Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GREICE KELLE VIEGAS SARAIVA

**Caracterização de copolímeros
e efeito da estrutura
em sistemas biomiméticos**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data de depósito na SPG:

09/03/2015

Greice Kelle Viegas Saraiva

**Caracterização de copolímeros
e efeito da estrutura
em sistemas biomiméticos**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Prof^a Dra. Iolanda Midea Cuccovia
Co-orientador Prof Dr. Fábio Herbst Florenzano

São Paulo

2015

Dedico esta Tese a minha família,
meus pais Juraci e Antônio pelo incentivo
meus irmãos Cláudia e Bráulio pelo apoio
meu companheiro Ivan pela solidariedade
meu filho José Antônio pelo amor e afeto
minhas afilhadas Anita e Duda pelo carinho

Agradecimentos

Começar os agradecimentos já me causa nostalgia, lembrar-me do início de tudo, das descobertas, dos amigos e de todos que contribuíram com a realização deste trabalho. Sendo assim seguem alguns agradecimentos especiais.

À Prof^a Iolanda, que mais que orientadora foi parceira, amiga e conselheira. A você Io, agradeço por me fazer sorrir... Agradeço a você pelo brilho de seus olhos... Agradeço pelo seu sorriso... Por me fazer acreditar que sou capaz! Por me fazer acreditar que existem pessoas e pessoas... Obrigada... Simplesmente obrigada.

“Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir. Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz.” Carlos Drummond de Andrade.

Ao Prof^o Fábio, amigo de vários trabalhos, pelo incentivo, por me fazer acreditar que tudo é possível, pela orientação e confiança.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado”. Roberto Shinyashiki

Aos Prof.^o Hernan Chaimovich pela acolhida, pelos conselhos e pelo carinho.

“Porque se chamavam homens, também se chamavam sonhos e sonhos não envelhecem”. Milton Nascimento

A Prof^a Flávia pela amizade, pelas conversas e aconselhamentos.

“Pois seja o que vier, venha o que vier. Qualquer dia, amigo, eu volto a te encontrar. Qualquer dia, amigo, a gente vai se encontrar”. Milton Nascimento

Ao Prof^o Roberto Salinas, Prof^a Shirley, Prof^a Karin, Prof^a Kátia, Prof^o Jorge Manzini e Rafael Lira pelo apoio, sugestões, contribuições e colaborações.

“Colaborar é oferecer a mão, é dar-lhe uma verdadeira utilidade. Colaborar é ter consciência da Realidade. Colaborar é ser luz na escuridão, é Viver a Totalidade”. Kiko Arquer

Ao Dr. Filipe Lima... o que dizer deste Amigo? OBRIGADA!!!!, Mil vezes obrigada. Você participou de todo processo deste doutoramento, me ensinou milhões de coisas. Foi um companheiro para o José Antônio, ofereceu seu ombro amigo, obrigado até mesmo pelas implicâncias, que me fazem refletir e saber que um amigo verdadeiro é aquele que nos diz às verdades que muitas das vezes fingimos não conhecer.

“Companheirismo não é estar junto apenas, é também colaborar com o outro, para que juntos se possa vencer os desafios”. André Suhanov

As amigas Laura Farkuh e Catarina, meninas, vocês são muito especiais, amigas do coração, fizeram parte da minha história, encheram meus dias de alegria, e transformaram esta caminhada em um doce passeio.

“A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento, duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor”. Joseph Addison

Aos IC's Maisa, Bel, Alyne, Ronaldo, Diana, Rafael e Peter, “eita bicho lerd”, foi assim que tudo começou!! Vocês fazem parte de cada detalhe deste trabalho, esta conquista também é de vocês. Com vocês aprendi que compartilhar é o melhor caminho.

“E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar. Não tem tempo nem piedade, nem tem hora de chegar. Sem pedir licença muda nossa vida e depois convida a rir ou chorar.” Toquinho e Vinícius.

As amigas Mariana, Luciana, Marcela, Larissa C., Eliziane, Ray e amigo Phillipe vocês são pessoas muito especiais na minha vida, no meu crescimento, colaboraram com a minha formação pessoal e profissional. Vocês fazem parte disso. "Nenhum de nós chegou onde está exclusivamente através do impulso de nossos próprios pés. Chegamos aqui porque alguém se inclinou e nos alavancou."

A Márcia, por ajudar a conhecer cada pedacinho deste laboratório, pelas broncas, pelo carinho meio torto e pela amizade.

“Cada novo amigo que ganhamos no decorrer da vida aperfeiçoa-nos e enriquece-nos, não tanto pelo que nos dá, mas pelo que nos revela de nós mesmos.” Miguel Unamuno

Aos colegas de laboratório Layara, Larissa, Marli, João, Gustavo, Marquinho, Laura Mortara, Thamiris, Phellipe pela convivência e colaboração.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”. Marthin Luther King

Aos colegas da representação discente pelo respeito e pelas lutas por uma universidade cada vez melhor.

“Sonha e serás livre de espírito... luta e serás livre na vida.” Che Guevara

A minha FAMÍLIA pelo amor, carinho, respeito, confiança e apoio.

“Não existe esta coisa de homem 'feito por si mesmo'. Somos formados por milhares de outros. Cada pessoa que alguma vez tenha feito um gesto bom por nós, ou dito uma

palavra de encorajamento, entrou na formação do nosso caráter e nossos pensamentos, tanto quanto do nosso sucesso.” George Matthew Adams

Aos professores do Instituto de Química, pelo aprendizado, em especial ao Prof Bayardo, pela inspiração.

“Todo o conhecimento humano começou com intuições, passou daí aos conceitos e terminou com ideias”. Immanuel Kant

A todos que de alguma forma contribuíram com a minha caminhada.

“A vida é a arte do encontro, embora haja tanto desencontro pela vida.” Vinícius de Moraes

Aos meus sempre alunos, vocês estão comigo e é pra vocês esta conquista.

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” Antoine de Saint-Exupéry

Ao CNPq pela bolsa. A CAPES, FAPESP, FAPEMIG, INCT-FCx, e NAP-FCx pelo apoio.

A todos vocês o meu muito OBRIGADA!!!!!!

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a presença distante das estrelas!

Mario Quintana

RESUMO

Saraiva, G.K.V. **Caracterização de copolímeros e efeito da estrutura em sistemas biomiméticos.** 2015. 141p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Copolímeros, macromoléculas orgânicas ou inorgânicas com alta massa molar, consistem de unidades monoméricas repetidas, unidas por ligações covalentes e que apresentam mais de um tipo de monômero. Neste trabalho estudamos três copolímeros constituídos por dois blocos distintos, isto é copolímeros dibloco, onde um dos blocos é constituído pelo polimetacrilato de metila, PMMA e o outro pelo polimetacrilato de N,N dimetilamino, PDMAEMA, e o homopolímero de PDMAEMA. A fórmula geral dos copolímeros dibloco estudados é $\text{PMMA}_m\text{-}b\text{-PDMAEMA}_n$ onde o número de monômeros de cada bloco é representado pelos índices m e n.

Os copolímeros $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$ (MM, 54.200), $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ (MM 27.558), o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ (MM 25.555) e o homopolímero PDMAEMA (MM 41.614,9) tiveram suas massas molares e a razão entre os monômeros de cada bloco caracterizados por cromatografia de gel permeação, GPC, e NMR. Determinamos a concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros e verificamos, por RMN e fluorescência, o efeito da concentração e do pH na sua agregação.

A interação dos copolímeros com vesículas unilamelares grandes, LUVs, preparadas com misturas de fosfatidilcolina, PC, e fosfatidilglicerol, PG, foi estudada em diferentes condições de pH e força iônica. A interação dos polímeros com as LUVs também foi estudada medindo-se o diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das LUVs na presença dos polímeros. Observou-se que, quando a razão polímero/lipídio é alta, os polímeros se ligam às LUVs, neutralizando completamente a carga das vesículas. Quando a concentração de LUVs é próxima à dos polímeros, forma-se uma rede que conduz à agregação e precipitação dos complexos.

Estudamos o efeito dos polímeros na permeabilização de LUVs e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) preparadas com misturas de PC:PG. Os copolímeros permeabilizaram as LUVs, dependendo da razão polímero/lipídio, do pH, força iônica e das características hidrofóbicas e hidrofílicas de cada copolímero. Quanto maior a porcentagem de PG nas LUVs maior a interação com os copolímeros. A ligação dos

copolímeros às LUVs deve produzir segregação dos fosfolipídios negativos na bicamada das LUVs (i.e., separação lateral de fases) facilitando a permeabilização das vesículas.

Demonstramos que os copolímeros se ligam à superfície das GUVs modificando a sua forma e levando ao rompimento das vesículas. Estes efeitos foram modulados pelo pH e a força iônica do meio.

O efeito de permeabilização dos copolímeros foi correlacionado com as razões entre os blocos hidrofóbicos e hidrofílicos. Quando o copolímero tem uma maior fração de PDMAEMA, o bloco mais hidrofílico do copolímero, este efeito é mais evidente. A porcentagem de permeabilização, após um tempo definido, para copolímeros de mesma massa molar, como o PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} (MM 27.558) e o PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} (MM 25.555), é muito maior com o copolímero com maior porção hidrofílica, o PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0}. O homopolímero DMAEMA também se mostrou eficiente na interação com as LUVs, porém menos que o PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3}, que possui maior número de unidades DMAEMA e uma sequência de monômeros de MMA.

Demonstramos, nesta Tese, que o efeito de copolímeros sintéticos contendo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas são bons modelos de peptídeos e proteínas permitindo avaliar quantitativamente o efeito dessas interações em modelos de membranas.

Palavras-chave: Copolímero, vesículas, PMMA-*b*-PDMAEMA, polímeros, biomiméticos.

ABSTRACT

Saraiva, G.K.V. **Copolymers characterization and effect on the structure of biomimetic systems.** 2015. 141p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Copolymers are organic or inorganic macromolecules with high molecular weight, consisting of repeated monomer units joined by covalent bonds and exhibit more than one type of monomer. Here, we studied three copolymers consisting of two different blocks, i.e. diblock copolymers, where one block is constituted by methyl polymethacrylate, PMMA and other by polymethacrylate N, N-dimethylamino, PDMAEMA and a homopolymer PDMAEMA. The general formula of the diblock copolymers studied was PMMA_m-b-PDMAEMA_n where the number of monomers of each block is represented by indexes m and n.

The PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} copolymers (MW, 54,200), PMMA₁ PDMAEMA_{3,0}-b (MW 27,558), the PMMA₁ PDMAEMA_{1,1}-b (MW 25,555) and PDMAEMA homopolymer (MW 41614.9) had their molecular weights and the ratio between the monomers of each block characterized by gel permeation chromatography, GPC, and NMR. The critical micelle concentration (CMC) of the copolymers was determined by fluorescence and the aggregation of the copolymers verified by NMR. The effect pH on the copolymers CMC was also determined.

The interaction of copolymers with large unilamellar vesicles, LUV, prepared with mixtures of phosphatidylcholine, PC, and phosphatidylglycerol, PG, was studied under different conditions of pH and ionic strength. The interaction of the polymers with the LUVs was also studied measuring the hydrodynamic diameter and zeta potential of the LUVs in the presence of the polymers. It was observed that when the ratios polymer / lipid are high, the polymers bind to the LUVs, completely neutralizing the charge of the vesicles. When the concentration of LUVs is close to that of the polymers, it forms a network that leads to aggregation and precipitation of the complexes.

We studied the effect of polymers in permeabilization LUVs and giant unilamellar vesicles (GUVs) prepared with PC:PG. The copolymers permeabilized the LUVs, depending on the ratio polymer / lipid, pH, ionic strength and the hydrophobic and hydrophilic characteristics of each copolymer. The higher the percentage PG LUVs

lead to greater interaction with the copolymers. The binding of the copolymers to the LUVs with negative charge induced phase separation of phospholipids in the bilayer of LUVs (ie, lateral phase separation) facilitating the permeability of the vesicles.

We demonstrate that copolymers bind to the surface of LUVs changing its shape and leading to rupture of vesicles. These effects are modulated by pH and ionic strength of the media.

The permeabilization effect of the copolymers was correlated with the ratios of the hydrophobic and hydrophilic blocks. When the copolymer has a larger fraction of PDMAEMA, the more hydrophilic block copolymer, this effect is more evident. The percentage of permeabilization, after a set time, for the same molar mass copolymers such as b-PDMAEMA3,0 PMMA1 (MW 27,558) and PMMA1 PDMAEMA1,1-b (MW 25,555), is much more efficient with copolymer with greater hydrophilic portion, the b-PMMA1 PDMAEMA3,0. The DMAEMA homopolymer also proved efficient in interacting with the LUVs.

We demonstrated that synthetic copolymers containing hydrophobic and hydrophilic regions are good models of peptides and proteins allowing quantitatively evaluate the effects of these interactions on model membranes.

Keywords: Copolymer, vesicles, PMMA-*b*-PDMAEMA, polymers, biomimetic

Índice

1.	INTRODUÇÃO	24
1.1	Copolímeros	24
1.2	Síntese de Copolímeros.....	26
1.3	Copolímeros em Bloco	28
1.4	Copolímeros anfifílicos	30
1.5	Copolímero PMMA-b-PDMAEMA	32
1.6	Sistemas miméticos de membrana	33
1.7	Sistemas Miméticos e Interação com Polímeros	36
2.	OBJETIVOS	38
3.	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	Material	39
3.2	Métodos	41
3.2.1	Dosagem dos Fosfolipídios	41
3.2.2	Sínteses dos copolímeros PMMA-b-PDMAEMA	41
3.2.3	Síntese do CDB	42
3.2.4	Síntese dos Copolímeros:	42
3.2.5	Purificação dos copolímeros PMMA-b-PDMAEMA	44
3.2.6	Cromatografia de Permeação em Gel - GPC	44
3.2.7	Determinação dos valores da razão n/m entre os blocos PMMA e PDMAEMA dos copolímeros PMMA-b-PDMAEMA	45
3.2.8	Determinação da concentração micelar crítica, cmc, dos copolímeros PMMA _n -b-PDMAEMA _m	45
3.2.9	Análise elementar.C, H e N.....	46
3.2.10	Determinação dos pKas dos grupos amino dos copolímeros.	46
3.2.11	Estudo da estruturação dos copolímeros em vários pHs, por RMN de ¹ H e NOESY	46
3.2.12	Preparação das Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs)	47
3.2.13	Medida do Vazamento de CF e PTS das LUVs por Fluorescência.....	50
3.2.14	Cinética de Vazamento de CF das Vesículas	51
3.2.15	Cinética de Vazamento de PTS das Vesículas na presença de MV.....	52
3.2.16	Preparação das LUVs para experimentos de Mobilidade Eletroforética, Potencial zeta e Diâmetro Hidrodinâmico	53
3.2.17	Determinação da Mobilidade Eletroforética, U _E , Potencial zeta, ζ, e Diâmetro Hidrodinâmico, D _H	53

3.2.18	Preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs).....	54
3.2.19	Microscopia Óptica.....	57
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Caracterização dos Copolímeros.....	58
4.1.1	Cromatografia de Permeação em Gel – GPC	58
4.1.2	Ressonância Magnética Nuclear, RMN, dos Polímeros.....	65
4.1.3	Análise Elementar	71
4.1.4	Titulação Potenciométrica dos Copolímeros	71
4.1.5	Determinação da Concentração Micellar Crítica (CMC) dos Copolímeros	74
4.2	Estudo do efeito dos copolímeros na permeabilização das LUVs contendo 5(6)-Carboxifluoresceína, CF.....	78
4.2.1	Copolímero PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1}	79
4.2.2	Copolímero PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0}	92
4.2.3	Copolímero - PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3}	95
4.2.4	Homopolímero – PMMA	98
4.2.5	Homopolímero – PDMAEMA.....	99
4.2.6	Ensaio de permeabilização das LUVs contendo 5(6)-carboxifluoresceína pelos copolímeros, em função do pH	101
4.2.7	Estudo da Interação do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1} com LUVs com CF em pHs entre 6 e 10.	102
4.2.8	Estudo da Interação do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0} com LUVs em pHs 6 a 10.....	102
4.2.9	Estudo da Interação do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3} com LUVs em pHs 6 a 10.....	103
4.2.10	Estudo da interação do Homopolímero – PDMAEMA com vesículas em pH que variam de 6 a 10	104
4.3	Ensaio de permeabilização das LUVs contendo pireno-tetrasulfonato de sódio (PTS) pelos copolímeros em baixa força iônica e variando o pH	104
4.3.1	Estudo da Interação do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1} com LUVs com PTS em pHs 6 a 10	105
4.4	Estudo da Mobilidade Eletroforética das LUVs com os Copolímeros e com o homopolímero PDMAEMA.....	113
4.4.1	Copolímero PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1}	114
4.4.2	Copolímero - PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0}	114
4.4.3	Copolímero - PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3}	115
4.4.4	Homopolímero – PDMAEMA.....	116
4.5	Estudo do efeito dos copolímeros e do homopolímero PDMAEMA no diâmetro das LUVs	116

4.6	Microscopia Óptica de GUVs na presença dos Copolímeros e do homopolímero PDMAEMA.....	118
4.6.1	Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 6 sem adição de sal	119
4.6.2	Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 8,5 sem adição de sal.	121
4.6.3	Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 10 sem adição de sal.	123
4.6.4	Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 6 com adição de sal.	125
4.6.5	Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 8,5 com adição de sal.	126
4.6.6	Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 10 com adição de sal	128
4.7	Análise de ^1H e 2D-NOESY em pH 6,2; 7,0; 8,2 e 10,0 do $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{3,0}$	130
5.	CONCLUSÕES	135
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138

Índice de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros da síntese dos polímeros de PMMA	43
Tabela 2: Parâmetros da síntese dos copolímeros de PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA.....	43
Tabela 3: Massa Molar Ponderal Média (M_w) dos Padrões de PMMA, em Da	58
Tabela 4: Tempo de eluição e Massa Molar Ponderal Média dos Padrões de PMMA “Green” (G), “Red” (R) e “White” (W)	59
Tabela 5: Massa molar ponderada (M_w), Massa molar numérica (M_n) e Polidispersidade (PDI). Os valores são relativos aos padrões de PMMA	63
Tabela 6: Massa molar ponderada (M_w), Massa molar numérica (M_n) e Polidispersidade (PDI) dos blocos de PMMA.....	65
Tabela 7: Proporção entre os monômeros presentes nos copolímeros, determinada por RMN e GPC	70
Tabela 8: Massa molar média dos copolímeros PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA, determinada por cálculos, utilizando os resultados combinados de GPC e RMN	71
Tabela 9: Análise elementar teórica e experimental	71
Tabela 10: Concentração Crítica de Agregação, CMC, dos Copolímeros.....	78
Tabela 11: Efeito da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} e da relação PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} /lipídio na % vazamento da CF. P_i é a concentração de fosfato total e é a soma de PC+PG.	91
Tabela 12: Efeito da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} e da relação PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} /lipídio na % de vazamento da CF. P_i é a concentração de fosfato total e é a soma de PC+PG.....	94
Tabela 13: Efeito da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} e da relação PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} /lipídio na % de vazamento da CF. P_i é a concentração de fosfato total e é a soma de PC+PG.....	97
Tabela 14: Concentração de copolímero e homopolímero necessária para produzir 50% de vazamento nas LUVs de PG 50% em tampão Tris/HCl 0,01 M pH 8,1, 0,3 M NaCl	100
Tabela 15: Concentração de copolímero e homopolímero necessária para produzir 50% de vazamento nas LUVs de PG 100%. Tampão Tris/HCl 0,01 M pH 8,1, 0,3 M NaCl.	101
Tabela 16: % Vazamento em PC:PG 50:50 com todos os copolímeros e com PDMAEMA em pH 8,0 [LUVs] = $6,5 \times 10^{-5}$ M.....	113
Tabela 17: % Vazamento em PG 100% em todos os copolímeros e no PDMAEMA [LUVs] = $5,8 \times 10^{-5}$ M	113

Índice de Figuras

Figura 1: Estruturas dos compostos: A) Pireno tetrasulfonato B) Metilviologênio C) 5 (6)-Carboxifluoresceína em pH acima de 7,5.....	40
Figura 2: Estrutura geral dos copolímeros PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA.....	41
Figura 3: Síntese do ácido ditiobenzóico.....	42
Figura 4: Síntese do CDB – ácido ditiobenzóico mais α -metil-estireno formando ditiobenzoato de cumila.....	42
Figura 5: Etapas da síntese do Bloco de PMMA _n CDB do polímero de metacrilato de metila.	43
Figura 6: Síntese do copolímero – PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA. Monômero de DMAEMA + BPO formando o radical polimérico, este radical reage com o PMMA _n CDB formando o PMMA- <i>b</i> PDMAEMA.....	44
Figura 7: Etapas de preparação das GUVs pelo método de eletroformação. a) Espalhamento da solução lipídica sobre as lâminas recobertas com polímero de óxido de flúor. b) Eliminação do clorofórmio por fluxo de N ₂ . c) Montagem da câmara com as lâminas recobertas com o filme. d) Preenchimento da câmara com a solução de sacarose 0,2 M. e) Conexão da câmara com o aparelho de eletroformação.	56
Figura 8: Visualização da GUV em microscópio óptico, por contraste de fase.	56
Figura 9: Modelo de suporte para visualização das GUVs, no experimento com PVA.	57
Figura 10: Cromatograma do padrão de massa molecular do PMMA “Red”.....	59
Figura 11: Curva de Calibração com Padrões de PMMA. Log Mw vs Tempo de eluição da amostra.....	60
Figura 12: Cromatograma do copolímero - PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Z.....	60
Figura 13: Cromatograma do copolímero – PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA X.....	61
Figura 14: Cromatograma processado do copolímero - PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Y.....	61
Figura 15: Cromatograma do polímero - PDMAEMA.....	62
Figura 16: Cromatograma do bloco de PMMA Z.....	64
Figura 17: Cromatograma do bloco de PMMA Y.....	64
Figura 18: Cromatograma do bloco de PMMA X.....	65
Figura 19: Espectro ¹ H RMN do copolímero - PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Z.....	66
Figura 20: Espectro ¹ H RMN do Copolímero - PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA X.....	67
Figura 21: Espectro ¹ H RMN do copolímero - PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Y.....	68
Figura 22: Espectro ¹ H RMN do polímero PDMAEMA.....	69
Figura 23: – Titulação do HCl 0,016 M (●) e de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} (●) com NaOH 0,053 M. ..	72
Figura 24: Titulação do HCl 0,017 M (●) e do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} (●) com NaOH 0,051 M.	72
Figura 25: Titulação do HCl 0,013 M (●) e do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} (●) com NaOH 0,059 M.....	73
Figura 26: Titulação do HCl 0,013 M (●) e do PDMAEMA (●) com NaOH 0,059 M.	73
Figura 27: Determinação da CMC do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} com NPN, 2 x 10 ⁻⁶ M, em pH 6 (A), pH 8 (B) e pH 10 (C). λ_{Exc} = 352 nm e λ_{Em} = 418 nm.....	75
Figura 28: Determinação da CMC do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} com NPN, 2 x 10 ⁻⁶ M em pH 6, 8 e 10. pH 6 (A), pH 8 (B) e pH 10 (C) λ_{Exc} = 352 nm e λ_{Em} = 418 nm.....	76
Figura 29: Determinação da CMC do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} com NPN, 2 x 10 ⁻⁶ M, em pH 6, 8 e 10. pH 6 (A), pH 8 (B) e pH 10 (C) λ_{Exc} = 352 nm e λ_{Em} = 418 nm.....	77
Figura 30: Efeito do [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] no vazamento de CF em LUVs de PG 100%, 1,17 x 10 ⁻⁴ M em função do tempo.	79
Figura 31: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] no vazamento de CF de LUVs de PG 100%, 1,17 x 10 ⁻⁴ M, após 200 s da adição do copolímero	80
Figura 32: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] no vazamento de LUVs de PC:PG 10:90, 1,22 x 10 ⁻⁴ M, em função do tempo.	81
Figura 33: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] no vazamento de CF em LUVs 1,22 x 10 ⁻⁴ M de PC:PG 10:90, após 200 s.....	81
Figura 34: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] no vazamento de LUVs 6,8 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 20:80, em função do tempo.	82
Figura 35: % Vazamento de CF em LUVs 6,8 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 20:80, após 200 s, em função da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}].....	82

Figura 36: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] no vazamento de CF em LUVS 2,2 X 10 ⁻⁴ M de PC:PG 30:70, após 200 s.	83
Figura 37: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] na % vazamento de LUVs 2,2 X 10 ⁻⁴ M de PC:PG 30:70, em função do tempo, 200 s após a adição do copolímero.	83
Figura 38: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] na % vazamento de LUVs 5,7 X 10 ⁻⁵ M de PC:PG 40:60, em função do tempo.	84
Figura 39: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] na % vazamento de CF de LUVS 5,7 X 10 ⁻⁵ M de PC:PG 40:60, após 200 s.	84
Figura 40: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de LUVs 6,1 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 50:50, em função do tempo.	84
Figura 41: Efeito da [PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}] na % vazamento de CF em LUVS 6,1 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 50:50, após 200 s.	85
Figura 42: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de LUVs de PC:PG 60:40, em função do tempo.	85
Figura 43: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento CF em LUVS 7,4 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 60:40, após 200 s.	86
Figura 44: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de LUVs 6,8 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 70:30, em função do tempo.	86
Figura 45: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de CF em LUVS 6,8 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 70:30, após 200 s.	87
Figura 46: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de LUVs 5,4 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 80:20, em função do tempo.	87
Figura 47: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de CF em LUVS 5,4 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 80:20, após 200 s.	88
Figura 48: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de LUVs 6 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 90:10, em função do tempo.	88
Figura 49: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de CF em LUVS 6 x 10 ⁻⁵ M de PC:PG 90:10, após 200 s.	88
Figura 50: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de LUVs 6 x 10 ⁻⁵ M de PC 100%, em função do tempo.	89
Figura 51: Efeito da concentração de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de CF em LUVS 6 x 10 ⁻⁵ M de PC 100%, após 200 s.	89
Figura 52: % Vazamento de CF em LUVS após 200 s, em função da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} em todas as razões PC:PG.	90
Figura 53: % Vazamento de CF em LUVS após 200 s, em função da % de PG. PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} 2,72 x 10 ⁻⁴ M.	90
Figura 54: Efeito da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} na % vazamento de CF em LUVs 1,5 x 10 ⁻⁴ M de PG 100%, em função do tempo.	92
Figura 55: Efeito da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} na % vazamento de CF em LUVs 1,5 x 10 ⁻⁴ M de PG 100%, após 200 s.	92
Figura 56: % Vazamento de CF em LUVS ~ 1,5 x 10 ⁻⁴ M após 200 s, em função da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} em todas as razões PC:PG.	93
Figura 57: % Vazamento de CF LUVS ~ 1,5 x 10 ⁻⁴ M, após 200 s, em função da % de PG nas vesículas por PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} 1,6 x 10 ⁻⁵ M.	93
Figura 58: Efeito da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} (M) na % vazamento de LUVs 1,22 x 10 ⁻⁴ M de PG 100% em função do tempo.	95
Figura 59: Efeito da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} na % de vazamento em LUVs 1,22 x 10 ⁻⁴ M de PG 100, após 200 s.	96
Figura 60: % Vazamento de CF em LUVS 1,28 x 10 ⁻⁴ M após 200 s, em função da concentração do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} em todas as razões PC:PG.	96
Figura 61: % Vazamento de CF em LUVS após 200 s, em função da % de PG nas vesículas PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} 2,91 x 10 ⁻⁸ M.	96

Figura 62: Efeito da concentração do PMMA (M) na permeabilização de LUVs $1,7 \times 10^{-4}$ M de PG 100%.....	98
Figura 63: Efeito da concentração do PMMA na % vazamento em LUVs $1,7 \times 10^{-4}$ M de PG 100%, após 200 s.	98
Figura 64: Efeito da concentração do PDMAEMA (M) na % vazamento de LUVs $1,44 \times 10^{-4}$ M de PG 100%.....	99
Figura 65: Efeito da concentração do PDMAEMA na % de vazamento de LUVs, $1,44 \times 10^{-4}$ M, PG 100% após 200 s.	99
Figura 66: % Vazamento de CF em LUVS após 200 s, em função da concentração do PDMAEMA em LUVs com diferentes razões PC:PG.	100
Figura 67: % Vazamento de CF em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{1,1} $6,5 \times 10^{-8}$ M, com a [LUVs] em média $1,6 \times 10^{-4}$ M.....	102
Figura 68: % Vazamento de CF em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{3,0} $4,8 \times 10^{-8}$ M com a [LUVs] em média $1,4 \times 10^{-4}$ M.....	103
Figura 69: % de Vazamento de CF em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{6,3} $5,1 \times 10^{-8}$ M com a [LUVs] em média $1,0 \times 10^{-4}$ M.....	103
Figura 70: % de vazamento de CF em várias proporções PC:PG em função do pH do PDMAEMA $6,7 \times 10^{-8}$ M com a [LUVs] em média $1,2 \times 10^{-4}$ M.....	104
Figura 71: Efeito da concentração de PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{1,1} na % vazamento de [LUVs] $2,25 \times 10^{-5}$ M de PG 100%, em função do tempo, monitorada por PTS e MV, em pH 8,5.....	105
Figura 72: % de Vazamento de PTS/MV em LUVs de PG 100%, após 200 s, em função da concentração do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{1,1} em pH 8,5 e [LUVs]= $2,25 \times 10^{-5}$ M.....	106
Figura 73: % de Fluorescência de PTS/MV em várias proporções PC:PG em pH 8 do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{1,1} , $2,6 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média = $2,5 \times 10^{-5}$ M.....	106
Figura 74: % Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{1,1} $2,6 \times 10^{-8}$ M e com [LUVs] em média = $2,5 \times 10^{-5}$ M.....	106
Figura 75: % Vazamento em LUVs $4,6 \times 10^{-5}$ M, PG 100%, pelo PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{3,0} em várias concentrações (M), monitorada por PTS e MV pH=8,5.....	107
Figura 76: % Vazamento de PTS/MV em LUVs $4,6 \times 10^{-5}$ M, de PG 100%, após 200 s, em função da concentração do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{3,0} pH= 8,5.....	108
Figura 77: % Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em pH 8 do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{3,0} $\sim 1,95 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média $3,0 \times 10^{-5}$ M.....	108
Figura 78: % Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{3,0} $1,95 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média $3,0 \times 10^{-5}$ M.....	109
Figura 79: % Vazamento em LUVs 2×10^{-5} M, PG 100%, pelo PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{6,3} em várias concentrações (M), monitorada por PTS e MV pH 8,5.....	109
Figura 80: % de Fluorescência de PTS/MV em LUVS 2×10^{-5} M, de PG 100%, após 110 s, em função da concentração do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{6,3} pH 8,5.....	110
Figura 81: Porcentagem de vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em pH 8,5 do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{6,3} $5,1 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média $2,01 \times 10^{-5}$ M.....	110
Figura 82: % Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{6,3} $5,1 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média $2,01 \times 10^{-5}$ M.....	110
Figura 83: % Vazamento de LUVs $6,5 \times 10^{-5}$ M, de PG 100%, pelo PDMAEMA em várias concentrações, mediada por PTS/MV. pH 8,5.....	111
Figura 84: % Vazamento de PTS/MV em LUVS $6,5 \times 10^{-5}$ M, de PG 100%, após 200 s, em função da concentração do PDMAEMA.....	111
Figura 85: % de Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em pH 8 do PDMAEMA $1,34 \times 10^{-8}$ M, LUVS= $6,0 \times 10^{-5}$ M,.....	112
Figura 86: % de Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em função do pH do PDMAEMA $1,34 \times 10^{-8}$ M, LUVS= $6,0 \times 10^{-5}$ M,.....	112
Figura 87: Mobilidade eletroforética das LUVs 8×10^{-4} M PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, com adição crescente de PMMA _{1-b} -PDMAEMA _{1,1}	114

Figura 88: Mobilidade eletroforética das LUVs 8×10^{-4} M, PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, com adição crescente de PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0}	115
Figura 89: Mobilidade eletroforética das LUVs $7,6 \times 10^{-4}$ M, PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, com adição crescente de PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3}	115
Figura 90: Mobilidade eletroforética das LUVs PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, da ordem de $7,6 \times 10^{-4}$ M com adições crescente de PDMAEMA.	116
Figura 91: Efeito do PDMAEMA no diâmetro hidrodinâmico das LUVs $7,6 \times 10^{-4}$ M, PC:PG 50:50, medida por DLS	117
Figura 92: Efeito do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3} no diâmetro hidrodinâmico das LUVs $7,6 \times 10^{-4}$ M PC:PG 50:50.....	117
Figura 93: Efeito do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1} no diâmetro hidrodinâmico das LUVs 8×10^{-4} M, PC:PG 50:50.....	118
Figura 94: Efeito do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0} no diâmetro hidrodinâmico das LUVs 8×10^{-4} M, PC:PG 50:50.....	118
Figura 95: Efeito do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3} , $5,06 \times 10^{-9}$ M no vazamento de GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, em função do tempo. Tampão MES 0,01 M pH 6,0 sem sal. Aumento 63 vezes, a escala representa 5 μ m.	119
Figura 96: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0} $4,8 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.....	120
Figura 97: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1} , $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.....	120
Figura 98: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	120
Figura 99: Efeito do tempo no vazamento de GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3} , $5,1 \times 10^{-9}$ M. Tris/HCl 0,01 M pH 8,5 sem sal. Aumento de 63 vezes a escala representa 10 μ m	121
Figura 100: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0} $4,8 \times 10^{-9}$ M. E tampão pH 8,5 sem sal. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m	122
Figura 101: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1} , $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 8,5 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	122
Figura 102: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 8,5, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	123
Figura 103: Efeito de PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3} $5,1 \times 10^{-9}$ M, nas GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M. Tampão CAPS 0,01 M, pH 10. Aumento de 63 vezes, a escala representa 20 μ m	123
Figura 104: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0} $4,8 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	124
Figura 105: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1} , $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	124
Figura 106: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10 sem sal, aumento de 63 vezes a escala representa 20 μ m.....	124
Figura 107: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3} $5,1 \times 10^{-9}$ M. Tampões MES 0,01 M pH 6, 0,1M NaCl. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.....	125
Figura 108: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0} $4,8 \times 10^{-9}$ M. E tampão pH 6, 0,1 M NaCl. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	125
Figura 109: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1} , $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 com 0,1 M de NaCl, aumento de 63 vezes, a escala representa 20 μ m.	126
Figura 110: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 com 0,1 M NaCl, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	126
Figura 111: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, num aumento de 63 vezes, a escala representa 20 μ m com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3} $5,1 \times 10^{-9}$ M. Tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 8,5, 0,1 M NaCl.	127
Figura 112: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0} $4,8 \times 10^{-9}$ M de 002 a 005 s. Tampão pH 8,5, 0,1 M NaCl. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	127

Figura 113: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão Tris/HCl 0.01M pH 8,5, 0,1 M de NaCl, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	128
Figura 114: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 8,5 com NaCl 0,1 M. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	128
Figura 115: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3} $5,1 \times 10^{-9}$ M. E tampão pH 10 com NaCl 0,1 M. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	128
Figura 116: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} $4,8 \times 10^{-9}$ M de 002 a 005 s. Tampão pH 10, 0,1 M NaCl. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	129
Figura 117: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1} $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10, 0,1 M de NaCl, aumento de 63 vezes, a escala representa 20 μ m.	129
Figura 118: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10 com NaCl 0,1 M. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.	129
Figura 119: Espectro de ¹ H-RMN do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} , em CDCl ₃ 2mg/mL, $7,3 \times 10^{-5}$ M e 10mg/mL $3,6 \times 10^{-5}$ M – 500 MHz.	130
Figura 120: Espectro 2D-NOESY do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} , em clorofórmio deuterado, 2mg/mL, $7,3 \times 10^{-5}$ M, 500 Mhz.	131
Figura 121: Espectros de ¹ H-RMN do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} , 1×10^{-4} M, na faixa de pH 6,2 a pH 10. O espectro na parte inferior da Figura é uma expansão do espectro na parte superior da Figura.	132
Figura 122: Espectro 2D-NOESY do PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0} , 1×10^{-4} M em tampão pH 6,2 a pH 10.	133

Índice de Esquemas:

Esquema 1: Tipos de copolímeros (5). a) Estatístico, b) Alternado, c) Em bloco e d) Graftizado.	25
Esquema 2: Reação de polimerização via RAFT, adaptado de Moad – 2005 (12).	28
Esquema 3: Tipos de Copolímeros em bloco: a) Dibloco, b) Tribloco, c) Multibloco e d) Estrela.	29
Esquema 4: Estrutura de moléculas anfifílicas	31
Esquema 5: Representação de algumas estruturas formadas por moléculas anfifílicas: a) Micela, b) Micela reversa e c) Lipossoma	34
Esquema 6: Composição dos lipossomas, compartimento aquoso, região hidrofílica e região hidrofóbica da bicamada, adaptado de Frézard. (43)	35
Esquema 7: Estruturas dos Fosfolipídios: A) Fosfatidilcolina, PC, e B) Fosfatidilglicerol PG.....	36
Esquema 8: Método de preparação dos lipossomas baseado no processo de hidratação (CF ou PTS) do filme lipídico adaptado Frézard (43)	48
Esquema 9: Representação esquemática da preparação de vesículas lipídicas a partir de filmes (57).	49
Esquema 10: Representação esquemática da montagem do extrusor.	49
Esquema 11: Representação esquemática e foto da coluna de Sephadex G-25 com os lipossomas contendo CF.	50
Esquema 12: Modelo proposto da ligação do copolímero com as vesículas	135
Esquema 13: Modelo proposto da agregação dos polímeros com as vesículas	136
Esquema 14: Modelo do mecanismo de ação dos copolímeros sobre as vesículas	137

1. INTRODUÇÃO

1.1 Copolímeros

A humanidade é capaz de evoluir quando cria alternativas para garantir sua sobrevivência, proteção e bem estar. Para garantir estas expectativas ocorrem grandes avanços nas áreas da saúde, alimentação, transporte entre outros. Estes avanços geralmente estão associados à disponibilidade de materiais adequados como é o caso dos polímeros naturais ou sintéticos que estão presentes em todas as áreas, auxiliando na manutenção da saúde e do conforto.

À luz da ciência, a vida é possível pela existência de polímeros, já que polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas são componentes principais de uma célula (1–3).

Além dos polímeros naturais, que compõem os sistemas celulares, os polímeros sintéticos também estão presentes em todo o nosso ambiente (4).

A palavra polímero é resultante da combinação de duas palavras gregas, poli (muitos) e mero (unidade de repetição - monômero). Desta forma, polímeros são macromoléculas orgânicas de alta massa molecular cuja estrutura consiste em unidades repetitivas unidas por ligação covalente. É possível classifica-los em homopolímeros e copolímeros. Os homopolímeros apresentam em sua estrutura um único tipo de monômero e os copolímeros dois ou mais monômeros em sua composição estrutural (1,3,5).

Os copolímeros podem ser divididos de acordo com a distribuição dos monômeros dentro da cadeia em:

- a) Estatísticos – não há uma sequência definida na disposição dos monômeros dentro da cadeia;
- b) Alternados – os monômeros se dispõem de maneira alternada na cadeia;
- c) Em Bloco – há uma sequência de um monômero–bloco alternado com outra sequência de outro monômero;
- d) Graftizados – onde uma cadeia linear de um homopolímero liga-se outra cadeia covalentemente (Esquema 1) (5).

Esquema 1: Tipos de copolímeros (5). a) Estatístico, b) Alternado, c) Em bloco e d) Graftizado.

Os copolímeros são amplamente encontrados na natureza, incluindo várias funções orgânicas e desempenham importante papel biológico, como por exemplo, carboidratos e proteínas, e grande utilização na indústria, como a celulose e o poliisopreno.

O uso de copolímeros sintéticos vem sendo cada vez mais estudado por sua ampla aplicação na indústria petrolífera, farmacêutica, têxtil, da construção civil entre outras. Alguns copolímeros sintéticos do nosso cotidiano são: Acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS), Poliestireno de alto impacto (HIPS), diversos tipos de poliuretanos (espumas, isolantes térmicos e acústicos) e Buna-S (6,7,8).

A reatividade química dos copolímeros depende estrutura de suas unidades monoméricas, mas suas propriedades dependem em grande parte da maneira como os monômeros são unidos. É esse fato que leva à versatilidade dos copolímeros sintéticos (6). Usando-se monômeros específicos, alguns copolímeros podem ter sua estrutura e, por conseguinte, suas propriedades, modificadas por agentes externos, isto é, podem responder a pH, temperatura e/ou campo elétrico e magnético (7,8).

Os copolímeros apresentam características que estão relacionadas com a sua síntese. A caracterização de polímeros compreende, além da elucidação da estrutura química de suas unidades repetitivas, de parâmetros estruturais e morfológicos como a massa molar média, a polidispersidade, a proporção entre os tipos de monômeros (em copolímeros), o grau de ramificação, entre outros. Esta caracterização é importante porque polímeros produzidos a partir dos mesmos monômeros podem ter características estruturais completamente diferentes e propriedades muito distintas (9). Desta forma é

preciso determinar os parâmetros estruturais dos produtos obtidos para compreender as suas propriedades.

1.2 Síntese de Copolímeros

A classificação dos materiais poliméricos sintéticos é feita, frequentemente, de acordo com o método de preparação, pois suas propriedades são, geralmente, consequência deste processo. Podem ser divididos em duas grandes classes: polímeros de adição e de condensação. Polímeros de adição são aqueles em que, durante a reação de formação, não há perda de material, ou seja, não ocorre perda de matéria de baixo peso molecular e todos os átomos dos monômeros estão presentes no polímero; assim, a massa total do polímero será a massa da somatória dos monômeros que o compõem. Polímeros de condensação são formados através da reação de grupos funcionais reativos com a eliminação de compostos de baixo peso molecular, de forma que nem todos os átomos dos monômeros são encontrados no polímero (5).

O método de preparação mais utilizado para produção polimérica em grande escala é o método de adição via radicalar. Este método pode ser dividido, atualmente, em dois grupos: a) polimerização Radicalar Livre (FRP, do inglês Free Radical Polymerization) e b) Polimerização Radicalar Controlada (CRP, do inglês: Controlled Radical Polymerization) (10).

A síntese de polímeros por FRP é uma técnica bastante eficiente, pois produz homopolímeros das mais diferentes massas molares, porém com uma polidispersidade alta. A síntese por CRP produz polímeros e copolímeros com baixa polidispersidade e morfologias bastante variadas (10).

As três categorias de polimerização por CRP mais utilizadas são: a) Polimerização por Transferência Atômica Reversível (ATRP, do inglês Atom Transfer Radical Polymerization), a Polimerização Mediada por Nitróxido (NMP, do Inglês Nitroxide-Mediated Radical Polymerization) e a Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (RAFT, do Inglês Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer) (10).

A polimerização via RAFT é uma das mais interessantes e versáteis técnicas de polimerização radicalar controlada. Essas polimerizações ocorrem na presença de compostos tiocarbonílicos (agentes de transferência de cadeia), que reagem através de

um mecanismo de adição-fragmentação. RAFT é uma polimerização em cadeia que necessita de um iniciador capaz de gerar radicais livres (11).

O segredo da RAFT reside nos agentes de transferência de cadeia, que permitem à polimerização radicalar seguir como uma polimerização por condensação, ou seja, todas as cadeias crescendo ao mesmo tempo, além de ocorrer em temperaturas menores que as outras técnicas e no final da polimerização os únicos contaminantes serem os próprios monômeros, o que por sua vez facilita a purificação dos copolímeros (10).

A polimerização por RAFT é uma técnica que possibilita a obtenção de copolímeros do tipo dibloco facilmente. Este tipo de polimerização é vantajoso, pois é possível controlar o tamanho da cadeia, a topologia do polímero e também obter-se materiais com baixo índice de polidispersidade. (11).

A polimerização RAFT tem como principal característica uma sequência de adição-fragmentação em equilíbrio. No esquema 2 mostramos o mecanismo da polimerização RAFT utilizando um ditioéster como Agente de Transferência de Cadeia (CTA). O iniciador origina radicais primários por decomposição [1], estes radicais reagem com unidades dos monômeros, formando radicais oligômeros [P1] que reagem com a dupla ligação enxofre-carbono do agente de transferência de cadeia (1). O produto radicalar resultante (2) não reinicia a propagação, mas sofre uma fragmentação homolítica originando espécies radicalares [$R\bullet$ e $P_m\bullet$] que, por sua vez, reiniciam a polimerização, estabelecendo um equilíbrio entre as espécies ativas e dormentes, via adição e fragmentação. O equilíbrio entre as espécies de propagação e os macro-radicais RAFT (4) é a chave do processo RAFT, permitindo a formação de polímeros com baixa polidispersidade e um aumento linear da massa molar com a conversão do monômero (12).

O equilíbrio químico é estabelecido pelas constantes de velocidade de fragmentação e adição (k_β e k_α). A constante de velocidade de fragmentação deve ser mais lenta do que a constante de velocidade de adição, garantindo que as espécies dormentes prevaleçam no meio reacional. Deste modo, a reação de terminação entre as espécies radicalares é muito baixa. Ao final da polimerização a maioria das cadeias formadas retém o grupo do agente de transferência de cadeia e os polímeros resultantes podem ser separados como materiais estáveis e utilizados em novas polimerizações.

O homopolímero pode ser utilizado como macro agente de transferência de cadeia, permitindo desta forma sintetizar copolímero em bloco, com baixa polidispersidade.

Esquema 2: Reação de polimerização via RAFT, adaptado de Moad – 2005 (12).

Após a etapa de síntese, o homopolímero sintetizado e o copolímero em bloco precisam ser caracterizados, visando conhecer sua massa molar, assim como sua distribuição e a sequência real dos blocos no copolímero formado.

Os copolímeros são caracterizados usando ressonância magnética nuclear e cromatografia de permeação em gel. A cromatografia de permeação em gel (GPC), que é utilizada para obtenção da distribuição por tamanho das massas molares dos blocos individuais e do copolímero como um todo, baseia-se na separação de cadeias de diferentes tamanhos, por meio de uma coluna com porosidade adequada e posterior detecção (13).

1.3 Copolímeros em Bloco

O copolímero em bloco mais simples pode ser sumariado como $A_m B_n$, onde o bloco homopolimérico A_m está ligado covalentemente ao outro B_n . Este copolímero é

chamado copolímero dibloco (Esquema 3a). Outros exemplos são os copolímeros tribloco BAB, ($B_n A_m B_n$), no qual o bloco homopolimérico A_m está entre os blocos de B_n (Esquema 3b). No terceiro tipo, também chamado multibloco, os homopolímeros A_m e B_n estão ligados repetidas vezes (Esquema 3c). No quarto tipo chamado de estrela, os homopolímeros A_m e B_n formam uma estrutura parecida com uma estrela (Esquema 3d) (14).

Esquema 3: Tipos de Copolímeros em bloco: a) Dibloco, b) Tribloco, c) Multibloco e d) Estrela.

Copolímeros em bloco, sintetizados a partir de moléculas com características distintas são, por vezes, capazes de se auto-organizar em uma grande variedade de morfologias e diferentes meios. Devido à ligação química entre os componentes do bloco, a separação de fase ocorre em escala nanométrica. Isto permite a fusão das propriedades de dois polímeros totalmente diferentes em uma só estrutura química. Copolímeros em bloco são macromoléculas muito atraentes em termos de pesquisa acadêmica e de aplicação industrial. Os copolímeros em bloco podem ter várias aplicações como adesivos, aditivos em borrachas, agentes compatibilizantes, modificadores de viscosidade, agentes emulsificantes, agentes dispersantes, etc. (15,16).

A síntese controlada de copolímeros em bloco permite produzir materiais com propriedades distintas e específicas (17).

1.4 Copolímeros anfifílicos

Uma classe bastante estudada de copolímeros são os anfifílicos. Moléculas anfifílicas são formadas por uma região hidrofóbica e outra hidrofílica. Esses materiais apresentam analogia com os surfactantes de baixa massa molecular que também podem apresentar uma grande variedade de estruturas, podendo ser neutros (sem grupos carregados), zwitteriônicos (igual número de cargas positivas e negativas) ou carregados com carga positiva ou negativa. Alguns exemplos de substâncias anfifílicas são mostradas no Esquema 4.

Uma das características exibidas por copolímeros anfifílicos em água é a agregação em partículas esferoidais, também denominadas micelas (18). Assim como as micelas formadas por surfactantes, essas partículas são capazes de concentrar reagentes, seja por partição, por interações iônicas ou outras e, com isso, também acelerar reações químicas (19).

Os copolímeros em bloco anfifílicos podem ser úteis em diversas aplicações, tais como: (i) incorporação de substâncias tóxicas ou poluidoras, visando sua remoção de, por exemplo, rios, mares, lagos, mananciais, etc; (ii) estabilização de emulsões farmacêuticas, com possível utilização farmacotécnica; (iii) e incorporação de fármacos, podendo inclusive, proporcionar a liberação prolongada de fármacos, aumentando a meia vida do mesmo no organismo e/ou permitindo a sua liberação em tecidos alvo, sendo isto de grande importância do ponto de vista terapêutico (14, 20, 21).

Os agregados formados por tensoativos tais como vesículas, micelas e polímeros são amplamente estudados por possuírem interfaces anisotrópicas que separam uma região aquosa, hidrofílica e uma região oleosa, hidrofóbica. O aspecto relevante destas interfaces é de que estas podem controlar propriedades físicas e induzir mudanças de reatividade química e biológica (22,23).

As interfaces, além de determinarem propriedades físicas dos agregados, são responsáveis pelas mudanças de reatividade química e biológica que se produzem quando reações ou interações acontecem nos agregados, (24) (25). Estes sistemas apresentam interesse científico e amplo campo de aplicações, já que essencialmente todas as reações biológicas ocorrem em interfaces e agregados de composição variável.

Os copolímeros anfifílicos que respondem a variações de pH e temperatura são chamados “inteligentes” ou “sensíveis a estímulo” e têm sido objeto de interesse há algumas décadas devido a sua versatilidade de aplicações, tais como na área

1.5 Copolímero PMMA-*b*-PDMAEMA

Os copolímeros do tipo PMMA-*b*-PDMAEMA são copolímeros do tipo anfifílico, o bloco de polimetacrilato de metila é o bloco hidrofóbico e o bloco de polimetacrilato de N,N dimetilamino é o bloco hidrofílico. O bloco DMAEMA é um polímero funcional que apresenta carga positiva em uma ampla faixa de pH. Polímeros de DMAEMA são relativamente solúveis em água.

Baines e colaboradores (35) investigaram a micelização de blocos de copolímeros contendo PDMAEMA e PMMA e verificaram que, numa razão maior que 1 estes copolímeros são capazes de formar micelas. Baines demonstrou ainda que existe repulsão entre as cadeias catiônicas de PDMAEMA, e que este tipo de interação é responsável por determinar o tipo de associação existente, ou seja, a protonação das aminas presentes no PDMAEMA é responsável pelos tipos de associação do polímero.

Segundo Gaucher e colaboradores (36) as micelas poliméricas podem ser aplicadas como carreadores dos mais diversos compostos na terapia medicamentosa. As interações eletrostáticas ou interações hidrofóbicas determinam a separação do “núcleo” do meio ao seu redor. Estes copolímeros podem melhorar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos em água e podem modificar a distribuição de fármacos. Podem-se desenhar copolímeros com estabilidade física suficiente para resistir à dissociação após diluição e assegurar o transporte do fármaco na corrente sanguínea até tecidos específicos. As questões de estabilidade *in vivo* e retenção de fármacos, ou a falta dela, inevitavelmente tornam-se pontos focais na pesquisa realizada em sistemas micelares.

Polímeros com grupos amino terciários utilizados como agentes de transporte, tais como metacrilatos e metacrilamidas, a saber 2- (dimetilamino) acetato de metacrilato (DMAEMA) e 2- (dimetilamino) acetato de metacrilato (DEMAEMA), apresentam várias aplicações como biossensores, em “drug delivery”, no isolamento de biomoléculas, e no controle da atividade enzimática. Estas aplicações são possíveis porque estes polímeros apresentam propriedades específicas como sensibilidade ao pH, temperatura e capacidade de micelização (37)

Copolímeros de PMMA-*b*-PDMAEMA, em solução aquosa, formam micelas em pH maior que 6. Os grupos amino estão protonados em meio ácido e esta ionização aumenta o caráter hidrofílico do copolímero. Em meio alcalino o copolímero tem maior caráter hidrofóbico. Os copolímeros de PMMA-*b*-PDMAEMA apresentam atividade

antibacteriana, homeostática e antitumoral, além de aplicações potenciais em áreas do meio ambiente, transporte de fármacos, sensores, tintas, membranas. (38,39)

Para entender as atividades que os polímeros podem exercer em sistemas biológicos é preciso estudar sua interação com componentes desses sistemas, em especial membranas, uma vez que a membrana é a primeira barreira encontrada pelos transportadores. O estudo das interações de polímeros com as membranas representa um avanço na função e capacidade destes polímeros de encontrarem o alvo e prolongarem a liberação de drogas.

Micelas, vesículas e monocamadas, quando usadas para estudar aspectos específicos da biologia, podem ser consideradas como sistemas biomiméticos de membranas (40).

Para o estudo das interações polímeros/membranas os sistemas biomiméticos são uma ferramenta muito importante, pois nos permitem variar a composição lipídica das vesículas e a composição iônica do meio. A síntese dos polímeros pode ser controlada o que permite se estudar com mais detalhe as características da interação vesícula-polímero, sobretudo quais fatores estruturais dos polímeros são importantes para esse processo (41).

1.6 Sistemas miméticos de membrana

Moléculas anfifílicas como lipídios e surfactantes em solução aquosa podem se organizar espontaneamente em uma variedade de estruturas, formando sistemas miméticos. Sistemas miméticos de membrana podem ser: micelas, micelas reversas, monocamadas, bicamadas, vesículas (lipossomas) (Esquema 5).

O estudo de sistemas vesiculares compreende uma vasta área de estudos multidisciplinares que produz uma interface interessante entre a Química, Biologia, Bioquímica e a Física, resultando muitas vezes em aplicações na medicina, farmácia e engenharia. De acordo com seu tamanho, formato, morfologia, características físico-químicas, estas estruturas apresentam a capacidade de encapsulamento de compostos hidrofílicos no seu núcleo aquoso e compostos hidrofóbicos nas bicamadas lipídicas (42).

Sistemas biomiméticos são bastante utilizados por serem sistemas simplificados, de fácil preparação e apresentam características de membranas. As alterações de pH,

temperatura, concentração da solução, força iônica geram modificação na estrutura das membranas. A formação de micelas e lipossomas ocorre de acordo com a composição, por exemplo, ácidos graxos formam micelas e fosfolipídios formam bicamadas. (42)

Esquema 5: Representação de algumas estruturas formadas por moléculas anfifílicas: a) Micela, b) Micela reversa e c) Lipossoma

Durante estudos de difusão de cátions e ânions através de lipídeos, Bangham e col. (1965) observaram que determinados lipídeos em meio aquoso se reorganizavam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas que circundavam uma cavidade aquosa interna, semelhante às membranas biológicas (Esquema 6). Desde então, essas vesículas passaram a ser utilizadas como modelo de membrana biológica e foram denominados lipossomas. Nesta tese utilizaremos as denominações lipossomas e vesículas como sendo equivalentes.

As vesículas são estruturas esféricas formadas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios que separam um ou vários compartimentos aquosos. São de natureza anfifílica, pois são formados por uma região externa contendo um sistema de membranas fosfolipídicas e uma região interna constituída por um meio aquoso, sendo possível encapsular vários tipos de moléculas dentro desses compartimentos. (Esquema 6) (43).

Os métodos de preparação das vesículas podem ser: extrusão, sonicação, agitação, liofilização, congelamento e descongelamento, evaporação em fase reversa, entre outros. O diâmetro das vesículas é determinado pela sua forma de preparo e variam de 200 a 5000 nm.

As vesículas convencionais, formadas por uma ou mais membranas fosfolipídicas, são diferenciados pelo tamanho, número e organização das bicamadas fosfolipídicas. As mais vesículas são divididas nas seguintes categorias:

- Vesículas unilamelares pequenas (*Small Unilamellar Vesicles* – SUVs) é uma vesícula formada por uma única bicamada e são as menores com diâmetro variando de 20 a 80 nm.
- Vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles* – LUVs) são vesículas formadas por uma única bicamada fosfolipídicas com tamanho intermediário, com diâmetro entre 80 e 1 μm .
- Vesículas multilamelares (*Multilamellar Vesicles* – MLVs) são formadas por várias bicamadas fosfolipídicas disposta de forma concêntrica, com tamanho médio e diâmetro que varia de 400 nm e alguns micrometros.
- Vesículas gigantes (*Giants Unilamelares Vesicles* – GUVs) são normalmente formadas por uma única bicamada fosfolipídicas, e apresentam diâmetro superior a 1 μm .

Esquema 6: Composição dos lipossomas, compartimento aquoso, região hidrofílica e região hidrofóbica da bicamada, adaptado de Frezárd. (43)

Agregados, como vesículas, podem compartimentalizar reagentes, oferecendo oportunidades adicionais de controle de velocidade e composição de produtos. (24). Micelas e vesículas também podem ser utilizadas como modelos para o estudo da interação proteína (peptídeos) com membranas (45) (46), devido à semelhança de diversas características estruturais desses modelos com as das membranas biológicas. Vesículas constituem, também, um sistema de interesse, como modelo para investigar a transição entre sistemas inanimados e vivos (44).

Temos estudado em detalhe o efeito de micelas e vesículas em diversas reações de interesse biológico. Os sistemas básicos, bem como as formas de analisar dados e problemas, estão descritos em revisões de nosso grupo (25), (44). A quantificação do efeito de agregados de anfífilos sobre a cinética de reações depende fundamentalmente da determinação independente das constantes de ligação dos diversos reagentes aos agregados e das propriedades de interações com íons das interfaces. (44)

Vesículas modelos de membrana biológicas podem ser preparadas com fosfolipídios zwitteriônicos, como a fosfatidilcolina (PC) e com misturas de fosfolipídios, como por exemplo, o fosfatidilglicerol (PG) que possui carga negativa em pH fisiológico (Esquema 7). A presença de PG na mistura fosfolipídica facilita a ligação de compostos com carga positiva, tais como a dos copolímeros estudados neste trabalho.

Esquema 7: Estruturas dos Fosfolipídios: A) Fosfatidilcolina, PC, e B) Fosfatidilglicerol PG.

1.7 Sistemas Miméticos e Interação com Polímeros

O desenvolvimento de novas moléculas e macromoléculas que afetam as propriedades de membranas é de enorme importância. Perspectivas farmacêuticas incluem, por exemplo, compostos antimicrobianos, peptídios naturais e sintéticos capazes de permeabilizar a membrana externa de fungos e bactérias entre outros (47).

A superfície de uma membrana lipídica é um ambiente complexo de polaridade intermediária e podem conter diversos grupos funcionais, por exemplo, de compostos zwitterions, ânions (carboxilato, sulfonato) ou cátions (principalmente de amônio). A diversidade da composição da membrana é fundamental para exibir todos os modos de associação não-covalente que podem ser formados em água (36).

Lipossomas formados por polímeros são um importante estratégia biomimética para o reconhecimento molecular e também para reforçar as propriedades mecânicas dos lipossomas. Recentemente, foi sintetizado um polímero anfifílico capaz de induzir agregação por ancoragem à superfície dos lipossomas (46, 47).

Segundo Hayashi e colaboradores a interação entre polímeros anfifílicos pode induzir múltiplas propriedades na forma de lipossomas. Ringsdorf e colaboradores relataram que um polímero anfifílico (poliacrilamida alquilada) induzia ou reprimia liberação de calceína dos lipossomas dependendo da temperatura. Polozova et al., relataram que um outro polímero anfifílico (também poliacrilamida alquilada) induzia a fissão de lipossomas em alguns condições experimentais (48).

Polímeros foram utilizados como uma camada protetora contra coagulação e adsorção, como agentes modificadores de superfície e agentes dispersantes.

Kirpotin e colaboradores estudaram lipossomas preparados a partir de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) com 3 a 6% de PEG ligado (MPEG-DTP-DSPE) e compararam com preparações semelhantes contendo conjugado de PEG-fosfolípido não clivável. Observaram a liberação completa do conteúdo do lipossoma. Além disso, o desprendimento de PEG de DOPE resultou em fusão dos lipossomas (49).

Em nossos estudos caracterizamos a composição química, e estrutural dos polímeros e copolímeros e estudamos a interação desses com vesículas variando-se a carga das vesículas e o pH. A caracterização dos (co)polímeros foram feitas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia de permeação em gel (GPC). Para a interação polímeros-vesículas utilizou-se, a espectroscopia de fluorescência e Espalhamento de Luz dinâmico (DLS).

2. OBJETIVOS

- 1-** Caracterizar polímeros dibloco constituídos por subunidades de PMMA e PDMAEMA.
- 2-** Estudar as propriedades estruturais desses copolímeros em fase aquosa.
- 3-** Estudar a interação desses copolímeros com modelos de membrana biológica.
- 4-** Propor um mecanismo de ação desses copolímeros na interação com modelos de membrana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A fosfatidilcolina de ovo, PC, foi extraída da gema de ovo e purificada segundo método desenvolvido em nosso laboratório (50). O sal sódico do fosfolípido 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3-fosfo-(1'-rac-glicerol), PG, foi obtido da Avanti Polar Lipids.

A resina Sephadex – G25 medium, os compostos 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol (Tris), ácido bórico, ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfônico (MES), 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES), 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS), pireno tetrasulfonato de sódio (PTS) (Figura 1A), metilviologênio (MV) (Figura 1B), eram da Sigma-Aldrich. O álcool polivinílico (PVA), de massa molar 145.000 Da, foi obtido da Merck.

O metacrilato de metila, MMA, e o metacrilato de dietilaminoetila, DMAEMA foram obtidos da Aldrich. Os solventes: metanol, n-hexano e acetona, todos de grau analítico, e trietilamina, TEA, grau HPLC, eram da J. T. Barker. O tetrahidrofurano, THF, clorofórmio deuterado, DCl₃, água deuterada, D₂O, e 1-(N-fenilamino) naftaleno, NPN, eram da Sigma-Aldrich. Casa Americana de Artigos para Laboratório e Nuclear respectivamente. O peróxido de benzoíla, BPO, foi obtido da Vetec do Brasil. As membranas de policarbonato, com diâmetro de poro 100 nm, utilizadas para preparação de vesículas por extrusão, são da Whatman (Nucleopore, Track-Etch Membrane).

O ditiobenzoato de cumila, CDB, utilizado como agente de transferência de cadeia foi sintetizado por Valdomiro Vagner de Souza, de acordo com um método de dois passos, modificado de Mertoglu (52).

A 5(6)-carboxifluoresceína (CF), da Sigma-Aldrich, (Figura 1C) foi purificada segundo Weinstein (53) obtendo-se, ao final da preparação, uma solução do sal sódico da CF. A solução foi liofilizada e o pó guardado em geladeira até seu uso.

Figura 1: Estruturas dos compostos: A) Pireno tetrasulfonato B) Metilviologênio C) 5 (6)-Carboxifluoresceína em pH acima de 7,5.

Para análise dos copolímeros por cromatografia de permeação em gel, GPC, utilizamos um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu, equipado com injetor automático Sil-20A Shimadzu, detector de índice de refração RID-A Shimadzu e coluna Phenomenex, Phenogel, com dimensões de 300 x 7,8 mm. Os padrões de massa molar do polimetacrilato de metila, PMMA, utilizados na padronização da eluição dos polímeros da coluna, foram da Sigma-Aldrich.

As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Hitachi F-7000 e cela de quartzo com caminho ótico de 10 mm. Medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi U 2000.

As análises de RMN-¹H foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da USP em espectrômetros BRUKER operando em 300 ou 500 MHz para hidrogênio.

As medidas de diâmetro hidrodinâmico e mobilidade eletroforética foram realizadas em um aparelho Zetasizer Nano 317. As medidas foram realizadas em tampões variando o pH, os tampões foram previamente filtrados com membranas 0,22 µm e as amostras foram filtradas com membranas de poro 0,45 µm. As filtrações são necessárias para que a solução esteja isenta de poeira.

A microscopia ótica das vesículas gigantes (GUVs) foram feitas em microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 e câmera Zeiss AxioCam HS (High Speed). Os experimentos foram realizados pela Dra Karin do Amaral Risque e Rafael Lira, da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, SP.

A centrífuga UNIVERSAL 32 hettich Zentrifugen foi utilizada na purificação dos polímeros.

3.2 Métodos

3.2.1 Dosagem dos Fosfolipídios

A concentração dos fosfolipídios foi determinada analisando-se o fosfato presente nas amostras. Alíquotas das amostras de LUVs foram adicionadas aos tubos de ensaio (previamente lavados em HCl concentrado) e foram secas numa estufa de 120°C. Após secagem adicionou-se 0,4 mL de ácido perclórico 70 % a cada amostra. Os tubos foram mantidos por uma hora em um digestor a 180 °C, tempo necessário para mineralizar totalmente os lipídios. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionaram-se 1 mL de água e 0,4 mL de molibdato de amônio 1,25 % (p/v) às amostras. Os tubos foram agitados num vórtex imediatamente após cada adição. Em seguida, adicionou-se às amostras 0,4 mL de uma solução de ácido ascórbico 3 % (p/v), agitaram-se os tubos em vórtex, novamente, e as amostras foram mantidas em banho-maria por cerca de 10 minutos. Após esse período os tubos foram esfriados em água corrente e a absorbância lida em 797 nm. A curva padrão foi feita junto com as amostras utilizando-se uma solução padrão de KH_2PO_4 0,001 M em água (54).

3.2.2 Sínteses dos copolímeros PMMA-*b*-PDMAEMA

As sínteses de alguns copolímeros utilizados nesta tese foram realizadas, em sua maioria, pelo aluno Valdomiro Vagner de Souza, no Instituto de Ciências Exatas - ICEx, na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL.

Os copolímeros PMMA-*b*-PDMAEMA (Figura 2) foram sintetizados através da técnica RAFT, utilizando-se ditiobenzoato de cumila (CDB) como agente de transferência de cadeia.

Figura 2: Estrutura geral dos copolímeros PMMA-*b*-PDMAEMA

3.2.3 Síntese do CDB

O ditiobenzoato de cumila (CDB) foi sintetizado em duas etapas. Inicialmente produziu-se o ácido ditiobenzóico, usando-se para isso um reagente de Grignard (cloreto de fenilmagnésio em THF) e dissulfeto de carbono (Figura 3).

Figura 3: Síntese do ácido ditiobenzóico.

Adicionou-se vagarosamente 55 mL dissulfeto de carbono a 20 mL de uma solução 2 M de cloreto de fenilmagnésio em THF e manteve-se a mistura de reação por 45 minutos sob refluxo. Após a reação o excesso de CS₂ foi evaporado e adicionou-se 1 M HCl. O ácido ditiobenzóico foi extraído com éter. O CDB foi sintetizado por uma reação de adição, usando o ácido ditiobenzóico e o α -metil-estireno (Figura 4), 1,7 mL de α -metil-estireno (0,013 moles) e 2,314 g de ácido ditiobenzóico (0,015 moles) foram adicionados, na ausência de oxigênio, a 70 mL de clorofórmio. A mistura foi mantida sob aquecimento a 55 °C por cinco horas. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica, com uma fase móvel de hexano (85%) e clorofórmio (15%).

Figura 4: Síntese do CDB – ácido ditiobenzóico mais α -metil-estireno formando ditiobenzoato de cumila

3.2.4 Síntese dos Copolímeros:

A síntese foi iniciada com o bloco de PMMA utilizando-se o BPO como iniciador. Para a síntese do copolímero solubilizou-se MMA em THF ~60 mL, adicionando-se o iniciador BPO e o CDB e elevando-se a temperatura até 70°C onde se forma o produto PMMA_nCDB. As massas adequadas de MMA, BPO e CDB para a síntese de cada polímero estão na Tabela 1. A síntese foi interrompida ao se verificar aumento significativo da viscosidade após aproximadamente 7,2 h.

Tabela 1: Parâmetros da síntese dos polímeros de PMMA

Monômero	m MMA (g)	CDB (mmol)	BPO (mmol)	T (°C)	t (min)
PMMA X	13,52	0,1200	0,05020	80	480
PMMA Y	2,149	0,1140	0,04600	95	420
PMMA Z	50,000	0,0069	0,00173	80	400

O PMMA_nCDB foi purificado por precipitação em metanol, PMMA_nCDB_{ppt}, solvente no qual o monômero é solúvel e o polímero insolúvel. O PMMA_nCDB_{ppt} foi separado por filtração, o metanol eliminado em sua maior parte em evaporador rotatório e o solvente residual foi retirado em dessecador sob vácuo (Figura 5). O PMMA_nCDB foi utilizado como macro-agente de transferência de cadeia.

Figura 5: Etapas da síntese do Bloco de PMMA_nCDB do polímero de metacrilato de metila.

Os blocos de PMMA_nCDB foram utilizados como Agentes de Transferência de Cadeia (macro CTA) em copolimerização com o monômero de DMAEMA utilizando o BPO como iniciador. As massas utilizadas de DMAEMA, BPO e PMMA_nCDB para a síntese de cada copolímero estão na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros da síntese dos copolímeros de PMMA-b-PDMAEMA

Monômero	m PMMA)* (g)	m DMAEMA (g)	BPO (mmol)	T (°C)	t (min)
PMMA-b-PDMAEMA X	1,25	50	0,0502	80	480
PMMA-b-PDMAEMA Y	0,673	60	0,046	95	420
PMMA-b-PDMAEMA Z	1,26	47	0,22	90	400

* PMMA referente ao PMMA_nCDB utilizado com agente de transferência de cadeia

A mistura de reação com PMMA_nCDB, DMAEMA e BPO, na ausência de solvente, foi mantida, sob agitação, num balão de três bocas, em refluxo e atmosfera de N₂, num banho de glicerina. A temperatura foi aumentada paulatinamente de 40 a 90 °C, até a mistura ficar viscosa. O tempo de reação para cada síntese depende da razão utilizada entre os monômeros, sendo da ordem de 4 h. Os copolímeros foram purificados por precipitação em n-hexano e a secagem do solvente residual foi feita sob vácuo (Figura 6).

Figura 6: Síntese do copolímero – PMMA-*b*-PDMAEMA. Monômero de DMAEMA + BPO formando o radical polimérico, este radical reage com o PMMA_nCDB formando o PMMA-*b*-PDMAEMA

3.2.5 Purificação dos copolímeros PMMA-*b*-PDMAEMA

Os copolímeros foram dissolvidos em acetona e a mistura foi centrifugada por 10 min a 2000 rpm. O monômero é insolúvel em acetona enquanto que o polímero é solúvel. O resíduo foi descartado, o sobrenadante foi coletado e evaporado com um fluxo contínuo de N₂. Os tubos de ensaio contendo os copolímeros foram colocados em um dessecador que foi mantido sob vácuo para completa remoção do solvente residual.

3.2.6 Cromatografia de Permeação em Gel - GPC

Os copolímeros foram caracterizados por GPC. Todas as soluções e misturas de solventes foram filtradas em Millex LCR com membranas de PTFE modificada de tamanho de poro 0,45 µm, antes da injeção. O volume injetado variou de 5 µL a 10 µL e o fluxo utilizado foi de 0,6 cm³/min, na temperatura ambiente (~ 22°C). A curva de

calibração foi preparada a partir dos seguintes padrões de PMMA: a) PMMA “Green”, b) PMMA “Red” e c) PMMA “White”, com as seguintes composições de massa molar ponderal média (M_w):

PMMA “Green”: 1.580.000 Da, 380.000 Da, 40.300 Da, 6.270 Da;

PMMA “Red”: 1.100.000 Da, 199.000 Da, 23.200 Da, 1.980 Da;

PMMA “White”: 655.000 Da, 86.700 Da, 12.500 Da, 831Da.

A curva de calibração, para cada padrão, foi construída através do gráfico de $\log(M_w)$ versus o volume eluído (V_e) para os padrões de PMMA.

As soluções dos padrões foram preparadas numa concentração de 2 g/L em THF e as amostras foram preparadas numa concentração de 20 g/L em THF com 0,2 % de TEA. A fase móvel utilizada foi THF com 0,02% TEA, aplicou-se 5 μ L no GPC. A corrida foi feita com fluxo de 0,6 ml/min durante 25 min.

3.2.7 Determinação dos valores da razão n/m entre os blocos PMMA e PDMAEMA dos copolímeros PMMA_n-b-PDMAEMA_m.

A razão n/m entre o número de monômeros de MMA (n) e DMAEMA (m) que compõem cada um dos copolímeros PMMA_n-b-PDMAEMA_m foi determinada através da análise do Espectro de ^1H -RMN a 300 MHz. Os picos referentes aos hidrogênios característico de cada monômero. Os espectros foram adquiridos com pulsos de 90° em torno de 8,0 μ s, com janela espectral de 12 ppm.

3.2.8 Determinação da concentração micelar crítica, cmc, dos copolímeros PMMA_n-b-PDMAEMA_m

Para determinação da concentração micelar crítica, cmc, fizemos a análise da fluorescência do NPN em solução dos copolímeros. O NPN tem um rendimento quântico muito baixo em solventes polares como a água e um rendimento quântico mais elevado em ambientes menos polares, tais como agregados de copolímero.

Preparou-se uma solução de NPN 1×10^{-3} M em metanol e a solução de copolímero $4,7 \times 10^{-4}$ M em tampões 0,01M pH 6 (tampão MES), pH 8 (tampão Tris/HCl) e pH 10 (tampão CAPS). Adicionou-se à cubeta volumes crescentes de copolímero, 4 μ L de NPN ($[\text{NPN}]_{\text{final}} = 2,0 \times 10^{-6}$ M) e completou-se o volume com

tampão 0,01M, no respectivo pH, para 2,0 mL. O sinal de fluorescência foi registrado após cada diluição com agitação ($\lambda_{\text{exc}} = 352 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 370 \text{ a } 600 \text{ nm}$).

3.2.9 *Análise elementar. C, H e N*

As análises foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.2.10 *Determinação dos pKas dos grupos amino dos copolímeros.*

Os pKas dos grupo amino presentes nos copolímeros foram determinados através de titulação. Adicionou-se em 30 mL de HCl 0,01 M, uma alíquota (Tabela 3) da solução de copolímero em metanol suficiente para que o pH inicial fosse ajustado para cerca de 2,0. Imergiu-se o eletrodo na solução, sob agitação, e deixou-se o sistema por 10 min em equilíbrio, mantendo-se uma atmosfera de N_2 durante toda a titulação. Em seguida adicionou-se o titulante, NaOH, 0,05 M, utilizando-se uma microseringa (com volumes que variavam de 25 a 100 μL) sob agitação constante. O valor do pH foi registrado após cada adição do titulante, até atingir pH~11,0.

Tabela 3 – Volume e concentração inicial de copolímero adicionado à solução de HCl (30 mL) para titulação.

Polímero	Volume adicionado (mL)	Concentração (M)
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA X	0,5	$3,13 \times 10^{-3}$
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Y	0,25	$4,75 \times 10^{-3}$
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Z	0,9	$6,65 \times 10^{-4}$
PDMAEMA	2,0	$1,18 \times 10^{-3}$

3.2.11 *Estudo da estruturação dos copolímeros em vários pHs, por RMN de ^1H e NOESY*

A estruturação dos copolímeros foi analisada por ^1H -RMN e sequência NOESY, para observar as interações que ocorrem em meio aquoso.

Os experimentos de RMN foram realizados na Central Analítica do IQ/USP, em um espectrômetro Bruker Avance III operando a 500 MHz (frequência de ^1H). Os ensaios foram realizados em tubos com diâmetro de 5 mm a uma temperatura de 25 °C.

Soluções estoque de 2×10^{-3} M e 2×10^{-2} M do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} e das LUVs PC:PG 90:10 foram usadas para o preparo das amostras analisadas. As soluções estoque de copolímero utilizadas para os ensaios em soluções aquosas foram preparadas a partir da solubilização em metanol-d₄ 99,8% deuterado. As concentrações e condições de pH utilizadas estão dadas na tabela 4. Também foram adquiridos espectros ¹H para amostras do copolímero dissolvidas em clorofórmio deuterado (Tabela 4). Os espectros foram adquiridos com pulsos de 90° em torno de 8,2 μs com janela espectral de 12 ppm. Os espectros de RMN foram processados utilizando o programa NMRPipe (42) e analisados com CcpNmr Analysis (55).

Foram realizados experimentos de correlação homonuclear via acoplamento dipolar (2D-NOESY) para identificar interações entre os spins nucleares através do espaço. Os espectros 2D-NOESY foram adquiridos com um mixing time de 120 ms. Para a supressão do sinal da água, foi utilizada uma sequência de pulsos que aplica pré-saturação da água durante o *delay* de relaxação e *mixing time* (56). Os NOESYs foram adquiridos com 2048 x 700 pontos complexos, usando o método de States-TPPI para discriminação de frequências na dimensão indireta. Todos os experimentos de RMN foram adquiridos usando abundância natural dos isótopos e foram realizados por Luciana Coutinho de Oliveira e Dr Roberto K. Salinas. O volume final das soluções preparadas foi de 500 uL e as concentrações de copolímero utilizadas foi de 2mg/mL ou 10mg/mL apresentados na tabela 4.

3.2.12 *Preparação das Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs)*

As vesículas unilamelares grandes (LUVs) foram preparadas utilizando-se soluções dos lipídios PC e PG dissolvidos em diclorometano e misturando-se os mesmos na proporção desejada, em um tubo de ensaio. Em geral usou-se uma massa da ordem de 9 mg de lipídio total para cada preparação. O diclorometano foi evaporado com um fluxo contínuo de N₂, com rotação do tubo para formação do filme lipídico (Esquema 8). Os tubos de ensaio contendo os filmes foram colocados em um dessecador, acoplado a uma bomba de vácuo, durante 1h, para completa remoção do solvente.

Tabela 4: Detalhamento do preparo das amostras do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} em diferentes condições para análises de RMN, através de experimentos unidimensional de prótons e bidimensional (¹H-¹H)-NOESY. O volume final das amostras em tampão foi de 500 μ L

Tampão 10mM /pH ou solvente	Volume de D ₂ O	Volume de estoque de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0}	Volume de 2 x10 ⁻² M LUV PC:PG 90:10	Concentração final de PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0}
¹H				
CDCl ₃	-	1mL	-	10 mg/mL
CDCl ₃	-	1mL	-	2 mg/mL
Fosfato / pH 6,2	50 μ L	26 μ L	-	2 mg/mL
Fosfato / pH 7,0	50 μ L	26 μ L	-	2 mg/mL
Fosfato / pH 8,2	50 μ L	26 μ L	-	2 mg/mL
Borato / pH 10	50 μ L	26 μ L	-	2 mg/mL
2D-NOESY				
Fosfato / pH 6,2	50 μ L	26 μ L	-	2 mg/mL
Fosfato / pH 7,0	50 μ L	26 μ L	-	2 mg/mL
Fosfato / pH 8,2	50 μ L	26 μ L	-	2 mg/mL
Borato / pH 10	50 μ L	26 μ L	-	2 mg/mL
Fosfato / pH 6,2	50 μ L	26 μ L	40 μ L	2 mg/mL
Fosfato / pH 7,0	50 μ L	26 μ L	40 μ L	2 mg/mL
Fosfato / pH 8,2	50 μ L	26 μ L	40 μ L	2 mg/mL
Borato / pH 10	50 μ L	26 μ L	40 μ L	2 mg/mL

Esquema 8: Método de preparação dos lipossomas baseado no processo de hidratação (CF ou PTS) do filme lipídico adaptado Frézard (43)

Aos filmes adicionou-se 0,5 mL de CF 0,050 M (ou 0,5 mL de PTS 0,001M, tampão Tris/HCl 0,01M, pH 8 e 0,1 M NaCl) e a suspensão foi agitada até completa liberação do filme lipídico do tubo, formando vesículas multilamelares (MLVs), Esquemas 8 e 9.

Esquema 9: Representação esquemática da preparação de vesículas lipídicas a partir de filmes (57).

Para a formação das vesículas unilamelares, LUVs, e uniformização do diâmetro das mesmas, a suspensão de MLVs foi passada por um extrusor, por 11 vezes (Patty, et al., 2003) como mostrado no Esquema 10. O extrusor contém duas membranas de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro e duas seringas, uma em cada extremidade do aparelho.

Esquema 10: Representação esquemática da montagem do extrusor.

Após a extrusão a suspensão das LUVs contendo CF foi passada por uma coluna de Sephadex G-25 (Esquema 11), para separar as vesículas contendo CF em seu compartimento aquoso interno da CF livre fora das LUVs. As vesículas foram eluídas pela coluna utilizando-se tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 300 mM como eluente, para que a força iônica dentro e fora das vesículas fosse a mesma.

Esquema 11: Representação esquemática e foto da coluna de Sephadex G-25 com os lipossomas contendo CF.

A suspensão das LUVs contendo PTS também foi passada por uma coluna de Sephadex G-25 (Esquema 11), para separar as vesículas contendo PTS do PTS livre em solução, utilizando-se tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 100 mM como eluente.

3.2.13 Medida do Vazamento de CF e PTS das LUVs por Fluorescência

A supressão da fluorescência pode ocorrer por dois mecanismos: supressão colisional dinâmica ou supressão estática. A supressão colisional dinâmica ocorre quando o fluoróforo que está no estado excitado é desativado pelo contato com um supressor em solução. Neste caso não ocorre alteração química. A supressão estática ocorre quando o fluoróforo que está no estado excitado retorna ao estado fundamental através da formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. A diminuição da intensidade de fluorescência colisional é descrita pela equação de Stern-Volmer (58) (Equação.1).

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad \text{Equação 1}$$

F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do supressor

F é a intensidade de fluorescência na presença do supressor

k_q é a constante de supressão bimolecular

τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor

$[Q]$ é a concentração do supressor

A constante de supressão de stern-Volmer é dada pela equação 2:

$$K_D = k_q \tau_0 \quad \text{Equação 2}$$

Com a CF ocorre o mecanismo de auto-supressão, quando em altas concentrações do fluoróforo, por transferência de energia entre os monômeros de CF no estado excitado através de colisões com outros monômeros ou dímeros no estado fundamental. A concentração de CF utilizada neste trabalho foi de 50 mM para a qual a autossupressão é grande.

A fluorescência do PTS é suprimida pelo MV. Quando o PTS está encapsulado nas LUVs a sua fluorescência não é suprimida quando se adiciona o MV no compartimento aquoso externo, porque nem o PTS nem o MV atravessam a membrana das LUVs, devido as cargas dessas moléculas. Quando as LUVs são permeabilizadas por qualquer agente, e o PTS encontra o MV na fase aquosa externa, forma-se o par PTS/MV e a fluorescência diminui, em função da concentração do supressor.

3.2.14 Cinética de Vazamento de CF das Vesículas

As cinéticas de vazamento de CF das LUVs foram medidas a 25°C. Uma alíquota de 90 µL de LUVs, após passagem pela coluna de Sephadex-G25, foi adicionada a uma cela de fluorescência contendo um volume de tampão suficiente para completar 2 mL de volume final. A fluorescência da amostra foi registrada em função do tempo. Após 100 s adiciona-se à cela uma alíquota da solução do copolímero PMMA-*b*-PDMAEMA, sob agitação constante no fluorímetro, e monitorou-se a variação de fluorescência em função do tempo. Se houvesse aumento da permeabilidade da bicamada da vesícula e passagem da CF para o compartimento aquoso externo,

haveria aumento de fluorescência devido à diluição CF. A cinética de permeabilização das LUVs foi seguida por 450 s e, após este tempo, adicionou-se 30 µL de Polidocanol 10% v/v para se obter a completa permeabilização de todas as vesículas e obter o máximo de fluorescência. O valor de intensidade de fluorescência máxima foi determinado para se calcular a porcentagem de permeabilização nos tempos desejados.

A porcentagem de permeabilização das vesículas em cada cinética foi calculada utilizando a equação 3.

$$\% \text{ Permeabilização} = \frac{(I_{(t)} - I_0)}{(I_{\text{tot}} - I_0)} * 100 \quad \text{Equação 3}$$

I_0 - intensidade de fluorescência inicial, antes da adição do copolímero.

$I_{(t)}$ - fluorescência após adição do copolímero no tempo definido t.

I_{tot} - fluorescência total, após adição de detergente.

3.2.15 Cinética de Vazamento de PTS das Vesículas na presença de MV.

As cinéticas de vazamento de PTS das LUVs foram medidas a 25 °C e a fluorescência foi monitorada em 405 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$). Uma alíquota de 30 µL de LUVs 3mM foi adicionada a uma cela de fluorescência contendo um volume de tampão suficiente para completar 2 mL de volume final. A fluorescência foi registrada em função do tempo, sob agitação constante, e após 100 s adicionou-se à cela uma alíquota da solução de copolímero. Se houver aumento da permeabilidade da bicamada da vesícula e passagem do PTS para o compartimento aquoso externo, haveria uma diminuição na intensidade de fluorescência devido à interação PTS/MV. A cinética de permeabilização das LUVs foi seguida por 400s e, após este tempo, adicionou-se 30 µL de Polidocanol 10% v/v para se obter a completa permeabilização de todas as vesículas e registro do mínimo de fluorescência.

A porcentagem de permeabilização das vesículas em cada cinética foi calculada utilizando a equação 4.

$$\% \text{ Permeabilização} = \frac{(I_0 - I_{(t)})}{(I_0 - I_F)} * 100 \quad \text{Equação 4}$$

I_0 - intensidade de fluorescência inicial, antes da adição do copolímero

$I_{(t)}$ – intensidade de fluorescência após adição do copolímero num tempo definido t

I_F - intensidade de fluorescência final após adição de detergente

3.2.16 Preparação das LUVs para experimentos de Mobilidade Eletroforética, Potencial zeta e Diâmetro Hidrodinâmico

As LUVs foram preparadas conforme descrito no item 3.2.12 (Esquema 9 e 10) e a solução de hidratação variou conforme desejado. Para ~9 mg de lipídio total utilizou-se 0,5 mL de tampão Tris/HF 0,01 M pH 8,5 e a amostra foi passada pelo extrusor conforme descrito.

3.2.17 Determinação da Mobilidade Eletroforética, U_E , Potencial zeta, ζ , e Diâmetro Hidrodinâmico, D_H

As partículas que estão dispersas em sistema aquoso podem adquirir carga em sua superfície. Os mecanismos mais comuns de obtenção de cargas na superfície são a ionização de grupos superficiais, adsorção de espécies carregadas do meio e a dissociação iônica. Essas cargas de superfície modificam a distribuição dos íons circundantes, resultando em uma camada ao redor da partícula, que é diferente da solução. Se aplicarmos um campo elétrico nestas partículas, elas se moverão para um dos polos, dependendo da sua carga. O sentido que as partículas tomam é uma indicação do sinal da carga que carregam em sua superfície. A velocidade com que elas se movem é proporcional ao valor da carga. Como as partículas se movimentam em movimento browniano, a camada da superfície se move como parte dela.

A medida de potencial zeta, ζ , é feita aplicando-se um campo elétrico através da solução. A velocidade da partícula nesse campo elétrico é medida através da técnica de anemometria laser Doppler. A mudança de frequência do laser incidente nessa partícula em movimento é medida como a mobilidade das partículas (mobilidade eletroforética, U_E) esta mobilidade é convertida em ζ , aplicando-se a teoria de Smoluchowski (equação 5). A U_E é medida usando-se um eletrodo de imersão e o ζ é calculado a partir de valores da U_E , através da aproximação da equação Henry's com Smoluchovski (Equações 5 e 6).

$$U_E = 2\epsilon z f(ka) / 3\eta \quad \text{Equação 5}$$

$$\zeta = \eta U_E / \epsilon \quad \text{Equação 6}$$

U_E = Mobilidade eletroforética

ζ = potencial zeta

ϵ = constante dielétrica

$f(ka)$ = Função de Henry

η = Viscosidade

A magnitude do ζ permite uma avaliação de estabilidade das partículas em dispersão. Convencionalmente, um valor de ζ , em módulo, de 30 mV é um potencial elevado, implicando em estabilidade da partícula.

Os valores de diâmetro hidrodinâmico, D_H , ζ e U_E das LUVs foram determinados a 25° C, numa cubeta de quartzo. O tampão utilizado para a diluição da vesícula foi previamente filtrado através de uma Membrana Millipore de diâmetro de poro de 0,22 μ m. Valores utilizados de D_H e U_E foram a média de três medidas da mesma amostra. Para as medições de D_H e U_E , utilizamos 40 μ l da solução de LUVs 25 mM em 1 mL de solução tampão Tris/HF 10mM pH 8,5. Após a medida dos valores iniciais de D_H e U_E , adicionamos 5 μ l da alíquota do copolímero (solução estoque da ordem de 6×10^{-3} M) e realizamos a medida. Continuamos a adição do copolímero até um volume final de 200 μ l.

As condições e parâmetros utilizados foram: água como dispersante, índice de refração 1,33, viscosidade 0,792 cP, constante dielétrica 76,8 e temperatura de 25° C.

3.2.18 Preparação das Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

As GUVs foram preparadas no laboratório da Profa. Dra. Karin A. Riske com o auxílio dos alunos Rafael Lira e Thaís F. Schmidt, da UNIFESP. Para a preparação das GUVs espalhou-se 100 μ L da solução de álcool polivinílico, PVA, 5% p/v sobre uma lâmina de microscópio, de modo a formar um filme fino. A lâmina foi mantida em estufa a 70 °C por 15 min. Após a secagem da solução de PVA espalhou-se, sobre o mesmo 100 μ L de uma solução 2 mg/mL de lipídios em clorofórmio. O solvente residual foi removido em dessecador, sob vácuo, por 30 min. Colocou-se uma moldura

de teflon sobre a lâmina e fechou-se a moldura com outra lâmina, de 2 mm de espessura. A câmara formada foi preenchida com uma solução de sacarose 0,2 M e deixada em repouso por 20 min. A suspensão das GUVs foi coletada e diluída 10 vezes em glicose de mesma osmolaridade (0,2 M).

Outra técnica utilizada também em colaboração com a Profa. Dra. Karin foi a de eletroformação(59). Nesta técnica espalhou-se 10 μ L da solução lipídica 2 mg/mL em clorofórmio sobre duas lâminas de microscópio recobertas com um polímero de óxido de estanho dopado com flúor, que conduz corrente elétrica (Figura 13a). O clorofórmio foi retirado com fluxo de N₂ formando um filme (Figura 13b). As lâminas são separadas por uma moldura de teflon de 2 mm de espessura, com a superfície condutora voltada uma para a outra (Figura 13c). A câmara formada pelas lâminas foi preenchida completamente com uma solução de sacarose 0,2 M (Figura 13d) e então foi conectada a um gerador de corrente alternada, onde foi aplicada uma diferença de potencial de 1 V com uma frequência de 10 Hz por um período de 1 hora (Figura 13e). Após a formação das GUVs a suspensão foi coletada e diluída aproximadamente 10 vezes em uma solução de glicose 0,2 M.

A diluição em glicose nos dois experimentos confere um contraste óptico às vesículas quando observadas em microscópio de contraste de fase, devido à diferença de índice de refração das soluções de sacarose e glicose. Além disso, pelo fato da sacarose ser mais densa que a glicose, as vesículas sedimentam, facilitando a observação por microscopia óptica. O Figura 8 mostra o contraste observado nas GUV com sacarose encapsulada e glicose na fase externa.

Figura 7: Etapas de preparação das GUVs pelo método de eletroformação. a) Espalhamento da solução lipídica sobre as lâminas recobertas com polímero de óxido de flúor. b) Eliminação do clorofórmio por fluxo de N_2 . c) Montagem da câmara com as lâminas recobertas com o filme. d) Preenchimento da câmara com a solução de sacarose 0,2 M. e) Conexão da câmara com o aparelho de eletroformação.

Figura 8: Visualização da GUV em microscópio óptico, por contraste de fase.

3.2.19 Microscopia Óptica

As GUVs foram observadas em microscópio invertido, equipado com objetivas de contraste de fase com aumento de 20x, 40x e 63x.

A cela de observação (Figura 9) foi preenchida com uma solução de copolímero de concentrações definidas, preparadas no tampão adequado. Utilizamos 0,1 M NaCl e glicose 0,2 M em todos os tampões. Os tampões utilizados foram: MES 0,01 M pH 6,0, Tris/HCl 0,01 M pH 8,5 e CAPS 0,01 M, pH 10,0. Imediatamente após a adição à cela de 20 μ L da suspensão de GUVs (em sacarose) e 75 μ L de tampão (em glicose) inicia-se a filmagem.

Figura 9: Modelo de suporte para visualização das GUVs, no experimento com PVA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os copolímeros estudados neste trabalho foram caracterizados inicialmente quanto a sua distribuição de tamanhos, agregação e pKas dos seus amino grupos. Após esta caracterização, estudamos a interação dos copolímeros com vesículas preparadas com diferentes fosfolipídios, em diversos pHs, e por diferentes técnicas.

4.1 Caracterização dos Copolímeros

4.1.1 Cromatografia de Permeação em Gel – GPC

Caracterizou-se o homopolímero PDMAEMA e os copolímeros PMMA-*b*-DMAEMA por cromatografia de permeação em gel (GPC) para determinação da massa molar ponderal média (M_w), massa molar numérica média (M_n) e polidispersidade (PDI).

Para os estudos dos copolímeros nomeamos cada um da seguinte forma: PMMA-*b*-PDMAEMA X, PMMA-*b*-PDMAEMA Y, PMMA-*b*-PDMAEMA Z e, o homopolímero de metacrilato de dietilaminoetila, PDMAEMA.

Para a determinação da massa molar média dos polímeros por GPC preparamos a curva de calibração com padrões de PMMA, Tabela 3. A corrida foi feita com a mistura THF/0,02% TEA com um fluxo de 0,6 ml/min durante 25 min. Cada conjunto de padrões é composto por quatro polímeros de PMMA com diferentes M_w , PMMA “Green”, PMMA “Red” e PMMA “White”.

Tabela 3: Massa Molar Ponderal Média (M_w) dos Padrões de PMMA, em Da

PMMA “Green”	PMMA “Red”	PMMA “White”
1.580.000	1.100.000	655.000
380.000	199.000	86.700
40.300	23.200	12.500
6270	1.980	831

Na Figura 10 é mostrado o cromatograma de eluição do conjunto de padrões PMMA “Red”, que apresenta 4 picos correspondentes a polímeros de M_w diferentes, como apresentado na Tabela 4. Os demais conjuntos têm perfil semelhante com os picos em diferentes volumes de eluição.

Figura 10: Cromatograma do padrão de massa molecular do PMMA “Red”.

Após a obtenção dos cromatogramas dos conjuntos “Red”, “Green” e “White”, utilizamos os valores do tempo de eluição e os respectivos valores de Mw, Tabela 4, para a construção da curva analítica.

Tabela 4: Tempo de eluição e Massa Molar Ponderal Média dos Padrões de PMMA “Green” (G), “Red” (R) e “White” (W)

Tempo de eluição (min)	Padrão	Massa Molar Ponderal Média (Mw)
10.78	G	1.580.000
10.84	R	1.100.000
11.02	W	655.000
11.19	G	380.000
12.01	R	199.000
13.29	W	86.700
14.69	G	40.300
15.68	R	23.200
16.64	W	12.500
17.48	G	6.270
18.59	R	2.180
19.58	W	831

No gráfico da Figura 11 é possível observar que existe uma relação aproximadamente linear entre o $\log M_w$ e o tempo de eluição entre 11,19 min e 19,58 min ($R^2 = 0,9868$). Para os tempos menores que 11,19 minutos esta linearidade não se mantém (dados não apresentados) devido à alta massa molar dos padrões, e consequente volume hidrodinâmico, que são eluídos no volume de exclusão da coluna.

Figura 11: Curva de Calibração com Padrões de PMMA. Log Mw vs Tempo de eluição da amostra.

Após a construção da curva padrão, analisaram-se os copolímeros. Para os copolímeros, o volume utilizado variou de 5 μL a 10 μL , com concentração de 20 g/L. A corrida foi feita nas mesmas condições da curva padrão. O cromatograma de eluição dos copolímeros PMMA-*b*-PDMAEMA Z e PMMA-*b*-PDMAEMA X são mostrados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

Figura 12: Cromatograma do copolímero - PMMA-*b*-PDMAEMA Z.

Figura 13: Cromatograma do copolímero – PMMA-*b*-PDMAEMA X.

Na figura 14 está o cromatograma processado do PMMA-*b*-PDMAEMA Y e na Figura 15 o do PDMAEMA.

Figura 14: Cromatograma processado do copolímero - PMMA-*b*-PDMAEMA Y

Polímeros sintéticos, em geral e como é o caso aqui, consistem de um conjunto de moléculas de vários tamanhos, ou seja, exibem normalmente uma distribuição de massa molecular e são, por isso, denominados polidispersos. Quando o índice polidispersidade (PDI) é igual a 1, o polímero é considerado monodisperso, mas para polímeros que são sintetizados por mecanismos de reação de adição, como é o caso do RAFT, eles apresentam PDI maiores que 1. Desta forma, a massa molar ponderal média, M_w , deve ser calculada com base na distribuição verificada no cromatograma levando-se em consideração a concentração relativa de cada fração de massa molar.

Figura 15: Cromatograma do polímero - PDMAEMA.

A massa molar numérica média (**M_n**) e a massa molar ponderal média (**M_w**) foram calculadas para os copolímeros, usando-se a intensidade de cada ponto do cromatograma, a partir de seu volume eluição e da equação determinada pela curva de calibração, que correspondem a uma fração de cadeias que se considera tenham a mesma massa molar. Dessa forma, usando-se todos os pontos do pico de um determinado polímero determina-se a massa molar média (usando qualquer base de ponderação). Isso é possível, pois a detecção do polímero foi feita por meio de índice de refração diferencial, que tem a intensidade do sinal proporcional à concentração da amostra (polímero) sendo analisada a cada ponto. Sendo assim, a intensidade do sinal do detector pode ser diretamente correlacionada com a concentração de cadeias com determinada massa molar (medida pelo volume de eluição correspondente a esse ponto específico no cromatograma). Usando essas considerações, as equações a seguir podem ser usadas.

Para os cálculos do **M_n** utilizamos a equação 6:

$$M_n = \frac{\sum I_i}{\sum (I_i/MM_i)} \quad \text{Equação 6}$$

Onde: **M_n** – Massa molar numérica média

I_i – Intensidade de cada ponto no cromatograma

MM_i – Massa molar relativa ao ponto i, determinada pela curva padrão

Para os cálculos da massa molar ponderal média, **M_w**, utilizamos a equação 7

$$M_w = \sum (I_i/\sum I_i) * MM_i \quad \text{Equação 7}$$

Para o cálculo do índice de polidispersidade, **PDI**, utilizamos a equação 8:

$$\text{PDI} = \text{Mw}/\text{Mn} \quad \text{Equação 8}$$

Os cromatogramas nas Figuras 12, 13, 14 e 15 apresentam distribuição de massas única, um único pico para cada polímero sintetizado. Os valores de **Mw**, **Mn** e **PDI** obtidos estão na Tabela 5. Os valores no de PDI, no geral, são os esperados para síntese via RAFT e para polimerização livre, como a do PDMAEMA.

Tabela 5: Massa molar ponderada (Mw), Massa molar numérica (Mn) e Polidispersidade (PDI). Os valores são relativos aos padrões de PMMA

Copolímero	Massa Molar		
	Mw	Mn	PDI
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA X	39.321,4	33.357,6	1,19
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Y	11.359,3	6.284,6	1,80
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Z	16.284,0	12.848,8	1,26
PDMAEMA	106.198,8	41.614,9	2,55

Os valores de Mw e Mn dos copolímeros são aproximados pois o PDMAEMA tem uma relação MM/Raio hidrodinâmico diferente dos padrões de PMMA utilizados para determinação da curva analítica nestes experimentos. Outro efeito que interfere na análise dos cromatogramas é a presença de carga positiva no PDMAEMA, que pode gerar um arraste na coluna mudando os valores de eluição e levando a valores de Mw e Mn que não são reais. Para minimizar este efeito, TEA foi adicionada ao THF.

Os blocos de PMMA que deram origem aos copolímeros foram também caracterizados por cromatografia de permeação em gel, para determinação do Mw, do Mn, e PDI. Os blocos de PMMA foram nomeados seguindo o mesmo padrão dos copolímeros, PMMA Z referente ao PMMA-*b*-PDMAEMA Z e assim por diante. Esses dados foram úteis para a determinação da proporção entre os blocos e para medida mais acurada da massa molar média, como se verá em seções à frente.

Para os blocos de PMMA o volume utilizado foi de 5 µL, com concentração de 20 g/L. A corrida foi feita nas mesmas condições da curva padrão, ou seja, o solvente foi THF/0,02% TEA com um fluxo de 0,6 ml/min, durante 25 min. O cromatograma de eluição dos blocos de PMMA Z, PMMA X e PMMA Y são mostrados nas Figuras 16, 17 e 18, respectivamente.

Figura 16: Cromatograma do bloco de PMMA Z

Figura 17: Cromatograma do bloco de PMMA Y

A M_n e a M_w dos blocos de PMMA foram calculadas usando-se a intensidade de cada ponto do cromatograma, a partir de seu volume eluição e da equação determinada pela curva de calibração. No caso dos blocos de PMMA a massa molar determinada é real, pois o conjunto de padrões é do mesmo polímero. Sendo assim, as massas molares medidas serão utilizadas junto com os dados de RMN para determinar a massa real de cada copolímero. Os valores de M_n , M_w e a PDI estão apresentados na Tabela 6.

Figura 18: Cromatograma do bloco de PMMA X

Tabela 6: Massa molar ponderada (Mw), Massa molar numérica (Mn) e Polidispersidade (PDI) dos blocos de PMMA

Polímero	Massa Molar		
	Mw	Mn	PDI
PMMA X	5.579,6	4.976,5	1,21
PMMA Y	5.405,5	4.826,2	1,12
PMMA Z	11.567,3	9.371,0	1,23

4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear, RMN, dos Polímeros

A Ressonância magnética nuclear (RMN) é fundamental na determinação da estrutura de polímeros. Utilizamos esta ferramenta para confirmar a estrutura química dos copolímeros, bem como, para determinar a proporção entre os blocos PMMA e PDMAEMA.

Foram feitos os espectros de ^1H RMN em CDCl_3 de todos os copolímeros e do homopolímero PDMAEMA, numa concentração de 10 mg/mL. Os espectros de ^1H RMN dos copolímeros PMMA-*b*-PDMAEMA Z, X e Y, estão apresentados nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente. Os espectros de RMN dos copolímeros apresentaram deslocamentos químicos que estão de acordo com aqueles relatados na literatura (60); (61). Após cada figura estão os deslocamentos químicos de cada polímero.

Figura 19: Espectro ^1H RMN do copolímero - PMMA-*b*-PDMAEMA Z.

PMMA-*b*-PDMAEMA Z: ^1H RMN (CDCl_3), δ (ppm): **a** - 2,2 (singlete 6 H); **b** - 2,5 (singlete 2 H); **c** - 3,6 (singlete 2 H); **d** - 4,0 (singlete 2 H); **e** - 0,8 (duplete 3 H) 1,0 (duplete 3 H) e **f** - 1,8 (multiplete 2 H).

Figura 20: Espectro ^1H RMN do Copolímero - PMMA-*b*-PDMAEMA X.

PMMA-*b*-PDMAEMA X: ^1H RMN (CDCl_3), δ (ppm): **a** - 2,3 (singlete 6 H); **b** - 2,6 (singlete 2 H); **c** - 3,6 (singlete 2 H); **d** - 4,1 (singlete 2 H); **e** - 0,9 (duplete 3 H) 1,1 (duplete 3 H) e **f** - 1,9 (multiplete 2 H).

Figura 21: Espectro ¹H RMN do copolímero - PMMA-*b*-PDMAEMA *Y*.

PMMA-*b*-PDMAEMA *Y*: ¹H RMN (CDCl₃), δ (ppm): **a** - 2,3 (singlete 6 H); **b** - 2,6 (singlete 2 H); **c** - 3,6 (singlete 2 H); **d** - 4,1 (singlete 2 H); **e** - 0,8 (duplete 3 H) 1,0 (duplete 3 H) e **f** - 1,8 (multiplete 2 H).

O espectro de ^1H RMN do PDMAEMA está apresentado na Figura 22, os deslocamentos químicos são correspondentes aos encontrados por Zhao e colaboradores utilizando um polímero sintetizado via RAFT. (62)

Figura 22: Espectro ^1H RMN do polímero PDMAEMA.

PDMAEMA - ^1H RMN (CDCl_3), δ (ppm): **a** - 2,35 (singlete 6 H); **b** - 2,7 (singlete 2 H); **d** - 4,2 (singlete 2 H); **e** - 0,9 (duplete 3 H) 1,1 (duplete 3 H) e **f** - 1,9 (multiplete 2 H);

Para determinar as proporções de PMMA e PDMAEMA (PMMA/PDMAEMA), de cada copolímero utilizou-se a área do pico “d” para o PDMAEMA e a área do pico “c” para o PMMA que correspondem aos dois prótons do metileno ligado ao éster do DMAEMA e aos três prótons da metila ligada ao éster do MMA, respectivamente, conforme a Equação 9 que leva em consideração que as áreas desses picos são proporcionais ao número total de prótons equivalentes na cadeia. As proporções entre os monômeros, MMA/DMAEMA, de cada copolímero estão na Tabela 9.

$$r_{\text{RMN}} = \frac{\text{Área Pico “d” PDMAEMA} * 1/2H}{\text{Área Pico “c” PMMA} * 1/3H} \quad \text{Equação 9}$$

Tabela 7: Proporção entre os monômeros presentes nos copolímeros, determinada por RMN e GPC

Copolímero	MMA/DMAEMA	Monômeros MMA	Monômeros DMAEMA
	RMN (Equação 7)	GPC (Tabela 4)	(Equação 8)
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA X	1/6,3	50	313
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Y	1/3,0	48	145
PMMA- <i>b</i> -PDMAEMA Z	1/1,1	94	103

Para determinação da massa molar dos copolímeros utilizou-se os dados do GPC e RMN de acordo com as equações 10 e 11. Para a equação 10 utilizou-se o Mw determinado por GPC para o bloco PMMA (tabela 6) e a razão determinada pela equação 9. Com os valores obtidos na equação 10, calculou-se a massa molar do copolímero.

$$MM_{\text{DMAEMA}} = M_{w\text{PMMA}} * r_{\text{RMN}} \quad \text{Equação 10}$$

$$MM_{\text{COPOL}} = M_{w\text{PMMA}} + MM_{\text{DMAEMA}} \quad \text{Equação 11}$$

Conhecendo-se a massa molar dos copolímeros (Tabela 6), a razão MMA/DMAEMA e a massa molar dos blocos MMA e PDMAEMA (100 e 157, respectivamente) foi possível determinar também o número médio de amins terciárias em cada cadeia de cada copolímero (Tabela 7).

Tabela 8: Massa molar média dos copolímeros PMMA-*b*-PDMAEMA, determinada por cálculos, utilizando os resultados combinados de GPC e RMN

Copolímero	Massa molar média
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3}	54.200 g/mol
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0}	27.558 g/mol
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}	25.555 g/mol

4.1.3 Análise Elementar

A análise elementar dos copolímeros confirmou os resultados obtidos através do GPC e RMN quanto à composição dos copolímeros. Os resultados da análise elementar teórico, calculados utilizando-se as proporções de massas molares dos blocos dos copolímeros apresentadas na tabela 7, e a análise experimental se encontram na tabela 9.

Tabela 9: Análise elementar teórica e experimental

Amostra	Experimental			Teórico		
	% C	% H	% N	% C	% H	% N
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3}	59,32	9,42	7,74	60,97	9,40	8,08
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0}	58,92	9,52	7,82	60,96	9,29	7,37
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}	58,74	8,96	4,94	60,76	8,99	5,64

4.1.4 Titulação Potenciométrica dos Copolímeros

Os copolímeros foram analisados por titulação potenciométrica, para determinação dos pKas das aminas terciárias. No caso dos copolímeros estudados neste trabalho, a determinação dos pKas individuais de cada amina é impossível devido ao grande número de grupos por molécula. Além disso, não se esperaria pKas idênticos para todas as aminas porque a ionização de cada um dos grupos interfere com a ionização dos próximos. Assim, fizemos a titulação de todos os copolímeros para determinar a faixa de variação de pKas e com isso poder analisar os resultados obtidos nos experimentos posteriores. Nas Figuras 23 a 26 são mostradas as curvas de titulação dos copolímeros e do PDMAEMA. As concentrações de polímeros utilizadas nas titulações dos polímeros estão em Material e Métodos.

Os gráficos das Figuras 23 a 26 mostram, para todos os polímeros, uma faixa bastante larga de tamponamento que vai de pH 5,5 a 8 aonde ocorre a titulação dos grupos amina.

Figura 23: – Titulação do HCl 0,016 M (●) e de PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} (●) com NaOH 0,053 M.

Figura 24: Titulação do HCl 0,017 M (●) e do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{1,1} (●) com NaOH 0,051 M.

A grande faixa de tamponamento observada nas titulações é sugestiva de que os grupos amina se dissociam com pKas diferentes e em pHs menores do que seria previsível para aminas terciárias, que possuem pKas por volta de 10,7. Essa acidez incomum de aminas terciárias pode ser devida à proximidade de um grande número de

cargas positivas, o que leva a uma repulsão eletrostática entre os grupos carregados positivamente, condensação de hidróxido na superfície dos agregados dos polímeros e diminuição dos pKas.

Figura 25: Titulação do HCl 0,013 M (●) e do PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} (●) com NaOH 0,059 M.

Figura 26: Titulação do HCl 0,013 M (●) e do PDMAEMA (●) com NaOH 0,059 M.

No caso do PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} e PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} que possuem aproximadamente o mesmo número de grupos aminas, cerca de 145, a faixa de tamponamento é semelhante apesar do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} possuir um grupo hidrofóbico de 48 e o PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} de 94, o que induz a uma agregação a

concentrações menores. Entretanto, como a concentração utilizada para a titulação é muito alta todos os polímeros devem estar agregados nessa condição (ver item 4.1.5).

É interessante o fato de que os grupos amina do PDMAEMA apresentem uma região de tamponamento entre os pHs 5,5 e 8, o que indica que mesmo sem este homopolímero possuir uma região hidrofóbica ocorre diminuição dos pKas das amina devido à proximidade de grande quantidade de grupos carregados positivamente.

4.1.5 Determinação da Concentração Micellar Crítica (CMC) dos Copolímeros

A determinação da concentração micelar crítica, CMC, foi feita utilizando-se a medida de fluorescência do NPN. A fluorescência do NPN em água é muito baixa e aumenta na medida em que a sonda é solubilizada em um ambiente hidrofóbico. No caso dos copolímeros, determinamos a variação da fluorescência do NPN em função da concentração em tampões com diferentes pHs, sem adição de sal.

Nas Figuras 27 a 29 estão os gráficos de Fluorescência ($\lambda_{Exc}= 352$ nm e $\lambda_{Em}= 418$ nm) vs [copolímero]. Os valores de CMC para cada copolímero, nos diferentes pHs, foram calculados partir da intersecção de duas retas obtidas a baixa e a alta concentração de copolímero (Tabela 10). Pode-se observar que o pH afeta a CMC de todos os copolímeros, observando-se uma diminuição da CMC com o aumento de pH. A única exceção é o PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} para o qual a CMC em pH 8 é maior que em pH 6, mas isso pode ser devido a erro experimental e esses experimentos deverão ser repetidos. Estes resultados indicam que a desprotonação das aminas em pHs altos leva ao aumento da contribuição hidrofóbica e, portanto, à diminuição da CMC.

Figura 27: Determinação da CMC do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3} com NPN, 2×10^{-6} M, em pH 6 (A), pH 8 (B) e pH 10 (C). $\lambda_{\text{Exc}} = 352$ nm e $\lambda_{\text{Em}} = 418$ nm.

Figura 28: Determinação da CMC do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} com NPN, 2×10^{-6} M em pH 6, 8 e 10. pH 6 (A), pH 8 (B) e pH 10 (C) $\lambda_{\text{Exc}} = 352$ nm e $\lambda_{\text{Em}} = 418$ nm.

Figura 29: Determinação da CMC do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{1,1} com NPN, 2×10^{-6} M, em pH 6, 8 e 10. pH 6 (A), pH 8 (B) e pH 10 (C) $\lambda_{Exc} = 352$ nm e $\lambda_{Em} = 418$ nm.

Tabela 10: Concentração Crítica de Agregação, CMC, dos Copolímeros

Copolímero	CMC (M)		
	pH=6	pH=8	pH=10
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{6,3}	$1,6 \times 10^{-7}$	$2,44 \times 10^{-7}$	$3,5 \times 10^{-8}$
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{3,0}	$7,9 \times 10^{-7}$	$5,20 \times 10^{-7}$	$8,9 \times 10^{-8}$
PMMA ₁ - <i>b</i> -PDMAEMA _{1,1}	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,07 \times 10^{-7}$	$9,7 \times 10^{-8}$

4.2 Estudo do efeito dos copolímeros na permeabilização das LUVs contendo 5(6)-Carboxifluoresceína, CF.

Após caracterização estrutural estudou-se a interação dos copolímeros com vesículas unilamelares grandes, LUVs, contendo diferentes proporções de fosfolipídios zwitteriônicos e negativos. Esta parte da tese visa determinar se os copolímeros sintéticos se comportam de modo análogo ao das proteínas, ou peptídeos, e se é possível fazer uma correlação entre estrutura e atividade desses copolímeros na interação com modelos de membrana normalmente utilizados no estudo de atividade de polímeros biológicos.

A interação de peptídeos antimicrobianos com vesículas fosfolipídicas tem sido bastante estudada. O efeito da estrutura do peptídeo é fundamental para a atividade antimicrobiana. Várias técnicas têm sido empregadas para verificar essa interação e determinar o mecanismo através do qual um dado peptídeo leva a destruição, permeabilização ou fusão de membranas.

Os experimentos mostrados a seguir visam determinar o efeito dos polímeros sintetizados na permeabilização e outras alterações estruturais, quando da interação com vesículas fosfolipídicas de diferentes composições e em diferentes meios.

Nesta série de experimentos estudamos o efeito dos polímeros na permeabilização (ou vazamento) de vesículas de PC e PC:PG, de diferentes proporções. Para tanto utilizamos duas sondas diferentes: a carboxifluoresceína, CF, e o pirenotetrassulfonato, PTS. Nos experimentos a seguir descrevemos os resultados obtidos com a incorporação de CF nas LUVs.

As LUVs de PC:PG foram preparadas em 0,5 mL de CF 0,050 M em Tampão Tris/HCl, 0,01 M, pH 8,1. O tampão de eluição da coluna foi Tris/HCl, 0,01 M, pH 8,1, 0,3 M NaCl. A interação dos copolímeros, de diferentes concentrações, com LUVs de PC:PG foi estudada mantendo-se a concentração de LUVs constante.

Para cada cinética, após 100 s da adição das vesículas à cela, adiciona-se o copolímero, com agitação com agitador magnético, e a variação de fluorescência é monitorada em função do tempo. Após 450 s adiciona-se 30 μ l de Polidocanol 10% para completa permeabilização das vesículas.

4.2.1 Copolímero $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$

4.2.1.1 Estudo da Interação do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ com LUVs preparadas em Tris/HCl pH 8,1, com 300 mM NaCl.

Estudou-se a interação do copolímero $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ com LUVs preparadas com 100 % PG (Figura 30). A adição do copolímero às LUVs levou a um aumento na fluorescência em função do tempo indicando que as vesículas foram permeabilizadas. Na Figura 30 estão os gráficos de porcentagem de vazamento (% Vazamento, calculada como descrito em Material e Métodos) em função do tempo na permeabilização de LUVs com PG100% pelo $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$. Cada linha corresponde ao vazamento de LUVs em uma determinada concentração do copolímero. Observa-se que o vazamento é muito rápido nos primeiros segundos após a adição do copolímero e chega-se a um máximo de vazamento em todas as concentrações usadas. O máximo de vazamento depende da concentração do copolímero e não se chega a 100 % de vazamento em nenhuma das concentrações usadas (Figura 30).

Figura 30: Efeito do $[PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}]$ no vazamento de CF em LUVs de PG 100%, $1,17 \times 10^{-4}$ M em função do tempo.

Na Figura 31 estão os gráficos de % Vazamento das LUVs, após 200 s da adição de copolímero, vs a concentração do copolímero. Quanto maior a concentração de

copolímero adicionado às LUVs maior o efeito do vazamento da CF até se atingir ~90 %, em concentração maior que $5,4 \times 10^{-5}$ M, que é uma concentração maior que a CMC deste copolímero. Aparentemente é um fenômeno tudo ou nada, ou seja, o vazamento inicial depende da concentração do copolímero mas o equilíbrio entre o copolímero ligado e o copolímero livre na fase aquosa é lento, o que dificulta ao copolímero se desligar e permeabilizar outras vesículas. Ou seja, a constante de ligação entre o copolímero e as LUVs é muito alta e, no tempo do experimento, não existe migração do copolímero ligado a uma vesícula para outra.

Figura 31: Efeito da [PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}] no vazamento de CF de LUVs de PG 100%, $1,17 \times 10^{-4}$ M, após 200 s da adição do copolímero

Na Figura 32 é mostrado a % de vazamento de LUVs de PC:PG 10:90 por diferentes concentrações PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}. Observa-se que quanto maior a concentração de copolímero maior a % Vazamento da CF. A permeabilização é menos eficiente do que com as LUVs com PG 100%.

Figura 32: Efeito da $[PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}]$ no vazamento de LUVs de PC:PG 10:90, $1,22 \times 10^{-4}$ M, em função do tempo.

Na Figura 33 estão os dados de % vazamento vs [copolímero] com LUVs de PC:PG 10:90. Pode-se observar que para as LUVs de PG 100 % o vazamento é mais eficiente do que para as LUVs de PC:PG 10:90.

Figura 33: Efeito da $[PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}]$ no vazamento de CF em LUVs $1,22 \times 10^{-4}$ M de PC:PG 10:90, após 200 s.

A permeabilização da LUV PC:PG 20:80 pelo $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,13}$, foi menos efetiva do que para as razões PC:PG 10:90 e PG 100%, Figura 34. Observa-se na Figura 35 que quanto maior a concentração do copolímero adicionado às LUVs maior o efeito do vazamento da CF.

A % Vazamento aumenta com o aumento da proporção de PG na vesícula mas não se observa a saturação como visto com LUVs de PG 100%, indicando menor ligação do copolímero nas LUVs com menos carga negativa e necessidade de uma concentração maior de copolímero para se chegar à saturação.

Figura 34: Efeito da $[PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}]$ no vazamento de LUVs $6,8 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 20:80, em função do tempo.

Figura 35: % Vazamento de CF em LUVs $6,8 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 20:80, após 200 s, em função da $[PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}]$.

Na Figura 36 estão os resultados da permeabilização da LUV PC:PG 30:70 pelo $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$. Ocorre uma maior permeabilização para esta razão PC:PG se comparada com a razão PCPG 20:80. Na Figura 37 observa-se que quanto maior a concentração de copolímero adicionado às LUVs maior o efeito do vazamento da CF.

Figura 36: Efeito da [PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}] no vazamento de CF em LUVS 2,2 X 10⁻⁴ M de PC:PG 30:70, após 200 s.

Figura 37: Efeito da [PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}] na % vazamento de LUVs 2,2 X 10⁻⁴ M de PC:PG 30:70, em função do tempo, 200 s após a adição do copolímero.

A permeabilização da LUV PC:PG 40:60 pelo PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} é mostrada nas Figuras 38 e 39 observando-se o mesmo comportamento que nos experimentos anteriores, ou seja, o aumento da concentração de copolímero leva a um maior efeito no vazamento da CF, mas não se atinge a saturação mesmo em 1,5 x 10⁻⁴ M de copolímero (Figura 39).

Figura 38: Efeito da $[PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}]$ na % vazamento de LUVs $5,7 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 40:60, em função do tempo.

Figura 39: Efeito da $[PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}]$ na % vazamento de CF de LUVs $5,7 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 40:60, após 200 s.

Na Figura 40 estão as cinéticas de permeabilização de LUV PC:PG 50:50 pelo $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$. Quanto maior a concentração de copolímero adicionado às LUVs maior o efeito do vazamento da CF, Figura 41.

Figura 40: Efeito da concentração de $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ na % vazamento de LUVs $6,1 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 50:50, em função do tempo.

Figura 41: Efeito da [PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}] na % vazamento de CF em LUVS $6,1 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 50:50, após 200 s.

Na Figura 42 são mostrados os resultados de vazamento da LUV PC:PG 60:40 pelo PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} e Figura 43 observa-se que quanto maior a concentração de copolímero adicionado às LUVs maior o efeito do vazamento da CF. Observa-se uma saturação na % de vazamento em alta concentração de copolímero porem a saturação ocorre com menos de 50 % de vazamento. A eficiência da permeabilização diminui com relação às LUVs de PC:PG 50:50.

Figura 42: Efeito da concentração de PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} na % vazamento de LUVs de PC:PG 60:40, em função do tempo.

Figura 43: Efeito da concentração de PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} na % vazamento CF em LUVs 7,4 x 10⁻⁵ M de PC:PG 60:40, após 200 s.

Na Figura 44 e 45 estão os resultados do estudo da permeabilização das LUVs PC:PG 70:30 pelo PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}. Conforme pode ser observado na Figura 45, quanto maior a concentração de copolímero adicionado às LUVs maior o efeito do vazamento da CF porém a permeabilização é menos eficiente do que com PC:PG 60:40.

Figura 44: Efeito da concentração de PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} na % vazamento de LUVs 6,8 x 10⁻⁵ M de PC:PG 70:30, em função do tempo.

Figura 45: Efeito da concentração de $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ na % vazamento de CF em LUVs $6,8 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 70:30, após 200 s.

Na Figura 46 estão os resultados da permeabilização da LUV PC:PG 80:20 pelo $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$, em diversas concentrações do copolímero. O efeito da concentração de copolímero no vazamento das LUVs é muito pequeno, mesmo em concentração da ordem de $1,5 \times 10^{-4}$ M, indicando a pequena ligação e/ou ineficiência do copolímero em promover vazamento, Figura 47.

Figura 46: Efeito da concentração de $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ na % vazamento de LUVs $5,4 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 80:20, em função do tempo.

Figura 47: Efeito da concentração de PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} na % vazamento de CF em LUVs $5,4 \times 10^{-5}$ M de PC:PG 80:20, após 200 s.

Com LUVs de PC:PG 90:10 o PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} praticamente não tem efeito, Figura 49.

Figura 48: Efeito da concentração de PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} na % vazamento de LUVs 6×10^{-5} M de PC:PG 90:10, em função do tempo.

Figura 49: Efeito da concentração de PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} na % vazamento de CF em LUVs 6×10^{-5} M de PC:PG 90:10, após 200 s.

Com LUVs de PC100% o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ não tem efeito na permeabilização (Figura 50) em todas as concentrações estudadas, Figuras 50 e 51. As vesículas de PC 100% não apresentam carga residual, o que explica a não permeabilização da vesícula, pois se houver ligação, é muito pequena ou não interfere na organização dos lipídios na bicamada.

Figura 50: Efeito da concentração de $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ na % vazamento de LUVs 6×10^{-5} M de PC 100%, em função do tempo.

Figura 51: Efeito da concentração de $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ na % vazamento de CF em LUVS 6×10^{-5} M de PC 100%, após 200 s.

Na Figura 52 estão todas as curvas de % Vazamento em função da $[\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}]$ nas LUVs com diferentes proporções PC:PG após 200 s. Nota-se que o efeito do copolímero no vazamento das LUVs depende fundamentalmente da razão PC:PG. Na Figura 53 os dados de vazamento das LUVs, a uma concentração fixa de $[\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}]$ foram plotados versus a %PG nas LUVs.

Figura 52: % Vazamento de CF em LUVs após 200 s, em função da concentração do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ em todas as razões PC:PG.

Pode-se observar que existe uma faixa de PG entre 30 a 80 onde a eficiência da permeabilização é muito próxima (Figura 53), ocorrendo um aumento exponencial quando a %PG é 100. Em LUVs com pequena fração de PG, a % de vazamento é muito pequena o que está de acordo com a preponderância da interação eletrostática na interação copolímero/LUVs. Na Tabela 11 estão os resultados relacionando a % Vazamento das LUVs, com diferentes razões copolímero/lipídio total, para todas as LUVs estudadas, com diferentes razões PC:PG.

Figura 53: % Vazamento de CF em LUVs após 200 s, em função da % de PG. $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ $2,72 \times 10^{-4}$ M.

Tabela 11: Efeito da concentração do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{1,1} e da relação PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{1,1}/lipídio na % vazamento da CF. Pi é a concentração de fosfato total e é a soma de PC+PG.

PG 100% e [Pi] = 1,17e-4 M			PC:PG 1:9 e [Pi] = 1,22e-4 M			PC:PG 2:8 e [Pi] = 6,75e-5 M		
[copol Z]	Copol/lip	% Vaz	[copol Z]	Copol/lip	% Vaz	[copol Z]	Copol/lip	% Vaz
1,80E-05	0,2	64,7	1,36E-04	1,12	18,9	1,36E-04	2,01	9,5
3,60E-05	0,3	90,0	2,72E-04	2,24	37,5	2,72E-04	4,03	19,1
5,40E-05	0,5	91,5	4,08E-04	3,36	48,3	4,08E-04	6,04	27,4
7,20E-05	0,6	92,0	5,44E-04	4,48	54,0	5,44E-04	8,06	33,1
8,10E-05	0,7	93,0	6,12E-04	5,04	61,3	6,12E-04	9,07	32,8
9,90E-05	0,8	99,0	8,16E-04	6,72	72,0	8,16E-04	12,09	42,4
PC:PG3:7 e [Pi] = 2,16e-4 M			PC:PG 4:6 e [Pi] = 5,72e-5 M			PC:PG 5:5 e [Pi] = 6,08e-5 M		
[copol Z]	Copol/lip	% Vaz	[copol Z]	Copol/lip	% Vaz	[copol Z]	Copol/lip	% Vaz
1,80E-05	0,08	15,3	1,36E-04	2,38	19,0	1,36E-04	2,24	18,0
3,60E-05	0,17		2,72E-04	4,76	37,5	2,72E-04	4,48	26,4
5,40E-05	0,25	26,1	4,08E-04	7,14	48,4	4,08E-04	6,72	30,8
7,20E-05	0,33	36,5	5,44E-04	9,52	54,0	5,44E-04	8,95	44,7
8,10E-05	0,38	40,5	6,12E-04	10,71	57,0	6,12E-04	10,07	49,0
9,90E-05	0,46	84,8	8,16E-04	14,28	62,6	8,16E-04	13,43	53,9
PC:PG 6:4 e [Pi] = 7,38e-5 M			PC:PG 7:3 e [Pi] = 6,8e-5 M			PC:PG 8:2 e [Pi] = 5,4e-5 M		
[copol Z]	Copol/lip	% Vaz	[copol Z]	Copol/lip	% Vaz	[copol Z]	Copol/lip	% Vaz
1,80E-05	0,24	13,9	1,36E-04	2,00	10,3	1,36E-04	2,52	5,4
3,60E-05	0,49	18,8	2,72E-04	4,00	25,1	2,72E-04	5,04	8,2
5,40E-05	0,73	22,3	4,08E-04	6,00	35,0	4,08E-04	7,56	10,2
7,20E-05	0,98	39,9	5,44E-04	8,01	46,0	5,44E-04	10,07	8,1
8,10E-05	1,10	44,0	6,12E-04	9,01	50,0	6,12E-04	11,33	10,0
9,90E-05	1,34	50,2	8,16E-04	12,01	62,9	8,16E-04	15,11	16,2
PC:PG 9:1 e [Pi] = 5,99e-5 M			PC 100% e [Pi] = 6,08e-5 M					
[copol Z]	Copol/lip	% Vaz	[copol Z]	Copol/lip	% Vaz			
1,80E-05	0,30	0,2	1,36E-04	2,24	0,2			
3,60E-05	0,60	0,1	2,72E-04	4,48	0,3			
5,40E-05	0,90	0,3	4,08E-04	6,72	0,4			
7,20E-05	1,20	0,3	5,44E-04	8,95	0,3			
8,10E-05	1,35	0,5	6,12E-04	10,07	0,3			
9,90E-05	1,65	0,1	8,16E-04	13,43	0,3			

Nos experimentos que se seguem estudou-se o efeito do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} na permeabilização das LUVs.

4.2.2 Copolímero $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$

4.2.2.1 Estudo da Interação do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ com LUVs preparadas em Tris/HCl pH 8,1; 0,3 M NaCl.

O efeito do copolímero $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ na permeabilização das LUVs de PG 100% foi estudado em Tris/HCl pH 8,1 com 0,3 M NaCl e os resultados podem ser observados na Figura 54 e 55. A porcentagem de permeabilização, após 200 s da adição do copolímero, para várias concentrações de $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ em todas as razões PC:PG pode ser observada na Figura 56.

Figura 54: Efeito da concentração do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ na % vazamento de CF em LUVs $1,5 \times 10^{-4}$ M de PG 100%, em função do tempo

Figura 55: Efeito da concentração do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ na % vazamento de CF em LUVs $1,5 \times 10^{-4}$ M de PG 100%, após 200 s

Observa-se na Figura 54 e 55 que a % de vazamento aumenta com a concentração de copolímero chegando a uma saturação a altas concentrações do mesmo. Na Figura 56 temos um resumo de todos os experimentos de vazamento obtidos com LUVs em várias frações PC:PG. O comportamento é semelhante ao obtido o $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$. Na Figura 57 observa-se que ocorre um máximo de vazamento nas frações de PC:PG entre 40 e 80 %.

Figura 56: % Vazamento de CF em LUVS $\sim 1,5 \times 10^{-4}$ M após 200 s, em função da concentração do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ em todas as razões PC:PG

Figura 57: % Vazamento de CF LUVS $\sim 1,5 \times 10^{-4}$ M, após 200 s, em função da % de PG nas vesículas por $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ $1,6 \times 10^{-5}$ M.

Quando comparamos a concentração de permeabilização entre o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, ficou evidente que a eficácia do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ é muito maior que a do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$. Nos experimentos com o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ para uma concentração de $5,4 \times 10^{-5}$ M a porcentagem de permeabilização chegou em 90% quando a vesícula era composta por PG100%. Para o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, na concentração de $1,5 \times 10^{-5}$ M, % vazamento é aproximadamente 10 vezes menor e a porcentagem de permeabilização chega a 97% quando a vesícula é composta por PC:PG 50:50. Esta eficiência provavelmente ocorre porque o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ tem maior quantidade do monômero hidrofílico, DMAEMA, do que o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$. O DMAEMA apresenta uma carga positiva em pH 8 e é responsável pela interação entre as vesículas e os copolímeros, Tabela 12.

Tabela 12: Efeito da concentração do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} e da relação PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0}/lipídio na % de vazamento da CF. Pi é a concentração de fosfato total e é a soma de PC+PG.

PG 100% e [Pi] = 1,5e-4 M			PC:PG 1:9 e [Pi] = 2,4e-4 M			PC:PG 2:8 e [Pi] = 1,85e-4M		
[copol y]	Copol/lip	%Vaz	[copol y]	Copol/lip	%Vaz	[copol y]	Copol/lip	%Vaz
5,93E-06	0,039	61,10	5,93E-06	0,024	40,10	5,93E-06	0,032	23,75
7,11E-06	0,046	62,22	7,11E-06	0,029	45,05	7,11E-06	0,039	22,67
9,48E-06	0,062	64,60	9,48E-06	0,038	50,10	9,48E-06	0,051	31,48
1,19E-05	0,077	74,55	1,19E-05	0,048	55,01	1,19E-05	0,064	46,44
1,42E-05	0,093	76,10	1,42E-05	0,057	58,95	1,42E-05	0,077	52,39
PC:PG3:7 e [Pi] = 1,76e-4 M			PC:PG 4:6 e [Pi] = 1,76e-4 M			PC:PG 5:5 e [Pi]= 1,71e-4 M		
[copol y]	Copol/lip	%Vaz	[copol y]	Copol/lip	%Vaz	[copol y]	Copol/lip	%Vaz
5,93E-06	0,073	22,73	5,93E-06	0,034	18,10	5,93E-06	0,035	61,10
7,11E-06	0,088	28,27	7,11E-06	0,041	26,61	7,11E-06	0,042	71,10
9,48E-06	0,117	33,86	9,48E-06	0,054	38,35	9,48E-06	0,055	76,33
1,19E-05	0,146	39,96	1,19E-05	0,068	55,28	1,19E-05	0,069	83,01
1,42E-05	0,176	51,26	1,42E-05	0,081	61,65	1,42E-05	0,083	97,86
PC:PG 6:4 e [Pi] = 1,49e-4 M			PC:PG 7:3 e [Pi] = 1,17e-4 M			PC:PG 8:2 e [Pi] = 1,40e-4 M		
[copol y]	Copol/lip	%Vaz	[copol y]	Copol/lip	%Vaz	[copol y]	Copol/lip	%Vaz
5,93E-06	0,040	41,09	5,93E-06	0,051	40,10	5,93E-06	0,042	1,73
7,11E-06	0,048	43,02	7,11E-06	0,061	45,57	7,11E-06	0,051	2,31
9,48E-06	0,064	44,98	9,48E-06	0,081	55,96	9,48E-06	0,068	1,71
1,19E-05	0,080	52,72	1,19E-05	0,101	62,61	1,19E-05	0,085	2,62
1,42E-05	0,096	62,74	1,42E-05	0,122	70,37	1,42E-05	0,102	5,10
PC:PG 9:1 e [Pi] =1,71e-4 M			PC 100% e [Pi] = 1,08e-4 M					
[copol y]	Copol/lip	%Vaz	[copol y]	Copol/lip	%Vaz			
5,93E-06	0,035	10,10	5,93E-06	0,055	0,30			
7,11E-06	0,042	12,33	7,11E-06	0,066	0,50			
9,48E-06	0,055	9,45	9,48E-06	0,088	0,30			
1,19E-05	0,069	12,79	1,19E-05	0,110	0,14			
1,42E-05	0,083	13,10	1,42E-05	0,132	0,19			

4.2.3 Copolímero - $PMMA_1-b-PDMAEMA_{6,3}$

4.2.3.1 Estudo da Interação do Copolímero $PMMA_1-b-PDMAEMA_{6,3}$ com LUVs preparadas Tris/HCl 0,01 M pH 8,1; 0,3 M NaCl.

O efeito do copolímero $PMMA_1-b-PDMAEMA_{6,3}$ na permeabilização das LUVs foi estudado nas mesmas condições utilizadas para o $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ e $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$. O efeito do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{6,3}$ na permeabilização das LUVs de PG 100%, em tampão Tris-HCl 0,010 M pH 8,1, 0,3 M NaCl, com diferentes concentrações do copolímero pode ser observada na Figura 58. Na Figura 59 estão as % Vazamento de CF, após 200 s, para várias concentrações de $PMMA_1-b-PDMAEMA_{6,3}$, com LUVs contendo PG 100%.

Na figura 59 observa-se que a % de Vazamento das LUVs aumenta com a concentração do copolímero chegando a uma saturação com LUVs 100% PG. Entretanto, essa saturação não ocorre em todas as razões PC:PG, como se pode observar na Figura 60. Com LUVs de diferentes razões PC:PG o vazamento só ocorre em grande porcentagem a partir de uma razão copolímero/Lipídio aonde a interação começa a ser mais efetiva, Figura 61, indicando que existe uma proporção PC:PG preferencial próxima a PC:PG 50:50. O efeito da % de vazamento pode ser observado na Tabela 13.

Figura 58: Efeito da concentração do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{6,3}$ (M) na % vazamento de LUVs $1,22 \times 10^{-4}$ M de PG 100% em função do tempo

Figura 59: Efeito da concentração do PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} na % de vazamento em LUVs 1,22 x 10⁻⁴ M de PG 100, após 200 s.

Figura 60: % Vazamento de CF em LUVs 1,28 x 10⁻⁴ M após 200 s, em função da concentração do PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} em todas as razões PC:PG.

Figura 61: % Vazamento de CF em LUVs após 200 s, em função da % de PG nas vesículas PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} 2,91 x 10⁻⁸ M.

Tabela 13: Efeito da concentração do PMMA_{1-b}-PDMAEMA_{6,3} e da relação PMMA_{1-b}-PDMAEMA_{6,3}/lipídio na % de vazamento da CF. Pi é a concentração de fosfato total e é a soma de PC+PG.

PG 100% e [Pi] = 1,22e-4 M			PC:PG 1:9 e [Pi] = 1,13e-4 M			PC:PG 2:8 e [Pi] = 1,08e-4 M		
[copol x]	Copol/lip	% Vaz	[copol x]	Copol/lip	% Vaz	[copol x]	Copol/lip	% Vaz
5,10E-08	4,2E-04	43,0	5,10E-08	4,5E-04	35,7	5,10E-08	4,7E-04	32,0
6,80E-08	5,6E-04	58,4	6,80E-08	6,0E-04	39,6	6,80E-08	6,3E-04	38,9
8,50E-08	7,0E-04	69,5	8,50E-08	7,6E-04	51,1	8,50E-08	7,9E-04	42,9
1,02E-07	8,4E-04	69,3	1,02E-07	9,1E-04	55,0	1,02E-07	9,4E-04	51,1
1,36E-07	1,1E-03	74,8	1,36E-07	1,2E-03	68,3	1,36E-07	1,3E-03	58,1
PC:PG3:7 e [Pi] = 1,22e-4 M			PC:PG 4:6 e [Pi] = 1,44e-4 M			PC:PG 5:5 e [Pi] = 1,31e-4 M		
[copol x]	Copol/lip	% Vaz	[copol x]	Copol/lip	% Vaz	[copol x]	Copol/lip	% Vaz
5,10E-08	4,2E-04	41,4	5,10E-08	3,5E-04	42,21509	5,10E-08	3,9E-04	81,8
6,80E-08	5,6E-04	49,3	6,80E-08	4,7E-04	46,57491	6,80E-08	5,2E-04	84,1
8,50E-08	7,0E-04	52,2	8,50E-08	5,9E-04	54,2523	8,50E-08	6,5E-04	85,2
1,02E-07	8,4E-04	64,0	1,02E-07	7,1E-04	66,90613	1,02E-07	7,8E-04	88,4
1,36E-07	1,1E-03	67,1	1,36E-07	9,4E-04	71,46812	1,36E-07	1,0E-03	92,7
PC:PG 6:4 e [Pi] = 1,08e-4 M			PC:PG 7:3 e [Pi] = 1,67e-4 M			PC:PG 8:2 e [Pi] = 1,31e-4 M		
[copol x]	Copol/lip	% Vaz	[copol x]	Copol/lip	% Vaz	[copol x]	Copol/lip	% Vaz
5,10E-08	4,7E-04	12,4	5,10E-08	3,1E-04	13,5	5,10E-08	3,9E-04	0,7
6,80E-08	6,3E-04	20,2	6,80E-08	4,1E-04	13,3	6,80E-08	5,2E-04	0,8
8,50E-08	7,9E-04	32,0	8,50E-08	5,1E-04	28,2	8,50E-08	6,5E-04	0,6
1,02E-07	9,4E-04	39,0	1,02E-07	6,1E-04	17,4	1,02E-07	7,8E-04	0,1
1,36E-07	1,3E-03	40,0	1,36E-07	8,2E-04	26,6	1,36E-07	1,0E-03	0,9
PC:PG 9:1 e [Pi] = 1,40e-4 M			PC 100% e [Pi] = 1,28e-4 M					
[copol x]	Copol/lip	% Vaz	[copol x]	Copol/lip	% Vaz			
5,10E-08	3,7E-04	-0,1	5,10E-08	3,9E-04	-0,6			
6,80E-08	4,9E-04	-0,1	6,80E-08	5,2E-04	-0,1			
8,50E-08	6,1E-04	0,4	8,50E-08	6,5E-04	-0,2			
1,02E-07	7,3E-04	0,3	1,02E-07	7,8E-04	-0,2			
1,36E-07	9,7E-04	1,0	1,36E-07	1,0E-03	0,5			

Com os experimentos realizados pode-se observar que existe uma interação eletrostática dos copolímeros (positivos) com as vesículas (negativas). Para confirmação da interação eletrostática determinou-se a %vazamento das vesículas com o homopolímero hidrofóbico PMMA e com o homopolímero de PDMAEMA, hidrofílico.

4.2.4 Homopolímero – PMMA

4.2.4.1 Estudo da Interação do Homopolímero PMMA com LUVs em Tampão Tris/HCl 0,01 M pH 8; 0,3 M NaCl.

O efeito do homopolímero **PMMA** na permeabilização das LUVs foi estudado nas mesmas condições utilizadas para os copolímeros. A % vazamento para várias concentrações de PMMA com LUVs de PG 100 % pode ser observada na Figura 62. A % de vazamento, após 200 s em função da concentração do PMMA pode ser observada na Figura 63. Não ocorre permeabilização das LUVs mesmo em concentrações da ordem de 1×10^{-4} M PMMA porque os monômeros de MMA não apresentam carga e por isso não devem interagir com as LUVs de PG, confirmando-se a necessidade de uma interação eletrostática para que a permeabilização ocorra.

Figura 62: Efeito da concentração do PMMA (M) na permeabilização de LUVs $1,7 \times 10^{-4}$ M de PG 100%.

Figura 63: Efeito da concentração do PMMA na % vazamento em LUVs $1,7 \times 10^{-4}$ M de PG 100%, após 200 s.

4.2.5 Homopolímero – PDMAEMA

4.2.5.1 Estudo da Interação do Homopolímero PDMAEMA com Vesículas preparadas Tris/HCl 0,01 M pH 8,1, 0,3 M NaCl.

O efeito do homopolímero PDMAEMA no vazamento das LUVs PG 100%, em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,1 foi estudado nas mesmas condições utilizadas para o PMMA e os resultados podem ser observados na Figura 64. Ao contrário do observado com o PMMA, o PDMAEMA é bastante eficiente na permeabilização das LUVs.

A % de vazamento de LUVs de PG 100%, após 200 s, para várias concentrações de PDMAEMA em LUVs de PG 100% estão na Figura 65. A porcentagem de permeabilização, após 200 s, em função da concentração do copolímero, para LUVs com diferentes razões PC:PG pode ser observada na Figura 66. Observa-se uma estabilização da % de vazamento em função da concentração do PDMAEMA a baixas concentrações do mesmo (da ordem de 3×10^{-6} M).

Figura 64: Efeito da concentração do PDMAEMA (M) na % vazamento de LUVs $1,44 \times 10^{-4}$ M de PG 100%.

Figura 65: Efeito da concentração do PDMAEMA na % de vazamento de LUVs, $1,44 \times 10^{-4}$ M, PG 100% após 200 s.

Figura 66: %Vazamento de CF em LUVs após 200 s, em função da concentração do PDMAEMA em LUVs com diferentes razões PC:PG.

Uma análise comparativa da % de vazamento das LUVs provocada pelos copolímeros e do homopolímero está apresentada nas tabelas 14 e 15. Quando se compara o $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{6,3}$ ($\text{PMMA} = 313$ e $\text{MMA} = 50$) com PDMAEMA ($\text{DMAEMA} = 265$) observamos que, quando o vazamento chega a 50% em LUVs de PG 50%, a concentração necessária para se obter essa permeabilização é menor para o $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{6,3}$ ($2,55 \text{ E-}08$) que possui do que para o PDMAEMA ($2,13 \text{ E-}06$) demonstrando que o bloco hidrofóbico é importante para a eficiência da permeabilização.

Para os copolímeros $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{3,0}$ e $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{1,1}$ o copolímero que apresenta maior porção de MMA e menos de PDMAEMA, o $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{1,1}$, ($\text{MMA} = 94$ e $\text{PDMAEMA} = 103$) necessita de uma concentração maior para atingir 50% de vazamento ($9,00 \text{ E-}05$) do que o polímero com menor quantidade de monômeros de MMA, o $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{3,0}$, ($\text{MMA} = 48$ e $\text{PDMAEMA} = 145$) mas com maior proporção de DMAEMA, mostrando a importância da atração eletrostática no processo de vazamento. Resultados similares são observados com LUVs contendo 100% de PG (Tabela 15).

Tabela 14: Concentração de copolímero e homopolímero necessária para produzir 50% de vazamento nas LUVs de PG 50% em tampão Tris/HCl 0,01 M pH 8,1, 0,3 M NaCl

Amostra	MM	DMAEMA	MMA	[amina] (M)	[pol](M) 50% vaz	CMC
$\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{6,3}$	54.200	313	50	$7,98 \text{ E-}06$	$2,55 \text{ E-}08$	$2,44 \text{ E-}07$
$\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{3,0}$	27.558	145	48	$8,59 \text{ E-}04$	$5,93 \text{ E-}06$	$5,20 \text{ E-}07$
$\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{1,1}$	25.555	103	94	$9,27 \text{ E-}03$	$9,00 \text{ E-}05$	$1,07 \text{ E-}07$
PDMAEMA	41.614,3	265	—	$5,64 \text{ E-}04$	$2,13 \text{ E-}06$	—

Tabela 15: Concentração de copolímero e homopolímero necessária para produzir 50% de vazamento nas LUVs de PG 100%. Tampão Tris/HCl 0,01 M pH 8,1, 0,3 M NaCl.

Amostra	MM	DMAEMA	MMA	[amina] (M)	[pol](M) 50% vaz	CMC
PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3}	54.200	313	50	2,66 E-05	8,50 E-08	2,44 x 10 ⁻⁷
PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0}	27.558	145	48	5,15 E-04	3,56 E-06	5,20 x 10 ⁻⁷
PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1}	25.555	103	94	1,48 E-03	1,44 E-05	1,07x 10 ⁻⁷
PDMAEMA	41614,3	265	-	2,84 E-04	1,07 E-06	-

Para compreender o efeito eletrostático na interação dos copolímeros com as LUVs estudamos o efeito pH na permeabilização das LUVs.

4.2.6 Ensaio de permeabilização das LUVs contendo 5(6)-carboxifluoresceína pelos copolímeros, em função do pH

Estudou-se a relação entre a protonação dos copolímeros e a permeabilização das LUVs em diferentes proporções PC:PG. As LUVs de PC:PG foram preparadas em 0,5 mL de CF 0,050 M em tampão Tris/HCl, 0,01 M, pH 8. Para as cinéticas as LUVs, após a passagem pela coluna de Sephadex em tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 8, 0,3 M NaCl, adicionamos uma alíquota das vesículas em tampões de mesma osmolaridade, mas de pHs diferentes. Os seguintes tampões foram preparados:

- acetato, 0,01 M pH 5, 0,3 M NaCl,
- MES 0,01 M, pH 6, 0,3 M NaCl,
- Hepes 0,01 M, pH 7, 0,3 M NaCl,
- Hepes, 0,01 M, pH 7,5, 0,3 M NaCl,
- Tris/HCl, 0,01 M, pH 8, 0,3 M NaCl,
- Tris/HCl, 0,01 M, pH 8,5, 0,3 M NaCl,
- Borato, 0,01 M, pH 9, 0,3 M NaCl,
- CAPS, 0,01 M pH 10, 0,3 M NaCl.

A interação dos Copolímeros com LUVs de diferentes proporções de PC:PG foi estudada em diferentes pHs, mantendo-se a concentração de LUVs constante. Para cada cinética, após 100 s adicionou-se o copolímero e a variação de fluorescência foi monitorada em função do tempo. Após 400 s adicionou-se 30 µl de Polidocanol 10% para completa permeabilização das vesículas.

4.2.7 Estudo da Interação do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ com LUVs com CF em pHs entre 6 e 10.

O efeito do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ na concentração de $6,5 \times 10^{-8}$ M na permeabilização das LUVs, variando-se as proporções PC:PG em diferentes pHs pode ser observado na Figura 67. Observa-se que nos pHs 8,5 e 9,0 a permeabilização é mais eficiente para algumas proporções de PC:PG. Nestes pHs as aminas do bloco hidrofílico estão parcialmente desprotonadas.

Figura 67: %Vazamento de CF em várias proporções PC:PG em função do pH do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ $6,5 \times 10^{-8}$ M, com a [LUVs] em média $1,6 \times 10^{-4}$ M

4.2.8 Estudo da Interação do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ com LUVs em pHs 6 a 10

O efeito do copolímero, $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$, $4,8 \times 10^{-8}$ M, na permeabilização das LUVs, variando as proporções PC:PG e variando o pH, pode ser observado na Figura 68. Os resultados obtidos com PG 100% são muito diferentes dos obtidos com as LUVs com diferentes proporções de PC:PG mas não foram repetidos. Pode-se observar que nos pHs 8,5 e 9,0 a permeabilização é mais eficiente, ocorrendo o mesmo que com o $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$.

Figura 68: %Vazamento de CF em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} $4,8 \times 10^{-8}$ M com a [LUVs] em média $1,4 \times 10^{-4}$ M

4.2.9 Estudo da Interação do PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} com LUVs em pHs 6 a 10

O efeito do PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3}, $5,1 \times 10^{-8}$ M, na permeabilização das LUVs, variando as proporções PC: PG e variando o pH pode ser observado na Figura 69. Pode-se observar que nos pHs 8,5 e 9,0 a permeabilização é mais eficiente. No caso do PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} a permeabilização é mais eficiente em todos os pHs, e a maior entre os pHs 8,5 e 9, mas há um aumento na permeabilização em pH 6 e 7 também, que deve estar relacionada aos pKas do copolímero.

Figura 69: % de Vazamento de CF em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3}, $5,1 \times 10^{-8}$ M com a [LUVs] em média $1,0 \times 10^{-4}$ M

4.2.10 Estudo da interação do Homopolímero – PDMAEMA com vesículas em pH que variam de 6 a 10

O efeito do homopolímero, PDMAEMA, $6,7 \times 10^{-8}$ M na permeabilização das LUVs, variando-se as proporções PC:PG e pH pode ser observado na Figura 70. Pode-se observar que nos pHs 8,5 e 9,0 a permeabilização é mais eficiente.

Figura 70: % de vazamento de CF em várias proporções PC:PG em função do pH do PDMAEMA $6,7 \times 10^{-8}$ M com a [LUVs] em média $1,2 \times 10^{-4}$ M

Os estudos do efeito do pH na permeabilização foram feitos também em menor força iônica mas para isso foi necessário modificar a metodologia. Por isso incorporamos PTS no compartimento aquoso das LUVs.

4.3 Ensaio de permeabilização das LUVs contendo pireno-tetrasulfonato de sódio (PTS) pelos copolímeros em baixa força iônica e variando o pH

Estudou-se a relação entre a carga das vesículas e a permeabilização da bicamada pelos copolímeros em baixa força iônica e a relação entre a protonação dos copolímeros e a permeabilização das LUVs em diferentes proporções PC:PG. Estes experimentos foram feitos em 100 mM de NaCl, portanto em uma força iônica bem menor que os experimentos com CF.

As LUVs de PC:PG foram preparadas em 0,5 mL de PTS 0,001 M nos seguintes tampões: a) MES, 0,01 M, pH 6, 0,1 M NaCl, b) Hepes, 0,01 M, pH 7, 0,1 M NaCl, c) Hepes, 0,01 M, pH 7,5, 0,1 M NaCl, d) Tris/HCl, 0,01 M, pH 8, 0,1 M NaCl, e) Tris/HCl, 0,01 M, pH 8,5, 0,1 M NaCl, f) Borato, 0,01 M, pH 9, 0,1 M NaCl, g) CAPS,

0,01 M, pH 10, 0,1 M NaCl. Para os experimentos adicionou-se à cubeta 50 uL de MV 0,050 M, para supressão do PTS, 30 uL da solução de vesículas com PTS e tampão suficiente para completar o volume final em 2 mL.

Em cada proporção PC:PG observou-se o efeito de diferentes pHs na permeabilização da LUV com CF. Para cada cinética, após 100 s adiciona-se o copolímero e a variação de fluorescência é monitorada em função do tempo. Após 400 s adiciona-se 30 µl de Polidocanol 10% para completa permeabilização das vesículas.

4.3.1 Estudo da Interação do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ com LUVs com PTS em pHs 6 a 10

4.3.1.1 Efeito $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ em vesículas PG 100%

Observa-se na Figura 71 a permeabilização das LUVs de PG 100% pelo $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$, em pH 8,5, em várias concentrações de copolímero. Observa-se que quanto maior a concentração de copolímero maior o efeito no vazamento do PTS.

Conforme pode ser observado na Figura 72 a permeabilização tem um pequeno aumento, em função da concentração do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$.

Figura 71: Efeito da concentração de $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ na % vazamento de [LUVs] $2,25 \times 10^{-5}$ M de PG 100%, em função do tempo, monitorada por PTS e MV, em pH 8,5

Figura 72: % de Vazamento de PTS/MV em LUVs de PG 100%, após 200 s, em função da concentração do PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} em pH 8,5 e [LUVs]= 2,25 x 10⁻⁵ M

O efeito do copolímero, PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}, 2,6 x 10⁻⁸ M, na permeabilização das LUVs, variando-se as proporções PC:PG e o pH, pode ser observado nas Figura 73 e 74.

Figura 73: % de Fluorescência de PTS/MV em várias proporções PC:PG em pH 8 do PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}, 2,6 x 10⁻⁸ M com [LUVs] em média = 2,5 x 10⁻⁵ M

Figura 74: % Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1}, 2,6 x 10⁻⁸ M e com [LUVs] em média = 2,5 x 10⁻⁵ M

Verificar que o pH interfere na protonação do bloco PDMAEMA o que afeta a permeabilização dos lipossomas, confirmando os resultados obtidos experimentos com CF.

A faixa de pH em que ocorre o efeito máximo na permeabilização dos polímeros é entre 7,5 e 9 enquanto que a faixa de tamponamento obtida na titulação dos copolímeros é entre 5,5 e 8,0. Essa diferença entre a faixa de tamponamento em água e o pH aonde se observa o máximo de atividade dos polímeros pode ser devida a um deslocamento de pKa dos grupos amina quando da ligação aos grupos negativos dos fosfatos do PG. Além disso a titulação dos polímeros foi feita na ausência de sal, diferentemente das cinéticas tanto com vesículas contendo CF quanto com PTS. Este efeito de mudança de pKa de grupos dissociáveis em superfícies carregadas é bastante comum em micelas e vesículas e já foi descrito para vários sistemas. O efeito da força iônica também é observado já que a permeabilização é maior em baixa força iônica.

4.3.1.2 Estudo da Interação do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} com LUVs entre pH de 6 a 10.

Observa-se na Figura 75 a permeabilização da LUV PG100% pelo PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} em pH 8,5. Quanto maior a concentração de copolímero adicionado às LUVs maior o efeito do vazamento do PTS e a diminuição da fluorescência pelo MV. O aumento da concentração do copolímero leva a um aumento da % vazamento, Figura 76. Os resultados corroboram os resultados obtidos nos experimentos com CF.

Figura 75: % Vazamento em LUVs $4,6 \times 10^{-5}$ M, PG 100%, pelo PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} em várias concentrações (M), monitorada por PTS e MV pH=8,5

Figura 76: % Vazamento de PTS/MV em LUVs $4,6 \times 10^{-5}$ M, de PG 100%, após 200 s, em função da concentração do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} pH= 8,5

O efeito do copolímero, PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0}, $1,95 \times 10^{-8}$ M, na permeabilização das LUVs, variando-se as proporções PC:PG e o pH, pode ser observado nas Figuras 77 e 78. Existe uma razão PC:PG preferencial onde ocorre a maior porcentagem de vazamento. Para os copolímeros PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} a faixa preferencial de vazamento é entre pH 8 e 9, próximo da região de tamponamento do copolímero. Em pH 10 a permeabilização é pouco eficiente.

Figura 77: % Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em pH 8 do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} $\sim 1,95 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média $3,0 \times 10^{-5}$ M

Figura 78: % Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0}, $1,95 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média $3,0 \times 10^{-5}$ M

Pode-se afirmar que o pH interfere na protonação do bloco PDMAEMA, o que afeta o efeito da permeabilização, já que o efeito ocorre tanto no experimento com CF quanto com PTS/MV. O efeito da força iônica também foi observado já que a permeabilização é mais eficiente em baixa força iônica (PTS/MV, 0,1 M NaCl), no experimento com a CF a força iônica, 0,3M NaCl, era três vezes maior.

4.3.1.3 Estudo da Interação do Copolímero PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3} com LUVs entre pHs 6 e 10.

Observa-se na Figura 79 a permeabilização das LUV PG100% pelo PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3}. Quanto maior a concentração de copolímero adicionado às LUVs maior o efeito do vazamento do PTS. Conforme pode ser observado na Figura 80, com aumento da concentração do polímero aumenta o vazamento.

Figura 79: % Vazamento em LUVs 2×10^{-5} M, PG 100%, pelo PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3} em várias concentrações (M), monitorada por PTS e MV pH 8,5

Figura 80: % de Fluorescência de PTS/MV em LUVs 2×10^{-5} M, de PG 100%, após 110 s, em função da concentração do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3} pH 8,5

O efeito do copolímero, PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3}, $5,1 \times 10^{-8}$ M na permeabilização das LUVs, variando as proporções PC:PG e variando o pH pode ser observado na figura 81 e 82. No caso do copolímero PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3}, existe uma faixa mais adequada de %PG para onde a permeabilização varia entre 35 a 90%. O efeito de pH no sistema é similar ao observado para os demais copolímeros.

Figura 81: Porcentagem de vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em pH 8,5 do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3} $5,1 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média $2,01 \times 10^{-5}$ M

Figura 82: % Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em função do pH do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3} $5,1 \times 10^{-8}$ M com [LUVs] em média $2,01 \times 10^{-5}$ M

4.3.1.4 Estudo da Interação do PDMAEMA com LUVs com PTS entre pHs 6 e 10.

Observa-se na Figura 83 a permeabilização das LUVs de PG100% pelo PDMAEMA. Quanto maior a concentração de copolímero adicionado às LUVs, maior o efeito do vazamento do PTS. Observa-se, na Figura 84, que o aumento da concentração do polímero aumenta o vazamento.

Figura 83: %Vazamento de LUVs $6,5 \times 10^{-5}$ M, de PG 100%, pelo PDMAEMA em várias concentrações, mediada por PTS/MV. pH 8,5

Figura 84: % Vazamento de PTS/MV em LUVS $6,5 \times 10^{-5}$ M, de PG 100%, após 200 s, em função da concentração do PDMAEMA.

O efeito do homopolímero, PDMAEMA, $1,34 \times 10^{-8}$ M na permeabilização das LUVs, variando as proporções PC:PG e variando o pH, pode ser observado na figura 85 e 86.

Figura 85: % de Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em pH 8 do PDMAEMA $1,34 \times 10^{-8}$ M, LUVS= $6,0 \times 10^{-5}$ M,

Figura 86: % de Vazamento de PTS/MV em várias proporções PC:PG em função do pH do PDMAEMA $1,34 \times 10^{-8}$ M, LUVS= $6,0 \times 10^{-5}$ M,

Pode-se confirmar que o pH interfere na protonação do bloco PDMAEMA o que afeta a permeabilização das LUVs, já que o efeito ocorre tanto no experimento com CF quanto com PTS/MV, existindo uma faixa de pH preferencial entre 7,5 e 9.

O efeito da força iônica também é observado já que a permeabilização é mais eficiente nos experimentos com PTS, onde a força iônica é menor do que no experimento com a CF. No caso do homopolímero o efeito da força iônica é ainda mais evidente. Nas tabelas 16 e 17 pode-se observar que a concentração PDMAEMA para permeabilizar as LUVs em pH 8 é muito menor que nos experimentos com CF.

Tabela 16: % Vazamento em PC:PG 50:50 com todos os copolímeros e com PDMAEMA em pH 8,0 [LUVs] = $6,5 \times 10^{-5}$ M

Amostra	MM	DMAEMA	MMA	[amina] (M)	[pol](M) 50% vaz	CAC
PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{6,3}	54.200	313	50	3,10 E-06	9,90E-09	$2,44 \times 10^{-7}$
PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{3,0}	27.558	145	48	1,07 E-05	7,40E-08	$5,20 \times 10^{-7}$
PMMA ₁ -b-PDMAEMA _{1,1}	25.555	94	103	2,44 E-06	2,58E-08	$1,94 \times 10^{-7}$
DMAEMA	41614,9	265	-	2,65 E-07	1,00E-09	-

Tabela 17: % Vazamento em PG 100% em todos os copolímeros e no PDMAEMA [LUVs] = $5,8 \times 10^{-5}$ M

Amostra	MM	DMAEMA	MMA	[amina] (M)	[pol](M)	CAC
PMMA1-b-PDMAEMA _{6,3}	54.200	313	50	6,23E-06	1,99E-08	$2,44 \times 10^{-7}$
PMMA1-b-PDMAEMA _{3,0}	27.558	145	48	1,64E-05	1,13E-07	$5,20 \times 10^{-7}$
PMMA1-b-PDMAEMA _{1,1}	25.555	94	103	1,06E-05	1,03E-07	$1,94 \times 10^{-7}$
DMAEMA	41614,9	265	-	1,25E-06	4,70E-09	-

4.4 Estudo da Mobilidade Eletroforética das LUVs com os Copolímeros e com o homopolímero PDMAEMA

As medidas de mobilidade eletroforética e tamanho das LUVs foram realizados para confirmar a interação eletrostática que ocorre entre os copolímeros e as LUVs.

Nos estudos com LUVs contendo CF ou PTS observamos que, dependendo da força iônica, do pH e da concentração dos copolímeros, ocorre a permeabilização das vesículas com liberação para o meio externo dos compostos fluorescentes incorporados no compartimento aquoso. A diferença entre os experimentos de vazamento de LUVs contendo CF dos feitos com LUVs contendo PTS é a força iônica.

Nos experimentos seguintes, mediu-se a mobilidade eletroforética de LUVs PC:PG 50:50 após a adição de concentrações crescentes de copolímeros, em tampão Tris/HF 0,01 M pH 8,5, em baixa força iônica. O experimento foi realizado com 40 μ L de vesículas (concentração final 8×10^{-4} M), 1 mL de tampão Tris/HF 0,01 M, tendo, portanto, menor força iônica que nos experimentos com CF e PTS, e adições crescentes de copolímero, de 5 a 200 μ L.

4.4.1 Copolímero $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$

No gráfico da Figura 87 observa-se que a suspensão de LUVs de PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, sem $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ tem mobilidade eletroforética média inicial de -3,5 mm.cm/Vs. Na medida em que se adiciona o copolímero a mobilidade diminui com o aumento da razão $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ /lipídeo. Essa aumento de mobilidade é resultante da interação entre a parte carregada positivamente do $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$ com o fosfato dos fosfolipídios. O experimento permite afirmar que há interação entre as cargas do copolímero e da vesícula, acarretando na neutralização e, conseqüentemente, levando a mobilidade eletroforética a tender a zero.

Figura 87: Mobilidade eletroforética das LUVs 8×10^{-4} M PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, com adição crescente de $PMMA_1-b-PDMAEMA_{1,1}$.

4.4.2 Copolímero - $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$

No gráfico da Figura 88 observa-se que as LUVs PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5 sem $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ tem mobilidade eletroforética média inicial de -2,6 mm.cm/Vs. Observa-se que com aumento da razão $PMMA_1-b-PDMAEMA_{3,0}$ /lipídeo ocorre uma diminuição na mobilidade eletroforética. No caso deste copolímero o efeito é maior no começo da adição e vai diminuindo com maiores concentrações devido à maior quantidade de carga positiva do copolímero, que neutraliza as cargas do PG.

Figura 88: Mobilidade eletroforética das LUVs 8×10^{-4} M, PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, com adição crescente de PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0}.

4.4.3 Copolímero - PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3}

No gráfico da Figura 89 observa-se que as LUVs sem PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} tem mobilidade eletroforética média inicial de -3,0 mm.cm/Vs. Com o aumento da razão PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3}/lipídeo ocorre um aumento na mobilidade eletroforética. É possível observar que é necessária uma concentração menor de PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} para zerar a mobilidade se comparado com os outros copolímeros (Figuras 87 e 88).

Figura 89: Mobilidade eletroforética das LUVs $7,6 \times 10^{-4}$ M, PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, com adição crescente de PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3}.

4.4.4 Homopolímero – PDMAEMA

No gráfico da Figura 90 observa-se que a solução de LUVs sem PDMAEMA tem mobilidade eletroforética média inicial de $-3,1$ mm.cm/Vs. Observa-se que com o aumento da razão PDMAEMA/lipídeo a mobilidade se mantém constante até uma concentração aonde ocorre um aumento significativo brusco na mobilidade eletroforética, chegando a $\sim 0,0$ mm.cm/Vs.

Figura 90: Mobilidade eletroforética das LUVs PC:PG 50:50 em Tampão Tris/HF 0,01M pH 8,5, da ordem de $7,6 \times 10^{-4}$ M com adições crescente de PDMAEMA.

4.5 Estudo do efeito dos copolímeros e do homopolímero PDMAEMA no diâmetro das LUVs

Ao extrusar as vesículas, limita-se o diâmetro máximo das LUVs a 100 nm. A medida do diâmetro hidrodinâmico das vesículas sem copolímero foi de aproximadamente 100 nm, como esperado. Ao adicionarmos o PDMAEMA à solução, o D_H praticamente não variou e a solução não ficou turva (Figura 91).

No entanto, as soluções de LUVs com PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} ficaram turvas a partir da razão PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3}/lipídios de 0,6 com o D_H aumentando de 90 até 320 nm (Figura 92).

Figura 91: Efeito do PDMAEMA no diâmetro hidrodinâmico das LUVs $7,6 \times 10^{-4}$ M, PC:PG 50:50, medida por DLS

Figura 92: Efeito do PMMA₁-b-PDMAEMA_{6,3} no diâmetro hidrodinâmico das LUVs $7,6 \times 10^{-4}$ M PC:PG 50:50

As soluções de LUVs com PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} ficaram turvas a partir da razão 0,61 (Figura 93) e as de PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} tiveram um aumento do D_h muito menor que os demais copolímeros, de 90 a 160 nm (Figura 94).

Figura 93: Efeito do PMMA₁-b-PDMAEMA_{1,1} no diâmetro hidrodinâmico das LUVs 8×10^{-4} M, PC:PG 50:50.

Figura 94: Efeito do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} no diâmetro hidrodinâmico das LUVs 8×10^{-4} M, PC:PG 50:50

Portanto podemos concluir que os polímeros se associam às LUVs neutralizando a carga do PG e levando também à agregação das vesículas quando em baixa força iônica.

4.6 Microscopia Óptica de GUVs na presença dos Copolímeros e do homopolímero PDMAEMA

Para uma análise visual da ação dos copolímeros nas membranas estudamos o comportamento dos copolímeros na presença de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) em colaboração com a Prof^a Dr^a Karin da UNIFESP. Os experimentos com LUV's mostraram que os copolímeros são capazes de permeabilizar as membranas, mas não permitem definir com maior precisão o mecanismo de permeabilização. Os experimentos com as GUVs permitem esta compreensão. Para visualização das GUVs as mesmas são preparadas com uma assimetria de açúcares, com sacarose no volume

interno e glicose no externo. Como a densidade óptica dos açúcares é diferente, pode-se observar um contraste óptico bem definido nos lipossomas. As GUVs utilizadas no experimento foram preparadas com PC:PG 50:50 em sacarose e na fase aquosa externa usou-se os tampões MES 0,01 M pH 6,0, Tris/HCl 0,01 M pH 8,5 e CAPS 0,01 M, pH 10,0 todos em glicose 0,2 M, sem e com adição de 100 mM de NaCl, para variar a força iônica no sistema.

4.6.1 Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 6 sem adição de sal

Na Figura 95, 96 e 97 pode-se observar o efeito do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, e $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$, respectivamente, nas GUV's de PC:PG 50:50 em 0,002 M em tampão MES 0,01 M pH 6. Nas figuras é mostrada uma sequência de fotos em função do tempo (em segundos) após adição do copolímero. Pode-se observar a formação de um poro (abertura) na GUV com liberação de todo o seu conteúdo. Nos tempos $t = 346\text{s}$ para o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, no tempo $t = 607$ para o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ e no tempo $t = 285\text{s}$ para o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ é possível observar os copolímeros agindo sobre as vesículas e, com o passar do tempo, o conteúdo interno da GUV vaza, a vesícula se desfaz, e não é possível mais observar o contraste de fase das GUVs. A estrutura da GUVs é totalmente desfeita.

No tempo $t = 529$, para o PDMAEMA, observa-se que a GUV murcha completamente, o que é diferente do efeito observado com os copolímeros. O PDMAEMA só tem a porção hidrofílica, o que pode explicar a diferença de comportamento neste pH. Aparentemente não existe um ponto de início do vazamento, como uma abertura (Figura 98).

Figura 95: Efeito do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, $5,06 \times 10^{-9}$ M no vazamento de GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, em função do tempo. Tampão MES 0,01 M pH 6,0 sem sal. Aumento 63 vezes, a escala representa $5 \mu\text{m}$.

Figura 96: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{3,0}$ $4,8 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa $10 \mu\text{m}$

Figura 97: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-b-PDMAEMA}_{1,1}$ $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa $10 \mu\text{m}$.

Figura 98: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa $10 \mu\text{m}$.

4.6.2 Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 8,5 sem adição de sal.

O efeito do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ e do PDMAEMA, respectivamente, nas GUV's em Tris/HCl 0,01 M pH 8,5 pode ser observado na Figura 99, 100, 101 e 102. No tempo $t = 979\text{s}$ para a $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, no tempo $t = 774\text{s}$ para o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, e no tempo $t = 491\text{s}$ para o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$, os copolímeros promovem uma abertura nas GUVs. Observa-se que ocorre o total extravasamento do material interno. Com o passar do tempo o contraste de fase é totalmente perdido e não é possível mais observar as vesículas.

Na Figura 100 pode-se observar ainda o efeito do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ nas GUVs mostrando que, apesar de duas GUVs estarem unidas, não houve fusão entre as GUVs já que uma delas permanece intacta enquanto outra extravasa o conteúdo interno e desaparece. No tempo $t = 775$ o contraste de fase já está sendo perdido. Observa-se a liberação do conteúdo interno de uma das GUVs que está aderida a outra. Este resultado indica que, possivelmente, não há fusão das GUVs

Em $t = 300\text{s}$, para o PDMAEMA, figura 102, pode-se observar a perda de contraste com permeabilização das GUVs, mas sem formação de uma abertura como ocorre com os copolímeros. Isto sugere que a porção hidrofóbica participa do mecanismo de formação da abertura. Depois de aproximadamente 300 s a GUV se desmancha (Fig 102).

Figura 99: Efeito do tempo no vazamento de GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, $5,1 \times 10^{-9}$ M. Tris/HCl 0,01 M pH 8,5 sem sal. Aumento de 63 vezes a escala representa $10 \mu\text{m}$

Figura 100: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ $4,8 \times 10^{-9}$ M. E tampão pH 8,5 sem sal. Aumento de 63 vezes, a escala representa $10 \mu\text{m}$

Figura 101: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$, $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 8,5 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa $10 \mu\text{m}$.

Figura 102: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 8,5, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μ m.

4.6.3 Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 10 sem adição de sal.

Em CAPS 0,01 M, pH 10,0 pode-se observar que a adição de PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3}, do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0}, PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{1,1} e do PDMAEMA, nas GUV's, Figuras 99, 100, 101 e 102, causa pouco efeito e as GUVs permanecem intactas. Não há liberação do conteúdo interno. O contraste óptico é mantido por todo tempo do experimento.

Em pH 10 os copolímeros não apresentando carga. Desta forma, como observado nos experimentos com as LUVs, não há permeabilização pois não ocorre uma interação eletrostática entre GUVs e copolímero.

Figura 103: Efeito de PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{6,3} $5,1 \times 10^{-9}$ M, nas GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M. Tampão CAPS 0,01 M, pH 10. Aumento de 63 vezes, a escala representa 20 μ m

Figura 104: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ $4,8 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

Figura 105: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$, $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10 sem sal, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

Figura 106: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10 sem sal, aumento de 63 vezes a escala representa 20 μm .

4.6.4 Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 6 com adição de sal.

Pode-se observar que a adição de $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, nas GUV's em pH 6, em presença de NaCl 0.1 M, figura 107, não promove extravasamento conteúdo interno das GUVs. Em pH 6 com 0,1 M de NaCl, figuras 108, 109 e 110 com $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ e PDMAEMA respectivamente, observa-se que as GUVs são afetadas pela adição dos polímeros. Ocorre a formação de uma abertura que causa o extravasamento do material interno das GUVs. Após este tempo não é possível observar as GUVs.

Figura 107: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$ $5,1 \times 10^{-9}$ M. Tampões MES 0,01 M pH 6, 0,1M NaCl. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm

Figura 108: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ $4,8 \times 10^{-9}$ M. E tampão pH 6, 0.1 M NaCl. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

Figura 109: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 com 0,1 M de NaCl, aumento de 63 vezes, a escala representa 20 μm .

Figura 110: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 6 com 0,1 M NaCl, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

4.6.5 Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 8,5 com adição de sal.

O efeito do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$ nas GUVs em pH 8,5, 0,1 M NaCl pode ser observado na Figura 111. Forma-se uma abertura na vesícula e é possível observar a perda do conteúdo interno. As vesículas que estão dentro da GUVs na Figura 111 são liberadas, confirmando a permeabilização das GUVs.

O efeito do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ nas GUVs, pode ser observado na figura 112. Ocorre perda do contraste óptico e uma mudança de formato da vesícula. Na Figura 113 pode-se observar o efeito da adição de $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-DMAEMA}_{1,1}$ nas GUVs de PC:PG 50:50 em tampão 8,5 com 0,1M de NaCl. As GUVs perdem contraste com o tempo. O aumento da força iônica interfere no modo de ação do copolímero, dificultando a permeabilização da GUVs.

Na Figura 114 pode-se observar o efeito da adição da DMAEMA nas GUVs de PC:PG 50:50 em tampão 8,5 com 0,1 M de NaCl. As GUVs perdem contraste com o tempo. O aumento da força iônica interfere no modo de ação do também do homopolímero, do mesmo modo que com os demais copolímeros.

Figura 111: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, num aumento de 63 vezes, a escala representa 20 μm com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$ $5,1 \times 10^{-9}$ M. Tampão Tris/HCl 0,01 M, pH 8,5, 0,1 M NaCl.

Figura 112: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ $4,8 \times 10^{-9}$ M de 002 a 005 s. Tampão pH 8,5, 0,1 M NaCl. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

Figura 113: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão Tris/HCl 0.01M pH 8,5, 0,1 M de NaCl, aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

Figura 114: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 8,5 com NaCl 0,1 M. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

4.6.6 Efeito dos copolímeros nas GUV's em pH 10 com adição de sal

O contraste de fase não é perdido com a adição dos $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ e do PDMAEMA nas GUV's em pH 10 com 0,1 M NaCl, como pode ser observado nas figuras 115, 116, 117 e 118.

Os copolímeros não têm efeito nas GUVs em pH 10, sendo assim, não existe interação eletrostática e a GUV não é permeabilizada. Os resultados apoiam os dados de fluorescência das LUVs.

Figura 115: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$ $5,1 \times 10^{-9}$ M. E tampão pH 10 com NaCl 0,1 M. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm

Figura 116: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ $4,8 \times 10^{-9}$ M de 002 a 005 s. Tampão pH 10, 0,1 M NaCl. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

Figura 117: GUVs de PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M, com adição do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ $6,6 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10, 0,1 M de NaCl, aumento de 63 vezes, a escala representa 20 μm .

Figura 118: GUVs e PC:PG 50:50, $1,25 \times 10^{-4}$ M com adição do PDMAEMA $5,36 \times 10^{-9}$ M. Tampão pH 10 com NaCl 0,1 M. Aumento de 63 vezes, a escala representa 10 μm .

4.7 Análise de ^1H e 2D-NOESY em pH 6,2; 7,0; 8,2 e 10,0 do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0}

O espectro de RMN do copolímero PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} foi feito inicialmente em CDCl_3 em duas concentrações diferentes (Figura 119) para verificarmos se havia interferência da concentração nos picos mais importantes dos blocos PMMA e DMAEMA.

Figura 119: Espectro de ^1H -RMN do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0}, em CDCl_3 2mg/mL, $7,3 \times 10^{-5}$ M e 10mg/mL $3,6 \times 10^{-5}$ M – 500 MHz.

A partir dos espectros de RMN foi estudado o efeito da concentração sobre o estado de agregação do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0}. Experimentos unidimensionais de ^1H adquiridos para o PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0} em clorofórmio deuterado em 2 mg/mL e em 10 mg/mL mostram que em maior concentração o copolímero tende a agregar. O pico “f”, que corresponde aos metilenos da cadeia principal do copolímero, possui menor intensidade e maior largura de linha quando em maior concentração (Figura 119).

Colhemos o Espectro 2D-NOESY do PMMA₁-b-PDMAEMA_{3,0}, em clorofórmio deuterado em 2 mg/ml (Figura 120) e em 10 mg/ml (não mostrado). Os espectros nas duas diferentes concentrações foram similares, não sendo observado nenhum pico adicional com o aumento da concentração do copolímero.

Figura 120: Espectro 2D-NOESY do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, em clorofórmio deuterado, 2mg/mL, $7,3 \times 10^{-5}$ M, 500 Mhz.

Estudos de RMN foram realizados com o objetivo de investigar características estruturais do copolímero frente a diversas condições de solvente e pH. As análises do espectro de ^1H -RMN do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ demonstram que, com a mudança de pH, ocorrem perturbações no deslocamento químico de alguns picos (Figura 121). O aumento do pH, de 6,2 a 10, levou a uma alteração no deslocamento químico dos picos “b” de 2,93 e 2,88 ppm para 2,62 ppm (Figura 121). O mesmo efeito foi observado para os picos que correspondem aos seis hidrogênios das metilas ligadas ao grupamento amino da DMAEMA (picos “a” da Figura 121). O deslocamento químico destes picos (em ppm) diminui à medida que o pH da solução é elevado de 2,48 e 2,43 ppm em pH 6,2 para 2,24 e 2,23 ppm em pH 10.

Figura 121: Espectros de ^1H -RMN do $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$, $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, na faixa de pH 6,2 a pH 10. O espectro na parte inferior da Figura é uma expansão do espectro na parte superior da Figura.

Este fenômeno ocorre devido à desprotonação da amina próxima ao metileno e às metilas, o que acontece com o aumento da basicidade do meio e, consequentemente, leva a uma perda gradual de carga positiva na amina. Esta perda gradual da carga positiva da amina acarreta um aumento do efeito de blindagem destes núcleos o que pode ser confirmado pela perturbação do deslocamento químico no espectro de prótons para campos mais altos (de menor frequência).

O efeito nuclear Overhauser (*Nuclear Overhauser Effect* - NOE) é uma importante fonte de informação quanto a estruturas, por RMN. Ele é uma medida da transferência de polarização entre núcleos de hidrogênios próximos no espaço através

do acoplamento dipolar. A observação e a intensidade de um pico NOE depende da distância entre os spins nucleares. A intensidade do pico NOE observado em um experimento NOESY pode ser utilizada para a interpretação da proximidade ou não de hidrogênios que estejam próximos, em até 5 Å de distância. Através da observação de picos de correlação ^1H - ^1H em experimentos 2D-NOESY adquiridos para o PMMA_1 - b -PDMAEMA_{3,0} em diversas condições de pH pôde-se notar que o aumento do pH de uma faixa de 6,2 a 10 leva a uma estruturação do copolímero. As correlações entre os picos “a” e “e”, que correspondem às metilas ligadas à amina da DMAEMA e à metila da cadeia principal do PMMA_1 - b -PDMAEMA_{3,0} respectivamente, possuem maior intensidade nos espectros NOESY adquiridos para as amostras em pH 8,2 e 10 em relação às amostras em pH 6,2 e 7 (Figura 122).

Figura 122: Espectro 2D-NOESY do PMMA_1 - b -PDMAEMA_{3,0}, 1×10^{-4} M em tampão pH 6,2 a pH 10.

A maior intensidade destes picos revela uma maior interação entre estes grupos químicos no PMMA_1 - b -PDMAEMA_{3,0} em pH 8,2 e pH 10 do que em valores menores.

Ou seja, o aumento do pH a um valor igual ou maior que 8,2 favorece a estruturação do PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} em solução aquosa.

O pH também afeta o estado de agregação deste copolímero que em pH 6,2 e 7 nos quais ocorre menor agregação e em valores maiores que 8,2 tende a se agregar. Isto pode ser concluído através da observação das intensidades e larguras de linha dos picos nos espectros de prótons nos diferentes valores de pH mensurados. Com o aumento gradual do pH observa-se que os picos tornam-se menos intensos (Figura 122), o que confirma a agregação com o aumento do pH. As intensidades podem ser comparadas neste caso pois os experimentos de RMN foram adquiridos com o mesmo ganho do *receiver* e número de *scans*, e as amostras possuíam a mesma concentração de copolímero.

5. CONCLUSÕES

Nesta tese caracterizamos copolímeros sintéticos contendo monômeros de PMMA e DMAEMA na forma de diblocos por cromatografia de permeação gel e ^1H -RMN para determinar a massa molar e a proporção entre os blocos. Em solução aquosa estes polímeros formam agregados a partir de uma concentração característica (CMC), que depende da razão entre os blocos e do número de monômeros em cada bloco. A agregação é dependente de pH, pois as amins terciárias protonadas do bloco PMAEMA são responsáveis pela repulsão entre os monômeros e assim a agregação aumenta com a desprotonação das amins. Os resultados de RMN mostram que o pH afeta o estado de agregação destes copolímeros em água. Em pH 6,2 e 7 o copolímero se agrega pouco e em $\text{pH} > 8,0$ o copolímero tende a agregar. Esta conclusão decorre também da observação das intensidades e das larguras de linha dos picos, nos espectros de ^1H -RMN em função de pH. A titulação das amins dos copolímeros mostrou um contínuo de dissociação numa faixa bastante ampla de pH (cerca de 2 unidades) confirmando que ocorre a dissociação das amins em pH acima de 5,5. A dissociação continua até próximo de pH 8,5.

A interação dos polímeros com vesículas lamelares grandes (LUVs) foi caracterizada medindo-se o diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos agregados em função da adição dos polímeros. Usando técnicas de espalhamento dinâmico de luz observamos que em algumas condições de baixa força iônica a carga negativa das LUVs preparadas com PC:PG diminui na presença do copolímero. Esta diminuição de carga foi quantificada medindo-se a mobilidade eletroforética. O esquema 12 mostra como a ligação do polímero poderia alterar a mobilidade das vesículas:

Esquema 12: Modelo proposto da ligação do copolímero com as vesículas

Neste esquema, quando a razão polímero/lipídio é alta, as LUVs são completamente envolvidas pelo polímero, que neutraliza completamente a sua carga. Por outro lado, quando a proporção de vesículas é quase igual à dos polímeros, ocorre a formação de uma teia, na qual os polímeros e as vesículas estão presos e forma-se um agregado que pode chegar a precipitar (esquema 13). Os resultados de DLS mostram claramente o crescimento do agregado em função do aumento da razão polímero/lipídio em baixa força iônica.

Esquema 13: Modelo proposto da agregação dos polímeros com as vesículas

A diferença entre as propriedades dos copolímeros e do homopolímero DMAEMA, tendo em vista as diferentes razões polímero/lipídio, está correlacionada com as propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas de cada polímero e com a relação polímero/lipídio. Em LUVs contendo 100% PG, um fosfolipídio negativo, a presença do polímero DMAEMA, que tem 265 aminas/polímero, leva a 50% de vazamento numa concentração de $1,5 \times 10^{-6}$ enquanto que o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{6,3}$, que possui 313 unidades de DMAEMA, produz o mesmo vazamento em $8,7 \times 10^{-8}$ M. Neste caso, além da contribuição das cargas positivas na ligação com as LUVs ocorre um efeito maior devido a interação hidrofóbica, que no caso da DMAEMA não existe.

Por outro lado, o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ e $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ são copolímeros que possuem diferentes quantidade de DMAEMA e MMA. O $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ possui 48 subunidades MMA enquanto que o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ possui 94. Porém, o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{3,0}$ possui 145 unidades DMAEMA enquanto que o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$ possui 103. Comparando-se a concentração necessária para 50 % de vazamento com LUVs de PG 100% observa-se que o polímero que possui uma região hidrofóbica maior (o $\text{PMMA}_1\text{-}b\text{-PDMAEMA}_{1,1}$) alcança 50% de

vazamento numa concentração de $1,2 \times 10^{-4}$ M enquanto que o PMMA₁-*b*-PDMAEMA_{3,0} tem a mesma atividade em $2,04 \times 10^{-5}$ M. Este resultado indica que a região carregada do copolímero é muito mais relevante para a interação com as LUVs. Estes resultados exemplificam a interdependência da razão hidrofílico/hidrofóbico na interação de polímeros com membranas.

Outro resultado interessante obtido neste trabalho é que a variação da razão PC:PG é fundamental para a interação mais eficiente entre os copolímeros e as LUVs. Nas condições de trabalho as membranas fosfolipídicas são fluidas e existe movimentação lateral dos fosfolipídios quando da ligação de proteínas e outros polímeros a elas. No esquema abaixo é mostrado, de modo simplificado, a ligação de um copolímero carregado e a possível separação lateral de fases de fosfolipídios negativos induzida pela ligação de polímeros carregados positivamente à membrana.

Esquema 14: Modelo do mecanismo de ação dos copolímeros sobre as vesículas

Esta separação lateral de fase pode explicar o vazamento observado nas vesículas carregadas negativamente. No caso de LUVs neutras a interação hidrofóbica dos copolímeros com a membrana não provoca uma alteração suficiente como para provocar vazamento. O efeito de pH nos estudos de vazamento de LUVs induzido por polímeros corrobora estes resultados.

O efeito dos polímeros no vazamento das vesículas foi demonstrado de forma muito clara nos experimentos com vesículas gigantes aonde se pode ver que a desprotonação do copolímero e aumento de força iônica diminuem o efeito no vazamento das GUVs.

Demonstramos, nesta Tese, que o efeito de copolímeros sintéticos contendo regiões hidrofóbicas e hidrofílicas são bons modelos de peptídeos e proteínas permitindo avaliar quantitativamente o efeito dessas interações em modelos de membranas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BILLMEYER JR. F. W. Textbook of Polymer Science. 1^a ed. Singapore: Jonh Wiley & Sons; 1984.
2. Butté, A, Storti G, Morbidelli M. Miniemulsion Living Free Radical Polymerization by RAFT. *Macromolecules*. 2001;34(17):5885–96.
3. ODIAN, G. Principles of Polymerization [Internet]. 3^a ed. New York: Jonh Wiley & Sons; 1991
4. Franchetti SMM, Marconato JC. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Quím Nova*. 2006;29(4):811–6.
5. CANEVAROLO JR. S. V. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e Engenheiros. 1^a ed. São Paulo: Artliber Editora; 2002. 280 p.
6. Stevens, M.P. Polymer chemistry: an introduction. 3 rd. New York: Oxford University Press; 1999.
7. Cohen S, Lobel E, Trevgoda A, Peled Y. A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye. *J Controlled Release*. 1997;44(2-3):201–8.
8. Jeong B, Bae YH, Lee DS, Kim SW. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature*. 1997;388(6645):860–2.
9. Sperling LH, Wiley InterScience (Online service). Introduction to physical polymer science [Internet]. Hoboken, N.J.: Wiley; 2006
10. Florenzano FH. Perspectivas atuais para a obtenção controlada de polímeros e sua caracterização. *Polímeros*. 2008;18(2):100–5.
11. Butté, Storti G, Morbidelli M. Miniemulsion Living Free Radical Polymerization by RAFT. *Macromolecules*. 2001;34(17):5885–96.
12. Moad G, Rizzardo E, Thang SH. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. *Aust J Chem*. 2005;58(6):379.
13. Shen JN, Ye YF, Zeng GN, Qiu JH. Preparation and Characterization of PMMA-b-PDMAEMA/Polysulfone Composite Membranes by RAFT Polymerization and their Permeation Performance of Carbon Dioxide. *Adv Mater Res*. 2011;284-286:1717–23.
14. Kumar N, Ravikumar MNV, Domb AJ. Biodegradable block copolymers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;53(1):23–44.
15. Barner-Kowollik C, Davis TP, Heuts JPA, Stenzel MH, Vana P, Whittaker M. RAFTing down under: Tales of missing radicals, fancy architectures, and mysterious holes. *J Polym Sci Part Polym Chem*. 2003;41(3):365–75.
16. Kircı B, Lutz J-F, Matyjaszewski K. Synthesis of Well-Defined Alternating Copolymers Poly(methyl methacrylate- *a lt* -styrene) by RAFT Polymerization in the Presence of Lewis Acid. *Macromolecules*. 2002;35(7):2448–51.

17. Yu C, Yu Y, Miao L, Zhao D. Highly ordered mesoporous silica structures templated by poly(butylene oxide) segment di- and tri-block copolymers. *Microporous Mesoporous Mater.* 2001;44-45:65–72.
18. Matějček P, Podhájecká K, Humpolíčková J, Uhlík F, Jelínek K, Limpouchová Z, et al. Polyelectrolyte Behavior of Polystyrene-block-poly(methacrylic acid) Micelles in Aqueous Solutions at Low Ionic Strength. *Macromolecules.* 2004;37(26):10141–54.
19. Cuccovia IM, Sesso A, Abuin EB, Okino PF, Tavares PG, Campos JFS, et al. Characterization of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles prepared by membrane extrusion and dichloromethane injection. *J Mol Liq.* 1997;72(1-3):323–36.
20. Deng S, Bai R, Chen JP, Yu G, Jiang Z, Zhou F. Effects of alkaline/surfactant/polymer on stability of oil droplets in produced water from ASP flooding. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 2002;211(2-3):275–84.
21. Sabhapondit A, Borthakur A, Haque I. Water Soluble Acrylamidomethyl Propane Sulfonate (AMPS) Copolymer as an Enhanced Oil Recovery Chemical. *Energy Fuels.* 2003;17(3):683–8.
22. Fendler, J. H. *Membrane Mimetic Chemistry: Characterization and applications of micelles, microemulsions, monolayers, bilayers, vesicles, host-guest systems, and polyions.* 1^a ed. New York: Wiley-Interscience; 1982.
23. Fendler JH. Reactivity control in membrane mimetic systems. *Pure Appl Chem* [Internet]. 1 de janeiro de 1982
24. Cuccovia IM, Sesso A, Abuin EB, Okino PF, Tavares PG, Campos JFS, et al. Characterization of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles prepared by membrane extrusion and dichloromethane injection. *J Mol Liq.* 1997;72(1–3):323–36.
25. Cuccovia Iolanda Midea, Chaimovich, Hernan. Structural and Functional Implications on the Interfacial Composition in Supramolecular Aggregates: The Use of Chemical Trapping for the Determination of Interfacial Concentrations. In *Catalysis and Photochemistry in Heterogenous Media.* 1^a ed Kerala, India: Eds. Research Signpost; 2007.
26. Eeckman F, Moës A., Amighi K. Poly(N-isopropylacrylamide) copolymers for constant temperature controlled drug delivery. *Int J Pharm.* 2004;273(1-2):109–19.
27. Snowden MJ, Chowdhry BZ, Vincent B, Morris GE. Colloidal copolymer microgels of N-isopropylacrylamide and acrylic acid: pH, ionic strength and temperature effects. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1996;92(24):5013.
28. Virtanen P. Employment security and health. *J Epidemiol Community Health.* 2002;56(8):569–74.
29. Carmona-Ribeiro A, de Melo Carrasco L. Cationic Antimicrobial Polymers and Their Assemblies. *Int J Mol Sci.* 2013;14(5):9906–46.
30. Tirado-Miranda M, Schmitt A, Callejas-Fernández J, Fernández-Barbero A. Aggregation of protein-coated colloidal particles: Interaction energy, cluster morphology, and aggregation kinetics. *J Chem Phys.* 2003;119(17):9251.
31. Bütün V, Armes S., Billingham N. Synthesis and aqueous solution properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymers and diblock copolymers. *Polymer.* 2001;42(14):5993–6008.
32. Zhang M, Liu L, Zhao H, Yang Y, Fu G, He B. Double-responsive polymer brushes on the surface of colloid particles. *J Colloid Interface Sci.* 2006;301(1):85–91.

33. De Souza JCP, Naves AF, Florenzano FH. Specific thermoresponsiveness of PMMA-block-PDMAEMA to selected ions and other factors in aqueous solution. *Colloid Polym Sci.* 2012;290(13):1285–91.
34. Liu Q, Yu Z, Ni P. Micellization and applications of narrow-distribution poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]. *Colloid Polym Sci.* 2004;282(4):387–93.
35. Baines FL, Armes SP, Billingham NC, Tuzar Z. Micellization of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate- *block* -methyl methacrylate) Copolymers in Aqueous Solution. *Macromolecules.* 1996;29(25):8151–9.
36. Gaucher G, Dufresne M-H, Sant VP, Kang N, Maysinger D, Leroux J-C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Controlled Release.* 2005;109(1-3):169–88.
37. Arslan H, Zırtıl O, Bütün V. The synthesis and solution behaviors of novel amphiphilic block copolymers based on d-galactopyranose and 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate. *Eur Polym J.* 2013;49(12):4118–29.
38. Lee H, Son SH, Sharma R, Won Y-Y. A Discussion of the pH-Dependent Protonation Behaviors of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA) and Poly(ethylenimine- *ran* -2-ethyl-2-oxazoline) (P(EI- *r* -EOz)). *J Phys Chem B.* 2011;115(5):844–60.
39. Nassar A-EF, Willis WS, Rusling JF. Electron Transfer from Electrodes to Myoglobin: Facilitated in Surfactant Films and Blocked by Adsorbed Biomacromolecules. *Anal Chem.* 1995;67(14):2386–92.
40. Binder WH. Polymer-Induced Transient Pores in Lipid Membranes. *Angew Chem Int Ed.* 14 de abril de 2008;47(17):3092–5.
41. Binder WH. Polymer-Induced Transient Pores in Lipid Membranes. *Angew Chem Int Ed.* 2008;47(17):3092–5.
42. De Vries AH, Mark AE, Marrink SJ. Molecular Dynamics Simulation of the Spontaneous Formation of a Small DPPC Vesicle in Water in Atomistic Detail. *J Am Chem Soc.* 2004;126(14):4488–9.
43. Frézard F, Schettini DA, Rocha OGF, Demicheli C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quím Nova.* 2005;28(3):511–8.
44. Luisi PL. The Emergence of Life: From Chemical Origins to Synthetic Biology [Internet]. Cambridge University Press; 2006.
45. Torchilin VP, Levchenko TS. TAT-Liposomes: A Novel Intracellular Drug Carrier. *Curr Protein Pept Sci.* 2003;4(2):133–40.
46. Heerklotz H, Seelig J. Titration calorimetry of surfactant–membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2000;1508(1–2):69–85.
47. Manzini MC, Perez KR, Riske KA, Bozelli JC, Santos TL, da Silva MA, et al. Peptide:lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2014;1838(7):1985–99.

48. Ringsdorf H, Schlarb B, Venzmer J. Molecular Architecture and Function of Polymeric Oriented Systems: Models for the Study of Organization, Surface Recognition, and Dynamics of Biomembranes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1988;27(1):113–58.
49. Kirpotin D, Hong K, Mullah N, Papahadjopoulos D, Zalipsky S. Liposomes with detachable polymer coating: destabilization and fusion of dioleoylphosphatidylethanolamine vesicles triggered by cleavage of surface-grafted poly(ethylene glycol). *FEBS Lett*. 1996;388(2-3):115–8.
50. Maximiano FA, Silva MA da, Daghanli KRP, Araujo PS de, Chaimovich H, Cuccovia IM. A convenient method for lecithin purification from fresh eggs. *Quím Nova*. 2008;31(4):910–3.
51. Flávia Pires Maximiano, Guilherme H. Yoshinaze. Caracterização Físico-Química Do Fármaco Antichagásico Benznidazol. 2010;33(8):6.
52. Mertoglu M, Garnier S, Laschewsky A, Skrabania K, Storsberg J. Stimuli responsive amphiphilic block copolymers for aqueous media synthesised via reversible addition fragmentation chain transfer polymerisation (RAFT). *Polymer*. 2005;46(18):7726–40.
53. Weinstein JN, Yoshikami S, Henkart P, Blumenthal R, Hagins WA. Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science*. 1977;195(4277):489–92.
54. Chen PS, Toribara TY, Warner H. Microdetermination of Phosphorus. *Anal Chem*. 1956;28(11):1756–8.
55. Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas M, et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 2005;59(4):687–96.
56. Jeener J, Meier BH, Bachmann P, Ernst RR. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J Chem Phys*. 1979;71(11):4546.
57. Santos NC, Castanho MARB. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quím Nova*.;25(6b):1181–5.
58. Lakowicz, Joseph R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer Science & Business Media, 2013.
59. Angelova MI, Dimitrov DS. Liposome electroformation. *Faraday Discuss Chem Soc*. 1986;81:303.
60. Shen JN, Ye YF, Zeng GN, Qiu JH. Preparation and Characterization of PMMA-b-PDMAEMA/Polysulfone Composite Membranes by RAFT Polymerization and their Permeation Performance of Carbon Dioxide. *Adv Mater Res*.;284-286:1717–23.
61. Xiao G, Hu Z, Zeng G, Wang Y, Huang Y, Hong X, et al. Effect of hydrophilic chain length on the aqueous solution behavior of block amphiphilic copolymers PMMA-b-PDMAEMA. *J Appl Polym Sci*. 2012;124(1):202–8.
62. Zhao Y, Guo K, Wang C, Wang L. Effect of Inclusion Complexation with Cyclodextrin on the Cloud Point of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) Solution. *Langmuir*. 2010;26(11):8966–70.