLA, C., 1995, “Adjuvant Cyclophosphamide, Methotrexate, and Fluorouracil in Node-Positive Breast Cancer — The Results of 20 Years of Follow-up”, *The New England Journal of Medicine*, v.332, pp. 901-906.

BOUHADIR, K.H., ALSBERG, E., MOONEY, D.J., 2001, “Hydrogel for Combination Delivery of Antineoplastic Agents”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 2625-2633.

BOVEY, F., MIRAU, P., 1996, *NMR of Polymers*, 1^a ed., Estados Unidos, Academic Press.

BOYER, C., GRANVILLE, A., DAVIS, T., BULMUS, V., 2009, “Modification of RAFT-Polymers via Thiol-Ene Reactions: A General Route to Functional Polymers and

New Architectures”, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 47, pp. 3773-3794.

BRANDOLINI, A., HILLS, D., 2000, *NMR Spectra of Polymers and Polymer Additives*, New York, Marcel-Dekker.

BRANDRUP, J, IMMERGUT, E., GRULKE, E., 1999, *Polymer Handbook*, 4^a ed., Estados Unidos, Wiley-Interscience.

BRASIL JÚNIOR, A.G., 2010, “Desenvolvimento de Processos de Bioconjugação Empregando Pontos Quânticos Fluorescentes de Semicondutores II-VI”, *Dissertação de mestrado*, UFPE, Pernambuco, Brasil.

BROSNAN, S., SCHLAAD, H., 2014, “Modification of Polypeptide Materials by Thiol-X Chemistry”, *Polymer*, v.55, pp. 5511-5516.

BUENO, V.A.B., 2010, *Produção de Hidrogéis Micro e Nano Estruturados*, Tese de D.Sc., USP, São Paulo, Brasil.

CAI, S., THATI, S., BAGBY, T.R., DIAB, H., DAVIES, N.M., COHEN, M., FORREST, M.L., 2010, “Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer”, *Journal of Controlled Release*, v. 146, pp. 212–218.

CAMPOS, I.M.F., 2016, “Nanopartículas poliméricas para a liberação de fármaco sítio-dirigida para o tratamento de doenças neurodegenerativas”, *Qualificação ao Doutorado*, Programa de Engenharia Química da COPPE, Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

CAMPOS, L., KILLOPS, K., SAKAI, R., PAULUSSE, J., et al., 2008, “Development of Thermal and Photochemical Strategies for Thiol-Ene Click Polymer Functionalization”, *Macromolecules*, v. 41, pp. 7063-7070.

CANDUZINI, H.A., 2012, “*Síntese e Funcionalização de 1,2,3-triazóis via reação de cicloadição [3+2] de azidas e acetilenos terminais*”, Tese de M.Sc., USP, São Paulo, SP, Brasil.

CANEVAROLO, S.V., 2006, *Ciência dos Polímeros*, 2ªed., São Paulo, Artliber.

CHANDRAN, A., SHEENA, M., VARGHESE, H.T., PANICKER, C.Y., MANOJKUMAR, T.K., VAN ALSENOY, C., RAJENDRAN, G., 2012, “Vibrational Spectroscopic Study of (E)-4-(Benzylideneamino)-N-Carbamimidoyl Benzenesulfonamide”, *ISRN Analytical Chemistry*, v. 2012, pp. 1-11.

CHATTERJEE, K., ZHANG, J., HONBO, N., KARLINER, J.S., 2010, “Doxorubicin Cardiomyopathy”, *Cardiology*, v., 115, pp.155–162.

CHE MAN, S.H., YUSOF, N.Y., WHITTAKER, M.R., THICKETT, S.C., ZETTERLUND, P.B., 2013, “Influence of monomer type on miniemulsion polymerization systems stabilized by graphene oxide as sole surfactant”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v.51, pp. 5153-5162.

CHEMICALBOOK. Disponível em: http://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_592-42-7_1HNMR.htm. Acesso em 07 de Abril de 2015.

CHEN, D., XIA, X., GU, H., XU, Q., et al., 2011, "pH responsive polymeric carrier encapsulated magnetic nanoparticles for cancer targeted imaging and delivery", *Journal of Materials Chemistry*, v. 21, pp. 12682-12690.

CIRILO, L., 2013, *Síntese de novos suportes com diferentes composições e graus de hidrofobicidade visando avaliar a influência na imobilização da lipase B de Cândida antártica*, Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

CLAUDINO, M., MEULEN, I., TREY, S., JONSSON, M., HEISE, A., JOHANSSON, M., 2012, “Photoinduced Thiol–Ene Crosslinking of Globalide/e-Caprolactone

Copolymers: Curing Performance and Resulting Thermoset Properties”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 50, pp. 16–24.

COLE, M.A., JANKOUSKY, K.C., BOWMAN, C.N., 2013, “Redox Initiation of Bulk Thiol-Ene Polymerizations”, *Polymer Chemistry*, v.4(4), pp. 1167-1175.

COSTA, P., LOBO, J.M.S, 2001, “Modeling and Comparison of Dissolution Profiles”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.13, pp.123-133.

CUTTS, S., NUDELMAN, A., REPHAELI, A., PHILLIPS, D., 2005, “The Power and Potential of Doxorubicin-DNA Adducts”, *Life*, v. 57, pp. 73-81.

DAS, A., THEATO, P., 2016, “Activated Esther Containing Polymers: Opportunities and Challenges for the Design of Functional Molecules”, *Chemical Reviews*, v. 116, pp. 1434-1495.

DASH, S., MURTHY, P.N., NATH, L., CHOWDHURY, P., 2010, “Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems”, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, v.67, nº3, pp.217-223.

DECAN, M.R., IMPELLIZZERI, S., MARIN, M.L., SCAIANO, J.C., 2014, “Copper nanoparticle heterogeneous catalytic ‘click’ cycloaddition confirmed by single-molecule spectroscopy”, *Nature Communications*, v.5, pp.1-8.

DESAI, M.P., LABEHASETWAR, V., AMIDON, G.L., LEVY, R.J., 1996, “Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size”, *Pharmaceutical Research*, v. 13, nº 12, pp. 1838-1845.

DEVI, G., RENUGA, T.S., GUNASEKARAN, S., 2010, “FTIR Spectroscopic Analysis of Normal and Cancerous Human Breast Tissues between 450 cm⁻¹ and 1100 cm⁻¹ using Trend Analysis”, *International Journal of ChemTech Research*, v. 2, pp. 1426-1433.

DICIONÁRIO AURÉLIO. Disponível em: <<http://www.dicionariodoaurelio.com>>. Acesso em: 15 de abril de 2014.

DIMITRIU, S., 2001, *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*, 2 ed., CRC Press.

DREW UNIVERSITY, 2014, “Zero-Order Controlled-Release Kinetics Through Polymer Matrices”. Disponível em: <<http://www.drew.edu/wp-content/uploads/sites/99/Team5.pdf>>. Acesso em: 16 de Setembro de 2014.

DUNCAN, R., 1999, “Polymer Conjugates for Tumour Targeting and Intracytoplasmatic Delivery. The EPR Effect as a Common Gateway?”, *PSTT*, v.2, nº 11, pp. 441-449.

EISSA, A., KHOSRAVI, E., 2011, “Synthesis of a new smart temperature responsive glycopolymer via click-polymerisation”, *European Polymer Journal*, v. 47, pp. 61–69.

ELLIOTT, J., BOWMAN, C., 2001, “Monomer Functionality and Polymer Network Formation”, *Macromolecules*, v. 34, pp. 4642-4649.

ELLMAN, G. L., 1959, “Tissue Sulfhydryl Groups”, *Archive of Biochemistry and Biophysics*, v.82, pp. 70-77.

ESPOSITO E., CORTESI, R., NASTRUZZI, C., 1996, “Gelatin Microspheres: Influence of Preparation Parameters and Thermal Treatment on Chemico-physical and Biopharmaceutical Properties”, *Biomaterials*, v. 17, nº20, pp. 2009-2020.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, (a). Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/002389/WC500158596.pdf>. Acesso em 26 de Abril de 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, (b). Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/002455/WC500135004.pdf>. Acesso em 26 de Abril de 2017.

FANG, J., NAKAMURA, H., MAEDA, H., 2011, “The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved, and Limitations and Augmentation of the Effect”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, pp. 136-151.

FARLEY, R., SAUNDERS, B.R., 2014, “A General Method for Functionalisation of Microgel Particles with Primary Amines Using Click Chemistry”, *Polymer*, v. 55, pp. 471-480.

FAROKHZAD, O., KARP, J., LANGER, R., 2006, “Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting”, *Expert Opinion in Drug Delivery*, v. 3, pp. 311-324.

FENG, L., ZHU, C., YUAN, H., LIU, L., LV., F., WANG, S., 2013, “Conjugated polymer nanoparticles: preparation, properties, functionalization and biological applications”, *Chemical Society Reviews*, v. 16, pp. 1-14.

FILICE, M., ROMERO, O., GUIBAN, J., PALOMO, J., 2011, “Trans, trans-2,4-hexadiene incorporation on enzymes for site-specific immobilization and fluorescent labeling”, *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 9, pp. 5535-5540.

FLORY, R., J., 1953, *Principles of Polymer Chemistry*, Ithaca, NY, Cornell University Press.

FONSECA, L., NELE, M., VOLPATO, N., SEICERA, R., PINTO, J.C., 2013, “Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel through in situ Miniemulsion Polymerization”, *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 7, pp.54-63.

FORT, T., PATTERSON, H.T., 1963, “A Simple Method for Measuring Solid-Liquid Contact Angles”, *Journal of Colloid Science*, v.18, pp. 217-222.

FRAZER, R.Q., BYRON, R.T., OSBORNE, P.B., WEST, K.P., 2005, “PMMA: An essential material in medicine and dentistry”, *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, v. 15, pp. 629-639.

FREITAS, L., RUELA, F., PEREIRA, G., ALVES, R., FREITAS, R., SANTOS, L., 2011, “A reação ‘click’ na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações”, *Química Nova*, v.34, nº 10, pp. 1791-1804.

FREITAS, L.B.O., RUELA, F.A., PEREIRA, G.R., ALVES, R.B., FREITAS, R.P., 2011, “ A Reação ‘Click’ na Síntese de 1,2,3-triazóis: Aspectos Químicos e Aplicações”, *Química Nova*, v. 34, pp. 1791-1804.

FRICK, C., RUDIN, C., 1981, “Reactivity Ratios for Divinylbenzene and Ethylene Glycol Dimethacrylate Copolymerizations with Styrene and Methyl Methacrylate”, *Journal of Macromolecules*, v. 16, pp. 1275-1281.

GALO, O.A., 2012, “Síntese de Análogos de Benznidazol por ‘Click Chemistry’ e Avaliação da Atividade Antiparasitária”, *Dissertação de M.Sc.*, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

GALVAN, R., LAURENCE, R., TIRRELL, M., 1995, *Polymerization Process Modeling*, 1 ed., WILEY-VHC.

GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R., DELIE, F., 2008, “Nanoparticles for Drug Delivery: The Need for Precision in Reporting Particles Size Diameters”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 69, pp. 1-9.

GOLDMANN, A., WALTHER, A., NEBHANI, L., JOSO, R., 2009, “Surface Modification of Poly(divinylbenzene) Microspheres via Thiol-Ene Chemistry and Alkyne-Azide Click Reactions” *Macromolecules*, v. 42, pp. 3707-3714.

GONSALVEZ, A.M.R., MELO, T.M., 2007, *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*, 1ed, Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra.

HANS, M.L., LOWMAN, A.M., 2002, “Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting”, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 6, pp. 319-327.

HEIN, C.D., Liu, X., WANG, D., 2008, “Click Chemistry: a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences”, *Pharmaceutical Research*, v. 25, pp. 2216-2230.

HEISTER, E., NEVES, V., TILMACIU, C., LIPERT, K., BELTRÁN, V., COLEY, H., SILVA, S., McFADDEN, J., 2009, “Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy”, *Carbon*, v. 47, pp. 2152-2160.

HENRIQUE, J.S., FALCARE, R.S., LOPES, P.S., 2006, “Sistemas de Liberação Controlada”, *Pharmacia Brasileira*, Novembro/Dezembro.

HERMANSON, G.T., 2013, “Bioconjugate Techniques”, Academic Press, Third Edition, Oxford, UK.

HIZAL, G., TUNCA, U., SANYAL, A., 2011, “Discrete Macromolecular Constructs via the Diels-Alder “Click” Reaction”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v.49, pp.4103-4120.

HOFFMAN, A.S., 2002, “Hydrogel for Biomedical Applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.43, pp.3-12.

HOGG, N., 1999, “The effect of cyst(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine”, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, pp. 28-33.

HONG, S.H., MCHUGH, V.M., 1988, Review of Preparation and Properties of Polymers from Copolymerization of Aprotic Acrylic Monomers with Protic Acrylic Monomers, US Armament Munitions Chemical Command, Maryland, USA.

HOYLE, C., BOWMAN, C., 2010, “Thiol-ene click chemistry”, *Polymer Chemistry*, v. 49, pp. 1540-1573.

HOYLE, C.E., LEE, T.Y., ROPER, T., 2004, “Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future”, *Journal of Polymer Science: Part A: polymer chemistry*, v. 42, pp. 5301-5338.

HRUBÝ, M., KONÁK, C., ULBRICH, K., 2005, “Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin”, *Journal of Controlled Release*, v. 103, pp. 137–148.

HUANG, C., CHEN, C., LEE, Y., 2007, “Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poli(n-butyl cyanoacrylate)nanoparticles via miniemulsion”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, pp. 267-275.

HUSSIEN, S.S., 2014, “Biosorption of lanthanum from aqueous solution using *Pleurotus ostreatus* basidiocarps”, *International Journal of Biotechnology Research*, v. 2, pp. 26-36.

HUTCHINSON, C.R., COLOMBO, A.L., 1999, “Genetic Engineering of Doxorubicin Production in *Streptomyces peucetius*: A Review”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 23, pp. 647-652.

IHRE, H., LARSON, A., 2003, “Post-modification of a porous support”, *Patente n° WO 2003046063 A1*.

INCA, 2014, “Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil”, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ISHKUH, F., JAVANBAHKT, M., MANESH, M., DINARVAND, R., ATYABI, F., 2014, “Synthesis and characterization of paclitaxel-imprinted nanoparticles for recognition and controlled release of an anticancer drug”, *Journal of Material Science*, v. 49, pp. 6343-6352.

IYER, U., KADAMBI, V., 2011, “Antibody-drug conjugates – Torjan horses in the war of cancer”, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 64, pp. 207-212.

JAHANZAD, F., SAJJADI, S., BROOKS, B.W., 2004, “On the Evolution of Particle Size Average and Size Distribution in Suspension Polymerization Processes”, *Industrial & Engineering Chemical Research*, v.206, pp. 255-262.

JAMES, J., DUBS, G., 2006, “FDA approves new kind of lymphoma treatment”, *Food and Drug Administration. AIDS treat news*, pp. 2-3.

KADAJJI, V., BETAGERI, G., 2011, “Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications”, *Polymers*, v. 3, pp. 1972-2009.

KAMALY, N., YAMEEN, B., WU, J., FAROKHZAD, O., 2016, “Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release”, *Chemical Reviews*, v.116, pp. 2602-2663.

KATAOKA, K., MATSUMOTO, T., YOKOYAMA, M., OKANO, T., SAKURAI, Y., FUKUSHIMA, S., OKAMOTO, K., KWON, G., 2000, “Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(L-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance”, *Journal of Controlled Release*, v.64, pp. 143-153.

KILLOPS, K., CAMPOS, L., HAWKER, C., 2008, “Robust, efficient, and orthogonal synthesis of dendrimers via thiol-ene ‘click’ chemistry”, *Journal of the American Society*, v. 130, pp. 5062-5064.

KIM, J.-H. & YOON, J.-Y., 2002, “Protein Adsorption on Polymer Particles”. *Encyclopedia of surface and colloid science*, pp. 4373-4381.

KOBANOV, A.V., BATRAKOVA, E.V., ALAKHOV, V.Y., 2002, “Pluronic® Block Copolymers as Novel Polymer Therapeutics for Drug and Gene Delivery”, *Journal of Controlled Release*, v.82, pp. 189-212.

KOBANOV, A.V., BATRAKOVA, E.V., SRIADIBHATLA, S., YANG, Z., et al., 2005, “Polymer Genomics: Shifting the Gene and Drug Delivery Paradigms”, *Journal of Controlled Release*, v.101, pp. 259-271.

KOHANE, D., LANGER, R., 2008, “Polymeric biomaterials for tissue engineering”, *Pediatric research*, v. 63, pp. 487-491.

KOLB, H., SHARPLESS, K., 2003, “The Growing Impact of click chemistry on drug discovery”, *Drug Discovery Today*, v. 8, n°24, pp. 1128-1137.

KOLB, H.C., FINN, M.G., SHARPLESS, K.B., 2001, “Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions”, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 40, pp. 2004-2021.

KOO, S., STAMENOVIC, M., PRASATH, R., INGLIS, A., DU PREZ, F., et al., 2010, “Limitations of radical thiol-ene reactions for polymer–polymer conjugation”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 48, pp. 1699–1713.

KOWOLLIK, C., INGLIS, A.J., 2009, “Has Click Chemistry Lead to a Paradigm Shift in Polymer Material Design?”, *Macromolecular Chemistry and Physics*, v., 210, n° 12, pp. 987–992.

KUDRA, T., STRUMILLO, C., 1998, *Thermal Processing of Bio-Materials*, Amsterdam, Holanda, CRC Press.

KUN, K., KUNIN, R., 1968, “Macroreticular resins:Formation of macroreticular styrene-divinylbenzene copolymers”, *Journal of Polymer Science: Part A*, v. 6, pp. 2689-2701.

KURAMOTO, N.; HAYASHI, K.; NAGAI, K., 1994, “Thermoreversible Reaction of Diels-Alder Polymer Composed of Difurfuryladipate with Bismaleimidodiphenylmethane”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v.32, pp. 2501-2504.

LAHANN, J., 2009, *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*, 1st edition, John Wiley & Sons, Michigan, USA.

LAMI, E., FARZI, G., DAVID, L., PUTAUX, J., *et al.*, 2012, “Silica Encapsulation by Miniemulsion Polymerization: Distribution and Localization of the Silica Particles in Droplets and Latex Particles”, *Langmuir*, v. 28, pp. 6021-6030.

LAMPROU, A., 2006, “Study of the Emulsion and the Miniemulsion Polymerization of Styrene in the Presence of a Chain Transfer Agent”, *Department of Chemistry & Applied Biosciences Institute for Chemical & Bioengineering*, ETH, Zurich.

LANDFESTER, K., CRESPIY, D., 2013, *Miniemulsion polymerization*. 1^a ed., WILEY-VHC.

LEE, Y., HUANG, C., CHEN, C., 2014, “Drug-loaded poly(lkyl-cyanoacrylate) nanoparticles and process for the preparation thereof”, *Patente n° US8679539*.

LELU, S., NOVAT, C., GRAILLAT, C., GUYOT, A., LAMI, E., 2003, “Encapsulation of an organic phthalocyanine blue pigment into polystyrene latex particles using a miniemulsion polymerization process”, *Polymer International*, v. 52, pp. 542-547.

LI, Y., SU, H., FENG, X., WANG, Z., GUO, K., WESDEMIOTIS, C., FU, Q., CHENG, S., ZHANG, W., 2014, “Thiol-Michael “click” chemistry: another efficient tool for head functionalization of giant surfactants”, *Polymer Chemistry*, v. 5, pp. 6151-6162.

LOPES, C.M., LOBO, J.M., COSTA, P., 2005, “Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: Polímeros Hidrofílicos”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n°2, pp.143-154.

LOPES, C.M., LOBO, J.M.S., COSTA, P., 2005, “Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: Polímeros Hidrofílicos”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n°2.

LORCA, B., BESSA, E., NELE, M., SANTOS, E., PINTO, J.C., 2012, “Preparation of PMMA Nanoparticles Loaded with Benzophenone-3 through Miniemulsion Polymerization”, *Macromolecular Symposia*, v.319, pp. 246-250.

LOWE, A.B., 2010, “Thiol-ene ‘Click’ Reactions and Recent Applications in Polymer and Materials Synthesis”, *Polymer Chemistry*, v.1, pp. 17-36.

LOWE, A.B., HOYLE, C.E., BOWMAN, C.N., 2010, “Thiol-yne Click Chemistry: A Powerful and Versatile Methodology for Materials Synthesis”, *Journal of Materials Chemistry*, v.20, pp. 4745–4750.

LU, J., SHI, M., SHOICHET, M., 2009, “Click Chemistry functionalized polymeric nanoparticles target corneal epithelial cells through RGD-cell surface receptors”, *Bioconjugation Chemistry*, v. 20, pp. 87-94.

LUTZ, J., BÖRNER, H., WEICHENHAN, K., 2006, “Combining ATRP and “Click” Chemistry: a Promising Platform toward Functional Biocompatible Polymers and Polymer Bioconjugates”, *Macromolecules*, v. 39, pp. 6376-6383.

MACHADO, F., LIMA, E., PINTO, J.C., 2007, “Uma Revisão sobre os Processos de Polimerização em Suspensão”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.17, nº2, pp.166-179.

MAEDA, H., 2001, “The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumour Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting”, *Advan. Enzyme Regul.*, v. 41, pp. 189–207.

MAEDA, H., BHARATE, G.Y., DARUWALLA, J., 2009, “Polymeric Drugs for Efficient Tumor-Targeted Delivery Based on EPR-Effect”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.71, pp. 409-419.

MAEDA, H., GREISH, K., FANG, J., 2006, “The EPR Effect and Polymeric Drugs: A Paradigm Shift for Cancer Chemotherapy in the 21st Century”, *Advanced Polymer Science*, v.193, pp. 103-121.

MAEDA, H., WU, J., SAWA, T., MATSUMURA, Y., HORI, K., 2000, “Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review”, *Journal of Controlled Release*, v. 65, pp.271–284.

MAGENAU, A., J, D., CHAN, J.W., HOYLE, C.E., STOREY, R.F., 2010, “Facile polyisobutylene functionalization via thiol–ene click chemistry”, *Polymer Chemistry*, v. 1, pp. 831–833.

MANO, E.B., 1985, *Introdução A Polímeros*, 1 ed., São Paulo, Edgard Blücher LTDA.

MATSUMURA, Y., HAMAGUCHI, T., URA, T., MURO, K., *et al.*, 2004, “Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin”, *British Journal of Cancer*, v. 91, pp. 1775-1781.

MATSUMURA, Y., MAEDA, H., 1986, “A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs”, *Cancer Research*, v. 46, pp. 6387-6392.

MAZUREK, M.N., Ma, B., JAVAKHISHVILI, I., HANSEN, J.H., HVILSTED, S., SKOV, A.L., 2015, “Controlled release in hard to access places by poly(methyl methacrylate) microcapsules triggered by gamma irradiation”, *Polymers for Advanced Technologies*, v. 26, pp. 1059-1064.

MAZZEO, N., 2011, *Chemistry, Emission Control, Radioactive Pollution and Indoor Air Quality*, 1 ed., InTech.

MENDES, A., HUBBER, I., SIQUEIRA, M., BARBOSA, G., MOREIRA, D. *et al.*, 2012, “Preparation and Citotoxicity of poly(methyl methacrylate)nanoparticles for drug encapsulation”, *Macromolecular Symposia*, v. 319, pp. 34-40.

MISHRA, M., YAGCI, Y., 2008, *Handbook of Vinyl Polymers: Radical Polymerization, Process, and Technology*, CRC Press, 2nd edition, Boca Raton, USA.

MISTRY, B.D., 2009, *A Handbook of Spectroscopic Data Chemistry*, 1st ed., Oxford Book Company, Jaipur, India.

MITTAL, V., 2011, *Miniemulsion Polymerization Technology*, Ludwigshafen, Alemanha, John Wiley & Sons.

MOAD, G., CHONG, Y.K., POSTMA, A., RIZZARDO, E., THANG, S., 2005, "Advances in RAFT polymerization: The Synthesis of Polymers with Defined End Groups", *Polymer*, v. 46, pp. 8458-8468.

MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S., 2008, "Radical Addition-Fragmentation Chemistry in Polymer Science", *Polymer*, v. 49, pp. 1079-1131.

MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S.H., 2009, "Living Radical Polymerization Process – A Second Update", *Australian Journal of Chemistry*, v. 62, pp. 1402-1472.

MOHAN, P., RAPOPORT, N., 2010, "Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking", *Molecular Pharmaceutics*, v.7, pp.1959-1973.

MOREIRA, T.S., 2015, *Síntese de Nanopartículas Poliméricas por Polimerização Radicalar (RAFT) para Vetorização Biodirigida de Tamoxifeno*, Tese de D.Sc., Programa de Engenharia Química, COPPE, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

MOREIRA, T.S., OLIVEIRA, M.A., NELE, M., PINTO, J.C., LIMA, L.M., 2014, "Effect of Tamoxifen in RAFT Miniemulsion Polymerization During the Synthesis of Polymer Nanoparticles", *Polímeros*, v. 24. pp. 25-30.

MORI, S., BARTH, H.G., 1999, *Size Exclusion Chromatography*, 1st ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

NAIR, D.P., PODGÓRSKI, M., CHATANI, S., GONG, T., XI, W., FENOLI, C., BOWMAN, C., 2014, “The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry”, *Chemistry of Materials*, v.26, pp. 724-744.

NARAIN, R., 2014, *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.

NASIR, F., KHAN, J., KHAN, A., KHUDA, F., et al., 2012, “Development and Evaluation of Diclofenac Sodium Thermoreversible Subcutaneous Drug Delivery System”, *International Journal Pharm*, v. 439, pp. 120-126.

NEVES, C.H., 2002, “*Estudo do Processo Produtivo do Poliestireno Utilizando Água como Agente de Expansão Física*”, Tese de M.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

NEW, K., BRECHBIEL, M., 2009, “Growing Applications of ‘Click Chemistry’ for Bioconjugation in Contemporary Biomedical Research”, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, v. 24, nº 3, pp.289-302.

NGWULUKA, N., 2010, “Application of in situ polymerization for design and development of oral drug delivery systems”, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 11, nº 4, pp. 1603-1611.

NIH (a), National Institutes of Health, Estados Unidos, EUA. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=controlled+release>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2017.

NIH (b), National Institutes of Health, Estados Unidos, EUA. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results/map/click?map.x=251&map.y=324&term=controlled+release>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2017.

NORTHOP, B.H., COFFEY, R.N., 2012, “Thiol–Ene Click Chemistry: Computational and Kinetic Analysis of the Influence of Alkene Functionality”, *Journal of the American Chemical Society*, v.134, pp. 13804-13817.

NORTHROP, B., FRAYNE, S., CHOUDHARY, U., 2015, “Thiol-Maleimide “Click” Chemistry: Evaluating the Influence of Solvent, Initiator, and Thiol on the Reaction Mechanism, Kinetics, and Selectivity”, *Polymer Chemistry*, v.18, pp. 1-42.

NYQUIST, R., 2001, *Interpreting Infrared, Raman, and Nuclear Magnetic Resonance Spectra*, v.1, Academic Press, Michigan, USA.

O’CONNOR, A., MARSAT, J., MITRUGNO, A., FLAHIVE, T., et al., 2014, “Poly(Ethylene Glycol)-Based Backbones with High Peptide Loading Capacities”, *Molecules*, v. 19, pp. 17559-17577.

OCTAVIA, Y., TOCCHETI, C.G., GABRIELSON, K.L., JANSSENS, S., CRIJNS, H.J., MOENS, A., 2012, “Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies”, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 52, pp. 1213-1225.

ODIAN, G., 2004, *Principles of Polymerization*, 4 ed., New Jersey, John Wiley & Sons.

OLIVEIRA, M. A. M., 2011, “*Produção de Micropartículas e Nanopartículas Poliméricas para Aplicações Biomédicas em Sistemas Heterogêneos de Polimerização*”, Tese de Dsc. PEQ-COPPE, UFRJ. Rio de Janeiro-BR.

OLIVEIRA, M.A., NELE, M., PINTO, J.C., 2013, “Polimerização RAFT em Miniemulsão”, *Polímeros*, v. 23, pp. 784-797.

OLIVEIRA, M.A.M., MELO, P., NELE, M., PINTO, J.C., 2012, “In Situ Incorporation of Doxorubicin in Copolymer Particles During Suspension Polymerization”, *Macromolecular Symposia*, v. 319, pp. 23-33.

ORTEGA, F., RUIZ, F., AVERICK, S., RODRIGUEZ, G., et al., 2013, “Smart heparin-based bioconjugates synthesized by a combination of ATRP and click chemistry”, *Polymer Chemistry*, v. 4, pp. 2800-2814.

PABIN-SZAFKO, B., WISNIEWSKA, E., 2011, “Applying of spectroscopic methods in the investigation of radical polymerization processes and products”, *CHEMIK*, v. 65, pp. 637-642.

PARRISH, B., BREITENKAMP, R., EMRICK, T., 2005, “PEG- and Peptide-Grafted Aliphatic Polyesters by Click Chemistry”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, pp. 7404-7410.

PEIXOTO, A.C.B., 2013, *Funcionalização de Nanopartículas Poliméricas para Liberação de Medicamentos Sítio-dirigida*, Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PEPPAS, L., BLANCHETTE, J., 2004, “Nanoparticles and targeted systems for cancer therapy”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, pp. 1649-1659.

PIPKORN, R., WIESSLER, M., WALDECK, W., LORENZ, P., MUEHLHAUSEN, U., FLEISCHHACKER, H., KOCH, M., BRAUN, K., 2011, “Enhancement of the Click Chemistry for the Inverse Diels Alder Technology by Functionalization of Amide-Based Monomers”, *International Journal of Medical Science*, v.8, pp. 387-396.

PLANA, J.C., 2013, “The Red Devil Revisited”, *JACC: Cardiovascular Imaging*, v.6, n°8, pp. 886-888.

PREOBRAZHENSKAYA, M.N., TEVYASHOVA, A.N., OLSUFYEVA, E.N., Huang, K., HUANG, H., 2006, “Second Generation Drugs-derivatives of Natural Antitumor Anthracycline Antibiotics Daunorubicin, Doxorubicin and Carminomycin”, *J Med Science*, v. 26, n°4, pp. 119-128.

PUBCHEM, 2017. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-cysteine#section=Top>>. Acesso em 15 de agosto de 2017.

RAHMAN, A., CARMICHAEL, D., HARRIS, M., *et al.*, 1986, “Comparative Pharmacokinetics of Free Doxorubicin and Doxorubicin Entrapped in Cardiophilic Liposomes”, *Cancer Research*, v. 46, pp. 2295-2299.

RAHMAN, M.S., GRAJALES, S., 2016, “Functional RAFT Polymers for Biomedical Applications”, *Material Matters*, v. 8, pp. 96.

RÍHOVÁ, B., STROHALM, I., PRAUSOVÁ, J., *et al.*, 2003, “Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs: experimental and first clinical data”, *Journal of Controlled Release*, v.91, pp. 1-16.

ROMIO, A., RODRIGUES, H., PERES, A., VIEGAS, A., 2012, “Encapsulation of Magnetic nickel nanoparticles via inverse miniemulsion polymerization”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 129, pp. 1426-1433.

SAALU, L.C., ENYE, L.A., OSINUBI, A.A., 2009, “An Assessment of the Histomorphometric Evidences of Doxorubicin-induced Testicular Cytotoxicity in Wistar Rats”, *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, Vol. 1(9), pp. 370-374.
SALAMONE, J., 1996, *Polymeric Materials Encyclopedia*, 1 ed. CRC Press.

SANCHIS, J., CANAL, F., LUCAS, R., VICENT, M., 2010, “Polymer-drug conjugates for novel molecular targets”, *Nanomedicine*, v. 5, pp. 915-935.

SANTOS, J.G.F., 2007, *Otimização do Processo de Obtenção do Cimento Ósseo à base de PMMA*, Tese de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

SAXENA, V., HUSSAIN, M., 2012, “Poloxamer 407/TPGS Mixed Micelles for Delivery of Gambogic Acid to Breast and Multidrug-Resistant Cancer”, *International Journal of Nanomedicine*, v. 7, pp. 713-721.

SAXON, E., BERTOZZI, C., 2000, “Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction”, *Science*, v.287, pp. 2007-2010.

SCHMALZ, G., BINDSLEV, D.A., 2009, *Biocompatibility of dental materials*, 1 ed., Berlin, Alemanha, Springer.

SCHORK, F., LUO, Y., SMULDERS, W., RUSSUM, J. et al., 2005, “Miniemulsion Polymerization”, *Advanced Polymer Science*, v. 175, pp. 129-255.

SEMSARILAR, M., PERRIER, S., 2010, “Green Reversible Addition-fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization”, *Nature Chemistry*, v. 2, pp. 811-820.

SENER, P., SIEVERS, E., 2012, “The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma”, *Nature Biotechnology*, v.30, pp. 631-637.

SEYMOUR, L.W., MIYAMOTO, Y., MAEDA, H., BRERETON, M., STROHALM, J., ULBRICH, K., DUNCAN, R., 1995, “Influence of Molecular Weight on Passive Tumour Accumulation of a Soluble Macromolecular Drug Carrier”, *European Journal of Cancer*, v.31, pp. 766-770.

SHARMA, B.K., 2004, *Instrumental methods of chemical analysis*, In; *Introduction to Analytical chemistry*, 23 ed., Goel Publishing House Meerut.

SIEGEL, R., MA, J., ZOU, Z., JEMAL, A., 2014, “Cancer Statistics”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 64, pp., 9-22.

SIEPMANN, J., SIEGEL, R.A., RATHBONE, M.J., 2012, “Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery”, *Controlled Release Society*.

SIGMA, 2017. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c8755pis.pdf>. Acesso em 15 de agosto de 2017.

SIGMA-ALDRICH, 2017. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/polymer-science/raft-polymerization.html>>. Acesso em: 24 de junho de 2017.

SINDHU, P.S., 2006, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, 1 ed., New Delhi, New Age International (P) Limited Publishers.

SLETTEN, E.M., BERTOZZI, C., 2009, “Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Funciotnality”, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 48, pp.6974–6998.

SO YOUNG, A., LEE, D., HWANG, J., KIM, K., et al., 2014, “Photo-Induced Thiol-ene Polysulfide-Crosslinked Materials with Tunable Thermal and Mechanical Properties”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 52, pp. 3060–3068.

SOCRATES, G., 2006, *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*, John Wiley & Sons, 3rd edition, Chichester, England.

SOLJIC, I., PENOVIC, T., JUKIC, A., JANOVIC, Z., 2009, “Kinetic Study of Free Radical Copolymerization of Dodecyl Methacrylate and Styrene Using Diperoxide Initiator”, *AIDIC Conference Series*, v.9, pp. 283-291.

SOUSA, M.D., BARBOSA, C.M., 2009, “Polímeros com capacidade de reconhecimento molecular no controle da liberação de fármacos. Parte 1: Síntese e caracterização”, *Química Nova*, v. 32, nº 6, pp. 1609-1619.

SPEVACEK, J., PEARSON, R., RICHARDS, K., ZIGRINO, K., 2013, “Methods and systems of graft polymerization on a functionalized substrate”, *Patente n° WO2013033610*.

SRIKANTH, C.S., CHUANG, S.S.C., 2013, “Infrared Study of Strongly and Weakly Adsorbed CO₂ on Fresh and Oxidatively Degraded Amine Sorbents”, *The Journal of Physical Chemistry*, v.117, pp. 9196-9205.

STARUSAK, D., MERCER, J., DIETER, H., TREMMER, W., et al., 2001, “Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer’s, Menkes, and Wilson diseases”, *Brain Research Bulletin*, v. 55, pp. 175-185.

STEPHANOPOULOS, N., FRANCIS, M., 2011, “Choosing an effective protein bioconjugation strategy”, *Nature Chemical Biology*, v. 7, pp. 876-884.

STOCKMAYER, W., 1944, “Theory of Molecular size distribution and gel formation in branched-chain polymers”, *The Journal of Chemical Physics*, v. 12, pp. 45.

STOREY, B., 1965, “Copolymerization of styrene and p-divinylbenzene. Initial rates and gel points”, *Journal of Polymer Science: Part A*, v. 3, pp. 265-282.

STRANDMAN, S., HIETALA, S., ASEYEV, V., KOLI, B., BUTCHER, S., TENHU, H., 2006, “Supramolecular assemblies of amphiphilic PMMA-*block*-PAA stars in aqueous solutions”, *Polymer*, v. 47, pp. 6524-6535.

SU, J., CHEN, F., CRYNS, V., MESSERSMITH, P., 2011, “Catechol Polymers for pH-Responsive, Targeted Drug Delivery to Cancer Cells”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 133, pp. 11850-11853.

SVENSON, S., PRUD’HOMME, R.K., 2012, *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications: Imaging, targeting and delivery*, Springer, 1st edition, New York, USA.

TACHAPRUTINUM, A., PAN-IN, P., SAMUTPRASERT, P., BANLUNARA, W., et al., 2014, “Acrylate-Tethering Drug Carrier: Covalently Linking Carrier to Biological Surface and Application in the Treatment of Helicobacter pylori Infection”, *Biomacromolecules*, v. 15, pp. 4239-4248.

TERAMOTO, N., NIWA, M., SHIBATA, M., 2010, “Synthesis and Properties of Trehalose-based Flexible Polymers Prepared from Difurfurylidene Trehalose and Maleimide-terminated Oligo(dimethylsiloxane) by Diels-Alder Reactions”, *Materials*, v.3, pp. 369-385.

TESTA, L., MANO, M.S., 2011, “Quimioterapia em Câncer de Mama”, *Revista Brasileira de Mastologia*, v., 20, pp. 190-198.

THEATO, P., KLOK, H., 2013, *Functional Polymers by Post-Polymerization Modification*, Wiley-VHC, Weinheim, Germany.

THEISINGER, S., SCHOELLER, K., OSBORN, B., SARKAR, M., 2009, “Encapsulation of a fragrance via miniemulsion polymerization for temperature-controlled release”, *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 210, pp. 411-420.

THERMO SCIENTIFIC, Ellman’s Reagent. Documento 22582. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011216_Ellmans_Reag_UG.pdf>. Acesso em: 18 de abril de 2017.

UHRICH, K, CANNIZZARO, S., LANGER, R., SHAKESHEFF, K., 1999, “Polymeric Systems for controlled drug release”, *Chemical Reviews*, v. 99, pp. 3181-3198.

URBAN, V.M., MACHADO, A.L., VERGANI, C.E., JORGE, E.G., SANTOS, L.P.S., LEITE, E.R., CANEVAROLO, S.V., 2007, “Degree of Conversion and Molecular Weight of One Denture Base and Three Reline Resins Submitted to Post-polymerization Treatments”, *Materials Research*, v. 10, pp. 191-197.

URBANIÁK-DOAMGALA, W., 2012, *The Use of the Spectrometric Technique FTIR-ATR to Examine the Polymer Surface*, In *Advanced Aspects of Spectroscopy*, Intech, Shanghai, China, pp. 85-104.

UYGUN, M., TASDELEN, M.A., YAGCI, Y., 2010, “Influence of Type of Initiation on Thiol–Ene ‘Click’ Chemistry”, *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 211, pp. 103–110.

VAIDYA, A., AGARWAL, A., JAIN, A., AGRAVAL, R., 2011, “Bioconjugation of Polymers: A Novel Platform for Targeted Drug Delivery”, *Current Pharmaceutical Design*, v. 17, pp. 1108-1125.

VAN DER VEN, S., ELIAS, S., CHAN, C., MIAO, Z., et al., 2012, “Optical imaging with her2-targeted affibody molecules can monitor hsp90 treatment response in a breast cancer xenograft mouse model”, *Clinical Cancer Research*, v. 18, pp. 1073-1081.

WAY, D.V., 2011, “Otimização da Produção de Resinas à Base de Poli(metacrilato de metila) para Aplicações Odontológicas”, Projeto Final de Curso, Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

WEISS, C., LANDFESTER, K., 2010, “Miniemulsion Polymerization as a means to encapsulate organic and inorganic materials”, *Advanced Polymer Science*, v. 233, pp. 185-236.

WHITE, A.J., FILISKO, F.E., 1982, “Tacticity determination of poly(methyl methacrylate) (PMMA) by high-resolution NMR”, *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters*, v. 20, pp. 525-529.

WISE, D., 2000, *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Basel, Suíça, CRC Press.

XU, J., BOYER, C., 2015, “Visible Light Photocatalytic Thiol–Ene Reaction: An Elegant Approach for Fast Polymer Postfunctionalization and Step-Growth Polymerization”, *Macromolecules*, v. 48, pp.520-529.

XU, Z., WANG, C., YANG, W., DENG, Y., FU, S., 2004, “Encapsulation of nanosized iron oxide by polyacrylamide via inverse miniemulsion polymerization”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 277, pp. 136-143.

YOKO, Y., KAISHA, C., SHIMOMARUKO, C., et al., 1994, “Styrylcoumarin compound, photosensitive resin composition, and hologram recording medium”, Patente nº EP 0624580 A1.

YOKOYAMA, M., FUKUSHIMA, S., UEHARA, r., OKAMOTO, K., KATAOKA, K., SAKURAI, Y., OKANO, T., 1998, “Characterization of physical entrapment and

chemical conjugation of adriamycin in polymeric micelles and their design for in vivo delivery to a solid tumor”, *Journal of Controlled Release*, v. 50, pp. 79-92.

ZHANG, J., QIU, L., JIN, Y., ZHU, K., 2005, “Thermally responsive polymeric micelles self-assembled by amphiphilic polyphosphazene with poly(*N*isopropylacrylamide) and ethyl glycinate as side groups: Polymer synthesis, characterization, and *in vitro* drug release study”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 76A, Issue 4, pp. 773–780.

ZHANG, X., ZHANG, Y., 2013, “Applications of Azide Based Bioorthogonal Click Chemistry in Glycobiology”, *Molecules*, v.18, pp.7145-7159.

ZHAO, G.L., HAFRÉN, J., DEIANA, L., CÓRDOVA, A., 2010, “Heterogeneous “Organoclick” Derivatization of Polysaccharides: Photochemical Thiol-ene Click Modification of Solid Cellulose”, *Macromolecular Rapid Communications*, v. 31, pp. 740-744.

ZHENZHONG, L., ZHANG, G., LU, W., HUANG, Y., ZHANG, J., CHEN T., 2015, “UV light-initiated RAFT polymerization induced self-assembly”, *Electronic Supplementary Material (ESI) for Polymer Chemistry*, v. 6, pp. 6129-6132.

ZIMMERMAN, J., NICOLAUS, T., NEUERT, G., BLANK, K., 2010, “Thiol-based, site-specific and covalent immobilization of biomolecules for single-molecule experiments”, *Nature Protocols*, v.5, pp. 975-985.

APÊNDICE I

Cálculos das Reações *Click* Propostas

A.1. Cálculo da Seção 3.2.2.1

As massas de cada reagente da Seção 3.2.2.1. (Reação tiol-eno com estireno) foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 10:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010).

Alguns dados que foram necessários para os cálculos:

- MM do MPA – 106,14 g/gmol;
- Densidade do MPA – 1,218 g/mL;
- MM do estireno – 104,15 g/gmol;
- MM do AIBN – 164,21 g/gmol.

Tomando como base 5 mL de MPA:

$$1,218 \text{ g/mL} * 5 \text{ mL} = 6,09 \text{ g de MPA}$$

Número de mols de MPA adicionados:

$$6,09 \text{ g} \text{ ----- } x \text{ mols}$$

$$106,14 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$$

$$x = 0,0574 \text{ mols}$$

Número de moléculas de MPA adicionadas:

$$6 * 10^{23} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$$

$$y \text{ ----- } 0,0574 \text{ mols}$$

$$y = 0,3442 * 10^{23} \text{ moléculas de MPA}$$

Como a proporção tiol-eno deve ser 10:1, foi dividido o número de moléculas de MPA por 10 para obter o número de moléculas necessárias de estireno, que só contém uma instauração. Logo, são necessárias $0,3442 \cdot 10^{22}$ moléculas de estireno.

Além disso, admitiu-se que cerca de 30% de MPA encontrava-se oxidado e que, portanto, não participaria da reação tiol-eno. Essa estimativa foi feita com base na informação de que grupamentos tiol livres costumam reagir entre si dando origem a ligações dissulfeto. Assim, 70% de $0,3442 \cdot 10^{22} = 0,2410 \cdot 10^{22}$ moléculas de estireno.

$$\begin{aligned} 1 \text{ mol} & \text{-----} 6 \cdot 10^{23} \text{ moléculas} \\ z & \text{-----} 0,2410 \cdot 10^{22} \text{ moléculas de estireno} \\ z & = 0,0040 \text{ mols de estireno} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1 \text{ mol} & \text{-----} 104,15 \text{ g} \\ 0,0040 \text{ mol} & \text{----} w \\ w & = 0,4183 \text{ g de estireno} \end{aligned}$$

Como a proporção de iniciador foi de 1:2 em relação ao tiol, tem-se que:

$$0,0574 \text{ mols de tiol} / 2 = 0,0287 \text{ mol de AIBN}$$

$$\begin{aligned} 164,21 \text{ g} & \text{-----} 1 \text{ mol} \\ q & \text{-----} 0,0287 \text{ mols de AIBN} \\ q & = 4,71 \text{ g de AIBN} \end{aligned}$$

Dividindo por dois esse valor de massa porque cada iniciador gera dois radicais livres, tem-se que:

$$\text{Massa de AIBN} = 2,3555 \text{ g}$$

A2. Cálculos da Seção 3.2.2.2

As massas de cada reagente da Seção 3.2.2.2 (Reações tiol-eno com L-cisteína) foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 2:1 e

que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010).

Alguns dados que foram necessários para os cálculos:

- MM da cisteína – 121,16 g/gmol;
- MM do hexadieno – 82,14 g/gmol;
- MM do DVB – 130,19 g/gmol;
- MM do EGDMA – 198,22 g/gmol;
- MM do BPO – 242,21 g/gmol;
- MM do AIBN – 164,21 g/gmol;
- MM do $K_2S_2O_8$ – 270,33 g/gmol.

Primeiramente foi escolhido como base empregar 0,01 mol de cisteína. Dessa maneira, para todas as reações *click* testadas, a massa de cisteína empregada foi de 1,21g.

Partindo desse valor e da informação de que cada molécula de cisteína contém apenas 1 grupamento tiol livre, partiu-se então para a determinação das massas dos compostos vinílicos. Como tanto no hexadieno, como no DVB e no EGDMA há duas insaturações e para cada dupla ligação é necessário haver 2 grupamentos tiol, é necessário adicionar 0,0025 mol de hexadieno, DVB ou EGDMA nas reações.

Dessa maneira:

$$\text{Massa do composto vinílico} = \text{MM do composto vinílico} * 0,0025 \quad (12)$$

- Massa de hexadieno = $82,14 * 0,0025 = 0,205\text{g}$;
- Massa de DVB = $130,19 * 0,0025 = 0,325\text{g}$;
- Massa de EGDMA = $198,22 * 0,0025 = 0,496\text{g}$.

Com relação às massas dos iniciadores, o cálculo é feito, como já mencionado, considerando que é necessário adicionar 0,5 equivalente em relação à cisteína. Portanto, como a cisteína possui apenas 1 grupamento tiol, mas os iniciadores se decompõem gerando 2 radicais livres, deve ser empregado $\frac{1}{4}$ do número de mols de cisteína.

Dessa maneira:

$$\text{Massa de iniciador} = \text{MM do iniciador} * 0,0025 \quad (13)$$

- Massa de BPO = $242,21 * 0,0025 = 0,605\text{g}$;
- Massa de AIBN = $164,21 * 0,0025 = 0,410\text{g}$;
- Massa de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8 = 270,33 * 0,0025 = 0,675\text{g}$.

A3. Cálculos da Seção 3.2.2.3

As massas de cada reagente da Seção 3.2.2.3 (Reações tiol-eno com L-cisteína e ácido ascórbico) foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 5:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010).

Alguns dados que foram necessários para os cálculos:

- MM da L-cisteína – 121,16 g/gmol;
- MM do DVB – 130,19 g/gmol;
- MM do EGDMA – 198,22 g/gmol;
- MM do BPO – 242,21 g/gmol;
- MM do AIBN – 164,21 g/gmol;
- MM do $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ – 270,33 g/gmol.

Usando como base 0,01 mol de L-cisteína e, portanto, 1,21 g de L-cisteína, tem-se que:

$$1 \text{ mol} \text{ ----- } 6 * 10^{23} \text{ moléculas de L-cisteína}$$

$$0,01 \text{ mol} \text{ ----- } x$$

$$x = 6 * 10^{21} \text{ moléculas de L-cisteína}$$

Como a proporção tiol:eno escolhida foi de 5:1, calcula-se que:

Número de moléculas de DVB = $6 * 10^{21} / (2 * 5)$ porque o divinilbenzeno tem duas insaturações. Logo,

$$6 \cdot 10^{20} \text{ ----- } x \text{ ----- } y$$

$$6 \cdot 10^{23} \text{ ----- } 1 \text{ mol ----- } 130,19 \text{ g}$$

$$y = 0,1302 \text{ g de DVB}$$

O mesmo raciocínio deve ser feito para os EGDMA, logo:

$$6 \cdot 10^{20} \text{ ----- } x \text{ ----- } y$$

$$6 \cdot 10^{23} \text{ ----- } 1 \text{ mol ----- } 198,22 \text{ g}$$

$$y = 0,1982 \text{ g de DVB}$$

As massas dos iniciadores são as mesmas da Seção 3.2.2. porque os cálculos são feitos com base na L-cisteína, cuja massa é a mesma da seção citada.

A4. Cálculos da Seção 3.2.2.5

As massas de cada reagente da Seção 3.2.2.5 (Reações tiol-eno com cloridrato de cisteína (Cis-Cl)) foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 4:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010).

Alguns dados que foram necessários para os cálculos:

- MM da Cis-Cl – 157,61 g/gmol;
- MM do EGDMA – 198,22 g/gmol;
- MM do AIBN – 164,21 g/gmol;
- MM do $K_2S_2O_8$ – 270,33 g/gmol.

Usando como base 0,01 mol de cloridrato de cisteína, portanto, 1,57 g de cloridrato de cisteína, tem-se que:

$$1 \text{ mol ----- } 6 \cdot 10^{23} \text{ moléculas de cloridrato de cisteína}$$

$$0,01 \text{ mol ----- } x$$

$$x = 6 \cdot 10^{21} \text{ moléculas de L-cisteína}$$

Como a proporção tiol:eno escolhida foi de 4:1, calcula-se que:

Número de moléculas de EGDMA = $6 \cdot 10^{21} / (2 \cdot 4)$ porque o EGDMA tem duas insaturações. Logo,

$$7,5 \cdot 10^{20} \text{ ----- } x \text{ ----- } y$$

$$6 \cdot 10^{23} \text{ ----- } 1 \text{ mol ----- } 198,22 \text{ g}$$

$$y = 0,25 \text{ g de EGDMA}$$

A proporção de iniciador em relação ao tiol foi de 0,5 equivalente. Como há $6 \cdot 10^{21}$ moléculas de L-cisteína, dividindo por 2 tem-se o número de moléculas de cada iniciador a ser empregado.

$$3 \cdot 10^{21} \text{ moléculas de AIBN ----- } w$$

$$6 \cdot 10^{23} \text{ moléculas AIBN ----- } 164,21 \text{ g}$$

$$w = 0,82 \text{ g de AIBN}$$

$$3 \cdot 10^{21} \text{ moléculas de } K_2S_2O_8 \text{ ----- } q$$

$$6 \cdot 10^{23} \text{ moléculas de } K_2S_2O_8 \text{ ----- } 270,33 \text{ g}$$

$$q = 1,35 \text{ g de } K_2S_2O_8$$

A5. Cálculos da Seção 3.2.2.6

As massas de cada reagente da Seção 3.2.2.6 (Reações tiol-eno com ácido-3-mercaptopropiônico) foram calculadas seguindo a indicação de que a proporção tiol-eno deveria ser de 10:1 e que seriam necessários 0,5 equivalente de iniciador em relação ao grupamento tiol (CAMPOS *et al.*, 2008; KOO *et al.*, 2010).

Alguns dados que foram necessários para os cálculos:

- Mw do polímero – 497252 g/gmol;
- MM do MPA – 106,14 g/gmol;
- MMA do AIBN – 164,21 g/gmol.

Usando como base o valor de 0,2 g de polímero, tem-se que:

$$497252 \text{ g} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \text{ ----- } 6 \cdot 10^{23} \text{ moléculas}$$

$$0,2 \text{ g} \text{ ----- } x \text{ mols} \text{ ----- } y \text{ moléculas}$$

$$y = 2,4 \cdot 10^{17} \text{ moléculas de polímero}$$

Supondo que teria apenas uma dupla pendente em cada cadeia e usando a proporção tiol:eno de 10:1, tem-se que:

$$2,4 \cdot 10^{17} * 10 = 2,4 \cdot 10^{18} \text{ moléculas de tiol}$$

$$6 \cdot 10^{23} \text{ moléculas} \text{ ----- } 1 \text{ mol} \text{ ----- } 106,14 \text{ g}$$

$$2,4 \cdot 10^{18} \text{ moléculas} \text{ ----- } x \text{ mols} \text{ ----- } y \text{ g}$$

$$y = 0,00042 \text{ g de MPA}$$

Como a proporção de iniciador nesse caso foi de 1:2 em relação ao tiol, a massa de AIBN calculada é:

$$2,4 \cdot 10^{18} / 2 = 1,2 \cdot 10^{18} \text{ moléculas de AIBN}$$

$$1,2 \cdot 10^{18} \text{ moléculas} \text{ ----- } z$$

$$6 \cdot 10^{23} \text{ moléculas} \text{ ----- } 164,21 \text{ g}$$

$$z = 0,00032 \text{ g de AIBN}$$

APÊNDICE II

Gráficos das Correlações entre as Reações do Capítulo IV

A seguir são apresentados os gráficos das correlações entre os produtos das reações apresentadas no Capítulo IV.

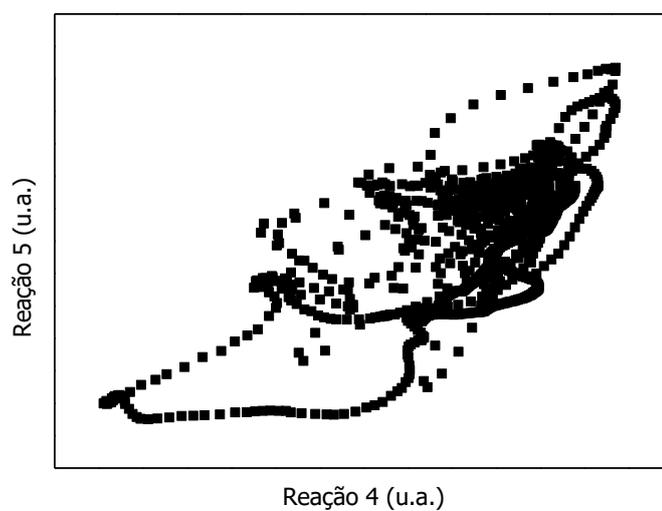


Figura 87 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 4 e 5.

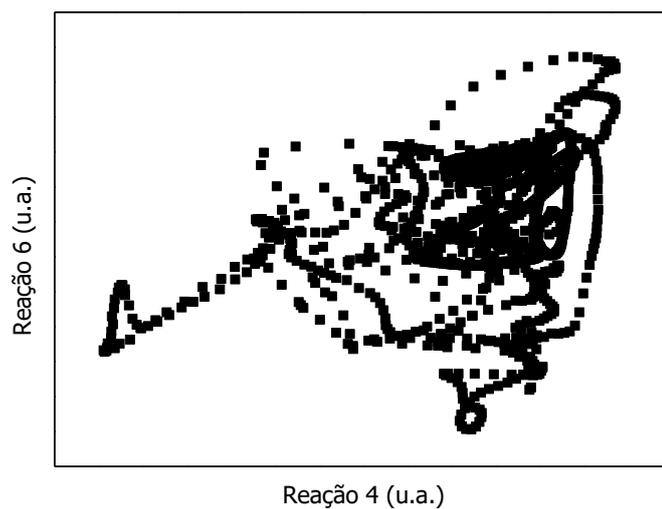


Figura 88 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 4 e 6.

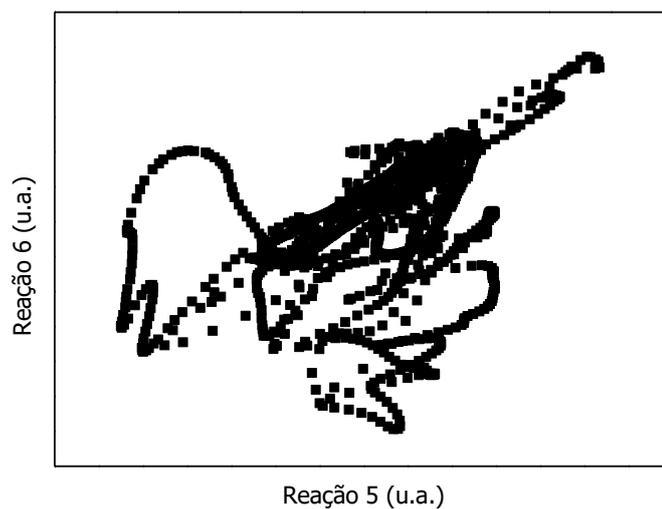


Figura 89 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 5 e 6.

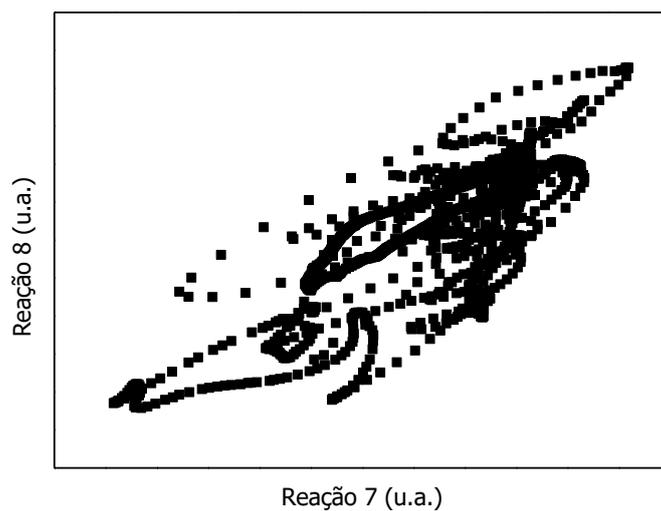


Figura 90 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 7 e 8.

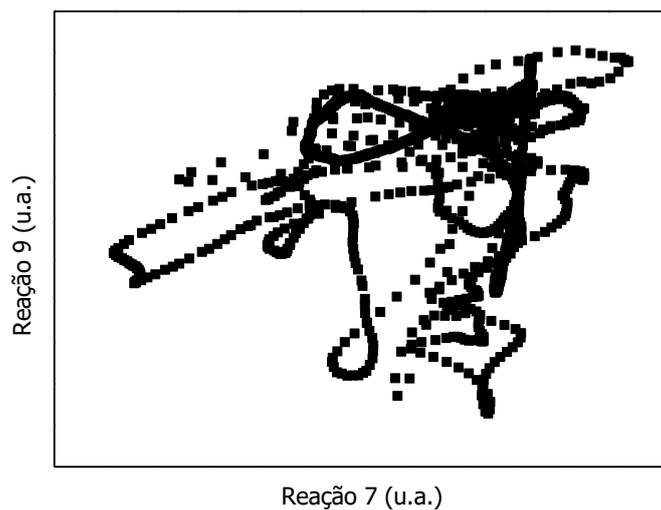


Figura 91 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 7 e 9.

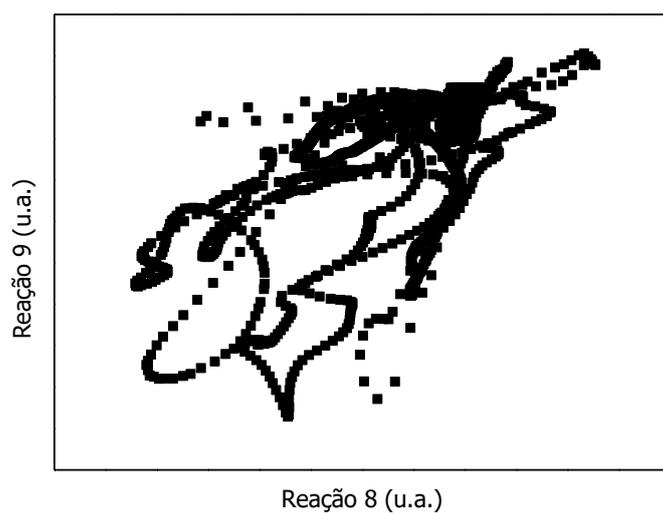


Figura 92 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 8 e 9.

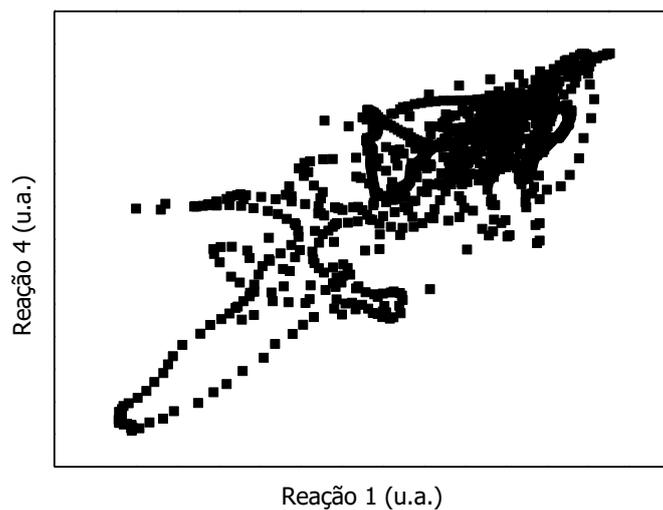


Figura 93 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 1 e 4.

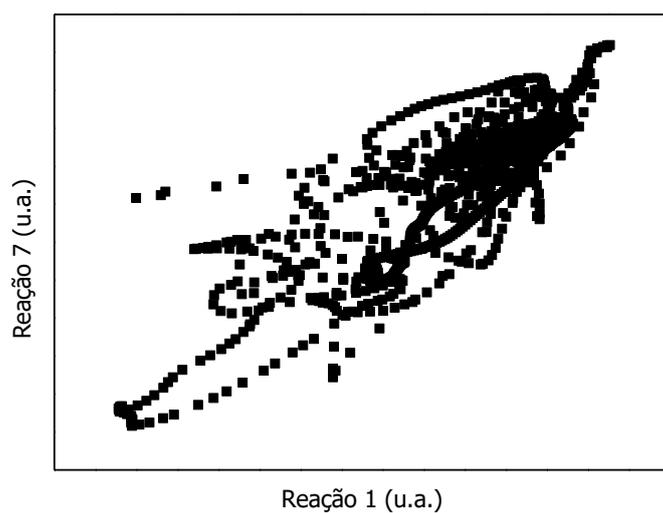


Figura 94 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 1 e 7.

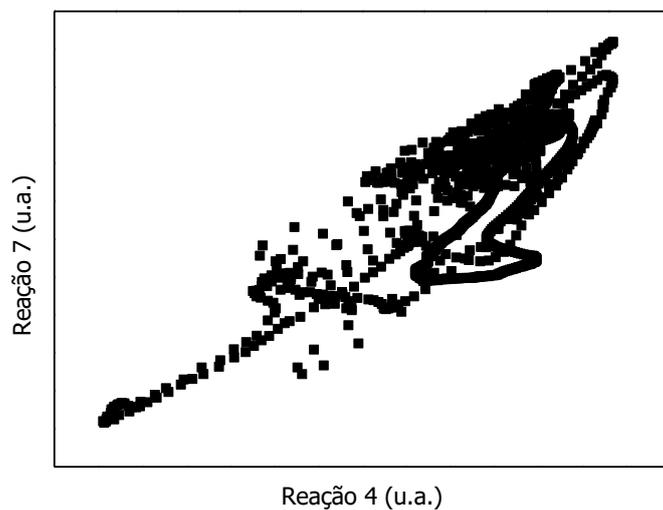


Figura 95 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 4 e 7.

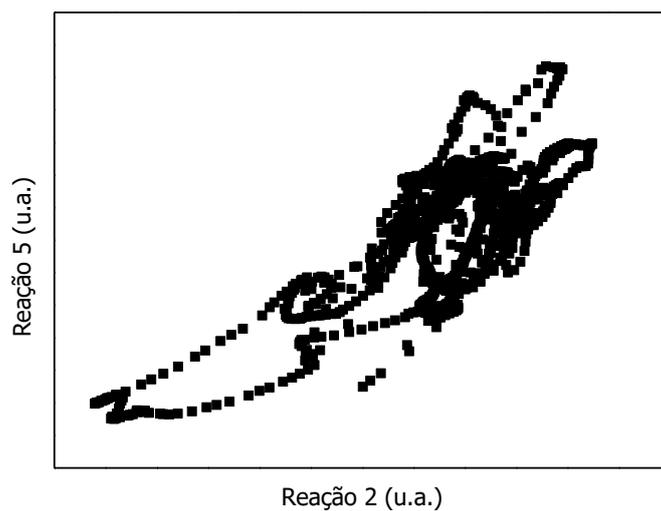


Figura 96 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 2 e 5.

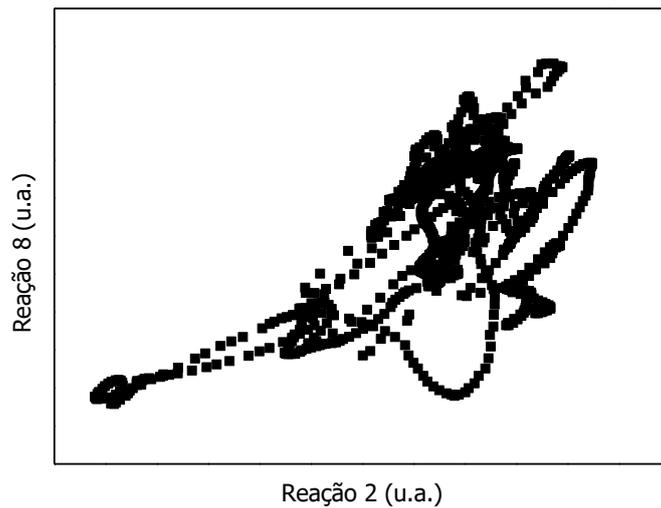


Figura 97 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 2 e 8.

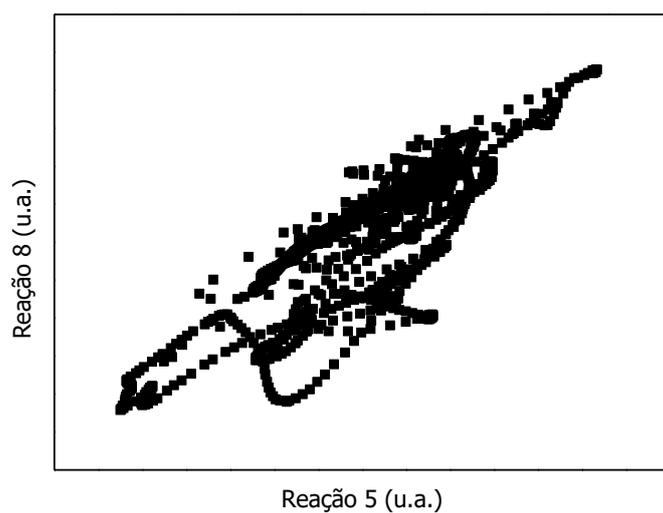


Figura 98 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 5 e 8.

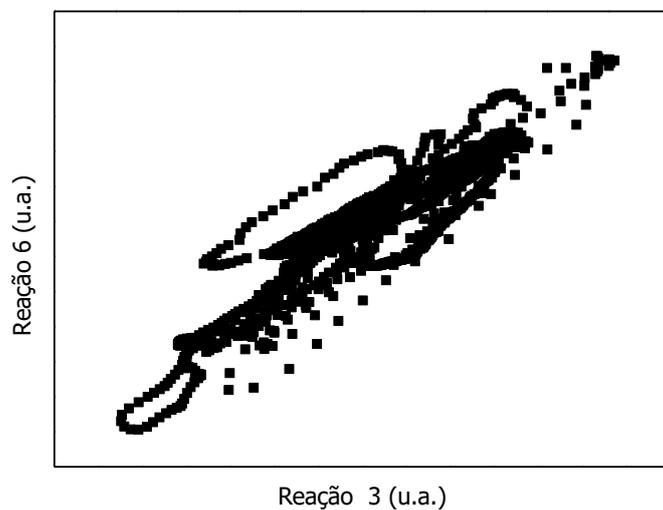


Figura 99 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 3 e 6.

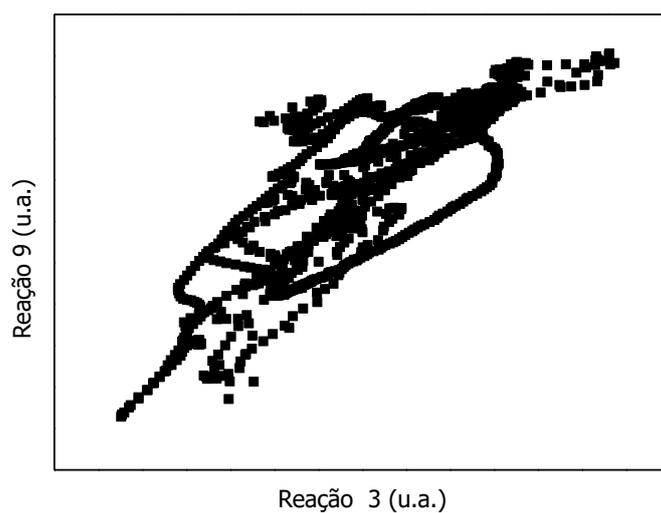


Figura 100 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 3 e 9.

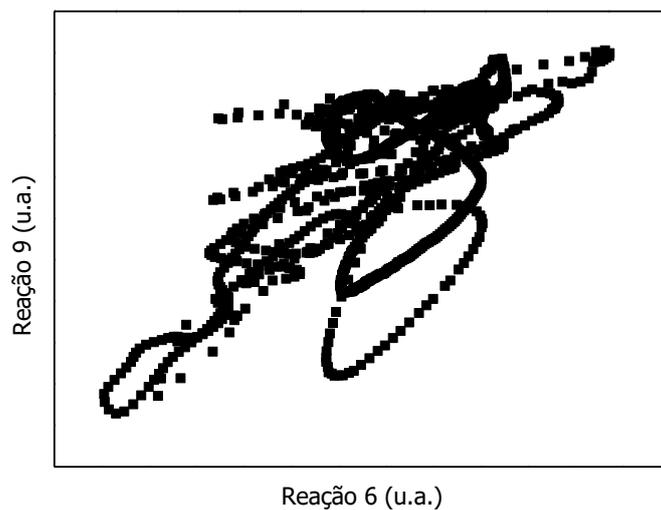


Figura 101 – Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 6 e 9.

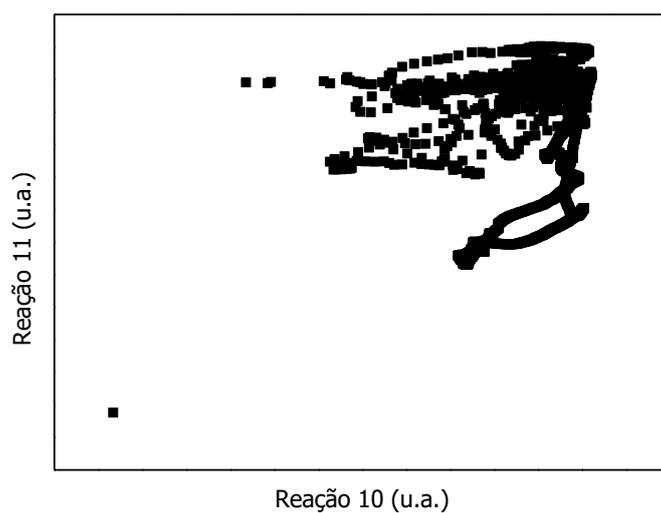


Figura 102 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 10 e 11.

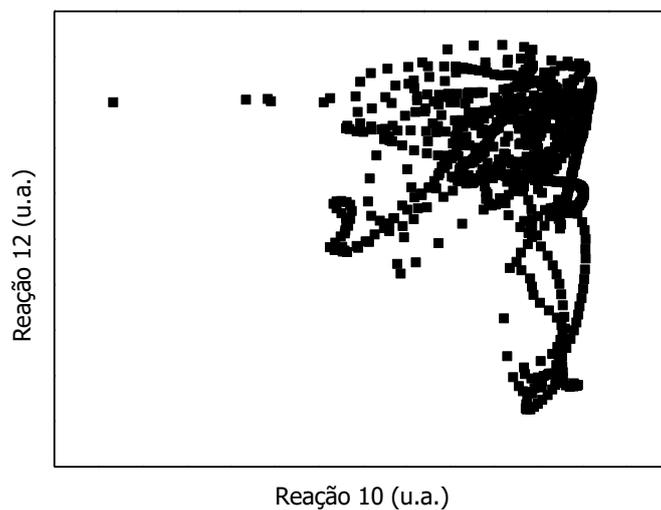


Figura 103 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 10 e 12.

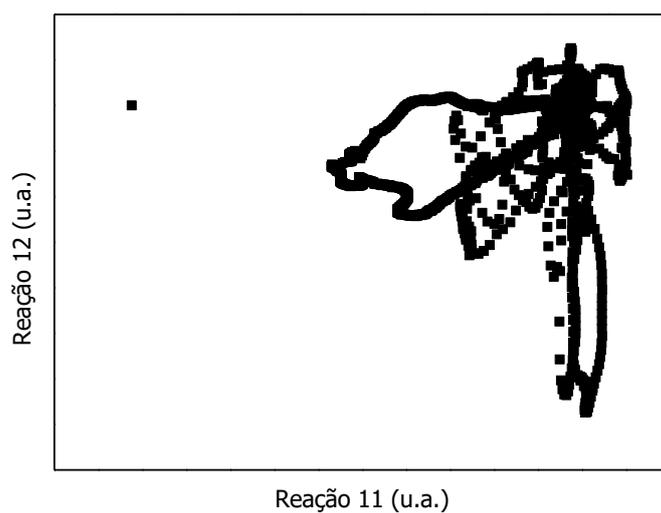


Figura 104 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 11 e 12.

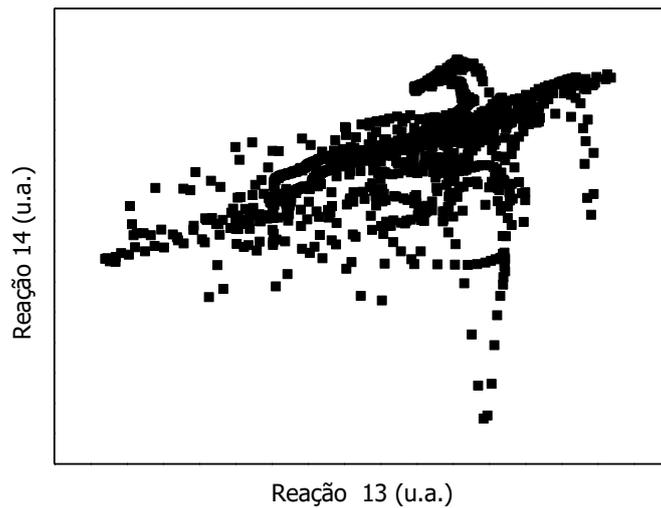


Figura 105 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 13 e 14.

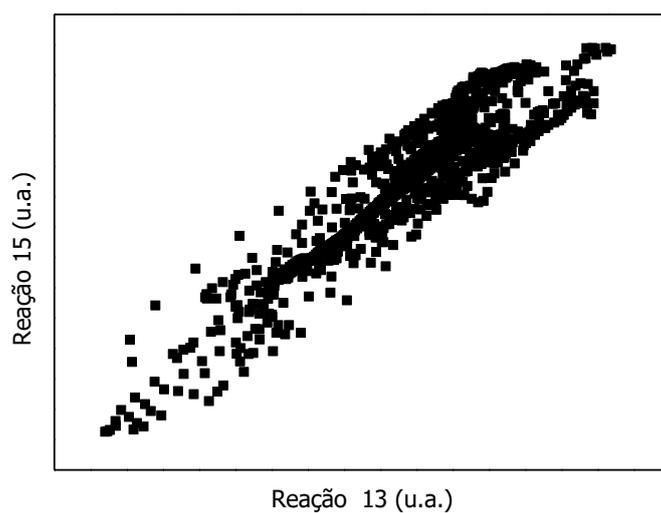


Figura 106 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 13 e 15.

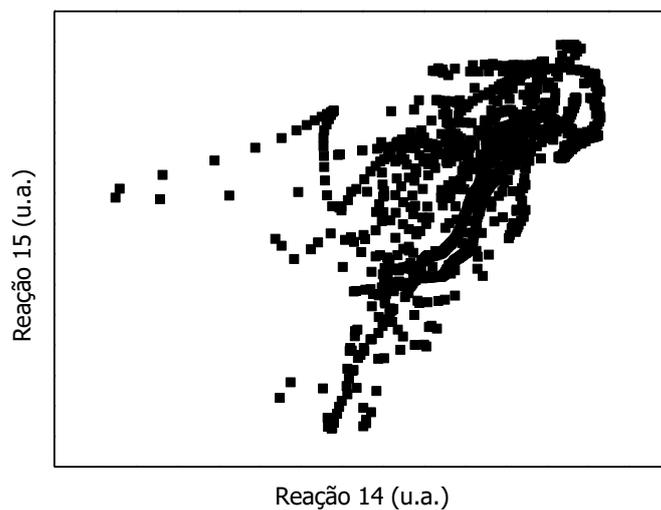


Figura 107 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 14 e 15.

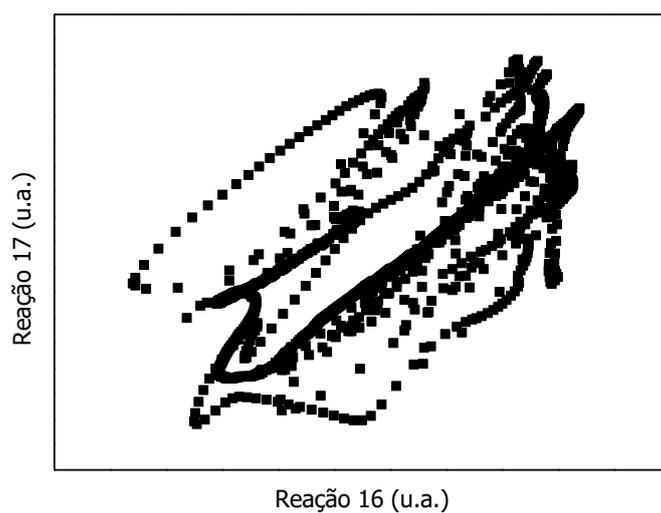


Figura 108 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 16 e 17.

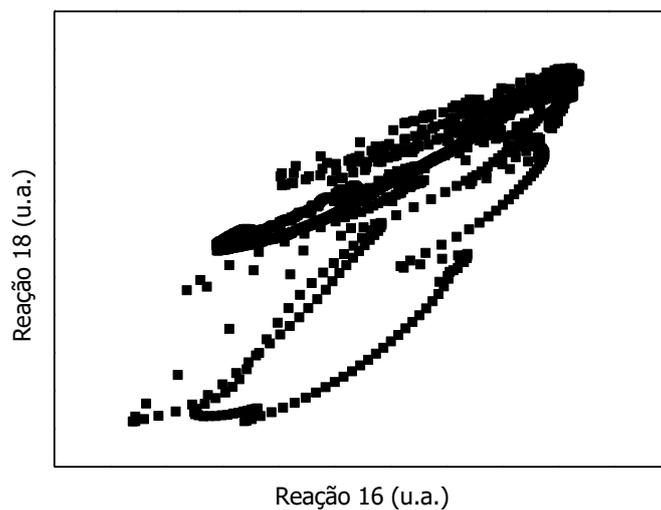


Figura 109 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 16 e 18.

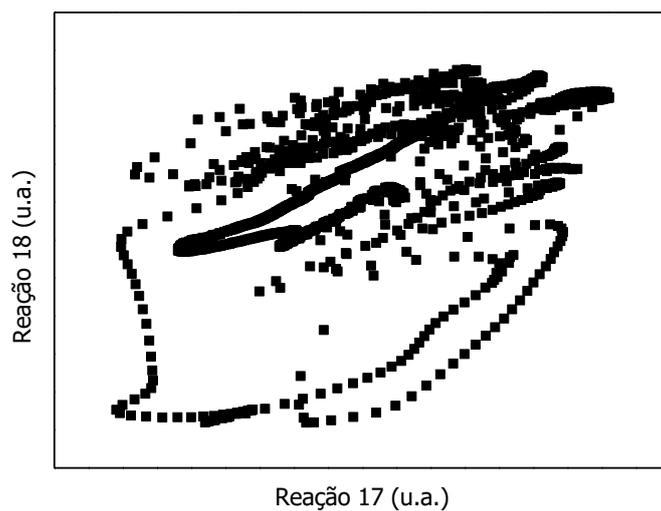


Figura 110 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 17 e 18.

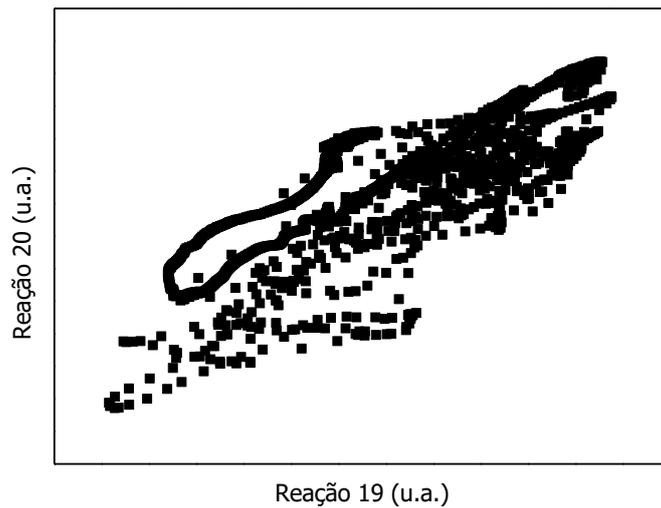


Figura 111 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 19 e 20.

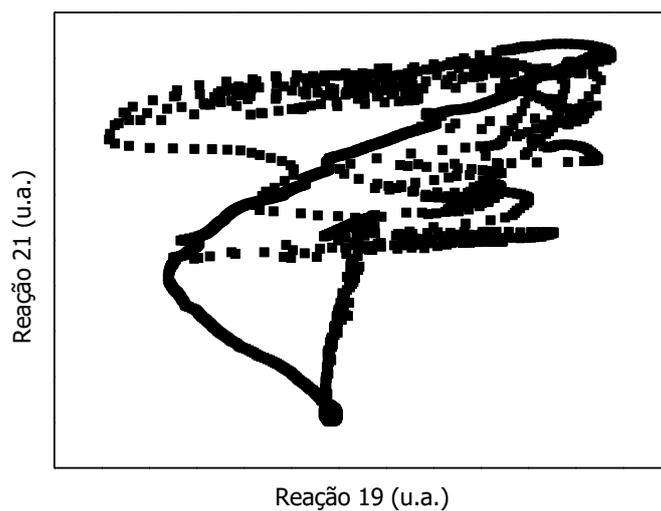


Figura 112 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 19 e 21.



Figura 113 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 20 e 21.

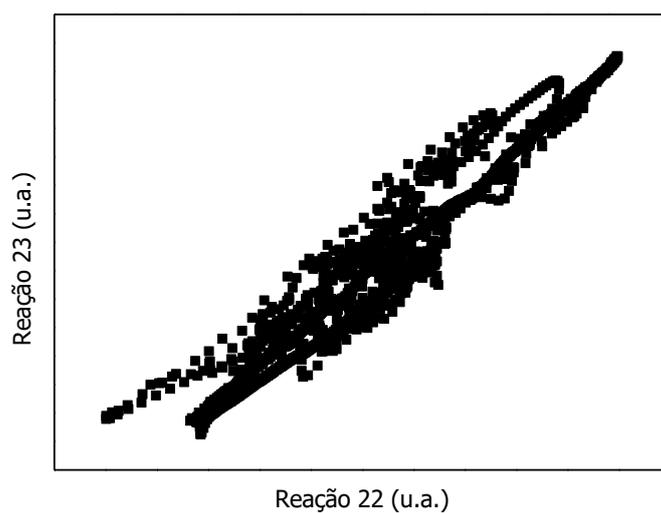


Figura 114 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 22 e 23.

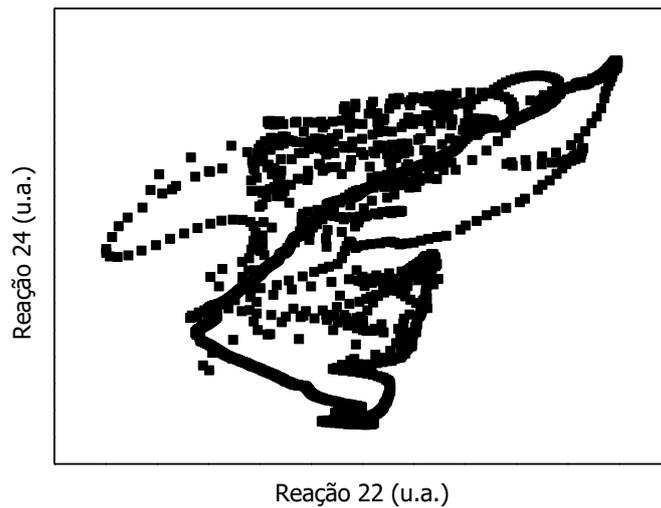


Figura 115 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 22 e 24.



Figura 116 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 23 e 24.



Figura 117 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 25 e 26.

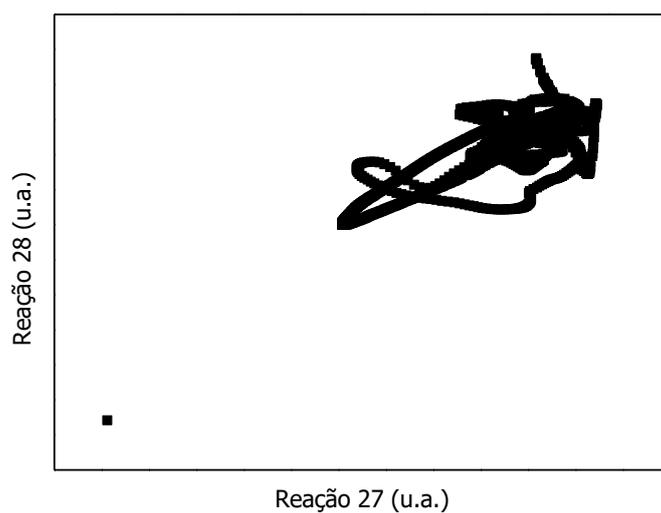


Figura 118 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações 27 e 28.

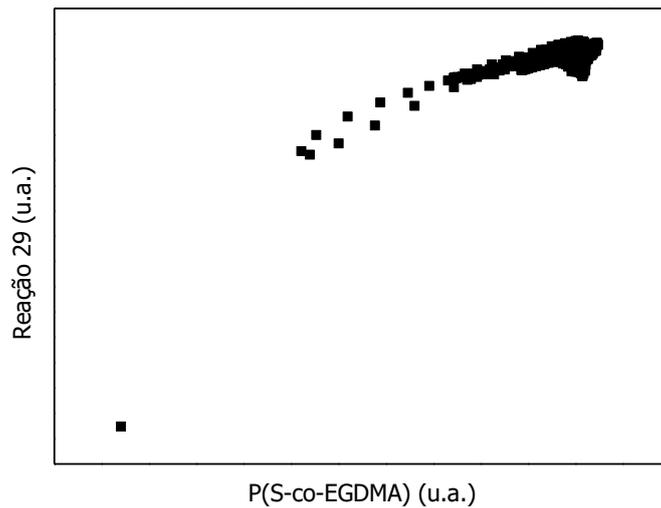


Figura 119 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações P(S-co-EGDMA) e da reação 29.

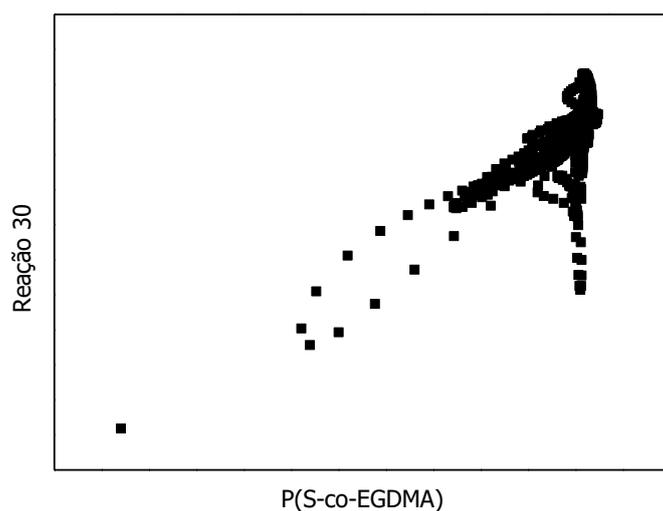


Figura 120 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações P(S-co-EGDMA) e da reação 30.

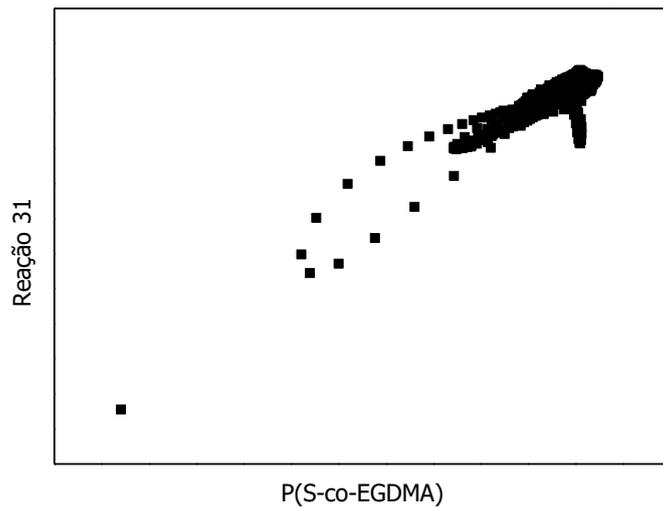


Figura 121 - Correlação entre os valores de transmitância obtidos nas análises de FTIR dos produtos das reações P(S-co-EGDMA) e da reação 31.

APÊNDICE III

Cromatogramas de GPC dos produtos das reações conduzidas no Capítulo VII

A seguir são apresentados os cromatogramas de GPC dos produtos obtidos nas reações apresentadas no Capítulo VII.

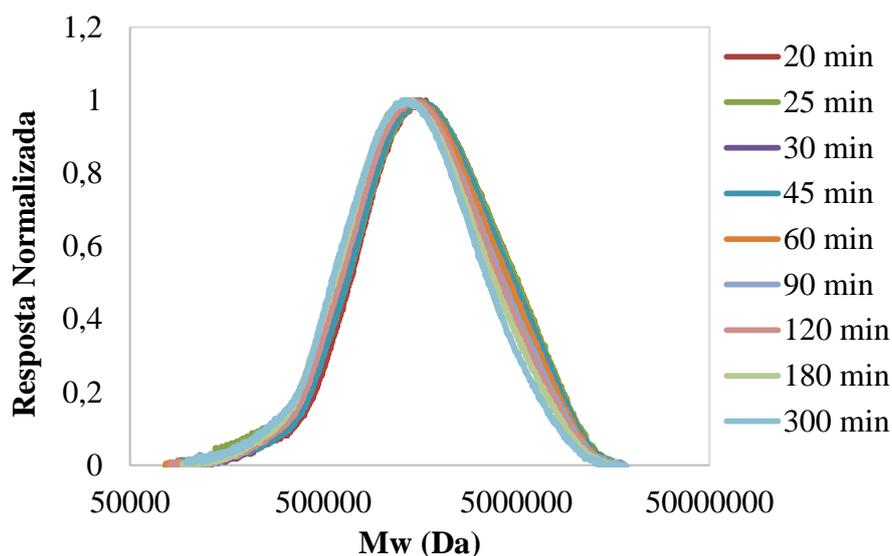


Figura 122 – Cromatograma de GPC do produto da reação R1.

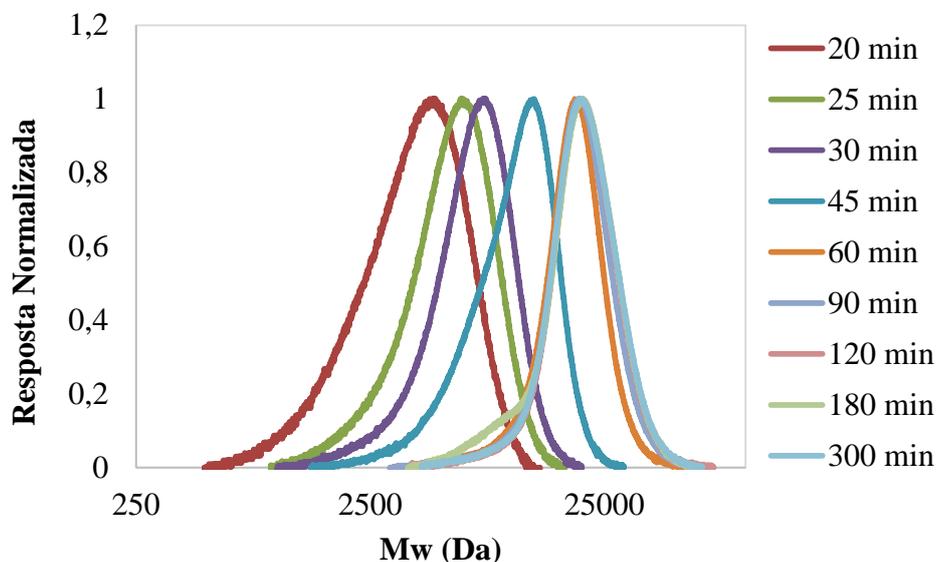


Figura 123 – Cromatograma de GPC do produto da reação R2.

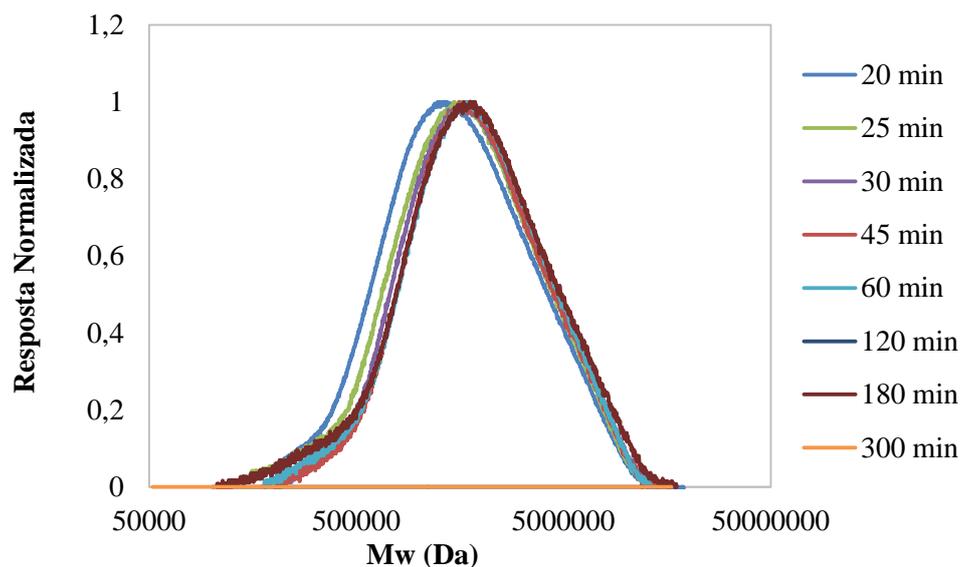


Figura 124 – Cromatograma de GPC do produto da reação R3.

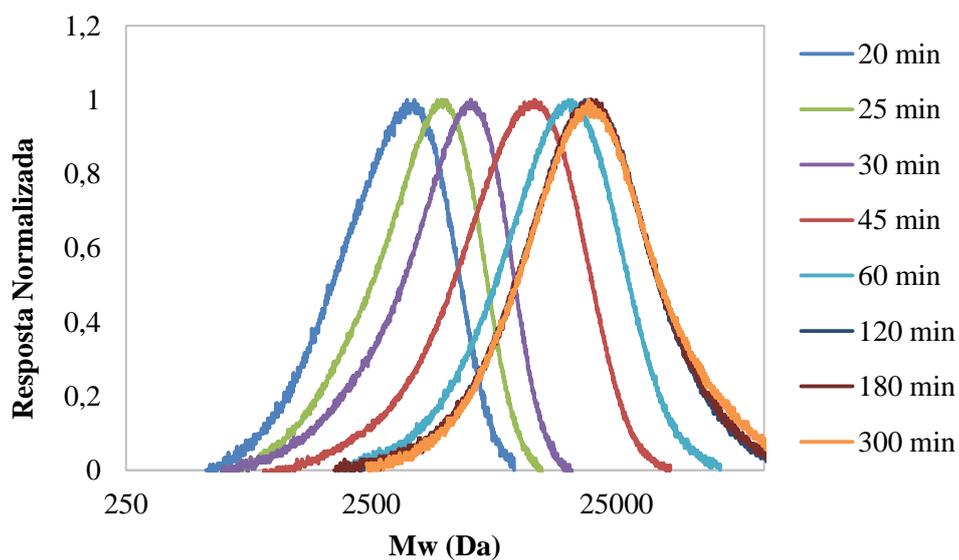


Figura 125 – Cromatograma de GPC do produto da reação R4.

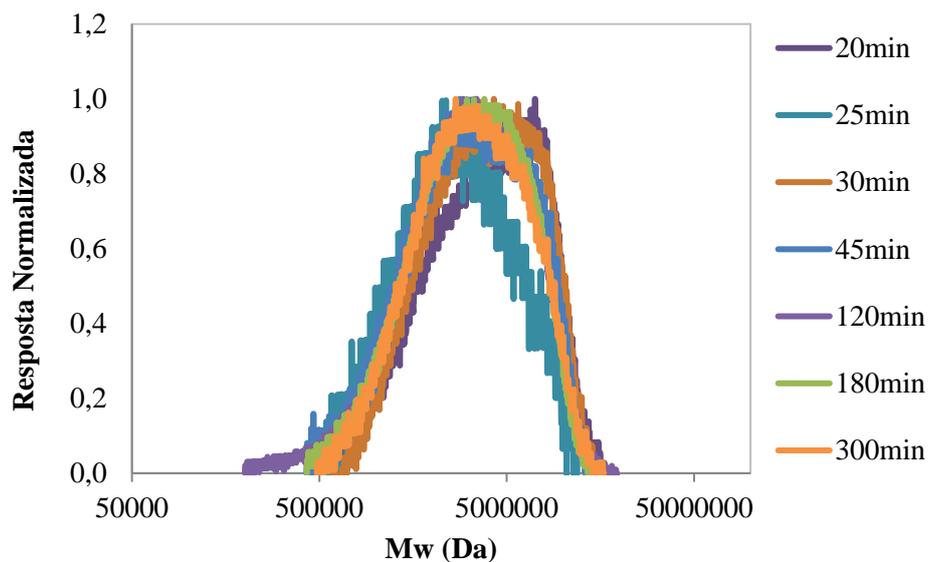


Figura 126 – Cromatograma de GPC do produto da reação R5.

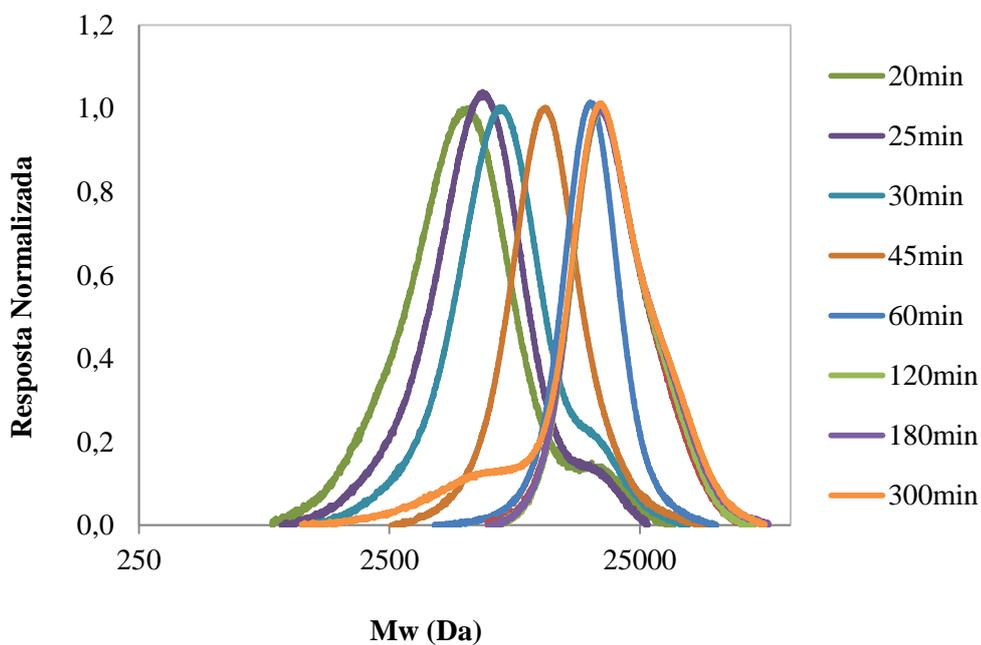


Figura 127 – Cromatograma de GPC do produto da reação R6.