

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

VALDOMIRO VAGNER DE SOUZA

**Síntese e Caracterização de Polímeros contendo
poli[metacrilato de 2-(dimetilamino) etila] e suas
Aplicações Biológicas e Biomiméticas**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo
Data de depósito na SPG:
18/07/2019

VALDOMIRO VAGNER DE SOUZA

**Síntese e Caracterização de Polímeros contendo
poli[metacrilato de 2-(dimetilamino) etila] e suas
Aplicações Biológicas e Biomiméticas**

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

Orientadora: Dra. Iolanda Midea Cuccovia

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

dd719a de Souza, Valdomiro Wagner
s Síntese e Caracterização de Polímeros contendo
Metacrilato de 2-(dimetilamino) etila e suas
Aplicações Biológicas e Biomiméticas / Valdomiro
Wagner de Souza. - São Paulo, 2019.
149 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de
Bioquímica.

Orientador: Cuccovia, Iolanda Midea
Coorientador: Florenzano, Fábio Herbst

1. Polímeros. 2. DNA. 3. Transfecção. 4.
Polimerização. I. T. II. Cuccovia, Iolanda Midea,
orientador. III. Florenzano, Fábio Herbst,
coorientador.

DE SOUZA, V. V. Síntese e Caracterização de Polímeros contendo Metacrilato de 2-(dimetilamino) etila e suas Aplicações Biológicas e Biomiméticas.
Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Bioquímica).

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr (a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr (a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr (a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr (a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr (a). _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Acreditaram em mim, mesmo quando falhei. Acreditaram, mesmo quando não havia dinheiro. Acreditaram, apesar de todos meus erros. Eles acreditaram em mim, quando nem eu acreditava. Eles me deram uma, duas, três, várias chances. Eles acreditaram e me convenceram. A falta de recursos financeiros atrasa a gente, mas, não nos impede.

Dedico essa tese aos meus pais, João (*in memoriam*) e Ana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, à minha irmã Viviane, Daniel e às minhas sobrinhas, Ana Júlia e Maria Cecília, por alegrarem as minhas noites de sexta feira.

Agradeço a minha esposa Haiadni. Obrigado por ser a mãe de nossa pequena Alícia.

Obrigado professor Fábio Herbst Florenzano. Você plantou a semente da ciência em minha mente (lá em 2005) e é responsável (ou o culpado) por eu ter decidido ser professor. Agradeço pela co-orientação deste trabalho e por muitas outras coisas.

Obrigado pela parceria, colegas de Lorena (DEMAR-USP), especialmente Milton *Justin*, Wagner Freitas, Sr. Renatinho, Carol, Claudia, Heman, Gabriel Trama e os xarás Ygor e Ygor, professor Eduardo Triboni, entre outros.

Obrigado professora Iolanda M. Cuccovia, pelos conselhos, ensinamentos e confiança. Foi estimulante conviver com você. Tive a oportunidade única de aprender a trabalhar no laboratório e a fazer ciência (de verdade e do jeito certo). Obrigado pelas plantinhas que me deu, elas cresceram no meu jardim (literalmente).

Professor Hernan Chaimovick Guralnik. Em meados de 2005, eu estagiei no laboratório e ele era diretor do IQ, na época. O ouvi falar sobre ciência. Fiquei entusiasmado com o fato de alguém de seu *quilate* e competência, ainda ter tempo para estimular os sonhos de um jovem estudante de graduação. Eu cometi o erro de não ter cursado o mestrado no IQ, mas, acredito que corriji (em partes) esse erro, apresentando essa tese. Obrigado por me ajudar a escolher o título desta tese.

Agradeço ao professor Roberto Salinas pela parceria e pelas valiosas dicas sobre ciência. Obrigado, pois aprendi muito com você. Obrigado pelos chocolates, bolos, doces e por ser tão legal comigo. Fui muito bem recebido em seu laboratório.

Agradeço aos colegas do IQ: Douglas, Tatiana, Carol, Angie, Oswaldo de Moçambique (obrigado, pela amizade, que ultrapassou continentes), Agnieszka, Jack, Claudio e Taty, Túlio, Litiele, Ricardo, Railmara, Ana Regina, Marcela, Murilo, Mario (colombiano), Íris (ICB), Isaac, Marcus, Luís, Larissa, Íris, "*Laurinha e Laurona*", Peter (Park), Marcinha, Gustavo Carretero, Carol, Adauto, Amanda, Sandra e Cheila.

Obrigado pela convivência, professoras Flávia, Cris (do ICB) e demais docentes do IQ.

Um agradecimento especial ao parceiro e amigo, Phelipe A. M Vitalle. Obrigado por me ensinar “biomol” e a trabalhar com proteínas e bactérias. “*É na calada da noite que as ideias surgem*”. Meu mais sincero agradecimento. Eu torço muito para que possamos continuar trabalhando juntos e possamos um dia “curar” o câncer, mesmo que seja apenas em nosso “*mundo das ideias*”.

Um agradecimento à Rosângela do SAS, pela ajuda com minhas hospedagens no CRUSP. Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Doutorado e Taxa de Bancada, à USP (especialmente ao IQ) e a todos seus funcionários e colaboradores.

Um agradecimento a todos que, de algum modo, contribuíram com esse trabalho.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

DE SOUZA, V. V. **Síntese e Caracterização de Polímeros contendo Metacrilato de 2-(dimetilamino) etila e suas Aplicações Biológicas e Biomiméticas**. 2019. 155 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Polímeros são constituídos por unidades repetitivas (meros). Quando consistem em apenas um tipo de mero são denominados homopolímeros e, possuindo mais de um tipo, copolímeros. A natureza destas unidades e a maneira como se ligam nas cadeias poliméricas definem as propriedades dos polímeros, que podem incluir mudanças com pH e temperatura. O uso de diferentes monômeros permite desenvolver polímeros para aplicações como entrega de genes ou formação de vesículas poliméricas (polimerossomos), objetivos desta tese. Visando desenvolver materiais poliméricos para essas aplicações, vários polímeros e copolímeros foram sintetizados, usando a técnica RAFT: (sigla inglesa para Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer), uma das variantes da técnica de Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (PDRR). Proporções variáveis de metacrilato de 2-(dimetilamino) etila (DMAEMA), metacrilato de metila (MMA) e estireno (S) permitiram sintetizar vários materiais. Os polímeros obtidos neste trabalho foram caracterizados por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC, como sigla em inglês), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (comumente chamada pela sigla inglesa: FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN de ^1H). Resultados obtidos por Espalhamento Dinâmico de Luz (em inglês, DLS: Dynamic Light Scattering) das amostras de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ e PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ em tampão TRIS-HCl, (pHs 7,4 e 8,0) demonstraram que o número de partículas diminuiu com o aumento de pH. O número de partículas é maior quando formadas em tampão fosfato pH 8 devido a uma maior compactação do polímero. As amostras preparadas em tampões Tris-HCl e fosfato, (pH 8), mostraram menores valores de Potencial Zeta quando em tampão fosfato. O tamanho das partículas foi compatível com vesículas em todas as condições estudadas e esses polimerossomos tiveram aumento no seu diâmetro hidrodinâmico (Dh), a partir de 65 °C (PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄) e 85 °C (PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁), quando em tampão fosfato. Análise dos polimerossomos por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) por Coloração Negativa mostraram, respectivamente, a existência de um compartimento interno capaz de incorporar uma sonda hidrofílica e revelaram vesículas com aproximadamente 80 nm de diâmetro. Paralelamente, foram realizados experimentos de eletroforese em gel de agarose com um DNA plasmideal (pUC19), na presença de polímeros de PDMAEMA₃₁₅ (RAFT), PMMA₃-*co*-PDMAEMA₂₆ e PMMA₃₁-*co*-PDMAEMA₇₀ (RAFT). Observou-se migração alterada de pUC19 no gel de agarose e até mesmo retenção de DNA próximo ao slot de aplicação. O PMMA₆₀ não afetou a migração do pUC19, mostrando a importância do PDMAEMA para a interação com DNA. Polímeros contendo DMAEMA também mediarão a entrega de pUC19 em células de *E. coli* não competentes. Apenas as células de *E. coli* incubadas com PMMA₃-*co*-PDMAEMA₂₆ ou PMMA₃₁-*co*-PDMAEMA₇₀ (RAFT), mas não com PDMAEMA₃₁₅ ou PMMA₆₀ (ambos obtidos via RAFT), foram eficientemente transformadas, sugerindo que uma pequena fração de PMMA nas cadeias de

polímeros é necessária para transfecção. Esses resultados abrem caminho para o desenvolvimento de novos agentes de entrega de DNA, candidatos a uma variedade de aplicações.

Palavras chave: Polímeros (materiais), DNA, Transfecção, Polimerização

ABSTRACT

DE SOUZA, V. V. **Synthesis and Characterization of Polymers containing 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate and its Biological and Biomimetic Applications.** 2019. 155 f. Thesis (PhD) - Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Polymers consist of repeating units or groups (monomers). Homopolymers consist of only one type of group and copolymers contain more than one type of monomer. The nature of the monomers and the binding type in the polymer chains define the properties of the polymers, which may include changes with pH and temperature. The use of different monomers allows the development of polymers for applications such as gene delivery or the formation of polymeric vesicles (polymersomes), the objectives of this thesis. In order to develop polymeric materials for these applications, several polymers and copolymers were synthesized using RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer), one of the variants of the Radical Reversible Deactivation Polymerization (RRDP) technique. Variable proportions of 2-(dimethylamine) ethyl methacrylate (DMAEMA), methyl methacrylate (MMA) and styrene (S) allowed the synthesis of several materials. The polymers obtained here were characterized by Gel Permeation Chromatography (GPC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR). Results obtained by Dynamic Light Scattering (DLS) of the PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ and PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ in TRIS-HCl buffer (pHs 7.4 and 8.0) demonstrated that the number of particles decreased with increasing pH. The number of particles was higher when formed in phosphate buffer pH 8 due to increased compaction of the polymer. Samples prepared in Tris-HCl and phosphate buffers, (pH 8), showed lower Zeta Potential values. The size of the particles was compatible with vesicles under all conditions studied and these polymers increased the hydrodynamic diameter (Dh), from 65 °C (PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄) and 85 °C (PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁), when in phosphate buffer. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) and Negative Staining Transmission Electron Microscopy showed the existence of an internal vesicle compartments capable of incorporating a hydrophilic probe and revealed vesicles with approximately 80 nm diameter. In parallel, agarose gel electrophoresis experiments with a plasmid DNA (pUC19) were performed in the presence of PDMAEMA₃₁₅, PMMA₃-*co*-PDMAEMA₂₆ and PMMA₃₁-*co*-PDMAEMA₇₀ (RAFT) polymers. There was altered migration of pUC19 on the agarose gel and even retention of DNA near the application slot. PMMA₆₀ did not affect the migration of pUC19, showing the importance of PDMAEMA for interaction with DNA. DMAEMA-containing polymers also mediated the delivery of pUC19 in non-competent *E. coli* cells. Only *E. coli* cells incubated with PMMA₃-*co*-PDMAEMA₂₆ or PMMA₃₁-*co*-PDMAEMA₇₀ (RAFT), but not with PDMAEMA₃₁₅ (RAFT) or PMMA₆₀ (RAFT), were efficiently transformed, suggesting that a small fraction of PMMA in the polymer chains is required for transfection. These results pave the way for the development of new DNA delivery agents, candidates for a variety of applications.

Keywords: Polymers (materials), DNA, Transfection, Polymerization.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| APRESENTAÇÃO | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.2 COPOLIMEROS PARA FORMAÇÃO DE VESÍCULAS POLIMÉRICAS (POLIMEROSSOMOS) | 15 |
| 1.2.1 Limitações dos polimerossomos desenvolvidos até o momento | 16 |
| 1.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS PARA TRANFECCÃO DE GENES | 17 |
| 1.3.1 Limitações relacionadas à transfecção de genes em células | 18 |
| 1.3.2 Limitações atuais relacionadas à transfecção de genes em células procarióticas | 19 |
| 1.5 Síntese de polímeros funcionais via Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (RDRP) | 20 |
| 1.5.1 A técnica RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer) | 22 |
| 1.5.2 PDMAEMA: um polímero que responde ao pH e à temperatura | 25 |
| 1.5.3 Protonação do PDMAEMA e resposta ao pH | 26 |
| 1.5.4 Resposta de DMAEMA à temperatura | 26 |
| 1.6 A hipótese do uso de polímeros contendo PDMAEMA para a formação de polimerossomos | 27 |
| 1.7 Uso de polímeros contendo PDMAEMA para a entrega de genes | 28 |
| 2. OBJETIVOS | 34 |
| 3. MATERIAIS, INSTRUMENTOS E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 MATERIAIS | 35 |
| 3.2 INSTRUMENTOS E MÉTODOS | 35 |
| 3.2.2 Espectroscopia de RMN de prótons | 36 |
| 3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier | 36 |
| 3.2.4 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico (Dh) por Espalhamento Dinâmico de Luz | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.2.5 Análises de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)..... | 37 |
| 3.2.6 Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão por Coloração Negativa . | 37 |
| 4.1 SÍNTESES VIA POLIMERIZAÇÃO RADICALAR LIVRE (PRL) | 38 |
| 4.1.1 Copolímeros com distribuição aleatória | 39 |
| 4.2 SÍNTESES POR PDRR NA MODALIDADE RAFT | 40 |
| 4.2.1 HOMOPOLÍMEROS | 40 |
| Poliestireno..... | 40 |
| Poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]..... | 41 |
| Poli(metacrilato de Metila)..... | 41 |
| 4.2.2 COPOLÍMEROS..... | 42 |
| Poliestireno- <i>b</i> -[metacrilato de 2-(dimetilamino)etila]..... | 43 |
| Poli [2-(dimetilamino)etil metacrilato]- <i>b</i> -poliestireno | 44 |
| Poli (metacrilato de metila)- <i>b</i> -[metacrilato de 2-(dimetilamino)etila] | 44 |
| Copolímeros aleatórios de PMMA- <i>co</i> -PDMAEMA..... | 45 |
| 5. CARACTERIZAÇÕES DOS POLÍMEROS OBTIDOS..... | 46 |
| 6. ESTUDO DAS APLICAÇÕES BIOMOLECULARES E BIOMIMÉTICAS: TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS | 46 |
| 6.1 APLICAÇÕES DE COPOLÍMEROS PARA A FORMAÇÃO DE POLÍMEROSSOMOS..... | 47 |
| 6.2 APLICAÇÕES DE COPOLÍMEROS PARA A TRANSFEÇÃO DE GENES EM BACTÉRIAS | 49 |
| Produção e purificação dos plasmídeos (pUC19). | 51 |
| Clonagem e obtenção | 51 |
| Transformação bacteriana para produção de DNA (pUC19)..... | 52 |
| Preparação de complexos de polímero/plasmídeo (PDMAEMA/DNA) e avaliação da interação..... | 53 |
| Transformação de <i>E. coli</i> com políplexos de polímero/pDNA | 54 |

| | |
|---|--------------------------------------|
| 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 56 |
| 7.1 SÍNTESES POR POLIMERIZAÇÃO RADICALAR LIVRE..... | 60 |
| Copolímeros em distribuição aleatória de PMMA-co-DMAEMA..... | 60 |
| 7.2 SÍNTESES POR PDRR VIA RAFT..... | 64 |
| 7.2.1 Homopolímeros..... | 64 |
| 7.2.2 Copolímeros dibloco..... | 77 |
| PS ₁₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₆₀ | 80 |
| PS ₁₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₃₂ | 81 |
| PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₂₄₄ e PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₇₈₁ | 83 |
| PMMA ₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₂₄ | 88 |
| PMMA ₅₂ - <i>b</i> -DMAEMA ₂₉₄ | 90 |
| PMMA ₁₄₁ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₁₉ | 91 |
| PMMA ₂₁₅ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₃₅ | 93 |
| 7.2.3 Copolímeros em distribuição aleatória..... | 94 |
| PMMA ₃₀ - <i>co</i> -DMAEMA ₆₃ e PMMA ₃₁ - <i>co</i> -DMAEMA ₇₀ | 95 |
| 8. APLICAÇÕES BIOLÓGICAS E BIOMIMÉTICAS..... | 98 |
| 8.1 Formação de polimerossomos..... | 98 |
| 8.2 Polímeros para a Transfecção de genes..... | 107 |
| 9. Conclusão..... | 115 |
| 10. Perspectivas..... | 116 |
| 11. REFERENCIAS..... | 117 |
| 20. Anexos..... | 126 |
| A – Material complementar..... | 126 |
| B – Súmula Curricular..... | 146 |
| C - Manuscritos em preparação..... | Erro! Indicador não definido. |

APRESENTAÇÃO

A experiência desse autor em síntese planejada de polímeros foi acrescida de conhecimentos da seara biológica. Esses conhecimentos foram essenciais para compreender os caminhos necessários para o desenvolvimento planejado de sistemas poliméricos úteis em aplicações biológicas e biomiméticas.

Essa tese apresenta os resultados relacionados à construção de polímeros para a formação de polimerossomos (ou vesículas poliméricas) e para a entrega de genes. Outros resultados alcançados com colaborações, omitidos do presente trabalho, se encontram em processo de socialização com a comunidade científica.

Finalmente, foi possível aprender sobre as maneiras mais adequadas de se construir polímeros sob medida, desde a síntese até a caracterização. Os polímeros obtidos se mostraram versáteis para variadas aplicações.

1. INTRODUÇÃO

Polímeros são macromoléculas constituídas de unidades repetitivas, chamadas meros. Quando consistem de apenas um tipo de mero, são chamados de homopolímeros e, possuindo mais de um tipo, são tidos como copolímeros (BARNER-KOWOLLIK, 2008). A natureza destas unidades (meros) e a maneira como são conectados nas cadeias poliméricas, definem suas propriedades (DESHPANDE et al., 2002). Essas propriedades podem envolver a resposta a estímulos, tais como pH (ZHANG; MARIC, 2011), temperatura (KLOUDA, 2015), campo elétrico (YI; ABIDIAN, 2015), dentre outras (SMITH; XU; MCCORMICK, 2010; URBAN, 2011).

Os polímeros podem possuir diferentes arquiteturas (**Figura 1**), por exemplo, monobloco, dibloco, tribloco, estatísticos ou em distribuição aleatória ou multibloco (DESHPANDE et al., 2002; TANG; SZOKA, 1997).

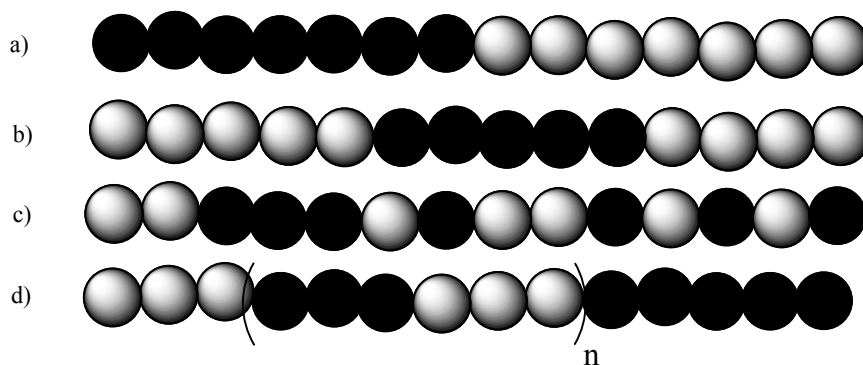


Figura 1. Arquitetura de copolímeros em bloco: (●) mero A; (○) mero B; (a) AB dibloco; (b) ABA tribloco; (c) AB estatístico ou em distribuição aleatória; (d) AB multibloco.

As diferentes estruturas e morfologias e a flexibilidade quanto ao uso de diferentes monômeros têm permitido desenvolver polímeros para aplicações

sofisticadas. Eles estão passando de materiais de uso comum e intensivo (*commodities*) - em que são aplicados apenas devido às suas propriedades mecânicas, processabilidade e custo reduzido - para servir como base de dispositivos sofisticados, inclusive na escala de nanômetros. Isso, entretanto, demanda maior refinamento nas técnicas de síntese e caracterização (WEI et al., 2017).

A contribuição científica do autor desta tese reside exatamente nessa seara: usar, explorar e aperfeiçoar técnicas atuais de síntese e caracterização para a obtenção de polímeros sob medida, capazes de atender a demandas específicas e resolver problemas, sejam tecnológicos, biomédicos ou outros.

Nesse sentido, alguns polímeros funcionais têm sido desenvolvidos para vetorização de genes ou de fármacos (PARK; JEONG; KIM, 2006), e para a montagem de vesículas poliméricas (polimerossomos) (DISCHER; AHMED, 2006; MENG; ZHONG; FEIJEN, 2009). A presente tese está estruturada em três principais partes: (i) síntese e caracterização dos polímeros desenvolvidos sob medida e os estudos das aplicações, que envolveram: (ii) aplicação dos polímeros para a formação de polimerossomos e; (iii) Uso de polímeros para a entrega de genes.

1.2 COPOLIMÉROS PARA FORMAÇÃO DE VESÍCULAS POLIMÉRICAS (POLIMEROSSOMOS)

Vesículas poliméricas ou polimerossomos são entidades formadas por auto-montagem, em água, de copolímeros em bloco anfifílicos (KUNITAKE et al., 1981). Apresentam elevada estabilidade físico-química devido a sua constituição polimérica (BERMUDEZ et al., 2002). Podem ser utilizados como agentes de diagnóstico ou

terapias médicas (LEONG et al., 2018), em entrega de fármacos (DISCHER et al., 2007) ou para a construção de nanoreatores (CHE; HEST, 2016; DISCHER; AHMED, 2006; LI, 2011).

Polimerossomos ou outros tipos de agregados também podem ser usados para a entrega de DNA ou RNA em células eucarióticas. Após ligar DNA, o complexo formado (usualmente chamado de poliplexo) pode adentrar as células e liberar o DNA no seu interior. Esse processo é conhecido por terapia gênica e, futuramente, poderá ser usado no tratamento de diversas doenças genéticas (LI; HUANG, 2006; WIRTH; PARKER; YLA-HERTTUALA, 2013).

Apesar das diversas aplicações dos polimerossomos, a pesquisa nessa área ainda é incipiente no Brasil e há limitações, a seguir, discutidas.

1.2.1 Limitações dos polimerossomos desenvolvidos até o momento

Alguns dos principais problemas dos polimerossomos construídos até a presente data se referem à baixa solubilidade em água e a incapacidade de responder a estímulos, como a variações do pH e temperatura do meio (; ZHU et al., 2017; LEONG et al., 2018). Essas limitações podem incapacitar o uso de polimerossomos, por exemplo, como nanoreatores ou nanosensores. A resposta a estímulos desse tipo (ou a outros, como luz, calor, eletricidade, etc.) pode tornar a vesícula polimérica seletiva a determinados substratos ou frmente à identificação ou quantificação de substâncias (LIU et al., 2015; ZHU et al., 2017). Além de tudo isso, praticamente todos os sistemas biológicos (ex. enzimas, receptores) são funcionais apenas em meio aquoso.

Pesquisadores da Alemanha, recentemente, construíram polimerossomos sensíveis a mudanças de temperatura e pH do meio. Eles usaram um copolímero tribloco constituído dos monômeros tetrahydro-pirano (THP), hidroxietil metacrilato (HEMA) e metacrilato de 2-(dimetilamino) etila (DMAEMA), esse último, responsável pelas características de dupla resposta (YILDIRIM et al., 2017). O referido estudo reforça a hipótese de que é possível usar copolímeros obtidos via RAFT para a construção de vesículas poliméricas capazes de encapsular substâncias hidrofóbicas ou hidrofílicas e de liberá-las de forma controlada (por exemplo, em resposta a variações de pH do meio).

1.3 MATERIAIS POLIMÉRICOS PARA TRANFEÇÃO DE GENES

A entrega ou vetorização de genes (em inglês: *gene delivery*) consiste em um método para inserir ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico: DNA ou ácido ribonucleico: RNA) numa célula (POUTON; SEYMOUR, 1998). Esse processo, quando realizado num organismo eucariótico, pode ser capaz de corrigir erros genéticos e determinar novas funções celulares (GUAN; ROSENECKER, 2017). Em um organismo procariótico pode aumentar ou diminuir a expressão de uma determinada proteína (POTTER; HELLER, 2018).

Outros vetores incluem cepas bacterianas específicas, como *Agrobacterium tumefaciens*, que são usados para entregar DNA em células vegetais, por exemplo (PAZOUR; DAS, 1990).

Esses e outros vetores existentes se distribuem em dois tipos: virais e não-virais. Exemplos de vetores virais são: adenovírus, poxvírus e herpesvírus (LU;

JOSHI; FLOMENBERG, 2014). Exemplos de não-virais incluem os polímeros e lipossomos, que são menos imunogênicos e não-patogênicos (JIN et al., 2014).

Entretanto, os polímeros possuem características particulares que trazem vantagens ausentes em outros vetores como o fato de poderem ter sua morfologia e estrutura planejadas. Isso pode, por exemplo, maximizar suas propriedades, que comumente são fundamentais para um vetor de genes eficiente (ONACA et al., 2009).

Polímeros catiônicos comercialmente disponíveis, como ViaFect (Sigma), ou lipídios especiais, são ferramentas eficientes para fornecer DNA exógeno a células eucarióticas e são usados para transfecção de células em bioquímica, em laboratórios em todo o mundo (DEVÍNSKY; PISARCIK; LUKAC, 2017).

O planejamento estrutural (ou morfológico) dos polímeros envolve a geometria, o balanço hidrofílico/hidrofóbico, a massa molar média, topologia das cadeias e a sua composição relativa, no caso de copolímeros. A otimização dessas características pode culminar na obtenção de agentes tão eficientes quanto os vírus, propiciando uma janela segura para a terapia gênica e solucionando os problemas que, atualmente, limitam seu uso em diversas aplicações biotecnológicas (FISCHER et al., 2003). Algumas dessas limitações serão discutidas a seguir.

1.3.1 Limitações relacionadas à transfecção de genes em células

Alternativas não-virais eficientes para vetorizar genes incluem os agentes físicos: injeção de genes, eletroporação ou choque térmico (NAYEROSSADAT; ALI; MAEDEH, 2012). Embora sejam métodos eficientes, são restritos ao uso “*ex vivo*”,

não sendo possível seu uso em um organismo tão complexo quanto um ser humano. Portanto, são restritos apenas ao campo da biologia molecular, para transformação bacteriana, por exemplo.

Os vetores virais são mais eficientes. Entretanto, são propensos a induzir reações imunes e podem, inclusive, apresentar patogenicidade (LI; HUANG, 2006). Portanto, é importante desenvolver uma alternativa não-viral, segura e eficiente para a entrega de genes em células. Quando se trata de procariotos, as limitações são ainda maiores e por isso merecem discussão em detalhes.

1.3.2 Limitações atuais relacionadas à transfecção de genes em células procarióticas

Em contraste com as células eucarióticas, a transferência de DNA estranho para células bacterianas geralmente envolve a geração de competência por um tratamento químico com cloreto de cálcio, seguido por uma perturbação por choque térmico (RAHIMZADEH et al., 2016). Alternativamente, pode-se usar eletroporação, na qual um pulso elétrico forte e curto é aplicado para perturbar a bicamada lipídica, permitindo a penetração de moléculas carregadas, como o DNA (POTTER; HELLER, 2018). Embora essas técnicas sejam estratégias bem estabelecidas para entregar DNA em organismos procarióticos, como *Escherichia coli*, a transformação de outras células procarióticas, como *Leptospira interrogans*, uma bactéria patogênica de grande importância para a saúde pública, ou *Xanthomonas campestris*, uma bactéria fitopatogênica que dissemina doenças entre culturas economicamente relevantes, não é simples. (BIRTLES, 2012; HAYWARD, 1993) Assim, métodos de entrega de DNA mais simples e eficientes para organismos

procarióticos também são desejáveis e encontrarão aplicações em situações específicas, seja como alternativa aos processos já existentes ou por permitir a transformação de organismos, até então, não transformáveis.

Todos os argumentos apresentados colocam os polímeros como ferramentas para resolução de diversos problemas. A seguir serão discutidos os aspectos relacionados à obtenção de materiais poliméricos de forma planejada para aplicações como aquelas citadas anteriormente.

1.5 Síntese de polímeros funcionais via Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (RDRP)

A Polimerização via Radical Livre (PRL) ainda é uma técnica amplamente utilizada, especialmente para a produção de polímeros em escala industrial. A PRL permite obter materiais de forma relativamente simples e com baixo custo. No entanto, a PRL possui limitações, como a impossibilidade de gerar polímeros com distribuição estreita de massas molares (baixa dispersidade molecular) (HEUTS, 2002). Além disso, a síntese de polímeros com morfologias em bloco ou com homogeneidade composicional entre as cadeias, no caso de copolímeros, é bastante difícil (BRAUNECKER; MATYJASZEWSKI, 2007).

Mas, há cerca de duas décadas, a ciência de polímeros apresentou as revolucionárias técnicas alternativas de Polimerização Radicalar Controlada (CRP), conhecidas, atualmente, como Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (PDRR) (BRAUNECKER; MATYJASZEWSKI, 2007; DESTARAC, 2010). Esse tipo de polimerização apresenta características extraordinárias, como a possibilidade de gerar polímeros com baixa polidispersidade, controle e

planejamento da arquitetura (obtenção de copolímeros com diferentes morfologias), planejamento de massa molar de antemão e homogeneidade de composição entre as cadeias dos copolímeros, sobrepujando as limitações referentes à PRL (BARNER-KOWOLLIK, 2008; MOAD; THANG, 2009). Em resumo, o controle dessas características possibilita, especialmente, adaptar materiais poliméricos para que eles "se encaixem" em diferentes aplicações (FAIRBANKS; GUNATILLAKE; MEAGHER, 2015).

Além disso, os materiais obtidos via PDRR possuem funcionalidade terminal, que os torna capazes de se ligarem a novos monômeros (inclusive, diferentes) em uma polimerização subsequente (BRAUNECKER; MATYJASZEWSKI, 2007). A PDRR se baseia, de maneira geral, na minimização do processo de *terminação* durante a polimerização radicalar, um fato que acaba por interromper o crescimento das cadeias, finalizando o processo de forma definitiva (BARNER-KOWOLLIK, 2008; MOAD; THANG, 2009).

A técnica RAFT (Sigla inglesa para *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*) é uma das variantes de PDRR mais interessante. Nela, um radical formado pode dar origem a várias cadeias (devido ao processo de transferência de cadeia) reiniciáveis, ainda que o processo de terminação não seja completamente evitado (MOAD; THANG, 2009). Portanto, o produto final (por exemplo, um homopolímero) apresenta uma funcionalidade terminal que permite a reinicialização da polimerização (por exemplo, sintetizar outro bloco em continuidade ao homopolímero), seja com o mesmo ou com outro tipo de monômero, o que facilita sobremaneira a obtenção de copolímeros em bloco e com diferentes morfologias (MOAD et al., 2003; MOAD; THANG, 2009).

A combinação de todas essas variáveis pode propiciar o desenvolvimento de polímeros para várias aplicações biológicas (BOYER et al., 2009). A seguir, a técnica RAFT em pormenores.

1.5.1 A técnica RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer)

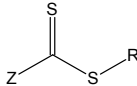
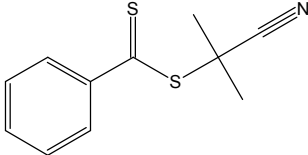
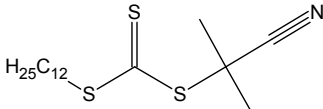
Esta variante de PDRR, apresentada pela primeira vez pelo grupo dos professores Rizzardo, Thang e Moad, tem várias peculiaridades (CHONG et al., 2007). Por exemplo, são usados exatamente os mesmos iniciadores da Polimerização via Radical Livre (peróxidos ou azonitrilas, em geral). Apesar da concentração de radicais ser baixa, eles são formados na etapa de *iniciação* das reações, gerando muitas cadeias poliméricas por conta de uma transferência da funcionalidade radicalar entre elas (BARNER-KOWOLLIK, 2008; MOAD; THANG, 2009).

Na RAFT, é imprescindível a presença dos *agentes de transferência de cadeia* (CTA: sigla inglesa para *chain transfer agent*), que se tornam bifuncionais quando reagem com cadeias radicalares, podendo gerar um radical diferente e mantendo-se ligados à cadeia original (que passa a ser iniciável novamente em outro ciclo de transferência). O novo radical formado continua se propagando. Em outro momento, essa nova cadeia radicalar reage com o CTA, mas esse se encontra ligado à cadeia polimérica anterior, que é liberada como um macro-radical, propagando-se por alguns instantes. O resultado também é a diminuição do número de cadeias que sofrem terminação irreversível (PERRIER, 2017).

Compostos de transferência de cadeia como os ditiobenzoatos, tritiocarbonatos e os ditiocarbamatos são essenciais para a RAFT. Todos eles

apresentam o grupo S-C(S)- que reage, por meio do enxofre da tiocarbonila, com radicais. O radical intermediário formado pode então clivar-se em uma das ligações C-S simples, liberando um radical que pode ser diferente daquele que reagiu inicialmente (KEDDIE et al., 2012; MOAD; RIZZARDO; THANG, 2009). Os agentes de transferência de cadeia usados para a síntese dos polímeros apresentados no presente trabalho estão ilustrados na Tabela 1 (BENAGLIA et al., 2009). Detalhes sobre cada um dos materiais obtidos serão apresentados em sessão própria, no decorrer desta tese.

Tabela 1: Alguns agentes de transferência de cadeia (CTA), usados para a síntese via RAFT dos polímeros apresentados.

| Estrutura molecular do CTA | Nomenclatura |
|---|---|
|  | fórmula geral |
|  | ditiobenzoato de 2-ciano-2-propila |
|  | tritiocarbonato de 2-ciano-2-propila e dodecila |

A Figura 3, abaixo, apresenta os principais equilíbrios e mecanismos reacionais envolvidos.

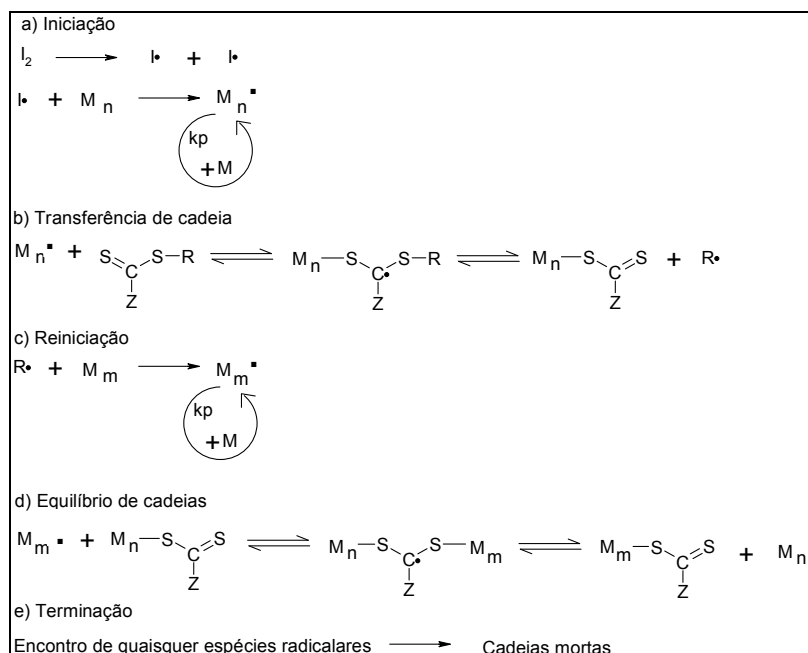


Figura 3: Conjunto de equilíbrios da RAFT, onde: I é o iniciador; M é o monômero; R e Z, grupos fundamentais para o controle reacional; k_p se refere à constante cinética de propagação. Adaptado de Florenzano, F.H. (FLORENZANO, 2008)

Outra vantagem de se utilizar a técnica RAFT para a síntese de polímeros é a possibilidade de se usar uma gama de monômeros, de diversas características. Há monômeros polares, apolares, neutros, carregados positivamente ou negativamente, com resposta ao pH ou temperatura, etc. Isso amplia o leque de possibilidades de construção de polímeros, quase que em número ilimitado, em termos de estrutura, morfologia e resposta (MOAD et al., 2003; SMITH; XU; MCCORMICK, 2010).

A seguir, alguns monômeros escolhidos como matéria prima para a construção dos polímeros apresentados nesse trabalho.

1.5.2 PDMAEMA: um polímero que responde ao pH e à temperatura.

Atualmente, está disponível variada gama de monômeros. Dentre eles, são interessantes os representantes biocompatíveis, com elevado grau de hidrofobicidade (Figura 4): metacrilato de metila (MMA) (QING, 2006; SLONE, 2001) e estireno (S) (KAEDING, 1974) e o DMAEMA, monômero hidrofílico, capaz de responder a pH e temperatura (COTANDA et al., 2013; NOURI et al., 2012; XIONG et al., 2011; YILDIZ et al., 2003; ZUIDAM et al., 2000). Esse último, por suas peculiares características, merece uma discussão mais detalhada.

O PDMAEMA (Figura 4) foi apresentado pela primeira vez como um candidato a vetorização de genes (tanto *in vivo* como *ex vivo*) por (VAN DE WETERING et al., 1998).

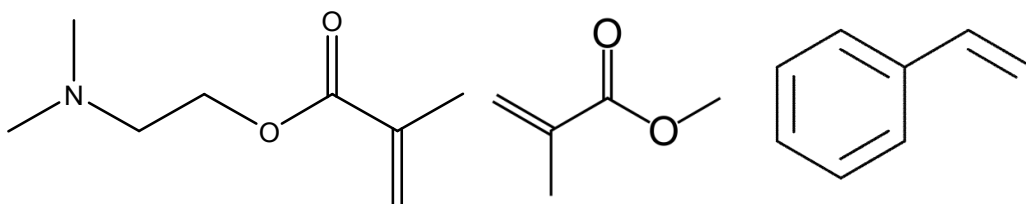


Figura 4: Estrutura dos monômeros: (i) À esquerda, DMAEMA; (II) no centro, MMA e; (iii) à direita, o estireno.

O DMAEMA apresenta uma amina terciária, com $pK_a = 8.44$ carregada positivamente em pHs que vão do ácido até bem acima da neutralidade. Essa característica estrutural torna os polímeros de DMAEMA (PDMAEMA) capazes de responder a variações de pH (VAN DE WETERING et al., 1998;) e temperatura (LAUBER et al., 2017), mudando sua conformação e solubilidade em solução ou saindo de fase (COTANDA et al., 2013; VAN DE WETERING et al., 1998).

1.5.3 Protonação do PDMAEMA e resposta ao pH

A amina protonável presente na estrutura do PDMAEMA parece também facilitar a interação com ácidos nucleicos. Isso ocorre porque o DNA encontra-se carregado negativamente (em condições fisiológicas, devido aos grupos fosfato presentes em sua estrutura). De modo semelhante, ocorre também a interações de polímeros contendo PDMAEMA com a membrana celular (MANGANIELLO et al., 2012).

O grau de protonação de polímeros de DMAEMA (PDMAEMA) depende do pH do meio e define o comportamento do polímero. Em pHs ácidos, as moléculas de PDMAEMA estarão mais carregadas aumentando a solubilidade em água. Nessas condições, há também maior interação do polímero com o DNA (WETERING et al., 1998).

1.5.4 Resposta de DMAEMA à temperatura

Os polímeros sensíveis à temperatura podem apresentar uma *Temperatura Crítica Inferior de Solubilização* (LCST, sigla em inglês) e também uma *Temperatura Crítica Superior de Solubilização* (UCST). A LCST e a UCST são, respectivamente, os valores de temperatura abaixo e acima da qual o solvente e polímero formam soluções (LÓPEZ-PÉREZ et al., 2010; XIA et al., 2013; XIONG et al., 2011).

Polímeros contendo PDMAEMA apresentam LCST. Ou seja, o aumento da temperatura provoca, a partir de certo valor, (LCST) uma alteração súbita no estado de solvatação do polímero em água. Aparentemente, há mudanças no seu comportamento com relativa diminuição da hidrofiliabilidade do PDMAEMA com o

aquecimento, levando à diminuição da solubilidade em água (observa-se aumento da turbidez de soluções contendo polímeros de DMAEMA) (ARSLAN; ZIRTIL; BUTUN, 2013). O comportamento desses polímeros em função da temperatura pode depender, também, de sua arquitetura (estatístico ou dibloco) e do balanço hidrofílico/hidrofóbico (YAMAMOTO; PIETRASIK; MATYJASZEWSKI, 2008).

1.6 A hipótese do uso de polímeros contendo PDMAEMA para a formação de polimerossomos

Há poucos estudos relatando o uso de polímeros (ou copolímeros) de PDMAEMA para a construção de polimerossomos. É um campo de pesquisa ainda emergente, mas bastante promissor, por vários motivos, os principais incluem possibilidade de resposta de materiais a temperatura e pH, anteriormente discutida (YILDIRIM et al., 2017).

Copolímeros dibloco, anfipáticos, podem formar polimerossomos (DISCHER et al., 1999). Por exemplo, um estudo realizado por (PIETSCH et al., 2012) demonstrou a ocorrência de formação espontânea de vesículas por copolímeros dibloco contendo PDMAEMA. Nesse estudo, o copolímero parece sofrer automontagem termo-induzida em duas etapas, resultando, após a primeira temperatura LCST, na formação de vesículas multilamelares e acima da segunda transição LCST, vesículas unilamelares.

O planejamento adequado do tamanho das cadeias, grau de hidrofobicidade e morfologia do copolímero idealizado, constituem o segredo para que vesículas responsivas a pH e temperatura se formem espontaneamente em meio aquoso. Um artefato deste porte poderia ser utilizado, inclusive, para a construção de

nanoreatores, entidades que prometem revolucionar a nanotecnologia, pois permitem desde o desenvolvimento de sistemas que são aplicáveis para o confinamento de enzimas (KIM et al., 2010), até a obtenção de biosensores (LANGE; ROZNYATOVSKAYA; MIRSKY, 2008; SCHMITT et al., 2016).

1.7 Uso de polímeros contendo PDMAEMA para a entrega de genes

Os vetores para a entrega de genes em células eucarióticas, baseados em polímeros, não são mais eficientes que os vetores virais, embora possam ser mais seguros (ROBBINS; GHIVIZZANI, 1998; SEOW; WOOD, 2009). No entanto, os esforços no planejamento estrutural e o uso de técnicas avançadas (como a RAFT) para a síntese de polímeros abrem um caminho amplo para novos vetores não-virais seguros e eficientes (AHMED; NARAIN, 2013).

A aplicação envolvendo a entrega de genes em células eucarióticas tem sido bastante explorada. Entretanto, polímeros contendo DMAEMA apresentam toxicidade celular, que, embora seja moderada, precisa ser contornada (BAI et al., 2012; SAMSONOVA et al., 2011).

Há indícios, por exemplo, de que ácidos nucleicos complexados com polímeros, possam ser protegidos de degradação biológica. Isso se dá, provavelmente, pelas interações eletrostáticas existentes entre o polímero e o DNA (ZHU et al., 2010). Essas características ainda podem ser moduladas em função da grande gama de morfologias possíveis para materiais construídos via RAFT (ZUIDAM et al., 2000).

Parece haver, também, correlação entre a eficiência de transfecção em células de mamíferos com a morfologia de polímeros contendo PDMAEMA. Podem

haver diferenças na eficiência de transfecção e no nível de toxicidade, quando se compara: (i) homopolímeros com copolímeros; (ii) morfologia dos copolímeros: estatístico, dibloco ou tribloco e (iii) balanço hidrofílico/hidrofóbico (HINTON et al., 2012; VAN DE WETERING et al., 1999).

Polímeros contendo PDMAEMA, apesar de terem limitações, apresentam imenso potencial para serem usados futuramente na área médica e farmacêutica. Por exemplo, (VAN DER AA et al., 2007) desenvolveram poliplexos, vetores não virais catiônicos de PDMAEMA e compararam com aqueles de *Poli(etil)enimina* (PEI). Todos os dois tipos de poliplexos foram capazes de complexar DNA e internalizá-los em células COS-7. Os detalhes moleculares do mecanismo pelo qual os poliplexos catiônicos mediam a entrega do DNA ainda são pouco compreendidos, entretanto há evidências que sugerem que os poliplexos carregados positivamente são absorvidos por meio da endocitose.

Outros estudos sugeriram que a concentração do material e a razão polímero/plasmídeo também podem influenciar na eficiência de transfecção. Concentrações de PDMAEMA na ordem de 15 a 20 µg/mL e razões de polímero/plasmídeo de 3 a 4 (massa/massa) têm apresentado maiores eficiências de transfecção em determinados tipos de células eucarióticas (CHERNG et al., 1996; HINRICHS et al., 1999; SANTANDER-ORTEGA et al., 2014).

(ZHU et al., 2010) demonstraram que micelas catiônicas, constituídas por um copolímero tribloco obtido via RAFT de PDMAEMA-*b*-Policaprolactona-*b*-PDMAEMA, foram promissoras para vetorização de siRNA e para o transporte de fármacos lipofílicos anticâncer. Os resultados se mostraram encorajadores para tratar doenças por terapia gênica (usando RNAs de interferência, que podem modular a expressão gênica) e quimioterapia antineoplásica.

Parece haver, também, correlação entre a massa molar média das cadeias poliméricas com a toxicidade e eficiência de transfecção em células eucarióticas. Nesse sentido, (SAMSONOVA et al., 2011) estudaram essa relação em copolímeros dibloco de PDMAEMA-*b*-poli(metacrilato de 2-hidroxietila). Os resultados sugeriram que quanto maior a proporção de PDMAEMA presente nas cadeias, maior a eficiência de transfecção, mas também a toxicidade.

(VENKATARAMAN et al., 2011) estudaram os efeitos da arquitetura de polietilenoglicol (PEG) em relação à eficiência de transfecção de genes e toxicidade envolvendo polímeros catiônicos de DMAEMA. Os estudos demonstraram que a presença de PEG, independentemente de sua topologia, não afeta a habilidade desses polímeros em complexar e liberar DNA. Eles também demonstraram que os copolímeros estatísticos (ou em distribuição aleatória) são menos tóxicos dos que os copolímeros dibloco e que o aumento da massa molar de copolímeros estatísticos (até determinado limite), pode aumentar a eficiência da expressão gênica desencadeada pela vetorização dos genes por esses materiais poliméricos. Os estudos foram realizados em linhagens de células de rim embrionário humano (HEK 293) e linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano (HepG2).

(NOURI et al., 2012) estudaram o efeito da conjugação de PDMAEMA com polietilenimina (PEI). Os conjugados DMAEMA-*b*-PEI foram sintetizados com sucesso. Eles mostraram que os polímeros ligados com PDMAEMA apresentavam menor citotoxicidade do que PEI sozinho, mantendo a eficiência para condensar o DNA em nanopartículas.

Apesar dos avanços nos estudos com células eucarióticas, conforme comentado anteriormente, ainda não há nenhum polímero capaz de transfectar procaríotos. A dificuldade provavelmente reside no fato de organismos (ex. *E. coli*)

possuírem dupla membrana e parede celular, o que provavelmente dificultaria o processo (SCHREIBER, 2002). O uso de um polímero capaz de transfectar bactérias poderia facilitar e flexibilizar os trabalhos em biologia molecular, vindo a ser um substituto eficiente (no quesito tempo, sobretudo) e menos oneroso financeiramente que os vírus ou outros vetores, pois uma pequena quantidade do polímero poderia ser suficiente para transformar bactérias, dispensando o uso de instrumentos específicos, como eletroporação (TSONG, 1991) ou choque térmico (RAHIMZADEH et al., 2016), por exemplo).

O segredo para transfectar procariotos usando polímeros pode estar relacionado à composição relativa, estrutura e morfologia do material. Um copolímero que funcione como vetor de DNA em bactérias (ex. *E.coli*), pode abrir caminhos para a transformação de outros tipos de células bacterianas, até então, incapazes de serem transformadas pelos métodos tradicionalmente usados em biologia molecular. Por exemplo, *Xanthomonas sp* (SWINGS; VAUTERIN; KERSTERS, 1993) e *Leptospira sp* (STALHEIM, 1985) não podem, até o momento, ser transformadas mesmo por meio de métodos clássicos. Esses gêneros englobam importantes agentes patogênicos, razão pela qual o estudo de vetores para esses organismos torna-se interessante do ponto de vista da Saúde Pública e, porque não dizer, da eficiência no uso de recursos em Saúde.

Importante ressaltar que os materiais poliméricos que foram obtidos aqui podem ser reproduzidos fielmente ou até terem suas características otimizadas. Isso porque foram sintetizados por RAFT, uma ferramenta que permite arquitetar polímeros de forma planejada e estritamente controlada.

A RAFT é uma técnica adequada para a criação de materiais poliméricos com a estrutura desejada e, a partir disso, que apresentem propriedades úteis de interesse em diversas áreas. Na RAFT usam-se os mesmos iniciadores das polimerizações via radical livre comuns e o número de cadeias formadas será igual ao número de moléculas do CTA adicionados à mistura reacional, conforme será demonstrado a seguir. O controle da polimerização é conseguido na RAFT por meio de um intrincado conjunto de equilíbrios de transferência de cadeia (PERRIER, 2017). No centro desse processo estão os chamados agentes de transferência de cadeia (CTA), já apresentados anteriormente, na Tabela 1.

Além das vantagens que fazem da RAFT uma técnica bastante vantajosa comparada com PRL, também se ressalta a homogeneidade composicional dos copolímeros obtidos por essa primeira, característica importante quando se busca aplicações biológicas para os materiais poliméricos (KEDDIE, 2013).

O autor desta tese tem construído polímeros usando RAFT desde o início de 2005, sendo de principal interesse materiais que formam agregados em solução aquosa. Esses sistemas podem mimetizar condições biológicas, apresentar diferentes compartimentos para a incorporação de substâncias, entre outras características interessantes. Incorporando determinados meros a esses sistemas, eles podem responder a estímulos externos, aumentando assim as possibilidades e a especificidade de sua aplicação (DU, 2014; ZHANG et al., 2012). Esses sistemas, muitas vezes chamados de inteligentes, podem responder ao pH e à temperatura, simultaneamente ou não (XIONG et al., 2011).

Ao decorrer desta tese, as três vertentes: síntese, caracterização e estudos de aplicação de polímeros planejados serão exploradas. As duas primeiras vertentes foram amplamente exploradas em contribuições originais do autor desta tese. A

primeira, publicada em 2008, sendo uma das primeiras publicações abordando a síntese de copolímeros via RAFT, no país, tratou da síntese e caracterização de um copolímero dibloco anfifílico de PMMA-*b*-DMAEMA, capaz de formar agregados em solução aquosa (DE SOUZA et al., 2011).

A mais recente publicação do autor desta tese envolveu a síntese, caracterização e estudos visando correlacionar a estrutura química dos meros que compõe as cadeias poliméricas, comportamento de agregação desses polímeros em solução aquosa, grau de protonação e conformação das cadeias poliméricas no *core* interno.

Atualmente, o autor da presente tese tem se dedicado ao desenvolvimento de polímeros para aplicações biológicas, principalmente para a entrega de genes e formação de vesículas poliméricas. Os resultados alcançados e os caminhos que levaram a eles serão, doravante, esmiuçados.

2. OBJETIVOS

Geral

- Sintetizar e caracterizar polímeros e testá-los para aplicações biológicas e biomiméticas selecionadas;

Específicos

- Sintetizar via RAFT e caracterizar uma gama de polímeros planejados para as seguintes aplicações: (i) montagem de polimerossomos e; (ii) entrega de genes;
- Testar os polímeros obtidos em cada uma das aplicações;
- Buscar correlações entre as características de estrutura, composição e morfologia e a eficiência dos polímeros em cada uma das aplicações;

3. MATERIAIS, INSTRUMENTOS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

DMAEMA, estireno e MMA foram obtidos de Sigma Aldrich; 1,1-azobis(ciclohexanocarbonitrila) (ACHN, 98%) e azobisisobutironitrila (AIBN, 98%), 2-Ciano-2-propil dodeciltritiocarbonato e ácido de 4-Ciano-4-[(dodecilsulfaniltiocarbonil)sulfanil] pentanóico, de Sigma Aldrich; De-HiBit-200 resina, para remoção dos inibidores de polimerização presentes nos monômeros, da Polysciences, Inc. A sonda CAT 1 (4-trimetilamonio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil Iodeto) da Fisher Scientific; Os solventes metanol, hexano, etanol, tetrahidrofurano (THF), acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), trietilamina (TEA), água deuterada (D₂O) e clorofórmio deuterado (DCI₃), todos de grau analítico, foram obtidos da Sigma Aldrich; O Peróxido de benzoíla (BPO) era da Vetec do Brasil; Os meios de cultura LB: *Luria Bertani* foram obtidos de Sigma Aldrich e Kasvi; tampão ácido 4-Morfolino Propano Sulfônico (MOPS), de Sigma-Aldrich; ácido bórico, HCl and NaOH da Merck. Plasmid Plus Maxi Kit, de Qiagen. Tampões: acetato, Tris-HCl e fosfato, da Sigma-Aldrich. Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-Gal) foram obtidos de Thermo Scientific. Todos os outros materiais utilizados foram de Sigma-Aldrich.

3.2 INSTRUMENTOS E MÉTODOS

3.2.1 Cromatografia de exclusão por tamanho ou permeação em gel (SEC/GPC)

A SEC/GPC foi usada para analisar as características moleculares dos polímeros e foi realizada em GPC Shimadzu Prominence Series equipado com auto injetor (Sil-20A) e pré-coluna Phenogel 5 μ linear/Mixed, duas colunas em série:

Phenogel 5 μ 10x10⁶ Å e 10x10⁴ Å (Phenomenex). O volume injetado das amostras foi de 10 μ L (10 mg/mL) e as análises foram realizadas a 35 °C. A detecção foi realizada usando detector de índice de refração diferencial (Shimadzu RID-10A). A fase móvel foi THF com trietilamina a 0,3% como eluente, com taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹. O sistema foi calibrado com padrões de polimetilmetacrilato (PMMA) (EasyCal, Sigma-Aldrich) (MW ~ 800–2,000,000 g/mol).

3.2.2 Espectroscopia de RMN de prótons

A confirmação estrutural, pureza e razões entre monômeros (n/m) dos copolímeros foram determinados por espectros de RMN de ¹H usando espectrômetros Bruker e Varian operando a 300 MHz (frequência ¹H). Os espectros foram registrados à temperatura ambiente em cloroformio deuterado (CDCl₃). Os sinais a 4,05 ppm (PDMAEMA, O-CH₂-), 3,6 ppm (3 H, O-CH₃, PMMA) e 6,29-7,29 ppm (sinais do aromático do bloco PS) foram utilizados para determinar a composição dos copolímeros.

3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

As análises de FTIR (em inglês: *fourier transform infrared spectroscopy*) foram feitas usando-se um espectrometro IR Prestige 21 (Shimadzu), disponível no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAR), na Escola de Engenharia de Lorena-SP (EEL-USP).

3.2.4 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico (Dh) por Espalhamento Dinâmico de Luz

As análises de Dh por DLS (sigla inglesa para *dynamic light scattering*) foram realizadas em um Zetasizer Nano 317 a 25 °C. Os tampões foram previamente filtrados através de Millipore Millex LCR (0,22 µm). Os dados do tamanho hidrodinâmico foram obtidos a partir de uma análise de distribuição de tamanho ponderada de massa e relatados como a média das medições em triplicata ± o desvio padrão (DP).

3.2.5 Análises de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A técnica de RPE é usada para estudar espécies químicas com elétrons não pareados. A espectroscopia RPE desempenha um papel importante na compreensão de radicais orgânicos e inorgânicos, complexos de metais de transição e algumas biomoléculas. Aqui, foi utilizada para avaliar a existência de compartimentos internos hidrofílicos dos polimerossomos. As análises foram realizadas em espectrômetro Bruker EMX-200 (Bruker, Alemanha) usando iodeto de trimetilamônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (CAT1) como sonda (RAUCKMAN; ROSEN; ABOU-DONIA, 1976).

3.2.6 Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão por Coloração Negativa

É uma técnica versátil em microscopia eletrônica de transmissão que pode ser empregada para a visualização da morfologia celular, tamanho e arquitetura de superfície em alta resolução. Foi realizada usando Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI Tecnai G20 200 Kv, disponível no Instituto de Ciências Biomédicas

(ICB) da Universidade de São Paulo (USP).

4. SÍNTESES DOS POLÍMEROS

Foram sintetizados homopolímeros e copolímeros por PRL e PRC na modalidade RAFT. Todas as sínteses foram realizadas em balão de três bocas, de fundo redondo, imerso em glicerina, sob aquecimento. O aquecimento se deu por chapa aquecedora com controle automatizado de temperatura. Todas as sínteses foram realizadas em atmosfera inerte (argônio) e agitação a 600 RPM. Os agentes iniciadores utilizados (ACHN ou AIBN) em todas as sínteses foram duplamente recristalizados em metanol antes de cada reação de polimerização. Em todas as sínteses, os agentes estabilizadores de reação, presentes nos monômeros, foram removidos usando resina D-HIBIT ou alumina (1 g para cada 7 mL de monômero), respectivamente. Foram retiradas alíquotas da mistura reacional de cada uma das reações, em diferentes tempos. As alíquotas foram analisadas por GPC imediatamente após as coletas, permitindo monitorar o crescimento e polidispersidade das cadeias, ao decorrer do tempo. Isso propiciou a obtenção de produtos poliméricos de acordo com o planejado, inclusive por permitir que a reação fosse encerrada quando a massa molar das cadeias se aproximasse do desejado.

4.1 SÍNTESES VIA POLIMERIZAÇÃO RADICALAR LIVRE (PRL)

Inicialmente, copolímeros com morfologia em distribuição aleatória foram sintetizados por PRL. Esses materiais foram testados (estudos piloto) como candidatos a transfecção de genes. Sendo as sínteses via PRL mais simples e

menos onerosas, foram escolhidas para a construção dos dois materiais a serem usados nos testes iniciais, cujos resultados poderiam subsidiar a construção, via RAFT, de copolímeros sob medida mais eficientes. A seguir, a metodologia para obtenção dos copolímeros via PRL.

4.1.1 Copolímeros com distribuição aleatória

Foram sintetizados dois copolímeros de poli(metacrilato de metila)-co-poli[metacrilato de 2-(dimetilamino) etila] via PRL. Na Tabela 1, a seguir, são apresentados os parâmetros de síntese.

Tabela 1 - Parâmetros de síntese dos copolímeros de PMMA-co-DMAEMA via PRL

| Material | MMA (mmol.L ⁻¹) | DMAEMA (mmol.L ⁻¹) | ACHN (mmol.L ⁻¹) | T (°C) ^a | Tempo de reação (min.) |
|---|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------|
| PMMA ₃ -co-DMAEMA ₂₆ | 46,7 | 118,69 | 1,18 | 90 °C | 35 |
| PMMA ₃₆ -co-DMAEMA ₈₄ | 74,8 | 0,1424 | 1,23 | 90 °C | 46 |

^a Temperatura média de síntese.

Para a síntese do primeiro material, foram adicionados em balão reacional: 5 mL de MMA e 20 mL de DMAEMA, dissolvidos em 15 mL de 1,4 dioxano, seguido da adição de 0,289 g de ACHN. A reação prosseguiu por 35 minutos a 80 °C.

Para a síntese do segundo copolímero, em um balão reacional, foram adicionados, 8 mL de MMA e 24 mL de DMAEMA, dissolvidos em 15 mL de 1,4 dioxano. Após, foram adicionados 0,3 g de ACHN. A reação prosseguiu por 46 minutos a 80 °C.

Os polímeros obtidos foram purificados por precipitações repetidas em hexano e secos por 2 dias a 40 °C.

4.2 SÍNTESES POR PDRR NA MODALIDADE RAFT

Para a construção de copolímeros em bloco via RAFT, inicialmente se faz necessária a síntese do homopolímero (macroCTA), cujas cadeias possuem um Agente de Transferência de Cadeia (CTA). Esse agente é, de fato, o principal responsável pela manutenção das cadeias como “vivas”, ou seja, capazes de propiciar o crescimento de outro bloco. Portanto, foram sintetizados diferentes homopolímeros (macrosCTA), que posteriormente foram usados como bloco de partida para a construção dos copolímeros. Descrição em pormenores da síntese dos macroCTAs, a seguir.

4.2.1 HOMOPOLÍMEROS

Poliestireno

Conforme descrito na Tabela 2, para a síntese do macroCTA de poliestireno foram adicionados a um balão de fundo redondo estireno (56 mL), ácido 4-ciano-4-dodecil-sulfanil-tiocarbonil-sulfonil-pentanóico, (0,302 g) usado como CTA, e AIBN (0,0246 g), dissolvidos em 25 mL de tolueno. A purificação foi realizada por precipitação repetida em metanol e o produto foi seco por 2 dias a 40 °C.

Tabela 2 - Parâmetros de síntese do homopolímero de PS via RAFT

| Material | Estireno (mol.L ⁻¹) | CTA (mmol.L ⁻¹) | AIBN (mmol.L ⁻¹) | CTA/AIBN ^a | T (°C) ^b | Tempo de reação (horas) |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------------|
| PSmacroCTA ₁₆₀ | 0,48 | 0,748 | 0,15 | 5 | 70 | 48 |

^aRazão molar; ^b Temperatura média de reação;

Poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]

Foram sintetizados dois homopolímeros de DMAEMA, conforme Tabela 3 e descrição a seguir.

PDMAEMAmacroCTA₄₁₁: 200 mL de DMAEMA foram adicionados a um balão reacional, seguidos da adição de 0,44 g de 2-ciano-2-propil-dodecil-tritiocarbonato e 0,076 g de ACHN. A purificação do polímero se deu por precipitações repetidas em hexano e o produto foi seco por 2 dias a 40 °C.

PDMAEMAmacroCTA₃₁₅: 100 mL de monômero DMAEMA foram adicionados a um balão de fundo redondo, seguidos da adição de 0,2154 g de 2-ciano-2-propil-dodecil-tritiocarbonato e 0,038 g de ACHN. O polímero foi purificado por precipitações repetidas em hexano e seco por 2 dias a 40 °C

Tabela 3 - Parâmetros de síntese dos homopolímeros de PDMAEMA via RAFT

| Material | DMAEMA (mol.L⁻¹) | CTA (mmol.L⁻¹) | ACHN (mmol.L⁻¹) | [CTA/I]^a | T (°C)^b | Tempo (horas) |
|--------------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| PDMAEMAmacroCTA ₄₁₁ | 1,18 | 1,24 | 0,311 | 4 | 85 | 20 |
| PDMAEMAmacroCTA ₃₁₅ | 0,59 | 0,623 | 0,155 | 4 | 85 | 5 |

^a Razão molar; ^b Temperatura média de reação;

Poli(metacrilato de Metila)

Foram sintetizados 4 (quatro) homopolímeros (macroCTAs) de PMMA. Todos os polímeros foram purificados por repetidas precipitações em metanol e secos por 2 dias a 40 °C. As reações foram monitoradas por GPC. Detalhes sobre as sínteses se encontram descritos a seguir e na Tabela 4.

PMMA₆₀macroCTA₆₀: Em um balão reacional contendo 10 mL de 1,4 dioxano, foram adicionados 20 mL de MMA, 0,45 g de 2-ciano-2-propil-dodecil-tritiocarbonato e 0,0355 g de AIBN.

PMMA₅₈macroCTA₅₈: Em um balão reacional contendo 20 mL de 1,4 dioxano, foram adicionados: 30mL de MMA, 0,26g de ácido 2-ciano-2-propil-dodecil-tritiocarbonato e 0,0187 g de AIBN.

PMMA₁₄₁macroCTA₁₄₁: O polímero foi sintetizado utilizando 30 mL de MMA, 0,26g de ácido 2-ciano-2-propil-dodecil-tritiocarbonato e 0,01 9 g de AIBN, dissolvidos em 10 mL de 1,4 dioxano.

PMMA₂₁₅macroCTA₂₁₅: A síntese foi realizada usando se 50 mL de MMA, 0,216g de ácido 2-ciano-2-propil-dodecil-tritiocarbonato e 0,021g de AIBN, dissolvidos em 40 mL de 1,4 dioxano.

Tabela 4 - Parâmetros de síntese de homopolímeros de PMMA via RAFT

| Material | MMA (mol.L ⁻¹) | CTA (mmol.L ⁻¹) | I (mmol.L ⁻¹) | CTA/I ^a | T (°C) ^b | Tempo (horas) |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| PMMA ₆₀ | 0,19 | 1,30 | 0,21 | 6 | 70 | 5 |
| PMMA ₅₈ | 0,28 | 0,58 | 0,11 | 6 | 70 | 2,5 |
| PMMA ₁₄₁ | 0,28 | 0,58 | 0,11 | 6 | 70 | 2,5 |
| PMMA ₂₁₅ | 0,47 | 0,62 | 0,13 | 5 | 60 | 4,5 |

^aRazão molar; ^b Temperatura média de reação;

4.2.2 COPOLÍMEROS

Utilizando os homopolímeros sintetizados via RAFT foram construídos

copolímeros anfifílicos, dibloco, de variados tamanhos e com diferentes proporções monoméricas (MMA ou estireno, como representante hidrofóbico e DMAEMA, como hidrofílico). A seguir, descrição de cada uma das sínteses.

Poliestireno-*b*-[metacrilato de 2-(dimetilamino)etila]

O poliestireno (PSmacroCTA₁₆₀) foi utilizado como bloco de partida para a síntese de 2 (dois) copolímeros dibloco, anfifílicos de PS-*b*-DMAEMA.

PS₁₆₀-*b*-DMAEMA₆₀: 8 g de PSmacroCTA₁₆₀ foram solubilizadas em 15 mL de tolueno. Posteriormente, foram adicionados 8,8 mL de DMAEMA e 13,6 mg de AIBN. O copolímero foi purificado por precipitação em metanol e seco por 24 horas a 40 °C.

PS₁₆₀-*b*-DMAEMA₃₂: 8 g de PSmacroCTA₁₆₀ foram solubilizadas em 30 mL de tolueno, seguido da adição de 8,9 mL de DMAEMA e 9,6 mg de AIBN. A purificação se deu conforme descrito anteriormente. Outros parâmetros das sínteses se encontram na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de síntese de copolímeros de PS-*b*-DMAEMA via RAFT

| | PSmacroCTA (mol.L ⁻¹) | DMAEMA (mol.L ⁻¹) | CTA/I ^a | AIBN (mmol.L ⁻¹) | T (°C) ^b | Tempo (horas) |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------|------------------|
| PS ₁₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₆₀ | 0,077 | 0,052 | 5 | 0,082 | 70 | 12 |
| PS ₁₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₃₂ | 0,077 | 0,057 | 7 | 0,059 | 60 | 48 |

^a Razão molar; ^b Temperatura média de reação;

Poli [2-(dimetilamino)etil metacrilato]-*b*-poliestireno

Dois copolímeros dibloco, anfipáticos, foram sintetizados via RAFT, em uma única reação. Para isso, o homopolímero de PDMAEMAmacroCTA₃₁₅ foi usado como bloco de partida.

O alongamento dos blocos PS foi realizado usando o iniciador AIBN. A amostragem que originou o primeiro material foi retirada do balão reacional após 45 horas de reação. A segunda amostragem (restante da mistura reacional que ficou no balão) originou o segundo material, depois de decorrido o tempo de 69 horas. As duas misturas reacionais foram submetidas, separadamente, ao processo de purificação por precipitação repetida em hexano, originando 2 (dois) copolímeros que foram secos por 2 dias a 40°C. A **Tabela 6**, a seguir, apresenta os parâmetros de síntese.

Tabela 6 - Parâmetros de síntese dos copolímeros de PDMAEMA-*b*-PS via RAFT

| | PDMAEMAmacroCTA (mol.L ⁻¹) ^b | Estireno (mol.L ⁻¹) | T (°C) | CTA/I ^a | AIBN (mmol.L ⁻¹) | Tempo (horas) |
|--|--|------------------------------------|--------|--------------------|---------------------------------|------------------|
| PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₂₄₄ | 0,127 | 1,40 | 55 | 0,364 | 0,19 | 45 |
| PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₇₈₁ | 0,100 | 1,23 | 65 | 0,242 | 1,21 | 69 |

^aRazão molar; ^bAproximado, considerando a massa de PDMAEMAmacroCTA existente em cada mistura reacional;

Poli (metacrilato de metila)-*b*-[metacrilato de 2-(dimetilamino)etila]

Usando-se os homopolímeros macroCTAs de PMMA, foram sintetizados quatro copolímeros dibloco anfifílicos de PMMA-*b*-PDMAEMA.

Para as sínteses dos materiais foram adicionados, em balão de fundo redondo, quantidades distintas (vide Tabela 7) de cada um dos homopolímeros de PMMAmacroCTA, anteriormente preparados, DMAEMA monômero livre de estabilizador e o iniciador radicalar AIBN. Os reagentes foram dissolvidos em 30 mL de 1,4 dioxano. As reações prosseguiram por tempos pré-determinados, em temperatura de 70°C.

Foram retiradas alíquotas de cada uma das misturas reacionais, durante as sínteses, para monitoração das reações, por GPC. Ao final da reação, os produtos purificados foram obtidos mediante precipitações repetidas em hexano e, após, foram secos em estufa a 40 °C por 72 horas. Os parâmetros de síntese dos blocos de PDMAEMA encontram-se sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros de síntese dos copolímeros de PMMA-*b*-DMAEMA via RAFT

| Material | PMMAmacroCTA (mol.L ⁻¹) | DMAEMA (mol.L ⁻¹) | CTA/I ^a | AIBN (mmol.L ⁻¹) | Tempo (horas) |
|---|--|----------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------------|
| (1) PMMA ₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₂₄ | 0,03 | 0,116 | 7 | 0,045 | 4 |
| (2) PMMA ₁₄₁ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₁₉ | 0,01 | 0,03 | 7 | 0,012 | 2 |
| (3) PMMA ₅₂ - <i>b</i> -DMAEMA ₂₉₄ | 0,003 | 0,038 | 6 | 0,010 | 3 |
| (4) PMMA ₂₁₅ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₃₅ | 0,199 | 0,157 | 7 | 0,130 | 4 |

^a Razão molar; Os números 1 a 4 se referem a diferentes homopolímeros de PMMA usados.

Copolímeros aleatórios de PMMA-co-PDMAEMA

A obtenção dos dois copolímeros de PMMA-co-DMAEMA, foi realizada em única síntese, em duas etapas (Tabela 8). Para isso, foram adicionadas, em balão reacional, 20 mL de MMA, 75 mL DMAEMA, 1,314 g de 2-ciano-2-propil-dodecil-tritiocarbonato, 0,104 g de AIBN, dissolvido em 15 mL de 1,4 dioxano. A reação

prosseguiu a 70 °C. Decorridos 120 minutos de reação, foram retirados 40 mL (1º produto reacional) e, após 180 minutos de reação, o 2º produto reacional. Ambos os produtos foram purificados por precipitações repetidas em hexano e secos em estufa a 40°C por 4 dias.

Tabela 8 - Parâmetros de síntese dos copolímeros de PMMA-co-DMAEMA via RAFT

| Material | MMA (mol.L ⁻¹) | DMAEMA (mol.L ⁻¹) | CTA (mmol.L ⁻¹) | AIBN (mol.L ⁻¹) | Tempo de reação (horas) |
|---|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| PMMA ₃₀ -co-DMAEMA ₆₃ | 0,186 | 0,444 | 3,8 | 0,633 | 2 |
| PMMA ₃₁ -co-DMAEMA ₇₀ | 0,186 | 0,444 | 3,8 | 0,633 | 3 |

5. CARACTERIZAÇÕES DOS POLÍMEROS OBTIDOS

Todos os polímeros obtidos foram analisados por GPC e espectroscopia de FTIR e RMN de ¹H. Os dados de GPC foram utilizados para a obtenção de informações sobre massa molecular numérica (M_n), massa molecular ponderada (M_w) e polidispersidade (PDI= M_w/M_n). As análises FTIR visaram à confirmação estrutural e pureza dos materiais obtidos. Análises de RMN de ¹H foram úteis para calcular a composição relativa dos meros nas cadeias, além da confirmação estrutural e avaliação de pureza dos polímeros.

6. ESTUDO DAS APLICAÇÕES BIOMOLECULARES E BIOMIMÉTICAS: TÉCNICAS E PROCEDIMENTOS

Os materiais foram analisados quanto à potencialidade de formar polimerossomos e entregar genes. Alguns desses polímeros foram cedidos, em

regime de colaboração, ao aluno de doutorado Klaus Engelmann, do departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), orientado pela profa. Dra. Katia R. Perez. Esses polímeros foram testados quanto à capacidade de incorporar fármacos e, obviamente, não estão descritos no presente trabalho. A Tabela 9 (sessão *resultados*) detalha cada um dos polímeros sintetizados e suas respectivas aplicações.

6.1 APLICAÇÕES DE COPOLÍMEROS PARA A FORMAÇÃO DE POLIMEROSSOMOS

Dois copolímeros de PDMAEMA-*b*-PS, construídos via técnica RAFT foram submetidos aos ensaios para a formação de polimerossomos, conforme a seguir:

Montagem dos polimerossomos em solução aquosa e caracterização

Os dois copolímeros de PDMAEMA₃₁₅-*b*-Psty₂₄₄ e PDMAEMA₃₁₅-*b*-Psty₇₈₁ foram dissolvidos em tetrahydrofurano (THF) para uma concentração final de 40 mg mL⁻¹. Posteriormente, em frasco contendo 2 mL de tampão TRIS-HCl 10 mM (pH 7,4) sob agitação a 1000 rpm, em temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de cada solução orgânica para a montagem dos polimerossomos na concentração final de 1 mg.mL⁻¹.

O diâmetro hidrodinâmico (Dh) e potencial zeta dos polimerossomos foram obtidos por meio de análises de DLS. As análises foram realizadas em diferentes pHs e tampões, em função da temperatura, que variou de 25 a 80 °C.

A fim de verificar se os polimerossomos formados possuíam compartimento interno hidrofílico, foram realizados estudos de incorporação de sonda hidrossolúvel, por estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). A sonda selecionada para esses estudos foi a CAT1 (iodeto de 4-trimetilamônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila) (RAUCKMAN; ROSEN; ABOU-DONIA, 1976). Os polimerossomos foram preparados da mesma forma como descrito em métodos, para uma concentração final de $13,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ e $6,9 \text{ mmol.L}^{-1}$ de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ (ambos 1 mg/mL numa solução aquosa contendo $3,75 \text{ mM}$ sonda de spin CTA1 in tampão TRIS-HCl 10 mmol.L^{-1} , pH 7,4).

O sinal RPE de $170 \text{ }\mu\text{L}$ da amostra colocada em células de quartzo (Wilmad, USA) foi medido antes e após a adição de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de ácido ascórbico $0,04 \text{ M}$, que suprime o sinal da sonda CAT1, por uma reação de oxido-redução. A relação entre o sinal antes (sinal total) e após a supressão (sinal residual) foi ajustada pela diluição e usada para calcular a porcentagem de sonda encapsulada e o volume interno total do compartimento aquoso dentro dos polimerossomos pela equação 1.

$$\% \text{ Encapsulado} = 100 * \text{Sinal residual} / \text{Total de Sinal} = 100 * \text{volume interno} / 170 \text{ }\mu\text{L}$$

Equação 1: Cálculo da porcentagem de sonda encapsulada (%Encapsulado)

O percentual final de encapsulação e volume interno aquoso dos polímeros foi analisado em função da concentração final de polímero na amostra. Controles para testar a reação de supressão do sinal consistiram de solução de CAT1 em tampão sem polímeros em que ácido ascórbico foi adicionado na mesma proporção da amostra contendo os polimerossomos.

Microscopia Eletrônica de Transmissão por coloração negativa

Amostras contendo os polimerossomos foram submetidas também a análises por Microscopia Eletrônica de Transmissão por *coloração negativa* (do inglês: MET - Negative staining transmission electron microscopy), visando obter informações sobre sua forma e tamanho em meio aquoso. Para isso, os polimerossomos foram preparados conforme procedimento descrito anteriormente (vide *montagem dos polimerossomos* na sessão métodos), em tampão TRIS-HCl 10 mM (pH 7,4). Inicialmente, *grids* (400 mesh) de uma película de camada fina de carbono (Electron Microscopy Sciences) foram descarregados de forma negativa por 15 segundos a uma corrente de plasma de 14 mA. Em seguida, os *grids* foram adicionados ao topo de uma gota de 20 μL de solução tampão contendo os polimerossomos na concentração de 2,5 mg mL^{-1} por 2 minutos, seguido de duas lavagens com água. Os *grids* contendo as amostras foram colocadas no topo de uma gota de acetato de uranila a 2% durante 2 minutos, seguida de secagem utilizando papel de filtro e após, secagem a temperatura ambiente. A visualização das imagens foram realizadas por meio do programa ImageJ.

6.2 APLICAÇÕES DE COPOLIMEROS PARA A TRANSFEÇÃO DE GENES EM BACTÉRIAS

Não há descrição na literatura de um vetor sintético capaz de entregar genes para transformação de bactérias *não-competentes*. Esse foi um dos propósitos desse trabalho, principalmente pelos motivos discutidos na sessão anterior (página 31 a 33). Por comodidade, o modelo de organismo escolhido foi *Escherichia coli*

(*E. coli*), da linhagem DH5 α (DAY; MAURELLI, 2002).

O meio de crescimento das bactérias usadas nos experimentos foi o caldo LB contendo, por litro: 10 g de Difco triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g NaCl, pH 7,0. As culturas foram realizadas a 37 °C com agitação (400 r.p.m.). O crescimento foi monitorizado por meio da medição de densidade óptica (D.O) em 630 nm com um espectrofotômetro (Labsystems). O modelo de plasmídeo utilizado foi o pUC19 (vide Figura 5), pelo reduzido tamanho e simplicidade de trabalho (SCHWEIZER, 1991). Além disso, esse vetor possui gene de LacZ e Amp^r, que facilitam sobremaneira os trabalhos em biologia molecular. Mais detalhes sobre isso serão apresentados a diante.

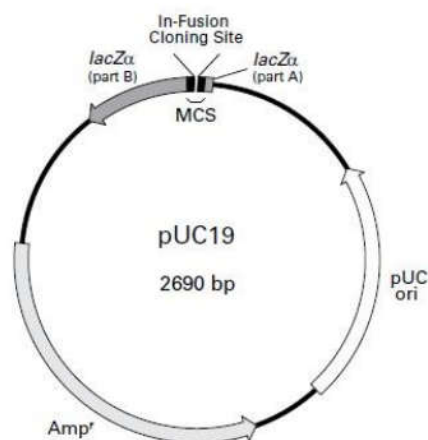


Figura 5. Mapa do vetor pUC 19. Adaptado de (NORRANDER; KEMPE; MESSING, 1983)

Para a realização dos experimentos, foram realizados os seguintes procedimentos:

Produção e purificação dos plasmídeos (pUC19).

Clonagem e obtenção

Esse modelo de plasmídeo possui tamanho relativamente pequeno (2686 pb), induz expressão de elevado número de cópias, comparado aos demais disponíveis. O pUC19 codifica para a expressão de beta-lactamases, que conferem resistência a ampicilina, sendo isso interessante para a seleção dos microrganismos (SCHWEIZER, 1991; SZOSTKOVÁ; HORÁKOVÁ, 1998).

Além disso, o pUC19 é um dos vetores mais amplamente utilizados, uma vez que os recombinantes, ou as células nas quais o DNA estranho foi introduzido, podem ser facilmente distinguidos dos não recombinantes com base nas diferenças de cor das colônias no meio de crescimento. O mecanismo para essa ocorrência reside no fato do fragmento lacZ, cuja síntese pode ser induzida por IPTG, ser capaz de complementação intra-alélica com uma forma defeituosa da enzima β -galactosidase codificada pelo cromossomo hospedeiro (mutação lacZDM15 nas cepas *E. coli* JM109, DH5 α e XL1-Blue). Na presença de IPTG em meio de crescimento, as bactérias sintetizam ambos os fragmentos da enzima. Os fragmentos podem juntos catalisar a hidrólise do X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo) produzindo produtos que dão as colônias cor azul quando cultivados em meios onde são suplementados. Isso facilita a identificação das bactérias transformadas, minimizando a consideração de possíveis contaminantes. Portanto, as bactérias devem crescer em meio contendo ampicilina, IPTG e X-gal (ZHANG, 2016). Os plasmídeos foram amplificados por meio da técnica de *Transformação Bacteriana*, descrita a seguir:

Transformação bacteriana para produção de DNA (pUC19)

Inicialmente, seguindo protocolo padronizado, o vetor plasmideal pUC19 foi inserido em células eletrocompetentes (linhagem DH5 α de *Escherichia coli*) (CHAN; DAVIS; JOKIC, 2006). Para isso, 1 μ L (50 ng) do vetor pUC19 foi misturado com 50 μ L de DH5 α competentes e mantidas em gelo por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a mistura foi submetida a choque térmico (42° C por 45 segundos) e novamente colocada em gelo por 1 minuto (BERGMANS; VAN DIE; HOEKSTRA, 1981). Em seguida, foram adicionados 750 μ L de meio LB líquido estéril e as bactérias foram crescidas em estufa a 37 °C por 1 hora. Depois disso as células foram centrifugadas a 120.000 gs por 5 minutos. O sobrenadante (750 μ L de meio LB) foi descartado e o volume restante foi suspenso e plaqueado em placas de Petri com LB ágar, contendo 100 μ g/mL de ampicilina, 1mM de IPTG e 1 μ M de X-GAL. As bactérias foram crescidas (overnight) por 12 horas em estufa a 37°C.

Seleção das células bacterianas e pré-inóculo

Decorridas 12 horas, as colônias de coloração azulada foram selecionadas com auxílio de ponteira estéril (técnica conhecida em inglês por: *blue-white screening test*) e incubadas com 5 mL de meio LB líquido sob agitação de 230 RPM e 37° C por 1 hora, para crescimento.

Crescimento das bactérias e produção de pUC19

As células foram vertidas em 1 L de meio LB líquido, que foi mantido sob

agitação a 230 RPM, sob 37 °C por 12 horas (overnight). Posteriormente, todo o conteúdo foi centrifugado e o *pellet* obtido foi submetido ao processo de purificação, para extração do DNA plasmideal, conforme protocolo padronizado usando-se *QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit* (QIAGEN, 2012; QIAGEN; QIAGEN, 2005; ZHANG; CAHALAN, 2007).

Preparação de complexos de polímero/plasmídeo (PDMAEMA/DNA) e avaliação da interação.

Polímeros selecionados (*Experimento 1*: PMMA_{macroCTA}₆₀, PDMAEMAmacroCTA₃₁₅, PMMA_{3-co-PDMAEMA}₂₆ e PMMA_{31-co-PDMAEMA}₇₀ e *experimento 2*: PSmacroCTA₆₀, PDMAEMAmacroCTA₃₁₅, PDMAEMA_{315-b-PS}₂₄₄ e PDMAEMA_{315-b-PS}₇₈₁) foram submetidos a estudos visando avaliar o nível de interação com DNA, por meio da avaliação de migração diferencial em gel de agarose. Detalhes dos experimentos a seguir:

Preparo das soluções estoque de polímeros: Os polímeros foram solubilizados em THF (concentração final de 1 mg/mL) e mantidos sob agitação, por 12 horas, para completa solubilização.

Preparo dos complexos polímero/DNA: Alíquotas de 30, 50 e 100 µL das soluções estoque dos polímeros (concentração de 1 mg/mL em THF, preparadas conforme descrito anteriormente) foram adicionadas em tubos plásticos (Eppendorf). Posteriormente, o solvente (THF) foi evaporado sob fluxo de argônio para a formação de filmes, sendo posteriormente hidratados com adição de 18 µL de

solução aquosa de DNA (pUC19, em concentração de 78 ng/ μ L), sendo submetidos a agitação por 10 segundos e sem seguida, mantidos em gelo, por 5 minutos. Uma alíquota de 6 μ L de DNA *loading buffer* (Purple 6x) (Biolabs, Inc.) foi adicionada em cada tubo e este foi submetido agitação em sistema vortex. Todas as amostras foram preparadas em gelo para preservar o DNA de degradação. As eletroforeses foram realizadas em corridas com tampão TAE usando 50 volts. Os polímeros também foram avaliados quanto à capacidade de entregar DNA, cujos experimentos serão descritos a seguir.

Transformação de *E. coli* com poliplexos de polímero/pDNA

A transfecção permite introduzir um plasmídeo na célula bacteriana. Este DNA exógeno passa a fazer parte do material genético bacteriano, que será herdado pelas novas células à medida que a bactéria se multiplica. Esse processo tem sido realizado usando-se as tradicionais técnicas de transformação bacteriana (MIKLAVCIC, 2017; RAHIMZADEH et al., 2016).

Preparo dos poliplexos de polímero/pDNA: A fim de verificar a influencia da quantidade de polímero na eficiência de transformação das bactérias, diferentes alíquotas (0.25, 0.5, 1.0 e 5.0 μ L) de cada polímero de uma solução estoque a 1 mg/mL em THF, foram adicionadas em microtubos plásticos (Eppendorf), seguido da evaporação do solvente sob fluxo de argônio para a formação de filmes. Uma alíquota de 10 μ L de solução de DNA (PUC19) em água (78,7 μ g/mL) foi adicionada em cada microtubo para hidratação dos filmes poliméricos, seguido por vigorosa agitação em vortex por 1 minuto, resultando em razão de polímero/plasmídeo de $25 \cdot 10^{-2}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-1}$ e $5 \cdot 10^{-1}$ (v/v). Posteriormente, essas amostras foram

mantidas em estufa a 37° C por 5 minutos.

Preparo das bactérias não competentes: *E. coli* DH5 α foram cultivadas em 100 mL of LB (Sigma) sem antibiótico até a densidade óptica de 0.7 ($\lambda = 600$ nm). Após, as células foram recuperadas via centrifugação (3,300 rpm), suspensas em 500 μ L of 10 mM de tampão 3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico (MOPS), pH 6.8, e reservadas em gelo.

Transformação das bactérias: Após a etapa de complexação, acima descrita, um volume de 700 μ L de meio LB líquido foi adicionado aos tubos contendo polímero e DNA, seguido da adição de 100 μ L de células de *E.coli*, preparadas conforme mencionado anteriormente. Os microtubos foram, posteriormente, submetidos à agitação por 1 minuto em vortex e incubado a 37 °C por 1 hora. Decorrido esse tempo, as células bacterianas incubadas com cada polímero e pUC19 foram vertidas em placas apropriadas contendo meio LB-ágar preparado com 100 μ g/mL de ampicilina, 1 μ M de X-Gal, 1 mM de IPTG e incubadas a 37 °C por até 36 horas. A eficiência dos polímeros como agentes de transfecção do DNA foi avaliada por meio de contagem das colônias formadas. Foram consideradas colônias bacterianas transfectadas apenas as colônias de coloração azul, pelo método conhecido, na língua inglesa por: *blue-white colony screening* (SHERWOOD, 2003). Após, a fim de excluir resultados *falso positivo*, as colônias transformadas foram novamente crescidas, após processo de *repique*, em outras placas contendo meio LB-ágar preparado com 100 μ g/mL de ampicilina, 1 μ M de X-Gal, 1 mM de IPTG.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos com sucesso 19 polímeros, de variada composição e morfologia. Destes, 17 foram sintetizados via PDRR (RAFT). O monitoramento das reações por GPC facilitou sobremaneira para que se conseguisse obter polímeros estritamente de acordo com o planejado.

Espectros de RMN de ^1H e de FTIR confirmaram a pureza, estrutura, composição e morfologia dos polímeros construídos. Para facilitar a leitura e compreensão dos resultados, eles foram organizados na sessão **material complementar**. As integrais de sinais de ^1H -RMN em 4,05 (O-CH₂-) de DMAEMA, 3,60 ppm (O-CH₃) de MMA e os prótons referentes ao anel aromático de PS (6 a 8 ppm), foram utilizadas para determinar a composição de copolímeros. Atribuições dos deslocamentos químicos (RMN de ^1H) e frequências de absorção característicos (FTIR) foram consultadas na literatura (DE SOUZA et al., 2011; KAEDING, 1974; LIAN et al., 2012; MA; XIAO; WANG, 2013; SARAIVA et al., 2019; SHEN, 2012; XIONG et al., 2004; ZHU; TAN; DU, 2008).

A combinação da massa molar total de GPC e as composições definidas por RMN de ^1H permitiram estabelecer a fórmula média dos copolímeros como $P(\text{mero } A)_m\text{-co-}P(\text{mero } B)_n$. As razões monoméricas nos diferentes copolímeros (razões m e n) foram calculadas a partir das razões das áreas relativas dos sinais de ^1H RMN correspondente aos prótons do grupo metileno da cadeia lateral do éster de DMAEMA e do grupo metil ligado ao éster de MMA ou aos prótons do anel aromático de estireno, usando a Equação 2, para copolímeros de DMAEMA e MMA:

$$n_{(\text{PDMAEMA})} / m_{(\text{PMMA})} = (A_d * 3) / (A_c * 2)$$

Equação 2

onde A_d se refere à área sob o sinal dos hidrogênios referentes ao grupo metileno do PDMAEMA. A_c é a área sob o sinal devido aos hidrogênios do grupo metila do PMMA. Os coeficientes 2 e 3 normalizaram as áreas em relação ao número de hidrogênios dos grupos metileno e metila, respectivamente, e n é o número de unidades de DMAEMA e m de MMA, cuja estrutura química geral é apresentada na figura 6:

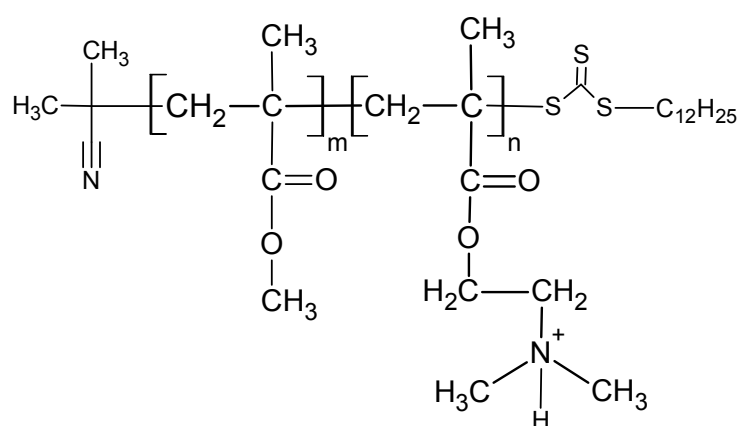


Figura 6. Estrutura química geral dos copolímeros contendo MMA e DMAEMA. Os índices m e n variam para cada copolímero. Nas terminações das cadeias se encontram presentes os Agentes de Transferência de Cadeia (ver Métodos).

A massa total do polímero (M_n), é dada pela composição relativa dos dois monômeros, como descrito na equação 3.

$$M_n = n * (\text{PDMAEMA}) + m * (\text{PMMA})$$

Equação 3

Enquanto (*PDMAEMA*) e (*PMMA*) são as massas dos monômeros (ex. 157,21 g.mol⁻¹ e 100,1 g.mol⁻¹, respectivamente), M_n foi obtida por análises de GPC.

Para os copolímeros contendo PDMAEMA e poliestireno, foi usada a equação 4.

$$n_{(\text{PDMAEMA})} / m_{(\text{PS})} = (A_d * 5) / (A_c * 2) \quad \text{Equação 4}$$

onde A_d se refere à área sob o sinal do grupo metileno DMAEMA. A_c é a área sob o sinal devido aos prótons dos anéis aromáticos de PS. Os coeficientes 5 e 2 normalizaram as áreas em relação ao número de hidrogênios dos grupos metileno e aromáticos, respectivamente, e n é o número de unidades de DMAEMA e m de estireno, cuja estrutura química geral é apresentada na figura 7, a seguir:

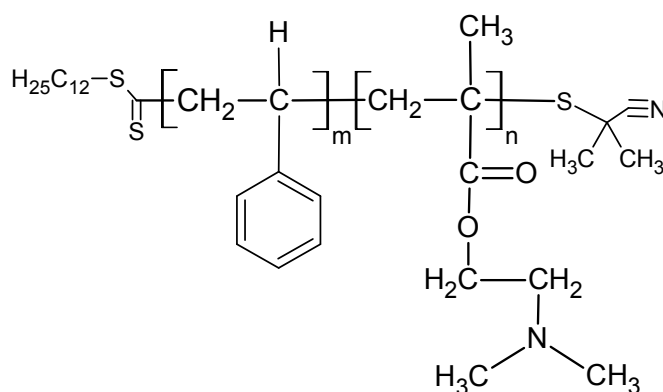


Figura 7. Estrutura química geral dos copolímeros contendo estireno e DMAEMA. Os índices m e n variam para cada copolímero. Nas terminações das cadeias se encontram presentes os Agentes de Transferência de Cadeia (ver Métodos).

A massa total do polímero, M_n , é dada pela composição relativa dos dois monômeros, conforme descrito na Equação 5:

$$M_n = n * (\text{PDMAEMA}) + m * (\text{PS}) \quad \text{Equação 5}$$

em que (PDMAEMA) e (PS) são as massas molares dos monômeros, isto é, 157,2 e 104,15 respectivamente. M_n foi obtido por análise de GPC.

Por conveniência, os dados de GPC, RMN de ^1H e FTIR foram organizados em tabelas ao longo do texto. Os cromatogramas estão apresentados nas respectivas sessões que tratam de cada polímero.

A Tabela 9, a seguir, apresenta um compêndio dos parâmetros moleculares

de todos os polímeros sintetizados.

Tabela 9. Parâmetros moleculares dos polímeros sintetizados

| Material | Tipo de resposta | Aplicabilidade | M_n [g.mol ⁻¹] ^a | M_w/M_n ^a | Razão de co-monômeros ^a |
|---|------------------|---|---|------------------------|------------------------------------|
| Copolímeros em distribuição aleatória via PRL | | | | | |
| PMMA ₃ -co-DMAEMA ₂₆ | pH e temperatura | Entrega de genes e purificação de proteínas | 4.450 | 1,96 | 8:1 |
| PMMA ₃₆ -co-DMAEMA ₈₄ | pH e temperatura | Entrega de genes e purificação de proteínas | 16.800 | 1,51 | 2:1 |
| Homopolímeros (macroCTAs) via RAFT | | | | | |
| PDMAEMA ₃₁₅ | pH e temperatura | Entrega de genes | 54.680 | 1,65 | - |
| PDMAEMA ₄₁₁ | pH e temperatura | Entrega de genes | 71.500 | 1,55 | - |
| PMMA ₅₂ | Não | - | 5.820 | 1,25 | - |
| PMMA ₆₀ | Não | - | 12.400 | 1,32 | - |
| PMMA ₁₄₁ | Não | - | 14.100 | 1,14 | - |
| PMMA ₂₁₅ | Não | - | 21.480 | 1,46 | - |
| PS ₁₆₀ | Não | - | 22.130 | 1,27 | - |
| Copolímeros em distribuição aleatória via RAFT | | | | | |
| PMMA ₃₀ -co-DMAEMA ₆₃ | pH e temperatura | Entrega de genes e purificação de proteínas | 12.800 | 1,33 | 1:2 |
| PMMA ₃₁ -co-DMAEMA ₇₀ | pH e temperatura | Entrega de genes e purificação de proteínas | 14.000 | 1,44 | 1:2 |
| Copolímero dibloco via RAFT | | | | | |
| PMMA ₅₂ -b-DMAEMA ₂₉₄ | pH e temperatura | Entrega de genes e purificação de proteínas | 46.600 | 1,24 | 1:5 |
| PMMA ₆₀ -b-DMAEMA ₁₂₄ | pH e temperatura | Entrega de genes e purificação de proteínas | 36.350 | 1,36 | 1:2 |
| PMMA ₁₄₁ -b-DMAEMA ₁₁₉ | pH e temperatura | Entrega de genes e purificação de proteínas | 21.400 | 1,21 | 1:1 |
| PMMA ₂₁₅ -b-DMAEMA ₁₃₅ | pH e temperatura | Entrega de genes e purificação de proteínas | 28.700 | 1,48 | 2:1 |
| PDMAEMA ₃₁₅ -b-PS ₂₄₄ | pH e temperatura | Entrega de genes e polimerossomos | 74.840 | 1,56 | 1:1 |
| PDMAEMA ₃₁₅ -b-PS ₇₈₁ | pH e temperatura | Entrega de genes e polimerossomos | 144.820 | 1,49 | 3:1 |
| PS ₁₆₀ -b-DMAEMA ₆₀ | pH e temperatura | polimerossomos | 26.070 | 1,13 | 3:1 |
| PS ₁₆₀ -b-DMAEMA ₃₂ | pH e temperatura | polimerossomos | 22.170 | 1,25 | 5:1 |

^a Valores de M_n aproximados, obtidos por GPC;

A seguir serão apresentados os resultados relacionados à síntese e caracterização dos polímeros obtidos.

7.1 SÍNTESES POR POLIMERIZAÇÃO RADICALAR LIVRE

Copolímeros em distribuição aleatória de PMMA-co-DMAEMA

Foram obtidos com sucesso dois copolímeros: PMMA₃-co-DMAEMA₂₆ e PMMA₃₆-co-DMAEMA₈₄. Os valores de polidispersidade (M_w/M_n) se encontraram ligeiramente mais baixos do que comumente observado para sínteses via PRL. A Tabela 11 apresenta os parâmetros moleculares obtidos via GPC.

Tabela 11. Parâmetros moleculares dos copolímeros em distribuição aleatória sintetizados via PRL

| Material | Tempo de eluição (min.) | M_w^a | M_n [g.mol ⁻¹] ^a | M_w/M_n^a |
|---|-------------------------|---------|---|-------------|
| PMMA ₃ -co-DMAEMA ₂₆ | 26,44 | 8.770 | 4.450 | 1,96 |
| PMMA ₃₆ -co-DMAEMA ₈₄ | 24,54 | 25.500 | 16.800 | 1,51 |

^a Valores de M_n aproximados, obtidos por GPC;

As Tabelas 12 e 13 apresentam, respectivamente, as bandas de FTIR e os deslocamentos químicos dos prótons presentes nas estruturas dos meros que compõem cada material, que são condizentes com copolímeros de elevada pureza constituídos de MMA e DMAEMA. (DE SOUZA; NAVES; FLORENZANO, 2012; DE SOUZA et al., 2011). Por comodidade, a caracterização detalhada será descrita em detalhes para cada polímero, ao decorrer desta tese.

Tabela 12. Bandas de FTIR dos copolímeros sintetizados

| Estrutura | Números de onda (cm ⁻¹) dos grupos funcionais característicos | | | |
|---|---|---------------------------------------|-------------|-------|
| | (C-H) | (C-H ₂ /C-H ₃) | (C=O / C-O) | (C-C) |
| PMMA ₃ -co-DMAEMA ₂₆ | 2826 e 2773 | 2951 | 1728 | 1030 |
| PMMA ₃₆ -co-DMAEMA ₈₄ | 2822 e 2770 | 2948 | 1722 | 1015 |

* Os símbolos (-) e (=) representam, respectivamente, ligações simples e duplas.

Tabela 13. Deslocamentos químicos por RMN de ¹H de copolímeros sintetizados

| Estrutura | Deslocamentos químicos (δ) característicos (ppm) | | | | |
|---|--|------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| | CCH ₃ | OCH ₃ | OCH ₂ | NCH ₂ | NCH ₃ (dimetil) |
| PMMA ₃ -co-DMAEMA ₂₆ | 0,85 | 3,58 | 4,14 | 2,54 | 2,26 |
| PMMA ₃₆ -co-DMAEMA ₈₄ | 0,85 | 3,58 | 4,10 | 2,56 | 2,26 |

A seguir, detalhes sobre as sínteses desses polímeros.

PMMA₃-co-DMAEMA₂₆

O polímero se mostrou com aspecto líquido e viscoso. O rendimento reacional global (ou seja, comparado à massa total de monômeros adicionada na reação) foi de 25.8% (4,71g). A Figura 8 apresenta o cromatograma por GPC.

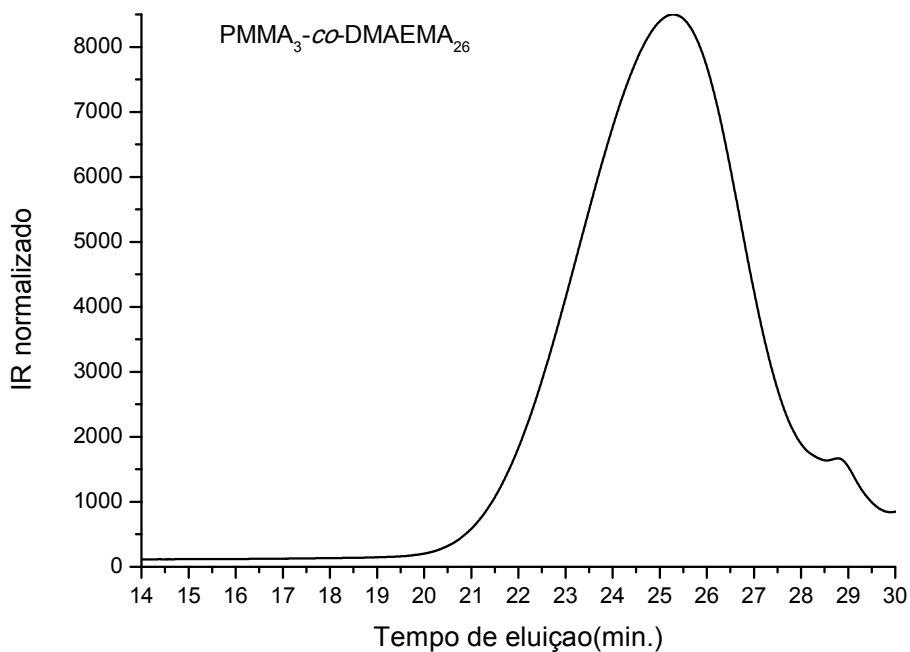


Figura 8: Tempo de eluição por GPC do PMMA₃-co-DMAEMA₂₆

Os espectros de RMN de ^1H e FTIR (**material complementar, MC1 e MC2**), em concordância com o cromatograma obtido por GPC, sugerem elevada pureza do copolímero obtido. A presença de sinais de deslocamento em: (i) 4,15 ppm referente ao grupo metileno ligado ao oxigênio, do DMAEMA e; (ii) 3,60 ppm referente a metila terminal do MMA e as bandas de FTIR (cm^{-1}) características: (2826, 2773, 2951, 1728 e 1030) confirmam o sucesso da síntese.

O copolímero se mostrou facilmente solúvel em água. Isso se deve à reduzida massa molar (M_n) das cadeias e pelo elevado número de meros de PDMAEMA (em comparação com os meros de MMA) na estrutura do material.

PMMA₃₆-co-DMAEMA₈₄

O produto se mostrou com aspecto vítreo. O rendimento reacional foi de 5,36% (1,2 g). O cromatograma por GPC se encontra na **Figura 9** e demonstra, juntamente com os resultados de RMN de ¹H e FTIR (**material complementar, MC3 e MC4**), a obtenção de um material de elevada pureza, com baixa polidispersidade.

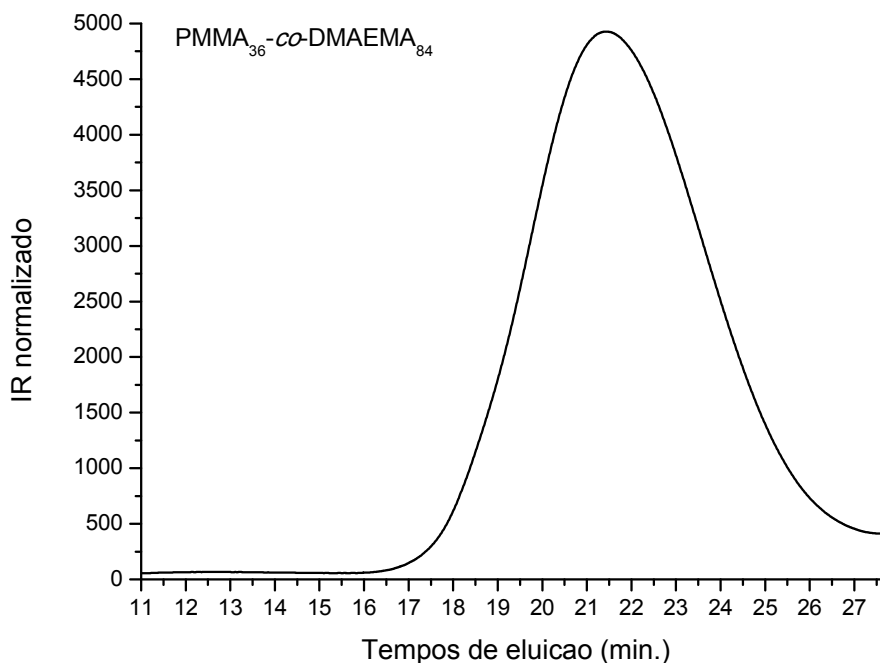


Figura 9: Tempo de eluição de GPC do PMMA₃₆-co-DMAEMA₈₄

O copolímero se mostrou facilmente solúvel em água, por causa da maior quantidade de meros de DMAEMA, nas cadeias. No espectro de RMN de ¹H (**material complementar, MC3**) é notável a presença de sinais de deslocamento em 4,15 ppm (referente ao grupo metila do DMAEMA) e 3,60 ppm (referente a metila terminal do MMA), sugerindo elevada pureza do produto e sucesso da copolimerização. O espectro de FTIR (**material complementar, MC4**) apresentou

bandas características em 2826, 2773, 2951, 1728 e 1030 cm^{-1} que apóiam essas observações.

Os dois polímeros sintetizados (acima) foram submetidos a testes preliminares quanto a potencial aplicação como agentes de transfecção de genes e purificação de proteínas de membrana. Os dados obtidos serviram de subsídio para a arquitetura de polímeros mais eficientes, sob medida, via RAFT. A seguir, serão apresentados esses polímeros.

7.2 SÍNTESES POR PDRR VIA RAFT

7.2.1 Homopolímeros

Foram obtidos via RAFT homopolímeros com reduzida dispersidade molar, aptos como agentes macroCTAs, que permitiram o crescimento controlado de um segundo bloco.

Os sinais característicos de GPC, FTIR e RMN de ^1H (espectros em **material complementar**) sugerem o sucesso em cada uma das sínteses. As massas molares (M_n) se apresentaram próximas do idealizado teoricamente. Os valores de PDI (polidispersidade molar) se mostraram reduzidos. Essas observações estão em sintonia com resultados de sínteses via RAFT.

A Tabela 14 apresenta os parâmetros moleculares por GPC, de cada material.

Tabela 14. Parâmetros moleculares via GPC dos homopolímeros (macroCTAs) sintetizados

| Estrutura | M_w | M_n [g.mol] | M_w/M_n^a |
|------------------------|---------|---------------|-------------|
| PMMA ₆₀ | 15.580 | 12.400 | 1,32 |
| PS ₁₆₀ | 28.230 | 22.130 | 1,27 |
| PDMAEMA ₃₁₅ | 113.200 | 54.680 | 1,65 |
| PDMAEMA ₄₁₁ | 111.290 | 71.500 | 1,55 |
| PMMA ₅₂ | 7.430 | 5.820 | 1,25 |
| PMMA ₁₄₁ | 18.400 | 14.100 | 1,14 |
| PMMA ₂₁₅ | 31.460 | 21.480 | 1,46 |

^a Valores de M_n aproximados, obtidos por GPC;

As tabelas 15 e 16 compilam, respectivamente, as bandas características por FTIR e os deslocamentos químicos, por RMN dos prótons de cada mero que compõem os materiais.

Tabela 15. Bandas de FTIR dos homopolímeros sintetizados

| Estrutura | Números de onda (cm ⁻¹) dos grupos característicos * | | | |
|------------------------|--|--|--------------|---|
| | (C-H) | (C-H ₂ /C-H ₃) | (C=O / C-O) | (C=C e C-H de aromáticos) |
| PMMA ₆₀ | | 2993 2946 2847 | 1728/1151 | - |
| PS ₁₆₀ | - | 3058 3025 2846 1450 (CH ₂) _n | - | 1490 (C=C de aromáticos) 695 - Deformação angular fora do plano (DAFP) de aromáticos |
| PDMAEMA ₃₁₅ | 1277 | 2948 2860 | 1725 1149 | - |
| PDMAEMA ₄₁₁ | 1270 | 2949 2862 | 1725 1150 | - |
| PMMA ₅₂ | - | 2998 2862 2934 | 1737 1152 | - |
| PMMA ₁₄₁ | - | 2997 2951 2928 2854 | 1732 990 | - |
| PMMA ₂₁₅ | - | 2950 | 1731 | - |

* Os símbolos (-) e (=) representam, respectivamente, ligações simples e duplas.

Tabela 16. Deslocamentos químicos por RMN de ^1H de homopolímeros sintetizados

| Estrutura | Deslocamentos químicos (δ) característicos (ppm) | | | | | | |
|------------------------|---|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------|-----------------|
| | CCH ₃ | CH ₂ | OCH ₃ | OCH ₂ | NCH ₂ | NCH ₃ (dimetil) | CH (aromáticos) |
| PMMA ₆₀ | 0,85 1,05 1,25 | 1,65 1,82 1,90 | 3,60 | - | - | - | - |
| PS ₁₆₀ | - | 1,43-1,54 | - | - | - | - | 6,44 - 7,20 |
| PDMAEMA ₃₁₅ | - | 1,65 1,82 1,90 | - | 4,08 | 2,58 | 2,3 | - |
| PDMAEMA ₄₁₁ | - | 1,65 1,82 1,90 | - | 4,08 | 2,58 | 2,28 | - |
| PMMA ₅₂ | 0,85 1,05 1,25 | 1,65 1,82 1,90 | 3,60 | - | - | - | - |
| PMMA ₁₄₁ | 0,85 1,05 1,25 | 1,65 1,82 1,90 | 3,60 | - | - | - | - |
| PMMA ₂₁₅ | 0,85 1,02 1,26 | 1,64 1,82 1,89 | 3,60 | - | - | - | - |

PSmacroCTA₁₆₀

O homopolímero de poliestireno obtido se mostrou insolúvel em água e bastante solúvel em solventes orgânicos apolares. O cromatograma obtido por GPC se encontra na **Figura 10** e sugere sucesso da síntese e pureza do polímero obtido.

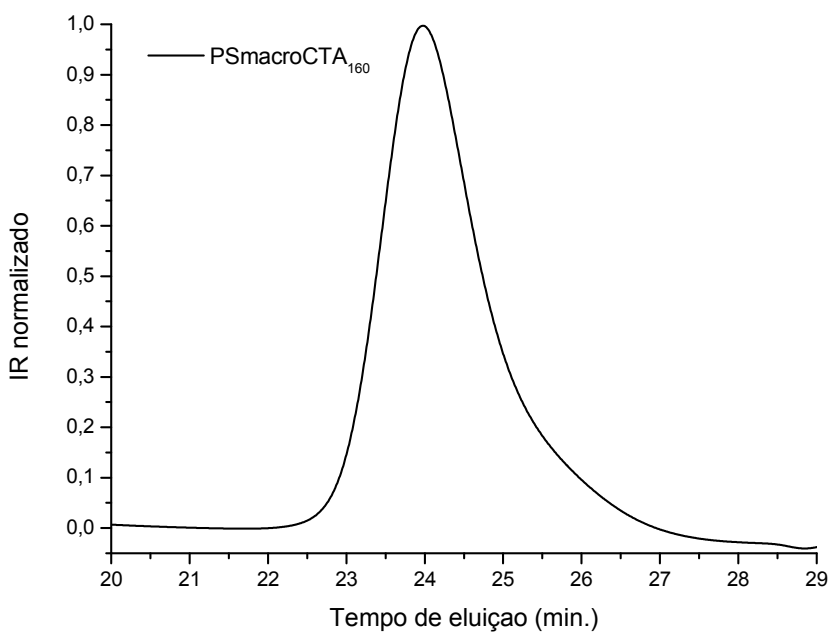


Figura 10: Tempo de eluição por GPC do PSmacroCTA₁₆₀

No espectro de RMN de ¹H (espectros em *material complementar, MC5*), são observados sinais entre 6,3 e 7,4 ppm, característicos de prótons de aromáticos (neste caso, anéis presentes nos meros de estireno). De igual significado, o espectro de FTIR apresenta um sinal de deslocamento na região de deformação angular fora do plano (DAFP) entre 700 e 760 cm⁻¹, referente à presença do anel aromático existente na estrutura do estireno. (espectros em *material complementar, MC6*). Esses resultados estão de acordo com dados prévios descritos na literatura (MAUL et al., 2007) que sugerem a obtenção de um polímero de estireno de elevada pureza. O polímero obtido apresentou massa molecular de acordo com o esperado teoricamente e reduzida polidispersidade.

PDMAEMAmacroCTA₃₁₅

O homopolímero de PDMAEMAmacro₃₁₅ foi sintetizado para ser o bloco hidrofílico dos copolímeros planejados para a formação de polimerossomos. Além de permitir a síntese de um segundo bloco (de estireno ou MMA, hidrofóbicos) também possibilitou que o copolímero se mostrasse solúvel em água e comportamento estímulo-responsivo a pH e temperatura. Embora a literatura (CHIEFARI et al., 1998c; MATYJASZEWSKI, 1998; RIZZARDO et al., 2010) sugira discreta diferença de reatividade do estireno e DMAEMA usando-se determinados CTAs, experimentos prévios realizados (resultados não apresentados nesta tese) demonstraram maiores eficiências de polimerização partindo-se de PDMAEMA como bloco inicial. A **Figura**

11 apresenta o cromatograma obtido por GPC.

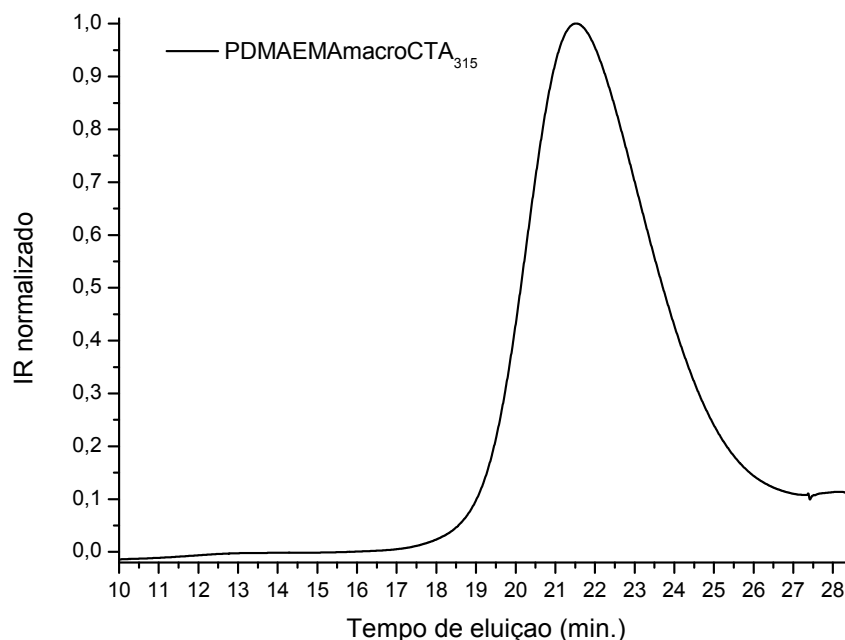


Figura 11: Tempo de eluição por GPC do PDMAEMAmacroCTA₃₁₅

Os espectros (*material complementar, MC7 e MC8*) de RMN de ¹H e de FTIR (vide dados nas **Tabelas 15 e 16**, anteriormente apresentadas) apresentam, respectivamente, deslocamentos químicos e bandas que comprovam a obtenção de um polímero de DMAEMA característico, de elevada pureza e baixa polidispersidade.

PDMAEMAmacroCTA₄₁₁

O homopolímero de PDMAEMAmacro₄₁₁ obtido foi sintetizado para a mesma finalidade do homopolímero de PDMAEMA₃₁₅ descrito anteriormente. Os resultados de GPC (**Figura 12**, abaixo), e espectros de RMN de ¹H e FTIR (*material*

complementar, MC9 e MC10) e (Tabelas 15 e 16), comprovam a obtenção de um polímero puro com características similares ao PDMAEMAmacroCTA₃₁₅, entretanto, com maiores M_n e M_w .

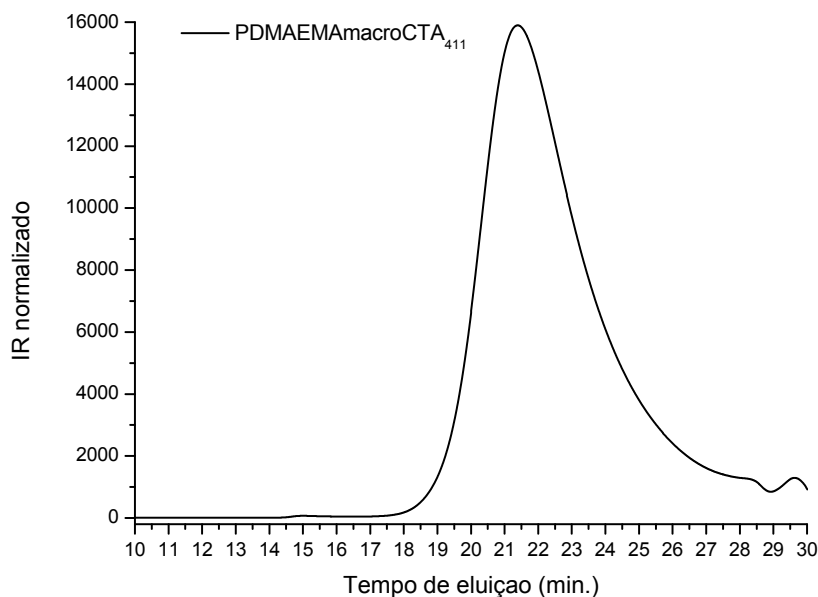


Figura 12: Tempo de eluição por GPC do PDMAEMAmacroCTA₄₁₁

Copolímeros dibloco de PMMA-b-DMAEMA foram sintetizados. Para isso, inicialmente, foram sintetizados homopolímeros de PMMAmacroCTA e sobre esses foram construídos blocos de PDMAEMA. A monitorização do crescimento das cadeias poliméricas foi realizada por análises de alíquotas da mistura reacional, retiradas em tempos pré-estabelecidos. A reação foi finalizada quando o polímero alcançou a massa molar (M_n) planejada. Detalhes das sínteses desses macroCTAs são apresentados a seguir.

PMMAmacroCTA₆₀

O produto obtido apresentou aspecto vítreo. O rendimento reacional foi de 24,9 % (4,98 g). O resultado de GPC (**Figura 13**) sugere a obtenção de um material puro.

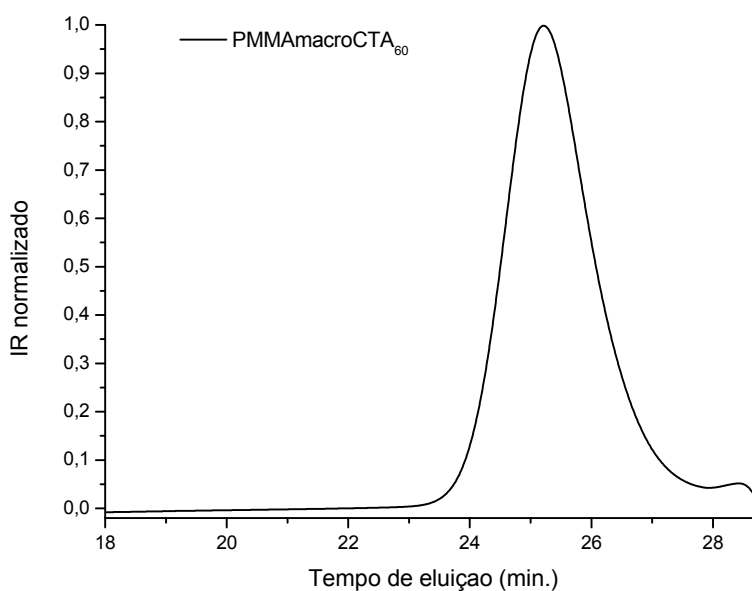


Figura 13: Tempo de eluição por GPC do PMMAmacroCTA₆₀

Nos espectros de RMN de ¹H e FTIR (*material complementar, MC11 e MC12*) estão presentes, respectivamente, os principais sinais em 1728/1151 cm⁻¹ (C=O / C-O) e 3,60 ppm (O-CH₃), característicos de polímeros de PMMA. (CÉSAR-OLIVEIRA et al., 1999; DE SOUZA et al., 2011)

A **Figura 14** apresenta os tempos de eluição por GPC em diferentes tempos de reação. O deslocamento do sinal para menores tempos de eluição (de 25,7 para 25,3 min.), ao decorrer do tempo, demonstra o crescimento das cadeias (aumento

da massa molar), com o controle da polidispersidade, que se manteve reduzida durante toda a síntese.

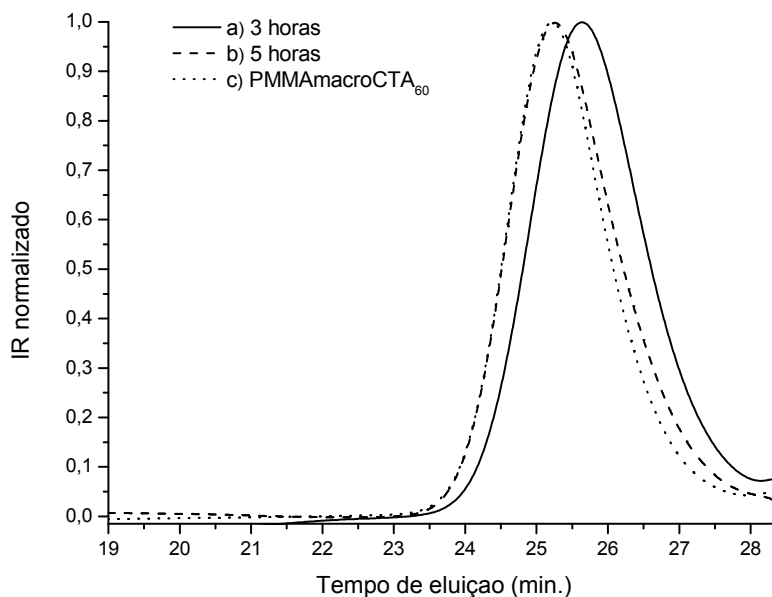


Figura 14. Tempos de eluição por GPC de alíquotas da mistura reacional de PMMA₆₀ obtidas de diferentes tempos de polimerização: a) 3 horas; b) 5 horas e; c) PMMAmacroCTA₆₀ purificado.

PMMAmacroCTA₅₂

O polímero, após purificação, se mostrou de coloração amarelada e aspecto vítreo. O rendimento reacional foi de 4 % (1,16 g). O cromatograma de GPC (**Figura 14**) sugere a obtenção de um material puro e com baixa polidispersidade. Os dados de RMN de ¹H e FTIR (*material complementar, MC13 e MC14*) demonstram estar presentes os principais sinais em 1728/1151 cm⁻¹ (C=O / C-O) e 3,60 ppm (O-CH₃), respectivamente.

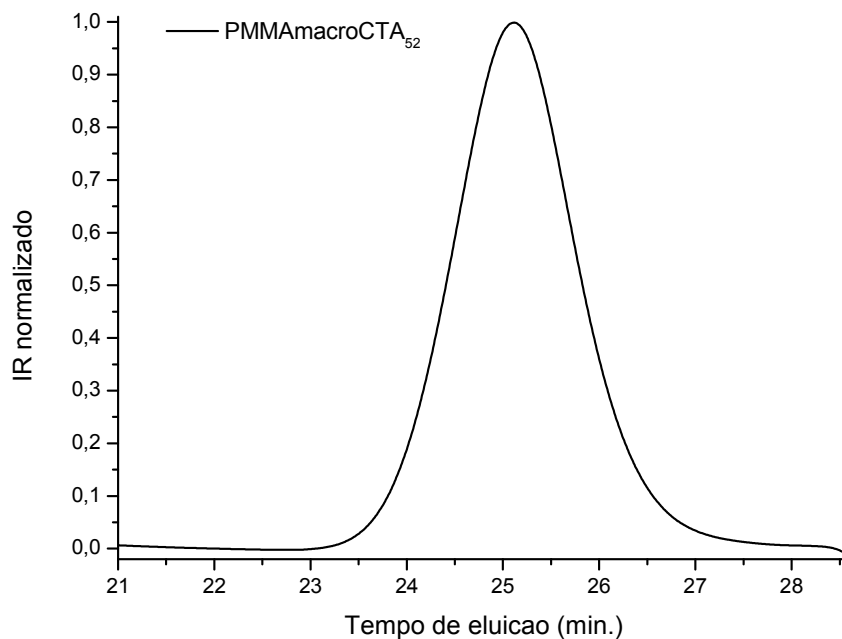


Figura 15: Tempo de eluição por GPC do PMMAmacroCTA₅₂

A **Figura 16**, a seguir, apresenta os tempos de eluição por GPC em diferentes tempos de reação. O deslocamento do sinal para menores tempos de eluição (26,10 até 25,5 min) representa o aumento da massa molar em função do tempo. Também é observável a manutenção da baixa polidispersidade das cadeias, desde o início ao término da síntese.

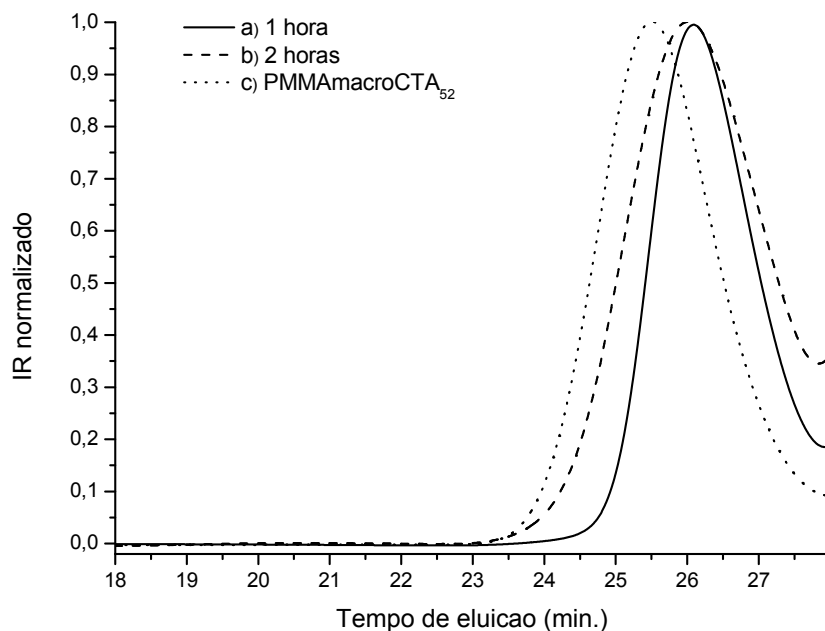


Figura 16. Tempos de eluição por GPC de alíquotas da mistura reacional de PMMA₅₂ obtidas de diferentes tempos de polimerização: a) 1 hora; b) 2 horas e; c) PMMAmacroCTA₅₂ purificado.

PMMAmacroCTA₁₄₁

O polímero sintetizado apresentou coloração amarelada, também de aspecto vítreo. O cromatograma de GPC (**Figura 17**) sugere a obtenção de um material puro e com baixa polidispersidade. O espectro de RMN de ¹H (*material complementar, MC15*) apresentou um principal sinal de deslocamento em 3.60 ppm (O-CH₃). Os dados de FTIR (*material complementar, MC16*) demonstram estar presentes os principais sinais em 1728/1151 cm⁻¹ (C=O / C-O). Esses dados, bem como o observado por GPC, sugerem pureza do material obtido e é coerente com dados de polímeros de MMA.

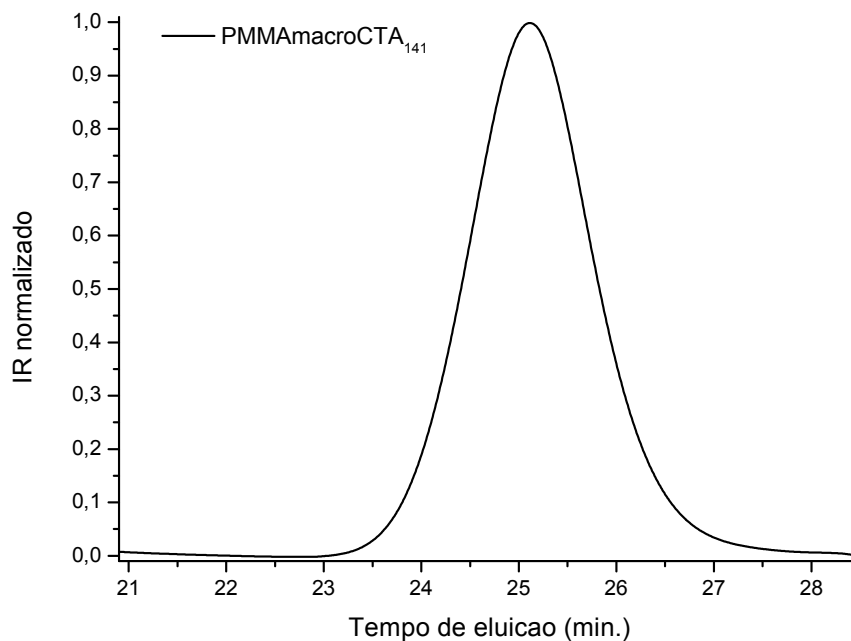


Figura 17: Tempo de eluição por GPC do PMMAmacroCTA₅₂

Os tempos de eluição por GPC da mistura reacional (após 2,5 horas de reação) e do polímero purificado são apresentados na **Figura 18**. O deslocamento do sinal para menores tempos de eluição (26,09 até 25,10 min.) demonstra o sucesso da polimerização com a redução da polidispersidade das cadeias.

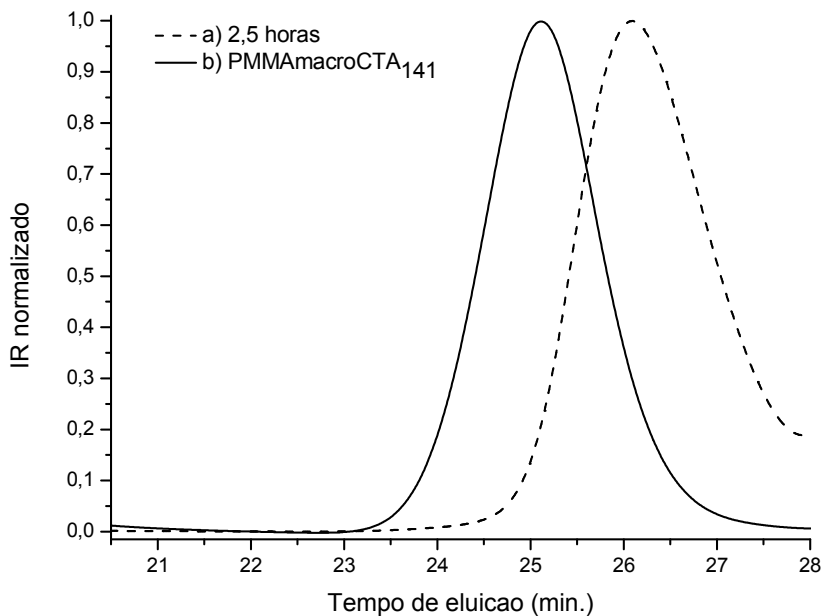


Figura 18. Tempos de eluição por GPC da alíquota da mistura reacional de PMMA₁₄₁ obtida após a) 2,5 horas de reação e; b) PMMAmacroCTA₁₄₁, polímero purificado.

PMMAmacroCTA₂₁₅

O polímero puro se mostrou de coloração amarelada e aspecto vítreo. O rendimento reacional foi de 47,54 % (22,25 g). O cromatograma de GPC (**Figura 19,**) sugere a obtenção de um polímero puro e com baixa polidispersidade. Os dados RMN de ¹H e de FTIR (**material complementar, MC17 e MC18**) demonstram estar presentes os principais sinais em 1728/1151 cm⁻¹ (C=O / C-O) e 3,60 ppm (O-CH₃).

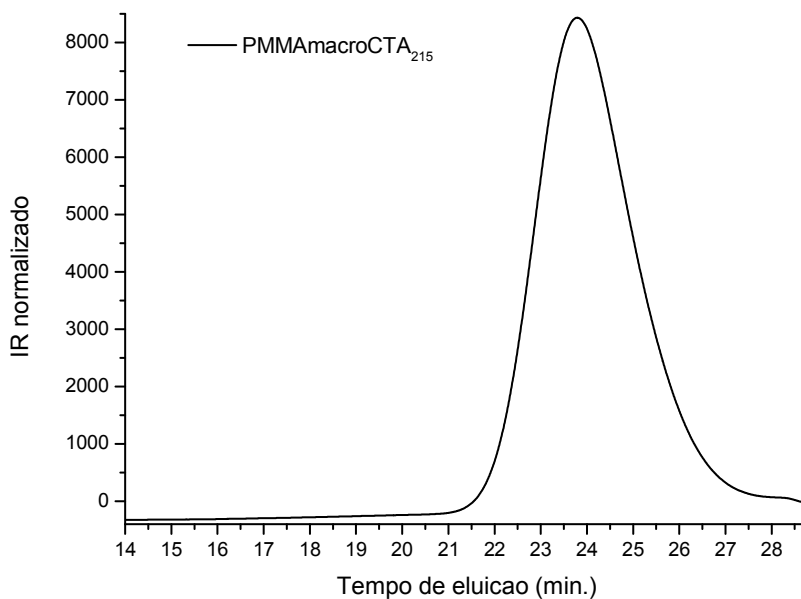


Figura 19: Tempo de eluição por GPC do PMMAmacroCTA₂₁₅

Os tempos de eluição por GPC são apresentados na **Figura 20** e se referem a alíquotas da mistura reacional, retiradas em diferentes tempos. Há o deslocamento do sinal para menores tempos de eluição, ao decorrer do tempo, na medida em que a massa molecular das cadeias aumenta. (Observe o tempo de eluição, de alíquota retirada após 2 horas de reação: 24,82; até o tempo de eluição do polímero após purificação: 24,12 min.). Também é observável a redução da polidispersidade das cadeias, ao decorrer do tempo.

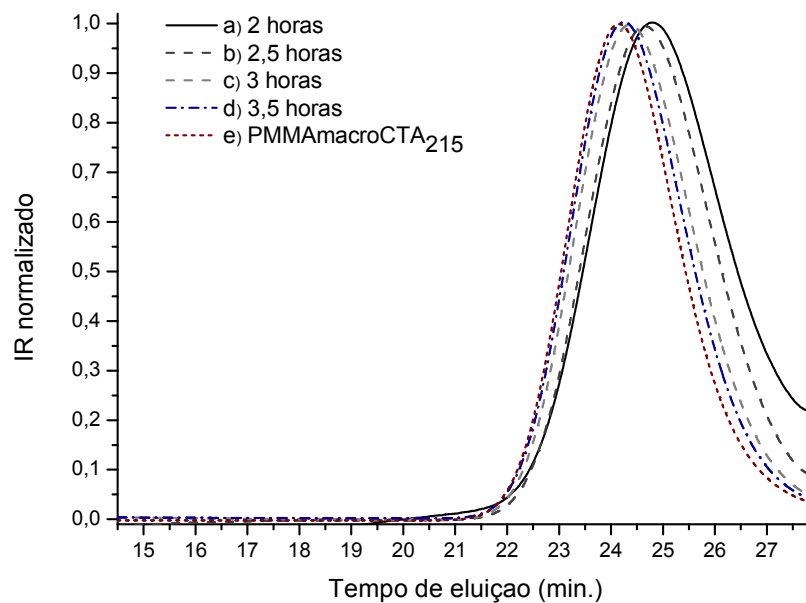


Figura 20. Tempos de eluição por GPC de alíquotas da mistura reacional de PMMA₅₂ obtidas de diferentes tempos de polimerização: a) 2 horas; b) 2,5 horas; c) 3 horas; d) 3,5 horas e; e) PMMA macroCTA₂₁₅ purificado.

Os homopolímeros descritos na sessão anterior foram utilizados como bloco de partida (macroCTA) para a construção de copolímeros dibloco. A seguir, detalhes sobre as copolimerizações.

7.2.2 Copolímeros dibloco

Os homopolímeros obtidos por técnica RAFT (macroCTAs) permitem a síntese de um segundo bloco, que pode ser constituído do mesmo tipo ou de diferentes monômeros. Os homopolímeros sintetizados (vide sessão anterior) foram, portanto, usados para a construção de copolímeros dibloco de variados tamanhos

de cadeia e diferentes razões de hidrofobicidade/hidrofilicidade.

Na **Tabela 17** são apresentados os parâmetros moleculares por GPC de todos os copolímeros sintetizados.

Tabela 17. Parâmetros moleculares obtidos por GPC dos copolímeros sintetizados

| Estrutura | M_w | M_n [g.mol] ^a | M_w/M_n |
|---|---------|----------------------------|-----------|
| PMMA ₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₂₄ | 48.550 | 36.350 | 1,36 |
| PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₇₈₁ | 189.800 | 144.820 | 1,49 |
| PMMA ₅₂ - <i>b</i> -DMAEMA ₂₉₄ | 60.800 | 46.600 | 1,24 |
| PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₂₄₄ | 152.930 | 74.840 | 1,56 |
| PMMA ₁₄₁ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₁₉ | 30.400 | 21.400 | 1,21 |
| PS ₁₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₆₀ | 29.000 | 26.070 | 1,13 |
| PS ₁₆₀ - <i>b</i> -DMAEMA ₃₂ | 27.750 | 22.170 | 1,25 |
| PMMA ₂₁₅ - <i>b</i> -DMAEMA ₁₃₅ | 40.550 | 28.700 | 1,48 |

^aValores de M_n aproximados, obtidos por GPC;

Os copolímeros obtidos também foram analisados por FTIR e RMN de ¹H (resultados compilados nas **Tabelas 18 e 19**, apresentadas a seguir). Os resultados se complementam no que diz respeito à obtenção de produtos livres de contaminação.

Tabela 18. Principais sinais nos espectros de FTIR dos copolímeros dibloco sintetizados

| Estrutura | Números de onda (cm ⁻¹) dos grupos funcionais característicos | | | |
|--|---|---|--------------|---|
| | (C-H) | (C-H ₂ /C-H ₃) | (C=O / C-O) | (C=C e C-H de aromáticos) |
| PMMA ₇₇ -b-DMAEMA ₁₆₀ | 2820 e 2767 | 2948 1386 e 1398 (CH ₃ - dimetilgeminal) | 1725 | - |
| PDMAEMA ₃₁₅ -b-PS ₇₈₁ | 2820 e 2767 | 2948 1385(CH ₃ - dimetilgeminal) | 1724 | 1491 (C=C de aromáticos) 696 - Deformação angular de aromáticos) |
| PMMA ₅₂ -b-DMAEMA ₂₆₃ | 2823 e 2765 | 2948 | 1724 | - |
| PDMAEMA ₃₁₅ -b-PS ₂₄₄ | 2820 e 2766 | 2943 | 1723 | 1490 (C=C de aromáticos) 696 - Deformação angular de aromáticos) |
| PMMA ₇₉ -b-DMAEMA ₉₄ | 2823 e 2765 | 2947 | 1724 | |
| PS ₁₆₀ -b-DMAEMA ₆₀ | 2820 e 2767 | 2946 | 1726 | 692 - Deformação angular de aromáticos) |
| PS ₁₆₀ -b-DMAEMA ₃₂ | 2820 e 2768 | 2949 | 1726 | 698 - Deformação angular de aromáticos) |
| PMMA ₂₁₅ -b-DMAEMA ₁₃₅ | 2823 e 2765 | 2948 | 1725 1154 | |

* Os símbolos (-) e (=) representam, respectivamente, ligações simples e duplas.

Tabela 19. Deslocamentos químicos por RMN de ¹H dos copolímeros dibloco sintetizados

| Estrutura | Deslocamentos químicos (δ) característicos (ppm) | | | | | | |
|--|--|-------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------|-----------------|
| | CCH ₂ | *CCH ₃ | OCH ₃ | OCH ₂ | NCH ₂ | NCH ₃ (dimetil) | CH (aromáticos) |
| PMMA ₆₀ -b-DMAEMA ₁₂₄ | 0,86 | 1,83 | 3,69 | 4,04 | 2,54 | 2,26 | - |
| PDMAEMA ₃₁₅ -b-PS ₇₈₁ | 0,88 | 1,83 | - | 4,08 | 2,63 | 2,32 | 6,29-7,41 |
| PMMA ₅₂ -b-DMAEMA ₂₉₄ | 0,89 | 1,82 | 3,60 | 4,07 | 2,58 | 2,30 | - |
| PDMAEMA ₃₁₅ -b-PS ₂₄₄ | 0,89 | 1,83 | - | 4,06 | 2,58 | 2,29 | 6,40-4,42 |
| PMMA ₁₄₁ -b-DMAEMA ₁₁₉ | 0,85 | 1,83 | 3,60 | 4,06 | 257 | 2,28 | - |
| PS ₁₆₀ -b-DMAEMA ₆₀ | 0,88 | 1,83 | - | 4,06 | 2,58 | 2,29 | 6,29-7,40 |
| PS ₁₆₀ -b-DMAEMA ₃₂ | 0,88 | 1,83 | - | 4,06 | 2,56 | 2,28 | 6,31-4,43 |
| PMMA ₂₁₅ -b-DMAEMA ₁₃₅ | 0,85 | 1,82 | 3,59 | 4,05 | 2,56 | 2,29 | - |

*δ referentes aos prótons (CCH₃) de DMAEMA, em região próxima também em MMA; Os sinais de deslocamento de MMA estão em vermelho, estireno em preto e de DMAEMA em azul.

Os resultados de síntese e caracterização de cada copolímero serão descritos, a seguir:

PS₁₆₀-*b*-DMAEMA₆₀

O polímero, depois de purificado, se mostrou de coloração amarelada e com aspecto granuloso. O cromatograma de GPC (**Figura 21**) demonstra que houve reduzido deslocamento do sinal para menor tempo de eluição (em comparação ao tempo de eluição apresentado pelo PSmacroCTA₁₆₀, usado como bloco de partida). Esse resultado parece sugerir que não houve crescimento das cadeias de PDMAEMA. A explicação para isso pode estar relacionada à baixa reatividade reacional quando se utiliza homopolímeros de PSmacroCTA como bloco de partida.

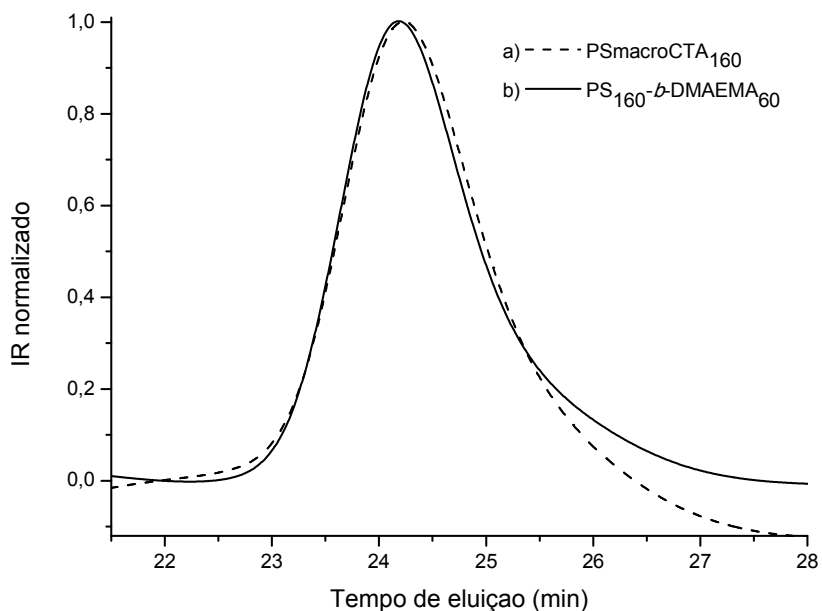


Figura 21: Tempo de eluição por GPC de: a) PSmacroCTA₁₆₀ e; b) PS₁₆₀-*b*-DMAEMA₆₀ purificado.

Entretanto, os dados de RMN de ¹H do copolímero (vide **material complementar, MC19**) e (**Tabela 19**), depois de repetidas etapas de purificação,

demonstram estar presentes os principais sinais em 4,15 ppm (referente ao grupo metila do PDMAEMA) e na região compreendida entre 6,3 e 4,4 ppm (referente a prótons de aromáticos), sugerindo o sucesso da copolimerização. O espectro de FTIR (vide *material complementar, MC20*) e (*Tabela 18*) do copolímero puro também apresenta sinais característicos na região de DAFP, característico dos grupos aromáticos do estireno. Também são observados sinais característicos de amins e carbonilas, existentes na estrutura do DMAEMA. (DE SOUZA et al., 2011; FOURNIER et al., 2007; ZHU; TAN; DU, 2008)

PS₁₆₀-*b*-DMAEMA₃₂

O polímero purificado se mostrou de coloração amarelada e aspecto vítreo. O cromatograma de GPC (**Figura 22**, abaixo) demonstra que não houve deslocamento do sinal para menor tempo de eluição (em comparação ao tempo de eluição apresentado pelo PSmacroCTA₁₆₀, usado como bloco de partida). Esse resultado é semelhante ao observado para o copolímero anteriormente descrito e também parece sugerir que não houve crescimento das cadeias de PDMAEMA.

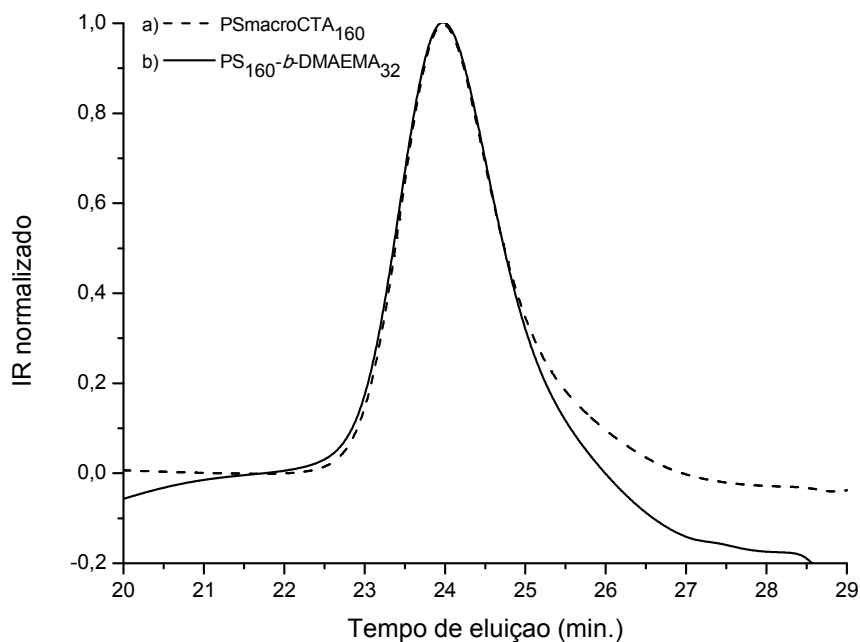


Figura 22: Tempos de eluição por GPC de: a) PSmacroCTA₁₆₀ e; b) PS₁₆₀-*b*-DMAEMA₃₂ purificado.

Entretanto, os dados de RMN de ¹H do copolímero (vide **material complementar, MC21**) e (**Tabela 19**), depois de repetidas etapas de purificação, demonstram estar presentes os principais sinais em 4,15 ppm (referente ao grupo metila do DMAEMA) e na região compreendida entre 6,3 e 4,4 ppm (referente a prótons de aromáticos), sugerindo sucesso da copolimerização. O espectro de FTIR (vide **material complementar, MC22**) e (**Tabela 18**) do copolímero puro também apresenta sinais na região de DAFP, característico dos grupos aromáticos. Também são observadas bandas características de aminas e carbonilas, presentes na estrutura do DMAEMA.

Os dois materiais que serão descritos doravante foram planejados para a

formação de polimerossomos. O bloco de PDMAEMAmacroCTA₃₁₅ foi usado como partida para a construção dos copolímeros dibloco de PDMAEMA-*b*-PS.

PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ e PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁

Ambos os copolímeros apresentaram aspecto plástico, de coloração esbranquiçada. A reação, que deu origem aos dois copolímeros foi monitorada por GPC (vide mais detalhes sobre as sínteses na sessão **materiais e métodos**). A **Tabela 20** apresenta alguns dados de caracterização selecionados.

Tabela 20. Parâmetros de síntese e dados de caracterização dos copolímeros de PDMAEMA_n-*b*-PS_m^a

| Material | PDMAEMAmacro CTA (mmol.L ⁻¹) ^b | Estireno ^b (mmol.L ⁻¹) | I (mmol.L ⁻¹) | M _n ^c (Kg.mol ⁻¹) | M _w /M _n ^c |
|--|---|---|---------------------------|---|---|
| (a) PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₂₄₄ | 0,127 | 1,40 | 0,19 (AIBN) | 74,8 | 1,4 |
| (b) PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₇₈₁ | 0,100 | 1,23 | 1,21 (AIBN) | 145 | 1,4 |

^a PDMAEMA relação (n) e PS (m) nos dois copolímeros foram calculadas das áreas dos sinais por sinais de RMN de ¹H e massa molar total (vide métodos) ^b Quantidade usada de monômeros; ^c Mensurado por GPC;

A **Figura 23**, abaixo, apresenta perfis cromatográficos por GPC dos polímeros puros.

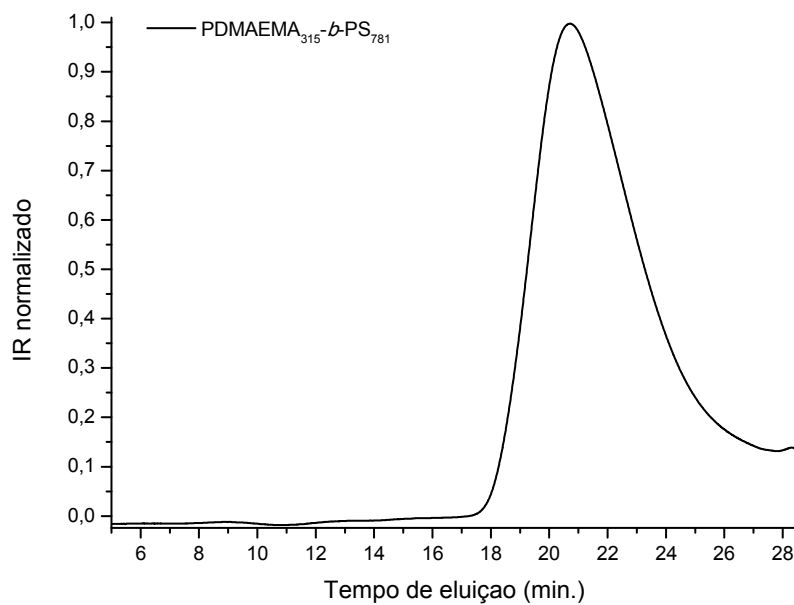
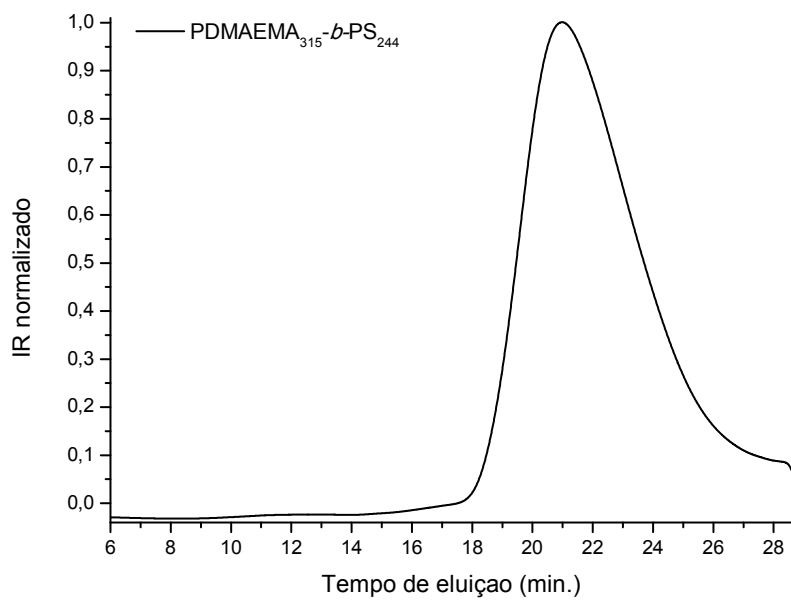


Figura 23: Tempos de eluição por GPC de: (acima), PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ e; (abaixo) PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₈₇₁, ambos puros.

A progressão da massa molar das cadeias poliméricas das sínteses foi monitorada por GPC, por meio da retirada de alíquotas da mistura reacional em diferentes tempos (**Figura 24 e 25**). O crescimento das cadeias é detectado a partir do deslocamento do tempo de eluição como uma função do tempo de reação. Depois de atingir o peso molecular desejado, cada fração foi coletada para purificação, permitindo a obtenção de polímeros estritamente de acordo com o planejado.

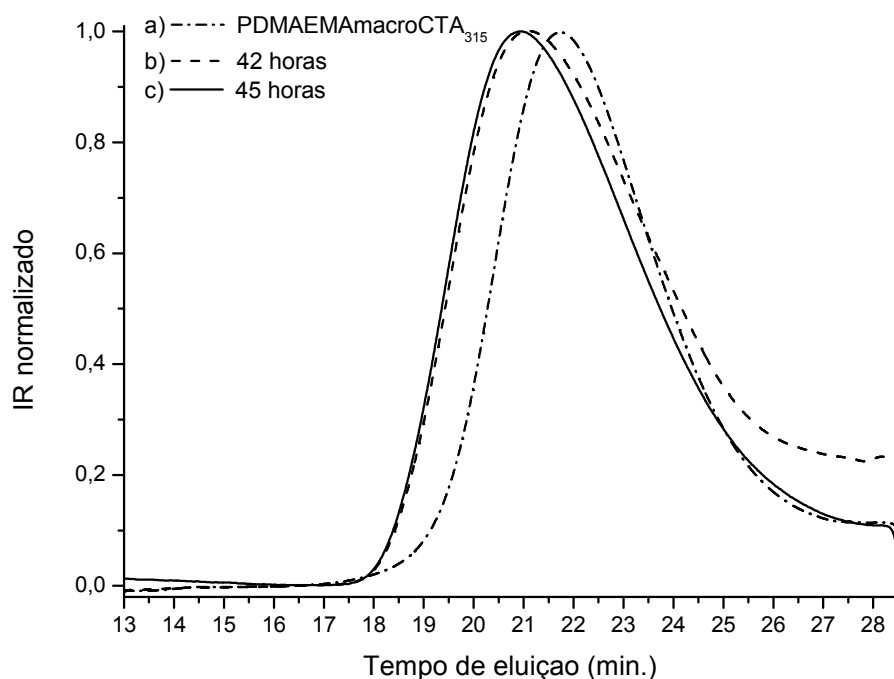


Figura 24: Tempos de eluição por GPC de alíquotas da mistura reacional da síntese de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ a) PDMAEMAmacroCTA₃₁₅ e alíquotas da mistura reacional após: b) 42 horas e; c) 45 horas.

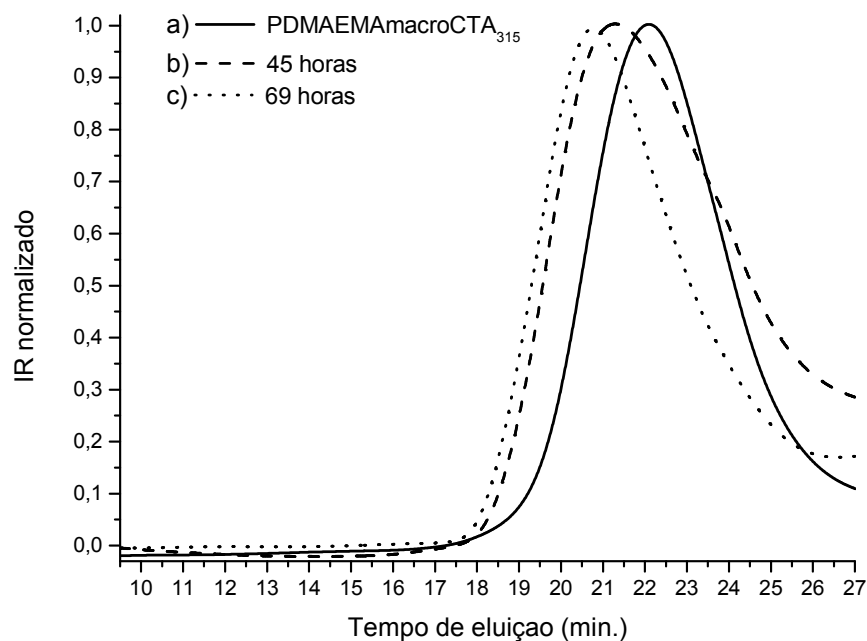


Figura 25: Tempos de eluição por GPC de alíquotas da mistura reacional da síntese de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁. a) PDMAEMAmacroCTA₃₁₅ e alíquotas da mistura reacional após: b) 45 horas e; c) 69 horas.

A **Figura 26** apresenta os perfis cromatográficos dos copolímeros depois de purificados, descendentes do PDMAEMAmacroCTA₃₁₅

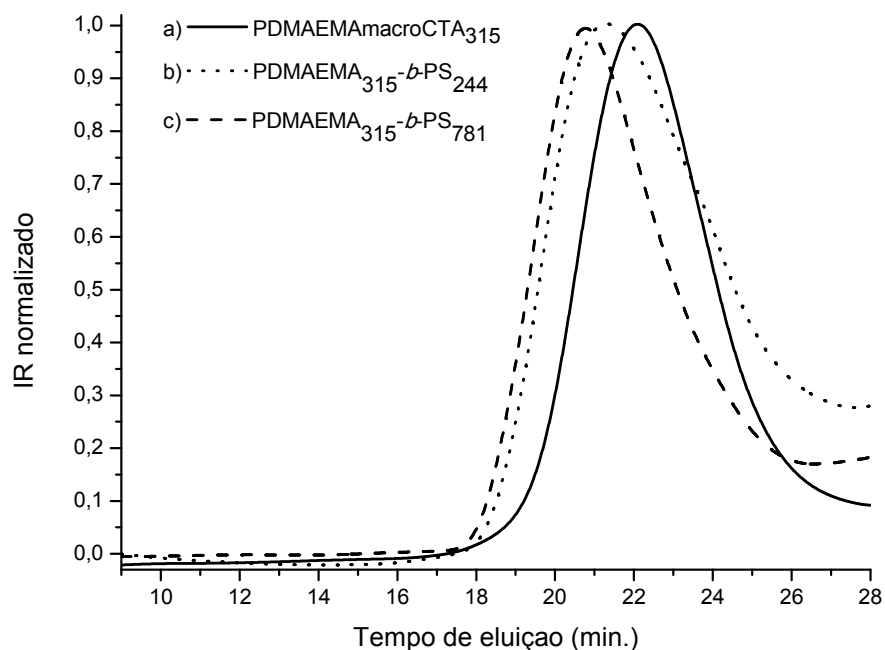


Figura 26: Tempos de eluição por GPC normalizados de: a) PDMAEMAmacroCTA₃₁₅; b) PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ e, c) PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁. Deslocamentos de sinal em tempos de eluição mais curtos mostram o crescimento das cadeias de PS.

RMN de ¹H e FTIR (*material complementar, MC23 e MC24*) confirmaram as estruturas dos copolímeros. Em ambos os espectros de FTIR, bandas são observadas em 698 cm⁻¹. Esses sinais estão relacionados à DAFP dos anéis aromáticos da estrutura de estireno presente nas cadeias de PS e também sugerem que as copolimerizações foram bem sucedidas (ZHU; TAN; DU, 2008).

O espectro de FTIR de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ (*material complementar, MC24*) exibe uma banda a 698 cm⁻¹ com maior intensidade, comparado com o sinal no mesmo espectro de frequência de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄. Isto é devido à maior quantidade de estireno presente nas cadeias do copolímero PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁, que tem um bloco de PS maior. Ambos os materiais foram submetidos a ensaios

para analisar a capacidade de formarem polimerossomos. Esses resultados serão descritos posteriormente.

Os copolímeros dibloco candidatos à entrega de fármacos também foram construídos com sucesso. Todos os copolímeros se apresentaram de coloração amarelada, com aspecto vítreo. Doravante, os resultados das sínteses e caracterizações desses materiais.

PMMA₆₀-*b*-DMAEMA₁₂₄

O cromatograma por GPC se encontra na Figura 27 e apresenta os traços do PMMA_{macroCTA}₆₀ (bloco de partida), das alíquotas das misturas reacionais em função do tempo e do copolímero puro. O deslocamento do sinal para menores tempos de eluição demonstra o crescimento das cadeias e, conseqüentemente, ratificam o sucesso da síntese. Também é notável a simetria dos sinais, que significa que as cadeias se mantiveram com baixa polidispersidade ao longo da reação, fenômeno característico de sínteses por RAFT. Essas observações, juntamente com resultados de RMN de ¹H e FTIR (espectros em **material complementar, MC25 e MC26**) estão de acordo com a literatura (DE SOUZA et al., 2011; XIONG et al., 2004). Eles comprovam o sucesso na obtenção de um material de elevada pureza, baixa polidispersidade e na medida exata do que foi planejado.

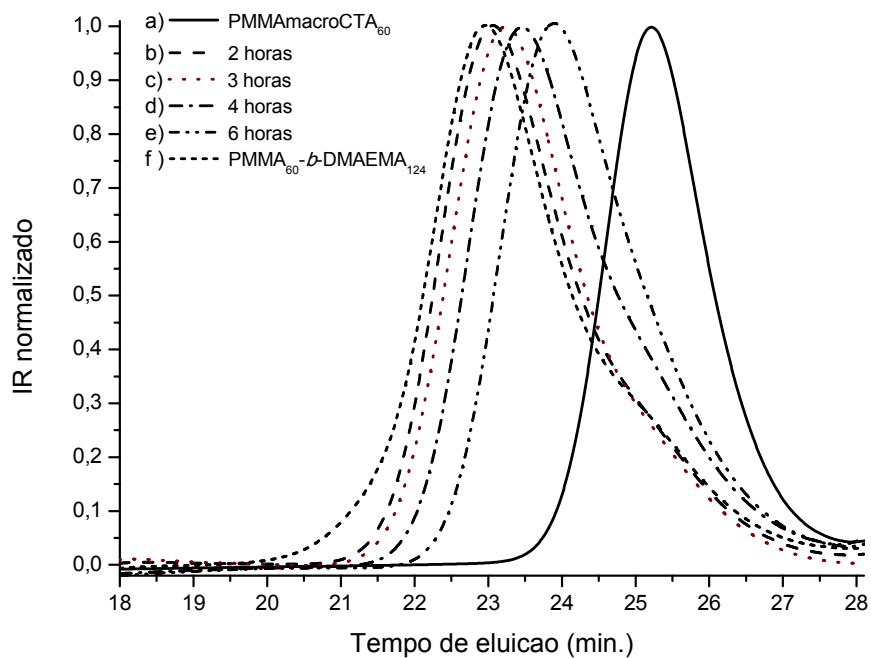


Figura 27: Tempos de eluição por GPC de: a) PMMAmacroCTA₆₀; b) 2 horas; c) 3 horas; d) 4 horas; e) 6 horas e; f) PMMA₆₀-*b*-DMAEMA₁₂₄ puro.

No espectro de RMN de ¹H (espectro em **material complementar, MC25**) é notável a presença de sinais de deslocamento em 4,15 ppm (referente ao grupo metila do DMAEMA) e 3,60 ppm (referente a metila terminal do MMA). O espectro de FTIR (**material complementar, MC26**) apresentou bandas características em 2826, 2773, 2951, 1728 e 1030 cm⁻¹ que apoiam essas observações.

PMMA₅₂-*b*-DMAEMA₂₉₄

Abaixo o cromatograma por GPC. Ele apresenta os tempos de eluição do homopolímero de PMMA₅₂ (bloco de partida), das alíquotas da mistura reacional em função do tempo e do copolímero de PMMA₅₂-*b*-DMAEMA₂₉₄ purificado. O deslocamento do sinal para menores tempos de eluição demonstra o crescimento das cadeias.

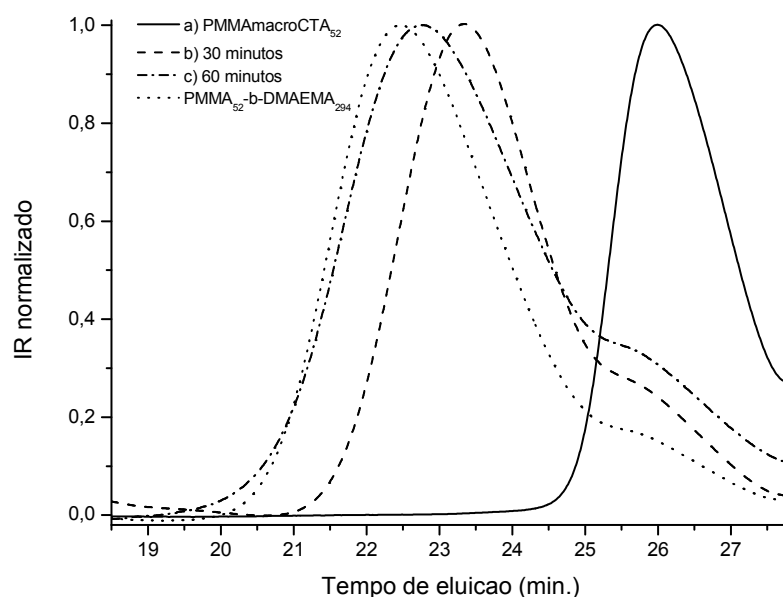


Figura 28: Tempos de eluição por GPC de: a) PMMA₅₂; b) 30 minutos; c) 60 minutos; d) PMMA₅₂-*b*-DMAEMA₂₉₄ puro.

Observa-se na **Figura 28** a existência de um ombro posterior, provavelmente relacionado a uma segunda população de cadeias, de tamanhos diferentes. Embora isso seja característico de perda do controle reacional, o

copolímero resultante se apresentou com baixa polidispersidade, o que é um indicativo de sucesso da síntese via RAFT. De qualquer modo, também é possível que seja inerente a cadeias em estado de *terminação* (usualmente chamadas de cadeias mortas), não impossíveis de existirem, mesmo em uma síntese via RAFT.

Os dados de GPC, juntamente com os resultados de RMN de ^1H e FTIR (espectros em **material complementar, MC27 e MC28**), sugerem o sucesso da obtenção de um polímero puro. Os dados de RMN de ^1H estão em sintonia com resultados já descritos na literatura e também sugerem o sucesso da reação (DE SOUZA et al., 2011; WETERING et al., 1998).

No espectro de RMN de ^1H (espectro em **material complementar, MC27**) é notável a presença de sinais de deslocamento em 4,15 ppm (referente ao grupo metila do DMAEMA) e 3,60 ppm (referente a metila terminal do MMA, e no espectro de FTIR (**material complementar, MC28**) também há bandas características em 2826, 2773, 2951, 1728 e 1030 cm^{-1} que apoiam essas observações.

PMMA₁₄₁-*b*-DMAEMA₁₁₉

O cromatograma por GPC se encontra na **Figura 29** e apresenta os tempos de eluição do PMMA_{macroCTA}₁₄₁, das alíquotas da mistura reacional em função do tempo e do copolímero de PMMA₁₄₁-*b*-DMAEMA₁₁₉ puro. O deslocamento dos sinais para menores tempos de eluição demonstra o crescimento das cadeias e, conseqüentemente, também sugere o sucesso da copolimerização. Essas observações, juntamente com resultados de RMN de ^1H e FTIR (espectros em **material complementar, MC29 e MC30**) sugerem sucesso da copolimerização.

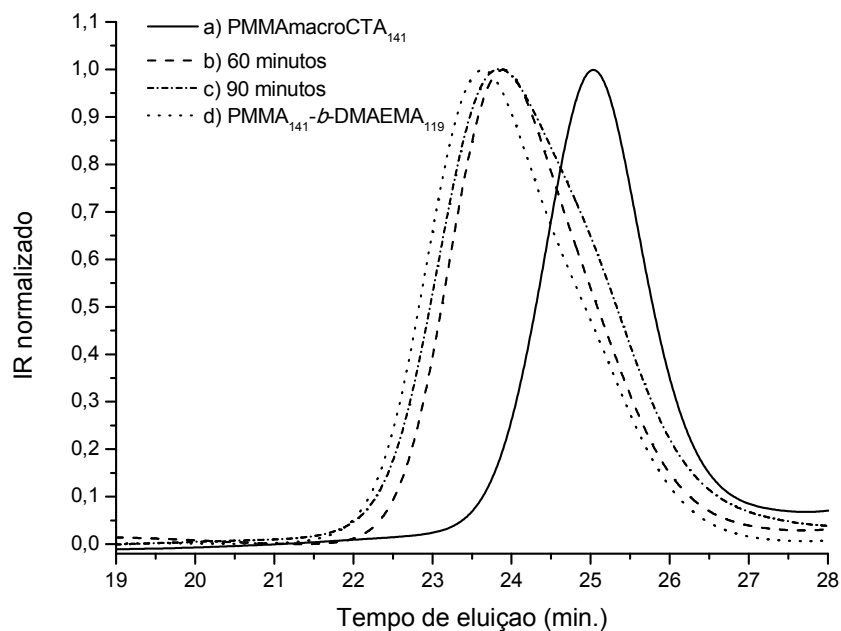


Figura 29: Tempos de eluição por GPC de: a) PMMAmacroCTA₆₀; b) 60 minutos; c) 90 minutos; PMMA₁₄₁-*b*-DMAEMA₁₁₉ puro.

No espectro de RMN de ¹H (espectro em **material complementar, MC29**) é notável a presença de sinais de deslocamento em 4,15 ppm (referente ao grupo metila do DMAEMA) e 3,60 ppm (referente a metila terminal do MMA). O espectro de FTIR (**material complementar, MC30**) apresentou bandas características desse tipo de material em 2826, 2773, 2951, 1728 e 1030 cm⁻¹.

PMMA₂₁₅-*b*-DMAEMA₁₃₅

O polímero, depois de purificado, se mostrou de coloração amarelada e aspecto vítreo. No cromatograma de GPC (**Figura 30**) é visível o deslocamento do sinal para um menor tempo de eluição, demonstrando o crescimento das cadeias de DMAEMA.

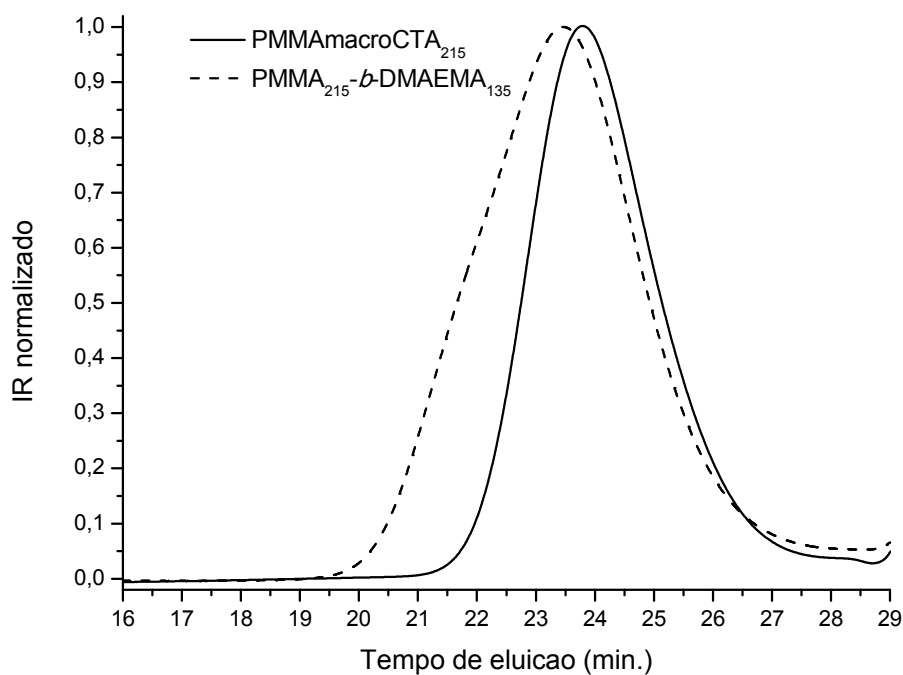


Figura 30: Tempos de eluição por GPC de: a) PMMA macroCTA₂₁₅ e; b) PMMA₂₁₅-*b*-DMAEMA₁₃₅

Os dados de RMN de ¹H do copolímero (*material complementar, MC31*), depois de repetidas etapas de purificação, demonstram estar presentes os principais sinais em 4,15 ppm (referente ao grupo metila do DMAEMA) e 3,60 ppm (referente a

metila terminal do MMA). O espectro de FTIR (*material complementar, MC32*), apresentou bandas características em 2826, 2773, 2951, 1728 e 1030 cm^{-1} que, em conjunto com os dados de GPC e RMN, comprovam o sucesso da síntese.

7.2.3 Copolímeros em distribuição aleatória

Foram obtidos com sucesso 2 (dois) copolímeros em distribuição aleatória: $\text{PMMA}_{30}\text{-co-DMAEMA}_{63}$ e $\text{PMMA}_{31}\text{-co-DMAEMA}_{70}$. Os valores de polidispersidade (M_w/M_n) se mostraram baixos e os copolímeros com morfologia e composição monomérica bastante próximos do planejado. A tabela a seguir apresenta alguns parâmetros moleculares obtidos via GPC.

Tabela 21. Parâmetros moleculares via GPC de copolímeros em distribuição aleatória sintetizados por RAFT

| Estrutura | M_w | M_n [g.mol ⁻¹] | M_w/M_n |
|--|--------|------------------------------|-----------|
| $\text{PMMA}_{30}\text{-co-DMAEMA}_{63}$ | 17.130 | 12.800 | 1,33 |
| $\text{PMMA}_{31}\text{-co-DMAEMA}_{70}$ | 20.180 | 14.000 | 1,44 |

As **Tabelas 22** e **23** apresentam, respectivamente, as frequências vibracionais observadas por análises de FTIR e os deslocamentos químicos dos prótons (análises de RMN de ^1H) presentes nas estruturas dos meros que compõem cada material, que são condizentes com copolímeros de elevada pureza constituídos de MMA e DMAEMA (DE SOUZA; NAVES; FLORENZANO, 2012; DE SOUZA et al., 2011; FRANCO et al., 2017; HADJANTONIOU et al., 2010).

Tabela 22. Frequências vibracionais por FTIR de copolímeros em distribuição aleatória sintetizados por RAFT

| Estrutura | Frequência (cm ⁻¹) dos grupos funcionais característicos | | | |
|---|--|---|-------------|-------------|
| | (C-H) | (C-H ₂ /C-H ₃) | (C=O / C-O) | (C-H) |
| PMMA ₃₀ -co-DMAEMA ₆₃ | 2820 e 2767 | 2948 1386 e 1398 (CH ₃ - dimetilgeminal) | 1725 | 2820 e 2767 |
| PMMA ₃₁ -co-DMAEMA ₇₀ | 2820 e 2767 | 2948 1386 e 1398 (CH ₃ - dimetilgeminal) | 1725 | 2820 e 2767 |

Tabela 23. Principais deslocamentos químicos (RMN de ¹H) de copolímeros em distribuição aleatória sintetizados por RAFT

| Estrutura | Deslocamentos químicos (δ) característicos (ppm) | | | | | |
|---|--|-------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------|
| | CCH ₂ | *CCH ₃ | OCH ₃ | OCH ₂ | NCH ₂ | NCH ₃ (dimetil) |
| PMMA ₃₀ -co-DMAEMA ₆₃ | 0,88 | 1,83 | 3,59 | 4,05 | 2,56 | 2,28 |
| PMMA ₃₁ -co-DMAEMA ₇₀ | 0,88 | 1,82 | 3,59 | 4,06 | 2,56 | 2,29 |

*δ referentes aos prótons(CCH₃) de DMAEMA, em região próxima também em MMA

A seguir, detalhes das caracterizações dos copolímeros obtidos.

PMMA₃₀-co-DMAEMA₆₃ e PMMA₃₁-co-DMAEMA₇₀

Ambos os copolímeros apresentaram aspecto viscoso, com coloração amarelada e facilmente solúvel em água. A **Figura 30** (abaixo) apresenta os tempos de eluição por GPC dos materiais puros.

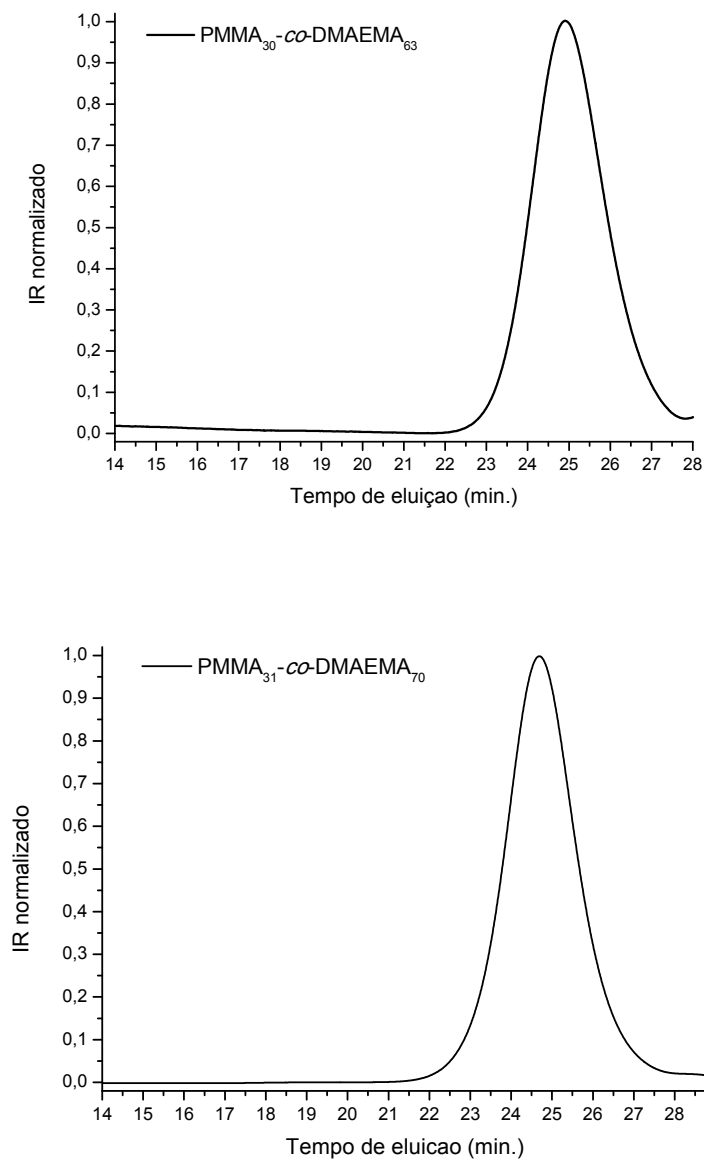


Figura 30. Tempos de eluição por GPC de: (acima) PMMA₃₀-co-DMAEMA₆₃, e; (abaixo) PMMA₃₁-co-DMAEMA₇₀, ambos puros.

A reação, que deu origem aos dois copolímeros, foi monitorada por GPC, conforme mostra a **Figura 31** (detalhes sobre a síntese na sessão *métodos*). O deslocamento do sinal para menores tempos de eluição caracteriza o crescimento das cadeias e aumento do peso molecular.

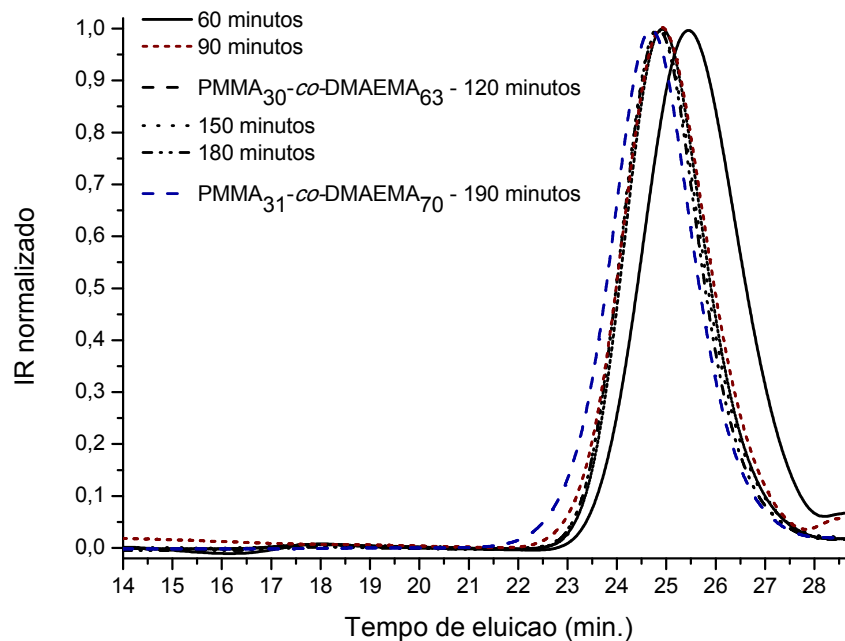


Figura 31. Tempos de eluição por GPC de alíquotas da mistura reacional em função do tempo, sendo: a) 60 minutos; b) 90 minutos; c) 120 minutos (fração que originou o $\text{PMMA}_{30}\text{-co-DMAEMA}_{63}$); d) 150 minutos; e) 180 minutos e; f) 190 minutos (fração que originou o $\text{PMMA}_{31}\text{-co-DMAEMA}_{70}$)

O crescimento das cadeias poliméricas foi monitorado. Para isso, alíquotas coletadas em intervalos de 30 minutos após o início da reação foram imediatamente injetadas no cromatógrafo (GPC). No momento em que as cadeias em crescimento na mistura alcançaram a massa molar desejada, metade do conteúdo da mistura reacional foi coletada e submetida ao processo de purificação, permitindo a obtenção do primeiro copolímero: $\text{PMMA}_{30}\text{-co-DMAEMA}_{63}$. A mistura reacional resultante no balão reacional foi mantida polimerizando até o tempo de 190 minutos, momento em que o segundo copolímero alcançou massa molecular próxima do

planejado. Essa mistura também foi purificada, originando o copolímero de PMMA₃₁-co-DMAEMA₇₀.

Em polimerizações deste tipo, os meros de MMA e DMAEMA são inseridos nas cadeias de forma aleatória (embora controlada, conforme sínteses por RAFT). É mais favorável a inserção de meros de DMAEMA nas cadeias em crescimento, pelo fato desse monômero se encontrar em maior quantidade na mistura reacional.

Nos espectros de RMN de ¹H (espectros em **material complementar, MC33 e MC35**) nota-se a presença de sinais de deslocamento em 4,15 ppm (referente ao grupo metila do DMAEMA) e 3,60 ppm (referente a metila terminal do MMA). Os espectros de FTIR (**material complementar, MC34 e MC36**) apresentaram sinais característicos em 2826, 2773, 2951, 1728 e 1030 cm⁻¹ que apoiam essas observações e, em sintonia com os demais resultados, sugerem a obtenção de copolímeros de elevada pureza, próximos ao idealizado.

8. APLICAÇÕES BIOLÓGICAS E BIOMIMÉTICAS

8.1 Formação de polimerossomos

DMAEMA é um polieletrólito fraco em água com um valor de pKa de ~ 8,44. O monômero DMAEMA possui um grupo amino terciário que pode sofrer alterações no grau de protonação em função do pH (Em reduzido pH tende a ocorrer a protonação desses grupos amino, aumentando a carga líquida positiva da cadeia polimérica). Esta resposta protonação/desprotonação dependente do pH do DMAEMA que pode alterar a razão hidrofílica-hidrofóbica dos copolímeros correspondentes. Então, isso pode alterar a morfologia, bem como o tamanho das

estruturas automontadas em diferentes valores de pH. O comportamento das partículas formadas em função da temperatura, em tampões com diferentes valores de pH, foi explorado por DLS. (**Tabela 24 e Figura 32**)

| PDMAEMA₃₁₅-<i>b</i>-PS₂₄₄ | | | | |
|--|-----|----------------------------------|-------------|---------------------|
| Tampão | pH | Diâmetro (número médio, nm) (DP) | PDI (DP) | Potencial Zeta (DP) |
| Acetato | 5,0 | 96 (6) | 0,64 (0,20) | + 44,2 (1,9) |
| Tris-HCl | 7,4 | 147 (25) | 0,71 (0,24) | + 29,3 (3,9) |
| Tris-HCl | 8,0 | 86 (26) | 0,54 (0,06) | + 25,0 (2,4) |
| Fosfato | 8,0 | 93 (9) | 0,45 (0,05) | + 12,8 (1,0) |

| PDMAEMA₃₁₅-<i>b</i>-PS₇₈₁ | | | | |
|--|-----|----------------------------------|-------------|---------------------|
| Tampão | pH | Diâmetro (número médio, nm) (DP) | PDI (DP) | Potencial Zeta (DP) |
| Acetato | 5,0 | 104 (18) | 0,46 (0,02) | + 43,0 (1,0) |
| Tris-HCl | 7,4 | 80 (20) | 0,36 (0,08) | + 33,5 (1,2) |
| Tris-HCl | 8,0 | 58 (3) | 0,29 (0,06) | + 20,9 (2,1) |
| Fosfato | 8,0 | 111 (19) | 0,29 (0,11) | + 12,6 (0,5) |
| | | 104 (18) | 0,46 (0,02) | + 43,0 (1,0) |

Tabela 24. Efeito do pH e diferentes tampões nos Número Médio e Potencial Zeta dos polimerossomos. DP é o desvio padrão da medida.

Comparando-se os valores do Número Médio de partículas nos tampões TRIS-HCl pHs 7,4 e 8,0 observa-se que o número de partículas diminui com o aumento de pH, o que sugere que com a diminuição da carga dos grupos amino ocorre maior agregação dos copolímeros, resultando na diminuição do número de partículas. Por outro lado, comparando-se o número de partículas dos polímeros no mesmo pH (pH=8), observa-se que em tampão fosfato o número de partículas é maior do que em TRIS-HCl, o que sugere que, apesar da maior eficiência do fosfato em neutralizar as partículas do que o Cl⁻ (o que pode ser verificado pelo valor do

potencial zeta, que é menor nas partículas em tampão fosfato do que em Tris/HCl), os agregados são menores em tampão fosfato, talvez devido a uma maior compactação entre os meros das partículas. Esta análise é particularmente difícil de fazer e exigiria mais experimentos na medida em que, em pH 8, o tampão TRIS-HCl está aproximadamente 50 % protonado e portanto a concentração de Cl^- também é 50 % da concentração total do tampão enquanto que, o tampão fosfato, em pH 8, está majoritariamente desprotonado ($\text{pK}_a = 7.21$) e com duas cargas negativas e, portanto, é difícil comparar o seu comportamento com o do Cl^- pois suas concentrações e cargas são diferentes.

Os resultados mostram haver aumento dos valores de Potencial Zeta para amostras contendo agregados preparados em tampões com menores valores de pH, sugerindo aumento do grau de protonação do grupo amino terciário das cadeias de PDMAEMA, à medida que o pH do meio decresce.

Resultados das análises de amostras preparadas em tampões Tris-HCl e fosfato, ambos em pH 8, mostram menores valores de Potencial Zeta para amostras preparadas em tampão fosfato. É possível que isso ocorra porque as cargas negativas dos grupos fosfato do tampão estejam neutralizando as cargas positivas dos grupos amino do PDMAEMA com maior eficiência do que os ânions Cl^- do tampão Tris-HCl.

A **Figura 32** apresenta o comportamento das partículas formadas em diferentes tampões, em função da temperatura.

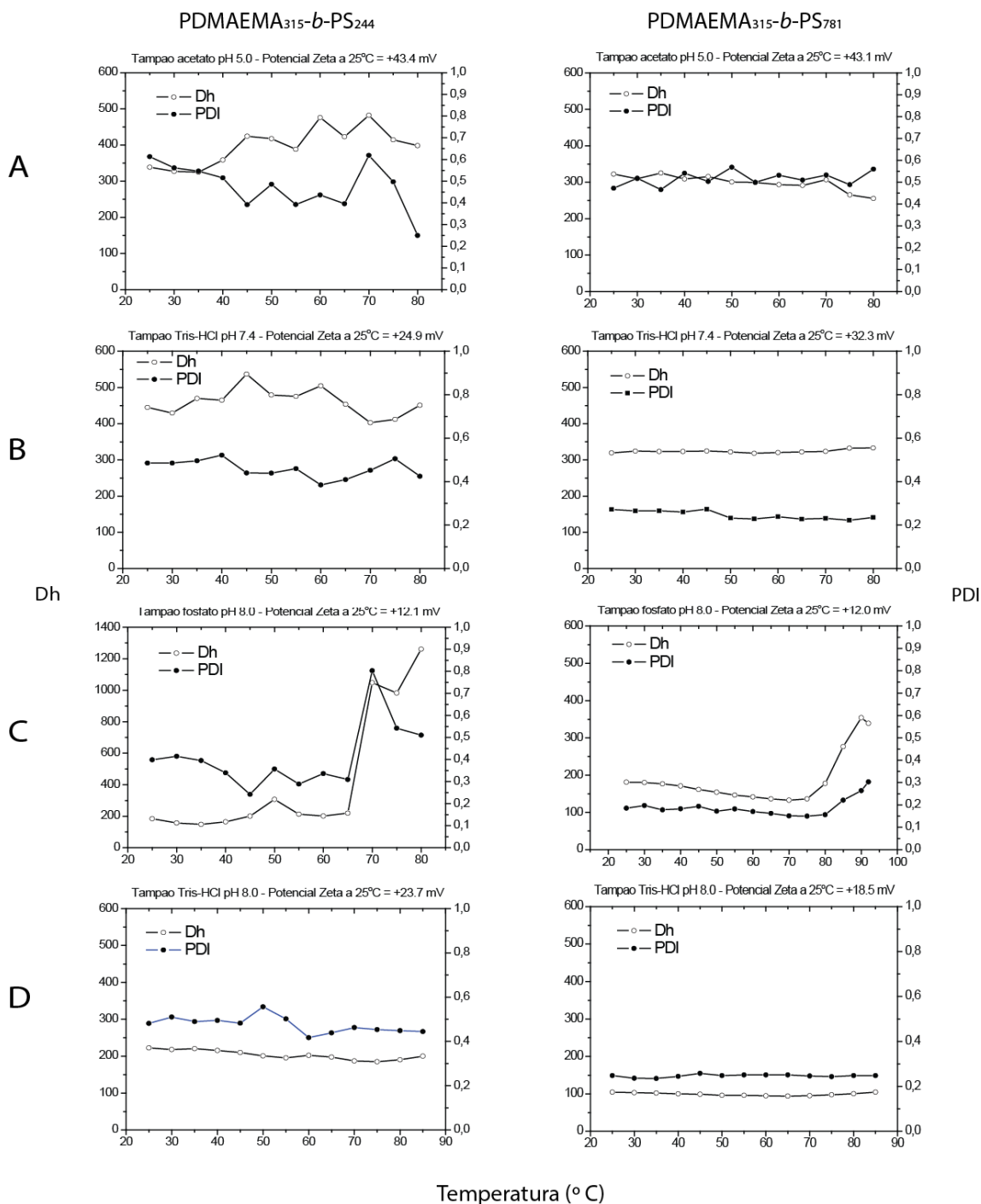


Figura 32. Diâmetro hidrodinâmico (Dh) e potencial zeta em função da temperatura e pH de partículas de PDMAEMA₃₁₅-b-PS₂₄₄ (esquerda) e PDMAEMA₃₁₅-b-PS₇₈₁ (direita) em diferentes tampões. (A): tampão acetato - pH 5,0; (B): tampão Tris-HCl - pH 7,4; (C) tampão fosfato - pH 8,0 e; (D) tampão Tris-HCl - pH 8.

O tamanho das partículas formadas é compatível com vesículas em todas as condições estudadas, sugerindo que esses sistemas, preparados de maneira simples, formam polimerossomos. Parece haver aumento do diâmetro hidrodinâmico das partículas de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ a partir de 65 °C e de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁, a partir de 85 °C, mas somente quando foram preparados em tampão fosfato. À medida que o pH aumenta, os grupos amino ficam menos carregados positivamente, reduzindo a repulsão entre as cargas positivas e isso deveria ocasionar a redução do diâmetro hidrodinâmico dos polimerossomos. Entretanto, esse comportamento não foi observado. Por outro lado, a diminuição da repulsão eletrostática entre os grupos amino pode levar ao aumento do número de agregação dos copolímeros e, conseqüentemente, aumento do número de agregação e do diâmetro.

A fim de verificar se as partículas possuíam compartimento interno hidrofílico (uma característica de polimerossomos), foram realizados estudos de incorporação de sonda hidrossolúvel, por estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica. Ensaio RPE indicaram a presença de um compartimento hidrofílico e a não permeabilidade da sonda incorporada no interior das partículas, sendo isso constatado pela manutenção do sinal RPE residual, após a supressão do sinal da sonda por ácido ascórbico (vide métodos). A porcentagem calculada de incorporação foi de 0,59 e 0,53% do volume total da amostra (1 mg de copolímero em 1 mL de solução), respectivamente para PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ e PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁. (**Tabela 25**)

Tabela 25: Sinais residual e total por RPE antes e depois da adição de ascorbato, Percentagem de encapsulação e volume total do compartimento aquoso de uma solução a 1 mg/mL de polimerossomos de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ e PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ em tampão Tris-HCl 0.01 M, pH 7.4.

| Amostra | Total do sinal (RPE) (x10 ⁻³) | Sinal RPE residual (x10 ⁻³) | % de encapsulação | Volume interno total (µL) /% |
|--|--|--|----------------------|---------------------------------|
| Controle | 2,816 | Não detectável | ---- | ---- |
| PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₂₄₄ | 2,790 | 0,01063 | 0,59 ± 0,07 | 1,00 (0,60%) |
| PDMAEMA ₃₁₅ - <i>b</i> -PS ₇₈₁ | 2,706 | 0,0143 | 0,53 ± 0,05 | 0,90(0,53%) |

A estrutura da sonda de CAT utilizada e o sinal RPE estão disponíveis em **material complementar, MC37 e MC38**, respectivamente. (RAUCKMAN; ROSEN; ABOU-DONIA, 1976)

Comparando-se a eficiência de encapsulação nas partículas formadas pelos dois copolímeros, dada a sua concentração em termos de massa (mg/mL), ambos atingiram aproximadamente o mesmo grau de encapsulação. Devido à diferença de tamanho e massa molar, conseqüentemente, o PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ apresentou maior eficiência de encapsulação por molécula. Também foram realizados cálculos de modelagem das partículas (não apresentados), usando dados de volume de partículas DLS. Os resultados sugerem um volume (fração) de encapsulação de aproximadamente 0,55% (PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄) e 0,49% (PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁) de encapsulação e são consistentes com o observado nos experimentos de RPE.

As análises das partículas em água por Microscopia Eletrônica de Transmissão por Coloração Negativa revelaram predominantemente vesículas de 80 nm de diâmetro médio para ambos os materiais (**Figuras 33 e 34**).

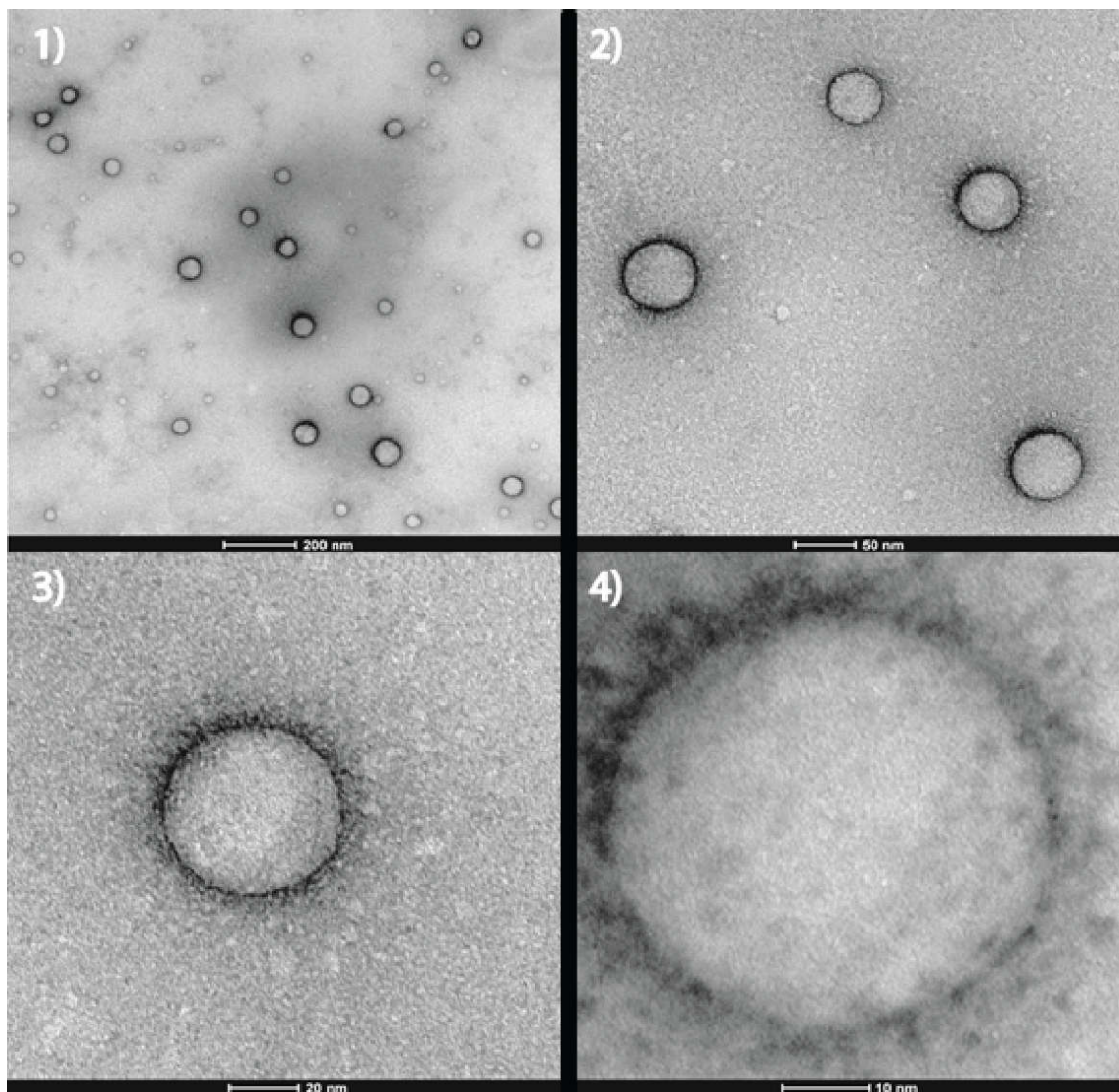


Figura 33. Imagens por Microscopia Eletrônica de Transmissão por Coloração Negativa de polimerossomos de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄. Os polimerossomos foram montados em tampão Tris-HCl a 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4). As escalas estão na figura.

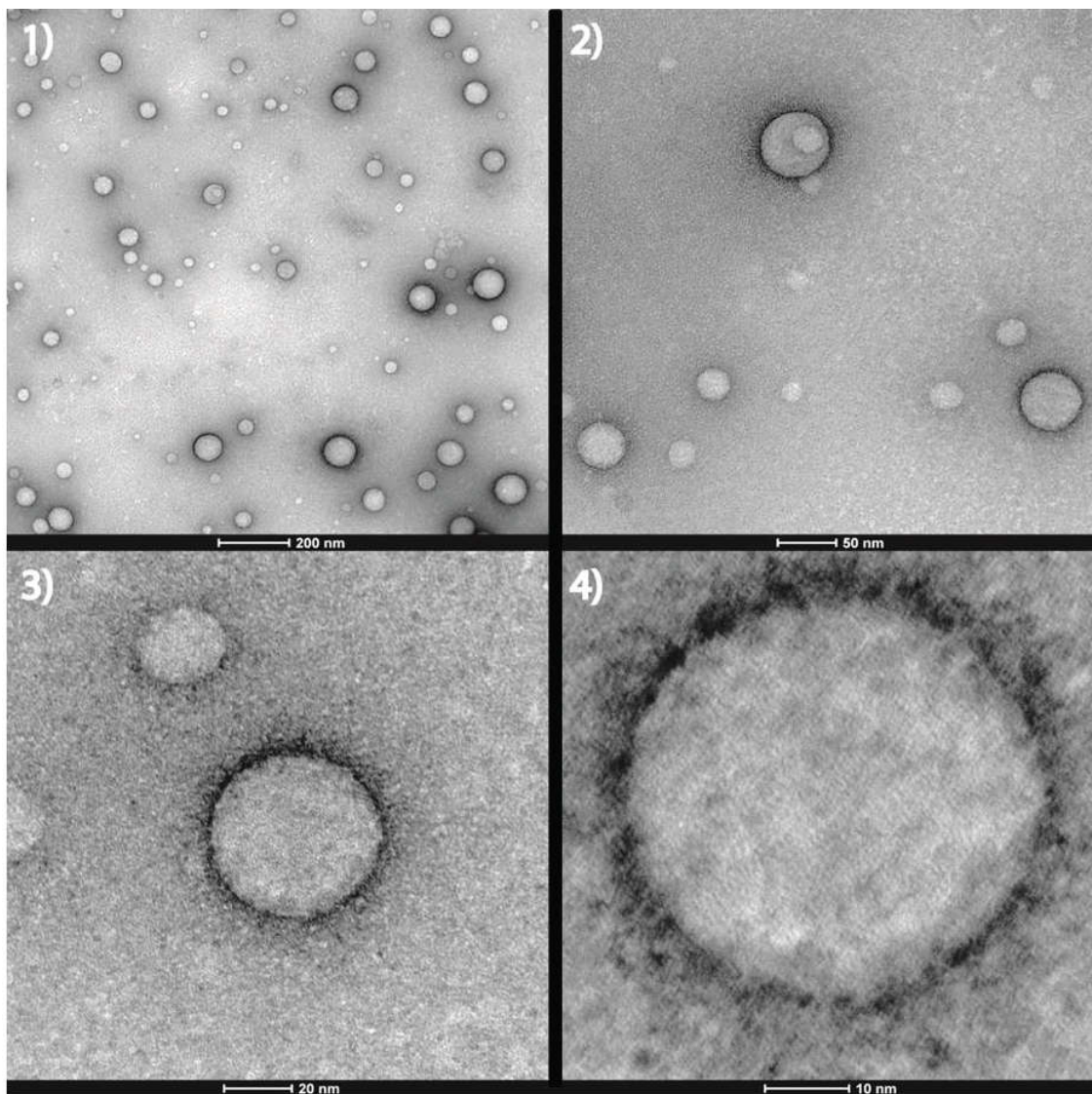


Figura 34. Imagens por Microscopia Eletrônica de Transmissão por Coloração Negativa de polimerossomos de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁. Os polimerossomos foram montados em tampão Tris-HCl a 10 mmol.L⁻¹ (pH 7.4). As escalas estão na figura.

O diâmetro médio observado para os polimerossomos visualizados por análises de microscopia eletrônica pareceu ser significativamente menor do que o observado no DLS. Isso pode se justificar pelo fato de que as amostras medidas por microscopia estavam no estado seco e isso está em concordância com o preconizado na literatura (BHATTACHARJEE, 2016). Por causa do processo de

preparo das amostras, que envolve a remoção de água, os polimerossomos podem estar em uma condição mais compacta, sem camadas de solvatação. Nas análises de DLS, as coroas dos polimerossomos podem estar solvatadas, com moléculas de água associadas às partículas o que induz aumento do D_h (BHATTACHARJEE, 2016; SPECTROSCOPY; SCATTERING; MOTION, 2011).

As imagens obtidas parecem mostrar polimerossomos de diferentes diâmetros, dando a falsa impressão de alta polidispersidade. No entanto, isso não ocorre, porque os polimerossomos, quando observados ao microscópio, se apresentam em diferentes planos de profundidade na grade. As análises de DLS apresentadas em sessão anterior mostram polimerossomos com diâmetros hidrodinâmicos relativamente próximos, sugerindo baixa polidispersidade.

Os resultados obtidos por RPE e MET permitem inferir que os polimerossomos possuem um compartimento hidrofílico interno separado do invólucro hidrofílico externo por uma camada hidrofóbica. A camada hidrofóbica é formada por blocos de PS e os núcleos hidrofílicos pelos blocos de PDMAEMA, de acordo com a representação esquemática (**Figura 35**).

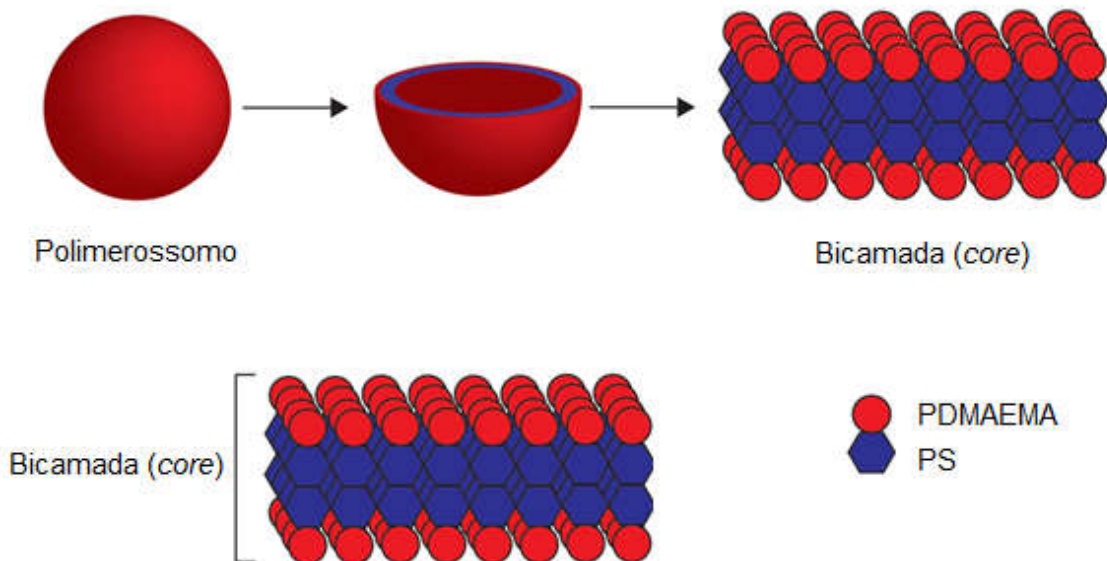


Figura 35. Representação esquemática sugerida para a morfologia de um polimerossomo, com base nos resultados obtidos por DLS, RPE e Microscopia Eletrônica de Transmissão por Coloração Negativa

As camadas hidrofílicas interna e externa, por serem formadas por blocos de PDMAEMA (que possuem grupos carregados positivamente), podem tornar os polimerossomos obtidos interessantes para entrega de genes, pois as cargas positivas dos grupos amino do PDMAEMA complexam DNA (LEE et al., 2011; WETERING et al., 1998). Além disso, os polimerossomos formados possuem uma camada interna hidrofílica capaz de aprisionar água, o que os torna potenciais candidatos a nanoreatores (ZHU et al., 2017).

8.2 Polímeros para a Transfecção de genes

Embora os homopolímeros de PDMAEMA se liguem ao DNA (ARIGITA et al., 1999; XUE et al., 2014), a transferência de DNA com estes polímeros para

células bacterianas não foi descrita. A ligação PDMAEMA/DNA resulta de interações eletrostáticas (WETERING et al., 1998). Não há estudos que demonstrem se a transfecção bacteriana está relacionada com o equilíbrio hidrofóbico/hidrofílico do material polimérico. Para testar se o aumento da hidrofobicidade poderia aumentar a capacidade do polímero para mediar a transferência de DNA para células bacterianas, foram desenvolvidos copolímeros anfipáticos de diferentes tamanhos e composições. Polímeros de PMMA, PDMAEMA e dois copolímeros contendo ambas as unidades e diferentes proporções de monômeros foram sintetizados para verificar o impacto das relações DMAEMA/MMA na eficiência de transformação bacteriana. O MMA foi escolhido como o componente hidrofóbico porque forma materiais biocompatíveis para uma ampla variedade de aplicações na indústria biomédica (ALI; KARIM; BUANG, 2015; QING, 2006).

Copolímeros de PMMA-co-PDMAEMA foram sintetizados via polimerização de radical livre ou via RAFT (ver Métodos). Homopolímeros de PDMAEMA e PMMA foram sintetizados via RAFT.

Para testar se os copolímeros selecionados contendo DMAEMA se ligam ao DNA, foram realizados experimentos em eletroforese em gel de agarose de um DNA plasmideal (pUC19) (**Figura 36**). O pUC19 é um vetor de clonagem padrão com elevado teor de cópias contendo o gene lacZ, que codifica para a β -galactosidase. A migração eletroforética de pUC19 no gel de agarose produziu duas bandas, uma correspondendo a DNA circular, migrando com tamanho aparente > 10 kb, e DNA super-enrolado migrando com tamanho aparente de 2 kb (**Figura 36**). Este comportamento é consistente com DNA plasmideal não clivado. A adição de PDMAEMA₃₁₅ ou PMMA₃-co-PDMAEMA₂₆ (FRP) e PMMA₃₁-co-PDMAEMA₇₀ (RAFT)

levou à migração alterada de pUC19 no gel de agarose e até mesmo retenção de DNA próximo ao slot de aplicação. O PMMA₆₀, por outro lado, não afetou a migração do pUC19.

A ligação ao DNA, portanto, foi relacionada à presença de PDMAEMA, uma vez que as amostras de DNA contendo apenas polimetacrilato de metila (PMMA₆₀) nas concentrações de 30 e 50 µg não exibiram um desvio da banda de DNA no gel de agarose (**Figura 36**). No geral, essas observações mostraram que polímeros contendo PDMAEMA, com uma carga líquida positiva, são necessários para a ligação do DNA e mudanças de mobilidade eletroforética (WETERING et al., 1998).

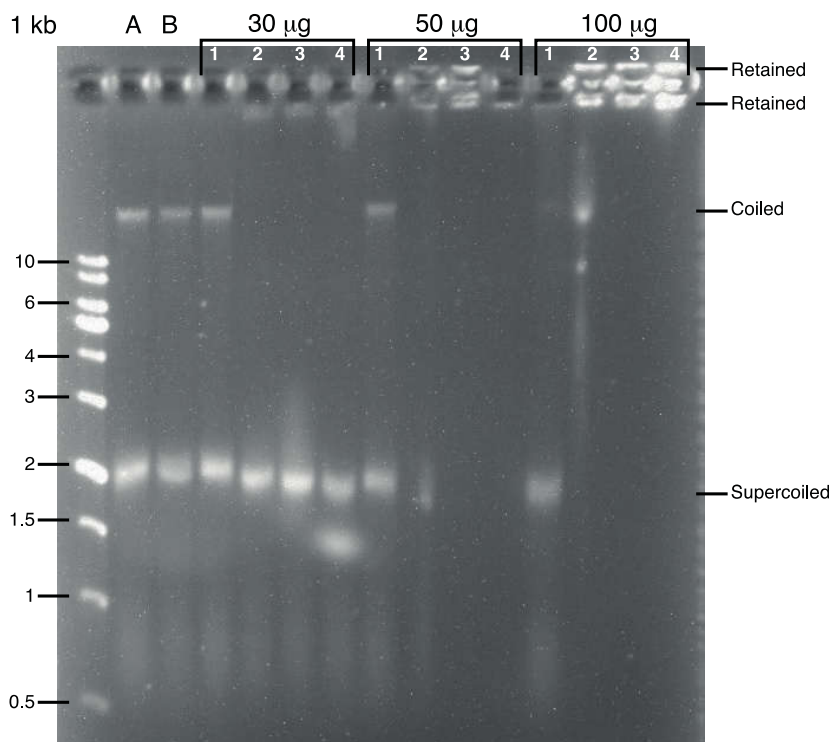


Figura 36. Eletroforese em gel de agarose dos copolímeros e do DNA plasmideal pUC19. A ligação de pUC19 aos copolímeros muda sua banda de migração no gel de agarose. A eletroforese foi realizada durante 90 minutos a 50 volts. As seguintes quantidades de copolímeros foram testadas: 30, 50 e 100 µg. As pistas (*lanes*) A e B referem-se aos controles que correspondem ao DNA apenas na presença de THF (A) ou tampão (B), adicionados em substituição do copolímero. Os copolímeros adicionados em cada experiência são indicados por números: 1 = PMMA₆₀; 2 = PDMAEMA₃₁₅; 3 = PMMA₃-co-PDMAEMA₂₆ (FRP); 4 = PMMA₃₁-co-PDMAEMA₇₀.

Depois de se observar que os copolímeros contendo PDMAEMA se ligam ao DNA plasmideal, investigou-se se estes polímeros foram capazes de mediar a entrega de pUC19 em células de *E. coli* não competentes. Colônias bacterianas que receberam o DNA pUC19 podem ser identificadas pelo teste de triagem branco-azulado (do inglês: *blue-white screening test*). Nesta experiência, a expressão do gene *lacZ* após a indução com IPTG resulta em uma β -galactosidase funcional que catalisa a reação de clivagem da ligação glicosídica no substrato cromogênico X-Gal

adicionado às placas de ágar, produzindo um pigmento azul e, portanto, as colônias adquirem cor azulada (ZHANG, 2016).

Bactérias transformadas com pUC19 funcional foram identificadas como colônias azuis em placas de ágar (**Figura 37**). Apenas as células de *E. coli* que foram incubadas com PMMA₃-co-PDMAEMA₂₆ (FRP) ou PMMA₃₁-co-PDMAEMA₇₀, mas não com PDMAEMA₃₁₅ ou PMMA₆₀ (não mostradas), produziram colônias de cor azul nas placas de ágar. Uma única colônia azul da experiência anterior foi plaqueada em uma nova placa LB-agar contendo IPTG e X-Gal, produzindo colônias azuis adicionais após 12 horas de incubação a 37 °C (**Figura 37**), mostrando que as colônias transformadas estavam totalmente funcionais, restando a capacidade de crescer e expressar β-galactosidase.

O crescimento de células de *E. coli* foi mais lento na presença de copolímero do que na sua ausência. Após transformação na presença de copolímeros, novas colônias foram observadas visualmente em placas somente após 36 horas de incubação a 37 °C, ao invés do tempo usual de crescimento de 12 horas. A fim de quantificar a eficiência de transformação do copolímero, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi quantificada e comparada com um método de transformação padrão baseado no choque térmico de células de *E. coli* quimicamente competentes. As eficiências de transformação de copolímero dependeram da quantidade de copolímero utilizada, e a melhor foi de 0,5 µg, sob as condições testadas (**Tabela 26**). Neste intervalo de concentração, o método de transformação padrão produziu cerca de cinco vezes mais colônias do que a transformação de *E. coli* não competente induzida pela presença dos copolímeros (**Tabela 26**). Considerando que a experiência de transformação de *E. coli* induzida

pelo polímero foi realizada utilizando uma razão bactéria/DNA aproximadamente 8 vezes superior a utilizada no experimento de controle (ver a seção de métodos), a transformação mediada por copolímero foi 40 vezes menos eficiente que o método usual de transformação química. O ajuste fino da morfologia dos copolímeros pode resultar em polímeros vetores mais eficientes. Não observamos colônias azuis quando células de *E. coli* foram transfectadas na presença de PMMA₆₀, em consonância com a observação de que este polímero não se liga ao DNA (**Figura 37**). Curiosamente, o homopolímero PDMAEMA₃₁₅ também não conseguiu transformar as células de *E. coli*, embora se ligue ao DNA (**Figura 37**).

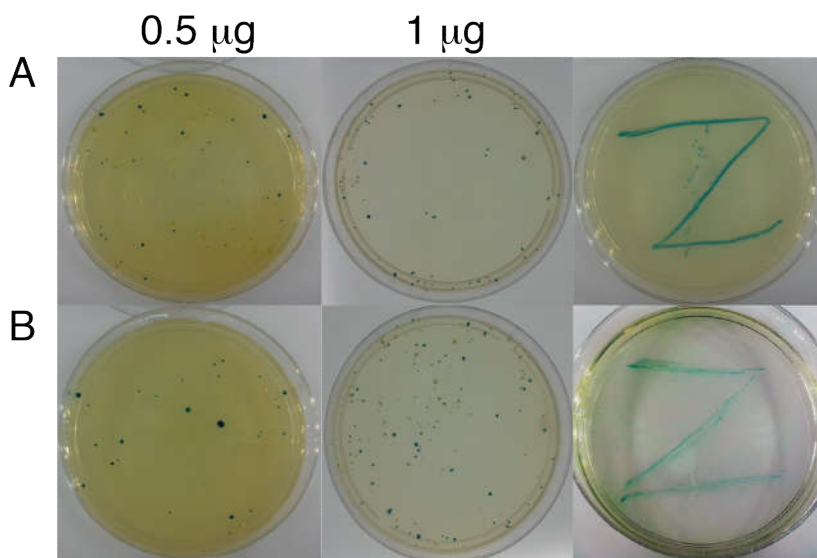


Figura 37. Expressão de pUC19 em *E. coli* DH5α de acordo com o teste de triagem branco-azulado (*blue-white screening test*). **A)** PMMA₃-co-PDMAEMA₂₆ (FRP) **B)** PMMA₃₁-co-PDMAEMA₇₀. A quantidade de copolímero utilizada nesta experiência foi de 0,5 μg (esquerda) ou 1 μg (do meio). A terceira coluna refere-se à inoculação de uma única colônia azulada (1 μg) em uma nova placa de ágar contendo IPTG e X-Gal. Os controles foram realizados na ausência do polímero que foi substituído por THF ou tampão e não apresentaram colônias.

Tabela 26: Eficiência de transformação de *Escherichia coli* (UFC – unidades formadas de colônia)

| Polímero | Número de colônias | | | |
|--|----------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | 0,25 µg ^c | 0,5 µg ^c | 1 µg ^c | 5 µg ^c |
| PDMAEMA ₃₁₅ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PMMA ₆₀ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| PMMA ₃ -co-PDMAEMA ₂₆ (FRP) | 10 ± 2,1 | 53 ± 4,2 | 31 ± 25,7 | 1 ± 0,6 |
| PMMA ₃₁ -co-PDMAEMA ₇₀ | 4 ± 4,0 | 43 ± 6,0 | 48 ± 23,1 | 0 |
| THF | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tampão | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Choque térmico (Heat shock) ^b | 350 ± 42,1 | 220 ± 6,1 | 180 ± 8,1 | 160 ± 4,6 |
| Choque térmico (Heat shock) ^a | 0 | 0 | 0 | 0 |

^a Células não competentes; ^b Células quimicamente competentes; ^c Quantidade de polímero adicionado (a partir de 1 mg / mL de solução de THF). Os valores reportados são a média e o desvio padrão de três experiências

A presença de uma pequena fração de PMMA nas cadeias de polímeros foi necessária para transfecção. Note que apenas um homopolímero de PDMAEMA foi usado e esse polímero foi obtido exclusivamente pela RAFT. Uma mudança sistemática desses parâmetros ainda é necessária para descobrir se o PDMAEMA não é capaz de transferir o DNA para as bactérias, independentemente das variáveis. A **Tabela 26** também indica que o copolímero obtido pelo FRP (PMMA₃-co-PDMAEMA₂₆) é mais eficiente para transformar *E. coli* do que a obtida pela RAFT (PMMA₃₁-co-PDMAEMA₇₀). Esses dois copolímeros diferem em três características: massa molar total, composição diferencial e método de síntese. Qualquer uma dessas variáveis, ou sua combinação, pode explicar a diferença na capacidade de

transferência. A massa molar está relacionada com o tamanho do políplexo formado pela combinação com o DNA, assim como a toxicidade.

A composição diferencial está relacionada ao balanço hidrofílico / hidrofóbico, que pode ser, sem dúvida, um fator significativo para a interação da superfície bacteriana com o políplexo. Finalmente, os polímeros RAFT apresentam um grupo enxofre em uma ou ambas as extremidades da cadeia, o que pode afetar o processo de transferência e a toxicidade. Os polímeros FRP, por outro lado, apresentam heterogeneidade inter-cadeias composicional, dificultando saber quais cadeias são os melhores agentes de transferência, em termos de composição. No caso específico, isso não é um grande problema, já que a reatividade dos comônômeros não é muito diferente.

Os copolímeros de PDMAEMA e PMMA mediam a transfecção de *E. coli*. O ajuste fino da composição do polímero pode resultar em sistemas de transfecção mais eficientes e menos tóxicos.

A transferência de DNA estranho para células bacterianas geralmente envolve a geração de competência por um tratamento químico com CaCl_2 seguido por uma perturbação por choque térmico. Alternativamente, pode-se usar a eletroporação, na qual um pulso elétrico forte e curto é aplicado para perturbar a bicamada lipídica, permitindo a penetração de moléculas carregadas, como o DNA. Embora essas técnicas sejam estratégias bem estabelecidas para fornecer DNA a organismos procariotas, como *Escherichia coli*, a transformação de outras células procarióticas, como *Leptospira sp*, uma bactéria patogênica de grande importância para a saúde pública, ou *Xanthomonas campestris*, uma bactéria fitopatogênica que infecta economicamente culturas essenciais, não é simples. Por isso, métodos de

entrega de DNA mais simples e mais eficientes para organismos procarióticos são desejáveis e encontrarão aplicações em situações específicas.

9. Conclusão

Foram sintetizados com sucesso diversos polímeros, via Polimerização Radicalar Livre e Controlada (RAFT). Todos os materiais foram devidamente caracterizados RMN de ^1H e FTIR. A massa molar média e sua distribuição foram obtidas por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). Essas informações foram devidamente utilizadas para a análise de todos os polímeros obtidos e auxiliaram nos estudos de correlação estrutura/atividade.

Dois copolímeros, PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ e PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ se mostraram, por meio de um modo simples de preparo, ser capazes de formar polimerossomos, em água. Os polimerossomos obtidos apresentaram camadas hidrofílicas (interna e externa) separadas por uma camada hidrofóbica constituída de poliestireno e isso os qualifica como potenciais candidatos à entrega de genes e à formação de nanoreatores. Os polimerossomos apresentaram resposta ao pH e temperatura. Entretanto, são necessários mais estudos para melhor compreender o seu comportamento.

A presente tese também demonstrou como copolímeros baseados em MMA e DMAEMA entregam DNA em *E. coli*, induzindo a transformação delas. A composição do polímero determinou a capacidade de transfecção, deste modo, os polímeros hidrofílicos contendo apenas DMAEMA foram incapazes de mediar a transfecção em *E. coli* (vide **Figura 37 e Tabela 26**). Esses resultados abrem caminho para o desenvolvimento de novos agentes de entrega de DNA, candidatos a uma variedade de aplicações.

10. Perspectivas

Os polímeros apresentados nesta tese estão sendo testados quanto à capacidade de entregar genes em células eucarióticas. Esses estudos, realizados em colaboração com o prof. Dr. Alexander Henning Ulrich e a Dra. Ana Regina Geciauskas Lage Castillo, têm se mostrado bastante promissores. Outros copolímeros se mostraram capazes de isolar e extrair uma complexa proteína de membrana: NCX-Mj. Esses estudos foram realizados em parceria com o prof. Dr. Roberto K. Salinas e serão publicados em breve. Os resultados obtidos permitirão desenvolver novos polímeros sob medida, aprimorados e, provavelmente, mais eficientes.

11. REFERENCIAS

AHMED, M.; NARAIN, R. Progress of RAFT based polymers in gene delivery Progress in Polymer Science, v. 38, n. 5, p. 767–790, 2013.

ALI, U.; KARIM, K. J. B. A.; BUANG, N. A. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). Polymer Reviews, 55: 678-705, 2015.

ARIGITA, C. et al. Association and dissociation characteristics of polymer/DNA complexes used for gene delivery. Pharmaceutical Research, v. 16: p. 1534-1541, 1999.

ARSLAN, H.; ZIRTIL, O.; BÜTÜN, V. The synthesis and solution behaviors of novel amphiphilic block copolymers based on d-galactopyranose and 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate. European Polymer Journal, v. 49, n. 12, p. 4118–4129, 2013.

BAI, Y. X. et al. Synthesis and characterization of amphiphilic antibacterial copolymers. Polymers for Advanced Technologies, v. 23, n. 3, p. 581–587, 2012.

BARNER-KOWOLLIK, C. Handbook of RAFT Polymerization. 2008.

BENAGLIA, M. et al. Universal (Switchable) RAFT agents. Journal of the American Chemical Society, v. 131, n. 20, p. 6914-6915, 2009.

BERGMANS, H. E. N.; VAN DIE, I. M.; HOEKSTRA, W. P. M. Transformation in Escherichia coli: stages in the process. Journal of Bacteriology, v. 146, n. 2, p. 564-70, 1981.

BERMUDEZ, H. et al. Molecular weight dependence of polymersome membrane structure, elasticity, and stability. Macromolecules, v. 35, n. 21, p. 8203-8208, 2002.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? Journal of Controlled Release, v. 28, n. 238, p. 311-312, 2016.

BIRTLES, R. Leptospira Infections. In: Infectious Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe, V. 49, N. 3, p. 757-758, 2013.

BOYER, C. et al. Bioapplications of RAFT Polymerization. Chemical Reviews, v. 109, n. 11, p. 5402–5436, 2009.

BRAUNECKER, W. A.; MATYJASZEWSKI, K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. Progress in Polymer Science, v. 32, n. 1, p. 93–146, 2007.

CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F. et al. Síntese de copolímeros metacrílicos através da modificação química do poli(metacrilato de metila) de massa molar Controlada. Polímeros, v. 9, p. 156–162, 1999.

CHAN, J.; DAVIS, C.; JOKIC, I. Influences of growth temperature and preparation of competent cells on efficiency of chemically-induced transformation in *Escherichia coli* DH5 α . *J. Exp. Microbiol. Immunol.*, v. 9, p. 92-96, 2006.

CHE, H.; HEST, J. C. M. VAN. Stimuli-responsive polymersomes and nanoreactors. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 4, p. 4632–4647, 2016.

CHERNG, J. Y. et al. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v.13, n. 7, p. 1038–1042, 1996.

CHIEFARI, J. et al. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition - Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process We wish to report a new living free-radical polymer- ization of exceptional effectiveness and versatility. *Macromolecules*, v. 9297, n. 98, p. 5559–5562, 1998.

CHONG, Y. K. et al. Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization of Methyl Methacrylate in the Presence of Lewis Acids: An Approach to Stereocontrolled Living Radical Polymerization. *Macromolecules*, v. 40, n. 26, p. 9262–9271, 2007.

COTANDA, P. et al. A comparative study of the stimuli-responsive properties of DMAEA and DMAEMA containing polymers. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 51, n. 16, p. 3333–3338, 2013.

DAY, W. A.; MAURELLI, A. T. *Escherichia Coli*. 2013.

DE SOUZA, J. C. P.; NAVES, A. F.; FLORENZANO, F. H. Specific thermoresponsiveness of PMMA-block-PDMAEMA to selected ions and other factors in aqueous solution. *Colloid and Polymer Science*, v. 290, n. 13, p. 1285–1291, 2012.

DE SOUZA, V. V. et al. Cmc of PMMA-block-PDMAEMA measured by NPN fluorescence. *Polymer Bulletin*, v. 67, n. 5, p. 875–884, 2011.

DESHPANDE, M. C. et al. Influence of polymer architecture on the structure of complexes formed by PEG-tertiary amine methacrylate copolymers and phosphorothioate oligonucleotide. *Journal of Controlled Release*, v. 81, n. 1, p. 185-99, 2002.

DESTARAC, M. Controlled Radical Polymerization: Industrial Stakes, Obstacles and Achievements. *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 4, n. 3–4, p. 165–179, 2010.

DEVÍNSKY, F.; PISÁRCIK, M.; LUKÁČ, M. Cationic amphiphiles: Self-assembling systems for biomedicine and biopharmacy. 2017.

DISCHER, B. M. et al. Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science*, v. 284, n. 5417, p. 1143–1146, 1999.

DISCHER, D. E. et al. Emerging applications of polymersomes in delivery: From

molecular dynamics to shrinkage of tumors. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 8–9, p. 838–857, 2007.

DISCHER, D. E.; AHMED, F. *Polymersomes Annual Review of Biomedical Engineering*, 2006. Disponível em:
<isi:000240294400010%5Cnd:%5C1Refman12%5CPDF%5CRef_ID-6059.pdf>

DU, J. *Polymer Vesicles*. In: *Advanced Hierarchical Nanostructured Materials*. 2014.

FAIRBANKS, B. D.; GUNATILLAKE, P. A.; MEAGHER, L. *Biomedical applications of polymers derived by reversible addition - fragmentation chain-transfer (RAFT)*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 30, n. 9, p. 1141-52, 2015.

FISCHER, D. et al. *In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. *Biomaterials*, v. 24, n. 7, p. 1121-31, 2003.

FLORENZANO, F. H. *Perspectivas Atuais para a Obtenção Controlada de Polímeros e sua Caracterização*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.18, n. 2, p.100-105, 2008.

FOURNIER, D. et al. *Tunable pH- and temperature-sensitive copolymer libraries by reversible addition-fragmentation chain transfer copolymerizations of methacrylates*. *Macromolecules*, v. 40, n. 4, p. 915-920, 2007.

FRANCO, C. et al. *Data of PCL-b-P(MMA-DMAEMA)2 characterization and related assays*. *Data in Brief*, v. 15, p.111-126, 2017.

GUAN, S.; ROSENECKER, J. *Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems*. *Gene Therapy*, v. 24, n.3, p. 133-143, 2017.

HADJANTONIOU, N. A. et al. *Alternating amphiphilic multiblock copolymers: Controlled synthesis via RAFT polymerization and aqueous solution characterization*. *Macromolecules*, v. 43, n. 6, p. 2713–2720, 2010.

HAYWARD, A. C. *The hosts of Xanthomonas*. In: *Xanthomonas*. 1993.

HEUTS, J. P. A. *Theory of Radical Reactions*. In: *Handbook of Radical Polymerization*. 1954.

HINRICHS, W. L. J. et al. *Thermosensitive polymers as carriers for DNA delivery*. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 60, p. 249-59, 1999.

HINTON, T. M. et al. *The effect of RAFT-derived cationic block copolymer structure on gene silencing efficiency*. *Biomaterials*, v. 33, n. 30, p. 7631-7642, 2012.

JIN, L. et al. *Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers*. *Theranostics*, v. 4, n. 3, p. 240–255, 2014.

KAEDING, W. W. *Styrene monomer*. *Catalysis Reviews*, v. 8, n. 1, p. 307–316, 1974.

KEDDIE, D. J. et al. RAFT agent design and synthesis *Macromolecules*, 2012.

KEDDIE, D. J. A guide to the synthesis of block copolymers using reversible-addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Chemical Society Reviews*, v. 43, n. 2, p. 496–505, 2013.

KIM, K. T. et al. Smart nanocontainers and nanoreactors *Nanoscale*. 2010.

KLOUDA, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 31, n. 97, p. 338-349, 2015.

KUNITAKE, T. et al. Vesicles of Polymeric Bilayer and Monolayer Membranes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 103, n. 19, p. 5945-5947, 1981.

LANGE, U.; ROZNYATOVSKAYA, N. V.; MIRSKY, V. M. Conducting polymers in chemical sensors and arrays *Analytica Chimica Acta*, v. 28, n. 614, p. 1-26, 2008.

LAUBER, L. et al. PH- and thermoresponsive self-assembly of cationic triblock copolymers with controlled dynamics. *Macromolecules*, v. 50, n. 1, p. 416-423, 2017.

LEE, H. et al. 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)). *Journal of Physical Chemistry B*, v. 115, n. 5, p. 844–860, 2011.

LEONG, J. et al. Engineering Polymersomes for Diagnostics and Therapy *Advanced Healthcare Materials*, v. 7, n. 8, p. 1-57. 2018.

LI, M.-H. Stimuli-Responsive Polymersomes. In: *Intracellular Delivery: Fundamentals and Application*. 2011.

LI, S. D.; HUANG, L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther*, v. 13, n. 18, p. 1313–1319, 2006.

LIAN, X. et al. Photophysical properties and self-assembly of triblock copolymer with complexes of positively charged PDMAEMA and oppositely charged chromophores. *Polymer*, v. 53, n. 9, p. 1906–1914, 2012.

LIU, G. et al. Electrostatic Self-Assembly of Au Nanoparticles onto Thermosensitive Magnetic Core-Shell Microgels for Thermally Tunable and Magnetically Recyclable Catalysis. *Small*, v. 11, n. 23, p. 2807-16, 2015.

LÓPEZ-PÉREZ, P. M. et al. Hydrophobic–Electrostatic Balance Driving the LCST Offset Aggregation–Redissolution Behavior of N -Alkylacrylamide-Based Ionic Terpolymers. *Langmuir*, v. 26, n. 8, p. 5934–5941, 2010.

LU, X.; JOSHI, A.; FLOMENBERG, P. *Adenoviruses*. 2019.

MA, S.; XIAO, M.; WANG, R. Formation and Structural Characteristics of

Thermosensitive Multiblock Copolymer Vesicles. *Langmuir*, v. 29, n. 51, p. 16010–16017, 2013.

MANGANIELLO, M. J. et al. Diblock copolymers with tunable pH transitions for gene delivery. *Biomaterials*, v. 33, n. 7, p. 2301–2309, 2012.

MATYJASZEWSKI, K. *Controlled Radical Polymerisation*. American Chemical Society, 1998.

MAUL, J. et al. Polystyrene and Styrene Copolymers. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2007.

MENG, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Stimuli-responsive polymersomes for programmed drug delivery. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 2, p. 197–209, 2009.

MIKLAVČIČ, D. *Handbook of Electroporation*. 2017.

MOAD, G. et al. Synthesis of novel architectures by radical polymerization with reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT polymerization). *Macromolecular Symposia*, v. 192, n. 1, p. 1–12, 2003.

MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process - A Second Update. *Australian Journal of Chemistry*, v. 62, n. 11, p. 1402–1472, 2009.

MOAD, G.; THANG, S. H. RAFT Polymerization: Materials of The Future, Science of Today: Radical Polymerization – The Next Stage. *Australian Journal of Chemistry*, v. 62, n. 11, p. 1379, 2009.

NAYEROSSADAT, N.; ALI, P.; MAEDEH, T. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, v. 1, n. 27, 2012.

NORRANDER, J.; KEMPE, T.; MESSING, J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, v. 26, n. 1, p. 101–106, 1983.

NOURI, A. et al. Insight into the role of N,N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) conjugation onto poly(ethylenimine): Cell viability and gene transfection studies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, n. 12, p. 2967–2980, 2012.

ONACA, O. et al. Stimuli-Responsive Polymersomes as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. p. 129–139.

ONACA, O. et al. Stimuli-responsive polymersomes as nanocarriers for drug and gene delivery. *Macromolecular Bioscience*, v. 9, n. 2, p. 129–39, 2009.

PARK, T. G.; JEONG, J. H.; KIM, S. W. Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n. 4, p. 467–486, 2006.

PAZOUR, G. J.; DAS, A. *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology*, v. 172, n. 3, p. 1241–1249, 1990.

PERRIER, S. 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization - A User Guide. *Macromolecules*, 2017.

PIETSCH, C. et al. Thermo-Induced Self-Assembly of Responsive Poly(DMAEMA-*b*-DEGMA) Block Copolymers into Multi- and Unilamellar Vesicles. *Macromolecules*, v. 45, n. 23, p. 9292-9302, 2012.

POTTER, H.; HELLER, R. Transfection by electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*, v. 2018, p. 9.3.1-9.3.13, 2018.

POUTON, C.; SEYMOUR, L. Key issues in non-viral gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 34, n. 1, p. 3–19, 1998.

QIAGEN. QIAprep Spin Miniprep Kit QuickStart Protocol. <http://www.qiagen.com/Products/Plasmid/QIAprepMiniprepSystem/QIAprepSpinMiniprepKit.aspx>, 2012.

QIAGEN; QIAGEN. QIAGEN® Plasmid Purification Handbook. *Plasmid*, 2005.

QING, L. Poly(methyl methacrylate). In: *Introduction to Biomaterials*. 2017.

RAHIMZADEH, M. et al. Impact of heat shock step on bacterial transformation efficiency. *Molecular biology research communications*, v. 5, n. 4, p. 257–261, 2016.

RAUCKMAN, E. J.; ROSEN, G. M.; ABOU-DONIA, M. B. Synthesis of a Useful Spin Labeled Probe, 1-Oxyl-4-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine. *Journal of Organic Chemistry*, v. 41, n. 3, p. 564-565, 1976.

RIZZARDO, E. et al. RAFT polymerization. *PCT Int. Appl.*, 2010.

ROBBINS, P. D.; GHIVIZZANI, S. C. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacology & therapeutics*, v. 80, n. 1, p. 35–47, 1998.

SAMSONOVA, O. et al. Low molecular weight pDMAEMA-block-pHEMA block-copolymers synthesized via RAFT-polymerization: Potential non-viral gene delivery agents. *Polymers*, v. 3, n. 2, p. 693–718, 2011.

SANTANDER-ORTEGA, M. J. et al. Optimisation of Synthetic Vector Systems for Cancer Gene Therapy - The Role of the Excess of Cationic Dendrimer Under Physiological Conditions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 9, p. 1172–1181, 2014.

SARAIVA, G. K. V. et al. Characterization of PMMA-b-PDMAEMA aggregates in aqueous solutions. *Colloid and Polymer Science*, New York, v. 297, p. 557-569, 2019. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-019-04482-w> > DOI: 10.1007/s00396-019-04482-w.

SCHMITT, C. et al. Compartmentalization and Transport in Synthetic Vesicles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 1–12, 2016.

SCHREIBER, W. *Escherichia Coli*. 2017.

SCHWEIZER, H. P. *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene*, v. 2, n. 97, p. 109-21, 1991.

SEOW, Y.; WOOD, M. J. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, v. 17, n. 5, p. 767–777, 2009.

SHEN. Preparation and Characterization of PMMA and its Derivative via RAFT Technique in the Presence of Disulfide as a Source of Chain Transfer Agent. *Journal of Membrane and Separation Technology*, v. 1, p. 117-128, 2012.

SHERWOOD, A. L. Virtual elimination of false positives in blue-white colony screening. *BioTechniques*, v. 34, n. 3, p. 644-7, 2003.

SLONE, R. Methacrylic Ester Polymers. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 2001.

SMITH, A. E.; XU, X.; MCCORMICK, C. L. Stimuli-responsive amphiphilic (co)polymers via RAFT polymerization *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 2010.

SPECTROSCOPY, P. C.; SCATTERING, Q. L.; MOTION, B. Dynamic Light Scattering (DLS) DLS Measurement – Scattered Light Intensity Fluctuation. *Malvern Guides*, 2011.

STALHEIM, O. H. V. *Leptospira*. In: *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Band V (Handbook of the bacterial infections of animals. Volume V)*, v. 46, n. 3, p. 338-339, 1982.

SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: *Xanthomonas*. 1993.

SZOSTKOVÁ, M.; HORÁKOVÁ, D. The effect of plasmid DNA sizes and other factors on electrotransformation of *Escherichia coli* JM109. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Anal Biochem*, v. 170, n. 1, p. 38-44, 1998.

TANG, M. X.; SZOKA, F. C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy*, v. 4, n. 8, p. 823–832, 1997.

TSONG, T. Y. Electroporation of cell membranes *Biophysical Journal*, v. 60, n. 2, p. 297–306, 1991.

URBAN, M. W. *Handbook of Stimuli-Responsive Materials*. 2011.

VAN DE WETERING, P. et al. A Mechanistic Study of the Hydrolytic Stability of

Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate). *Macromolecules*, v. 31, n.23, p. 8063–8068, 1998.

VAN DE WETERING, P. et al. Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjugate Chemistry*, v. 10, n. 4, p. 589-597, 1999.

VAN DER AA, M. A. E. M. et al. Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells. *Pharmaceutical Research*, v. 24, n. 8, p. 1590–1598, 2007.

VENKATARAMAN, S. et al. The role of PEG architecture and molecular weight in the gene transfection performance of PEGylated poly(dimethylaminoethyl methacrylate) based cationic polymers. *Biomaterials*, v. 32, n. 9, p. 2369–2378, 2011.

WEI, M. et al. Stimuli-responsive polymers and their applications. *Polymer Chemistry*, 2017.

WETERING, P. VAN DE et al. 2- (Dimethylamino) Ethyl Methacrylate Based (Co) Polymers As Gene Transfer Agents. *Journal of Controlled Release*, v. 53, p. 145–153, 1998.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLÄ-HERTTUALA, S. History of gene therapy. *Gene*, v. 525, n. 2, p. 162–169, 2013.

XIA, Y. et al. Dually stimuli-responsive hyperbranched polyethylenimine with LCST transition based on hydrophilic–hydrophobic balance. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 127, n. 4, p. 3249–3255, 2013.

XIONG, Q. et al. Synthesis and Characterization of 2- (Dimethylamino) ethyl Methacrylate Homopolymers via aqueous RAFT Polymerization and Their Application in Miniemulsion Polymerization. *Polymer Bulletin*, v. 53, n. 1, p. 1–8, 2004.

XIONG, Z. et al. Dual-stimuli responsive behaviors of diblock polyampholyte PDMAEMA-b-PAA in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 356, n. 2, p. 557–565, 2011.

XUE, Y. et al. Study of stimuli-sensitivities of amphiphilic modified star poly[n,n-(dimethylamino)ethyl methacrylate] and its ability of DNA complexation. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 898-906, 2014.

YAMAMOTO, S. I.; PIETRASIK, J.; MATYJASZEWSKI, K. Temperature- and pH-responsive dense copolymer brushes prepared by ATRP. *Macromolecules*, v. 41, n. 19, p. 7013-702, 2008.

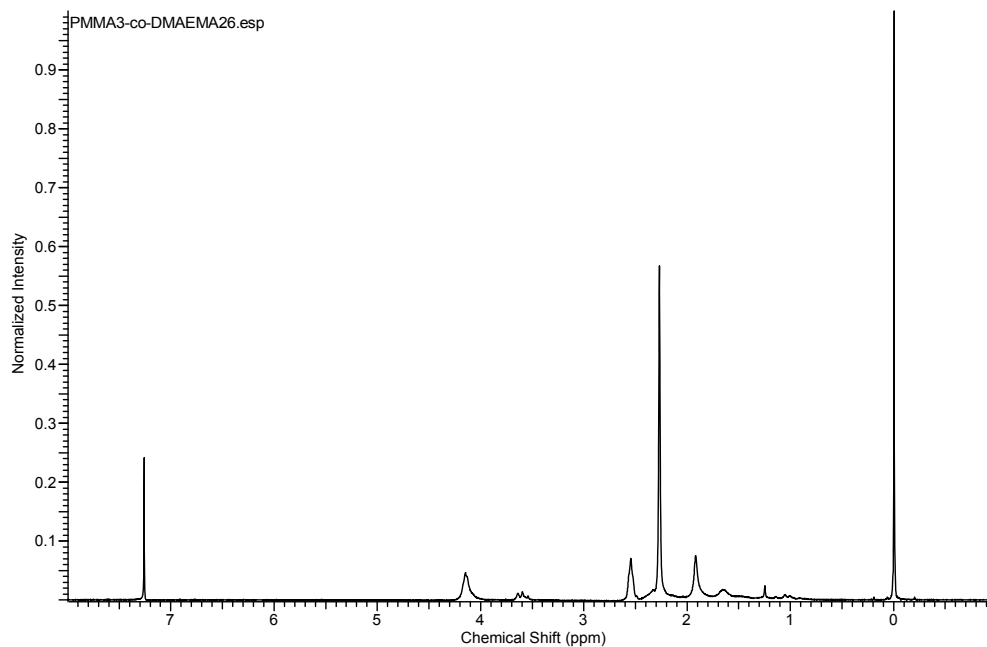
YI, N.; ABIDIAN, M. R. Conducting polymers and their biomedical applications. In: *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*. p. 243-276, 2016.

YILDIRIM, T. et al. Polymersomes with Endosomal pH-Induced Vesicle-to-Micelle

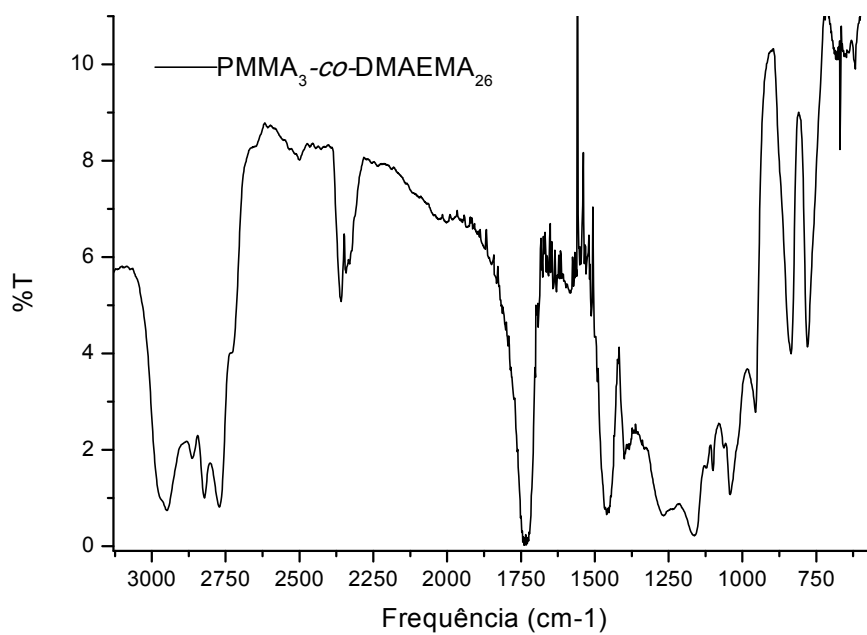
- Morphology Transition and a Potential Application for Controlled Doxorubicin Delivery. *Biomacromolecules*, v. 9, n. 18(10), p. 3280-3290, 2017.
- YILDIZ, B. et al. pH-sensitive dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA)/acrylamide (AAm) hydrogels: Synthesis and adsorption from uranyl acetate solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 88, n. 8, p. 2028–2031, 2003.
- ZHANG, C.; MARIC, M. Synthesis of Stimuli-responsive, Water-soluble Poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate/styrene] Statistical Copolymers by Nitroxide Mediated Polymerization. *Polymers*, v. 3, n. 3, p. 1398–1422, 2011.
- ZHANG, S.; CAHALAN, M. D. Purifying Plasmid DNA from Bacterial Colonies Using the Qiagen Miniprep Kit. *Journal of Visualized Experiments*, 2007.
- ZHANG, X. et al. Mimicking the cell membrane with block copolymer membranes. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 50, n. 12, p. 2293–2318, 2012.
- ZHANG, Y. S. Blue-white screening liquid can eliminate false positives in blue-white colony screening. *Genetics and Molecular Research*, 2016.
- ZHU, C. et al. Cationic methacrylate copolymers containing primary and tertiary amino side groups: Controlled synthesis via RAFT polymerization, DNA condensation, and in vitro gene transfection. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 48, n. 13, p. 2869–2877, 2010.
- ZHU, Y. et al. Polymer vesicles: Mechanism, preparation, application, and responsive behavior *Progress in Polymer Science*, 2017.
- ZHU, Y. J.; TAN, Y. B.; DU, X. Preparation and Self-Assembly Behavior of Polystyrene-Block-Poly(dimethylaminoethyl methacrylate) Amphiphilic Block Copolymer Using Atom Transfer Radical Polymerization. *eXPRESS Polymer Letters*, v. 2, n. 3, p. 214–225, 2008.
- ZUIDAM, N. et al. Effects of Physicochemical Characteristics of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-Based Polyplexes on Cellular Association and Internalization. *Journal of Drug Targeting*, v. 8, n. 1, p. 51–66, 2000.

20. Anexos

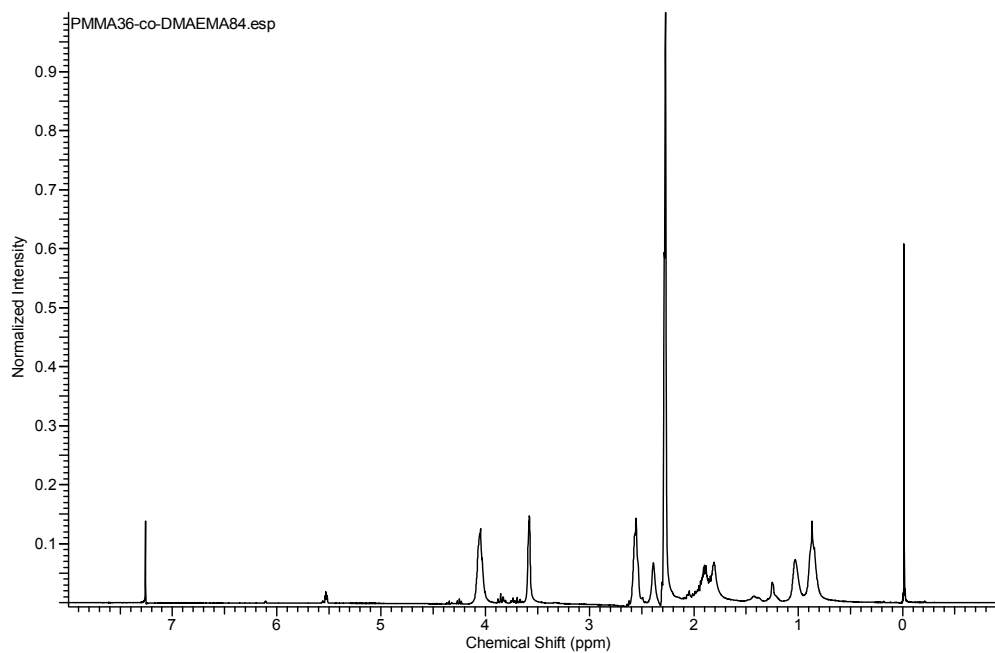
A – Material complementar



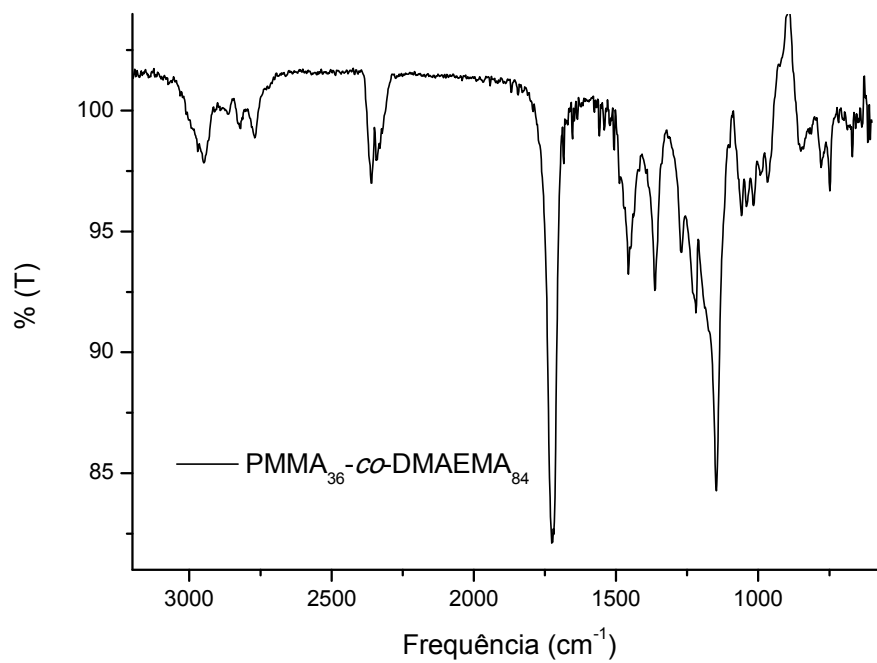
MC1. Espectro de RMN de ^1H de $\text{PMMA}_3\text{-co-DMAEMA}_{26}$



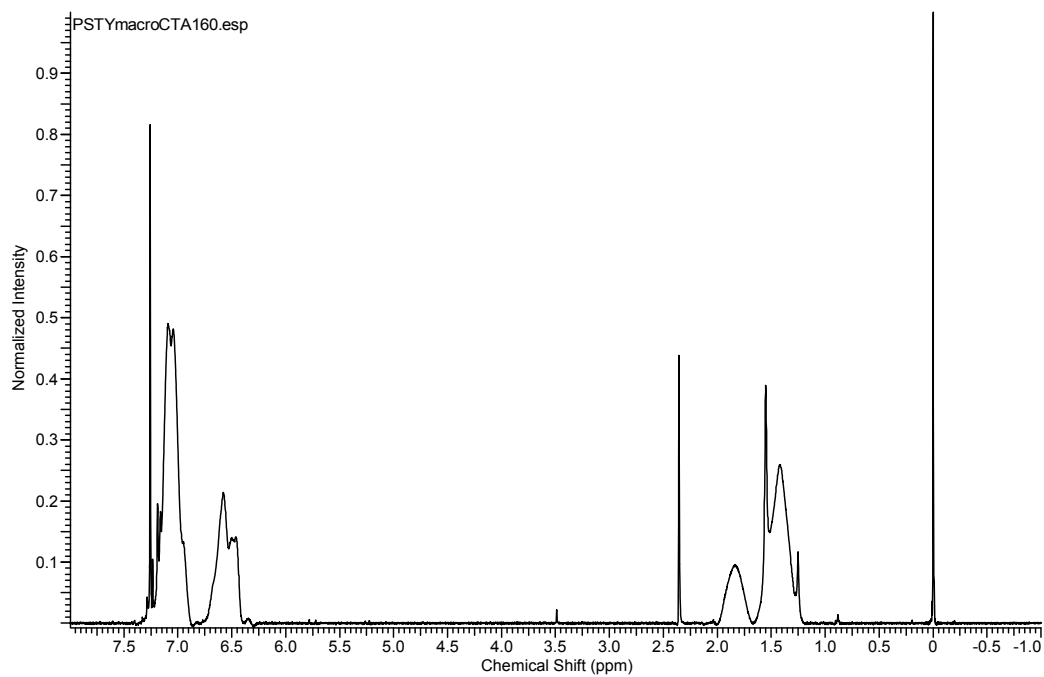
MC2: Espectro de FTIR de $\text{PMMA}_3\text{-co-DMAEMA}_{26}$



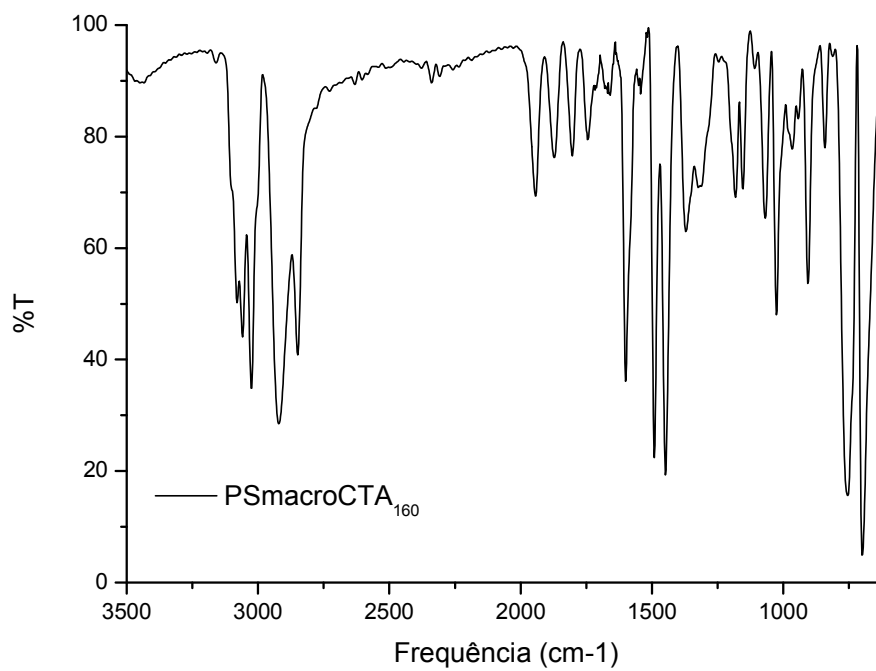
MC3: Espectro de RMN de ¹H de PMMA₃₆-co-DMAEMA₈₄



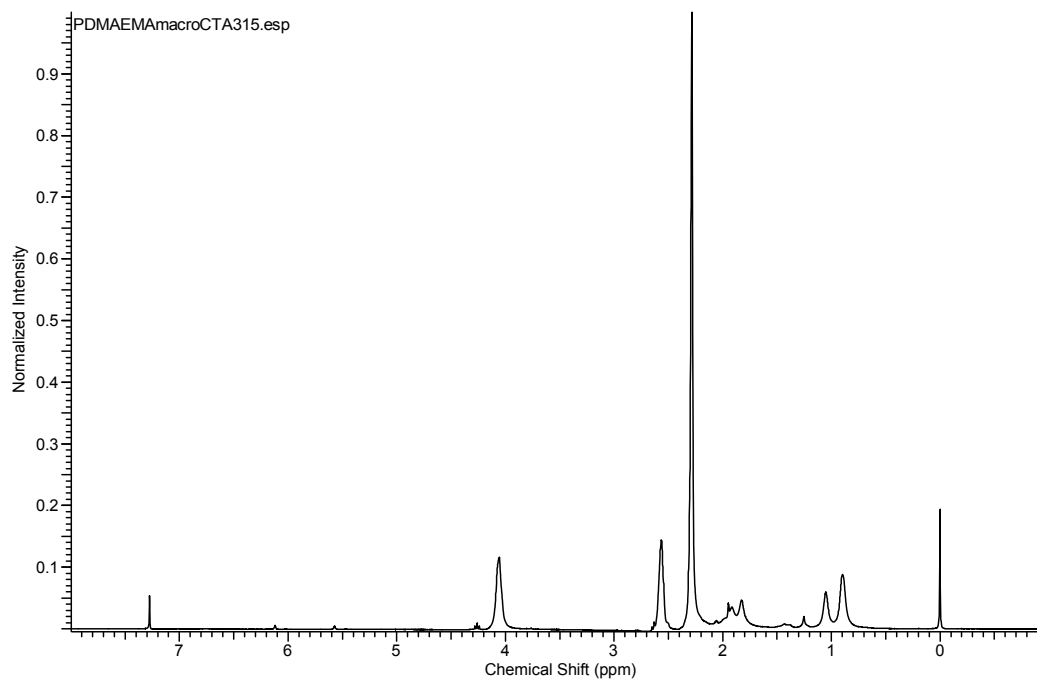
MC4: Espectro de FTIR de PMMA₃₆-co-DMAEMA₈₄



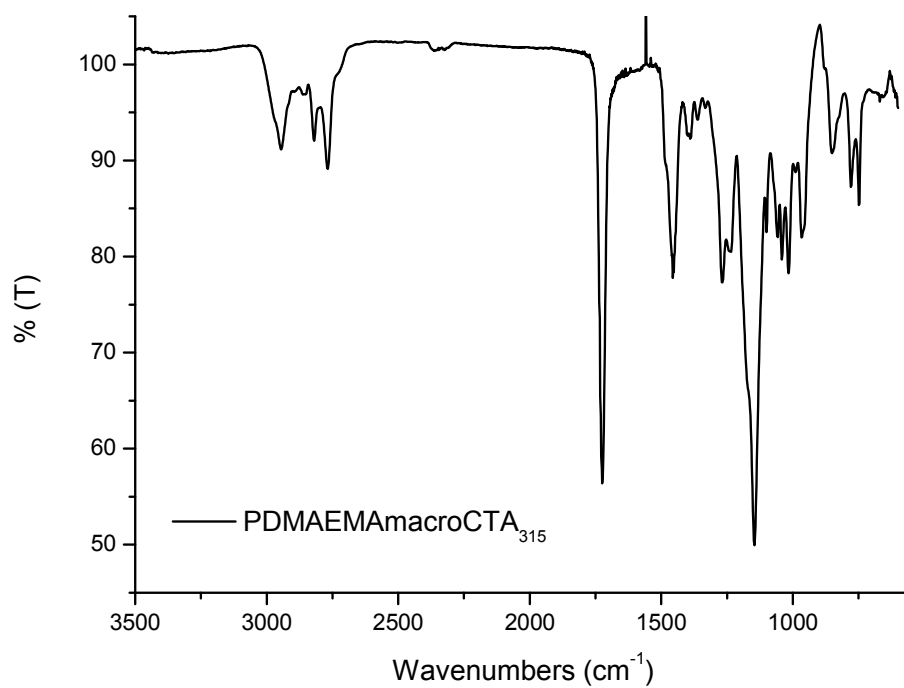
MC5: Espectro de RMN de ^1H de PStYmacroCTA₁₆₀



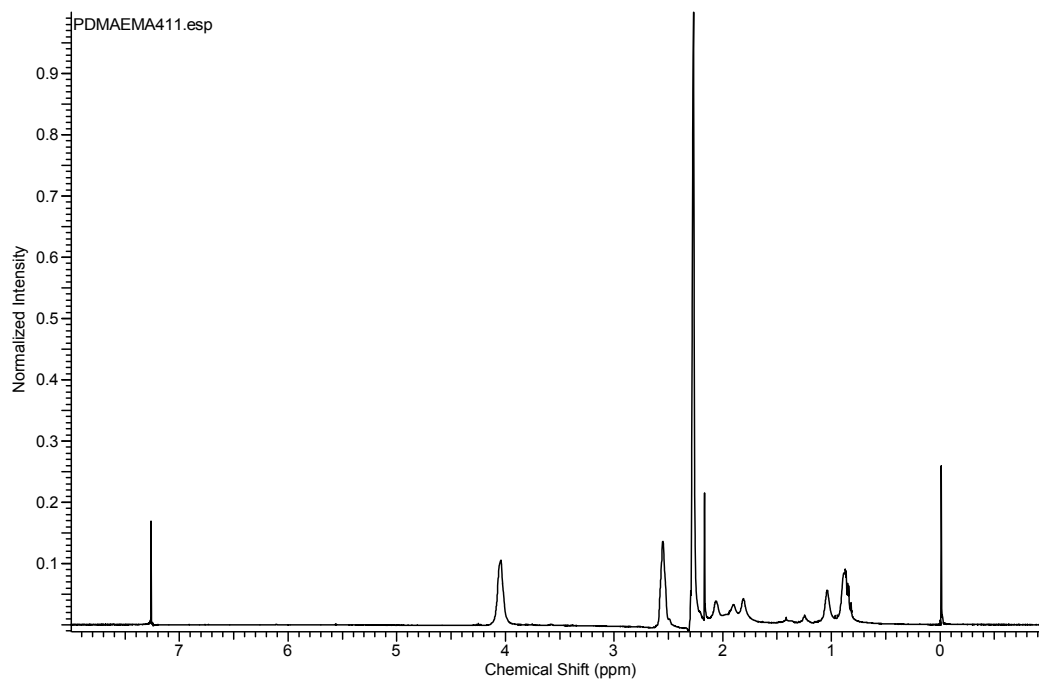
MC6: Espectro de FTIR de PStYmacroCTA₁₆₀



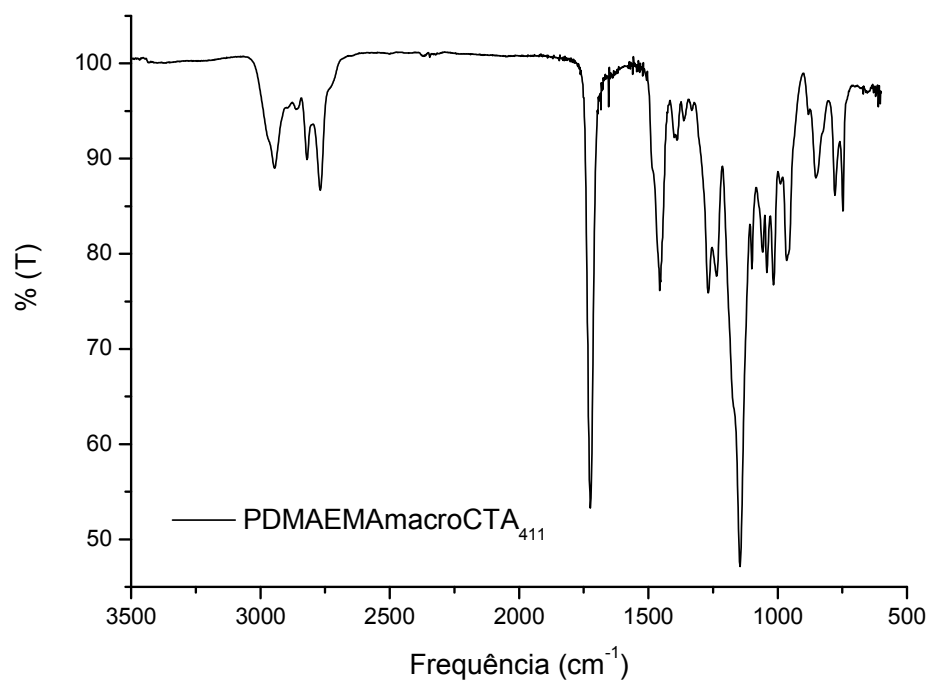
MC7: Espectro de RMN de ¹H de PDMAEMAmacroCTA₃₁₅



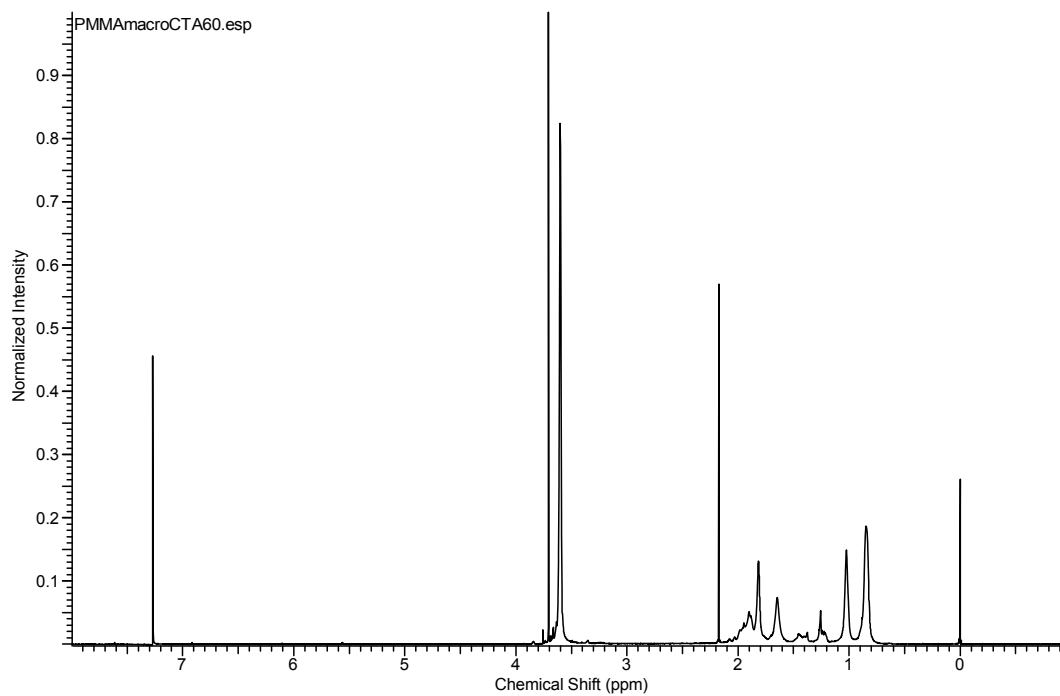
MC8: Espectro de FTIR de PDMAEMAmacroCTA₃₁₅



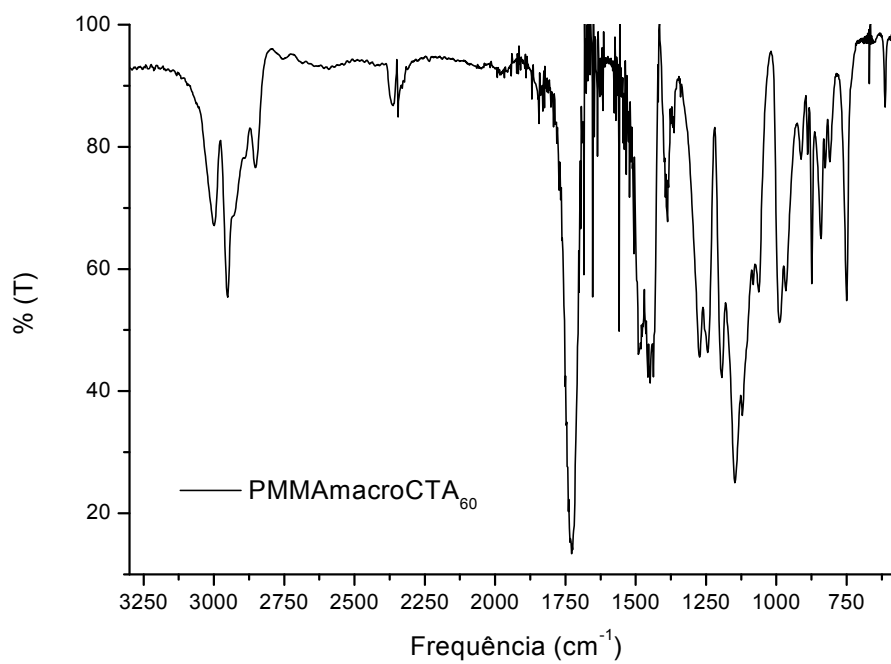
MC9: Espectro de RMN de ¹H de PDMAEMAmacroCTA₄₁₁



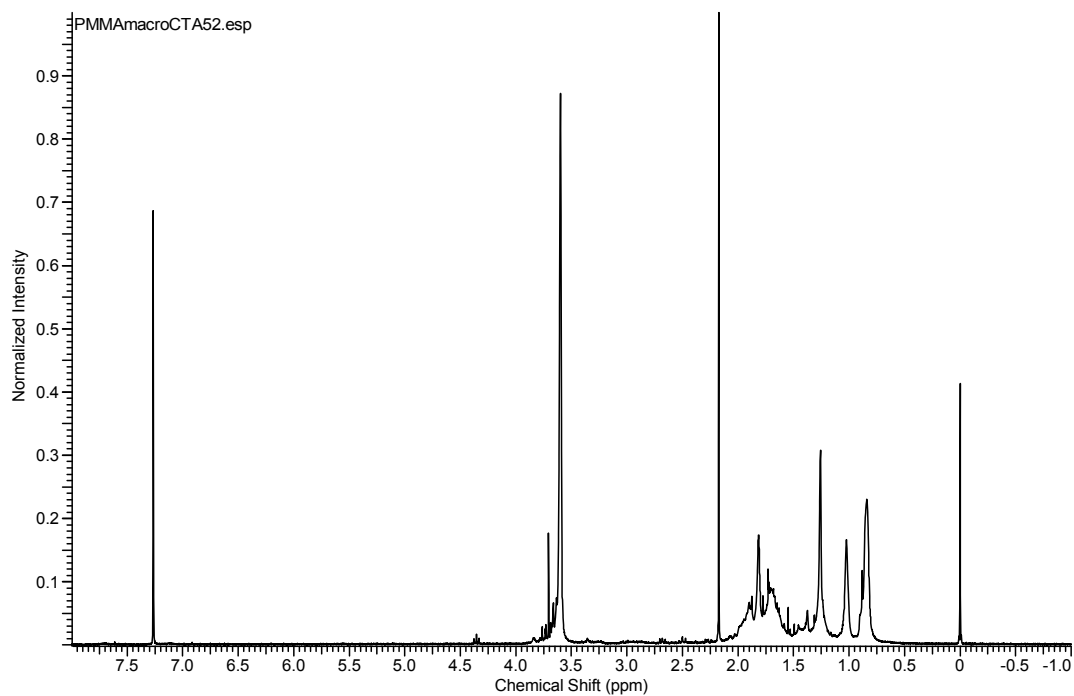
MC10: Espectro de FTIR de PDMAEMAmacroCTA₄₁₁



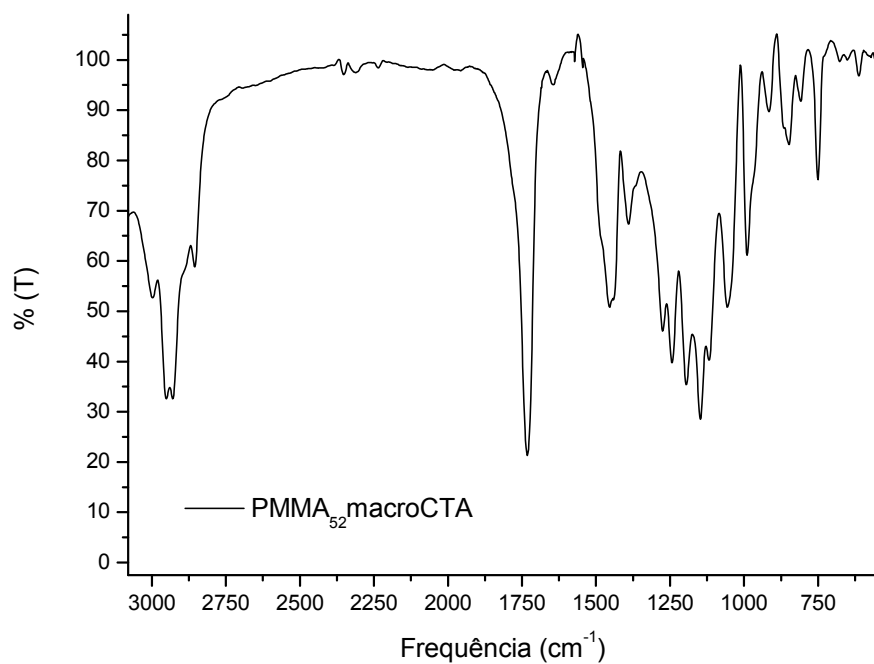
MC11: Espectro de RMN de ¹H de PMMAmacroCTA₆₀



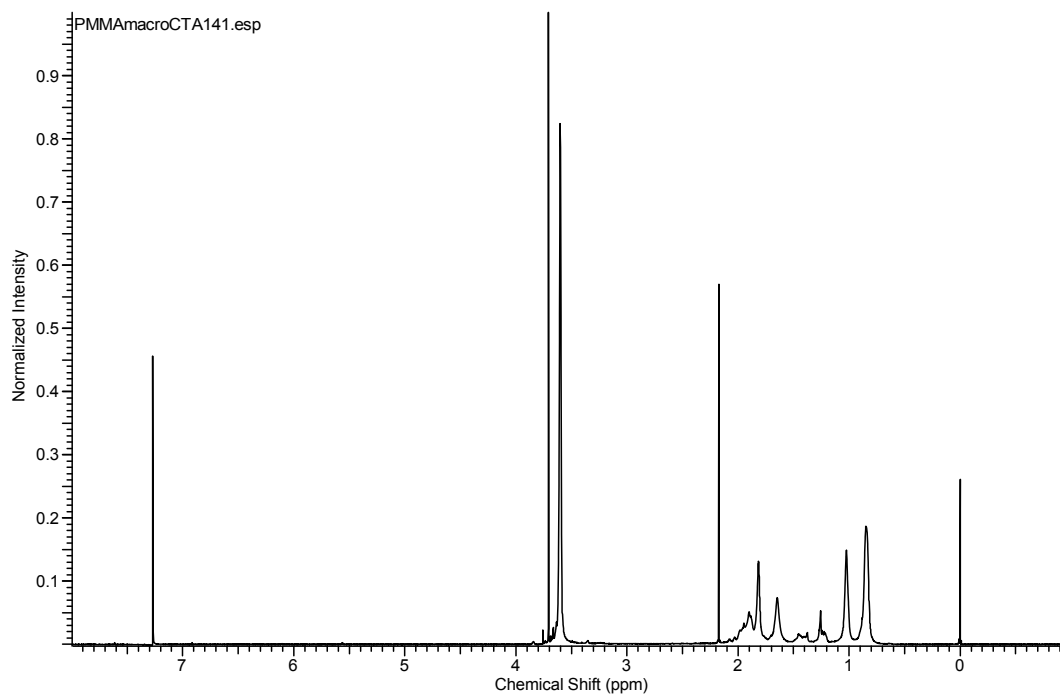
MC12: Espectro de FTIR de PMMAmacroCTA₆₀



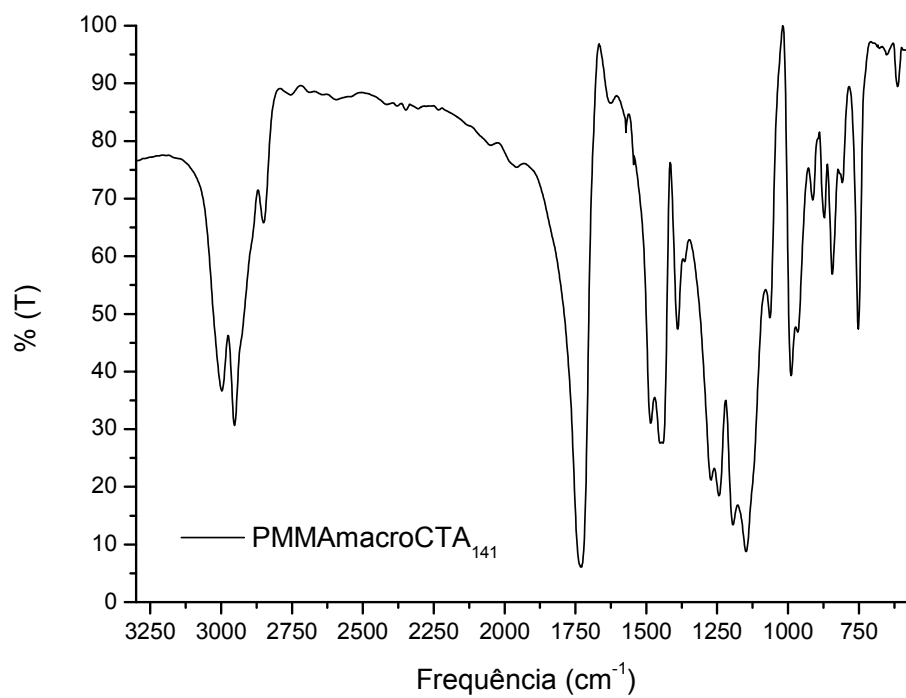
MC13: Espectro de RMN de ^1H de PMMAmacroCTA₅₂



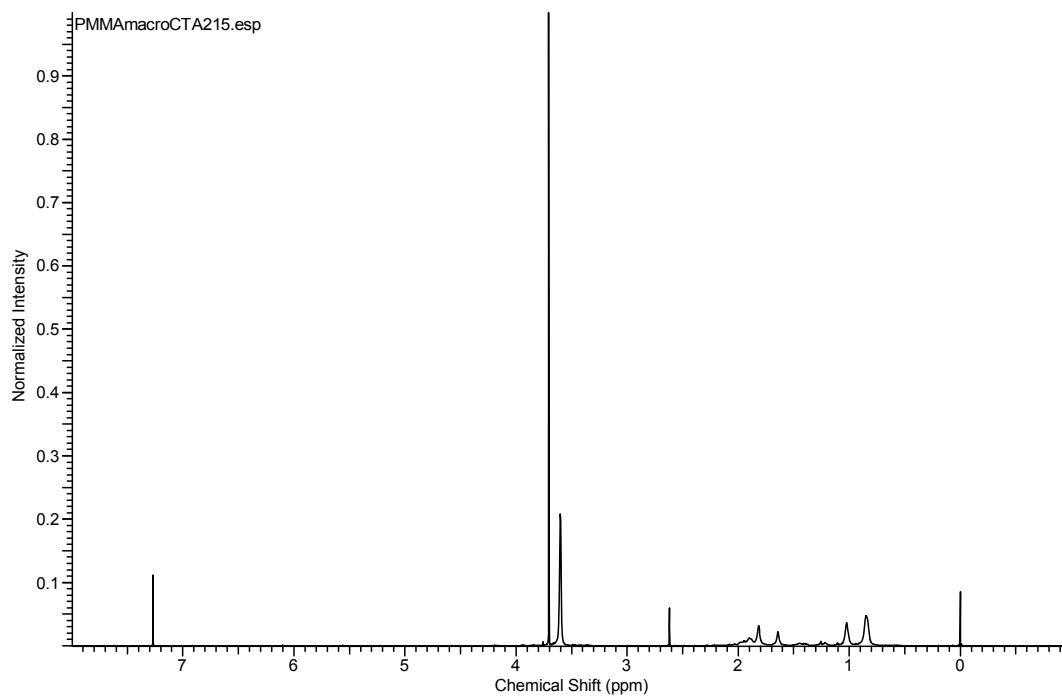
MC14: Espectro de FTIR de PMMAmacroCTA₅₂



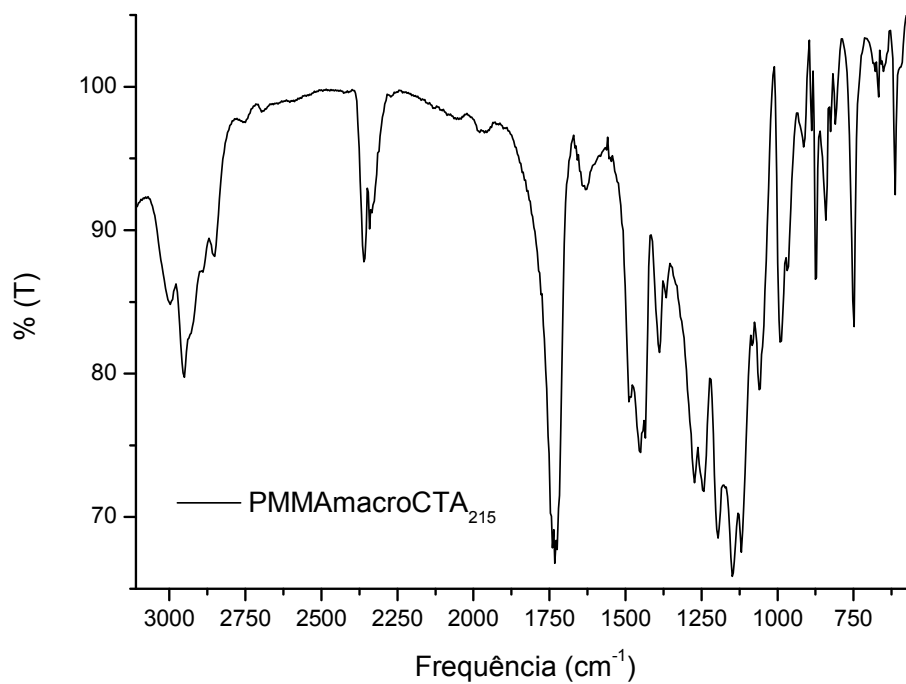
MC15: Espectro de RMN de ^1H de PMMAmacroCTA₁₄₁



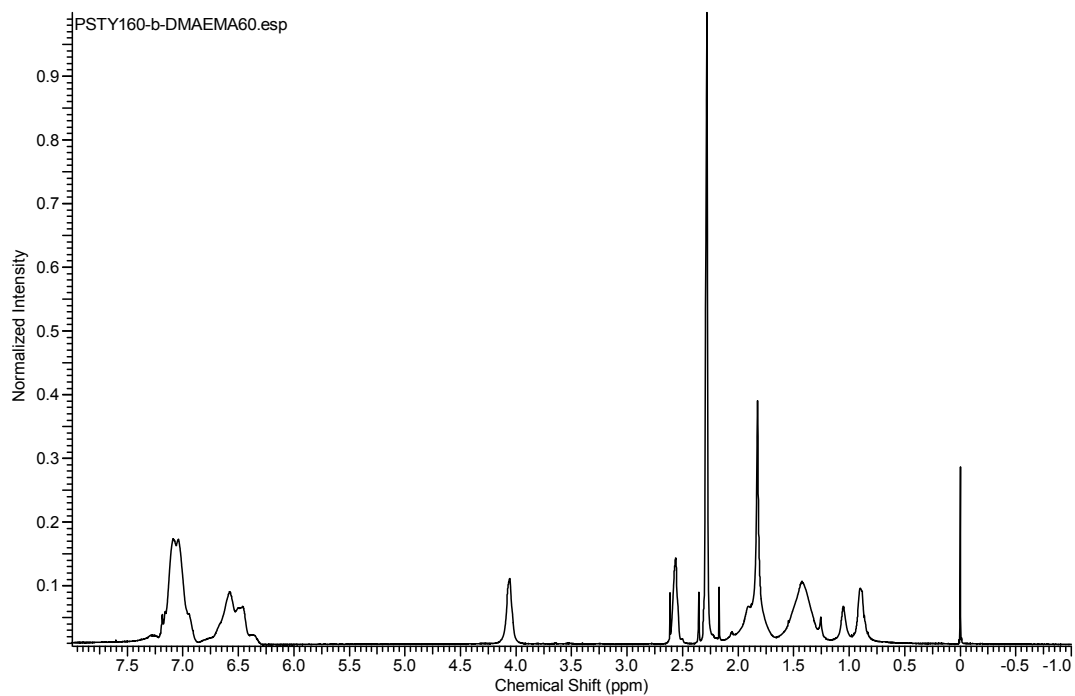
MC16: Espectro de FTIR de PMMAmacroCTA₁₄₁



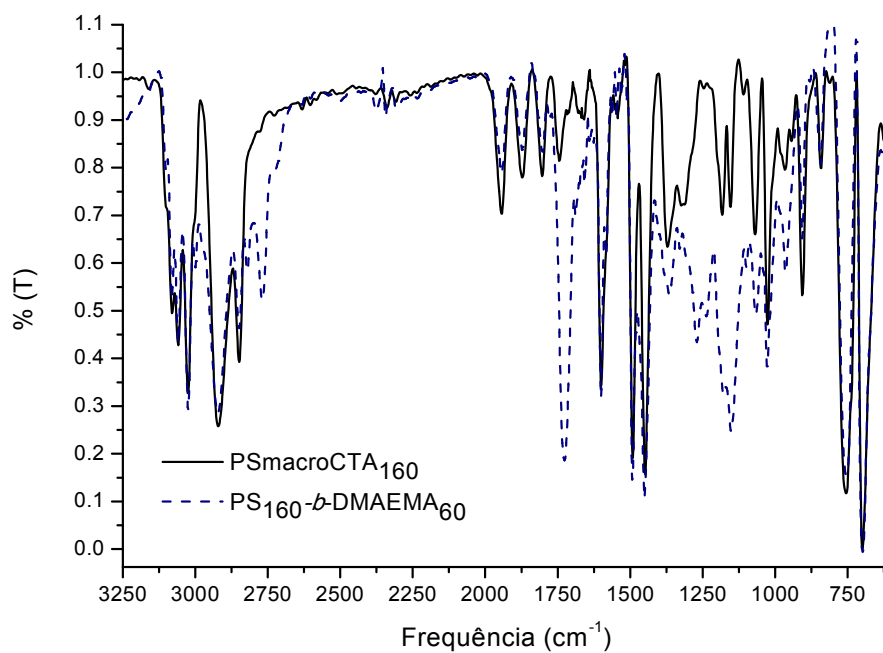
MC17: Espectro de RMN de ^1H de PMMAmacroCTA₂₁₅



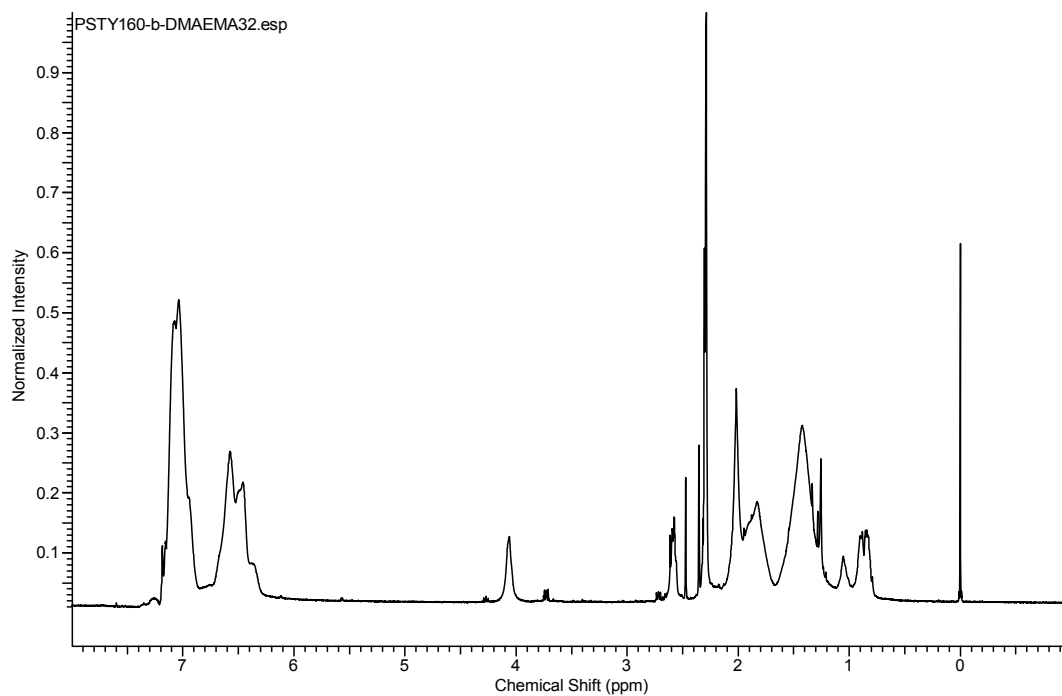
MC18: Espectro de FTIR de PMMAmacroCTA₂₁₅



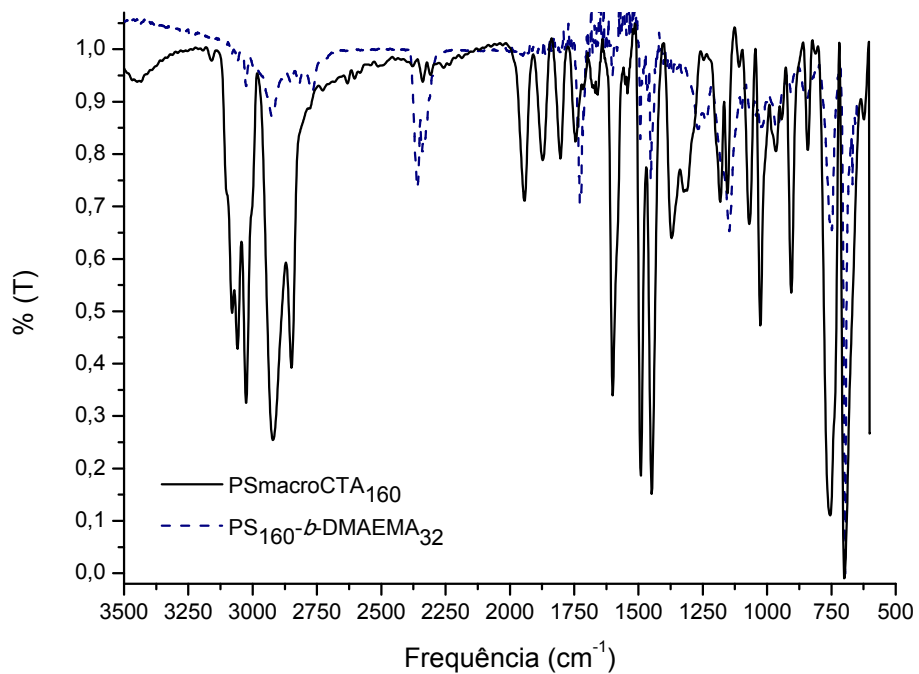
MC19: Espectro de RMN de ^1H de $\text{PS}_{160}\text{-}b\text{-DMAEMA}_{60}$ purificado.



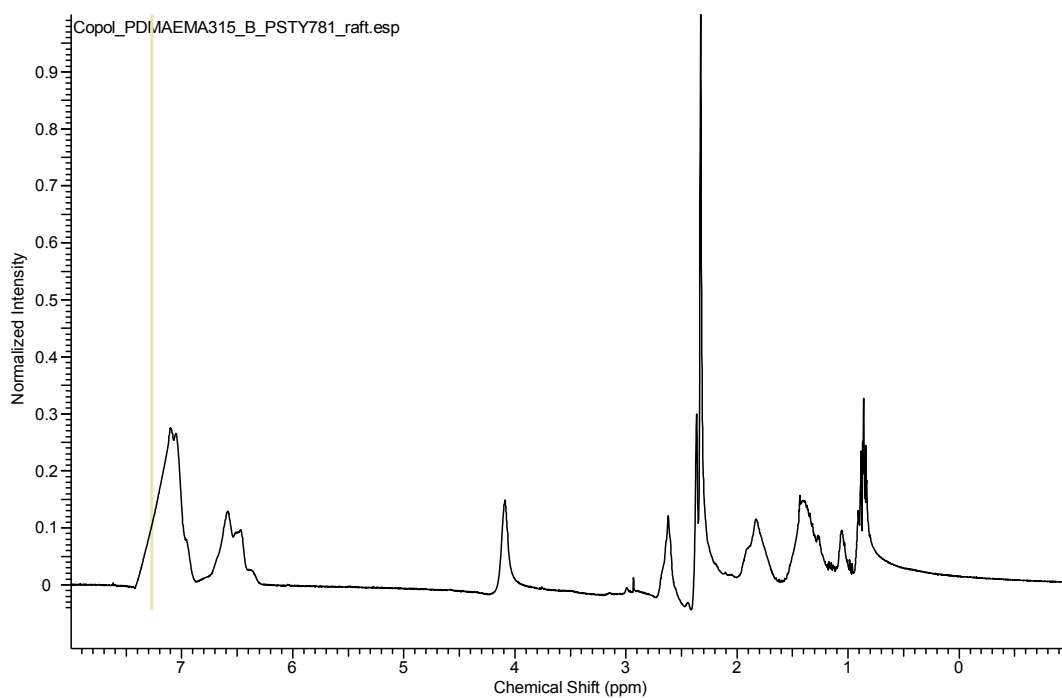
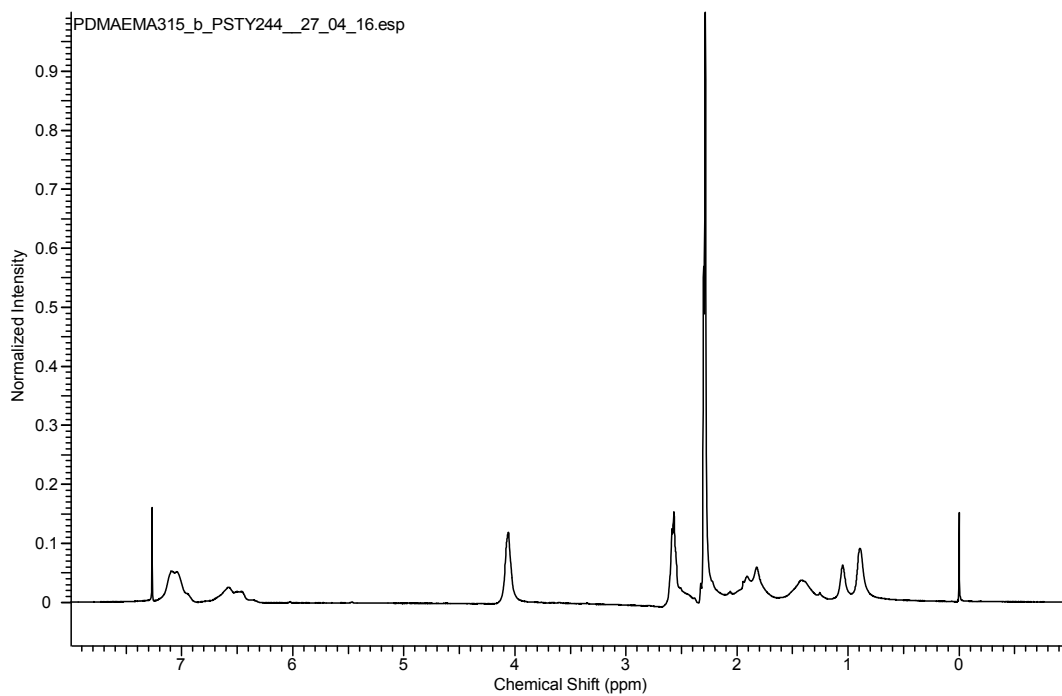
MC20: Espectro de FTIR de $\text{PS}_{160}\text{-}b\text{-DMAEMA}_{60}$ purificado.



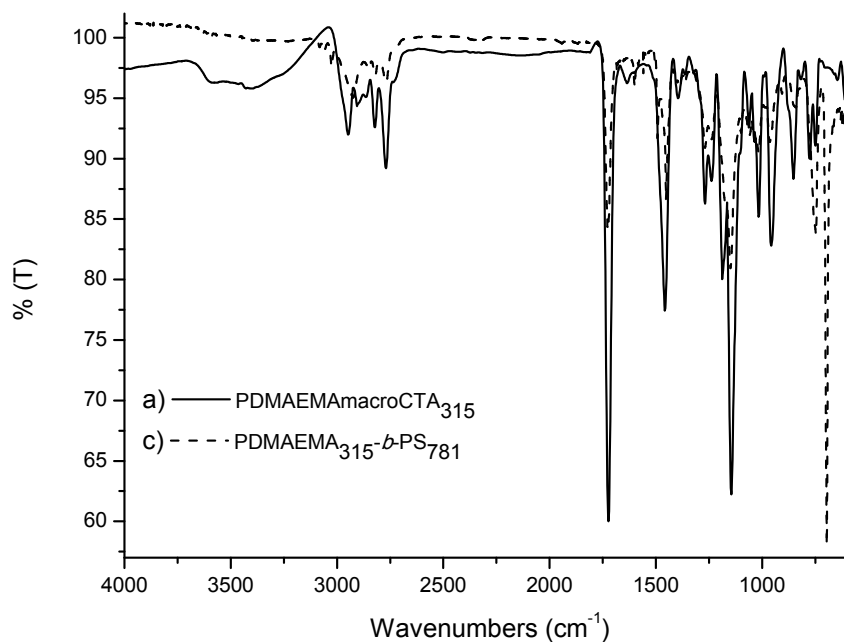
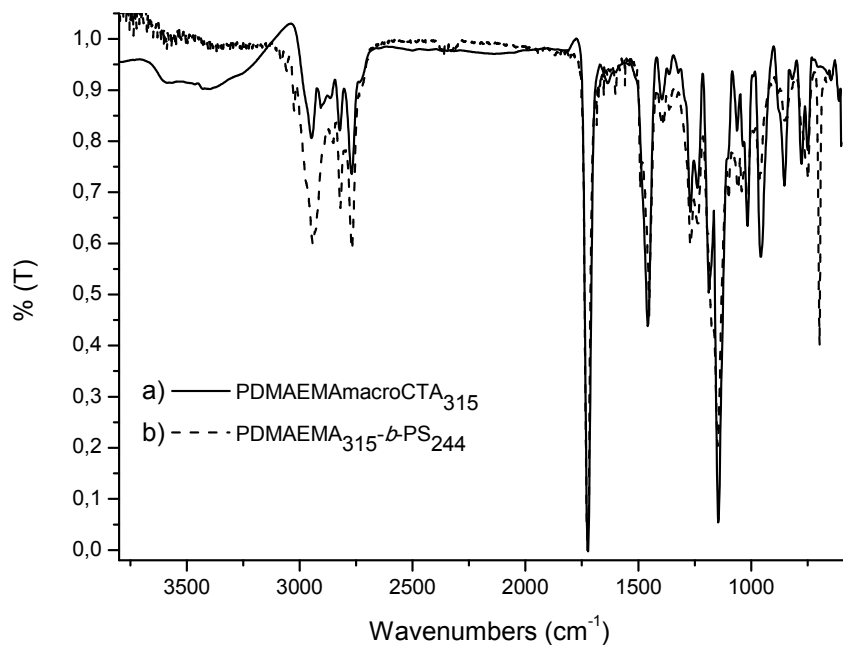
MC21: Espectro de RMN de ^1H de $\text{PS}_{160}\text{-}b\text{-DMAEMA}_{32}$ purificado.



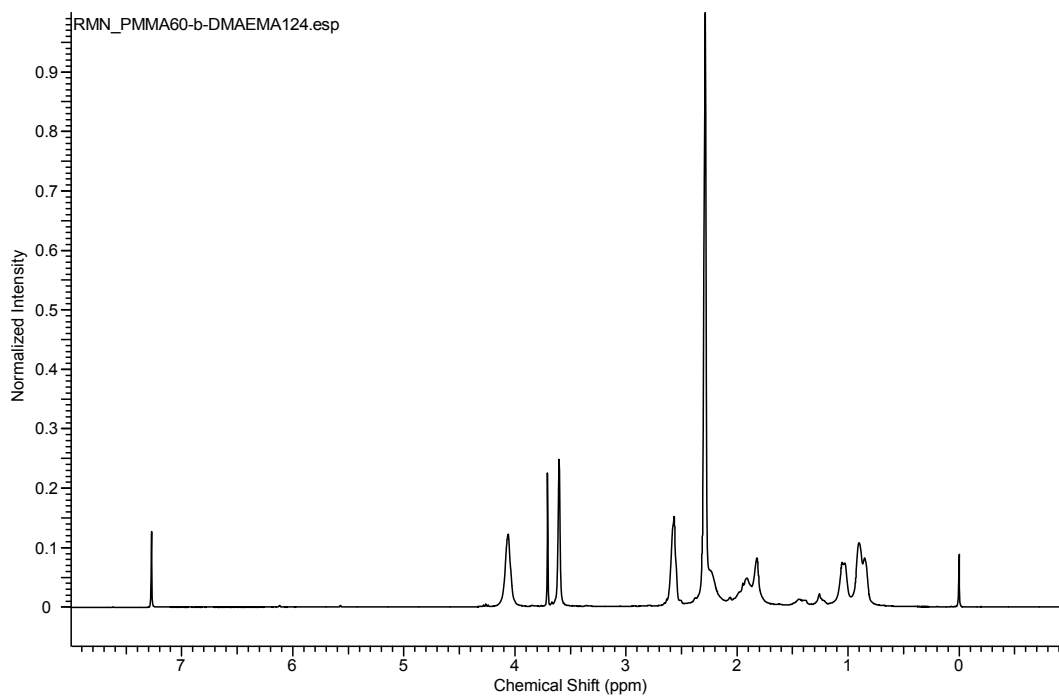
MC22: Espectro de FTIR de $\text{PS}_{160}\text{-}b\text{-DMAEMA}_{32}$ purificado.



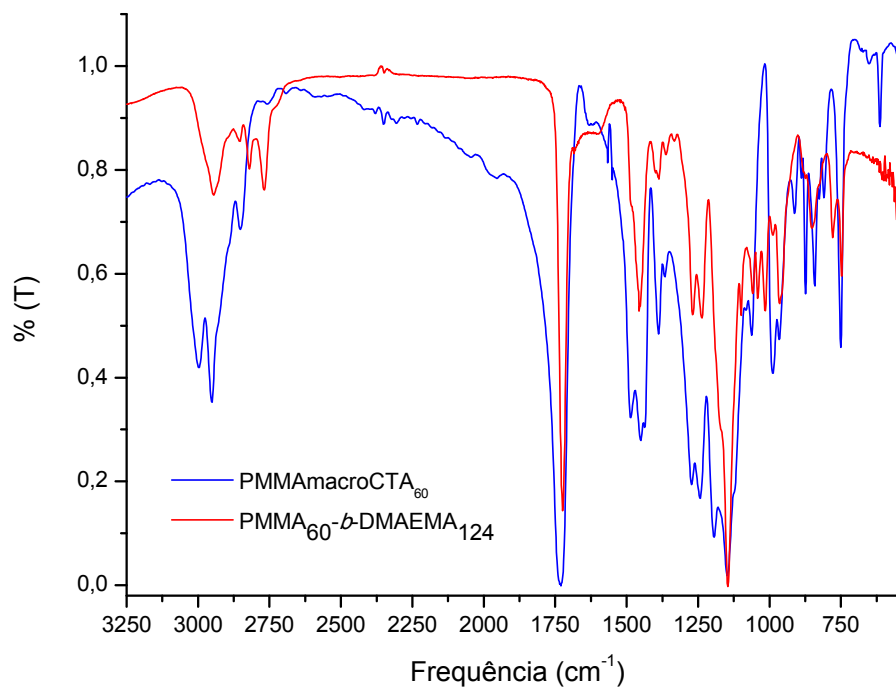
MC23: Espectros de RMN de ^1H de **(a, acima)** PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄; e **(b, abaixo)** PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁.



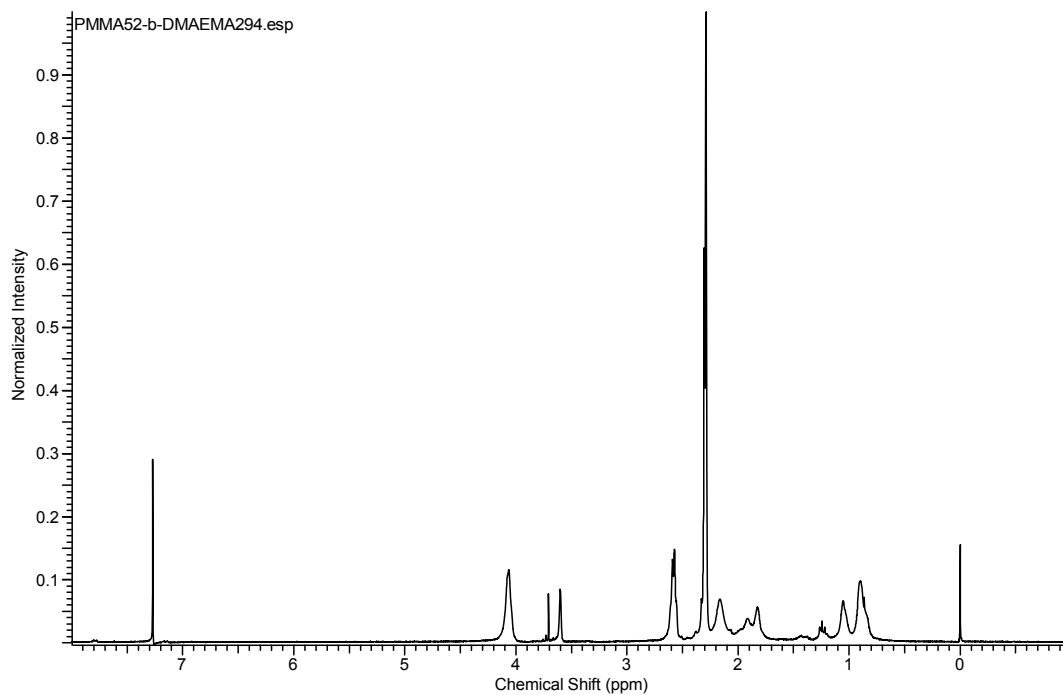
MC24: Resultados FTIR de PDMAEMAmacroCTA e copolímeros de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ (acima) e PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ (abaixo). A linha em azul refere-se ao homopolímero de PDMAEMA₃₁₅ (a), que foi utilizado como bloco de partida (macroCTA) para a síntese dos dois copolímeros de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₂₄₄ (acima, b) e PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ (abaixo, c), representado por linhas contínuas, na cor vermelha.



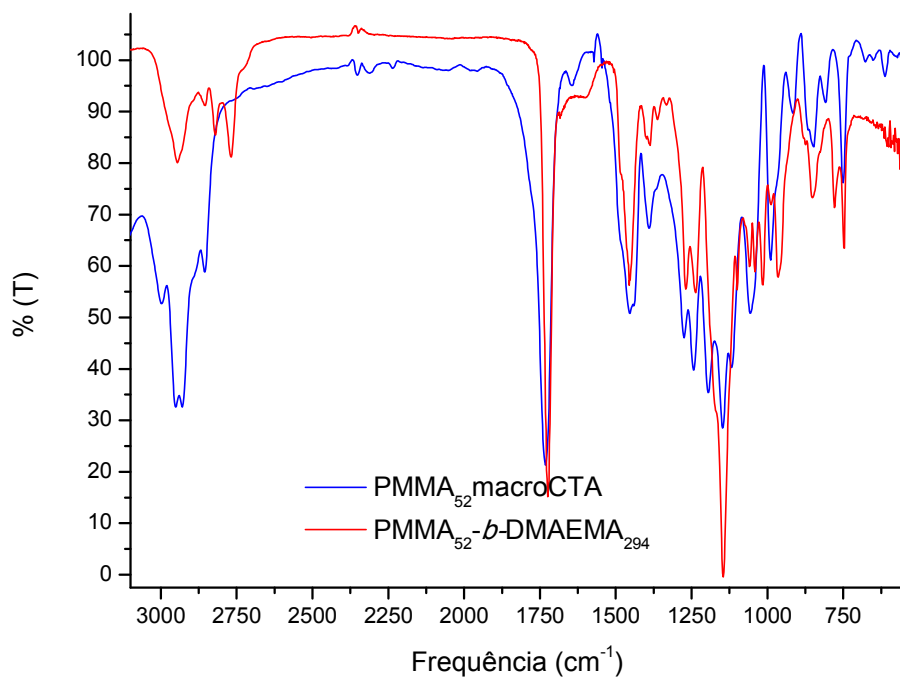
MC25: Espectro de RMN de ¹H de PMMA₆₀-*b*-DMAEMA₁₂₄



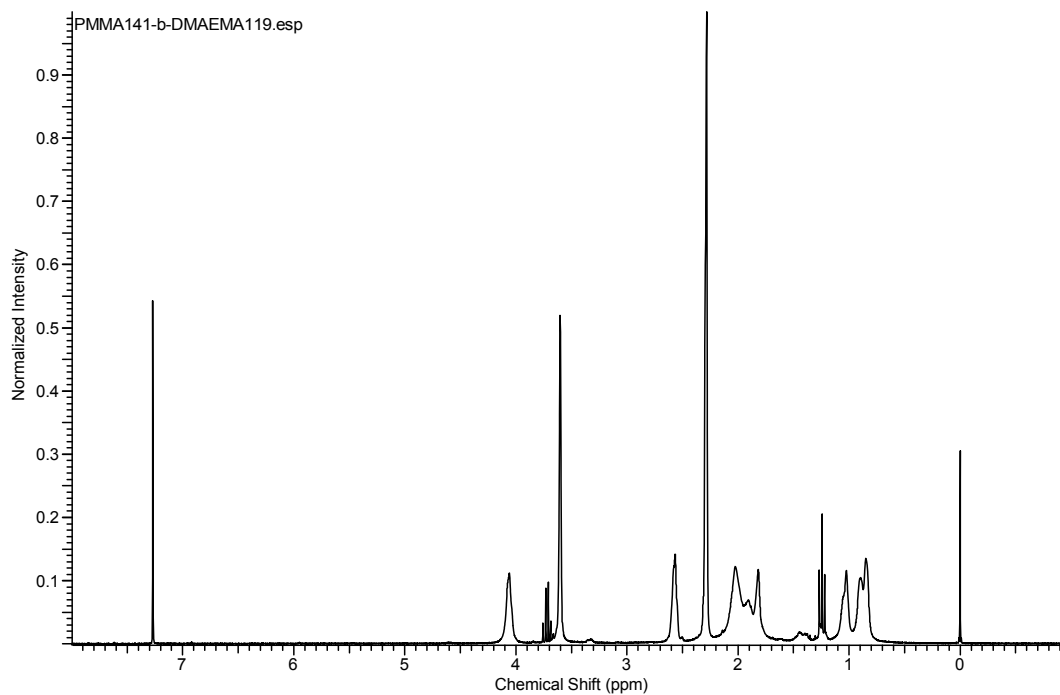
MC26: Espectro de FTIR de PMMA₆₀-*b*-DMAEMA₁₂₄



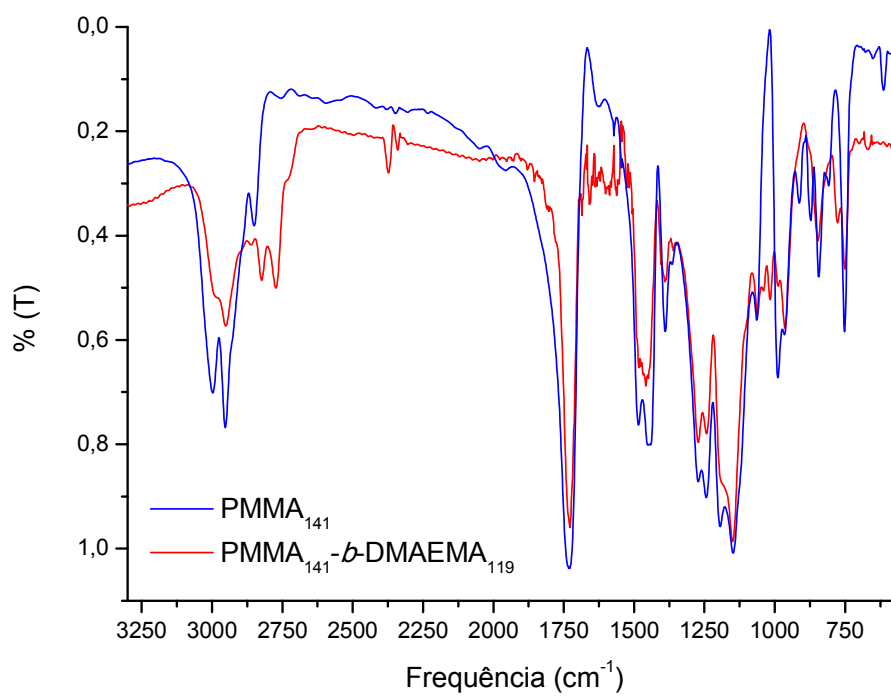
MC27: Espectro de RMN de ^1H de $\text{PMMA}_{52}\text{-}b\text{-DMAEMA}_{294}$



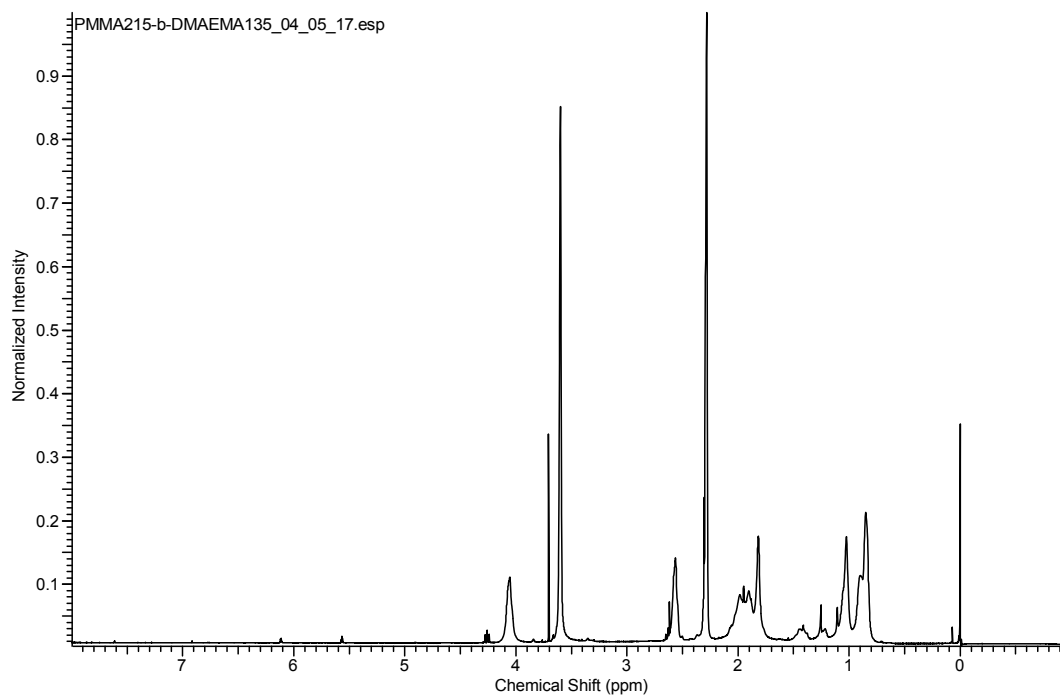
MC28: Espectro de FTIR de $\text{PMMA}_{52}\text{-}b\text{-DMAEMA}_{294}$



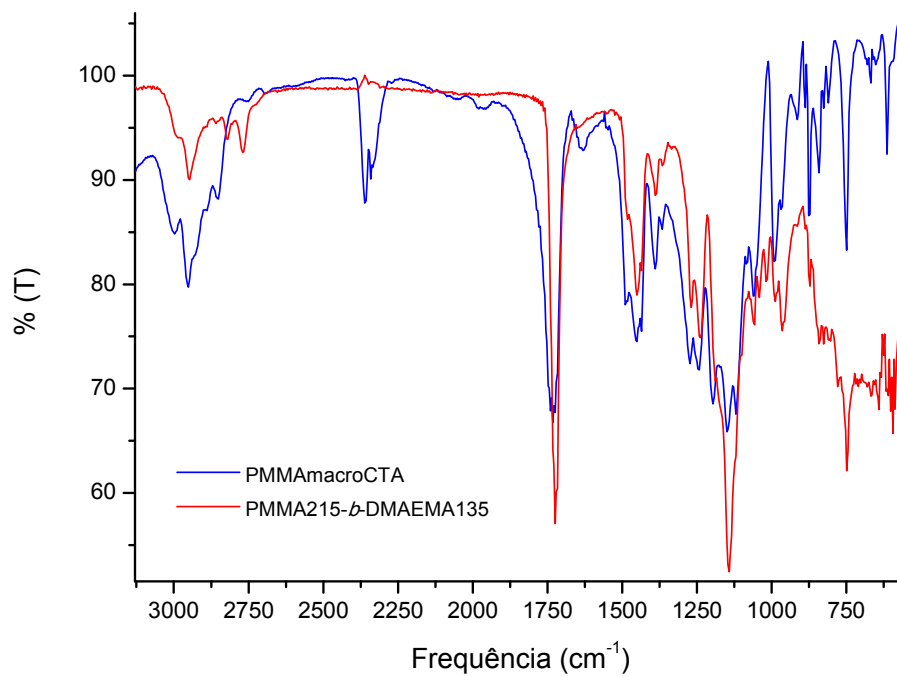
MC29: Espectro de RMN de ¹H de PMMA₁₄₁-*b*-DMAEMA₁₁₉



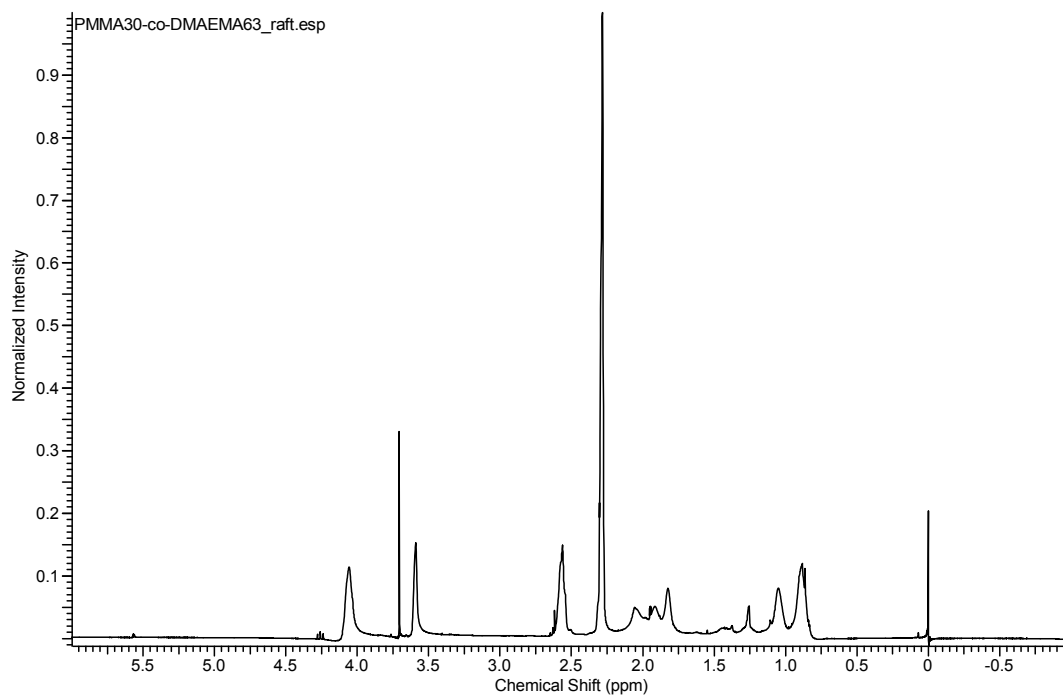
MC30: Espectro de FTIR de PMMA₁₄₁-*b*-DMAEMA₁₁₉



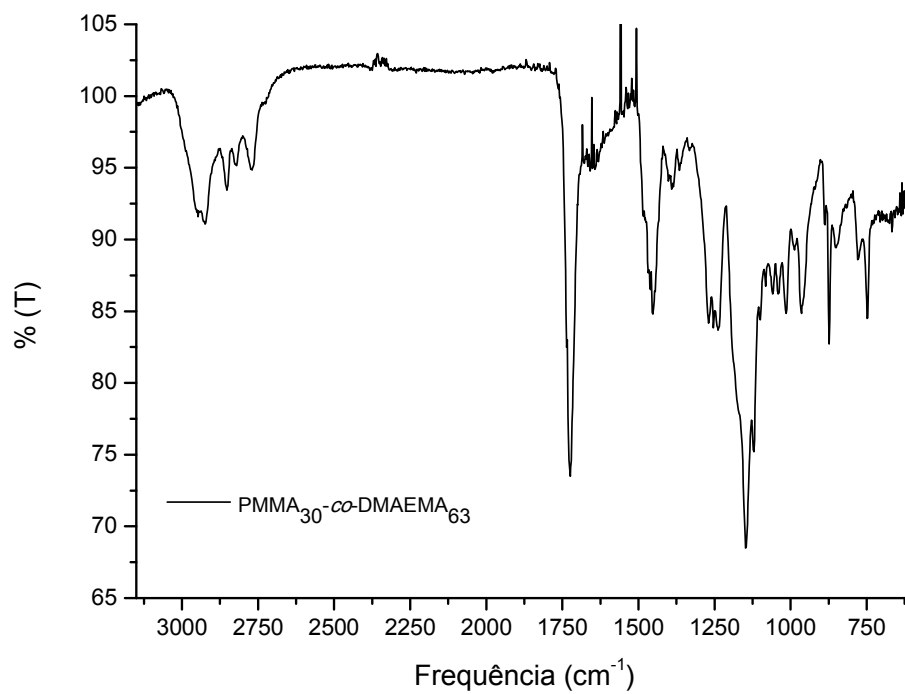
MC31: Espectro de RMN de ^1H de $\text{PMMA}_{215}\text{-}b\text{-DMAEMA}_{135}$



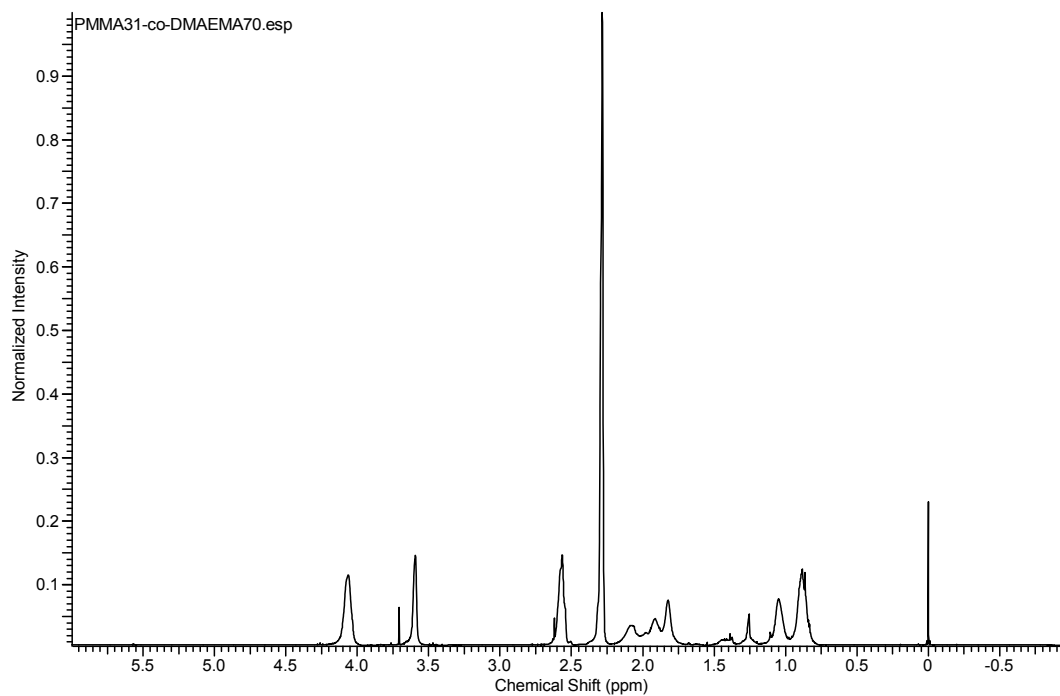
MC32: Espectro de FTIR $\text{PMMA}_{215}\text{-}b\text{-DMAEMA}_{135}$



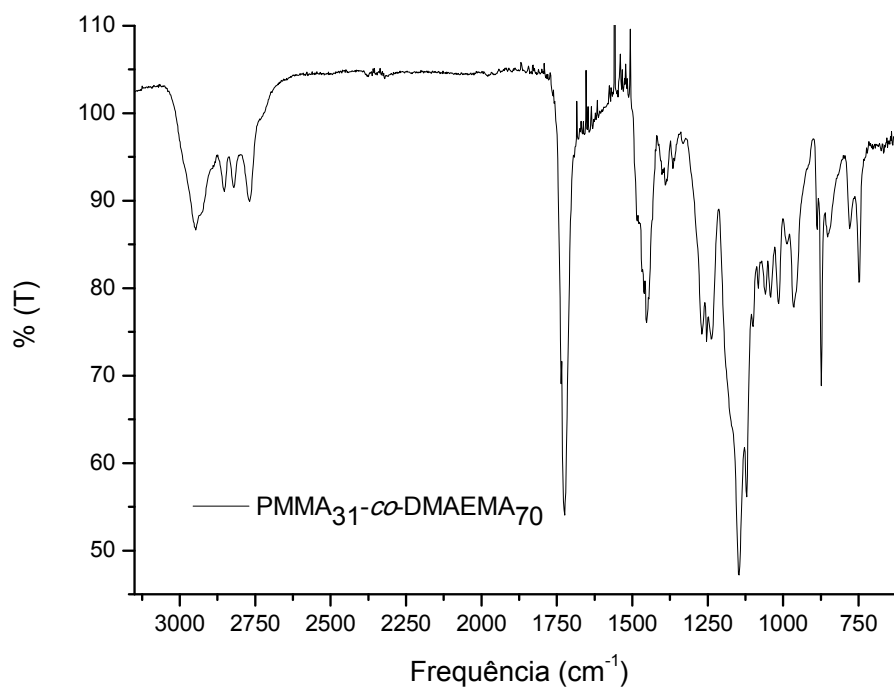
MC33: Espectro de RMN de ^1H de $\text{PMMA}_{30}\text{-co-DMAEMA}_{63}$



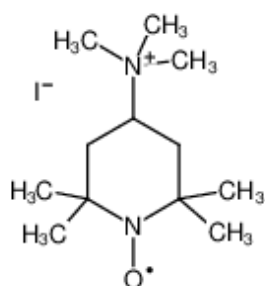
MC34: Espectro de FTIR de $\text{PMMA}_{30}\text{-co-DMAEMA}_{63}$



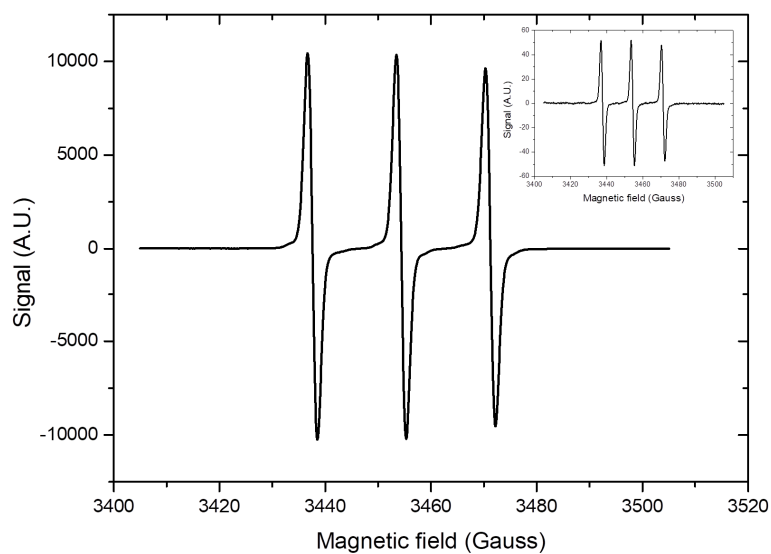
MC35: Espectro de RMN de ^1H de $\text{PMMA}_{31}\text{-co-DMAEMA}_{70}$



MC36: Espectro de FTIR de $\text{PMMA}_{31}\text{-co-DMAEMA}_{70}$



MC37. Estrutura da sonda iodeto de trimetilamônio-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (CAT1)



MC38. Espectro de RPE de CAT1 em uma suspensão de polimerossomos de PDMAEMA₃₁₅-*b*-PS₇₈₁ antes e depois da adição (ascendente) de ascorbato. Os polimerossomos foram preparados a 1 mg.mL⁻¹, em Tris-HCl 10 mM, CAT1 3.75 mmol.L⁻¹, pH 7.4.

B – Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Valdomiro Vagner de Souza

Local e data de nascimento: Pouso Alegre, MG – 03/03/1983.

EDUCAÇÃO

Escola Estadual Profa. Geraldina Tosta, Pouso Alegre, MG – 2000.

Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre, MG – 2006.

Graduação em Farmácia

Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG – 2009.

Mestrado em Ciências Farmacêuticas

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, CNPQ – Novembro de 2014 a Outubro de 2018.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos)

1. SARAIVA, G. K. V. ; DE SOUZA, V. V. ; DE OLIVEIRA, L. COUTINHO ; NORONHA, M. L. C. ; MASINI, J. C. ; CHAIMOVICH, H. ; SALINAS, R. K. ; FLORENZANO, F. H.; CUCCOVIA, I. M. Characterization of PMMA-b-PDMAEMA aggregates in aqueous solutions. COLLOID AND POLYMER SCIENCE, v. 297, p. 1-13, 2019.
2. SILVA, NARIADNE TEIXEIRA DA; CARDOSO, MARIA EDUARDA DE MATTOS ; LOPES, DANIELE DE OLIVEIRA ; SILVA, ALEXANDRE DE SOUZA E ; LACERDA, FÁBIO VIEIRA ; OLIVEIRA, LUIS HENRIQUE SALES ; Souza, Valdomiro Vagner de. PREVALÊNCIA DE DROGAS APRENDIDAS EM UM MUNICÍPIO DO SUL DE MINAS GERAIS: análise de variáveis interferentes e propostas para a prevenção. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 14, p. 707-713, 2016.
3. Silva, A.S; TAVARES, D. N. D. ; LACERDA, F. V. ; SOUZA, V. V. ; BAGANHA, R. J.; OLIVEIRA, L. H. S. . Influência do Treinamento Aeróbio nos Níveis de Homocisteína em um Indivíduo Diabético do Tipo 2: Estudo de Caso / Influence of Aerobic Training on Homocysteine Levels in a Type 2 Diabetic Subjects: Case Study. REVISTA CIÊNCIAS EM SAÚDE, v. 4, p. 6, 2014.
4. REZENDE, N. S. ; BASTOS, L. C. ; OLIVEIRA, L. H. S. ; SOUZA, V. V. ; DELFINO, M. M. EFEITOS DA TERAPIA DO ESPELHO NO TRATAMENTO DE PACIENTES PÓS ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO COM SEQUELA MOTORA - REVISÃO DE LITERATURA. CEU Arkos La Universidad Vallartense, p. 231-237, 2014.

5. PEREIRA, P. C. ; OLIVEIRA, L. H. S. ; Silva, A.S. ; SOUZA, V. V. . 362-370 EFICÁCIA DA REABILITAÇÃO VESTIBULAR EM IDOSOS COM TONTURA. CEU Arkos La Universidad Vallartense, v. 11, p. 371-378, 2013.
6. PAIVA, L.J ; OLIVEIRA, L. H. S. ; Silva, A.S. ; SOUZA, V. V. . AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONHECIMENTO E QUALIDADE DA ATENÇÃO FARMACÊUTICA OFERTADA A USUÁRIOS DE MEDICAMENTOS EM SILVIANÓPOLIS, SUL DE MINAS GERAIS, BRASIL. CEU Arkos La Universidad Vallartense, v. 11, p. 22-31, 2013.
7. SILVA, ALEXANDRE DE SOUZA E ; RAMOS, AMANDA HELOISA ; LACERDA, FÁBIO VIEIRA ; Souza, Valdomiro Vagner de ; OLIVEIRA, LUÍS HENRIQUE SALES ; MOTA, MARIA PAULA GONÇALVES . ASSOCIAÇÃO DA HOMOCISTEÍNA E LDL EM MULHERES IDOSAS COM DIABETES DO TIPO 2. CEU Arkos La Universidad Vallartense, v. 11, p. 200-208, 2013.
8. LIMA, RAFAEL MACHADO FELIX DE ; SANTOS, DÁRCIO BENEDITO DOS ; MARCÍLIO, TONE VANDER ; LIMA, CÁSSIO ALEXANDRE SANTOS ; SILVA, MAURI APARECIDO DA ; Souza, Valdomiro Vagner de . DESENVOLVIMENTO DE SABONETE LÍQUIDO DE ALOE VERA: EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ATIVO E MANIPULAÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 10, p. 251-259, 2012.
9. LIMA, R. M. F. ; CRIVELARO, M. A. ; ALMEIDA, S. A. ; SOUZA, V. V. . Produção de polvilho a partir do amido de mandioca: busca de alternativas para otimização do processo de produção em indústrias polvilheiras do município de Conceição dos Ouros, Minas Gerais, Brasil. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 10, p. 178-185, 2012.
10. LIMA, R.M.F ; SOUZA, V. V. . Polímeros Biodegradáveis: Aplicação na Agricultura e sua Utilização como Alternativa para a Proteção Ambiental. REVISTA AGROGEOAMBIENTAL, v. 3, p. 75-82, 2011.
11. Souza, Valdomiro Vagner; Noronha, Maria Luiza de Carvalho ; Almeida, Fabrini Luiz Alves ; Prado, César Augusto Ribeiro ; Doriguetto, Antônio Carlos ; Florenzano, Fábio Herbst . Cmc of PMMA-block-PDMAEMA measured by NPN fluorescence. Polymer Bulletin (Berlin. Print), v. 67, p. 875-884, 2011.
12. SOUZA, V. V.; FLORENZANO, F. H . Síntese de Copolímero de Poli(estireno-co-metacrilato de 2-hidroxietila) por Polimerização Radicalar Controlada via RAFT: Estudo da Síntese e Solubilidade. Revista Cientific@ Universitas, v. 2, p. 1-2, 2010.
13. SOUZA, V. V.; Bertocin, Ana Lúcia Francisco. Atenção farmacêutica para pacientes hipertensos nova metodologia e a importância dessa prática no acompanhamento domiciliar. Revista Brasileira em Promoção da Saúde (Online), p. 224-230, 2008.