



Joana Serra e Moura Pacheco Mendes

Síntese de hidrogéis de base acrílica recorrendo a técnicas
de polimerização radicalar viva.
Potencial aplicação como fármacos poliméricos.

Dissertação na área científica de Engenharia Química, orientada pelo Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho, pelo Doutor Arménio Coimbra Serra e pela Mestre Patrícia Vitorino Mendonça apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Serra e Moura Pacheco Mendes

Síntese de hidrogéis de base acrílica recorrendo a técnicas
de polimerização radicalar viva.
Potencial aplicação como fármacos poliméricos.

Dissertação na área científica de Engenharia Química, orientada pelo Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho, pelo Doutor Arménio Coimbra Serra e pela Mestre Patrícia Vitorino Mendonça apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

É um sempre uma mais valia aprender com especialistas. Assim, agradeço desde já ao Professor Doutor Jorge Coelho e ao Professor Doutor Arménio Serra, que me orientaram neste trabalho.

Um agradecimento muito especial à Mestre Patrícia Mendonça pela paciência, incansável disponibilidade, apoio, dedicação, e por todo o conhecimento transmitido, vital à realização das minhas tarefas.

Agradeço também a todos os membros do laboratório de polímeros do Departamento de Engenharia Química pela forma como me receberam, pelo ambiente fantástico que proporcionaram e por estarem sempre disponíveis a ajudar.

Para finalizar, e não esquecendo os que me são próximos, um Muito Obrigado a toda a minha família e amigos pelo apoio e paciência que demonstraram nestes últimos meses.

MOTIVAÇÃO

Os métodos de polimerização radicalar viva (LRP) têm emergido nos últimos anos como estratégias para a obtenção de novos polímeros, nomeadamente quando se pretendem materiais com controlo sobre a estrutura molecular do polímero, a composição, a arquitetura, o peso molecular e a polidispersidade. Em LRP as cadeias poliméricas do polímero produzido têm ainda sempre presente um grupo ativo na terminação da cadeia, o que possibilita que seja facilmente reiniciado com adição de monómero, ou funcionalizado com grupos finais específicos. Deste modo, atualmente é possível sintetizar novos materiais por via radicalar, que de alguma forma apresentem características e propriedades mais adequadas à função a que se destinam.

Os agentes sequestradores de ácidos biliares (BAS) são fármacos poliméricos constituídos por hidrogéis catiónicos que são capazes de se ligarem aos ácidos biliares presentes no intestino, a fim de impedir a sua reabsorção para o fígado. Atualmente estão disponíveis no mercado três tipos de agentes BAS a *Colestyramine*, o *Colestipol* e o *Colesevelam*. O processo de produção destes fármacos envolve a formação de um polímero, por polimerização radicalar livre, a sua reticulação para formar um hidrogel e, em certos casos, a alquilação que transforma os grupos NH_2 , presentes nas cadeias, por aminas quaternárias, para induzir a carga positiva para sequestrar os ácidos biliares. Tendo em conta a estrutura química dos ácidos biliares presentes no organismo (núcleo hidrofóbico e segmento hidrofílico com propriedades aniónicas no pH do intestino), a síntese de um BAS tem de ter em conta um balanço entre as cargas catiónicas (que asseguram as interações electrostáticas), os segmentos hidrofóbicos (que estabilizam o hidrogel e asseguram as interações hidrofóbicas) e a parte hidrofílica e grau de reticulação (que asseguram as características de inchaço adequadas). Uma desvantagem dos materiais utilizados como fármacos poliméricos é muitas vezes a sua baixa eficiência terapêutica, pois são necessárias elevadas doses de fármaco para produzir os efeitos desejáveis.

O *Colesevelam* é, de entre os fármacos comerciais, o mais utilizado como BAS. A base polimérica é sintetizada com recurso a técnicas de polimerização radicalar livre, onde não há qualquer controlo sobre a estrutura molecular do polímero, a composição, a arquitetura, o peso molecular e o índice de polidispersidade. Sabe-se que a estrutura destes materiais está intimamente ligada à sua eficiência terapêutica. É neste âmbito que surge a motivação deste trabalho, a síntese de hidrogéis, recorrendo a técnicas de polimerização radicalar viva. Deste modo, será possível desenvolver polímeros com estrutura controlada, que poderão conduzir ao desenvolvimento de materiais mais eficientes para a aplicação em causa e assim analisar a influência da estrutura do polímero no desempenho do BAS.

ABSTRACT

The main goal of this work was the synthesis of hydrogels by living radical polymerization for pharmaceutical applications, namely bile acid sequestrants. To accomplish that, the work was focused in the living radical polymerization use of different polymer backbones that could act as bile acids sequestrants. In addition, it was intended to study their properties and test their cross-linking ability in order to produce hydrogels that can substitute the current commercially available bile acid sequestrant agents, namely the *Colesevelam*.

The first step of this work was focused on the synthesis of the poly(allylamine) hydrochloride, which is the polymer back bone of *Colesevelam*, — by free radical polymerization. The methodology adopted was based on the procedures described in the patent of the commercial bile acid sequestrant. However, it was not possible to reproduce the results reported in the patent, since the final product obtained was an oil and not a powder form. In order to figure out the real procedure, different experimental conditions were studied, such as the increase of the reaction temperature and the addition of a different initiator with a smaller half-life than that indicated in the patent. In the case where only the initiator was changed, no modification of the polymer final form was observed. On the other hand, for the reaction at higher temperature (80 °C) it was possible to obtain polymer in powder form, as described in the patent. The cross-linking of the synthesized polymers was tested by using epichlorohydrin, 1,4-butanediol diglycidyl ether and 1,2- ethanediol diglycidyl ether as cross-linking agents, as indicated in the patent. However, once again, it was not possible to reproduce the results reported. For this reason new experiments were performed using higher amounts of cross-linking agents (975%), leading to the formation of a hydrogel just in one of the studied formulations.

Concerning the living radical polymerization, three different monomers (hydroxyethyl acrylate, hydroxyethyl methacrylate and allylamine) were tested as candidates for the preparation of new bile acid sequestrants backbones. The catalytic system used was Fe(0)/CuBr₂/Me₆TREN, which was developed in the Department of Chemical Engineering of the University of Coimbra (DEQ-FCTUC). Due to the low polydispersity obtained for poly(hydroxyethyl methacrylate) and the fact that this polymer is widely used biomedical applications because of its high biocompatibility, kinetic studies were carried out using different reaction conditions. For the systems studied it was possible to achieve good control over polymers molecular weight, in reaction at room temperature. The results obtained suggest that the catalytic system developed in DEQ-FCTUC is suitable for the controlled polymerization of water-soluble monomers that are good candidates for bile acid sequestrant polymers production.

RESUMO

Este trabalho teve como tema principal a síntese de hidrogéis com base em técnicas de polimerização radicalar viva, para possíveis formulações de fármacos sequestradores de ácidos biliares. Assim, o objetivo deste trabalho focou-se na síntese por polimerização radicalar viva de polímeros que pudessem ser usados como sequestradores de ácidos biliares, estudar as propriedades dos polímeros resultantes e testar a sua reticulação para formulações de hidrogéis que substituam os atuais agentes sequestradores de ácidos biliares, nomeadamente o *Colesevelam*.

A primeira etapa do trabalho centrou-se na síntese do polímero que está na base do *Colesevelam*, a polialilamina, por polimerização radicalar livre. A metodologia adoptada para este fim teve por base os procedimentos descritos na patente do *Colesevelam*. No entanto, não foi possível reproduzir os resultados da patente em termos de forma do polímero final, obtendo-se um óleo em vez de um produto em pó. Assim, foram estudadas algumas alternativas ao nível das condições operatórias, como o aumento de temperatura de reação e a adição de um iniciador com menor tempo de meia vida que o indicado na patente. No processo em que se simulou apenas a substituição do iniciador, não houve alterações na forma de obtenção do polímero final. No entanto, para a reação a elevada temperatura (80 °C) verificou-se a obtenção de um polímero em pó, tal como descrito na patente do *Colesevelam*. Para todos polímeros produzidos testou-se a reticulação com epícloridrina, com éter diglicídico do 1,4-butanodiol e com éter diglicídico do 1,2-etanodiol tal como indica a patente mas, mais uma vez, não foi possível obter os mesmos resultados. Assim fizeram-se novos testes de reticulação para grandes quantidades de agente (975 %), obtendo-se um hidrogel apenas para uma das formulações.

No que respeita à polimerização radicalar viva, utilizou-se o sistema catalítico Fe(0)/CuBr₂/Me₆TREN desenvolvido nos laboratórios do DEQ/FCTUC, na polimerização de três monómeros (o hidroxietil acrilato, o hidroxietilo metacrilato e a alilamina) como possíveis candidatos a substitutos do *Colesevelam*. Uma vez que se obtiveram baixas polidispersividades para o poli (hidroxietil metacrilato), e sendo este amplamente usado em aplicações biomédicas devido à sua alta biocompatibilidade, efetuou-se um estudo cinético da reação de polimerização usando diferentes condições de reação. Para os sistemas estudados obteve-se controlo sobre o crescimento das cadeias do polímero em reações ocorridas à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos sugerem que o sistema catalítico desenvolvido nos laboratórios DEQ/FCTUC é adequado à polimerização controlada de monómeros solúveis em água, conduzindo à síntese de polímeros a serem usados como sequestradores de ácidos biliares.

LISTA DE SIGLAS

AAPH	Azobis(amino propano dihidrocloro)
AIA	Alilamina
ANT	Akzo Nobel Trigonox ® 187 w-40
ARGET	Activators regenerated by electron transfer - Ativadores regenerados por transferência de eletrão
ATRP	Atom transfer radical polymerization – Polimerização radicalar por transferência de átomo
BAS	Sequestrador de ácidos biliares
D ₂ O	Água deuterada
d ₆ DMSO	Dimetil sulfóxido deuterado
DCT	Iodine transfer polymerization – polimerização por transferência de átomo de iodo
DEQ/FCTUC	Departamento de Engenharia Química/Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
DMF	Dimetil formamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DP	Degree of polymerization - Grau de polimerização
DV	Viscosímetro diferencial
EBiB	Etil α -bromoisobutirato
FRP	Free radical polymerization - Polimerização radicalar livre
GPG	Gel permeation chromatography – cromatografia de permeação em gel
HEA	Hidroxietil acrilato
HEMA	Hidroxietilo metacrilato
k _a	Constante de velocidade de ativação
k _d	Constante de velocidade de desativação
k _{ex}	Constante de velocidade de transferência de cadeia degenerativa
k _p	Constante de velocidade de de propagação
k _t	Constante de velocidade de de terminação
LRP	Living radical polymerization - Polimerização radicalar viva
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry
Me ₆ TREN	Tris[2-(dimetilamino)etil]amina
M _n	Peso molecular médio numérico [g/mol]
M _n ^{GPC}	Peso molecular médio numérico determinado por cromatografia permeação em gel [g/mol]
M _n ^{teórico}	Peso molecular médio numérico teórico [g/mol]
M _w	Peso molecular médio ponderal [g/mol]
M _w /M _n	Polidispersividade
PAIA	Poli(alilamina)
PAIAH	Poli (clorohidrato alilamina)
PDI	Índice de polidispersividade
PHEA	Poli hidroxietil acrilato
PHEMA	Poli hidroxietil metacrilato
PRE	Persistent radical effect - efeito do radical persistente
RAFT	Reversible addition-fragmentation chain transfer – transferência de cadeia reversível por adição-fragmentação
RALLS	Right-angle laser-light scattering
RI	Índice de refração
RITP	Reverse iodine transfer polymerization – polimerização reversível por transferência de átomo de iodo
RMN	Ressonância magnética nuclear
SFRP	Stable Free Radical Polymerization - Polimerização radicalar por radical estável
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidiny-1-oxy
TREN	Tris (2-aminoetil)amina
UV -Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visível

INDÍCE

AGRADECIMENTOS.....	II
MOTIVAÇÃO.....	III
ABSTRACT.....	IV
RESUMO.....	V
LISTA DE SIGLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
Secção I - Introdução.....	11
1.1. Polímeros.....	12
1.2. Reações de polimerização - conceitos genéricos.....	13
1.3. Polimerização Radicalar Livre (FRP).....	15
1.4. Polimerização Radicalar Viva (LRP).....	16
1.4.1. Técnicas de LRP.....	18
• ATRP - Atom Transfer Radical Polymerization.....	19
• SFRP - Stable Free Radical Polymerization.....	20
• RAFT.....	21
• DCT.....	23
1.4.2. Avaliação do carácter “vivo” dos polímeros preparados por LRP.....	23
1.5. Hidrogéis.....	24
Secção II - Parte Experimental.....	29
2.1. Materiais.....	30
2.2. Técnicas.....	30
2.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	30
2.2.2. GPC/SEC - Gel Permeation Chromatography / Size Exclusion Chromatography.....	32
2.2.3. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS).....	33
2.3. Procedimentos experimentais.....	34
2.3.1. Síntese do <i>Colesevelam</i> por FRP.....	34
2.3.2. Exemplo de polimerização radicalar viva de PHEMA catalisada por $Fe_0/CuBr_2/Me_6TREN=1/0,1/1,1$ (DP = 222).....	35
2.3.3. Purificação de monómeros (HEA e HEMA).....	36
2.3.4. Síntese de Me_6TREN	37
2.3.5. Cinética PHEMA.....	37
2.3.6. Reiniciação ou copolimerização.....	38

2.3.7. Síntese de hidrogéis.....	38
• Reticulação com epiclorigrina.....	39
• Reticulação com éter diglicídico do 1,4-butanodiol.....	39
• Reticulação com éter diglicídico do 1,2-etanodiol.....	39
2.3.8. Testes de Inchaço (Swelling)	40
• Preparação da solução tampão fosfato a pH 6.....	40
Secção III - Resultados e Discussão	41
3.1. Polimerização radicalar livre – Colesevelam.	42
3.2. Polimerização radicalar viva (LRP)	45
3.2.1. Síntese de PHEA, PHEMA e PAIA por LRP.....	46
3.2.2. Estudo cinético da LRP catalisada por metais de PHEMA	56
• Estudo cinético de reação típica de LRP de HEMA. $V_{0\text{HEMA}}/V_{\text{DMSO}} = 2/1$, DP = 222 e Me_6TREN como ligante (BASK I).....	57
• Estudo cinético de reação de LRP de HEMA. Variação de $V_{0\text{HEMA}}/V_{\text{DMSO}} = 1/1$ e de DP =50. (BASK II)	59
• Estudo cinético de reação de LRP de HEMA. Variação de $V_{0\text{HEMA}}/V_{\text{DMSO}} (1/1)$. (BASK III)	61
• Estudo cinético de reação de LRP de HEMA. Variação do ligante (bipiridina). (BASK IV)	62
3.2.3. Avaliação do carácter “vivo” do polímero PHEMA.....	63
3.3. Síntese de Hidrogéis	64
Secção IV - Conclusões e Trabalho Futuro.....	67
4.1. Conclusões.....	68
4.2. Trabalho Futuro	68
Bibliografia	70
Anexo.....	72
Anexo A : Espectro de RMN em CDCl_3 do ligante Me_6TREN sintetizado para o sistema catatílico de LRP em estudo.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de polímeros quanto à sua composição.	13
Figura 2 – Representação esquemática de diferentes polímeros quanto à forma.	13
Figura 3 - Etapas de iniciação e propagação para a reação de polimerização de <i>Colsevelam</i>	16
Figura 4 - Equilíbrio típico em LRP, entre espécies dormentes e ativas.	17
Figura 5 - Distribuição de pesos moleculares típica em FRP e LRP	18
Figura 6 - Equilíbrio químico típico de ATRP.	20
Figura 7 - Equilíbrio químico típico de SFRP	21
Figura 8 - Esquema simplificado de mecanismo RAFT.	22
Figura 9 - Agentes de transferência de cadeia RAFT	22
Figura 10 – Equilíbrio dinâmico típico em ITP	23
Figura 11 - Esquema simplificado de mecanismo RITP	23
Figura 12 - Representação esquemática do deslocamento da curva de pesos moleculares do polímero de LRP após experiência de reiniciação.	24
Figura 13 - Estrutura química de <i>Colsevelam</i>	28
Figura 14 - Esquema representativo de equipamento GPC	32
Figura 15 – Esquema de um equipamento típico de espectroscopia de massa MALDI-TOF	34
Figura 16 – Montagem utilizada nas cinéticas das reações de LRP de PHEMA.	37
Figura 17 - Espectro RMN ¹ H a 600 MHz de PAIAH a 80°C por 72 h (COLV) em D ₂ O.	45
Figura 18 - Mecanismo de reação sugerido para polimerização viva catalisada por Fe(0)/CuBr ₂ /Me ₆ TREN.	48
Figura 19 - DP normalizado em relação ao volume de retenção. Reação de PHEA em DMSO (BAS 01), de PHEA em água (BAS 02) e de PHEMA em DMSO (BAS 03), com M _w /M _n (BAS 03) = 1,14.	51
Figura 20 - Espectro RMN ¹ H a 600 MHz de PHEA em d ₆ DMSO, obtido por LRP a 30 °C durante 24 h (BAS 01).	52
Figura 21 - Espectro RMN ¹ H a 600 MHz de PHEMA em d ₆ DMSO, obtido por LRP a 30 °C durante 24 h (BAS 03).	53
Figura 22 – Espectro RMN ¹ H a 600 MHz de PAIA em d ₆ DMSO, obtido por LRP a 30 °C durante 24 h (BAS 05).	54
Figura 23 – RI normalizado em relação ao volume de retenção. Padrão de poliestireno com M _p =10050 g/mol e M _w /M _n =1,02 e PAIA por LRP em reação a 30 °C (BAS 05) e a 80 °C (BAS 06).	55
Figura 24 - Representação gráfica da conversão e ln([M] ₀ /[M]) em função do tempo (a) e de M _n ^{GPC} e M _w /M _n em função de M _n ^{teórico} para reação de polimerização de PHEMA catalisada por Fe(0) e CuBr ₂ a 30°C em DMSO nas seguintes condições [HEMA] ₀ / [EBiB] ₀ /[Fe(0)] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[Me ₆ TREN] ₀ / = 222/1/1/0,1/1,1 e [HEMA] ₀ / [DMSO]=2/1 (% vol).	58
Figura 25 - Representação gráfica da conversão e ln([M] ₀ /[M]) em função do tempo (a) e de M _n ^{GPC} e M _w /M _n em função de M _n ^{teórico} para reação de polimerização de PHEMA catalisada por Fe(0) e CuBr ₂ a 30°C em DMSO nas seguintes condições [HEMA] ₀ / [EBiB] ₀ /[Fe(0)] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[Me ₆ TREN] ₀ / = 50/1/1/0,1/1,1 e [HEMA] ₀ / [DMSO]=1/1 (% vol).	60
Figura 26 - Representação gráfica da conversão e ln([M] ₀ /[M]) em função do tempo (a) e de M _n ^{GPC} e M _w /M _n em função de M _n ^{teórico} para reação de polimerização de PHEMA catalisada por Fe(0) e CuBr ₂ a 30 °C em DMSO nas seguintes condições [HEMA] ₀ / [EBiB] ₀ /[Fe(0)] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[Me ₆ TREN] ₀ / = 222/1/1/0,1/1,1 e [HEMA] ₀ / [DMSO]=1/1 (% vol).	61

Figura 27 - DP normalizado em relação ao volume de retenção. PHEMA de BASK IV (esquerda) e padrão de poliestireno com $M_p=10050$ g/mol e $M_w/M_n=1,02$ (direita).	62
Figura 28 - DP normalizado em relação ao volume de retenção. Reação de extensão de cadeia (esquerda) PHEMA-Br macroiniciador (direita).	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura básica da cadeia de polímeros 'heterochain'	12
Tabela 2 - Classificação de hidrogéis	26
Tabela 3 - Compostos envolvidos nas reações de LRP, estudadas.	36
Tabela 4 - Condições das reações de síntese de PAIAH por FRP e resultados obtidos.....	43
Tabela 5 - Experiências de LRP executadas com DP de 222.	46
Tabela 6 - Observações, condições de RMN, de GPC e resultados de peso molecular para as polimerizações de HEA, HEMA e AIA por LRP, utilizando $Fe(0)/CuBr_2/Me_6TREN = 1/0,1/1,1$ como sistema catalítico a 30 °C durante 24 h. DP = 222 e $[solvente]/[monómero] = 1/2$ (v/v).....	49
Tabela 7 - Estudo Comparativos de reações de alilamina FRP e LRP a 30 e 80 °C.....	54
Tabela 8 - Condições das cinéticas de LRP de PHEMA em DMSO, a 30 °C.	56
Tabela 9 - Resultados obtidos para as cinéticas de LRP de PHEMA em DMSO a 30 °C.....	57
Tabela 10 - Condições de reações de reticulação executadas à temperatura ambiente.	65
Tabela 11 - Resultados de teste de <i>swelling</i> em solução de dihidrogenossulfato de sódio a pH 6, num shaker a 37 °C e 900 rpm.	66

Secção I
Introdução

1.1. Polímeros

Um polímero é uma macromolécula resultante da união de moléculas mais pequenas designadas por monómeros, assim, a sua estrutura depende do monómero ou monómeros usados na reação química de polimerização [1]. Existem diferentes formas de classificar polímeros, como por exemplo, com base nas características de processamento, no mecanismo de polimerização ou até mesmo tendo em conta a sua estrutura básica [2]. Assim, os polímeros podem, por exemplo, ser distribuídos por dois grandes grupos, os termoplásticos ou os termofixos. Quando um polímero é deformável por ação de calor até se obter a forma final desejável do material, pertence aos termoplásticos. Já os polímeros termofixos, têm as cadeias individuais ligadas por ligações químicas covalentes (reticulações). O facto de estarem reticulados impede que o polímero seja amolecido por via térmica, como também evita a deformação e sua dissolução em solventes. O poliestireno (PS), o polietileno, o polipropileno e o policloreto de vinilo são alguns exemplos de termoplásticos comercialmente importantes. Como exemplo de polímeros termofixos podem ser referidos as resinas de fenol-formaldeído e os poliésteres insaturados [2].

Adicionalmente, os polímeros podem ser classificados com base nos grupos que constituem a estrutura química básica. A Tabela 1 apresenta alguns polímeros organizados tendo em conta as ligações das unidades de repetição.

Tabela 1 - Estrutura básica da cadeia de polímeros 'heterochain'[2].

Polímeros Carbono - Oxigénio	Polímeros Carbono - Enxofre	Polímeros Carbono - Azoto
--- C --- O --- Poliéteres	--- S --- C --- Politioéteres	--- C --- N --- Poliaminas
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{--- C --- O ---} \end{array}$ Poliésteres de ácidos carboxílicos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{--- S --- C ---} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ Polisulfonas	--- C = N --- Poli(iminas)
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{--- C --- O --- C ---} \end{array}$ Polianidridos de ácidos carboxílicos		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{--- C --- N ---} \end{array}$ Poliamidas
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{--- O --- C --- O ---} \end{array}$ Policarbonatos		$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{--- N --- C --- N ---} \end{array}$ Poliureias

Outros factores que influenciam fortemente as propriedades dos polímeros são a sua composição e a arquitectura das cadeias poliméricas. Quanto à composição, um polímero sintetizado a partir de um único monómero designa-se homopolímero, enquanto que a partir de duas ou mais unidades monoméricas diferentes designa-se copolímero. Ainda em termos

de composição, os copolímeros podem ser classificados segundo quatro subclasses, que se encontram ilustradas na Figura 1 [1].

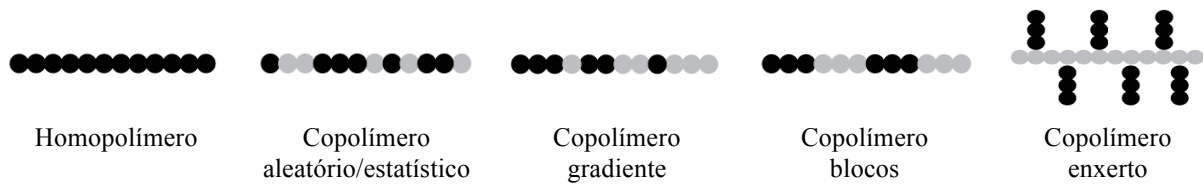


Figura 1 - Classificação de polímeros quanto à sua composição [1].

No que diz respeito à forma, os polímeros podem ser descritos como lineares, ramificados ou reticulados [1]. Um polímero linear não apresenta nenhum tipo de ramificação adicional aos grupos associados ao(s) monómero(s). Outras arquiteturas mais complexas como polímeros em estrela, polímeros em pente, polímeros hiper-ramificados e polímeros cíclicos são também possíveis de se obter, tal como ilustra a Figura 2.

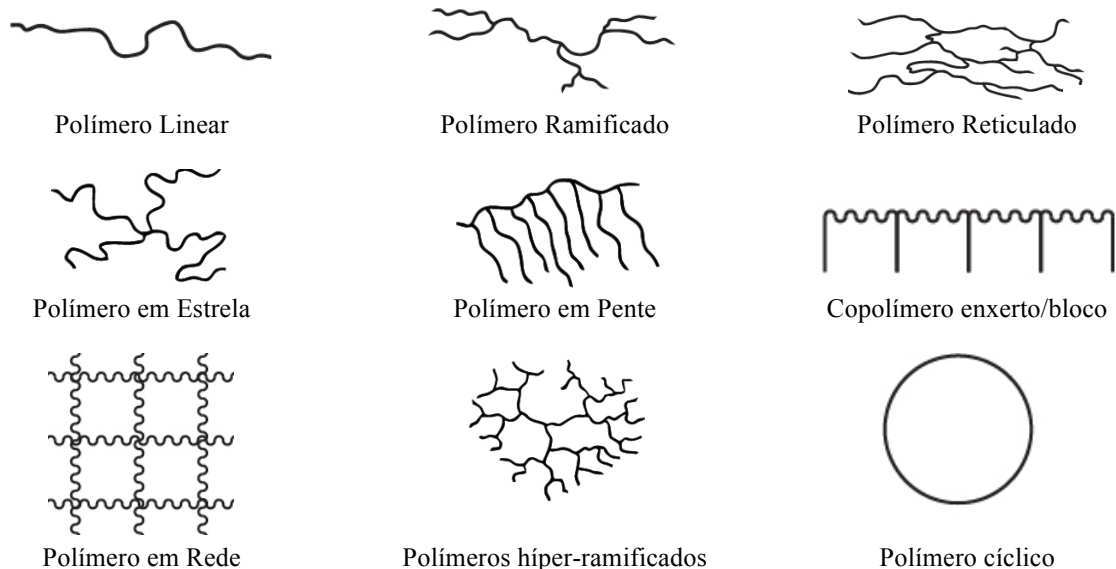


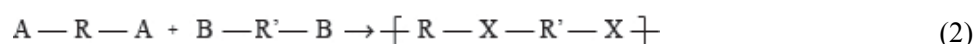
Figura 2 – Representação esquemática de diferentes polímeros quanto à forma [1].

1.2. Reações de polimerização - conceitos genéricos

As reações de polimerização podem ser caracterizadas de acordo com o mecanismo de polimerização envolvido, cuja complexidade é consequência dos grupos funcionais presentes nos monómeros. Se a cadeia de polímero for formada a partir da união aleatória de moléculas de monómeros, oligómeros ou moléculas de longa cadeia, o processo de polimerização

envolvido é denominado por reação gradual (*step-growth*) e formam-se dímeros, trímeros ou espécies macromoleculares. Por outro lado, quando a cadeia polimérica é formada por sucessivas ligações de moléculas de monómeros com uma cadeia ativa, o processo de polimerização diz-se de reação em cadeia ou crescimento em cadeia (*chain-growth*). O crescimento da cadeia pode dar-se através de um radical livre ou uma espécie iónica (anião ou catião), sendo que as cadeias de elevado peso molecular começam a ser formadas nos estágios iniciais do processo de polimerização [3].

Existem duas abordagens para o processo de polimerização por reação gradual, uma que envolve apenas uma molécula (monómero) com dois grupos funcionais diferentes (Equação 1), e outra que envolve o uso de dois monómeros bifuncionais (Equação 2). As Equações 1 e 2 representam esquematicamente as duas abordagens possíveis deste tipo de polimerização, considerando dois grupos funcionais hipotéticos, A e B, que reagem para formar um grupo X.



Como exemplos de reações de polimerização gradual pode referir-se, por exemplo, a preparação de poliésteres, poliamidas e poliuretanos. Uma policondensação é o processo de polimerização que, com recurso a monómeros não vinílicos, conduz à formação de um polímero por sucessivas reações de condensação e com a eliminação de moléculas de baixo peso molecular (água, metanol e ácido clorídrico, por exemplo).

As reações de polimerização em cadeia, '*chain-growth*', requerem a presença de moléculas (iniciadores) que por decomposição formam espécies reativas que atacam um monómero insaturado, dando assim início ao processo de polimerização [3]. As espécies podem ser radicais ou iões (aniões ou catiões) e o processo de polimerização designa-se por polimerização radicalar ou polimerização iónica (aniónica e catiónica), respectivamente. De referir que reações em cadeia são caracterizadas por três etapas com diferentes cinéticas: iniciação, propagação e terminação. Os processos de polimerização por radicais livres representam cerca de 50% da produção mundial de polímeros.

1.3. Polimerização Radicalar Livre (FRP)

A polimerização radicalar livre é um processo reativo caracterizado pela existência de três etapas bem definidas. A primeira, a iniciação, é constituída por dois passos, a dissociação do iniciador (I-I) em duas espécies radicalares (I•), seguida da associação de uma molécula de monómero (M) às espécies referidas. A etapa que se segue é a propagação em que as moléculas de monómero são continuamente adicionadas aos radicais em crescimento. Finalmente, a terminação pode ocorrer pois dois processos diferentes: quando duas cadeias em propagação com radicais ativos ($IM_n\bullet$ e $IM_m\bullet$) se combinam (terminação por combinação); ou quando entre as duas cadeias em propagação ($IM_n\bullet$ e $IM_m\bullet$) houver transferência de electrões (terminação por dismutação) [3].

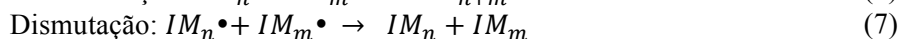
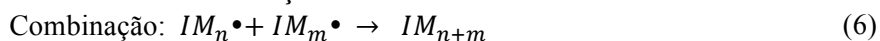
Iniciação



Propagação



Terminação



Esta polimerização em cadeia é frequentemente utilizada em tecnologia de polímeros mas ocorre apenas nas cadeias reativas em crescimento. Como consequência, atingem-se rapidamente altos pesos moleculares para baixas percentagens de conversão e o monómero está sempre presente em quantidades significativas durante todo o processo.

Neste trabalho, a síntese do *Colesevelam* será efectuada por polimerização radicalar. Assim, as reacções envolvidas no processo são em tudo análogas às descritas anteriormente para uma reacção genérica de FRP (iniciação, propagação e terminação). Explicitando para o caso do fármaco comercial (*Colesevelam*) a alilamina será o monómero, M, que se associa às espécies radicalares (I•) oriundas da dissociação do iniciador I, o azobis (amidinopropane) dihidrocloride (AAPH). Estas espécies radicalares são capazes de atacar a ligação dupla do monómero e assim permitir propagação da cadeia de polímero por adição de mais moléculas de alilamina. A Figura 3 que se segue ilustra o esquema reacional do fármaco sintetizado.

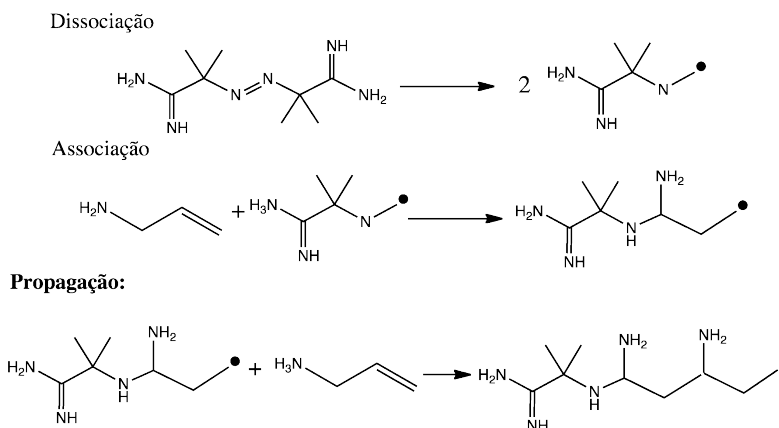
Iniciação:

Figura 3 - Etapas de iniciação e propagação para a reação de polimerização de *Colesevelam*.

De facto, a polimerização radicalar convencional (FRP) é um mecanismo de extrema importância para a preparação de muitos polímeros comerciais de elevado peso molecular, na medida em que pode ser aplicada a uma vasta gama de monómeros, permite a utilização de diferentes condições de reação (em massa, solução, emulsão e suspensão), é tolerante a uma ampla gama de grupos funcionais (p.e. OH, NR₂, COOH, CONR₂), pode ser utilizada para um amplo intervalo de temperatura (80-250 °C), para além de os monómeros poderem ser copolimerizados com diferentes propriedades para inúmeras aplicações [4]. No entanto, a principal limitação da FRP está associada ao reduzido controlo de determinadas propriedades estruturais dos polímeros tais como o peso molecular, a polidispersividade (PDI), a funcionalidade, a arquitetura e composição da cadeia [4]. É neste sentido que nos últimos tempos a polimerização radicalar viva (LRP) tem sido exaustivamente explorada em trabalhos académicos e industriais a fim de colmatar os problemas associados à FRP.

1.4. Polimerização Radicalar Viva (LRP)

A polimerização viva foi descoberta por Szwarc [5], em 1956, e definida como um processo de crescimento de cadeia onde não ocorrem reações de terminação. Num estudo de polimerização aniónica de estireno com metal alcalino em tetrahydrofurano (THF), Szwarc [5] descobriu quando a viscosidade parava de aumentar, caso se adiciona-se mais monómero fresco, após algum tempo de reação, a viscosidade começava a aumentar novamente. Este resultado conduziu a introdução de uma nova terminologia na ciência de polímeros, a polimerização viva.. Este tipo de polimerização apresenta, contudo, alguns problemas, nomeadamente: o facto de necessitar de condição de polimerização extremas (ex: -78 °C), não poder ser aplicado a diversas famílias de monómeros e ao facto de ser difícil de implementar à

escala industrial quando comparado com a polimerização radical. Com intuito de explorar as vantagens da polimerização radicalar e ao mesmo tempo permitir um controlo sobre a estrutura do polímero característico da polimerização viva, ao longo da última década tem vindo a ser desenvolvido um novo mecanismo de polimerização – a polimerização radicalar viva (LRP). Hoje em dia, a LRP é a área mais estudada em ciência de polímeros [6]. Esta área inclui um conjunto de técnicas de polimerização por radicais para a síntese de polímeros e copolímeros bem definidos e de baixa polidispersividade [3].

Assim, em LRP preparam-se polímeros por reação de adição sequencial com grupos terminais de cadeia ativos [4]. No entanto, *per si* este facto não garante as propriedades estruturais no polímero, como o controlo do peso molecular e a estreita distribuição de peso molecular. Para tal, são necessários dois requisitos adicionais. O iniciador tem de ser completamente consumido no início da reação e a velocidade da reação que conduz à formação de espécies ativas tem de ser igual à de formação de espécies dormentes (equilíbrio entre espécies dormentes e radicais em propagação), garantindo uma baixa concentração de radicais [4].

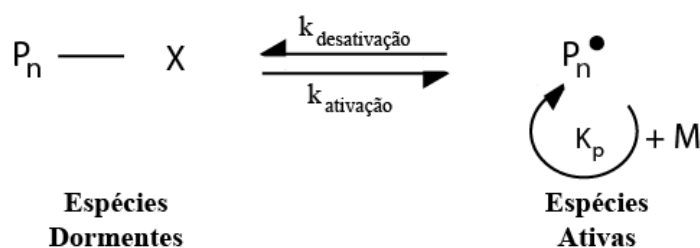


Figura 4 - Equilíbrio típico em LRP, entre espécies dormentes e ativas [4].

Assim, em contraste com a polimerização radicalar convencional, em LRP todas as cadeias poliméricas começam a crescer ao mesmo tempo a uma velocidade semelhante pois a vida útil de um radical ativo é normalmente pequena (0,1 - 10ms em LRP e 1s em FRP) [7], pelo que a probabilidade de ocorrerem fenómenos de terminação de cadeia é muito baixo em LRP, comparativamente com FRP. No entanto, apesar destes fenómenos por vezes ocorrerem, como o número de cadeias poliméricas em LRP é muito maior que em FRP, a taxa de terminação por cadeia e a taxa de transferência de monómero por cadeia são baixas, pelo que as reações de terminação podem ser consideradas negligenciáveis. Como consequência, nestes sistemas verifica-se uma distribuição de pesos moleculares estreita (Figura 5). Para além disso, um aumento linear do peso molecular do polímero com a conversão e uma polidispersividade baixa ($M_w/M_n < 1,5$) são também parâmetros que caracterizam os sistemas de LRP [4, 7].

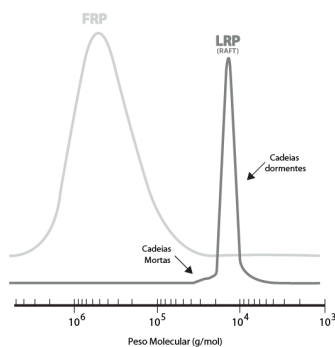


Figura 5 - Distribuição de pesos moleculares típica em FRP e LRP [7].

Em LRP existem várias técnicas que podem ser utilizadas na polimerização de diversos monómeros. Apesar disso, seja qual for a estratégia utilizada, os quatro critérios que identificam e que devem ser respeitados para que a polimerização seja viva, são:

1. A cinética da reação é de primeira ordem em relação ao monómero.

$$\ln\left(\frac{[M]_0}{[M]}\right) \text{ vs tempo} = \text{função linear} \quad (8)$$

2. Crescimento linear do grau de polimerização (DP_n) com a conversão.

$$DP_n = \Delta \frac{[M]}{[I]_0} \quad (9)$$

3. Presença de uma distribuição de peso moleculares estreita, próxima de uma distribuição de Poisson.

$$\frac{M_w}{M_n} \cong 1 + \frac{1}{DP_n} \quad (10)$$

4. As cadeias poliméricas têm de manter a sua capacidade de crescimento sempre que for adicionado mais monómero (presença de terminais ativos).

1.4.1. Técnicas de LRP

As diferentes técnicas de LRP partilham entre si a necessidade de existência de equilíbrio entre espécies ativas e espécies dormentes (Figura 4), o qual proporciona um controlo sobre o peso molecular do polímero. A diferença entre elas reside na estratégia que cada uma utiliza para manter esse equilíbrio. Existem dois princípios base pelos quais podemos agrupar as técnicas LRP, segundo o tipo de equilíbrio dinâmico que se estabelece : ativação/desativação reversível de radicais ou processo degenerativo de transferência reversível de cadeia [8].

Quando ocorre ativação/desativação reversível de radicais existe um efeito de auto-regulação, denominado por efeito de radical persistente (*persistent radical effect* – PRE). No início da polimerização ocorrem algumas terminações radical-radical e, como consequência, aumenta a quantidade da espécie desativadora em relação à quantidade de radicais em crescimento, pelo que o equilíbrio dinâmico (Figura 4) é deslocado no sentido das espécies dormentes. Neste sistemas uma vez que os radicais de propagação são produzidos na etapa de ativação, não é necessário a presença de um iniciador de radical. As técnicas de LRP baseadas no PRE mais conhecidas são o (*Atom Transfer Radical Polymerization* – ATRP e a *Stable Free Radical Polymerization* – SFRP) [8].

No que diz respeito ao mecanismo reversível de transferência de cadeia é necessário recorrer-se a um iniciador que forme radicais, visto que o processo de ativação/desativação não está relacionado com uma modificação no número de radicais. Nestes sistemas, o equilíbrio é mantido através da transferência de cadeia entre as cadeias poliméricas em crescimento e os agentes de transferência. Neste grupo incluem-se as técnicas de LRP *Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer* –(RAFT) e *Degenerative Chain Transfer* (DCT) [8].

Neste trabalho, o mecanismo utilizado para a síntese de polímeros por LRP é o ATRP. Nas secções seguintes serão brevemente descritas cada uma das técnicas de LRP referidas.

- **ATRP - Atom Transfer Radical Polymerization**

ATRP é uma das técnicas mais versáteis e é atualmente a mais amplamente usada em LRP [7]. Em ATRP as espécies envolvidas são um metal de transição (M_t^n), que pode aumentar o seu número de oxidação, um ligante (L) e um iniciador (haletto de alquila) [9]. O complexo de metal de transição (M_t^n/L) é o responsável pela transferência de um átomo halogenado (X) a um complexo de propagação macroradical (Figura 6). A espécie ligante forma um complexo com o elemento metálico, dissolvendo o catalisador no solvente da reação. Para além disso, a espécie ligante é fundamental para regular a reatividade do catalisador para diferentes monómeros. A polimerização é controlada pelo equilíbrio redox que é altamente deslocado para as espécies dormentes, impedindo que ocorram as reações de terminação de radical [7-9], uma vez dessa forma a concentração de radicais ativos é sempre muito baixa.

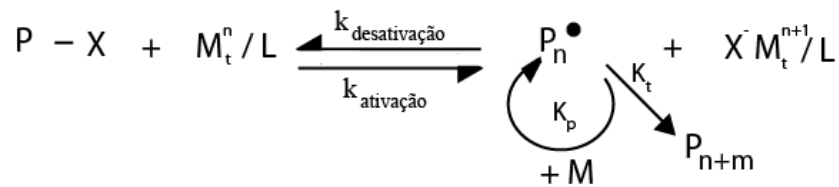


Figura 6 - Equilíbrio químico típico de ATRP [8].

A reação geralmente é iniciada pela ativação da cadeia halogenada ($\text{P}_n\text{-X}$), através da abstração do halogênio pelo centro metálico (M_t^n/L) para formar uma espécie iniciadora de radical (P_n^\bullet) e um complexo metálico oxidado ($\text{X}^-\text{M}_t^{n+1}/\text{L}$), o qual se designa desativador. De seguida, a espécie P_n^\bullet adiciona-se a uma unidade de monómero ou reage com o complexo metálico de maior estado de oxidação, levando à formação de espécies dormentes [10]. Quanto mais rápido for o equilíbrio dinâmico, maior o controlo sobre o peso molecular do polímero durante toda a reação. Os catalisadores usados em ATRP pertencem ao grupo dos metais de transição, tais como ruténio, cobre, ferro e níquel [11]. Estas espécies podem controlar a polimerização de monómeros, como por exemplo: acrilamidas, acrilatos e metacrilatos, estirenos ou monómeros solúveis em água [10].

Um dos catalisadores metálicos de uso mais frequente é o cobre devido à sua alta reatividade, baixo custo e fácil manuseamento [8]. Assim, o complexo de metal de transição no seu estado de oxidação menor (por exemplo Cu(I)Br/ligante), abstrai o átomo halogenado terminal da cadeia polimérica (ou do iniciador haleto de alquila) e produz um radical e um complexo num estado de oxidação superior (por exemplo $\text{Cu(II)Br}_2/\text{ligante}$) [9]. Com a preocupação de implementar sistemas catalíticos mais “verdes” e “amigos do ambiente”, catalisadores à base de ferro também têm sido muito usados em sistemas ATRP devido à sua abundância e às excelentes propriedades de biocompatibilidade já demonstradas [11]. Recentemente foi desenvolvido um novo sistema de ATRP nos laboratórios do DEQ/FCTUC [8] que utiliza pela primeira vez uma combinação de metais (ferro e cobre - em muito baixa concentração) como sistema catalítico para a polimerização de acrilatos, metacrilatos e estireno. Será este último, o sistema que vai ser usado neste trabalho.

- **SFRP - Stable Free Radical Polymerization**

Em SFRP o equilíbrio dinâmico (Figura 7) é estabelecido entre a espécie dormente ($\text{P}_n\text{-X}$) e duas espécies ativas: o radical ativo em crescimento (P_n^\bullet) e o radical estável (persistente) (X^\bullet).

Para que seja possível mediar a polimerização, o mediador radicalar deve ser estável o suficiente para não reagir consigo próprio nem com o monómero (para não iniciar o crescimento de novas cadeias). Para além disso, não deve participar em reações colaterais, como a abstração de átomos de β -H [7].

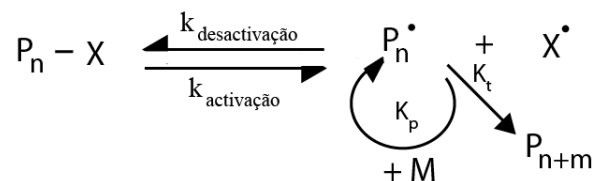


Figura 7 - Equilíbrio químico típico de SFRP [7].

Neste tipo de polimerização é normalmente utilizado um nitróxido como o agente mediador, uma vez que os radicais de nitróxido formados são muito estáveis e, conseqüentemente, mais eficientes. Quando uma reação de SFRP é mediada por nitróxido é também designada por NMP (*nitroxide mediated polymerization*) [8].

O primeiro sistema de SFRP mediado por nitróxidos a ser implementado com sucesso foi desenvolvido por Georges [11], em 1993, na polimerização controlada de estireno na presença de peróxido de benzoílo com 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidínio-N-oxi (TEMPO), como mediador de radicais estáveis. A evolução de pesos moleculares de poliestireno durante a reação mostrou uma tendência linear com a conversão de monómero e os polímeros apresentaram uma polidispersividade baixa (inferior a 1,3), numa reação realizada a 120 °C [8].

Este sistema LRP apresenta como principal inconveniente o facto de necessitar de temperaturas muito elevadas.

• RAFT

A polimerização por RAFT é indiscutivelmente um processo prático, já que permite a utilização de condições de reação mais aproximadas às do processo de polimerização convencional (FRP) [7]. Esta técnica recorre a um agente de transferência de cadeia capaz de reagir com um macrorradical em propagação, que foi previamente iniciado por um iniciador de radical, típico de um sistema de polimerização convencional (etapa de iniciação) [10]. A Figura 8 ilustra um sistema típico de RAFT.

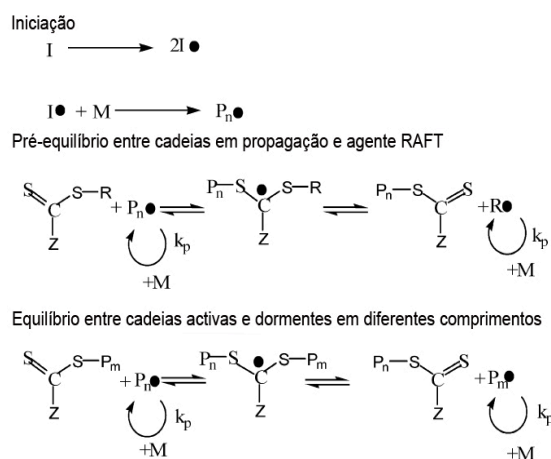


Figura 8 - Esquema simplificado de mecanismo RAFT [9].

Exemplos de agentes de transferência de cadeia utilizados neste processo de polimerização são: ditioesters, ditiocarbamatos, tritioarbonatos, xantatos e compostos tiocarbonil, cujas estruturas se encontram representadas na Figura 9.

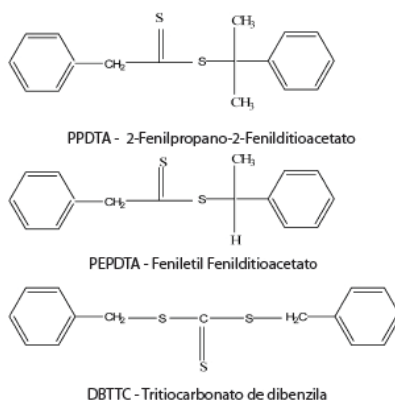


Figura 9 - Agentes de transferência de cadeia RAFT [10].

Normalmente, estes sistemas são caracterizados por processos bem controlados. Contudo, a seleção do agente de transferência de cadeia é crucial nestes sistemas uma vez que a sua natureza influencia o controle do peso molecular, a distribuição do peso molecular e a arquitetura molecular dos polímeros [8]. Apesar de esta técnica de LRP poder ser aplicada a grande número de monómeros, tem também algumas desvantagens. Por um lado, grande parte dos agentes de transferência de cadeia não estão disponíveis comercialmente (ou são extremamente caros) e, como tal, têm de ser sintetizados. Por outro, os polímeros produzidos têm sempre associados grupos ditio-ésteres, que induzem alteração na cor dos polímeros (de vermelho/rosa para amarelo) e maus odores. É ainda de referir que este grupo pode ser removido por hidrólise, sendo substituído por um grupo tiol [3].

• **DCT**

Este método decorre fundamentalmente ao uso de átomos de iodo (*Iodine Transfer Polymerization* ou *Reverse Iodine Transfer Polymerization* - ITP/RITP) que medeiam o mecanismo de transferência reversível. Os agentes de transferência de cadeia são normalmente derivados do iodeto de perfluoroalquilo [10]. A Figura 10 pretende ilustrar o equilíbrio dinâmico típico num sistema ITP [10].

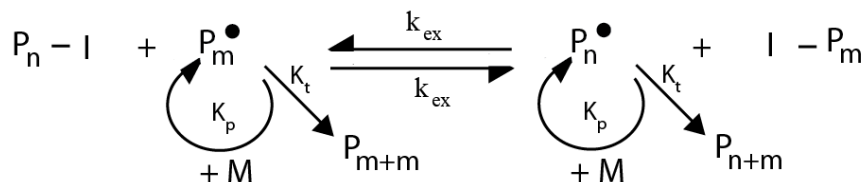


Figura 10 – Equilíbrio dinâmico típico em ITP [9].

Já em RITP recorre-se a iodo molecular (I₂), como agente de controlo, a fim de gerar *in situ*, o agente de transferência de cadeia reversível, antes da reação de polimerização ocorrer. O mecanismo de uma reação RITP típica é esquematizado na Figura 11.

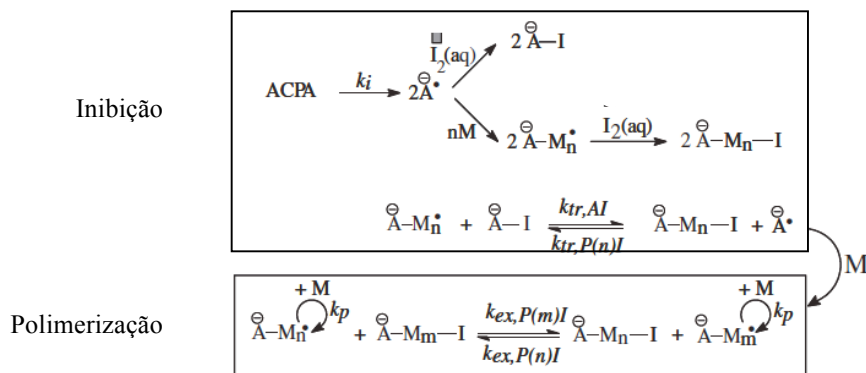


Figura 11 - Esquema simplificado de mecanismo RITP [10].

1.4.2. Avaliação do carácter “vivo” dos polímeros preparados por LRP

Como referido anteriormente, os sistemas LRP são caracterizados por apresentarem uma evolução linear do peso molecular com a conversão de monómero e simultaneamente, uma diminuição da polidispersividade com a conversão de monómero. No entanto, estes parâmetros não são uma garantia de um polímero vivo. Para tal são necessárias mais informações, nomeadamente análises de ressonância magnética nuclear (RMN) que permitem identificar a presença dos terminais ativos de cadeia. Como complemento a esta técnica de

identificação do terminal ativo de cadeia, dado que nem sempre é fácil de ser executada, surgem estratégias experimentais capazes de avaliar este carácter “vivo” dos polímeros obtidos por LRP, nomeadamente as reações de reiniciação ou a copolimerização (se for utilizado um monómero diferente). A reiniciação é uma reação de extensão de cadeia em que o polímero obtido por LRP é usado como macroiniciador de uma reação LRP com monómero fresco. Como resultado obtém-se um polímero com maior peso molecular e portanto por análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) é possível verificar o deslocamento do pico do polímero após experiência de reiniciação para valores mais altos de peso molecular, tal como demonstra a Figura 12.

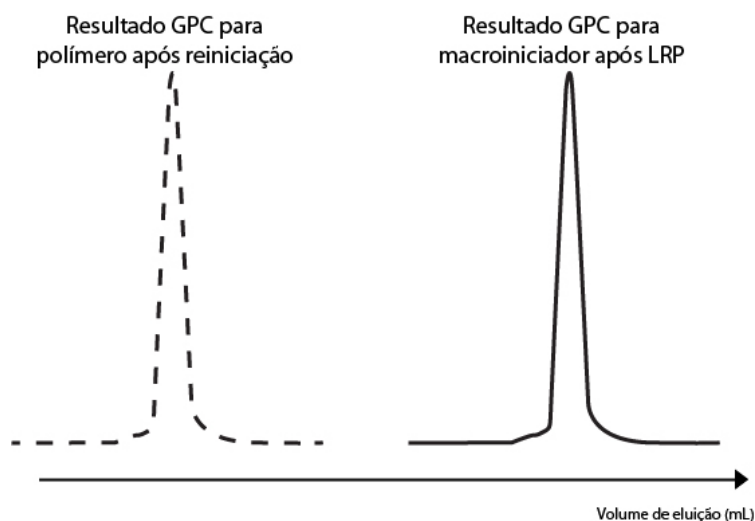


Figura 12 - Representação esquemática do deslocamento da curva de pesos moleculares do polímero de LRP após experiência de reiniciação.

1.5. Hidrogéis

Um hidrogel é uma estrutura polimérica tridimensional hidrofílica, capaz de absorver e reter grandes quantidades de água ou de um fluido biológico sem que ocorra dissolução do polímero [12]. Esta definição abrange uma grande variedade de materiais naturais (de origem vegetal ou animal), materiais naturais modificados e materiais poliméricos sintéticos [13]. A síntese ou modificação de materiais para a obtenção de hidrogéis advém muitas vezes da necessidade de evitar a dissolução das cadeias hidrofílicas de um determinado polímero numa solução aquosa, induzindo para tal, reticulação no polímero [14]. Assim, a organização típica de um hidrogel em redes pressupõe a existência de ligações cruzadas (reticulações químicas ou físicas) entre as cadeias de homopolímeros ou copolímeros, o que resulta num material insolúvel. Os hidrogéis reticulados fisicamente são formados por ligações de hidrogénio, ligações hidrofóbicas e/ou electrostáticas. Os que são reticulados quimicamente resultam da

formação de ligações covalentes por polimerização radicalar (ex: monómeros bifuncionais), por reação química com agentes reticulantes (ex.: reticulação com aldeídos, reação de adição de condensação), ou de radiação de alta energia [15]. Neste sentido, existe uma variedade de métodos para a reticulação de polímeros, no entanto, para a escolha do método mais adequado surge a necessidade de, em simultâneo, avaliar determinados aspectos (ex: condições de reacção e reagentes) e propriedades consoante a aplicação final do material [14]. Por exemplo, em muitas das aplicações dos hidrogéis nas áreas biomédica e farmacêutica é necessário garantir a biodegradabilidade (química ou enzimática), a biocompatibilidade do material e que os produtos resultantes da degradação tenham baixa toxicidade [14].

A característica comum a todos os hidrogéis é a compatibilidade com a água que advém da presença de grupos funcionais hidrofílicos (-OH, -COOH, -CONH₂, -CONH, -SO₃H), fazendo com que inchem facilmente em água [16]. O teor de água ou inchaço depende fundamentalmente da relação entre o número de cadeias poliméricas hidrofílicas e hidrofóbicas, e do grau de reticulação. A forma como um hidrogel incha ou encolhe num meio pode ainda dever-se à forma como o polímero responde a determinados estímulos externos tais como mudanças de temperatura, pH, solvente, campo elétrico ou magnético [15], no caso de se utilizar polímeros que respondem aos estímulos referidos.

Devido às suas propriedades de inchaço e biocompatibilidade, os hidrogéis têm sido exhaustivamente estudados para aplicações médicas e farmacêuticas, nomeadamente, em sistemas de libertação de fármacos, em engenharia tecidos e em dispositivos médicos [13]. Estes materiais poliméricos reticulados podem ser utilizados em lentes de contacto, entre diversas aplicações, podem ser usados: em cartilagens sintéticas; em membranas de biossensores; como pele artificial, como dispositivos de libertação controlada de fármacos; e como matrizes para crescimento celular. Nesta última aplicação, os hidrogéis atuam como matrizes extracelulares, de forma a criar um ambiente propício ao crescimento e diferenciação celular, por exemplo para o tratamento de queimaduras [12, 16].

Os hidrogéis podem ser classificados tendo em conta diferentes aspectos tais como a composição do polímero, a natureza da carga iónica e as suas propriedades estruturais [15, 17]. Estas características físico-químicas que permitem caracterizar um hidrogel estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação de hidrogéis [15, 17].

Composição do polímero	Natureza da carga iónica	Propriedades estruturais / estrutura física das redes
Homopolímero (polimerização de um único monómero hidrofilico)	Aniónicos (se contêm apenas cargas negativas)	Amorfo (moléculas orientadas de forma aleatória e entrelaçadas)
	Catiónicos (se forem constituídos por cargas positivas)	Semi-cristalino (moléculas com empacotamento regular e ordenado em determinadas regiões da matriz)
Copolimérico (polimerização de dois tipos de monómeros, sendo um deles obrigatoriamente hidrofilico)	Anfotéricos (comportam-se como ácidos ou bases, dependendo do meio em que estão inseridos)	Ligado por pontes de Hidrogénio (as moléculas estão ligadas por pontes de hidrogénio)
	Neutros (número de cargas positivas igual ao número de cargas negativas)	Agregado hidrocoloidal

A absorção de água é a propriedade mais importante nos hidrogéis, nomeadamente para aplicações biomédicas e farmacêuticas destes materiais, na medida em que este fenómeno permite conferir propriedades viscoelásticas ao material e possibilita o transporte de nutrientes e produtos resultantes do metabolismo celular [18]. Num hidrogel, os fatores que influenciam mais a sua interação com a água e o seu comportamento são a natureza hidrofílica/hidrofóbica dos polímeros utilizados, a carga iónica e o grau de reticulação. Como resultado destas interações, as cadeias de polímero incham, sem que haja dissolução no meio onde é inserido [16]. O grau de inchaço está muitas vezes associado quase exclusivamente ao grau de reticulação do hidrogel.

Com o intuito de avaliar o grau de inchaço coloca-se o material em água ou solução aquosa a testar (soro fisiológico, por exemplo, para testar hidrogéis para aplicações biomédicas, simulando assim as condições corporais). Pesando o composto antes e depois da imersão, durante um determinado tempo t , é possível determinar a quantidade de água absorvida pelo gel através da Equação (11) [18].

$$\text{Grau inchaço (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_t} \times 100 \quad (11)$$

Onde W_0 corresponde ao peso do hidrogel seco e W_t ao peso do hidrogel após um tempo t em solução.

Os hidrogéis de base polimérica tem vindo a suscitar recentemente grande interesse para aplicação como fármacos na medida em que: conduzem a menores toxicidades (porque não são absorvidos para a corrente sanguínea), podem ser otimizados com a introdução de diferentes funcionalidades para se produzirem materiais com diferentes atividades biológicas e têm a capacidade de reconhecer e permitir a ligação a moléculas causadoras de doenças [19]. Os ácidos biliares são surfactantes biológicos produzidos no fígado que ajudam na digestão de alimentos e permitem a absorção de lípidos no intestino. São responsáveis por controlarem vários processos metabólicos (glicose, energia de triglicérides e a homeostase do colesterol) e são sintetizados a partir do colesterol hepático microsomial no fígado humano [20]. Quimicamente estas moléculas têm um núcleo hidrofóbico (esqueleto esteróide) e um segmento hidrofílico com propriedades aniónicas ao pH do estômago [19]. Após serem segregados pelo fígado são armazenados na vesícula e entram no lúmen intestinal durante a digestão dos alimentos. Posteriormente são absorvidos e regressam ao fígado através da circulação portal hepática, mantendo-se deste modo o seu nível. Durante este processo, designado por ciclo enterohepático, pode existir perda de ácidos biliares (cerca de 5%) através da sua eliminação pelas fezes. Este desequilíbrio é compensado através da produção de mais ácido no fígado, por degradação do colesterol. Neste sentido, com o objetivo de tratar doenças associadas à hipercolesterolemia (elevados níveis de colesterol no sangue) têm sido produzidos fármacos poliméricos que permitem interromper o ciclo enterohepático. Este fármacos, conhecidos por sequestradores de ácidos biliares (BAS), são hidrogéis de base polimérica catiónica que permite formar complexos com as moléculas de ácido biliar ionizadas que se encontram no intestino. Devido ao elevado peso molecular dos polímeros, o complexo polímero-ácido biliar não é reabsorvido pelo intestino, sendo excretados nas fezes. Assim, quanto maior o número de moléculas de ácidos biliares não reabsorvidas, maior a quantidade de ácidos biliares que tem que ser produzida, a partir do consumo de colesterol. Desta forma, o nível de colesterol no plasma sanguíneo é diminuído. Atualmente existem no mercado três fármacos poliméricos aprovados pela Food and Drugs Administration (FDA) no tratamento de hipercolesterolemia: a *Colesteramida*, o *Colespiol* e o *Colesevelam* [21, 22]. Tendo em conta a natureza química dos ácidos biliares, estes fármacos são estruturalmente caracterizados por um balanço adequado de segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos para permitir a interação com a parte esteroide das moléculas de ácidos biliares e, também, por cargas catiónicas para permitirem as interações electrostáticas com as moléculas ionizadas a sequestrar.

O *Colesevelam* é um dos agente BAS mais recentes presente no mercado (pertence à 2ª geração de fármacos desta categoria) e o mais eficaz no tratamento da hipercolesterolemia. A

sua estrutura (Figura 13) é caracterizada por longas cadeias hidrofóbicas espaçadas, amins primárias para permitir interações electrostáticas com os ácidos biliares ionizados e amins quaternárias que estabilizam o hidrogel [21, 22].

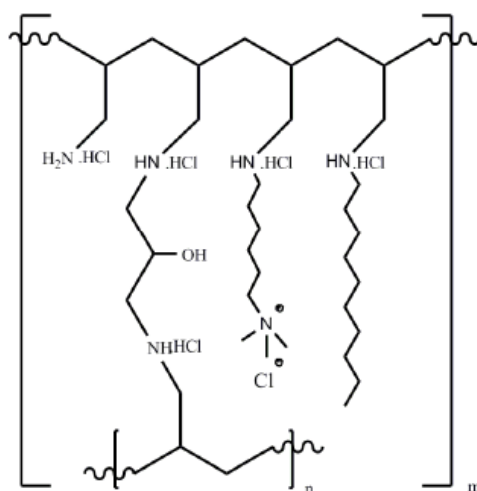


Figura 13 - Estrutura química de *Colsevelam* [23].

Atualmente a a síntese destes fármacos sequestradores de ácidos biliares recorre exclusivamente a processos de polimerização radicalar livre, nos quais não existe qualquer tipo de controlo sobre estrutura e peso molecular dos polímeros. No entanto, sabe-se que a eficiência destes fármacos está dependente do tipo de estrutura do polímero base (por exemplo posição relativa dos grupos catiónicos na estrutura polimérica) [24]. Assim, com o intuito de garantir um controlo sobre a estrutura molecular do polímero, peso molecular e polidispersidade pretendeu-se, neste projecto, sintetizar um novo polímero por polimerização radicalar viva que seja viável para substituir as formulações dos agentes sequestradores de ácidos biliares comerciais, nomeadamente o *Colesevelam*. Sendo o peso molecular dos polímeros de BAS determinante para a eficiência dos fármacos simulou-se os dados da patente de *Colesevelam* para determinar o peso alvo dos polímeros a sintetizar por LRP. Nesta patente, depois de se obter o polímero por FRP é necessário reticulá-lo e proceder ao processo de alquilação do hidrogel para testar as suas propriedades farmacológicas e compará-las com o fármaco comercial. Estes dois últimos procedimentos (reticulação e alquilação descritos na patente) serão seguidos para os polímeros de LRP. Neste sentido, será possível uma comparação entre os resultados do fármaco original e os dos polímeros obtidos por LRP, nas três etapas essencial de síntese de um BAS (polimerização, reticulação e alquilação).

Secção II
Parte Experimental

2.1. Materiais

O hidroxietil acrilato (HEA) (Sigma-Aldrich; $\geq 99\%$), o hidroxietil metacrilato (HEMA) (Sigma-Aldrich; $\geq 99\%$) e a alilamina (AlA) (Sigma-Aldrich; $\geq 99\%$) foram passados por uma coluna de alumina/areia para remover o inibidor de radicais antes de cada utilização. Brometo de cobre (II) (CuBr_2) (Acros, 99+% extra puro; anidro), dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich, 99,8%), dimetilsulfóxido deuterado ($d_6\text{DMSO}$) (Eurisotop; +1%TMS), DMSO (Acros, 99,8+% extra puro), água deuterada (D_2O) (Eurisotop; +1%TMS), clorofórmio deuterado (CDCl_3) (Eurisotop; +1%TMS), etil 2-bromo-2-metilpropionato (EBiB) (Sigma-Aldrich, 99%), acetato de etilo (Acros; 99,5%), solução de formaldeído (Sigma-Aldrich; reagente ACS, 37% em peso em H_2O) ácido fórmico (Sigma-Aldrich; ACS reagente; $\geq 88,0\%$), cloreto de metileno (Sigma-Aldrich; purum; $\geq 98, 0\%$ GC), hidróxido de sódio (Panreac; pellets), sulfato de sódio (Sigma-Aldrich; reagente ACS, $\geq 99,0\%$, pó anidro), tris (2-aminoetil) amina (TREN) (Aldrich, 96%), biperidina (Sigma-Aldrich, $\geq 98,0\%$) e ferro de valência zero (Acros; pó 99%; -70 mesh) foram utilizados como recebidos. Me_6TREN foi sintetizado de acordo com procedimentos descritos na literatura [25, 26]. Epicloridrina (Aldrich; $\geq 98,0\%$ GC), o 1,4-butanodiol diglicidil éter (Aldrich; $\geq 95\%$) e o 1,2-etanodiol diglicidil éter (Sigma-Aldrich; 99,5%, anidro), isopropanol (Sigma-Aldrich; 99,7%, anidro), metanol (Sigma-Aldrich; 99,8%, anidro) e dihidrogenofosfato de sódio foram utilizados como recebidos na síntese de hidrogéis.

2.2. Técnicas

Esta secção tem como objetivo dar a conhecer os conceitos básicos das técnicas utilizadas neste trabalho para a caracterização das amostras preparadas, bem como, as condições em que foram executadas e as principais características de cada equipamento.

2.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN é uma das técnicas mais informativas e das mais utilizadas para o estudo da estrutura molecular de um composto. A análise pode ser feita diretamente a partir de um líquido puro, a partir de uma solução ou a partir de um sólido. Os solventes utilizados para este tipo de análises, principalmente para o estudo de prótons, são solventes com uma

percentagem muito baixa de prótons de modo a que não haja interferência com os elementos em análise. Para tal recorre-se a solventes deuterados tais como D₂O, CDCl₃ ou d₆DMSO [27]. A teoria de RMN diz que qualquer núcleo com *spin* pode ser estudado por esta técnica espectroscópica. Assim, todos os núcleos que tenham número de massa ímpar ou número atómico ímpar (por exemplo ¹H, ²H, ¹³C, ¹⁴N e ¹⁷O), possuem *spin*, isto é têm momento angular. Neste trabalho apenas irá ser abordada a técnica de RMN para ¹H [27].

Para se obter um espectro de RMN de uma determinada amostra, esta é colocada no campo magnético de um espectrómetro, e sobre ela incide um campo de radiofrequência. Aumentando o campo magnético o detector detecta a excitação dos núcleos, o que resulta numa absorção de energia no campo de radiofrequências. Como resultado, obtém-se um gráfico de voltagem induzida *versus* varrimento do campo magnético, o espectro de RMN [27]. Para a análise destes gráficos é necessário ter em conta que: a área de cada pico depende do número total de núcleos que estão a oscilar; que a intensidade do campo necessária para a absorção de energia por um determinado próton depende do seu ambiente mais próximo (estrutura molecular); e que se um próton tem *n* prótons equivalentes (prótons equivalentes ocupam ambientes idênticos) em carbonos adjacentes, a sua absorção será dividida em *n*+1 picos [27]. Assim, um espectro de RMN fornece três tipos de informação sobre uma amostra em estudo: (i) o deslocamento químico de um multipeto, que diz o ambiente do próton envolvido; (ii) a área do pico, que revela o número de prótons envolvidos e (iii) a multiplicidade, que indica quantos prótons vizinhos existem.

Numa primeira fase, com o intuito de confirmar a estrutura dos polímeros e de avaliar a eficiência das sínteses de LRP executadas, realizaram-se estudos de RMN ¹H a 400MHz, com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e com D₂O ou d₆DMSO (dependendo da solubilidade do polímero) como solvente das amostras em análise. Adicionalmente, as amostras que envolviam os estudos cinéticos com poli hidroxietil metacrilato (PHEMA) foram analisadas por RMN ¹H a 600 MHz, com TMS como padrão interno e com d₆DMSO como solvente das amostras. Recorrendo a esta técnica foi então possível estudar as cinéticas executadas, determinando a conversão de monómero por integração de dois picos, um característico do monómero e outro polímero, no software MestRenova versão 6.0.2-5475. A Equação 12 ilustra o cálculo utilizado para determinar a conversão de monómero na síntese LRP de PHEMA. Para tal seleccionou-se os picos característicos da ligação dupla no monómero a 6,06 ppm e a 5,68 ppm, e o grupo metóxi (O-CH₂) do polímero a 4,09 - 4,12 ppm [28].

$$\text{Convers\~{a}o}_{PHEMA} (\%) = \left(1 - \frac{I(CH_2 = C)/2}{I(CH_2 = C)/2 + I(-OCH_2)/2} \right) \quad 12$$

2.2.2. GPC/SEC - Gel Permeation Chromatography / Size Exclusion Chromatography

A cromatografia de exclusão de tamanhos ou cromatografia de permeação em gel, vulgarmente denominada por GPC é uma técnica largamente utilizada em tecnologia de polímeros para determinação da distribuição de pesos moleculares de polímeros e obter valores para o peso molecular médio numérico (M_n) e para o peso molecular médio ponderal (M_w) [29].

A teoria do GPC/SEC é a separação de moléculas com base no seu raio/volume hidrodinâmico (raio/volume equivalente ao de uma esfera que eluiria no mesmo tempo que a amostra em estudo). Ao atravessarem uma coluna porosa de material polimérico reticulado, as moléculas da amostra são separadas de acordo com o seu volume. Como as partículas de pequeno tamanho da amostra são suficientemente pequenas para entrarem nos poros da coluna, estas são momentaneamente removidas do fluxo principal de solvente (exclusão) ao longo da colunas, pelo que necessitam de mais tempo para atravessar a coluna do equipamento [29].

O esquema que se segue ilustra bem um equipamento típico de GPC.

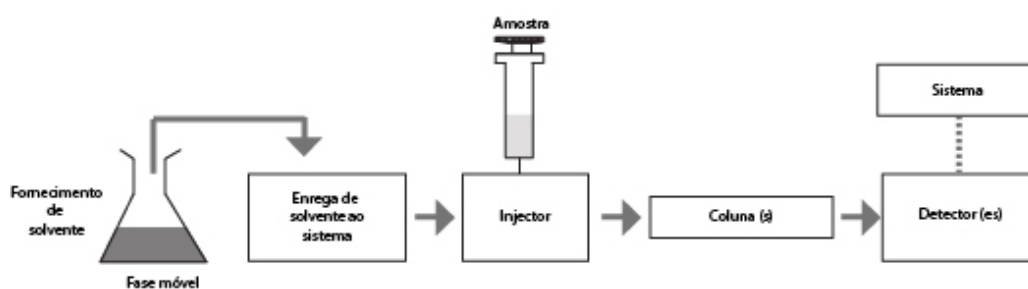


Figura 14 - Esquema representativo de equipamento GPC [29].

A amostra é injetada no sistema, e passa através da(s) coluna(s) onde ocorre o processo de separação por tamanho. Quando a amostra sai da(s) coluna(s) passa através de um detector ou uma série de detectores. A extensão da análise dos dados depende do tipo e do número de detectores usados e juntamente com vários tipos de calibrações e/ou cálculos utilizados pode calcular-se parâmetros como peso molecular, distribuição de peso molecular, viscosidade intrínseca ou a densidade molecular, raio hidrodinâmico, e raio giratório. Para a análise de

GPC ser possível é necessário uma curva de calibração obtida através de padrões de GPC, isto é, a partir de amostras poliméricas de peso molecular conhecido e baixa polidispersividade.

Neste trabalho os parâmetros das amostras foram determinados utilizando Viscotek (detector Dual 270, Viscotek, Houston, EUA) equipado com um viscosímetro diferencial (DV), um *light scattering* (RALLS, Viscotek) e um detector de índice de refração (RI; Knauer K-2301). O sistema de colunas era constituído por uma coluna de guarda PL 10 mm (50x7.5 mm²) seguida por duas colunas MIXED PL-B (300x7.5 mm², 10 mm). Com o auxílio de uma bomba de HPLC (Knauer K-1001) o caudal foi mantido a 1 mL/min. As medições foram realizadas com uma solução a 0,02% de LiBr em DMF a 60° C, usando para o efeito um aquecedor Elder CH-150. O sistema está equipado também com um desgaseificador Knauer on-line. O dn/dc utilizado para as amostras de PHEMA foi de 0,076, com base na bibliografia consultada e na injeção de uma amostra com concentração conhecida de PHEMA puro [28]. O peso molecular (M_n^{GPC}) e a polidispersividade (M_w/M_n) dos polímeros sintetizados foram determinadas recorrendo ao software OmniSEC versão: 4.6.1.354, e utilizou-se a calibração com três detectores (RI, DV e RALLS).

Nas reações de estudos cinéticos deste trabalho após conhecer os parâmetros fornecidos por GPC, e de se determinar previamente a conversão de monómero em cada reação por RMN, foi possível determinar a constante aparente da velocidade da reação (K_p), através da Equação 13, considerando que se trata cinética de primeira ordem.

$$\ln\left(\frac{[M]_0}{[M]}\right) = \ln(1 - \text{conversão}) = k_p t \quad (13)$$

2.2.3. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Em tecnologia de polímeros a espectroscopia MALDI - TOF é uma ferramenta poderosa para a determinação do peso molecular de polímero e que fornecer informações sobre a composição de um sistema polimérico, através da ionização suave da amostra.

A Figura 15 que se segue esquematiza o equipamento típico de espectroscopia de massa MALDI-TOF constituído por um recipiente para amostras, um laser óptico, uma fonte de alta tensão, um tubo de vento, e um detector electrónico para os iões [30].

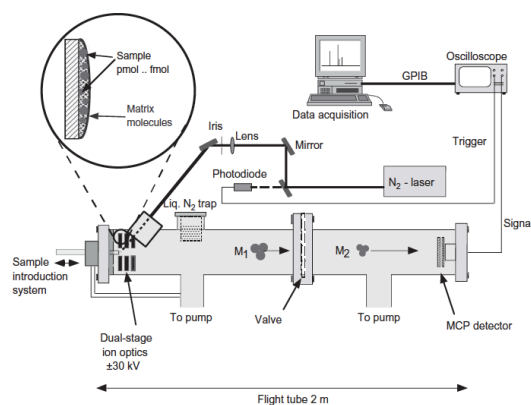


Figura 15 – Esquema de um equipamento típico de espectroscopia de massa MALDI-TOF [30].

Nesta técnica, uma determinada amostra é colocada numa matriz apropriada e sujeita a alto vácuo para ser cristalizada. A ação de um pulso de laser de gás de azoto com determinado comprimento de onda é capaz de ionizar as moléculas da amostra. Esta ação leva à libertação de moléculas e iões da matriz, a partir da placa. Posteriormente os iões são acelerados e um equipamento de análise mede o tempo que as moléculas demoram a percorrer uma determinada distância (analisador TOF) [30].

2.3. Procedimentos experimentais

Esta secção diz respeito aos procedimentos utilizados em todas as atividades laboratoriais envolvidas neste trabalho de investigação.

2.3.1. Síntese do *Colesevelam* por FRP

Com base na informação disponível na patente [23] que descreve a síntese do produto comercial *Colesevelam* sintetizou-se por polimerização radicalar livre o poli(clorohidrato alilamina) (PAIAH). Neste processo utilizou-se 13,1 mL de AIA (monómero) previamente purificado numa coluna de areia/alumina, como iniciador 20,4 mg de AAPH e como solvente 1 mL de água destilada.

Num banho de gelo colocou-se um balão de fundo redondo com 14,4 mL de ácido clorídrico e adicionou-se o monómero gota a gota. Posteriormente, adicionou-se a solução aquosa de iniciador e a reação prosseguiu durante 72 h, a 50 °C. Ao fim de 24 h de reação adicionou-se mais iniciador ao sistema reacional (20,4 mg de iniciador e 1 mL de solvente) e no final da reação adicionou-se 1 mL de água destilada, tal como descrito na referida patente.

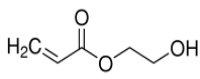
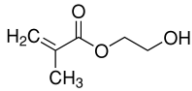
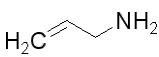
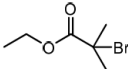
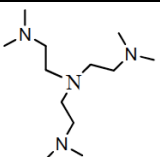
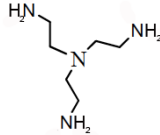
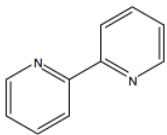

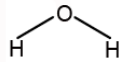
O polímero foi isolado por precipitação em metanol frio. O pó resultante foi filtrado, e o processo de lavagem e filtração foi repetido novamente. Finalmente o pó resultante foi colocado a secar numa estufa de vácuo.

2.3.2. Exemplo de polimerização radicalar viva de PHEMA catalisada por $\text{Fe}_0/\text{CuBr}_2/\text{Me}_6\text{TREN}=1/0,1/1,1$ (DP = 222)

Após passar o monómero HEMA (9,0 mL; 74,4 mmol) numa coluna de areia e alumina para remover o estabilizante preparam-se duas soluções. A primeira, contendo CuBr_2 (7,60 mg; 0,034 mmol), $\text{Fe}(0)$ (18,80 mg; 0,336 mmol), Me_6TREN (85,0 mg; 0,369 mmol) e DMSO (4,5 mL), onde o solvente foi previamente borbilhado em azoto durante cerca de cinco minutos e a segunda com o monómero e o iniciador EBiB (60,30 mg; 0,336 mmol). Depois de preparar o reator Schlenk de fundo redondo por secagem em vácuo, colocaram-se as soluções anteriormente descritas e congelou-se o sistema em azoto líquido. A mistura reacional do reator foi sujeita a um processo de degaseificação, para remover o oxigénio, através de ciclos de congelamento-vácuo-descongelamento e purga com azoto. Finalmente preencheu-se a atmosfera do reator com azoto e colocou-se num banho a 30 °C com 700 rpm, durante cerca de 24 h. Na Tabela 3 encontram-se todos os materiais envolvidos na reações de LRP estudadas.

A escolha dos monómeros teve em conta o objetivo central do trabalho, a síntese de polímeros funcionais com possível aplicação em fármacos sequestradores de ácidos biliares. Neste sentido pretendeu-se obter por LRP polímeros funcionais que apresentem biocompatibilidade com os tecidos vivos, baixa toxicidade, hidrofiliçidade e a presença de grupos hidroxilo com capacidade de funcionalização. Assim selecionaram-se monómeros acrílicos (HEA e HEMA), como consequência da vasta utilização e inúmeras aplicações já existentes para a síntese hidrogéis na indústria farmacêutica e em aplicações biomédicas [16].

Tabela 3 - Compostos envolvidos nas reações de LRP, estudadas.

Monómeros	 HEA	 HEMA	 AIA
Iniciador	 EBiB		
Ligantes	 Me6TREN	 TREN	 Bipiridina
Solventes	 DMSO	 Água	
Catalisador	Fe (0) + Cu(II)Br ₂		

Hidrogéis de acrilatos e de metacrilatos têm sido propostos como potenciais materiais para aplicações farmacêuticas, nomeadamente como sistemas de liberação controlada de fármacos, bioadesivos e como dispositivos segmentáveis de agentes terapêuticos [16]. A alilamina, sendo o monómero utilizado para a síntese do BAS comercial [23] será também objecto de estudo em reações de LRP.

2.3.3. Purificação de monómeros (HEA e HEMA)

Uma vez que os monómeros HEA e HEMA utilizados neste trabalho estão contaminados inevitavelmente com compostos diacrilatos foi necessário previamente purificá-los por forma a evitar a formação de um hidrogel durante a polimerização por LRP. O processo utilizado foi adoptado da literatura [31] e [32], respectivamente para o HEA e o HEMA.

Preparou-se uma solução aquosa de monómero 25 % (v/v) que foi posteriormente lavada cinco vezes com hexano. Por cada litro de solução adicionou-se 250 g de cloreto de sódio, sendo a solução resultante lavada duas vezes com éter etílico. Após adicionar sulfato de cálcio como agente secante e 0,1% de hidroquinona como agente estabilizante, destilou-se a solução no evaporador rotativo por forma a evaporar o éter etílico da solução.

2.3.4. Síntese de Me₆TREN

A síntese de Me₆TREN foi feita com base em informação da literatura [25] [26]. Uma solução de formaldeído (37% w/w, 49,3 mL) e ácido fórmico (88% w/w, 50 mL) previamente agitada foi adicionada, gota a gota, à temperatura de 0 °C, a 10 mL de TREN e de água destilada durante uma hora. De seguida, a mistura foi mantida em refluxo a 95 °C durante 12 h. Com o intuito de remover os compostos voláteis destilou-se a mistura proveniente do refluxo durante 1 h a 70 °C. Ajustou-se o pH da solução castanha resultante até valor de pH superior a 10 com uma solução saturada de hidróxido de sódio. A mistura foi lavada com cloreto de metilo duas vezes, a fase orgânica foi seca, adicionando sulfato de sódio e colocada no evaporador rotativo a 40 °C tendo-se obtido um óleo amarelo. O Me₆TREN foi analisada por ¹H-RMN em 600 Hz para confirmar a sua estrutura. O espectro de RMN do composto sintetizado encontra-se no anexo A.

2.3.5. Cinética PHEMA

A metodologia adoptada para a reacção que envolve a cinética de uma reacção LRP é em toda igual ao já descrito no ponto 2.3.2 referente à polimerização radicalar viva catalisada por metais. No entanto, após colocar o reator no banho de 30 °C, durante a polimerização, vão sendo recolhidas amostras de polímero, em tempos previamente definidos. Para tal, em cada amostra uma agulha é inserida no reator, utilizando um braço lateral com azoto, e uma seringa recolhe o polímero em cada instante de tempo. Este procedimento garante que não ocorre entrada de oxigénio no reator durante a recolha das amostras. Na Figura 16 apresenta-se a montagem utilizada nas reacções de cinética de PHEMA.

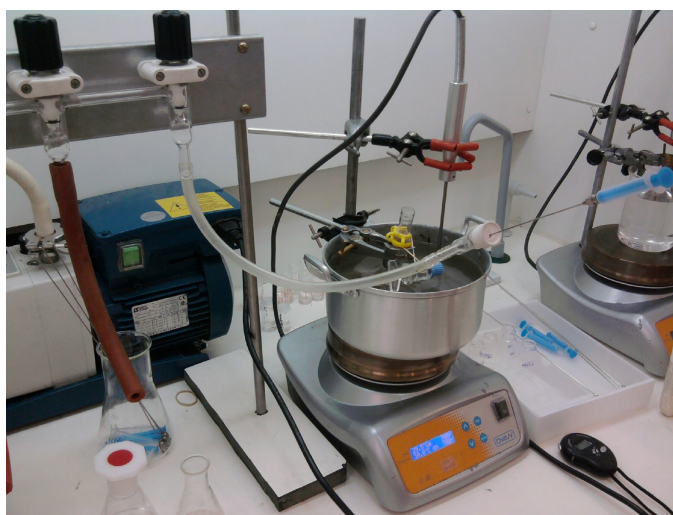


Figura 16 – Montagem utilizada nas cinéticas das reacções de LRP de PHEMA.

É ainda de referir que cada amostra recolhida foi analisada por espectroscopia de RMN ^1H , para determinar a conversão de monómero, e por GPC para determinar o peso molecular e a polidispersividade dos polímeros.

2.3.6. Reiniciação ou copolimerização

Para concretizar esta experiência executou-se o procedimento anterior de LRP (secção 2.3.2), no entanto, o iniciador EBiB foi substituído pelo macroiniciador PHEMA, obtido numa reacção nas seguintes condições $[\text{HEMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Fe}(0)]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{Me}_6\text{TREN}]_0 = 50/1/1/0,1/1,1$ e $[\text{HEMA}]_0/[\text{DMSO}] = 1/1$ (% vol). Assim, após purificar HEMA (1,80 mL; 14,86 mmol) numa coluna de areia e alumina preparou-se o reator Schlenk de fundo redondo, secando em vácuo. De seguida adicionou uma solução de CuBr_2 (0,70 mg; 0,003 mmol), $\text{Fe}(0)$ (1,7 mg; 0,03 mmol), Me_6TREN (7,5 mg; 0,033 mmol) e DMSO (1,8 mL) e outra com o monómero e o macroiniciador PHEMA (60,30 mg; $M_n^{\text{GPC}} = 1,0 \times 10^4$ g/mol; $M_w/M_n = 1,32$). Depois de executar os mesmos procedimentos de degaseificação descritos nas reacções de LRP deixou-se a reacção ocorrer por 24 h a 30 °C e 700 rpm.

2.3.7. Síntese de hidrogéis

Os hidrogéis podem ser preparadas por várias técnicas de polimerização ou por transformação de polímeros existentes [33]. Neste trabalho a síntese de hidrogéis foi feita com base no trabalho desenvolvido por Mandeville [23], que descreve o processo utilizado para a reticulação de polímeros de alilamina que conduz à obtenção de um hidrogel. Assim, pretende-se reticular os grupos amina do polímero, por reacção com um agente de reticulação, em meio básico, à temperatura ambiente, até se obter um gel. Colocando o gel em água e agitando durante algumas horas há a formação de partículas sólidas, que são lavadas em água, em alguns processos de lavagem, e secas em estufa de vazio.

Para cada polímero, sintetizado por FRP ou LRP, preparam-se soluções de 25% de polímero e utilizaram-se três agentes de reticulação a epícloridrina, o éter diglicídico do 1,4-butanodiol e o éter diglicídico do 1,2-etanodiol, com diferentes percentagens de agente. Embora os procedimentos de reticulação sejam semelhantes para os agentes utilizados, há pequenas diferenças que são descritas e seguida.

- **Reticulação com epícloridrina**

Preparou-se uma solução de polímero em água a 25% [23] em massa e ajustou-se o pH da solução a 10 com solução aquosa de hidróxido de sódio. De seguida adicionou-se a epícloridrina como agente de reticulação para diferentes relações de massa de agente reticulante e massa de polímero 5,9% [23], 200% e 975%. Deixou-se a solução em agitação, à temperatura ambiente, até gelificar. Depois de remover o polímero em gel procedeu-se à lavagem com água e as partículas foram recolhidas por filtração. Depois de repetir o processo de lavagem colocaram-se as partículas na estufa de vazio para secagem. Com este procedimento testaram-se os polímeros de polialilamina sintetizada por FRP, bem como, o PHEMA e a PAIA sintetizados por LRP.

- **Reticulação com éter diglicídico do 1,4-butanodiol**

Para os polímero de PAIAH de FRP prepararam-se soluções de 25% [23] (em massa) em água e ajustou-se o pH da solução a 10 com solução aquosa de hidróxido de sódio. Por adição de éter diglicídico do 1,4-butanodiol, como agente de reticulação, a 14% [23] e 975% (massa de agente reticulante/massa de polímero) prepararam-se os hidrogéis, à temperatura ambiente, até gelificar. Depois de remover o polímero em gel procedeu-se à lavagem com água, durante uma hora, e as partículas foram recolhidas por filtração. O procedimento de lavagem foi executado por duas vezes e o produto final foi seco a vácuo durante alguns dias para garantir a ausência de água.

- **Reticulação com éter diglicídico do 1,2-etanodiol**

O procedimento de reticulação de polímeros de polialilamina com o éter diglicídico do 1,2-etanodiol é idêntico ao do éter diglicídico do 1,4-butanodiol. Neste caso prepararam-se soluções de polímero em água a 25% [23] e a relação de massa de agente/massa de polímero foi de 25% [23] e 975%. A diferença para o agente 1,4-butanodiol diglicidil éter reside apenas no processo de lavagem. Neste caso a lavagem é feita com metanol e após filtração é adicionado água, ficando a suspensão em agitação por uma hora. Após nova filtração o processo de lavagem com água é repetido e adiciona-se isopropanol antes de colocar o hidrogel a secar em vácuo [23].

2.3.8. Testes de Inchaço (*Swelling*)

Com o intuito de avaliar o grau de inchaço dos hidrogéis de PAIA FRP reticulados com epícloridrina, executaram-se testes de swelling. Nestes testes seguiu-se o trabalho desenvolvido por Sadahira [34] para a caracterização e avaliação do perfil de liberação *in vitro* de hidrogéis do álcool polivinílico. Este trabalho avalia a quantidade de água que o hidrogel é capaz de absorver em três soluções fosfato a pH de 3, 6 e 9.

No presente trabalho prepararam-se três pequenos frascos com quantidades de hidrogel semelhantes (≈ 100 mg). Adicionou-se um volume predefinido de solução tampão fosfato a pH 6 (4 mL) e colocaram-se as amostras num shaker (Thermoshake com câmara com temperatura controlada) a 37 °C e 900 rpm durante 25 h. Durante as primeiras 4 h as amostras foram recolhidas em intervalos regulares de uma hora, e o excesso de água superficial retirado com papel de filtro, pesadas numa balança e determinado o grau de inchaço.

- **Preparação da solução tampão fosfato a pH 6**

1,7 g de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) foram pesados e solubilizados em 200 mL de água miliQ à temperatura ambiente. O pH da solução foi ajustado a 6,0 com solução de NaOH a 10 M e o volume da solução foi ajustado com água até perfazer 250mL de solução.

Secção III
Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos todos os resultados obtidos e decisões tomadas no decorrer do trabalho. Esta secção está dividida em três partes fundamentais. A primeira diz respeito à tentativa de sintetizar o fármaco comercial que funciona como agente sequestrador de ácidos biliares, o *Colesevelam*, com base na informação obtida em Mandeville [23]. A segunda parte é relativa à síntese de polímeros por LRP utilizando HEMA, HEA e AIA como monómeros. Nesta parte são abordadas as cinéticas de reação de síntese de PHEMA e discutidos os resultados obtidos quando se variam parâmetros de polimerização, como: grau de polimerização, rácio monómero/solvente e alteração do ligante. Os polímeros obtidos podem vir a ser possíveis candidatos a hidrogéis para agentes BAS e portanto, a terceira parte diz respeito à fase de síntese de hidrogéis a partir dos polímeros obtidos por LRP. A fase de alquilação para obter os agentes sequestrados de ácidos biliares não será abordada neste trabalho por limitação de tempo.

3.1. Polimerização radicalar livre – *Colesevelam*.

Com base na informação da patente do *Colesevelam* [23], a primeira etapa do trabalho foi a preparação deste fármaco polimérico por FRP. Com isto, pretendeu-se desenvolver conhecimento nesta área e determinar as propriedades do polímero, nomeadamente o seu peso molecular dada que esta informação não existia na literatura. Desta forma pretendia-se, posteriormente, proceder à síntese da polialilamina (polímero base do *Colesevelam*) com peso molecular igual ao do polímero comercial, mas seguindo uma nova abordagem baseada em LRP. Esta estratégia permitiria verificar se o controlo sobre o peso molecular (homogeneidade das cadeias) do polímero teria alguma influência na capacidade de sequestração de ácidos biliares.

O procedimento experimental executado para a síntese da PAIAH encontra-se descrito no ponto 2.3.1 deste trabalho e consistiu na reprodução exata procedimento descrito na patente do produto [23]. Segundo a referência, após adição do monómero (AIA) ao ácido clorídrico deve levar-se a mistura ao evaporador rotativo a 60 °C. Ao executar-se este procedimento verificou-se que a solução ficou viscosa. De facto, dada a grande estabilidade do radical alílico é improvável que suceda alguma autopolimerização. A explicação mais plausível é a transformação da amina na forma de hidrocloreto o que aumenta as interações intermoleculares.

Após esta primeira tentativa, foi necessário recorrer a várias alterações ao procedimento devido ao facto dos resultados obtidos não serem de forma alguma concordantes com o que se encontra descrito na patente. A Tabela 4 apresenta as condições de reacção para todas as sínteses de PAIAH por FRP realizadas neste trabalho, definidas com base nos resultados preliminares, bem como os resultados obtidos em termos de processo de obtenção do polímero e peso molecular.

Tabela 4 – Condições das reacções de síntese de PAIAH por FRP e resultados obtidos.

Código experiência	Monómero	Iniciador	Temperatura (°C)	Tempo reacção (h)	Precipitação em metanol frio	Precipitação em hexano frio
COL I	AIA	AAPH ¹	50	72	Não precipitou	Precipitou como óleo
COL II	AIA	AAPH + ANT ²	50	120	Precipitou como pó	-
COL III	AIA	ANT	60	72	Não precipitou	Precipitou como óleo
COL IV	AIA	AAPH	60	72	Não precipitou	Precipitou como óleo
COL V	AIA	AAPH	80	120	Precipitou como pó	Precipitou como óleo

¹Azobis(aminopropano dihidroclorato)

² Akzo Nobel Trigonox ® 187 w-40

Com base nas observações indicadas na Tabela 4 é possível constatar que todas as formulações conduziram à formação de polímero, já que houve sempre precipitação do produto final num não solvente do polímero. No entanto, a necessidade de realizar várias experiências de FRP com diferentes condições surgiu pelo facto de a tentativa de reprodução da patente do *Colesevelam* não ter produzido os resultados esperados. A experiência COLI corresponde à síntese do *Colesevelam* recorrendo ao procedimento descrito na patente, excluindo a parte de levar a mistura inicial ao evaporador rotativo (como descrito anteriormente). A precipitação do polímero em metanol frio (de acordo com o descrito na patente) não resultou. Nesse sentido, duas situações poderiam ter ocorrido, ou não tinha havido polimerização ou o peso molecular era muito baixo.

Tentou-se precipitar o polímero também em hexano visto que é um solvente muito apolar, tendo sido possível obter um precipitado na forma de óleo, o que veio confirmar possibilidade de se tratar de um polímero de baixo peso molecular. Dessa forma, não foi possível isolar o polímero como pó branco tal como descrito na patente. O baixo peso molecular pode ser explicado pela grande estabilidade do monómero na reacção de polimerização. Neste sentido, considerou-se a possibilidade da patente não estar a especificar a temperatura correta de reacção, parâmetro que influencia o peso molecular de polímeros preparados por FRP. Assim, com o objetivo de testar a influência da temperatura da reacção e adicionalmente a obtenção de

polímeros de maior peso molecular realizaram-se diversas experiências (COL II, COL III, COL IV e COL V) utilizando diferentes temperaturas e um iniciador mais rápido que o AAPH. Com estas experiências pretendeu-se verificar qual o peso molecular da PAIAH necessário para que se consiga obter um pó no processo de precipitação, aproximando-nos assim das condições da patente.

Uma vez obtido o polímero COL I (após 72 h de reação) adicionou-se um novo iniciador disponível no laboratório, Akzo Nobel Trigonox®187-w40 (ANT), ao sistema com o intuito de testar um iniciador com tempo de meia vida inferior (1 h a 56 °C, e AAPH tem um tempo de meia vida de 10 h a 56 °C). A reação prosseguiu por mais 48 h (num total de 120 h), tendo-se obtido uma mistura reacional visualmente semelhante à COL I. No entanto, quando precipitada em metanol a frio formou-se um pó branco, o que sugere que o peso molecular obtido é maior do que o obtido em COL I. Este resultado demonstra que de facto as condições de reação descritas na patente não deverão estar corretas, uma vez que não permitem obter o polímero na forma desejada. A introdução de um iniciador mais rápido permitiu criar mais radicais à temperatura de reação em causa, e com isso iniciar mais cadeias poliméricas.

Tendo em consideração este resultado, para verificar a eficácia deste novo iniciador procedeu-se à síntese do COL III e COL IV nas mesmas condições em termos de quantidades de monómero e à temperatura de 60 °C mas com diferentes iniciadores (COL III utilizou-se o AAPH em COL IV utilizou-se o ANT). Nestas experiências os polímeros continuaram a precipitar como óleo em hexano e não houve qualquer formação de sólido em metanol. No entanto, quanto se simulou os dados da patente, variando apenas a temperatura da reação de 50 para 80 °C a situação alterou-se e verificou-se a formação de partículas sólidas quando se precipitou a solução com polímero a metanol frio. Dado que a temperatura de polimerização têm um influência decisiva no peso molecular dos polímeros preparados por FRP, era um objetivo inicial deste trabalho preparar a PAIAH, seguindo o procedimento da patente, para que fosse possível depois determinar o peso molecular do polímero. Esse valor seria importante para definir o peso molecular alvo a atingir por LRP. Nesse sentido, seria possível então comparar influência do controlo do peso molecular no desempenho do BAS para o mesmo peso molecular alvo. Recorrendo ao produto comercial é impossível determinar o valor de peso molecular dado que o polímero na forma comercial já se encontra reticulado o que impossibilita as determinações por GPC.

A Figura 17 que se segue apresenta o espectro RMN em água deuterada da reação de *Colesevelam* a 80 °C.

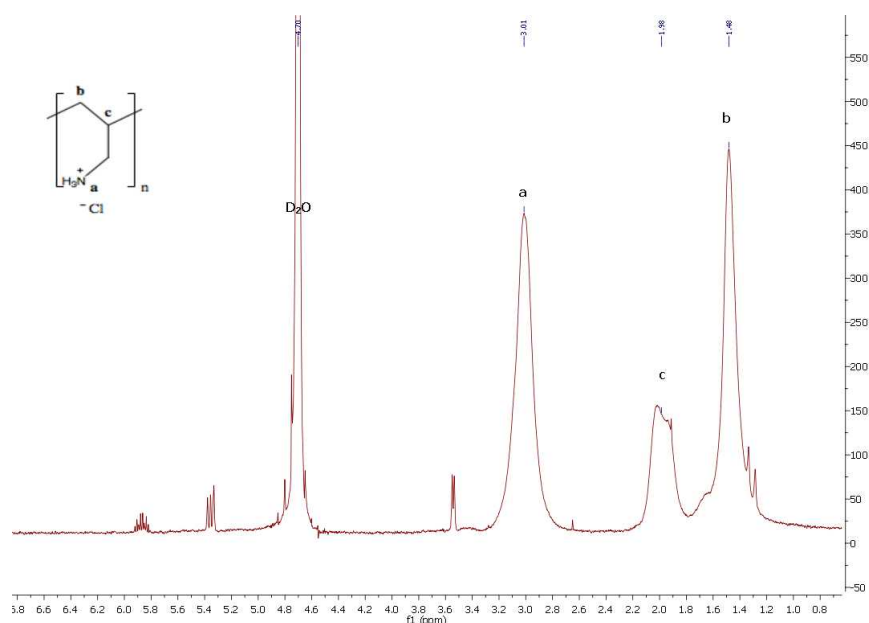


Figura 17 - Espectro RMN ^1H a 600 MHz de PAIAH a 80°C por 72 h (COLV) em D_2O .

Analisando o espectro de RMN da Figura 17 é possível observar três sinais de absorções de prótons do polímero de PAIAH. O sinal a $\delta=1,48$ ppm (b) é consequência do desvio referente aos prótons presentes no grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) na cadeia principal do polímero e o sinal a $\delta=1,98$ ppm (c) corresponde ao grupo $-\text{CH}-$ da mesma cadeia. No que diz respeito, ao grupo $-\text{CH}_2-$ ligado ao grupo característico das polialilaminas (NH_2) é responsável pelo sinal a $\delta=3,01$ ppm (a). O facto de este último grupo estar associado a um átomo de maior electronegatividade (átomo de azoto) provoca um efeito de desblindagem e aumenta o deslocamento químico [35]. O sinal adicional a $\delta=4,20$ ppm é característico do solvente utilizado para preparar a amostra, a D_2O . Os sinais referidos anteriormente para a PAIAH são os mesmos encontrados na literatura [35].

3.2. Polimerização radicalar viva (LRP)

Com o objetivo de controlar o peso molecular, a distribuição de pesos moleculares, a estrutura, a arquitetura e a funcionalidade dos polímeros que possam ser usados em agentes sequestradores de ácidos biliares, estudou-se a síntese de três polímeros por ATRP.

Neste trabalho serão apresentados e discutidos os sistemas de ATRP aplicados à síntese de PHEA, PHEMA e PAIA, com grau de polimerização (DP) de 222, em dois solventes diferentes, água e DMSO. As reações foram catalisadas por metais de ferro ($\text{Fe}(0)$) e cobre (Cu(II)Br_2), utilizando EBiB como iniciador, na presença de diferentes ligantes (Me_6TREN , TREN) à temperatura ambiente.

Importa salientar, que devido aos resultados promissores obtidos na polimerização do HEMA em DMSO, esta reação foi estudada em termos cinéticos para vários DP (50, 222), diferentes relações $V_{\text{monómero}}/V_{\text{solvente}}$ (1:1, 1:2) e testando dois ligantes (Me_6TREN e a biperidina). Para avaliar o carácter vivo dos polímeros PHEMA foram analisados os dados de RMN para identificar o terminal ativo de cadeia e foi realizada uma experiência de reiniciação utilizando como macroiniciador PHEMA-Br resultante de uma reação ATRP.

3.2.1. Síntese de PHEA, PHEMA e PAIA por LRP

O sistema catalítico utilizado no presente trabalho, $\text{Fe}(0)/\text{CuBr}_2/\text{Me}_6\text{TREN} = 1/0,1/1,1$, foi desenvolvido recentemente por nos laboratórios do DEQ/FCTUC [8]. A sua escolha foi feita com base nas características do sistema nomeadamente, a utilização de baixas quantidades de cobre como catalisador, o recurso a um outro catalisador ($\text{Fe}(0)$) biocompatível (característica fundamental para possível implementação em fármacos).

Neste capítulo serão estudadas uma série de polimerizações com $\text{DP}=222$, $[\text{monómero}]_0/[\text{solvente}] = 2/1$ (% v/v), que ocorreram durante 24 h a 30 °C e 700 rpm (Tabela 5). O valor de 222 é um valor tipicamente usado na literatura para estudos de polimerização do acrilato de metilo, e foi utilizado neste trabalho para que se pudesse comparar mais facilmente o resultados obtidos.

Tabela 5 – Experiências de LRP executadas com DP de 222.

Código Experiência	Monómero	Iniciador	Sistema catalítico	Ligante	Solvente
BAS 01	HEA	EBiB	$\text{Fe}(0)$ e CuBr_2	Me_6TREN	DMSO
BAS 02	HEA	EBiB	$\text{Fe}(0)$ e CuBr_2	TREN	Água
BAS 03	HEMA	EBiB	$\text{Fe}(0)$ e CuBr_2	Me_6TREN	DMSO
BAS 04	HEMA	EBiB	$\text{Fe}(0)$ e CuBr_2	TREN	Água
BAS 05	AIA	EBiB	$\text{Fe}(0)$ e CuBr_2	Me_6TREN	DMSO

Os monómeros HEA e HEMA foram selecionados para este sistema, tendo em conta a aplicação final, por diversas razões: dado o seu potencial demonstrado em aplicações farmacêuticas [14] (libertação controlada de fármacos) e em formulações de hidrogéis (lentes de contacto) [14]; dado que possuem grupos $\sim\text{OH}$ na sua estrutura que podem ser funcionalizados; e o facto das estratégias de LRP descritas na literatura para estes monómeros não permitem obter polímeros com baixa polidispersividade [32].

Segundo Coca e colaboradores [31] a síntese de PHEA por ATRP a 90 °C, utilizando CuBr como catalisador, metil 2-bromopropionato como iniciador e biperidina como ligante,

conduziu a polidispersividades elevadas (superiores a 1,6). Pretendeu-se, assim, estudar a viabilidade do sistema catalítico desenvolvido por Mendonça [8] para a síntese destes polímeros.

No que diz respeito a alilamina, é um monómero difícil de polimerizar por FRP e apenas se produzem oligómeros para baixos rendimentos, dado que ocorrem reações de auto-terminação entre os átomos de hidrogénio alílicos e os radicais [35]. No entanto, pretendeu-se estudar a viabilidade do mesmo sistema catalítico de LRP na medida em que a PAIAH é o polímero que está na base do agente sequestrador de ácidos biliares mais eficiente no mercado, o *Colesevelam*.

A escolha do iniciador é um factor de extrema importância em LRP uma vez que é este que determina a estrutura de um dos terminais do polímero, determina a reactividade inicial (abstração do halogéneo) e a sua estrutura necessita de ser compatível com o monómero a polimerizar. O iniciador selecionado neste sistema é o etil 2-bromoisobutirato (EBiB), que se tem revelado eficiente na iniciação de acrilatos e metacrilatos [8, 36].

Tipicamente, em ATRP utiliza-se um complexo de cobre(I)X/Ligante (X: halogéneo; L: ligante) como ativador da reação de polimerização. Este reage reversivelmente com as espécies dormentes do sistemas para gerar o desativador Cu(II)X₂/L e produzir um radical (R•). O radical propaga-se por adição de mais monómero (M) até reagir com o desativador e ocorrer a reação de desativação, formando de novo a espécie dormente e o ativador Cu(I)X/L [28]. Para o sistema em estudo utiliza-se como catalisadores o CuBr₂ que atua como desativador de radicais em crescimento e o Fe(0) que se pensa servir de ativador inicial de espécies dormente e agente oxidante que regenera o ativador Cu(I)Br durante a polimerização [8], na presença de Me₆TREN. O esquema que se segue ilustra o possível mecanismo das reações ocorridas no processo catalisado por Fe(0)/CuBr₂/Me₆TREN.

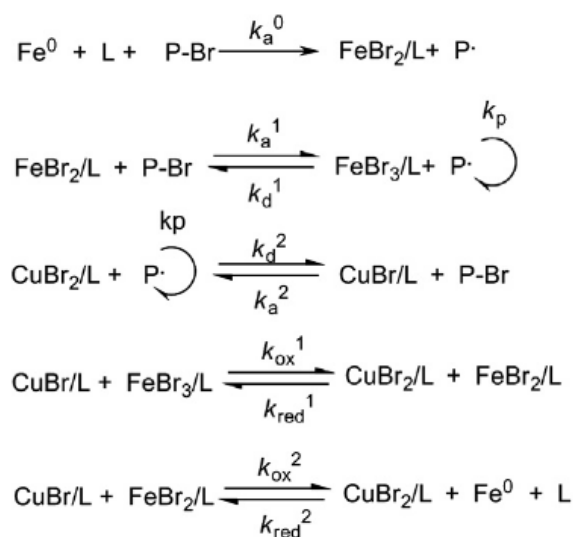


Figura 18 - Mecanismo de reação sugerido para polimerização viva catalisada por Fe(0)/CuBr₂/Me₆TREN [37].

A escolha do solvente para um sistema deste tipo deve ter em conta alguns aspetos fundamentais. O solvente tem que minimizar a transferência de cadeia para si próprio, ter a menor interação com o sistema catalítico (a estrutura do catalisador pode mudar com a presença de diferentes solventes) e conduzir ao menor número de reações colaterais [38]. O DMSO foi utilizado como solvente, porque promove reações LRP muito rápidas [8, 36]. Neste trabalho, como os monómeros acrílicos em estudo são solúveis em água, este solvente foi também testado com o sistema catalítico. Neste caso, trata-se de uma mais valia em termos ambientais tendo em conta uma futura implementação em processo industrial.

Relativamente aos ligantes, o Me₆TREN tem sido usado em combinação com catalisadores à base de cobre, conduzindo a bons resultados em termos de controlo da polidispersividade dos polímeros, para a polimerização de acrilatos em DMSO [8, 36]. Como uma das funções do ligante é dissolver o catalisador no meio reacional, nas reações em água optou-se por escolher um ligante mais hidrofílico (TREN) que também se tem revelado eficiente na polimerização de acrilatos [8, 36].

Nas primeiras experiências de LRP desenvolvidas neste trabalho para os sistemas de HEA e HEMA em DMSO e água (BAS 01, 02, 03 e 04 na Tabela 5) executou-se o procedimento descrito em 2.3.2. Para as polimerizações de HEA e HEMA em DMSO (BAS 01 e BAS 02 na Tabela 5) verificou-se que a solução ficou muito viscosa logo nos primeiros instantes da reação e que, após tentar dissolver os polímeros finais em DMF (bom solvente dos polímeros PHEA e PHEMA), estes inchavam e não se dissolviam. Após consulta bibliográfica, verificou-se que os grupos de investigação de Coca [31] e Beers [32] referiam que este tipo de monómeros vêm normalmente contaminados com espécies de diacrilatos. Esta contaminação dos monómeros conduziu, não à formação de um polímero após 24 h de reação, mas sim à

formação de um hidrogel. Com base neste resultado foi necessário purificar inicialmente os monómeros (descrito em 2.3.3) para se poder obter polímeros lineares durante as reações de LRP. Neste ponto é importante referir que, para garantir a reprodutibilidade de todos os trabalhos laboratoriais com estes monómeros (HEA e HEMA), foi purificada uma quantidade suficiente para todas as experiências. A ausência de impurezas prejudiciais às sínteses por LRP foi confirmada por RMN. Para evitar que ocorresse qualquer reação de polimerização durante o armazenamento dos reagentes adicionou-se hidroquinona, como inibidor de radicais. Importa referir que este composto é removido do monómero durante a de purificação que é efectuada imediatamente antes das reações, com o recurso a colunas de alumina/areia. Após a purificação dos monómeros, executou-se novamente os procedimentos de LRP (ponto 2.3.2) para cada sistema apresentado na Tabela 5. Na Tabela 6 estão apresentadas as principais observações deste trabalho, as condições de cada amostra para RMN e GPC, e os resultados obtidos.

Tabela 6 – Observações, condições de RMN, de GPC e resultados de peso molecular para as polymerizações de HEA, HEMA e AIA por LRP, utilizando $\text{Fe}(0)/\text{CuBr}_2/\text{Me}_6\text{TREN} = 1/0,1/1,1$ como sistema catalítico a 30 °C durante 24 h. $\text{DP} = 222$ e $[\text{solvente}]/[\text{monómero}]_0 = 1/2$ (v/v).

Código das Experiências	BAS 01 HEA/DMSO	BAS 02 HEA/Água	BAS 03 HEMA/DMSO	BAS 04 HEMA/Água	BAS 05 AIA/DMSO
Cor da solução	Vermelha	Verde	Verde	Castanho	Azul
Observações	Magneto parado em 2h	Magneto parado em 2h	Magneto parado em 2h	Magneto parado em 2h	
Solvente RMN	d_6 -DMSO	d_6 -DMSO	d_6 -DMSO	d_6 -DMSO	d_6 -DMSO
Solvente GPC	DMF	DMF	DMF	DMF	DMF
M_n Teórico (para 100% de conversão)	25 000	25 000	25 000	29 000	19 000
M_w/M_n	*	*	1,14	**	***
M_n GPC	*	*	44 000	**	***

* Ver resultados qualitativo na Figura 19

** Não foi possível determinar

*** Ver resultados qualitativo na Figura 23

No que se refere à cor solução, achou-se pertinente colocar este parâmetro como observação para cada experiência uma vez que está relacionado com o estado de valência dos catalisadores metálicos presentes no sistema. Como descrito na literatura [37], o uso do sistema catalítico Fe(0)/CuBr₂/Me₆TREN na polimerização do metacrilato em DMSO (condições semelhantes à experiência BAS 01) conduziu a uma solução verde, dado à presença de CuBr₂ no sistema. O perfil característico de absorvância do complexo foi confirmado por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis). No entanto, no presente trabalho, em BAS 01 a solução ficou vermelha, pelo que pode ter havido formação de outros estados de valência de cobre. Assim, o mecanismo de reação proposto para polimerizações catalisadas por Fe(0)/CuBr₂/Me₆TREN pode sofrer alguma alteração quando aplicado aos monómeros em estudo neste trabalho. Dado a limitações de tempo, não foi possível fazer estudos de espectroscopia UV-Vis para perceber que espécies metálicas estariam presentes nas diversas polimerizações. Assim, este estudo deverá ser tido em conta em trabalhos futuros para uma melhor compreensão do mecanismo de reação para este sistema catalítico, consoante as condições de polimerização.

Como já referido, no final de cada reação procedeu-se à análise de cada amostra de solução. Através de análise de GPC, preparada em solução de DMF, pretendeu-se avaliar a formação ou não de polímero, e qual o peso molecular e polidispersividade obtidos. Nesta etapa surgiram algumas limitações, dado que não foi possível encontrar na literatura valores de dn/dc para todos os polímeros em estudo, nas condições de operação do GPC (solvente: DMF; T = 60 °C). O dn/dc é um parâmetro que descreve a variação do índice de refração com a variação da concentração de polímero no solvente e é essencial para o cálculo do peso molecular. Quando não existe informação sobre este parâmetro, a única via que permite determinar o peso molecular por GPC é a a preparação de uma solução de polímero purificado e de concentração exata. No caso deste trabalho, também não foi possível isolar alguns polímeros de forma conveniente a obter produtos puros. O único polímero para o qual se obteve valor de dn/dc foi o PHEMA. Assim, pretendeu-se recorrer a uma técnica alternativa de determinação de peso molecular de polímeros, a espectroscopia de massa MALDI-TOF, no entanto, os resultados não chegaram a tempo da entrega deste trabalho.

Apesar destas limitações, para o PHEA é possível fazer uma análise qualitativa da polidispersividade, por comparação com o cromatograma obtido para o PHEMA (BAS 03) que apresenta $M_w/M_n = 1,14$ (Figura 19).

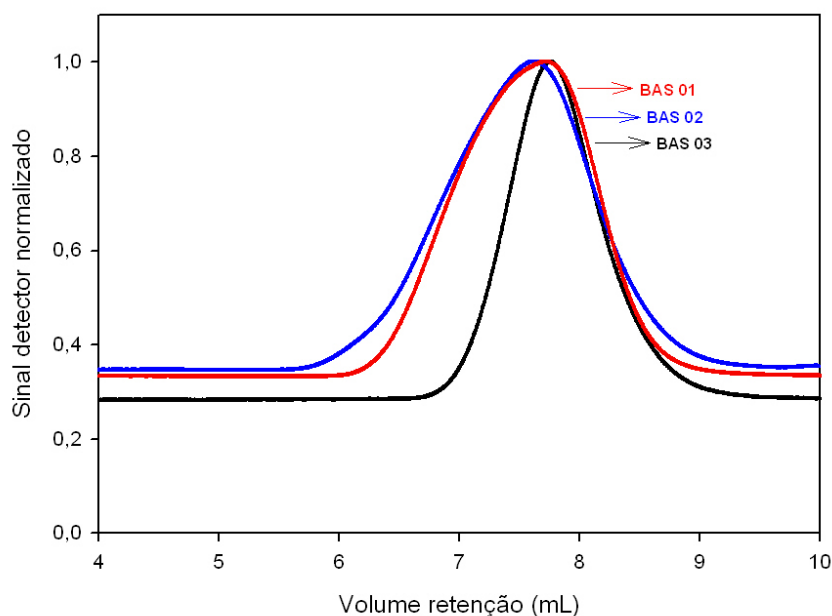


Figura 19 - DP normalizado em relação ao volume de retenção. Reação de PHEA em DMSO (BAS 01), de PHEA em água (BAS 02) e de PHEMA em DMSO (BAS 03), com M_w/M_n (BAS 03) = 1,14.

Como é possível observar através da Figura 19, a polidispersividade e o peso molecular do PHEA obtido usando DMSO (BAS 01) ou água (BAS 02) como solvente de reação não difere muito, já que os cromatogramas estão praticamente coincidentes. Assim, pode dizer-se que neste caso o solvente da reação não teve influência sobre o grau de controlo sobre o peso molecular e sobre a conversão final de monómero atingida na polimerização do PHEA. Relativamente à polidispersividade, verifica-se que esta é superior à do PHEMA (BAS 03), pois os cromatogramas apresentam uma distribuição de pesos moleculares com maior abertura do que a do anterior. Uma possível explicação para este resultado é o facto do monómero HEA (radical secundário) ter uma velocidade de propagação superior à do HEMA (radical terciário), o que faz com que a diferença entre a velocidade do ciclo de ativação/desativação, que mantém o equilíbrio dinâmico LRP, não seja suficiente para promover um controlo eficaz sobre o crescimento das cadeias.

Para além da determinação de pesos moleculares, recorreu-se a análises de RMN a fim de confirmar as estruturas poliméricas obtidas nas reações.

Na Figura 20, 21 e 22 encontram-se representados os espectros de RMN do PHEA, PHEMA e PAIA.

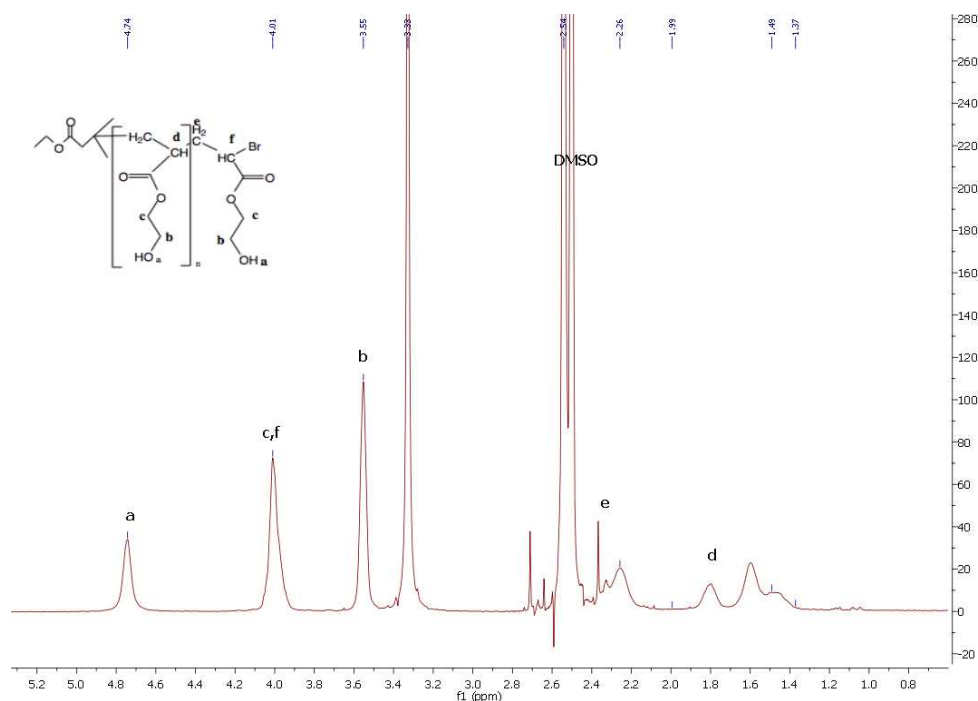


Figura 20 - Espectro RMN ^1H a 600 MHz de PHEA em $\text{d}_6\text{-DMSO}$, obtido por LRP a 30 °C durante 24 h (BAS 01).

A figura 20 representa o espectro de RMN de PHEA obtido nas condições de reação de BAS 01 (30 °C, 24 h, DMSO como solvente). A polimerização de HEA para obter o PHEA ocorre como consequência da reação dos grupos vinílicos, pelo que na estrutura do polímero ocorre a repetição de grupos $-\text{CH}_2-$ na cadeia principal, juntamente com o grupo $-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ lateral. A análise de RMN em DMSO revela a presença de: um sinal (a) a $\delta=4,74$ ppm que corresponde ao hidrogénio do grupo $-\text{OH}$; dois sinais (c) e (b) a $\delta=4,01$ ppm e $\delta=3,55$ ppm que correspondem aos grupos $-\text{CH}_2-$ do hidroxietil. A $\delta=4,20$ ppm seria espectável a presença de (f) que corresponde ao $-\text{CH}_2-$ ligado ao terminal ativo [39], no entanto, este sinal encontra-se no mesmo desvio do $-\text{CH}_2-$ de (c). O sinal (e) a $\delta=2,26$ ppm representa o grupode $-\text{CH}_2-$ da cadeia principal do polímero e finalmente em (d) a $\delta=1,00$ ppm encontra-se o sinal $-\text{CH}-$ da cadeia principal. Adicionalmente a $\delta=2,55$ ppm e a $\delta=3,35$ ppm encontram-se os picos de solventes da reação e monómero, DMSO e água, respetivamente. Os sinais obtidos foram idênticos aos descritos por Cocca [31] e Vargun [40].

O espectro de RMN do PHEMA (BAS 03) preparado a 30 °C em DMSO encontra-se na Figura 21.

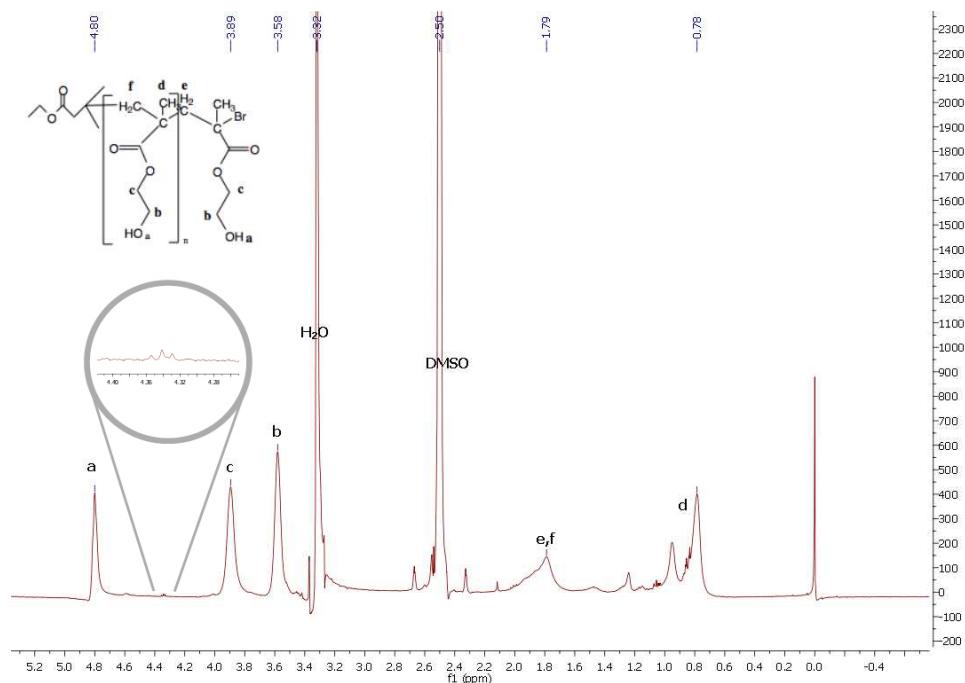


Figura 21- Espectro RMN ^1H a 600 MHz de PHEMA em d_6DMSO , obtido por LRP a 30°C durante 24 h (BAS 03).

Analisando a figura anterior são notórias as semelhanças com o gráfico de RMN de PHEA. A diferença reside essencialmente na presença de um grupo metil, na posição (d) a $\delta=0,78$ ppm. Tal facto já seria de esperar na medida em que a única diferença entre BAS 01 e BAS 03 reside no monómero, em que HEMA possuiu um $-\text{CH}_3$ ao contrário do que acontece no HEA.

Na posição de $\delta=4,35$ ppm supõe-se que o sinal corresponde ao terminal ativo de cadeia, no entanto este não foi possível confirmar na literatura. Adicionalmente, realizou-se uma reação de extensão de cadeia (ver discussão na secção 3.2.3 que se segue), onde foi possível comprovar a presença do terminal ativo no polímero, na medida em que, se obteve um copolímero com peso molecular superior ao que esteve na sua origem (PHEMA, BAS 03).

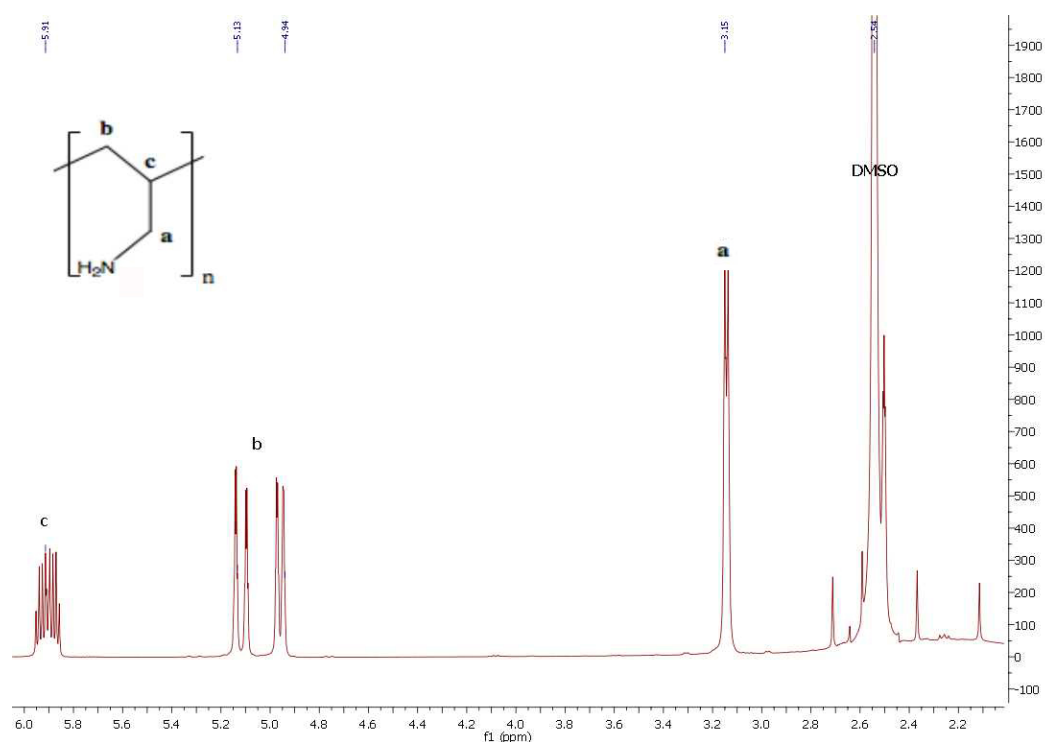


Figura 22 – Espectro RMN ^1H a 600 MHz de PAIA em $d_6\text{DMSO}$, obtido por LRP a 30 °C durante 24 h (BAS 05).

O espectro de RMN da PAIA obtida por ATRP a 30 °C ao fim de 24 h encontra-se na Figura 22. É possível identificar três sinais característicos do polímero e um sinal característico do solvente deuterado a $\delta=2,55$ ppm. O sinal do $-\text{CH}_2-$ ligado ao grupo amina aparece em (a) para $\delta=3,15$ ppm. Os sinais a $\delta=4,94\text{-}5,13$ ppm (b) e a $\delta=5,91$ ppm (c) são respectivamente os prótons dos grupos $-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}-$ da cadeia principal do polímero.

Dado que no ponto referente à polimerização radicalar livre da PAIAH, uma das experiências que permitiu precipitar o polímero na forma de pó (após precipitar solução em metanol) foi a que simula os dados da patente mas com temperatura de 80 °C, achou-se pertinente realizar uma reação LRP de AIA a 80 °C. Desta forma, poderia comparar-se os resultados com FRP a 80 °C e LRP a 30 °C, e assim verificar influência da técnica de polimerização usada e da variação da temperatura, respetivamente, nas propriedades do polímero. Na Tabela 7 encontram-se referidas as condições de reacção de cada experiência.

Tabela 7 – Estudo Comparativos de reações de alilamina FRP e LRP a 30 e 80 °C.

Código Experiência	Técnica de polimerização	Monómero/solvente	Temperatura reacção (°C)	M_n alvo (g/mol) (conv=100%)
BAS 05	LRP	AIA/DMSO	30	19 000
BAS 06	LRP	AIA/DMSO	80	20 000
COL V	FRP	AIA/água	80	-

Injetando uma amostra de final de reação (após 24 h) de experiência LRP da alilamina a 80 °C (BAS 06) no equipamento de GPC verificou-se a existência de polímero pelo aparecimento de um pico no cromatograma (Figura 23), no entanto este não precipitou em metanol frio sob a forma de pó.

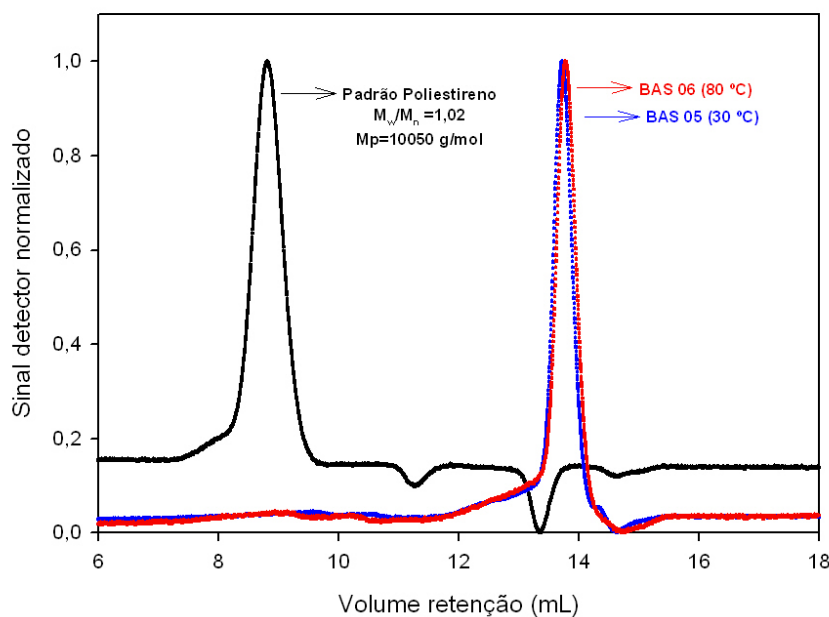


Figura 23 – RI normalizado em relação ao volume de retenção. Padrão de poliestireno com $M_p=10050$ g/mol e $M_w/M_n=1,02$ e PAIA por LRP em reação a 30 °C (BAS 05) e a 80 °C (BAS 06).

Com base nos dados qualitativos obtidos para o peso molecular do polímero verifica-se que em LRP, um aumento da temperatura não conduziu a diferenças significativas no peso molecular do polímero, já que os cromatogramas dos polímeros obtidos a 30 °C e 80 °C são coincidentes. Este resultado seria de esperar uma vez que nos mecanismo de LRP o peso molecular teórico é definido apenas pela razão entre a concentração de monómero e a concentração de iniciador. A temperatura de polimerização influencia apenas a velocidade de polimerização uma vez que altera a constante de equilíbrio entre as espécies dormentes e o radicais ativos em crescimento. Este fenómeno não ocorre por exemplo na polimerização por FRP, uma vez que tipicamente as temperaturas mais elevadas favorecerem reações secundárias (e.x transferência de cadeia para o monómero) o que diminui o peso molecular final. Este efeito é tanto mais pronunciado quanto mais instável for o radical em crescimento. Para radicais muitos estáveis como os alílicos (ex: PAIA) a influência da temperatura no peso molecular não é muito pronunciada. Ao contrário, em radicais resultantes de monómeros não ativados (ex: cloreto de vinilo) o efeito da temperatura é bastante pronunciado.

Considerando o peso alvo dos polímeros (indicado na Tabela 7), a conversão de monómero atingida ao fim das 24 h deve ser baixa, pois o pico do cromatograma saiu num volume de

eluição muito inferior a um padrão de PS de peso molecular 10 050 g/mol. No que diz respeito à polidispersividade, esta parece ser muito baixa por comparação com a curva do padrão de PS (Figura 23), que é uma das principais características que se espera de um polímero produzido por LRP. No entanto, será necessário proceder à optimização do sistema catalítico para a polimerização da AIA a fim de tentar aumentar a conversão de monómero final atingida.

3.2.2. Estudo cinético da LRP catalisada por metais de PHEMA

Neste tópico do trabalho serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para três cinéticas realizadas para a reação de HEMA em DMSO, onde se executou o procedimento descrito em 2.3.5. Neste estudo comparativo, fez-se variar o DP, a relação monómero/solvente e o ligante utilizado. Na Tabela 8 estão indicadas as condições de cada reação.

Tabela 8 – Condições das cinéticas de LRP de PHEMA em DMSO, a 30 °C.

Código Experiência	[HEMA]/[DMSO] (%v/v)	DP	Iniciador	Sistema catalítico	Ligante
BASK I	2:1	222	EBiB	Fe(0) e CuBr ₂	Me ₆ TREN
BASK II	1:1	50	EBiB	Fe(0) e CuBr ₂	Me ₆ TREN
BASK III	1:1	222	EBiB	Fe(0) e CuBr ₂	Me ₆ TREN
BASK IV	1:2	222	EBiB	Fe(0) e CuBr ₂	Bipiridina

A escolha do HEMA para este estudo foi feita tendo em conta o objetivo central do trabalho, a síntese de polímeros funcionais com possível aplicação em fármacos BAS. Sendo o HEMA um monómero já muito utilizado para formulações de hidrogéis para a indústria farmacêutica, apresenta biocompatibilidade com os tecidos vivos, baixa toxicidade, hidrofiliidade e a presença de grupos hidroxilo com capacidade de funcionalização [15], pode ser um potencial candidato para formulações de agentes BAS. Importa referir que por limitações inerentes à determinação do incremento de índice de refração (dn/dc) dos polímeros, valor necessário para o cálculo do peso molecular utilizando o algoritmo do TriSEC, é necessário purificar o polímero e injetá-lo com concentração conhecida. No decurso do trabalho e por limitações relacionadas com tempo, só foi possível purificar o PHEMA e determinar o seu valor dn/dc para as condições operatórias utilizadas no GPC (solvente DMF e T = 60 °C). Para os outros polímeros em estudo não foi possível determinar valores de dn/dc nem encontrá-los referenciados na literatura. Estudos futuros permitirão preparar pesos molecular suficientemente grandes de forma a isolar os polímeros e proceder ao cálculo do dn/dc.

Assim, as experiências indicadas na Tabela 8 descrevem as polymerizações do HEMA catalisadas pelos metais Fe(0) e Cu₂Br e iniciada por EBiB em DMSO a 30 °C. Este sistema foi utilizado com o intuito de determinar o seu potencial na polymerização controlada do PHEMA e, também, para comparar os resultados obtidos com os descritos na literatura relativamente à LRP do HEMA catalisada por cobre [32]. Os dados obtidos para pesos moleculares teórico e experimental (GPC e MALDI-TOF), de polidispersividade (M_w/M_n), de conversão de monómero no final da reação e da constante aparente de velocidade (k_p^{app}) são apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados obtidos para as cinéticas de LRP de PHEMA em DMSO a 30 °C.

Código	Rácios espécies químicas ¹	[HEMA] ₀ / [DMSO] (%Vol.)	Tempo de reação (min)	M _n Teórico (g/mol)	M _n GPC (g/mol)	M _w /M _n	Conversão ² (%)	k _p ^{app} (min ⁻¹)
BASK I	222/1/1/0,1/1,1	2/1	90	2,9x10 ⁴	2,7x10 ⁴	1,28	78,7	0,012
BASK II	50/1/1/0,1/1,1	1/1	180	7,0x10 ³	1,0x10 ⁴	1,32	91,4	0,008
BASK III	222/1/1/0,1/1,1	1/1	150	2,9x10 ⁴	5,6 x10 ⁴	1,08	78,6	0,010
BASK IV	222/1/1/0,1/1,1	2/1	90	2,9x10 ⁴	-	-	-	-

¹[HEMA]₀/ [EBiB]₀/[Fe(0)]₀/[CuBr₂]₀/[Me₆TREN]₀ para BASK I, II e III e [HEMA]₀/ [EBiB]₀/[Fe(0)]₀/[CuBr₂]₀/[Bipiridina]₀ para BASK IV

²Conversão de PHEMA determinada por RMN

- **Estudo cinético de reação típica de LRP de HEMA. $V_{0\text{HEMA}}/V_{\text{DMSO}} = 2/1$, DP = 222 e Me₆TREN como ligante (BASK I)**

A reação realizada no estudo cinético BASK I é em tudo idêntica às reações de LRP já efetuadas no ponto anterior deste trabalho, e que demonstraram sucesso na obtenção de polímeros.

A Figura 24 apresenta os dados cinéticos obtidos para a experiência BASK I, nomeadamente a conversão de monómeros ao longo do tempo (Figura 24 a), bem como a evolução do peso molecular experimental (M_n^{GPC}) e a polidispersividade (M_w/M_n) com o peso molecular teórico (M_n^{th}) (figura 24 b).

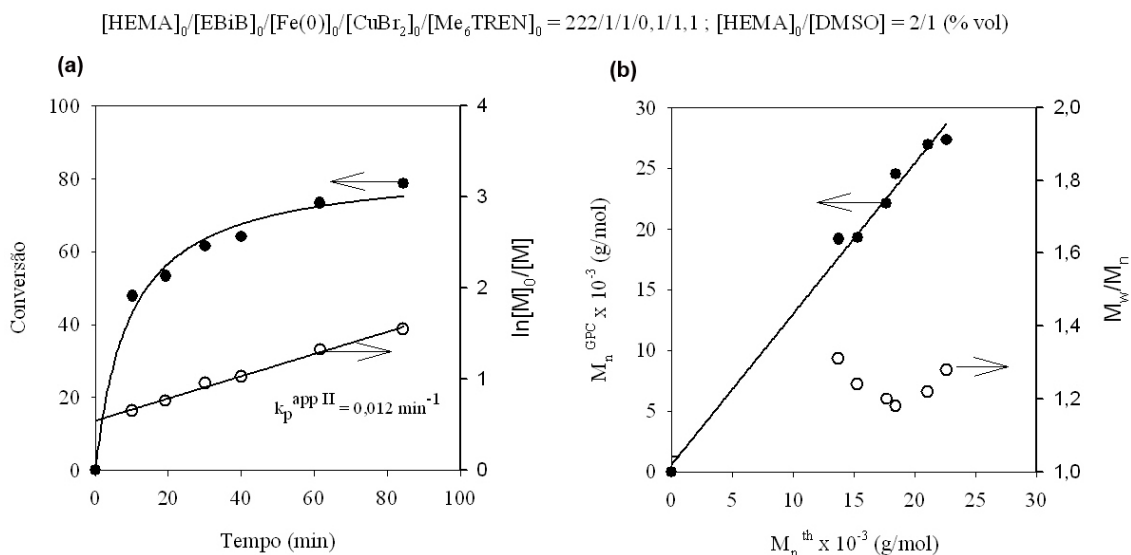


Figura 24 - Representação gráfica da conversão e $\ln([M]_0/[M])$ em função do tempo (a) e de M_n^{GPC} e M_w/M_n em função de $M_n^{\text{teórico}}$ para reação de polimerização de PHEMA catalisada por Fe(0) e CuBr₂ a 30°C em DMSO nas seguintes condições $[\text{HEMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Fe}(0)]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{Me}_6\text{TREN}]_0 = 222/1/1/0,1/1,1$ e $[\text{HEMA}]_0/[\text{DMSO}] = 2/1$ (% vol).

A reação de polimerização foi conduzida durante noventa minutos, tendo-se atingido uma conversão de monómero de 80%. Ao longo do tempo de reação a viscosidade do meio foi aumentado pelo que foi cada vez mais difícil recolher as amostras do reator. No que diz respeito, à evolução de $\ln([M]_0/[M])$ com o tempo de reação é linear em dois períodos diferentes. O primeiro período ocorre até aos 10 minutos de reação e o segundo a partir deste. Como consequência seriam de esperar dois parâmetros de velocidade distintos para cada período, no entanto como nos primeiros 10 minutos de reação apenas foi recolhida uma amostra não é possível determinar este parâmetro. Para o segundo período obteve-se uma constante aparente de velocidade de $0,012 \text{ min}^{-1}$. A estes dois períodos estão também associados dois momentos com conversão de monómero numa cinética de primeira ordem. Ao primeiro período, desde o início da reação até 50% de conversão, segue-se um período mais lento, que atinge 80% de conversão em 80 minutos.

Em 1999 foi publicado um estudo de polimerização ATRP de HEMA por Beers [32]. Neste artigo, há um estudo de reações de síntese de PHEMA, num sistema catalítico homogêneo com 2,2-bipiridina como ligante, CuBr como catalisador, e etil 2-bromoisobutiurato (BriB) como iniciador, no seguinte rácio de espécies químicas $[\text{HEMA}]_0/[\text{BriB}]_0/[\text{CuBr}]_0 = 100/1/1$. As reações de PHEMA com DMF como solvente foram realizadas com sucesso, no entanto, à temperatura ambiente e para uma diluição de 80% em DMF, a reação foi lenta (obtenção de 90% conversão completa de monómero em 65 h de reação) [32]. Neste estudo as reações foram realizadas em DMF (à temperatura ambiente e a 50 °C), e os resultados mostram

claramente uma curvatura na representação de $\ln([M]_0/[M])$ em função do tempo, o que indica a ocorrência de reações de terminação devido a reações paralelas [32]. Este efeito foi significativamente maior quando a reação ocorreu a 50 °C já que não se obteve mais de 30% de conversão [32].

No que diz respeito ao presente trabalho, para a reação de PHEMA em DMSO a 30 °C para o sistema catalítico em estudo obteve-se tal como Beers [32] uma curva quando se representou $\ln([M]_0/[M])$ em função do tempo.

No que diz respeito à polidispersividade dos polímeros obtidos no trabalho citado, estes valores foram aumentando de forma constante com a conversão ($1,2 \leq M_w/M_n \leq 1,8$) [32], o que não é de esperar de um sistema bem controlado.

Os valores de polidispersividade obtidos com o sistema catalítico desenvolvido por Mendonça [8, 19, 37] (Figura 24 b) estão compreendidos entre 1,18-1,32, pelo que se obtém um maior controlo sobre o crescimento das cadeias de PHEMA. Outra vantagem deste sistema face aos reportados na literatura [28, 32] para a LRP do PHEMA é o facto de ser realizado à temperatura ambiente.

Analisando ainda a variação do peso molecular experimental em função do peso molecular teórico é possível verificar que esta relação é linear. No entanto, existe um pequeno desvio em relação à reta ideal, bisetrix do quadrante, devido também às determinações destes valores estarem afetadas pelos erros das técnicas de RMN e GPC.

- **Estudo cinético de reação de LRP de HEMA. Variação de $V_{0\text{HEMA}}/V_{\text{DMSO}} = 1/1$ e de $DP = 50$. (BASK II)**

Com o intuito de avaliar a eficiência do controlo do peso molecular de PHEMA com estes sistema catalítico, realizou-se uma experiência com um DP baixo. Sendo as cadeias finais de polímero pequenas, qualquer diferença no seu tamanho irá produzir grandes desvios na polidispersividade final do polímero. Como esta reação em teoria é mais rápida que a de DP = 222 (BASK I), e esta última apresentou cerca de 50% de conversão de monómero em 10 min (Figura 24 a) decidiu-se aumentar a quantidade de solvente em relação à de monómero usado na reação (velocidade de reação diretamente proporcional à concentração de monómero). Esta escolha iria permitir a eficiente recolha de amostras durante toda a reação, caso contrário a viscosidade iria aumentar muito e não seria possível seguir a reação.

A Figura 25 representa a conversão de monómero ao longo do tempo de reação e a evolução da cinética de primeira ordem (Figura 25 a), bem como, a evolução do peso molecular experimental (de GPC) e da polidispersividade com o peso molecular teórico (figura 25 b) para a reação ATRP de BASK II, HEMA em DMSO.

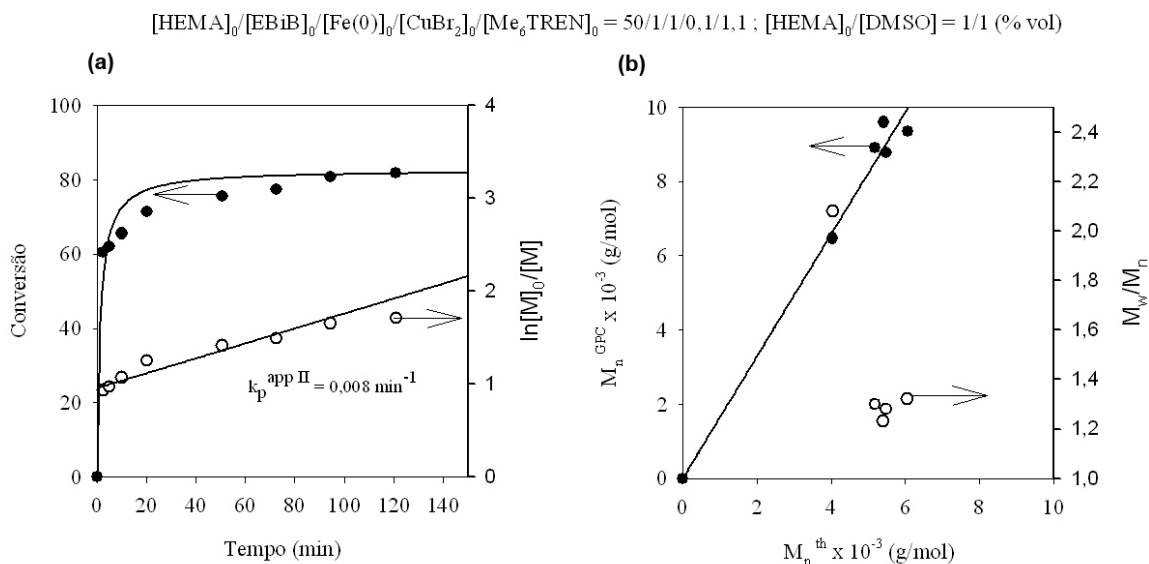


Figura 25 - Representação gráfica da conversão e $\ln([M]_0/[M])$ em função do tempo (a) e de M_n^{GPC} e M_w/M_n em função de $M_n^{teórico}$ para reação de polimerização de PHEMA catalisada por Fe(0) e CuBr₂ a 30°C em DMSO nas seguintes condições $[HEMA]_0/[EBiB]_0/[Fe(0)]_0/[CuBr_2]_0/[Me_6TREN]_0/[HEMA]_0/[DMSO] = 50/1/1/0,1/1,1$ e $[HEMA]_0/[DMSO] = 1/1$ (% vol).

Com o intuito de atingir a conversão completa de monómero a reação de BASK II em estudo foi prolongada por 150 min, comparativamente com a reação BASK I, já que o sistema usado tinha maior quantidade de solvente o que reduz a velocidade de reação. Verifica-se, pela análise da Figura 25 a) que a conversão completa de monómero atingiu os 80 %, de igual modo ao verificado para BASK I. O parâmetro referente à constante aparente de velocidade (k_p^{app}) é da mesma ordem de grandeza do obtido em BASK I (k_p^{app} (BASK I) = 0,012 min⁻¹; k_p^{app} (BASK II) = 0,008 min⁻¹). No entanto, estes valores não podem ser diretamente comparados já que as condições de operação, nomeadamente a concentração de monómero, não é a mesma nas duas reações. A cinética BASK II, utilizando um DP muito baixo, permitiu constatar que se continua a ter um bom controlo sobre o crescimento das cadeia, uma vez que a polidispersividade se manteve abaixo de 1,4. Este parâmetro é muito importante pois, como as cadeias poliméricas são muito pequenas (para DP = 50), qualquer diferença no tamanho se iria traduzir num aumento da polidispersividade do polímero. Estes resultados demonstram que o sistema catalítico usado tem potencial para ser usado na polimerização controlada do PHEMA. Com posterior otimização será, certamente, possível diminuir ainda mais o valor de polidispersividade obtido. Outro fator relevante neste sistema é a evolução linear do peso molecular, no entanto continua a verificar-se um afastamento dos valores experimentais (determinado por GPC) dos valores teóricos, tal como na cinética anterior.

• **Estudo cinético de reação de LRP de HEMA. Variação de $V_0 \text{ HEMA}/V_{\text{DMSO}}$ (1/1). (BASK III)**

No sistema anterior (BASK II) fez-se variar dois parâmetros em simultâneo, DP e $V_0 \text{ HEMA}/V_{\text{DMSO}}$. Para analisar qual a influência do volume de monómero em relação ao volume de solvente no sistema catalítico por si só, aumentou-se apenas a quantidade de solvente em relação ao sistema LRP base (BASK I). Os dados cinéticos obtidos apresentam-se na Figura 26.

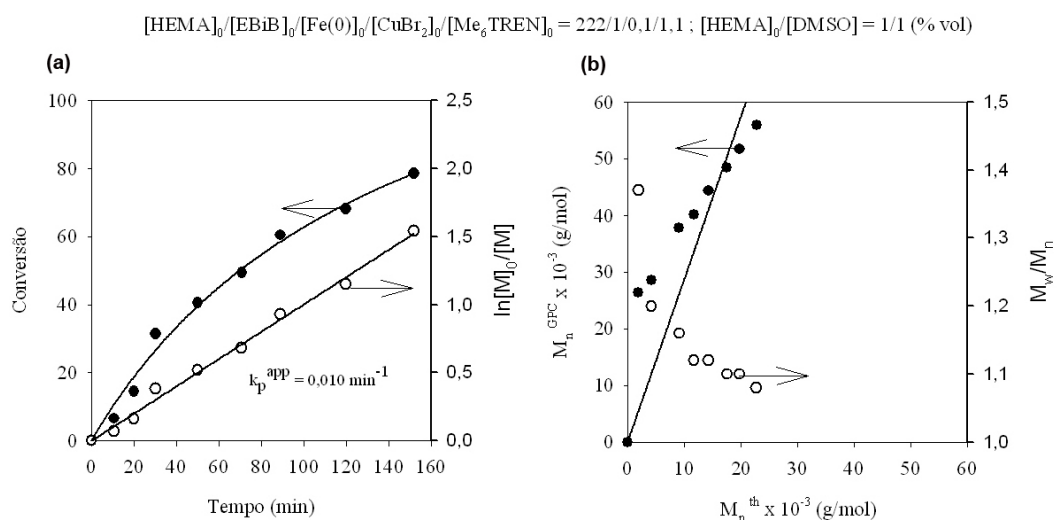


Figura 26 - Representação gráfica da conversão e $\ln([M]_0/[M])$ em função do tempo (a) e de M_n^{GPC} e M_w/M_n em função de $M_n^{\text{teórico}}$ para reação de polimerização de PHEMA catalisada por Fe(0) e CuBr_2 a 30 °C em DMSO nas seguintes condições $[\text{HEMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Fe}(0)]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{Me}_6\text{TREN}]_0 = 222/1/0,1/1,1,1$ e $[\text{HEMA}]_0/[\text{DMSO}] = 1/1$ (% vol).

BASK III é igualmente uma reação de ATRP de HEMA que ocorre a 30 °C em DMSO. Neste sistema variou-se a relação $V_{\text{monómero}}/V_{\text{solvente}}$, adicionando-se igual quantidade volúmica de DMSO e HEMA. Como resultado, a evolução da conversão de monómero ao longo do tempo tornou-se mais lenta, no entanto ao fim de 150 min obtiveram-se os mesmos 80% de conversão, tal como nas reações anteriores. É importante salientar que para todas as condições testadas, a conversão final de monómero manteve-se na mesma ordem de grandeza. Estudos futuros relacionados com a optimização do sistema, nomeadamente relacionados com a variação da temperatura do sistema poderão permitir a obtenção de maior conversão de monómero.

Tendo ainda em conta a representação (a) da Figura 26, é possível constatar que $\ln([M]_0/[M])$ em função do tempo traduz-se numa relação linear, com interseção na origem do referencial, sinal de reação de primeira ordem. Assim, quando o volume de monómero igual ao volume de DMSO houve uma diminuição dos radicais no sistema, pelo que a probabilidade de ocorrência de reação de terminação diminuiu.

Analisando a variação do peso molecular experimental em função do peso molecular teórico é possível verificar que esta relação é linear. No entanto, estes valores apresentam um afastamento da linha teórica maior do que os obtidos nas reações anteriores. Tendo em conta que a polidispersividade do polímero é baixa durante toda a reação (Figura 26 (b)), não deveria de existir uma diferença tão notória. Este facto deve-se a possíveis erros na determinação dos pesos molecular por GPC. Por uma questão de tempo não foi possível explorar esta possibilidade. No entanto, os valores de polidispersividade podem ser tidos em conta para a discussão dos resultados, pois a sua determinação é feita com base na largura do pico obtido no cromatograma e não pelo volume de eluição da amostra. Os valores de polidispersividade obtidos para com este sistema reacional são mais baixos do que os obtidos anteriormente, revelando que a diminuição da concentração de radicais na polimerização do PHEMA permite um melhor controlo sobre o crescimento das cadeias sem sacrificar a conversão de monómero final.

- **Estudo cinético de reação de LRP de HEMA. Variação do ligante (bipiridina). (BASK IV)**

Para avaliar o efeito da natureza do ligante no sistema catalítico em estudo substituiu-se o Me₆TREN utilizado em BASK I por bipiridina, já que este foi o ligante usado por Beers [32] em 1999 com sucesso.

Aplicando o mesmo procedimento que nas cinéticas anteriores verificou-se que, durante o tempo de reação em que foi feita a recolha de amostras (90 min), a viscosidade do meio não se alterou e, por RMN e GPC, não houve formação de polímero. Assim, optou-se por deixar a reação prosseguir até 18 h e analisar-se uma amostra ao fim deste tempo. A Figura 27 que se segue apresenta os dados obtidos no cromatograma de BASK IV ao fim de 18 h e o padrão de poliestireno ($M_p=10050$ g/mol e $M_w/M_n=1,02$) injetado.

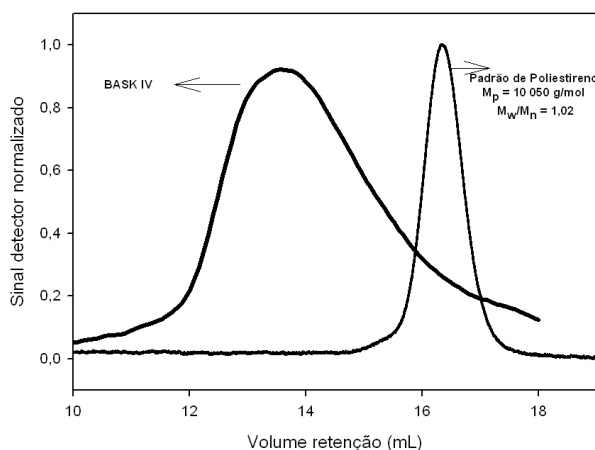


Figura 27 - DP normalizado em relação ao volume de retenção. PHEMA de BASK IV (esquerda) e padrão de poliestireno com $M_p=10050$ g/mol e $M_w/M_n=1,02$ (direita).

Nesta análise (Figura 27), verificou-se no cromatograma de GPC um pico largo quando comparado com o de um padrão de poliestireno, o que denota baixo controlo do peso molecular do PHEMA quando se utiliza a bipyridina como ligante para os catalisadores metálicos em estudo. O peso molecular do polímero não foi possível determinar devido ao elevado ruído presente nos detectores RI e RALLS. Assim, estes resultados permitem comprovar a teoria de que os sistemas catalíticos têm sempre de ser adequados aos monómeros a polimerizar e aos solventes usados, para que se possam obter reações controladas. Neste caso, a bipyridina revelou-se que não é um ligante adequado ao sistema catalítico em questão.

3.2.3. Avaliação do carácter “vivo” do polímero PHEMA

Em LRP uma etapa essencial da síntese de novos polímeros é a avaliação do carácter “vivo” da macromolécula. Para tal, é possível e aconselhável dois tipos de estudos que se complementam identificação do terminal ativo de cadeia e experiência de reiniciação. No entanto a identificação dos terminais activos das cadeias poliméricas por RMN, para este estudo, tal como visto no ponto na secção referente à discussão de síntese de PHEMA por LRP, verificou-se que o pico associado ao terminal ativo não estava claramente separado dos restantes pelo que não é possível garantir o carácter de vida do polímero recorrendo a esta técnica de espectroscopia. Contudo, é importante também referir que a identificação de terminais activos por RMN, não garante por si só, que o polímero é “vivo” dado que, em muitos casos, ser impossível ativar os terminais. A prova inequívoca do carácter vivo, consiste na experiência de reiniciação, que deverá demonstrar o movimento claro da cromatograma para pesos molecular superiores, utilizando o polímero “vivo” como macroiniciador.

Neste trabalho a experiência de reiniciação foi executada tendo em conta o procedimento descrito no ponto 2.3.6, usando como macroiniciador o polímero final obtido na reacção BASK II (tabela 9).

Após a reacção de reiniciação que durou 24 h a 30 °C procedeu-se à análise de GPC das duas amostras, ou seja, do PHEMA-Br macroiniciador e do PHEMA resultante da reacção de extensão de cadeia. Os resultados encontram-se ilustrados na Figura 28, na qual se representou o grau de polimerização normalizado em relação ao volume de retenção.

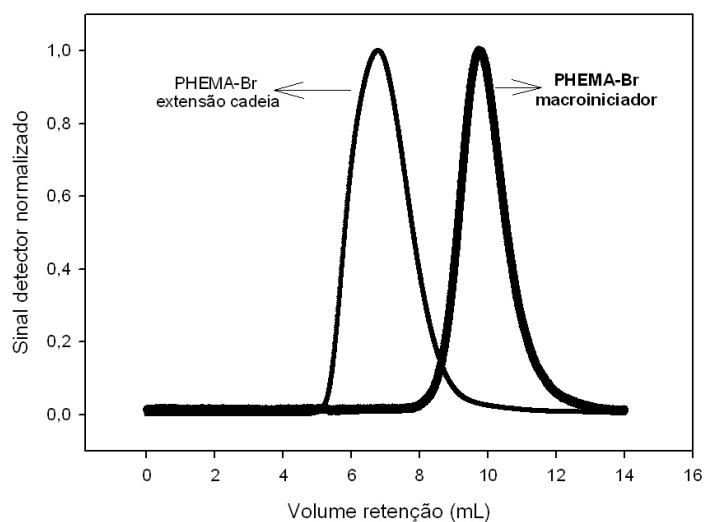


Figura 28 - DP normalizado em relação ao volume de retenção. Reação de extensão de cadeia (esquerda) PHEMA-Br macroiniciador (direita).

Com base Figura 28 é possível verificar o deslocamento da curva inicial de PHEMA-Br macroiniciador para valores de pesos moleculares superiores. Este facto permite garantir a iniciação eficiente do polímero e portanto, o carácter “vivo” dos polímeros produzidos pelo sistema ATRP testado neste trabalho. Assim, estes polímeros podem ser utilizados para a preparação de copolímeros.

3.3. Síntese de Hidrogéis

Sendo o objetivo deste trabalho a síntese de hidrogéis, a etapa posterior à síntese dos polímeros foi a sua reticulação. Para tal foi necessário em primeiro lugar eliminar impurezas do polímero, nomeadamente solventes, catalisadores e monómero, através da purificação do polímero. Os polímeros PHEA e PHEMA produzidos em DMSO por LRP, foram dissolvidos em etanol para lavagem e a solução resultante foi precipitada em hexano. Repetiu-se o procedimento de lavagem com etanol e passou-se a solução em coluna de areia/alumina para eliminar vestígios de catalisadores. Finalmente, precipitaram-se os polímeros em hexano sob a forma de pó. O sólido resultante foi posteriormente colocado na estufa para secar.

Para os estudos de reticulação foram utilizados os polímeros de PAIA, PHEA e PHEMA produzidos por LRP. Este último polímero, resultou de uma experiência de estudo cinético (BASK I, secção 3.2.2) após purificação por meio de diálise numa membrana apropriada, seguido de liofilização.

Nesta etapa de reticulação utilizou-se o procedimento da patente do *Colesevelam* (experiência H01) e introduziram-se novas percentagens de agente de reticulação para cada um, dado que não foi possível obter nenhum hidrogel, quando a patente foi seguida na íntegra. A Tabela 10

apresenta todos os polímeros produzidos por LRP e FRP que se tentaram reticular com recurso a três agentes de reticulação (a epiclorigirina, o 1,4-butanodiol diglicidil éter e o 1,2-etanodiol diglicidil éter) em meio básico (pH =10).

Tabela 10 – Condições de reações de reticulação executadas à temperatura ambiente.

Código	Polímero	Reação obtenção polímero	Solvente	Agente	Polímero em solução % (m/v)	Agente em polímero % (m/m)	Observações de reação
H 01	PAIAH	COL I	Água	Epicloridrina	25	6,6	Não se formou hidrogel
H 02	PAIAH	COL I	Água	Epicloridrina	4,0	975	Formação de um gel
H 03	PAIAH	COL I	Água	Epicloridrina	25	960	Formação de um gel
H 04	PAIAH	COL II	Água	Epicloridrina	25	998	Formação de um gel
H 05	PAIAH	COL I	Água	1,4-butanodiol diglicidil éter	25	15,0	Não se formou hidrogel
H 06	PAIAH	COL I	Água	1,4-butanodiol diglicidil éter	25	936	Formação de um gel
H 07	PAIAH	COL I	Água	1,2-etanodiol diglicidil éter	25	25,0	Não se formou hidrogel
H 08	PAIAH	COL I	Água	1,2-etanodiol diglicidil éter	25	972	Formação de um gel
H 09	HEMA	BAS 03	DMSO	Epicloridrina	40	7,00	Não se formou hidrogel
H 10	HEMA	BAS 03	DMSO	Epicloridrina	26	192	Não se formou hidrogel
H 11	PAIA	BAS 05	Água	Epicloridrina	4,0	975	Não se formou hidrogel

Ao executar o procedimento de reticular descrito na seção experimental deste trabalho nem sempre foi possível obter hidrogel em todas as reações e nos casos em que houve formação de fases distintas durante a reação de reticulação, nem sempre foi possível isolar o hidrogel com facilidade. Nos processos em que houve formação de fases distintas após o processo de lavagem, consoante o agente de reticulação utilizado, apenas foi possível isolar e secar o hidrogel produzido por COL II em 25% de água obtido com recurso a 998% de agente de reticulação em relação à massa de polímero (experiência H04). O hidrogel resultante foi isolado e seco numa estufa de vazio a fim de remover todos os solventes presentes.

Normalmente nos estudos de capacidade de inchaço (ou *swelling*), procede-se à análise da quantidade de água absorvida por, no mínimo, três amostras de material de massa semelhante nas mesmas condições. Isto deve-se ao facto de a reticulação, muitas vezes, não ser homogénea em todo o material e portanto o resultado obtido a partir da média dos três ensaios é mais representativo de todo o hidrogel do que seria obtido apenas com uma única amostra. Para avaliar o grau de inchaço do hidrogel poder-se-ia ter feito um estudo mais aprofundado em diferentes pH's, ou seja para o pH ácido do estômago e por exemplo para dois pH's do intestino ($6 < \text{pH} < 9$), a fim de se simular as condições do trato gastrointestinal. No entanto,

como a quantidade de hidrogel obtido no processo de reticulação era reduzida para preparar 9 amostras e dado o curto tempo deste trabalho, apenas foi possível estudar o grau de inchaço do hidrogel de H04 para um pH =6). Assim, simulando as condições do intestino com uma solução tampão de dihidrogenossulfato de sódio a pH = 6, recolheram-se quatro amostras durante quatro horas de contato do hidrogel com o fluido, num shaker a 37 °C e 900 rpm. O período de tempo selecionado para fazer esta análise foi de 4 h, tempo máximo de digestão humana, ao qual se adicionou uma última recolha ao fim de um dia em contacto com o meio aquoso para verificar a evolução da capacidade de inchaço [30]. Os resultados obtidos neste estudo encontram-se registados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados de teste de *swelling* em solução de dihidrogenossulfato de sódio a pH 6, num shaker a 37 °C e 900 rpm.

Tempo (h)	Grau de inchaço (%)			Média	Desvio Padrão
	I	II	III		
1	16,55	8,56	14,89	13,33	4,21
2	15,71	9,07	13,62	12,80	3,40
3	18,38	7,46	11,81	12,55	5,49
4	19,43	6,91	7,42	11,25	7,08
25	25,21	11,41	24,34	20,32	7,72

Como é possível verificar através da análise dos dados da Tabela 11, o hidrogel de PAIAH obtido por FRP não apresenta uma reticulação homogénea em toda a sua massa, confirmado pelas diferenças significativas existentes no valor da capacidade de inchaço para as várias amostras analisadas. Para além disso, a capacidade de inchaço assume sempre um valor inferior a 25%, valor mínimo típico apresentado por hidrogéis, podendo ser consequência da grande quantidade de agente reticulante usada no processo de reticulação, conduzindo à formação de uma estrutura rígida. A utilização desta quantidade de agente reticulante foi adaptada de um trabalho similar descrito na literatura [41], depois de se ter verificado que a quantidade descrita na patente do *Colesevelam* não se revelou eficiente na reticulação da PAIAH sintetizada (com peso molecular provavelmente inferior à do polímero comercial). Assumindo que a informação da patente está correta, pode dizer-se que o peso molecular do polímero tem influência no processo de reticulação do mesmo, tendo que se ajustar a quantidade de agente reticulante para que se atinjam as propriedades de *swelling* desejadas. Apesar destes resultados serem muito preliminares, achou-se pretinente colocar esta informação no relatório já que permite perceber que é necessário trabalhar no procedimento experimental descrito na patente do *Colesevelam*, de modo a conseguir-se reproduzir o produto final.

Secção IV
Conclusões e Trabalho Futuro

4.1. Conclusões

No que diz respeito à preparação do hidrogel *Cosevelam* não foi possível reproduzir os resultados descritos na patente existente, mesmo seguindo todos os procedimentos descritos.

Realizaram-se experiências adicionais para obter mais informações sobre a utilização de AIA como monómero e testou-se diferentes temperaturas e iniciadores. Com estas experiências foi possível confirmar que a AIA é um monomero muito estável e que apenas se forma um polímero de maior peso molecular quando se utiliza temperaturas elevadas (80 °C) ou quando se utilizam dois iniciadores na reação de FRP.

Para LRP o sistema Fe(0)/CuBr₂/Me₆TREN em estudo foi aplicado com sucesso para as polimerizações dos monómeros HEA, HEMA e AIA. Os resultados obtidos para a reação de PHEMA, na presença de um solvente polar (DMSO), revelaram-se promissores dadas as baixas polidisperssividades, pelo que se fizeram estudos cinéticos. Como resultados obtiveram-se sempre polímeros com pesos moleculares controlados ($M_w/M_n < 1,5$) nas reações de polimerização utilizando EBiB como iniciador. O carácter vivo de PHEMA foi confirmado por uma reação de extensão cadeia com sucesso. Os estudos cinéticos permitiram também concluir que a bipyridina não é um ligante adequado ao sistema catalítico em questão.

A etapa de reticulação para obtenção de hidrogéis constituiu uma primeira abordagem ao método, não se obtendo resultados promissores nesta fase.

Com este trabalho foi possível sintetizar polímeros que podem ser usados como BAS dadas as suas características, mas são ainda necessários mais ajustes experimentais para que se possa obter o *Colesevelam* comercial e otimizar o sistema catalítico metálico para a polimerização LRP de monómeros solúveis em água, nomeadamente da PAIA.

4.2. Trabalho Futuro

Relativamente à parte do trabalho dedicado à reprodução da patente do *Colesevelam*, através da polimerização da AIA por FRP, em estudos futuros deve proceder-se à execução de reações a diferentes temperaturas, entre 30 °C e 80 °C, a fim de verificar em que condições se consegue obter um polímero na forma de pó. Uma posterior análise de peso molecular dos polímeros resultantes irá permitir avaliar se existem diferenças significativas entre eles. Os passos seguintes de reticulação e alquilação deverão ser efectuados de acordo com a patente do *Colesevelam*. Finalmente, testes de complexação de ácidos biliares deverão ser efectuados

para que se possa comparar o desempenho do hidrogel sintetizado com o do fármaco comercial.

Na área de LRP, o trabalho revelou-se promissor principalmente na obtenção de PHEMA com peso molecular controlado. Os estudos seguintes deverão ser direcionados para a análise do complexo catalítico Fe(0)/CuBr₂/Me₆TREN por espectroscopia UV-Vis, nas condições de reação, para auxiliar o estudo do mecanismo de reação e para a optimização das condições de reação, com o objetivo de tentar diminuir o valor da polidispersividade de PHEMA obtida neste trabalho. Num passo seguinte de reticulação do PHEMA (tendo em conta a aplicação final do polímero como BAS), sugere-se o uso de agentes reticulantes mais reativos, dado que os compostos usados neste trabalho não permitiram reticular o polímero devido à baixa reatividade dos grupos –OH quando comparada com a do grupo –NH₂ da PAIA.

Bibliografia

1. Stevens, M., *Polymer chemistry, An introduction* 3rd ed 1999, New York: Oxford University Press.
2. Fried, J., *Polymer science and technology*, 1995, New Jersey: Prentice Hall PTR Englewood
3. Brandrup, J., E. Immergut, and E. Grulke, *Polymer Handbook*. fourth ed 1999, Canada: John Wiley & Sons, Inc.
4. Matyjaszewski, K. and T.P. Davis, *Handbook of radical polymerization*, 2002, Hoboken, NJ: Wiley-Interscience. xii, 920 p.
5. Szwarc, M., 'Living' polymers. *Nature*, 1956. **178**: p. 1168-1169.
6. Matyjaszewski, K., *Controlled/living radical polymerization : progress in ATRP*. ACS symposium series 2009, Washington DC: American Chemical Society. xii, 423 p.
7. MOAD, G., E. RIZZARDO, and S. THANG, *Toward Living Radical Polymerization*. American Chemical Society, 2008. **41**: p. 1133-1142.
8. Mendonça, P., *Metal-catalyzed living radical polymerization technique*, in *department of chemical engineering faculty of sciences and technology* 2010, Universidade Coimbra: Coimbra.
9. Wade A. Braunecker, K.M., *Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives*. *Progress in Polymer Science* 2007. **32**: p. 93-146.
10. Cunningham, M., *Controlled/living radical polymerization in aqueous dispersed systems*. *Progress in Polymer Science*, 2008. **33**: p. 365-398.
11. Ouchi, M., T. Terashima, and M. Sawamoto, *Chemical Reviews*, 2009. **109**: p. 4963.
12. Bhattacharya, A., J.W. Rawlins, and P. Ray, *Polymer grafting and crosslinking* 2009, Oxford: John Wiley & Sons. x, 341 p.
13. Hennink, W.E. and C.F. Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels* *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. **54**: p. 13-36.
14. Peppasa, N.A., et al., *Hydrogels in pharmaceutical formulations* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **50**: p. 27-46.
15. Wong, V., *Hydrogels water-absorbing polymers*. 2007: p. 18-22.
16. Kashyap, N., N. Kumar, and M. Kumar, *Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications*. *Critical Reviews*, 2005. **22**.
17. Bordado, J., M. Gil, and P. Ferreira, *Síntese de Poliuretanos. Aplicações* 2004, Coimbra: imprensa da Universidade.
18. Omidian, H., et al., *Swelling and Mechanical Properties of Modified HEMA based Superporous Hydrogels*. *Bioactive and compatible polymers*, 2010. **25**: p. 483-497.
19. Mendonça, P., *Bile acid sequestrants – review on synthetic routes and new approach based on living radical polymerization techniques*. 2011.
20. [2 junho 2011]; Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Bile_acid.
21. F.C.f.D.E.a. Research, F.a.d.p., in: D.o.I. Services (Ed.), *Food and Drug Administration*, 2011, pp. FDA approved drug products.
22. Staels, B., H. Handelsman, and V. Fonseca, *Bile Acid Sequestrants for Lipid and Glucose Control*. *Current Diabetes Reports*, 2010. **10**: p. 70-77.
23. Mandeville, W., *Process for removing bile salts from a patient and alkylated compositions therefor*, 1995.
24. Nichifor, M., et al., *Bile acid sequestrants based on cationic dextran hydrogel microspheres. 2. Influence of the length of alkyl substituents at the amino groups of the sorbents on the sorption of bile salts*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001. **90**: p. 681-689.
25. Ciampoli, M. and N. Nardi, *Inorganic Chemistry*, 1966. **5**: p. 41.
26. Queffelec, J., G. Gaynor, and K. Matyjaszewski, *Macromolecules* 2000. **33**: p. 8629.

27. Allinger, N.L., *Molecular structure : understanding steric and electronic effects from molecular mechanics* 2010, Hoboken, N.J.: Wiley. xix, 333 p.
28. Matyjaszewski, K. and J. Kwon, *Synthesis of Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) in Protic Media through Atom Transfer Radical Polymerization Using Activators Generated by Electron Transfer*. *Polymer Science*, 2006. **44**: p. 3787-3796.
29. Striegel, A., W. Yau, and J. Kirkland, *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. 2nd ed 2009, New Jersey: John Wiley & Sons
30. Pasch, H. and W. Schrepp, *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*, Germany: Springer.
31. Coca, S., et al., *Polymerization of Acrylates by Atom Transfer Radical Polymerization. Homopolymerization of 2-Hydroxyethyl Acrylate*. *Polymer Science*, 1997. **36**: p. 1417-1424.
32. Beers, K., et al., *Atom Transfer Radical Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate*. *Macromolecules*, 1999. **32**: p. 5772-5776.
33. Ratner, B. and A. Hoffman, *Synthetic Hydrogels for Biomedical Applications*. American Chemical Society, 1976.
34. Sadahira, C., *Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis do álcool polivinílico pH sensitivos processados por métodos físico-químicos*”, in *Escola de Engenharia da UFMG 2007*, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS: Belo Horizonte.
35. Zhao, H., et al., *Synthesis and thermal property of poly(allylamine hydrochloride)*. *Advanced Materials Research*, 2011. **150**: p. 1480-1483.
36. Percec, V., et al., *Journal of the American Chemical Society*, 2006. **128** (14156).
37. Mendonç, P., et al., *Ambient temperature rapid ATRP of methyl acrylate, methyl methacrylate and styrene in polar solvents with mixed transition metal catalyst system*. *European Polymer Journal*, 2011.
38. Masami Kamigaito, T.A., and Mitsuo Sawamoto, *Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization*. American Chemical Society, 2001. **101**: p. 3689-3745.
39. Coca, S., Beers K., Matyjaszewski, K., *Polymerization of Acrylates by Atom Transfer Radical Polymerization. Homopolymerization of 2-Hydroxyethyl Acrylate*. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1997. **Vol. 36**: p. 1417-1424.
40. Vargun, E., *Polymerization and characterization of 2-Hidroxyetyl Acrilate*, in *Graduates School of Natural and Applied Sciences* 2003. p. 74.
41. Baille, W., et al., *Functionalized beta-cyclodextrin polymers for the sorption of bile salts*. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, 2000. **37**: p. 677.

Anexo

Anexo A : Espectro de RMN em CDCl_3 do ligante Me_6TREN sintetizado para o sistema catalítico de LRP em estudo.

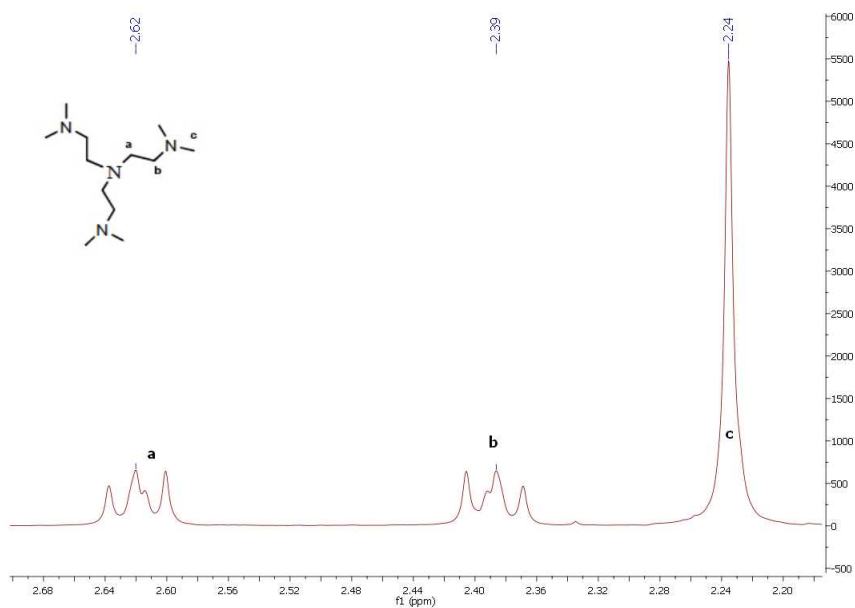


Figura A 1 - RMN ^1H a 600 MHz em CDCl_3 : 2,58 (dd, 6H); 2,36 (dd, 6H); 2,21 (s, 18H) ppm, usando TMS como padrão interno.