

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CLÁUDIA SANTOS SALIM

Síntese de copolímeros em bloco para a prospecção da formação de sistemas vesiculares
(polimerossomos)

Lorena
2022

CLÁUDIA SANTOS SALIM

Síntese de copolímeros em bloco para a prospecção da formação de sistemas vesiculares
(polimerossomos)

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais na área de concentração de Materiais Convencionais e Avançados

Orientador: Dr. Fábio Herbst Florenzano

Versão Corrigida

Lorena

2022

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 pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Salim, Cláudia Santos

Síntese de copolímeros em bloco para a prospecção da formação de sistemas vesiculares (polimerossomos) / Cláudia Santos Salim; orientador Fábio Herbst Florenzano - Versão Corrigida. - Lorena, 2022. 118 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia de Materiais na Área de Materiais Convencionais e Avançados) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2022

1. Polimerossomos. 2. Copolímeros. 3. Raft. I. Título. II. Florenzano, Fábio Herbst , orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Fábio Herbst Florenzano pela orientação e todos os ensinamentos ao longo de nossa convivência.

À Escola de Engenharia de Lorena e ao Instituto de Química, em especial, à professora Iolanda Cuccovia, da USP pela estrutura fornecida ao longo do meu trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos e do Programa de Doutorado-Sanduíche no Exterior.

Ao professor Wayne Reed, ao PolyRMC da Tulane University e à querida Júlia Siqueira pela receptividade e aprendizado.

Aos professores do DEMAR por todo o auxílio.

Ao professor Eduardo Alves do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do DFP-UFLA pelas análises de TEM.

E agradeço a Deus pela minha vida e por cada pessoa que Ele colocou no meu caminho durante essa jornada.

Aos colegas de pós-graduação do DEMAR que se tornaram amigos e fizeram meus dias mais leves. Aos colegas de laboratório: em especial à Beatriz Watanabe (meu braço direito), à querida Sarah Borges e à Tayara Corrêa, que foi meu ombro amigo quando mais precisei.

Aos meus pais, Cláudio e Eliete, pela minha criação, pela construção dos meus princípios que foram utilizados em cada passo que dei.

Por fim, às pessoas mais importantes no mundo pra mim: meu marido Luís Gustavo, minha inspiração, meu melhor amigo e meu amor; e meu filho João Vítor, meu exemplo de perseverança e bravura, meu orgulho. Eles são minha força e por eles eu tento ser uma pessoa melhor a cada dia. São minha conquista e as demais vitórias, dedico a eles.

RESUMO

SALIM, C. S. **Síntese de copolímeros em bloco para a prospecção da formação de sistemas vesiculares (polimerossomos)**. 2022. 118p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Copolímeros anfífilicos podem formar sistemas vesiculares em meio aquoso, chamados hoje de polimerossomos. Os polimerossomos podem responder a estímulos externos e ter diversas aplicações: na compartimentalização de produtos, reagentes e/ou catalizadores, aumentando a eficiência e a seletividade dos processos (como nanorreatores); encapsulamento de materiais tóxicos, proteínas e enzimas; no transporte de fármacos; montagem de organelas artificiais, entre muitas outras. O objetivo desse trabalho foi sintetizar copolímeros anfífilicos com diferentes composições (combinadas entre os monômeros DMAEMA, MAA, MMA, HEMA, STY e tBA) e massas molares médias, visando a obtenção de diblocos para montagem de polimerossomos, os quais foram estudados quanto à incorporação e isolamento de moléculas hidrofílicas. As sínteses foram via Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação devido às especificidades da técnica, em duas etapas, sendo a primeira gerou o macroagente para a segunda. Os polímeros foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear de prótons, Espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier e Cromatografia de Permeação em Gel. As vesículas poliméricas foram formadas pelo método de Troca de solventes, caracterizadas por Espalhamento de Luz Dinâmico e, em alguns casos, por microscopias. Por fim, os polimerossomos foram testados quanto à capacidade de isolarem moléculas hidrofílicas e liberarem o conteúdo quando desejado por Espectrofotometria UV-Vis e medidas da atividade enzimática pelo método de Miller. Após análise da cinética de reação por Espectrofotometria, concluiu-se que as vesículas de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ foram capazes de isolar moléculas de azul de metileno de um agente redutor. Os polimerossomos de P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇ foram analisados por Microscopia Eletrônica de Transmissão, a qual demonstrou a formação de coloides com o diâmetro de centenas de nanômetros (compatível com vesículas) e a forma esferoidal. Por fim, o PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃ encapsulou a enzima invertase, sua membrana foi rompida usando o tensoativo Triton X-100 e o conteúdo foi liberado e a diferença entre esses materiais pôde ser observada com o aumento da atividade enzimática.

Palavras-chave: Polimerossomos. Copolímeros. RAFT.

ABSTRACT

SALIM, C. S. **Synthesis of block copolymers for prospecting the formation of vesicular systems (polymersomes)**. 2022. 118p. Thesis (Doctoral of Science) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Amphiphilic copolymers can form vesicular systems in aqueous media, today called polymersomes. Polymersomes can respond to external stimuli and several applications: compartmentalization of products, reagents and/or catalysts, increasing the efficiency and selectivity of processes (such as nanoreactors); encapsulation of toxic materials, proteins and enzymes; in drug delivery; assembly of artificial organelles, among many others. The objective of this work was to synthesize amphiphilic copolymers with different compositions (combined between the monomers DMAEMA, MAA, MMA, HEMA, STY and tBA) and average molar masses, aiming at obtaining diblocks for the assembly of polymersomes, which were studied for their incorporation and isolation of hydrophilic molecules. The syntheses were performed by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer due to the specificities of the technique, in two stages, the first being generated the macroagent for the second. The polymers were characterized by Proton Nuclear Magnetic Resonance, Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Gel Permeation Chromatography. The polymeric vesicles were formed by the Solvent Switch method, characterized by Dynamic Light Scattering and, in some cases, by microscopy. Finally, the polymersomes were tested for their ability to isolate hydrophilic molecules and release the content when desired by UV-Vis Spectrophotometry and measurements of enzymatic activity by Miller's method. After analyzing the reaction kinetics by spectrophotometry, it was concluded that PDMAEMA₂₇₇-b-PS₈₆ vesicles were able to isolate methylene blue molecules from a reducing agent. P(DMAEMA₆₅-co-HEMA₃)-b-PS₃₂₇ polymersomes were analyzed by Transmission Electron Microscopy, which demonstrated the formation of aggregates with a diameter of hundreds of nanometers (compatible with vesicles) and a spheroidal shape. Finally, PS₉₈-b-PAA₃₄₃ encapsulated the invertase enzyme, its membrane was broken using Triton X-100 surfactant and the content was released and the difference between these materials could be observed with the increase in enzymatic activity.

Keywords: Polymersomes. Copolymers. RAFT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Comparação entre lipossomos e polimerossomos.....	17
Figura 2 – Representação da encapsulação de partículas hidrofílicas e hidrofóbicas em polimerossomos	18
Figura 3 – Representação esquemática da síntese de ATP a partir de polimerossomos miméticos celulares.....	19
Figura 4 – Esquema de montagem da célula artificial a partir de nanorreatores.....	20
Figura 5 - Funções de lipossomas e polimerossomos biomiméticos	21
Figura 6 – Mecanismos de formação de polimerossomos	23
Figura 7 – Diferenças nas camadas de micelas esféricas, cilíndricas e polimerossomos	24
Figura 8 – Representação esquemática de copolímeros anfifílicos de acordo com os tamanhos e proporções dos blocos hidrofílico e hidrofóbico em micelas ou vesículas poliméricas/ polimerossomos	25
Figura 9 – Mecanismo geral de polimerização RAFT	28
Figura 10 - Hidrólise da sacarose catalisada pela invertase produzindo glicose e frutose ..	31
Figura 11 - Fluxograma das etapas de estudo desse trabalho	39
Figura 12 - Esquema de polimerização do PDMAEMA para formação de um MacroCTA	42
Figura 13 - Esquema de polimerização do PDMAEMA- <i>b</i> -PS	42
Figura 14 - Esquema de polimerização do P(DMAEMA- <i>co</i> -HEMA) para origem de um macroCTA	43
Figura 15 - Esquema de polimerização do P(DMAEMA- <i>co</i> -HEMA)- <i>b</i> -PS	43
Figura 16 - Esquema de polimerização do PS	44
Figura 17 - Esquema de polimerização do PS- <i>b</i> -PtBA.....	44
Figura 18 – Curvas de GPC para o PDMAEMA ₁₄₇	57
Figura 19 – Espectro de RMN para o PDMAEMA ₁₄₇	59
Figura 20 - Espectro de FTIR do PDMAEMA ₁₄₇	60
Figura 21 – Curvas de GPC do PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₃₁₇	62
Figura 22 – Espectro de RMN para o PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₃₁₇ e do bloco (PDMAEMA ₂₇₇) que deu origem a esse material	63
Figura 23 - Espectro de FTIR do PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₃₁₇	64
Figura 24 – Curvas de GPC do PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆	65

Figura 25 – Espectro de RMN do PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆	66
Figura 26 - Espectro de FTIR do PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆	67
Figura 27 – Curvas de GPC para a sexta síntese: (PDMAEMA- <i>co</i> -PHEMA)- <i>b</i> -PS	68
Figura 28 – Espectro de RMN para o P(DMAEMA ₆₅ - <i>co</i> -HEMA ₃)- <i>b</i> -PS ₃₂₇	69
Figura 29 - Espectro de FTIR do P(DMAEMA ₆₅ - <i>co</i> -HEMA ₃)- <i>b</i> -PS ₃₂₇	70
Figura 30 – Análise de conversão de tBA em PtBA por ACOMP	72
Figura 31 - Cromatogramas de poliestireno e poli(estireno- <i>bloco</i> -acrilato de <i>terc</i> butila)..	73
Figura 32 – Espectro do poli (estireno- <i>bloco</i> -acrilato de <i>terc</i> butila) antes da hidrólise	73
Figura 33 – Espectro do PS ₁₇₁ - <i>b</i> -PtBA ₆₃₂ antes e após hidrólise (PS ₁₇₁ - <i>b</i> -PAA ₆₃₂)	74
Figura 34 – Distribuição dos tamanhos (D _H) para as vesículas de PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₃₁₇ em água	76
Figura 35 – Distribuição dos tamanhos (D _H) para as vesículas de PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₃₁₇ em solução tampão pH 7,0.....	76
Figura 36 – Distribuição dos tamanhos (D _H) para as vesículas de PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆ em água em triplicata	78
Figura 37 – Distribuição dos tamanhos (D _H) para as vesículas de PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆ em azul de metileno em triplicata	78
Figura 38 – Estudo fotométrico da incorporação do azul de metileno frente à ação do agente redutor tiocianato em vesículas de PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆	80
Figura 39 – Solução de azul de metileno (a), solução de azul de metileno com 3 gotas de tiocianato após 1 hora (b), vesícula em água com 3 gotas de tiocianato após 1 hora (c) e vesícula com solução de azul de metileno encapsulada após 1 hora (d).....	81
Figura 40 – Agregados de PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆ depositados sob fita de carbono	82
Figura 41 – Agregados de PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆ depositados sob metal polido	82
Figura 42 – Distribuição dos tamanhos (D _H) para as vesículas de P(DMAEMA ₆₅ - <i>co</i> -HEMA ₃)- <i>b</i> -PS ₃₂₇ em ureia	83
Figura 43 – Micrografias de vesículas de P(DMAEMA ₆₅ - <i>co</i> -HEMA ₃)- <i>b</i> -PS ₃₂₇ com ampliação de 30 mil vezes (A) e uma estrutura em zoom próxima da escala de 200 nm (B).	84
Figura 44 – Análise por DLS de tamanho das vesículas formadas por PS- <i>b</i> -PtBA hidrolisado em solução aquosa na concentração de 0,1 mg/mL	85
Figura 45 – Análise de DLS de tamanho dos vesículas formadas por PS- <i>b</i> -PtBA hidrolisado em solução aquosa na concentração de 0,8 mg/mL	86

Figura 46 – Análise de DLS de tamanho dos vesículas formadas por PS-b-PtBA hidrolisado em solução aquosa na concentração de 1 mg/mL.....	87
Figura 47 – Análise de DLS de tamanho dos vesículas formadas por PS-b-PtBA hidrolisado em solução aquosa na concentração de 1,5 mg/mL.....	88
Figura 48 – Coeficiente de difusão, dispersidade e diâmetro médios a partir de vesículas de PS ₁₇₁ -b-PAA ₆₃₂ formados em diferentes concentrações.....	89
Figura 49 – Análise de formação de vesículas por ARGEN	90
Figura 50 – Curva analítica de glicose gerada a partir das concentrações de glicose pelas absorvâncias obtidas	92
Figura 51 – Cinética da geração de açúcares redutores pelo tempo, para a determinação da atividade enzimática	93
Figura 52 – Curvas de absorvâncias e atividades enzimáticas calculadas a partir da análise de açúcares redutores das enzimas com adição de detergentes	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das quantidades de reagentes para produção da curva padrão de glicose	53
Tabela 2 - Distribuição das quantidades de reagentes para produção da curva de atividade enzimática	54
Tabela 3 – Dados obtidos por caracterização dos polímeros sintetizados	56
Tabela 4 - Dados obtidos da análise de GPC para o PDMAEMA ₁₄₇	58
Tabela 5 - Dados obtidos da análise de GPC da síntese de PDMAEMA ₂₇₇	61
Tabela 6 – Resultados obtidos por ACOMP para o monitoramento da síntese de PS- <i>b</i> -PtBA	71
Tabela 7 – Diâmetro hidrodinâmico de vesículas de PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆ em água	77
Tabela 8 – Análise por DLS de vesículas de PS ₁₇₁ - <i>b</i> -PAA ₆₃₂ em solução aquosa na concentração de 0,1 mg/mL.....	85
Tabela 9 – Análise por DLS de vesículas de PS ₁₇₁ - <i>b</i> -PAA ₆₃₂ em solução aquosa na concentração de 0,8 mg/mL.....	86
Tabela 10 – Análise por DLS de vesículas de PS ₁₇₁ - <i>b</i> -PAA ₆₃₂ em solução aquosa na concentração de 1 mg/mL.....	87
Tabela 11 – Análise por DLS de vesículas de PS ₁₇₁ - <i>b</i> -PAA ₆₃₂ em solução aquosa na concentração de 1,5 mg/mL.....	88
Tabela 12 – Absorbâncias obtidas para análise da conversão de açúcares redutores pelo tempo pelo método do DNS.....	92
Tabela 13 – Efeito da adição de detergente Triton-X100 no diâmetro hidrodinâmico em vesículas de PS ₉₈ - <i>b</i> -PAA ₃₄₃	94
Tabela 14 – Análise das atividades enzimáticas após adição dos detergentes Triton X-100 e DPE em solução enzimática.....	95
Tabela 15 – Teste de adição de detergente Triton-X100 em solução enzimática.....	96
Tabela 16 – Teste de adição de detergente DPE em solução enzimática	96
Tabela 17 – Teste de adição dos detergentes Triton X-100 e DPE em vesículas contendo solução enzimática	97
Tabela 18 – Atividade enzimática das vesículas contendo enzima aprisionada, do tampão contendo enzimas livres e de vesículas rompidas com Triton 3,5%.....	98

Tabela 19 - Análise dos diâmetros hidrodinâmicos da vesícula contendo enzima aprisionada, do tampão contendo enzimas livres e da vesícula estourada com Triton 3,5%	99
Tabela 20 – Atividade enzimática das vesículas contendo enzima aprisionada, do tampão contendo enzimas livres e de vesículas rompidas com Triton 3,5%	100
Tabela 21 – Segunda análise dos diâmetros hidrodinâmicos da vesícula contendo enzima aprisionada, do tampão contendo enzimas livres e da vesícula estourada com Triton 3,5%	101

LISTA DE SIGLAS

ACM	Monitoramento Automático Contínuo
ACOMP	Monitoramento online automático de reações de Polimerização
AIBN	Azobisisobutironitrila
CTA	Agente de Transferência de Cadeia
DEMAR	Departamento de Engenharia de Materiais
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMAEMA	Metacrilado de 2-(dimetilamino etila)
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPE	1,1-Difenil-eter
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietila
MAA	Ácido metacrílico
MMA	Metacrilato de metila
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PS	Poliestireno
RAFT	Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SEC	Size Exclusion Chromatography
STY	Estireno
tBA	Acrilato de <i>terc</i> butila
THF	Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	Polimerossomos e sua aplicabilidade	17
2.2	Formação dos polimerossomos	22
2.3	Síntese dos copolímeros	26
2.3.1	Polimerização via RAFT	28
2.4	Monitoramento online automático de reações de Polimerização (ACOMP)	30
2.5	Polimerossomos como nanorreatores: encapsulamento de materiais para atuação <i>in situ</i>	30
2.6	Comportamento responsivo de polímeros	32
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Materiais.....	38
4.2	Metodologia.....	38
4.2.1	Purificação dos monômeros	40
4.2.2	Purificação do iniciador das reações	40
4.2.3	Purificação dos polímeros	40
4.2.4	Cálculo da massa molar teórica.....	40
4.2.5	Sínteses dos polímeros de PMAEMA, PHEMA, PS, PMMA e PMAA	41
4.2.6	Síntese do PS ₁₇₁ - <i>b</i> -PtBA ₆₃₂	43
4.3	Hidrólise dos copolímeros de PtBA	45
4.4	Caracterização dos polímeros.....	45
4.4.1	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	45
4.4.2	Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN ¹ H).....	46
4.4.3	Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR)	47
4.4.4	Monitoramento online automático de reações de Polimerização (ACOMP)	47
4.5	Preparação de vesículas.....	48
4.6	Caracterização de vesículas – Estudo da incorporação de moléculas hidrofílicas.....	49
4.6.1	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	49

4.6.2 Acompanhamento da formação de vesículas por ARGEN	50
4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
4.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	51
4.6.5 Análise colorimétrica por Espectroscopia UV-Visível	51
4.6.6 Estudo fotométrico da incorporação de azul de metileno.....	51
4.7 Testes de incorporação - Quantificação de açúcares redutores	53
4.8 Rompimento das vesículas	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
6 CONCLUSÕES	102
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	103
REFERÊNCIAS.....	104
APÊNDICES.....	116

1 INTRODUÇÃO

Inspirada pela natureza, a Ciência vem buscando estratégias para imitar sistemas celulares organizados (CHEN; SILVER, 2012; MASON *et al.*, 2019). Recentemente, muitas pesquisas têm sido realizadas com vesículas de composição polimérica, cujas estruturas são análogas a de lipossomos, que são feitos a partir de lipídeos naturais (BHUSHAN *et al.*, 2021). Esses materiais são chamados, em tradução livre do inglês, de "polimerossomos". Polimerossomos são sistemas vesiculares formados pela autoagregação de copolímeros anfifílicos (UCHEGBU *et al.*, 2013) e que podem ser enquadrados como um tipo de sistema biomimético, por sua analogia com as células e as barreiras que as constituem (membranas) (MARTINO *et al.*, 2012; MASON; THORDARSON, 2017).

Copolímeros anfifílicos são amplamente utilizados nas áreas biológicas, da saúde e nas indústrias alimentícia, de construção civil e farmacêutica (ATZET *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2018). Alguns copolímeros podem formar agregados poliméricos como micelas e vesículas em meio aquoso. Polimerossomos possuem um compartimento interno aquoso, isolado do exterior por uma membrana anfifílica, em geral formados por copolímeros com a arquitetura “dibloco”, sendo um hidrofílico e outro hidrofóbico (UCHEGBU *et al.*, 2013).

Os polimerossomos podem encapsular diferentes tipos de materiais e agir como nanorreatores, ou seja, serem capazes de promoverem reações químicas em seu interior (DISCHER, 2002; BUSSELS, 2004; DU; O'REILLY, 2009; KHAN *et al.*, 2015). Dependendo da sua composição, podem responder a estímulos externos e isso aumenta sua aplicabilidade industrial. O estudo desses polimerossomos envolve a compreensão da estrutura, bem como das propriedades dos copolímeros anfifílicos que os constituem, dos métodos de produção e da caracterização das vesículas formadas (APOLINÁRIO *et al.*, 2017; DISCHER, 2002; UCHEGBU *et al.*, 2013).

Neste estudo, foram sintetizados copolímeros dibloco via RAFT (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer), uma técnica de Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (RDRP) que permite o planejamento e controle da massa molar total, composição e outros parâmetros do material polimérico. Esses copolímeros foram caracterizados, testados quanto à formação de vesículas pela técnica troca de solventes (DU; O'REILLY, 2009) e quanto à capacidade de isolar moléculas e promoverem reações químicas dentro das vesículas. O trabalho foi desenvolvido em sua maioria na EEL-USP e

parte no PolyRMC, da Tulane University – EUA, contando com o sistema de acompanhamento de sínteses ACOMP.

A motivação para esse trabalho vem do crescente número de estudos envolvendo materiais poliméricos sintéticos. A capacidade dos copolímeros em responder a estímulos externos aumenta o interesse em sua aplicação, que pode ser industrial em tratamento de águas; encapsulamento de materiais tóxicos, proteínas e enzimas (MASON *et al.*, 2019); aumento da eficiência e seletividade de processos químicos (nanorreatores) (BUSSELS, 2004; KHAN *et al.*, 2015; YAO *et al.*, 2015) e na nanotecnologia (HIGUCHI; YABU; SHIMOMURA, 2007).

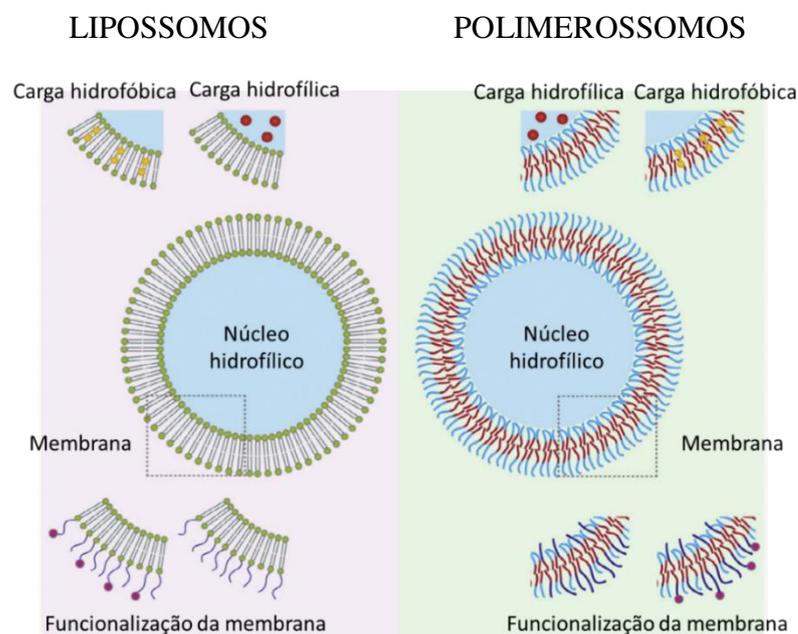
Sistemas vesiculares a partir de polímeros são amplamente estudados na área da Saúde seja para o diagnóstico de patologias ou tratamentos médicos (LEONG *et al.*, 2018; MESSENGER *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2020; VIEIRA; GAMARRA, 2016). Em outras áreas da Ciência e da Tecnologia também poderá vir a ser amplamente empregada (VAN OERS; RUTJES; VAN HEST, 2014), como na montagem de organelas artificiais (MASON *et al.*, 2019). Sendo assim, a confecção e o estudo desses sistemas são pertinentes e desejáveis no atual cenário.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polimerossomos e sua aplicabilidade

Polimerossomos são sistemas vesiculares que apresentam um compartimento interno aquoso, isolado do exterior por uma membrana anfifílica formada pela autoagregação de copolímeros (UCHEGBU *et al.*, 2013) e que podem ser enquadrados como um tipo de sistema biomimético, por sua analogia com as células e as barreiras que as constituem (membranas) (MARTINO *et al.*, 2012; MASON; THORDARSON, 2017). Quando comparados aos lipossomos (Figura 1), materiais análogos feitos a partir de lipídeos naturais (RIDEAU *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2020), os polimerossomos são considerados mais “robustos” ou tendo uma maior resistência mecânica, além da capacidade de projetar a permeabilidade da sua membrana. Este parâmetro depende tanto da massa molar (portanto da espessura da parede) como da polaridade relativa da membrana hidrofóbica (BLANAZS; ARMES; RYAN, 2009; ARRABITO *et al.*, 2020). Os lipossomos já são amplamente estudados e aplicados na biomedicina (KIM; JEONG, 2021), os polimerossomos vêm ganhando espaço na pesquisa com a possibilidade de alcançar mercados mais amplos, bem como outros setores industriais.

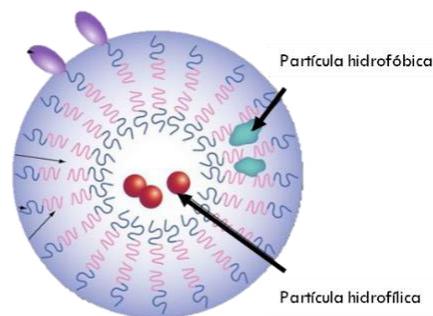
Figura 1 – Comparação entre lipossomos e polimerossomos



Fonte: Adaptado de Messenger *et al.* (2014).

Vesículas poliméricas geradas pela automontagem de copolímeros anfifílicos (polimerossomos) oferecem a vantagem de encapsulação simultânea de compostos hidrofílicos nas suas cavidades aquosas e a inserção de compostos hidrofóbicos nas suas membranas (Figura 2), assim como acontece com os lipossomos. Esta estratégia permite o desenvolvimento de nanorreatores e organelas artificiais em que os compostos ativos são simultaneamente protegidos e podem agir *in situ* e que apresentam as vantagens intrínsecas desse sistema vesicular (DISCHER, 2002; KHAN *et al.*, 2015; UCHEGBU *et al.*, 2013).

Figura 2 – Representação da encapsulação de partículas hidrofílicas e hidrofóbicas em polimerossomos



Fonte: BEI; MENG; YOUAN, 2010.

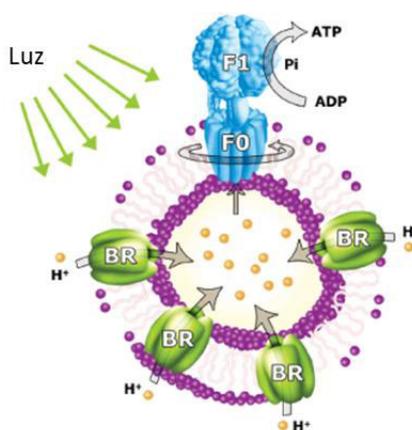
A aplicabilidade desses sistemas é amplamente estudada na área da Saúde. Vesículas combinadas com biomoléculas (enzimas, proteínas, DNA, etc.) têm potencialmente uma grande variedade de aplicações, desde sistemas de distribuição de medicamentos até construção de organelas artificiais ou superfícies ativas (PALIVAN *et al.*, 2012). Podem ser usadas para diagnóstico de patologias, tratamentos ou liberação controlada de drogas - *drug delivery* (LEONG *et al.*, 2018; MESSAGER *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2020; VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Para imitar células vivas, algumas estruturas biológicas fundamentais, tais como membranas lipídicas, proteínas de membrana e organelas de membrana vêm sendo empregadas (CHOI; MONTEMAGNO, 2005; MARTINO *et al.*, 2012). Os copolímeros anfifílicos podem ser empregados na composição de membranas similares ao modelo da bicamada lipídica das células vivas (VRIEZEMA, 2007; CHRISTIAN *et al.*, 2009).

No trabalho de Choi e Montemagno (2005), visando o estudo da síntese de ATP e da enzima ATP sintase, um sistema polimersômico multiprotéico foi construído para imitar um processo celular complexo. O ATP foi produzido por reações acopladas entre a bacteriorodopsina (BR), uma bomba de prótons transmembrana acionada por luz, e uma

enzima F_0F_1 -ATP sintase como motor, reconstituída em polimerossomos. A ATP sintase usava um gradiente de prótons eletroquímico gerado pelo BR para sintetizar o ATP a partir do ADP e do fosfato inorgânico (Pi), sendo que o processo está ilustrado na Figura 3. Os resultados do estudo indicaram que a ATP sintase mantinha a síntese de ATP e sua atividade motora em membranas artificiais. Com isso, os autores afirmaram que este proteopolimossomo híbrido pode ter ampla aplicação em investigação *in vitro* do metabolismo celular ou na síntese de outros materiais funcionais (CHOI; MONTEMAGNO, 2005).

Figura 3 – Representação esquemática da síntese de ATP a partir de polimerossomos miméticos celulares



Fonte: (CHOI; MONTEMAGNO, 2005).

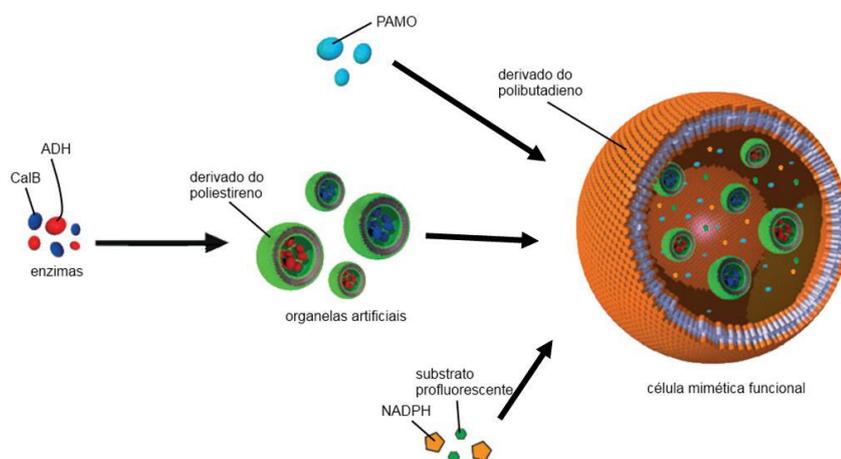
As cadeias poliméricas podem ser quimicamente modificadas para permitir a permeabilidade desejada de peptídeos, carboidratos, poliaminas e oligonucleotídeos. As nanovesículas poliméricas têm sido usadas para o direcionamento de células cancerosas, fagócitos mononucleares, células dendríticas e células (BROZ *et al.*, 2006).

Os nanorreatores copoliméricos também são uma alternativa aos lipossomos (ARRABITO *et al.*, 2020; BHUSHAN *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2020) como transportadores encapsulantes para enzimas ativadoras de pró-fármacos. Ranquin *et al.* (2005) em seus estudos alcançaram redução na citotoxicidade de drogas anticancerígenas por encapsulamento de pró-fármacos numa vesícula de um copolímero tribloco de poli(2-metiloxazolina)-bloco-poli(dimetilsiloxano)-bloco-(2-metiloxazolina), onde o composto ativo (citotóxico) era gerado apenas quando exposto às condições específicas encontradas em tecidos tumorais. A funcionalização dessas vesículas mostrou-se uma promessa para o tratamento do câncer. Elas também podem ser projetadas para formarem membranas

nanoporosas e terem proteínas inseridas em sua parede. Assim, o substrato de enzimas a penetra e é convertido pela enzima encapsulada (TANNER *et al.*, 2011).

A multicompartimentalização é o segredo para imitar as células vivas (MASON *et al.*, 2019). No trabalho de Peters *et al.* (2014), primeiramente são inseridas duas enzimas: a álcool desidrogenase (ADH) e a *Candida antarctica* lipase B (CalB) em vesículas feitas a partir do copolímero de poliestireno-*b*-poli(3-(isociano-lalanil-aminoetil)tiofeno (PS-*b*-PIAT). Em seguida, essas vesículas juntamente com a enzima fenil acetona monooxigenase (PAMO), substâncias nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e um substrato profluorescente são encapsuladas em um polimerossomo maior de polibutadieno-*b*-polióxido de etileno (PB-*b*-PEO). Essa estrutura multicompartimentalizada mimetizando uma estrutura celular e suas organelas, ilustrada na Figura 4 é capaz de realizar ações com efeito em cascata e apresenta um grande potencial de aplicação.

Figura 4 – Esquema de montagem da célula artificial a partir de nanorreatores

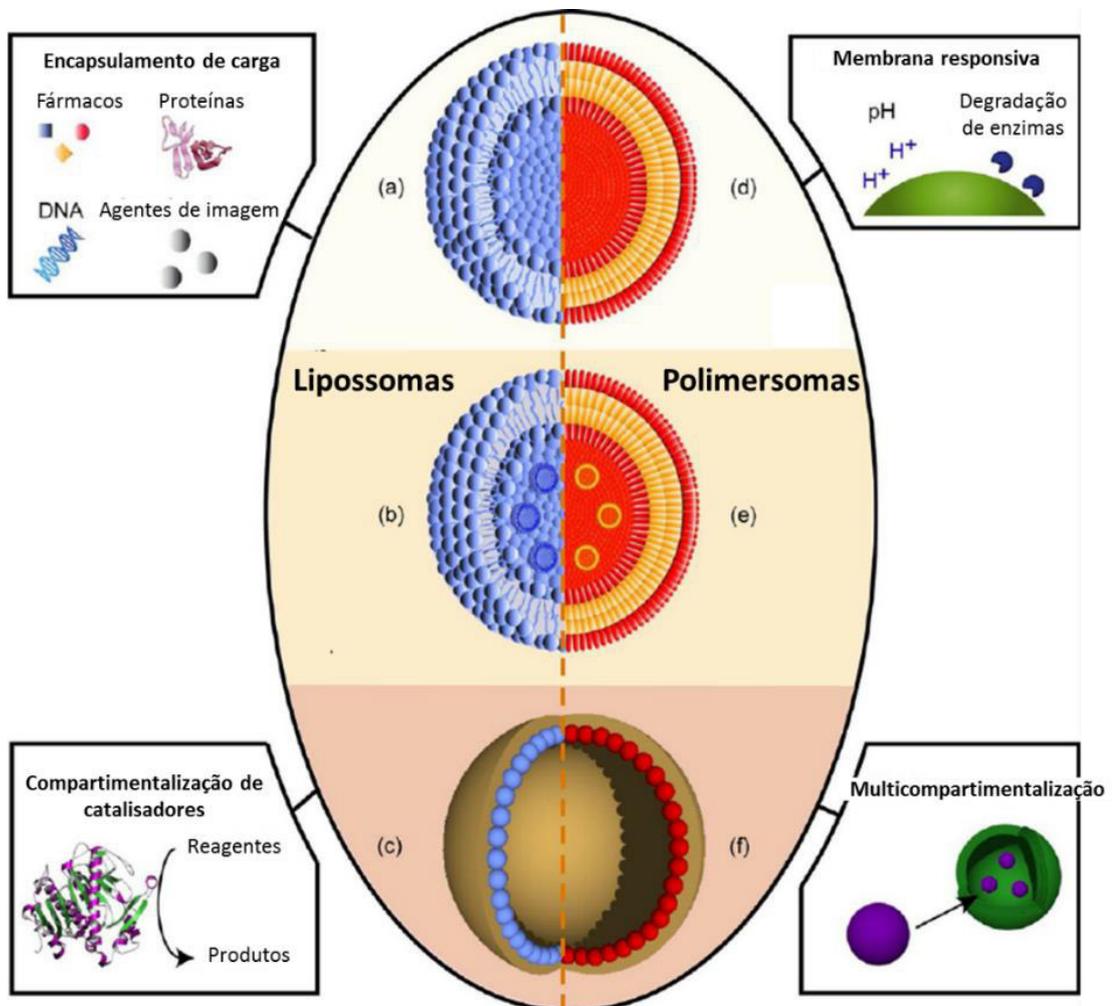


Fonte: TONELLI; RESENDE, 2014. Adaptado de PETERS *et al.*, 2014.

Além da aplicação na Saúde, polimerossomos podem ser empregados na área tecnológica e/ou industrial em sistemas de catalisadores localizados, com a finalidade de isolá-los para manter sua atividade catalítica (VAN OERS; RUTJES; VAN HEST, 2014), agindo como nanorreatores, compartimentalizando reagentes, produtos e catalisadores (YAO *et al.*, 2015). Como mostrado previamente na Figura 4, pode-se construir uma estrutura multicompartimentalizada e tornar os nanorreatores capazes de encapsular nanopartículas e essas podem ser funcionalizadas para aplicações nanotecnológicas, tais como marcação ou reconhecimento (BASINA *et al.*, 2009; HAMLEY, 2003).

Conforme apresentado na Figura 5, lipossomas (a) e polimerossomos (d) são utilizados como componentes para a concepção de sistemas multicompartimentalizados: lipossomas em lipossomas (b); polimerossomos em polimerossomos (e); cápsulas de polímeros subcompartimentalizados contendo múltiplos lipossomas (c) ou outros polímeros (f). O desenvolvimento de células artificiais terapêuticas e veículos de liberação controlada de fármacos requerem a versatilidade para encapsular uma gama de cargas, a capacidade de desencadear a liberação da carga encapsulada em resposta a estímulos ambientais, a versatilidade para executar sistemas enzimáticos (em cascata) e multicompartimentalização para co-encapsular diferentes tipos de carga terapêutica espacialmente no mesmo polimerossomo (CHANDRAWATI; CARUSO, 2012).

Figura 5 - Funções de lipossomas e polimerossomos biomiméticos



Fonte: (CHANDRAWATI; CARUSO, 2012).

Os polimerossomos podem substituir e sobrepujar similares preparados com moléculas pequenas, os chamados lipossomos, que já apresentam aplicações e mesmo produtos comerciais baseados neles, mas que têm desvantagens, como a baixa resistência mecânica das suas membranas (ARRABITO *et al.*, 2020; RIDEAU *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2020).

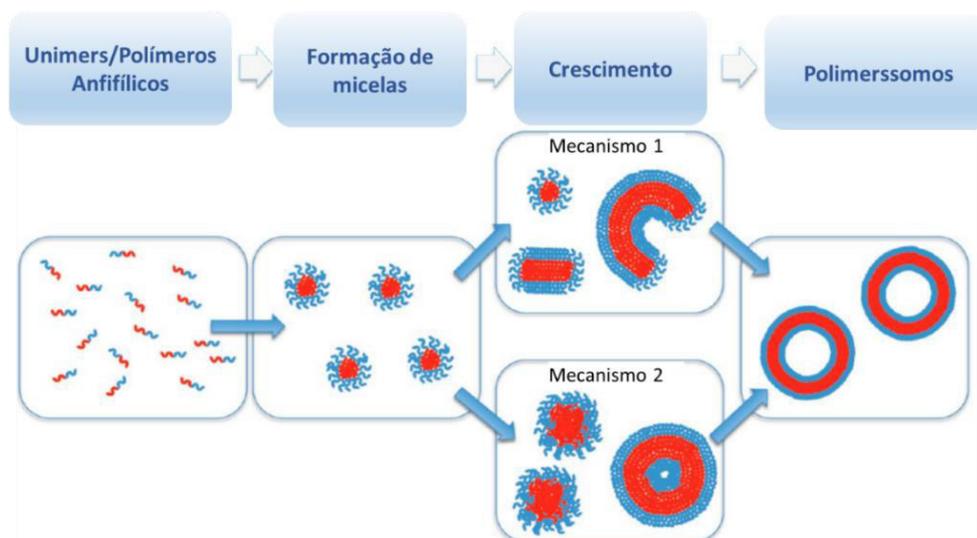
Como dito anteriormente, vesículas podem ser preparadas a partir de compostos fosfolipídicos, surfactantes ou copolímeros em bloco (como nesse trabalho) por diferentes métodos. A aplicação para qual o nanorreator for desenhado está atrelada não só à composição polimérica dos copolímeros em bloco, como também ao seu método de obtenção. Para melhor entendimento da aplicação das vesículas faz-se necessário também compreender os fenômenos associados às mesmas desde a sua composição à formação (KITA-TOKARCZYK *et al.*, 2005).

2.2 Formação dos polimerossomos

Existem diversos métodos de preparo de polimerossomos. Dentre eles: autoagregação por dissolução simples em meio aquoso (o qual foi empregado nesse trabalho), hidratação de filme polimérico, eletroporação, troca de solvente ou co-solvente (*solvent-switching*) com precipitação do copolímero e dupla emulsificação com evaporação do solvente (LIAO *et al.*, 2012; SHEN; EISENBERG, 1999; TROMBINO; CURCIO; CASSANO, 2022). Os copolímeros são conformados em micelas, vesículas, etc., de acordo com a composição ou método de preparo. Porém, independentemente do agregado formado, a maioria dos métodos são iniciados pela dissolução dos mesmos.

A formação de polimerossomos tem sido explicada por duas formas, representadas na Figura 6, sendo que as cores vermelha e azul correspondem aos blocos hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente. No mecanismo 1, há o crescimento por colisão de micelas em bicamadas que se auto agregam, formam grandes micelas cilíndricas e, em seguida, vesículas fechadas. O estágio inicial do mecanismo 2 é semelhante ao 1, o crescimento das estruturas micelares produz micelas esféricas grandes, ocorre a difusão de solvente para o interior das micelas e as vesículas são formadas (UNEYAMA, 2007).

Figura 6 – Mecanismos de formação de polimerossomos



Fonte: Adaptado de (BLEUL; THIERMANN; MASKOS, 2015).

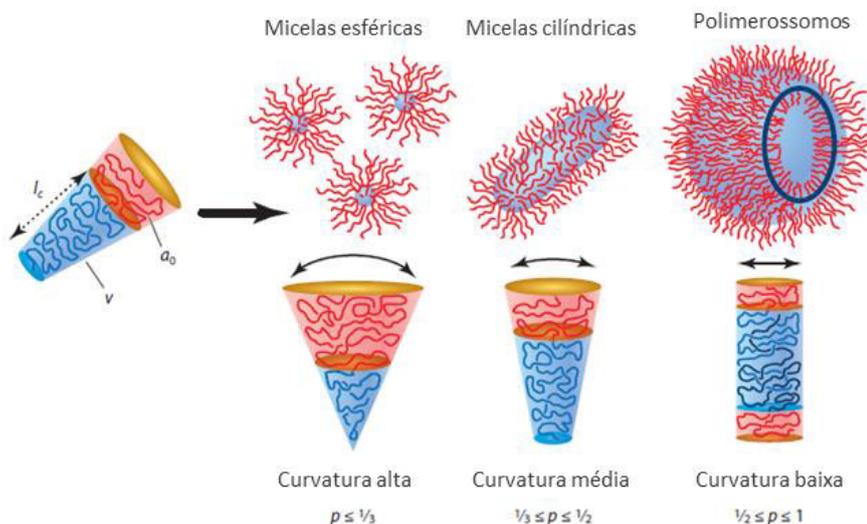
Para formação dos polimerossomos em meio aquoso são muito usados os copolímeros em blocos anfífilicos (com diferentes polaridades de cada bloco) pois possuem comportamento de agregação específico, formando membranas em diferentes solventes, o que os tornam mais interessantes para gerar essas estruturas vesiculares (depende do balanço hidrofílico/hidrofóbico) (BLANAZS; ARMES; RYAN, 2009; BRINKHUIS; RUTJES; VAN HEST, 2011; UCHEGBU *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2012).

Uma vez aplicada a técnica adequada para a síntese, é possível a obtenção de copolímeros em bloco e com a funcionalidade desejada, os quais podem se tornar muito importantes para a nanotecnologia (HIGUCHI; YABU; SHIMOMURA, 2007). Esses sistemas podem ser produzidos de diferentes formas, uma delas é a técnica de autoagregação em solução aquosa.

De acordo com a composição dos polímeros precursores e morfologia do material, vesículas podem apresentar resposta a estímulos externos. Podem alterar suas propriedades coloidais como forma, tamanho, permeabilidade, etc. e, por este fato, são consideradas “inteligentes”. É possível ainda, gerar polimerossomos com menor permeabilidade a moléculas hidrofílicas, por meio do ajuste de massa molar dos blocos. Diversos estudos comprovam a ação responsiva de polimerossomos: ao pH (DU; FAN; LIU, 2012), à temperatura (QIN *et al.*, 2006), a agentes de oxidação/redução (CERRITELLI; VELLUTO; HUBBELL, 2007) e à luz (BABIN *et al.*, 2009). Estudos mais recentes têm sido realizados desenvolvendo estímulos novos como: campo elétrico, campo magnético, moléculas de açúcar, gás, ultra-som, etc (ZHU *et al.*, 2017).

Os lipídios naturais se automontam apenas na morfologia de vesículas. Os copolímeros anfifílicos, por sua vez, por meio do controle da reação e da possibilidade de ser sintetizados com uma ampla variedade de razões de volume dos blocos, podem se autoagrupar em vesículas ou polimerossomos (bicamada), micelas esféricas (monocamada), micelas cilíndricas, bastonetes, lamelas (bicamada), cilindros hexagonais, agregados, etc., sendo que algumas dessas geometrias são apresentadas na Figura 7. A natureza do polímero e a relação dos blocos hidrofílico e hidrofóbico (Figura 8) são os principais parâmetros determinantes para a estrutura do agregado a ser formado pelo material polimérico (RIDEAU *et al.*, 2018). Comparando polimerossomos e micelas, ambos em escala nanométrica, os primeiros são esferas vazias com uma membrana hidrofóbica e interior hidrofílico, já as micelas possuem uma estrutura núcleo-casca (KITA-TOKARCZYK *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2017).

Figura 7 – Diferenças nas camadas de micelas esféricas, cilíndricas e polimerossomos

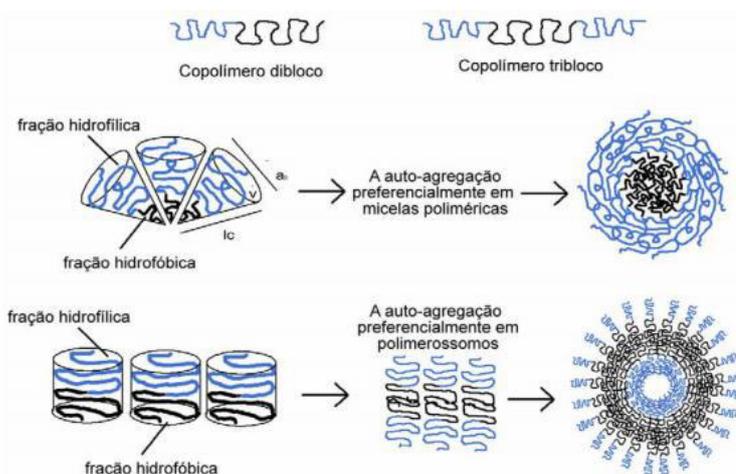


Fonte: (BLANAZS; ARMES; RYAN, 2009).

Micelas e lipossomos, formadas a partir de lipídeos naturais, são amplamente utilizados no setor farmacêutico ou alimentício (MASON *et al.*, 2019; ZHU *et al.*, 2020). Imitando esses sistemas, micelas e polimerossomos, a partir de polímeros sintéticos em blocos, podem ser produzidos por meio da técnica de RDRP. Copolímeros em bloco com grandes cadeias hidrofílicas geralmente se agrupam em micelas. Porém, percebe-se que ao aumentar o bloco hidrofóbico, esses materiais podem formar vesículas (ou polimerossomos)

e aprisionar diferentes tipos de moléculas (OLTRA; NAIR; DISCHER, 2014). Esses polímeros podem apresentar comportamento responsivo a estímulos e serem considerados "inteligentes", dependendo das unidades repetitivas presentes (ZHU *et al.*, 2017, 2020).

Figura 8 – Representação esquemática de copolímeros anfifílicos de acordo com os tamanhos e proporções dos blocos hidrofílico e hidrofóbico em micelas ou vesículas poliméricas/ polimerossomos



Fonte: (APOLINÁRIO *et al.*, 2017).

No processo de autoagregação de copolímeros anfifílicos, devem ser observados três fatores principais: massa molar média (M_w), massa ou fração de blocos dos polímeros (f) e energia de interação entre as moléculas dos blocos. A espessura dos polimerossomos pode influenciar algumas propriedades, como taxa de alongamento (K_a), área crítica de tensão (α_c), tensão de lise (ζ_c) potencial de quebra (V_c), flexibilidade (K_b), difusibilidade lateral (D). Membranas mais espessas, geradas por copolímeros de massa molar mais elevada têm menor permeabilidade, são mais resistentes às pressões osmóticas e podem ser capazes de encapsular materiais por mais tempo (APOLINÁRIO *et al.*, 2017; CHANG; SHENG; TSAO, 2014; DISCHER; AHMED, 2006; GENTEKOS; DUPUIS; FORS, 2016).

Gonzato *et al.* (2014) estudaram vesículas de copolímero de bloco de via Polimerização de Autoagregação Induzida (PISA) e consideraram que seus materiais, a partir de 100 nm, aproximadamente, comportavam-se como vesículas. Na tentativa de diminuir a alta dispersidade que, segundo os autores, as vesículas apresentam em relação às micelas, eles utilizaram uma mistura binária de um bloco estabilizador de PMAA relativamente longo e outro relativamente curto. Perceberam que à medida em que eles aumentavam a proporção de desse bloco relativamente curto aumentava-se também o diâmetro das partículas. Belluati *et al.* (2020) estudaram vesículas unilamelares gigantes

(GUV) poliméricas para encapsulação de organelas e seus sistemas classificados como vesículas também apresentavam diâmetros entre 100 e 200 nm. Ikkene *et al.* (2021) estudaram polimerossomos também via PISA e perceberam que os coloides variavam entre 100 e 300 nm, sendo que menores diâmetros indicavam menores espessuras de membranas e vice-versa (BELLUATI *et al.*, 2020; GONZATO *et al.*, 2014).

Para que os copolímeros se autoagreguem e formem vesículas, algumas proporções de massas molares dos polímeros sintetizados devem ser respeitadas, conforme foi apresentado nas Figuras 7 e 8. Sendo assim, é importante que a síntese desses copolímeros seja feita por meio de uma técnica adequada, que garanta a possibilidade de controle dos parâmetros estabelecidos. Além disso, A RAFT e outras técnicas similares, na prática são imprescindíveis para a geração de estruturas poliméricas como os copolímeros em bloco, como será mostrado a seguir.

2.3 Síntese dos copolímeros

Os copolímeros podem ser sintetizados pela união de unidades repetitivas com polaridades diferentes e, assim, adquirir características anfifílicas. Além disso, dependendo da natureza dessas unidades, esses materiais podem responder a estímulos como temperatura e pH (KIM *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2020).

A polimerização via radical livre (PRL) é a mais usada em processos químicos por não requerer condições de processo rigorosas, reagentes de alta pureza e por não usar agente controlador, o que aumentaria os gastos da reação (RUDIN; CHOI, 2013). No entanto, a PRL apresenta algumas limitações técnicas, como a falta de controle da massa molar e alta dispersidade das cadeias (MATYJASZEWSKI; SPANSWICK, 2005). Um dos fatores limitantes da PRL é o fato de que, uma vez terminada a reação, não é possível retomá-la ou propagar a cadeia polimérica, o que inviabilizaria a polimerização em blocos, que foi empregada nesse trabalho.

Posto isso, a Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (RDRP) foi desenvolvida para sobrepujar a PRL em diversos atributos. Seu diferencial é o uso de um agente controlador, que permite a pausa e retomada da polimerização, mesmo usando-se outros monômeros. Por meio dessa técnica, é possível controlar parâmetros estruturais como a massa molar média, a topologia das cadeias, a composição (para copolímeros) e assim

poder gerar copolímeros em bloco de forma eficiente (MATYJASZEWSKI; DAVIS, 2003; MATYJASZEWSKI; XIA, 2001).

Atualmente chamada de Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (RDRP, do inglês), essa técnica possibilita o maior controle de massa dos polímeros e podem ser aplicadas em meios heterogêneos (suspensão, emulsão, etc.), o que foi de grande importância do ponto de vista econômico e ambiental, visando aplicações industriais. A capacidade de parar e retomar sínteses para formar copolímeros em blocos possibilita a criação de novos materiais de alta performance que podem ser utilizados em produtos comerciais como surfactantes, lubrificantes, dispersantes, tintas, adesivos, termoplásticos, elastômeros, biomateriais, membranas, agentes de liberação de drogas, materiais eletrônicos, entre outros. As técnicas de RDRP fornecem flexibilidade e condições experimentais suaves que são similares às de PRL, enquanto permitem um controle preciso sobre as estruturas poliméricas. Como desvantagem, a técnica apresenta um custo elevado comparado à PRL e pode deixar conteúdo residual no produto final, alterando cor, odor e estabilidade (ABREU *et al.*, 2018; DESTARAC, 2010).

O controle dos parâmetros estruturais de copolímeros, alcançado por RDRP, gera a possibilidade de organização das funcionalidades das cadeias, o que se pretende alcançar com este estudo. Por exemplo, alguns monômeros já são intrinsecamente Materiais Responsivos aos Estímulos (SRMs, da sigla em inglês), o uso da RDRP otimiza a organização das suas funcionalidades e com parâmetros ajustados, aproximam a ciência dos materiais de campos como Nanotecnologia, Bioquímica, Química Orgânica e Física (YERUSHALMI *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2020).

Há cerca de duas décadas, a síntese de copolímeros com arquitetura planejada, como as exigidas para a confecção de polimerossomos, era uma tarefa bastante restrita. Com o advento das técnicas de RDRP, há diversos meios para se obter esse tipo de material. Entre eles existe a chamada Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (RAFT, também do inglês). Por meio da técnica RAFT é possível obter-se copolímeros com diversidade de composição, topologia e funcionalidade (VOSLOO *et al.*, 2002).

A formação (ou não) de polimerossomos e muitas das propriedades desse sistema dependem da composição e arquitetura dos copolímeros que os formam, o que aumenta a importância do uso de técnicas adequadas de polimerização. A RAFT é versátil, tolera traços de impurezas no material e é compatível com diversos monômeros e condições de reação. Essa técnica é eficiente para copolímeros de topologias específicas, gerando materiais com

distribuição estreita de massas molares e homogeneidade composicional. Por meio dela, a obtenção de copolímeros em bloco anfifílicos é em muito facilitada (BUSSELS, 2004).

2.3.1 Polimerização via RAFT

A RAFT é uma das técnicas mais versáteis dentre as RDRP, ela tolera traços de impurezas no material e é compatível com diversos monômeros e condições de reação. Há também um diferencial, essa técnica é capaz de controlar polimerizações em dispersões aquosas (BUSSELS, 2004). O uso da RAFT também garante, a princípio e, diferentemente do que ocorre na PRL, a homogeneidade composicional de reatividade dos monômeros (BARNER-KOWOLLIK, 2008).

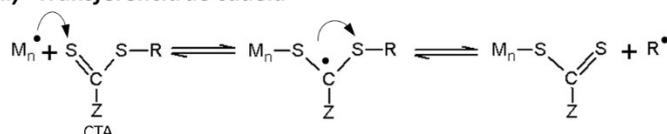
A polimerização via RAFT pode ser dividida em cinco etapas: Iniciação, Transferência de cadeias, Reiniciação, Equilíbrio de cadeias e Terminação, as quais estão apresentadas na Figura 9. Sendo que M_n representa a cadeia radicalar, Z o grupo de ativação/estabilização da ligação, C a tiocarbonila ativa e R o grupo radical de saída.

Figura 9 – Mecanismo geral de polimerização RAFT

(i) Iniciação



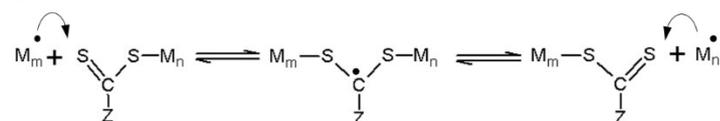
(ii) Transferência de cadeia



(iii) Reiniciação



(iv) Equilíbrio de cadeias



(v) Terminação



Fonte: Adaptado de Matyjaszeski e Davis (2003) e Florenzano (2008).

Existem também outras técnicas de polimerização como a Radicalar por Transferência Atômica (do inglês, ATRP). O maior diferencial da RAFT em relação à ATRP é que há um controle da polimerização devido à presença de um agente de transferência de cadeia (CTA), o qual deve ser compatível com os monômeros a serem polimerizados. Na RAFT, o número de cadeias formadas será igual ao número de moléculas do CTA (MATYJASZEWSKI; XIA, 2001).

Após a polimerização com a presença do agente de transferência é formado o macroCTA ou macroRAFT. Esse material é constituído pelo polímero juntamente com o agente de transferência nas extremidades de suas cadeias. A partir dele é possível a reiniciação da polimerização. Com a adição de um novo monômero é possível a formação de copolímeros dibloco e há ainda a possibilidade de formação de copolímeros tribloco ou superiores (WONG *et al.*, 2007). Na PRL, como ocorre uma terminação definitiva, a reiniciação da polimerização de uma mesma cadeia pelo mecanismo radicalar não é possível, o que na prática impede a síntese de copolímeros em bloco.

Uma vez aplicada a técnica adequada para a síntese, é possível a obtenção de copolímeros em bloco e com a funcionalidade desejada, os quais podem se tornar muito importantes para a nanotecnologia. Por meio deles é possível criar estruturas de separação de micro fases com variação de tamanho, componentes químicos e compatibilidade (HIGUCHI; YABU; SHIMOMURA, 2007). Por meio da RAFT, os blocos podem ser montados do tamanho desejado, a reação pode ser pausada e podem ser adicionados outros materiais, com diferentes propriedades e cujos tamanhos também podem ser modulados de acordo com a estrutura que se deseja obter.

Essa capacidade de formar blocos, com diferentes cargas ou propriedades, além de um controle da massa molar ou tamanho das cadeias (GODY *et al.*, 2014) faz com que a RAFT seja tão importante (TEBALDI *et al.*, 2014) para a formação de polimerossomos. Muitos estudos com formação de vesículas e encapsulamento utilizam copolímeros encontrados comercialmente, o que restringe as opções e a possibilidade de uma investigação mais sistemática do efeito da estrutura do material no comportamento dos polimerossomos. Uma vez que haja um domínio da execução da RAFT, pode-se também reduzir custos nesse processo, além de agilizá-lo.

2.4 Monitoramento online automático de reações de Polimerização (ACOMP)

O aparato de pesquisa da Tulane University e em particular do PolyRMC (Center for Polymer Reaction Monitoring and Characterization) situado na mesma universidade, permite o monitoramento de copolímeros por meio da técnica ACOMP. Trata-se de um método totalmente automatizado, permitindo monitoramento e controle em tempo real das reações de polimerização.

Essa técnica consiste na extração contínua de um pequeno fluxo da mistura reacional. Essa mistura é diluída adequadamente para ser analisada por múltiplos detectores (*online*) entre os quais se destacam os de espalhamento de luz, índice de refração diferencial, viscosidade e UV/Vis. A combinação desses sinais permite uma caracterização profunda, e em tempo real, do polímero sendo formado. Entre as características passíveis de serem analisadas via ACOMP estão: massa molar média e instantânea, dispersidade (D) e conversão. É possível também introduzir modificações nas condições reacionais, com base nas informações em tempo real, para garantir a obtenção do produto desejado.

Juntamente com a técnica de ARGEN é possível determinar a estabilidade de polimerossomos (ALB; DRENSKI; REED, 2008), o que auxilia o direcionamento da aplicação do material, para que esse aja em um meio propício e tenha a duração desejada. Tais análises não estão disponíveis no país.

As análises realizadas na Tulane University foram de suma importância para esse trabalho, houve maior compreensão das sínteses e dos parâmetros que podem ser explorados no processo. As diferentes técnicas usadas permitiram uma ampliação dos parâmetros que pode ser medidos durante a síntese, na caracterização do material obtido e na análise das vesículas. A partir dessa experiência, deu-se início aos estudos de encapsulação de moléculas hidrofílicas.

2.5 Polimerossomos como nanorreatores: encapsulamento de materiais para atuação *in situ*

Os polimerossomos, por serem anfifílicos, podem aprisionar substâncias de acordo com a afinidade hidrofílica ou hidrofóbica. Seu interior aquoso permite que materiais hidrofílicos fiquem encapsulados e que haja permeação de moléculas pela membrana. Para

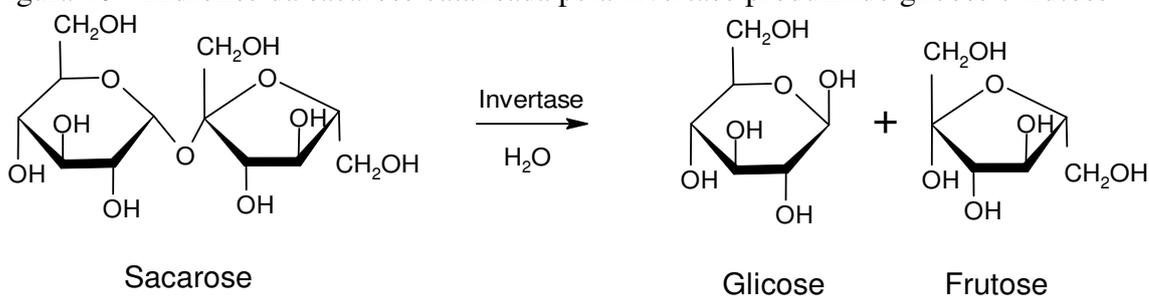
testar a ação dos polimerossomos como nanorreatores, enzimas em meio aquoso podem ser encapsuladas.

Enzimas são catalisadores naturais que regulam a taxa das reações químicas nos organismos vivos. Elas podem ser sintetizadas a partir de vegetais ou animais e, atualmente, são amplamente aplicadas na indústria, seja no setor farmacêutico ou alimentício (CIRPAN *et al.*, 2003). Nos estudos de Van Oers *et al.*, (2014), invertase foi encapsulada em um nanorreator e os resultados mostraram que a enzima foi capaz de catalisar a hidrólise de sacarose em frutose e glicose. Os autores observaram que os nanocomplexos da enzima exibiram para um aumento de 24 vezes na taxa de rotatividade em comparação com as misturas enzimáticas livres.

Nesse estudo, a enzima invertase foi encasulada em um copolímero para testar a capacidade desse em agir como um nanorreator. Posteriormente, foi misturada à uma solução contendo seu substrato (sacarose) e, em seguida, as vesículas tiveram sua membrana rompida devido à presença de um tensoativo. As atividades enzimáticas foram medidas ao longo das etapas de estudo a fim de se verificar se houve liberação do conteúdo aprisionado nesse sistema.

Para avaliar a capacidade da vesícula encapsular um material, optou-se por utilizar uma enzima disponível no mercado, a invertase ou sacarase. Essa enzima catalisa a reação de hidrólise da sacarose, produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose (Figura 10) (NADEEM *et al.*, 2015), um dissacarídeo denominado açúcar invertido.

Figura 10 - Hidrólise da sacarose catalisada pela invertase produzindo glicose e frutose



Fonte: Própria.

A invertase é muito utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia. Ela pode atuar em mecanismos de liberação controlada de drogas ou agir em alimentos funcionais (FONG *et al.*, 2017). Encapsular uma enzima é como imobilizá-la e existem diversos estudos sobre

utilização de polímeros na para isso. Alguns mostram que que a imobilização da invertase pode preservar sua atividade catalítica ou mesmo aumentá-la (ÖZTOP; AKYILDIZ; SARAYDIN, 2020; VITOLO, 2019). No caso da encapsulação por um polímerossomo, além da barreira protetora, possibilita a atuação da enzima em uma condição ou lugar específico.

Para que a enzima seja encapsulada e se mantenha aprisionada até o momento desejado, deve ser levado em conta que a estrutura química da membrana influencia sua permeabilidade (VARLAS *et al.*, 2019) e que deve haver afinidade entre o material que constitui a membrana e o que ela irá encapsular. Não deve haver conflito entre a carga da enzima e a do polímero. O ponto isoelétrico (pI) – valor de pH onde a molécula apresenta carga elétrica líquida igual a zero – da invertase é aproximadamente 4,0 (entre 3,4 e 4,5). Para valores abaixo de 3,4 cargas positivas são predominantes e acima de 4,5, cargas negativas (MARQUEZ, 2007; SELAMPINAR *et al.*, 1997). Além de considerar as cargas, deve-se avaliar a termodinâmica que envolve a solubilização de materiais, para que esses possam se autoagregar quando necessário, para que possam encapsular uma molécula e para que a liberação desse conteúdo se necessário.

2.6 Comportamento responsivo de polímeros

Para liberar uma carga específica em um lugar no corpo sob certas condições específicas, vesículas poliméricas estão sendo desenvolvidas para responder a vários estímulos, por meio do uso de copolímeros em bloco com grupos químicos intrinsecamente estímulo-responsivo (PALIVAN *et al.*, 2016; VAN GHELUWE *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2020).

Além dos fenômenos que favorecem a autoagregação de materiais, tornando possível que um copolímero anfifílico em meio aquoso se conforme numa vesícula, o comportamento responsivo de alguns materiais amplia sua potencial aplicação. Assim, uma molécula aprisionada e protegida por uma barreira de membrana pode ser liberada em um meio ou condição específica, preservando sua atividade até o momento certo da ação. Existem polímeros responsivos à diferentes condições, esses são às vezes chamados de “inteligentes” (ZHANG; MARIC, 2011).

Antes de entender o comportamento responsivo dos polímeros, é necessário analisar a termodinâmica da solubilização de polímeros hidrofílicos em meio aquoso, determinada pela variação energia livre de solubilização ($G(s)$) expressa pela (Equação 1):

$$G(s) = H(s) - TS(s) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, $G(s)$: variações de energia livre de Gibbs;

H: entalpia de solubilização;

T: temperatura;

e S: entropia de solubilização.

A solubilização engloba uma contribuição entálpica (H) e uma entrópica (S), além da temperatura. A contribuição entálpica vem do equilíbrio entre as interações intra e intermoleculares da água e do polímero. A dissolução das cadeias hidrofílicas é favorável pela variação de entalpia ($H < 0$), dominada pelos grupos polares das cadeias poliméricas e as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água do meio (HOCINE; LI, 2013). Sendo assim, um polímero pode ser solúvel em água, mas isso vai depender da temperatura do meio.

Vários polímeros, mesmo sendo solúveis em água, podem ter suas propriedades alteradas a partir de uma determinada temperatura. Polímeros termicamente responsivos com Temperatura Crítica Inferior de Solubilização (LCST) ou Temperatura Crítica Superior de Solubilização (UCST), devido a transições de fases pertencem a uma classe única de materiais inteligentes com amplas possibilidades de aplicação que variam de nanotecnologias a biomateriais, sistemas de liberação de drogas, sensores, estruturas de autocura, materiais híbridos responsivos, etc. (OSVÁTH; IVÁN, 2017).

O PDMAEMA, por exemplo, polímero utilizado nesse trabalho, é solúvel em água, porém ocorre uma separação de fases do tipo LCST após aquecimento em condições neutras ou básicas. Em meio ácido ele é completamente solúvel (HOCINE; LI, 2013). O PDMAEMA é considerado um polímero responsivo aos estímulos pH e temperatura.

Polímeros responsivos a estímulos são capazes de se alterar para demonstrar suas respostas às mudanças nas condições ambientais. Os estímulos podem ser temperatura, pH, luz, força iônica, campos elétricos e magnéticos (TROMBINO; CURCIO; CASSANO, 2022; ZHANG; MARIC, 2011).

Polímeros termorresponsíveis ou termicamente sensíveis, em uma determinada LCST, exibem uma transição de fase, o que provoca uma rápida alteração em seu estado de solubilidade. Alguns autores atribuem esse fenômeno a uma diminuição de polaridade (HOLMBERG *et al.*, 2002; JIANG; LOK; HENNINK, 2007; LIU; YU; NI, 2004), mas a explicação vem da termodinâmica. Envolve o equilíbrio entre os efeitos entrópicos, devido ao próprio processo de dissolução e devido ao estado ordenado das moléculas de água nas proximidades do polímero. Considera também os efeitos entálpicos, devido ao equilíbrio entre as forças intra e intermoleculares e devido à solvatação (SCHMALJOHANN, 2006)

Em baixas temperaturas, abaixo da LCST, o balanço entre as contribuições entálpicas e entrópicas (dH vs. dTS) resulta em uma boa solubilidade de polímeros hidrofílicos em água ($dG < 0$). Por outro lado, acima da LCST, a entalpia favorável decorrente das ligações de hidrogênio formadas entre a água e o polímero não é mais alta o suficiente para equilibrar a perda entrópica ($dG > 0$) e, com isso, ocorre uma separação de fases (HOCINE; LI, 2013). Devido a essas alterações, o PDMAEMA à temperatura (ZHANG; MARIC, 2011). O pH também interfere na solubilização e na LCST devido à presença de amina terciária em sua estrutura, fazendo com que a interação polímero-solvente e polímero-polímero mude com o pH. Essas características tornam interessante sua aplicação em polímerososomos (DE SOUZA; NAVES; FLORENZANO, 2012), para que a liberação de moléculas possa ocorrer *in situ* e a partir de algum sinal.

Sendo assim, acima da LCST, uma solução polimérica clara pode tornar-se “leitosa” (turva), devido à aparição de uma segunda fase. Esse fenômeno de transição é chamado ponto de nuvem (GELBART; BEN-SHAUL; ROUX, 2012; LÓPEZ-PÉREZ *et al.*, 2010). Essa condição também pode ampliar aplicações potenciais dos materiais. Em seu estudo, Duarte e Canselier (2005) mostram a viabilidade de empregar a extração do ponto de nuvem em micelas para a separação seletiva de compostos orgânicos homólogos ou isoméricos. Para isso, foram variados os parâmetros: concentração de tensoativo e temperatura. Segundo os autores, por meio desse fenômeno é possível utilizar micelas como extratores em operações industriais, para despoluição ou concentração de produtos da química fina. A maior vantagem dessa aplicação é ser um processo que não depende de solventes orgânicos voláteis, ou seja, um processo “limpo” e de baixo custo. O mecanismo de ação do estudo consistiu em aquecer a solução acima da LCST e utilizar um tensoativo (no estudo foram empregados Triton X-100 e Triton X-114). O aumento da temperatura provoca a desidratação do grupo hidrofílico das moléculas de tensoativo e uma elevação no número de agregação. As micelas vão aumentando de tamanho até que ocorra a separação de fases.

Formaram-se então duas fases isotrópicas: uma rica em tensoativo e outra pobre e essas podem então ser separadas (DUARTE; CANSELIER, 2005).

Existem outros polímeros responsivos, mas o PDMAEMA e seus copolímeros estão entre os de maior importância em nível acadêmico e industrial por poderem interagir com fármacos polianiônicos, enzimas e DNA. Eles são muito estudados em sistemas de liberação controlada de fármacos e genes por apresentarem uma boa resposta a pH e temperatura em solução aquosa (ZHANG; MARIC, 2011; ZHANG *et al.*, 2006) e por isso foi estudado nesse trabalho.

A partir da combinação entre polímeros com polaridades distintas, podem ser formados copolímeros em bloco e, em meio aquoso, poderão ser produzidos coloides de diferentes conformações (micelas, bicamadas, vesículas). Eles podem ser englobados como solução coloidal, um sistema heterogêneo constituído por uma mistura mecânica de partículas com tamanhos entre 1 e 1000 nm (AMARAL, 2021).

Os estudos sobre esses coloides supramoleculares vêm evoluindo ao longo dos anos. A liberação controlada de drogas aprisionadas em polimerossomos torna-se possível ao utilizar blocos poliméricos responsivos a estímulos exógenos e endógenos. Esses estímulos podem induzir uma mudança nas propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas dos copolímeros. Elas podem causar desintegração do polimerossomo ou clivagem das ligações das cadeias poliméricas e formar poros que irão liberar substâncias (TROMBINO; CURCIO; CASSANO, 2022).

Combinando polímeros com polaridades distintas em blocos poderão ser formadas vesículas em meio aquoso e essas aprisionarão a solução hidrofílica em seu interior. Essa autoagregação ocorre porque a partir de uma determinada concentração de material em meio aquoso, passa a ser energeticamente mais favorável pro sistema que essas moléculas se auto agreguem. Assim consegue se evitar ou diminuir o contato da porção hidrofóbica com a água. Elas “escondem” suas porções hidrofóbicas e geram um ganho entrópico. Na formação de vesículas em meio aquoso a partir de copolímeros anfífilicos dissolvidos em meio orgânico, ocorre uma diminuição na entropia de todo o sistema ($S < 0$) devido à organização específica das moléculas de água em torno do polímero, que é o principal efeito entrópico em polímeros hidrofílicos (HOCINE; LI, 2013)

Monômeros para a obtenção de polímeros responsivos estão disponíveis comercialmente. A possibilidade de manipulá-los, graças ao *know how* do grupo em sínteses, aumenta a aplicação potencial do material formado. A proposta desse trabalho foi criar novos copolímeros anfífilicos com a capacidade de formação de vesículas na escala nanométrica.

A encapsulação de materiais nessas vesículas vem sendo muito pesquisada (BUENO *et al.*, 2020), mas não é o foco principal desse estudo. Nele, espera-se comprovar que os materiais obtidos sejam capazes de aprisionar uma molécula hidrofílica e liberá-la quando desejado. Ao conseguir comprovar essa capacidade, esses sistemas poderão ter uma aplicação potencial na área biomédica ou como nanorreatores no setor industrial (LEONG *et al.*, 2018; MASON *et al.*, 2019; VAN OERS; RUTJES; VAN HEST, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho é sintetizar novos copolímeros com diferentes massas molares médias e diferentes combinações de monômeros, visando a montagem de polimerossomos capazes de incorporar moléculas hidrofílicas com potencial aplicabilidade na área de saúde ou tecnologia.

3.2 Objetivos específicos

Visando alcançar o objetivo geral deste trabalho, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Sintetizar polímeros via Transferência Reversível de Cadeia por Adição e Fragmentação (RAFT);
- Caracterizar os materiais sintetizados;
- Confeccionar sistemas vesiculares (polimerossomos) a partir desses materiais;
- Caracterizar os sistemas vesiculares produzidos;
- Estudar a incorporação de moléculas nesses sistemas;
- Produzir sistemas que respondam a um estímulo para que haja liberação do conteúdo aprisionado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para a realização da RAFT são necessários: 1) um agente de transferência de cadeia (ATC), compatível com os monômeros a serem utilizados; 2) um iniciador radicalar, comumente AIBN (sigla em inglês para azobisisobutyronitrile) ou peróxido de benzoíla e 3) monômeros. A técnica escolhida foi em solução usando-se solvente compatível (1,4-dioxano ou outros). A temperatura foi definida com base no iniciador utilizado.

As sínteses foram efetuadas usando: 1) 4-Ciano-4-[(dodecilsulfanilthiocarbonil)sulfanil] ácido pentanoico – Sigma Aldrich, 96,5%, como agente de transferência de cadeia; 2) Azoisobutironitrila (AIBN – Sigma Aldrich, 98%) como iniciador radicalar e 3) Metacrilado de 2-(Dimetilamino)etila (DMAEMA – Sigma Aldrich, 98%); Estireno (STY – Sigma Aldrich, 99%); Metacrilato de Metila (MMA – Sigma Aldrich, 99%); Ácido metacrílico (MAA – Sigma Aldrich, 99%), Metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA – Sigma Aldrich, 97%), Acrilato de *terc* Butila (tBA – Sigma Aldrich, 98%) como monômeros. Os solventes utilizados foram 1,4-Dioxano e Tetrahidrofurano (THF – Synth, 100%). A temperatura empregada foi de 70°C, sob atmosfera de Argônio (Ar).

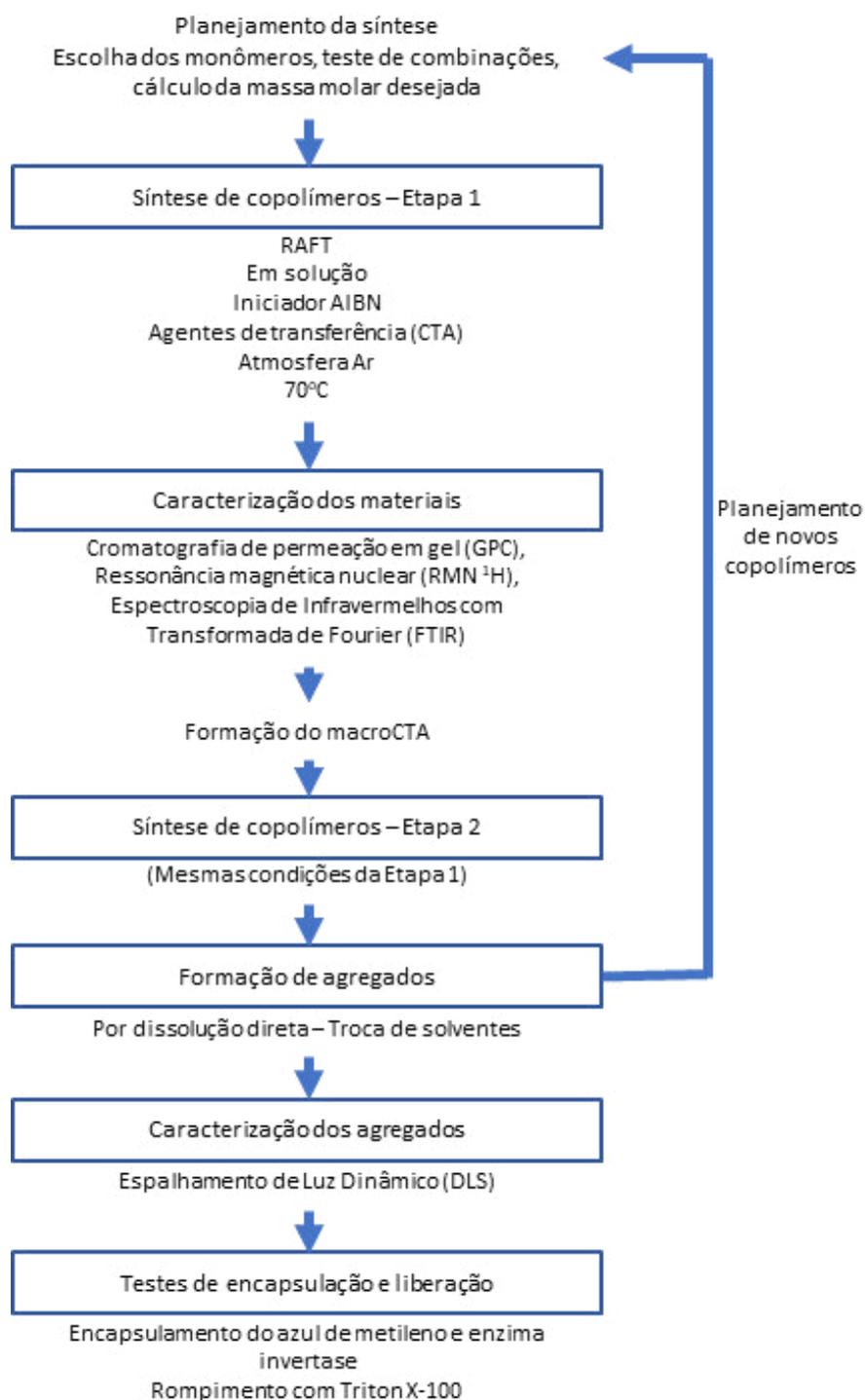
DMAEMA, HEMA, STY, MMA e MAA foram previamente filtrados através de uma coluna com alumina para remoção de inibidores antes da utilização. AIBN foi purificado por recristalização com etanol e seco à temperatura ambiente num forno a vácuo. Os demais solventes foram utilizados como recebidos.

4.2 Metodologia

As sínteses dos materiais poliméricos (copolímeros dibloco anfipáticos) foram feitas via RDRP empregando o mecanismo RAFT. Os reagentes obtidos comercialmente geralmente contêm algum inibidor e, por isso, foram purificados previamente ao uso. Ao fim das sínteses, também foi realizada purificação para remoção de monômeros residuais e demais reagentes.

O fluxograma das etapas desse trabalho está apresentado na Figura 11 cada etapa de estudo será descrita a seguir. Algumas etapas foram repetidas até que fosse obtido o material com as características ou propriedades desejadas.

Figura 11 - Fluxograma das etapas de estudo desse trabalho



Fonte: Própria.

4.2.1 Purificação dos monômeros

Todos os monômeros foram purificados a temperatura ambiente em coluna cromatográfica de Alumina básica ativada em estufa a 110° por 1 hora.

4.2.2 Purificação do iniciador das reações

O iniciador Azobisisobutironitrila (AIBN) foi purificado via recristalização. Em temperatura ambiente, 5g de AIBN foram solubilizados em 100mL de metanol sob agitação magnética por 30 minutos. A solução foi filtrada para remoção de impurezas e em seguida resfriada a 4°C por 24 horas. Os cristais formados foram filtrados, secos em dessecador por 12 horas e armazenados sob refrigeração.

4.2.3 Purificação dos polímeros

Cada 10 g dos polímeros de PDMAEMA, P(DMAEMA-*co*-HEMA)-*b*-PS e PDMAEMA-*b*-PS foram solubilizados em Tetrahydrofurano (THF) P.A. (Synth) e precipitados em 500 mL de Hexano P.A. (Synth), sob agitação magnética. A operação foi repetida com o material precipitado e o mesmo foi seco em seguida. Analogamente, os polímeros de PMMA e PMMA-*b*-PMAA foram purificados utilizando Metanol P.A. (Synth).

4.2.4 Cálculo da massa molar teórica

O cálculo da massa molar média teórica (Equação 2) é de suma importância. Ele evidencia a proporção entre o monômero e o agente RAFT, o que é um dos pontos fundamentais para a obtenção de polímeros. Por meio dele, são planejadas as sínteses de cada bloco, os quais poderão definir a estrutura do material final, como foi discutido no item 2.2.

Para esse trabalho, as massas molares teóricas foram calculadas segundo Moad *et al.* (2005):

$$MM = mm_{CTA} + \frac{n_{mon}}{n_{CTA}} \times f \times mm_{mon} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

MM	massa molar teórica
mm_{CTA}	massa molar do CTA (g mol^{-1})
n_{mon}	Número de mols do monômero (mol)
n_{CTA}	número de mols do CTA (g mol^{-1})
f	grau de conversão (0 a 1)
mm_{mon}	massa molar do monômero (g mol^{-1})

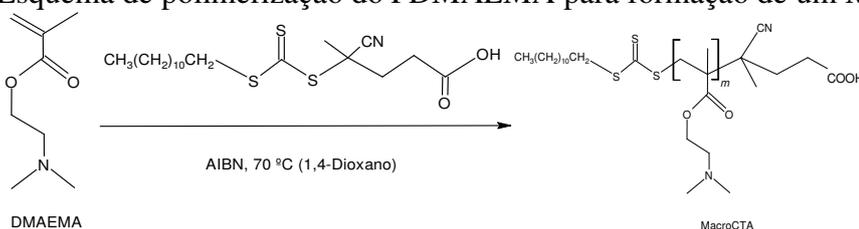
4.2.5 Sínteses dos polímeros de PMAEMA, PHEMA, PS, PMMA e PMAA

A escolha de monômeros hidrofóbicos e hidrofílicos é crítica para a formação de copolímeros, de acordo com a propriedade que deseja se obter no material formado (YAO *et al.*, 2015). A princípio, nesse trabalho foram usados monômeros típicos de polimerização via radicalar, com especial atenção àqueles que apresentam grupos que geram respostas ao pH e/ou temperatura para a porção hidrofílica. Entre esses monômeros estão o MMA e o STY para a porção apolar e o HEMA, MAA e DMAEMA para a porção polar. Foi usado ainda o tBA apolar, mas que após hidrólise torna-se ácido acrílico (AA) para alguns testes. DMAEMA não apresenta biocompatibilidade, portanto não pode ser aplicado em estudos da área de saúde. Por outro lado, é um monômero termorresponsivo, o que é desejável para diversas outras aplicações, como para a confecção de nanorreatores.

Foram testadas combinações entre DMAEMA, HEMA, STY, MMA, MAA e tBA. Os agentes de transferência de cadeia foram escolhidos de acordo com o par de blocos selecionado para a pesquisa. Os copolímeros em bloco foram sintetizados em duas etapas, sendo que a primeira produzirá um macroCTA que servirá de partida para o segundo bloco. A ordem da síntese (polar primeiro e apolar depois ou vice-versa) foi determinada pela reatividade relativa dos monômeros e também por questões de solubilidade diferencial. Podem ser usadas etapas de modificação pós-síntese como hidrólises e quaternizações para a geração de produto final.

As sínteses de PDMAEMA foram efetuadas sob agitação magnética, utilizando DMAEMA como monômero, AIBN como iniciador e ácido 4-Ciano-4-[(dodecilsulfaniltiocarbonil)sulfanil] ácido pentanoico como agente de transferência, o esquema da reação está apresentado abaixo, na Figura 12.

Figura 12 - Esquema de polimerização do PDMAEMA para formação de um MacroCTA



Fonte: Própria.

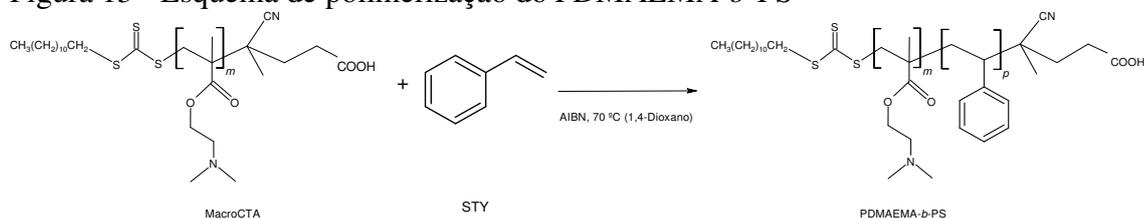
Uma reação típica de obtenção de macroCTA foi realizada em batelada ou em solução com o uso de AIBN como iniciador, em atmosfera inerte (Ar ou N₂) e com a temperatura controlada a 70°C. A massa molar pretendida foi calculada com base na razão monômero/CTA e na conversão, de acordo com a (Equação 2).

O macroCTA foi usado numa segunda etapa para a geração do copolímero em bloco, também usando a técnica em batelada ou solução. A massa molar final e a proporção dos blocos polares e apolares foram definidas com base na razão molar monômero/macroCTA e na conversão dos monômeros em polímeros. O procedimento foi similar à obtenção do macroCTA usando-se também AIBN como iniciador.

Foram sintetizados diversos copolímeros com variação nas unidades repetitivas, massa molar total e composição para se obter no mínimo um material capaz de formar vesículas em meio aquoso.

Para as sínteses do dibloco PDMAEMA-*b*-PS, utilizou-se estireno como monômero, AIBN como iniciador e o MacroCTA (PDMAEMA+controlador) como agente de transferência de cadeia. As reações também ocorreram sob agitação magnética e o esquema está apresentado na Figura 13.

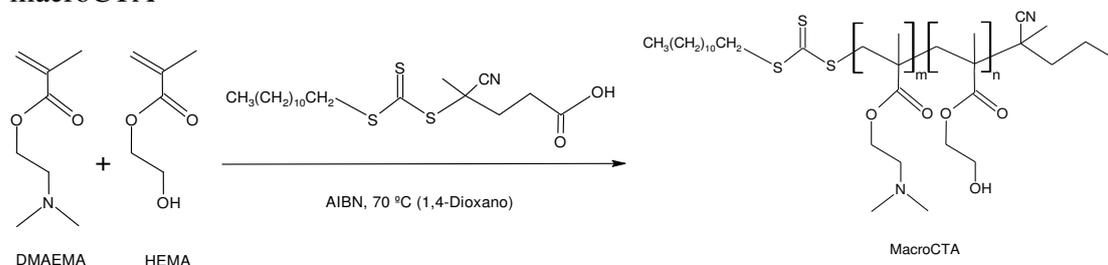
Figura 13 - Esquema de polimerização do PDMAEMA-*b*-PS



Fonte: Própria.

Para a síntese do copolímero aleatório P(DMAEMA-*co*-HEMA) na proporção 9:1, utilizou-se DMAEMA E HEMA como monômeros, AIBN como iniciador e 4-Ciano-4-[(dodecilsulfaniltiocarbonil)sufanil] ácido pentanoico como agente de transferência de cadeia. As reações também ocorreram sob agitação magnética e o esquema está apresentado na Figura 14.

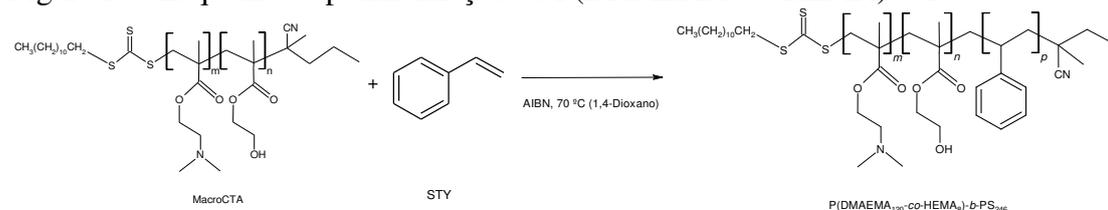
Figura 14 - Esquema de polimerização do P(DMAEMA-*co*-HEMA) para origem de um macroCTA



Fonte: Própria.

O P(DMAEMA-*co*-HEMA) agiu como macroCTA para a síntese do segundo bloco, o esquema dessa síntese está apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Esquema de polimerização do P(DMAEMA-*co*-HEMA)-*b*-PS



Fonte: Própria.

4.2.6 Síntese do PS₁₇₁-*b*-PtBA₆₃₂

As sínteses de copolímeros em bloco, via RAFT, na Tulane University também foram realizadas em duas etapas sucessivas, sendo o primeiro polímero produzido usado como macroCTA para a segunda síntese (formação do segundo bloco). A ordem de reação foi escolhida conforme a reatividade dos monômeros que deram origem aos blocos, sendo sempre sintetizado o bloco mais reativo primeiro (aquele que forma o radical mais estável).

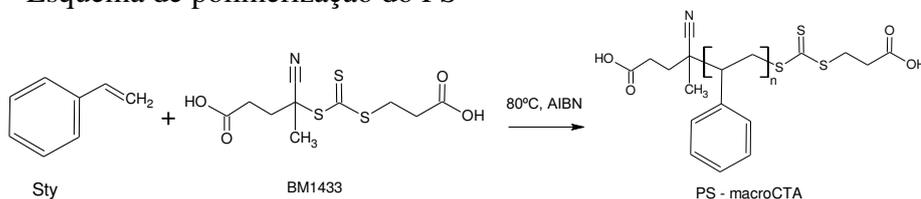
Foram sintetizados materiais a partir de STY e tBA. Esses materiais foram escolhidos devido à polaridade (ambos apolares) e ao fato de o tBA ser hidrolisável e, assim, capaz de formar AA, o qual é polar. Escolheu-se realizar a hidrólise após polimerização a fim de se

obter um material anfifílico que pudesse ser testado para a formação de vesículas poliméricas ou polimerossomos.

Como agentes de transferência de cadeia (CTA) foram usados compostos disponíveis comercialmente (fornecedores: Sigma-Aldrich, Strem Chemicals, Boron Molecular e outros), principalmente o 4-(((2-carboxietil)tio)carbonotio)l)tio)-4-ácido cianopentanóico (BM1433). A seleção desse CTA foi feita com base na compatibilidade dos monômeros (com auxílio da tabela fornecida pelo fabricante) e na solubilidade na mistura reacional. Os demais materiais usados foram de grau PA ou superior.

O primeiro bloco (PS - macroCTA) foi sintetizado por reação RAFT sem monitoramento e em batelada e o esquema está apresentado na Figura 16. Utilizou-se a proporção CTA: iniciador de 5: 1. A reação foi realizada em *bulk* (sem solvente). O produto final foi purificado por evaporação sob vácuo para retirar o monômero residual.

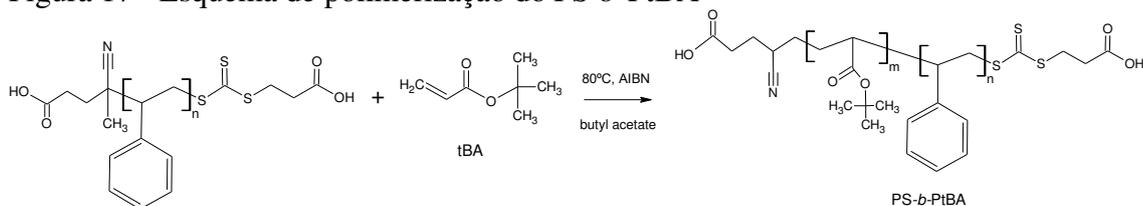
Figura 16 - Esquema de polimerização do PS



Fonte: Própria.

O segundo bloco foi sintetizado a partir do macroCTA PS₁₇₁, via RAFT, monitorado via ACOMP e com 70% (v/v) de acetato de butila como solvente. A reação foi mantida por cerca de 60 minutos e o esquema está apresentado na Figura 17. Esperava-se que a massa molar final fosse o dobro do primeiro bloco, com o objetivo de formar dois blocos de proporções semelhantes. O produto final foi purificado por evaporação sob vácuo para remover o monômero e solvente residuais.

Figura 17 - Esquema de polimerização do PS-*b*-PtBA



Fonte: Própria.

4.3 Hidrólise dos copolímeros de PtBA

A primeira hidrólise, na Tulane University, foi realizada de acordo com o método proposto por Davis e Matyjaszewski (DAVIS; MATYJASZEWSKI, 2000), sendo que PtBA (0,987 g, $7,7 \times 10^{-3}$ mol éster) foi adicionado a 3 mL de 1,4-Dioxano para dissolução do polímero. Foi adicionado 1,0 mL de ácido sulfúrico (HCl) concentrado, o balão foi coberto com um condensador e a solução foi aquecida ao refluxo. Após cerca de 6 h, a solução foi arrefecida e o excesso de reagentes foi removido por evaporação sob vácuo.

A segunda hidrólise, bem como a síntese de um segundo copolímero de PS-*b*-PtBA foi realizada na EEL USP por outro membro do grupo. Seu aspecto visual ficou diferente do primeiro e pode ser observado no Apêndice D. O método utilizado foi descrito por Ma e Wooley (2000). Dissolveu-se o material numa proporção de copolímero purificado em massa e de diclorometano em volume de 1:10. Com a homogeneidade desta mistura, adicionou-se ácido trifluoracético (TFA) numa proporção molar de 1:5 entre o número de mols de ésteres de terc butila e o ácido. A reação se deu a temperatura ambiente, sob agitação por 20 h em sistema fechado. Após o tempo de reação, o sistema foi aberto até total evaporação do diclorometano, assim o sistema foi colocado em banho de água a 75 °C para total evaporação do ácido, depois o material foi seco na estufa para evaporar o álcool formado na hidrólise. Esse segundo material ficou com aspecto de um pó branco (diferente do primeiro que era um gel escuro). Esse segundo material hidrolisado, o PS₁₀₆-PAA₃₀₃, foi usado em testes de incorporação.

4.4 Caracterização dos polímeros

A caracterização dos polímeros foi dada por análises de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e, para o material sintetizado na Tulane University, por ACOMP.

4.4.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Por meio da análise de GPC foram identificadas as massas molares numérica média (M_n), ponderal média em massa (M_w) e a dispersidade (*D*) dos polímeros.

Na EEL-USP, os ensaios de GPC dos materiais poliméricos foram realizados no Laboratório de Química de Polímeros do DEMAR. Utilizou-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, com injetor automático (Sil-20A), detector de índice de refração (RID-A) da marca Shimadzu, uma pré coluna Phenogel 5 μ linear/Mixed e mais duas colunas Phenogel 5 μ 10E6A e 10E4A da marca Phenomenex®. Padrões de PMMA (Supelco®). Foi utilizado como eluente uma solução de THF com trietanolamina 0,3%.

Na Tulane University, as análises foram realizadas no PolyRMC. Os produtos finais foram analisados através de um sistema GPC com THF como fase móvel. Um filtro de frita de aço inoxidável com poros de 10 μ m foi usado na entrada da bomba para refinar o solvente antes de entrar nas colunas e detectores. As alíquotas foram diluídas em THF até a concentração apropriada para detecção ideal e injetadas no circuito de um injetor manual Rheodyne 7725i conectado a uma bomba HPLC Jasco PU-2080 com taxa de fluxo ajustada em 0,8 ml / min a 25 ° C. Uma vez injetada, a amostra passou por três colunas Agilent 5 μ m PLgel em conjunto com os tamanhos de poros de 1000Å, 500Å e 50Å, respectivamente, para separar polímeros de baixa massa molar. Os tempos de eluição foram monitorados usando um espectrofotômetro de onda dupla Shimadzu SPD-10AV VP UV VIS com uma célula de fluxo de 1 cm seguida por um detector de índice de refração Shimadzu RID-10A. Os dois comprimentos de onda selecionados para o detector UV VIS foram 260 nm e 270 nm. Os dois detectores, juntamente com um amplificador, usados para aumentar a intensidade do segundo comprimento de onda (270nm) para um nível detectável, foram conectados a uma placa de DAQ USB-2416 de computação de medição externa e os dados foram coletados usando um Tracer DAQ.

4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN ¹H)

As amostras sintetizadas foram caracterizadas por RMN ¹H em um equipamento da marca Varian, modelo Mercury, a uma frequência de 300 MHz no Laboratório de Química Fina do DEQUI/ EEL – USP. Foi utilizado como solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃) (Aldrich, 99%). A partir dos dados fornecidos pelo equipamento, as áreas foram calculadas por meio do programa ACD/NMR Processor® e associadas à quantidade de prótons (H) que lhes deram origem.

Para o cálculo das unidades repetitivas dos blocos foi usada a (Equação 4)Equação 3:

$$\frac{m \times \text{Área (B1)}}{n^{\circ} \text{ prótons 1}} = \frac{n \times \text{Área (B2)}}{n^{\circ} \text{ prótons 2}} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

- B Bloco do copolímero
- m Número de unidades repetitivas do bloco 1
- n Número de unidades repetitivas do bloco 2

4.4.3 Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram analisadas em espectrômetro de infravermelho IR Prestige 21 com acessório de ATR (Refletância Total Atenuada), da marca Shimadzu, situado no Laboratório de Processamento e Reciclagem de Polímeros do DEMAR da EEL-USP.

4.4.4 Monitoramento online automático de reações de Polimerização (ACOMP)

Algumas reações de copolimerização em bloco (crescimento do segundo bloco - PtBA) foram monitoradas utilizando a técnica ACOMP. O conjunto de detectores consistiu em um espectrofotômetro UV-Vis, um viscosímetro e um analisador de massa molar (BI-MwA). O primeiro bloco de PSty foi sintetizado anteriormente usando a mesma configuração de reator descrita abaixo, mas como uma reação em *bulk* de bancada, sem monitoramento.

Um reator de 500 mL foi utilizado como reator, com uma barra de agitação de politetrafluoretileno magnético (PTFE) para agitação e colocado dentro de um banho de óleo de silicone para controle de temperatura. A velocidade e a temperatura da mistura foram reguladas por uma placa de aquecimento do agitador magnético controle-visc IKA RET. Uma bomba de extração conectada a um circuito de recirculação conectado ao reator fazia amostragem contínua na taxa de fluxo desejada de 0,5 ml / min.

A amostra foi diluída com solvente (BAc) e homogeneizada em um misturador estático através de duas etapas consecutivas de diluição antes de entrar no MALS, no viscosímetro e

no espectrofotômetro UV, colocados em conjunto. Todas as reações foram realizadas a 70 ° C. Após os dois estágios de diluição, foi alcançado um fator de diluição geral de 12 e a concentração total de monômero e polímero que atingiu os detectores foi de $22 \times 10^{-3} \text{ g / cm}^3$. Um detector de matriz de fotodíodo de destaque Shimadzu SPD-M20A, com uma célula de comprimento de caminho de 0,1 mm, foi usado para monitorar o sinal de monômero tBA durante a polimerização, e foi suficiente o uso de dois comprimentos de onda - 270 nm e 278 nm - fora de todo o espectro para calcular o monômero a concentração.

Os sinais UV foram coletados usando o software EZStar do fabricante. A viscosidade reduzida foi calculada usando um viscosímetro monocapilar feito sob medida que possui um transdutor de pressão Validyne. A massa molar (M_w) foi obtido a partir de um porto-Brook BI-MwA, um detector estático de espalhamento de luz estático de sete ângulos - 35 °, 50 °, 75 °, 90 °, 105 °, 130 °, 145 °. Como os polímeros produzidos eram significativamente menores que a luz incidente de 660 nm, apenas os sinais brutos de 90° eram necessários para os cálculos de M_w . Um filtro de seringa de PTFE compatível foi colocado logo antes da entrada do BI-MwA e um filtro de fritas de aço inoxidável com poros de 10µm também foi usado nas entradas das bombas de solvente. O viscosímetro foi conectado à placa BI-MwA DAQ e a coleta de dados desses dois detectores foi realizada usando o software de entrada de dispersão da luz dependente de tempo Brookhaven BIC.

4.5 Preparação de vesículas

As vesículas foram formadas, preferencialmente, pelo método de troca de solventes (*solvent switch*) a partir de solução orgânica compatível com a água, a 25 °C. Os materiais capazes de formar vesículas foram testados quanto à sua capacidade de isolar moléculas como a enzima invertase.

Essas vesículas poliméricas são formadas por dissolução direta a partir de solução orgânica, método descrito por Du e O'Reilly, o qual baseia-se na dissolução do polímero em solvente orgânico miscível em água para posterior incorporação à solução aquosa. Os sistemas formados (polímeros em solução aquosa) foram estudados pelas técnicas disponíveis na EEL-USP e na Tulane University para a caracterização de sua forma, tamanho e interações (DU; O'REILLY, 2009).

Os copolímeros foram dissolvidos em THF, numa proporção 1:10 (m/v) escolhida a partir de testes preliminares e, dessa mistura, retirou-se 100 μL que foram gotejados lentamente em 10 mL de água destilada ou nas seguintes soluções, sob forte agitação:

- Solução tampão fosfato pH 7,0 (KH_2PO_4) 50 mM, corrigido com KOH 1M;
- Solução ácida de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M;
- Solução de azul de metileno 0,006 g.L^{-1} .
- Solução de sacarose 0,02 M.
- Solução de invertase 3 mg.L^{-1} .

Os materiais capazes de formar vesículas foram caracterizados e os polimerossomos gerados foram testadas quanto à capacidade de isolar moléculas como azul de metileno e enzima invertase.

4.6 Caracterização de vesículas – Estudo da incorporação de moléculas hidrofílicas

Para o teste de isolamento de moléculas hidrofílicas, os polimerossomos foram produzidos em solução aquosa contendo a molécula a ser internalizada. A fração de moléculas não incorporadas (meio externo) foi separada dos polimerossomos por meio de filtração em membrana hidrofílica 0,22 μm . A fração retida foi determinada por técnicas analíticas adequadas para avaliação da capacidade de aprisionamento.

4.6.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O movimento browniano das partículas faz com que a luz laser emitida pelo equipamento de DLS seja espalhada com intensidades diferentes. A técnica analisa as flutuações dessas intensidades em um pequeno volume de solução. Calcula-se o diâmetro efetivo (D_{ef}), ou hidrodinâmico (D_{H}), das partículas em equilíbrio térmico com o solvente (CANEVAROLO JR, 2004).

A partir da técnica de DLS podem ser calculados os Diâmetros Efetivos, os quais, por meio dos sinais emitidos de espalhamento de luz, representam um possível diâmetro do material agregado ou vesícula e a dispersidade, a qual apresenta o quão disperso ou o quanto varia o espalhamento entre as vesículas analisadas.

As análises de DLS foram efetuadas para determinação do diâmetro médio e dispersidade (D) foram feitas a 35 $^{\circ}\text{C}$, em cubeta de vidro, por meio dos equipamentos

Brookhaven Instrument Corp, ZetaPlus/ BI-PALS situado no Laboratório de Química de Polímeros do DEMAR da EEL-USP e Zetasizer Nano ZS Malvern Panalytical situado no Laboratório de Polímeros do DEQUI da EEL-USP.

4.6.2 Acompanhamento da formação de vesículas por ARGEN

O equipamento ARGEN, utilizado na Tulane University, faz o acompanhamento de eventos como a agregação (a partir de determinada concentração), mudança de regimes, entre outras. Essa técnica é particularmente útil no caso em questão para determinar a formação e caracterizar as vesículas dos copolímeros anfífilos. O acompanhamento da formação de vesículas se dá por meio do aumento do espalhamento de luz que eles promovem em relação à água pura.

O ARGEN é uma plataforma que aplica estressores de temperatura e agitação independentemente para cada célula de amostra, replicando condições e monitorando de ambientes comumente encontrados. O equipamento coleta e produz informações de agregação de amostra em tempo real, identifica atrasos anômalos no início da agregação e calcula a taxa e o tempo total que o processo leva para atingir uma condição de agregação.

Nesse estudo, a partir do copolímero PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂ preparou-se vesículas (concentração 1mg/mL) e essa solução foi filtrada em seguida. A análise de ARGEN iniciou-se com um vial contendo 10 mL de água sob agitação de 1200 rpm. Nos primeiros 10 minutos de análise foram adicionadas 5 gotas de solução de vesículas a cada minuto. Nos 20 minutos seguintes, as 5 gotas foram adicionadas a cada 5 minutos. O objetivo dessa análise foi observar o comportamento da agregação dos materiais sob forte agitação.

4.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV foram executadas para observação das vesículas formadas. O equipamento utilizado foi o Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Hitachi, modelo TM 3000, do DEMAR-EEL/USP. As amostras em solução foram depositadas diretamente por gotejamento sobre uma superfície metálica polida, mantidas em dessecador por 2 horas ou até secagem completa e, então, lidas sob baixo vácuo, numa tensão de 15 kV. O material não foi metalizado.

4.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises de MET foram realizadas para confirmação da estrutura vesicular das amostras. Foram utilizados os microscópios Mod. EM-109 e Carl LEO-906, da marca Zeiss com Negative Staining e CCD para captura de imagens, disponível no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do DFP-UFLA. As amostras foram depositadas em *grids* de cobre de 300 mesh. Gotejou-se acetato de uranila sobre a amostra para aumentar o contraste.

4.6.5 Análise colorimétrica por Espectroscopia UV-Visível

A Espectroscopia UV-Visível foi utilizada nas análises de estudo fotométrico da incorporação do azul de metileno e para os testes de incorporação quantificando açúcares redutores. A transmitância de luz de cada amostra, a diferentes temperaturas, foi medida usando o Thermo Scientific, Evolution 201 UV/Vis, em cubeta de quartzo, disponível no Laboratório de Química de Polímeros do DEMAR da EEL-USP.

4.6.6 Estudo fotométrico da incorporação de azul de metileno

Esse estudo fotométrico foi realizado para comprovar a presença de um compartimento interno aquoso nas vesículas formadas a partir do copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇. Se as vesículas formadas forem polimerossomos, é esperado que apresentem um compartimento aquoso interno, separado por uma bicamada polimérica. Para testar essa hipótese, as vesículas foram preparadas em meio contendo azul de metileno. Dessa maneira parte do azul de metileno estaria incorporado no interior aquoso. Estudou-se o emprego do agente redutor (tiocianato de amônio) para o azul de metileno, que leva à formação do leucometileno, que é incolor. Caso haja um interior aquoso no agregado formado, parte do azul de metileno será protegido dessa reação de redução e da consequente perda de sua coloração típica. Pande *et al.* (2006) estudaram a redução do azul de metileno por íons de tiocianato em soluções líquidas e em micelas. Para eles, o progresso da redução de azul de metileno pode ser monitorado por espectrofotômetro UV-vis no comprimento de onda de 664 nm.

A partir dessas informações, primeiramente fez-se uma curva com as absorvâncias de diferentes concentrações conhecidas de azul de metileno. Foi determinada a concentração de $0,006 \text{ g.L}^{-1}$ de azul de metileno em água para que a absorvância máxima da solução fosse de 0,900 Abs. Essa solução foi filtrada em membrana hidrofílica de $0,22 \mu\text{m}$ e, em seguida, realizou-se um escaneamento da região espectroscópica e constatou-se maior absorvância no comprimento de 664 nm.

Em seguida, foram avaliadas diferentes concentrações do agente redutores em função do tempo. Determinou-se a quantidade ideal de tiocianato para que, em 1 hora, ocorresse a redução do composto de azul de metileno por completo na cubeta e essa passasse da coloração azul para transparente. Essa quantidade determinada foi de 3 gotas de solução de tiocianato de amônio $1,0 \text{ g.mL}^{-1}$.

Ao longo de toda a análise as cubetas de quartzo, com capacidade volumétrica de 3,0 mL, foram mantidas tampadas para evitar a presença de oxigênio, que poderia causar reoxidação e conseqüente mudança de coloração das amostras e as leituras foram realizadas em temperatura controlada de 25°C .

Foram definidas sete amostras para o estudo da cinética de reação. A primeira continha apenas água destilada (3 mL). Para a segunda amostra, preparou-se vesículas em água e preencheu o volume da cubeta com essa solução (3 mL). Para a terceira amostra, preencheu-se a cubeta (3 mL) com solução de azul de metileno. Para a quarta, preparou-se vesículas em solução de azul de metileno e preencheu a cubeta (3 mL). Para a quinta amostra, preparou-se vesículas em água para preencher metade da cubeta (1,5 mL) e os 1,5 mL restantes da cubeta foram preenchidos com solução de azul de metileno. A sexta amostra foi composta por metade da cubeta com água destilada e a outra metade com solução de azul de metileno. Para a sétima e última amostra preparou-se vesículas em azul de metileno que preencheram metade da cubeta e o restante foi completado com água destilada.

As soluções de azul de metileno (usada na terceira, quinta e sexta amostras) foram preparadas para que apresentassem absorvância aproximada de 0,800 Abs e as vesículas em azul de metileno (usadas na quarta e sétima amostras) foram feitas nessa mesma solução.

Para todas as amostras mediu-se a absorvância inicial (tempo 0) e adicionou-se 3 gotas da solução de tiocianato. Logo após a cubeta foi tampada e agitada para homogeneização do conteúdo. Fez-se a leitura de 1 em 1 minuto, por 60 para analisar a cinética de redução do material por espectrofotometria.

4.7 Testes de incorporação - Quantificação de açúcares redutores

Foram geradas vesículas de acordo com o procedimento descrito no item 4.5 e nelas foi incorporada a enzima invertase. Para separar a sacarose que foi incorporada na vesícula e usada como substrato para a enzima da que não foi, as substâncias hidrofílicas foram determinadas por ensaios colorimétricos adequados.

Para quantificar os açúcares redutores produzidos a partir da hidrólise da sacarose catalisada pela enzima invertase, utilizou-se o Método de Miller (MILLER, 1959). Inicialmente uma solução mãe de concentração 1 g.L^{-1} de D-glicose (Synth ®), em água destilada foi preparada. Para a construção da curva padrão, utilizou-se diferentes diluições dessa solução. Os volumes de solução e água destilada foram distribuídos em tubos de ensaio conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição das quantidades de reagentes para produção da curva padrão de glicose

Tubo	0	1	2	3	4	5
Solução de glicose (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Água destilada (mL)	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0

Fonte: Própria.

Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de solução de DNS elaborada com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma Aldrich ®) como agente cromóforo em todos os tubos. Os mesmos foram aquecidos em banho termostático de glicerina a 100°C por 5 minutos. Ao final, adicionou-se 5 mL de tartarato de sódio e potássio e 5 mL de água a cada tubo. Após o esfriamento das amostras, mediu-se a absorbância por espectrofotometria Uv-Vis a 540 nm. A análise foi realizada em triplicata, fez-se a regressão linear das médias encontradas, sendo que os pontos considerados incorretos por algum erro experimental foram descartados. A curva gerada, seguindo uma equação de reta $y = ax + b$, foi posteriormente utilizada no cálculo da atividade enzimática.

Para a análise da atividade enzimática primeiramente foi preparada uma solução tampão acetato de sódio pH 4,8 e soluções de sacarose (Synth ®) 0,02M e invertase (Sigma Aldrich ®) 3 mg.L^{-1} neste mesmo tampão. Os tubos de ensaio foram preparados conforme Tabela 2, seguindo a ordem e com atenção ao tempo.

Tabela 2 - Distribuição das quantidades de reagentes para produção da curva de atividade enzimática

Tubo	0	1	2	3	4	5
Água destilada (mL)	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solução de sacarose (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solução enzimática (mL)	0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Fonte: Própria.

Cada tempo foi cronometrado e anotado, uma vez que a atividade enzimática é dada pela quantidade de sacarose convertida em glicose em determinado intervalo de tempo. Por fim, adicionou-se 1,0 mL de solução de DNS em todos os tubos. Para o tubo 0, que serviu de branco para a leitura de absorbância, o DNS foi colocado logo em seguida às demais soluções. Em seguida, os mesmos foram aquecidos a 100° C por 5 minutos e após o esfriamento mediu-se a absorbância a 540 nm. A análise também foi realizada em triplicata e foi gerada uma curva ((Equação 4). Para o cálculo da atividade enzimática pode se considerar o coeficiente angular como a absorbância por minuto ou utilizar o valor máximo encontrado por tempo.

A equação gerada na construção da curva padrão de glicose aliada às absorbâncias encontradas com o uso da enzima podem ser analisadas como:

$$\frac{\text{Absorbância}}{\text{tempo}} = \text{coeficiente angular} \times \text{concentração de glicose} + \text{coeficiente linear} \quad (\text{Equação 4})$$

Para a análise da atividade enzimática das vesículas com enzima encapsulada utilizou-se o mesmo método, porém variando diluições para que a técnica original de preparação de vesículas (item 4.5) fosse preservada. Inicialmente 2,5 mg de polímero foram solubilizados em 50 µL de THF e gotejados em 10 mL de solução enzimática a 3mg.L⁻¹ sob agitação constante de 550 rpm por 15 minutos. Em seguida, 1 mL desse material foi depositado juntamente com 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de sacarose 0,02M em um tubo de ensaio. Após 3 minutos, adicionou-se 1 mL de DNS à mistura, que foi aquecida por 5 minutos em banho de água fervente e teve sua absorbância lida a 540 nm. De forma análoga fez-se a análise para vesícula em solução tampão sem adição de enzima e vesícula em solução enzimática acrescida de detergente Triton X-100 (Synth®) 3% v/v.

4.8 Rompimento das vesículas

Detergentes sintéticos podem ser utilizados para romper barreiras lipídicas das membranas (NAM; VANDERLICK; BEALES, 2012). Sendo assim, para estudar a ação dos polimerossomos formados como nanorreatores, as vesículas encapsularam o material e, posteriormente, com a adição do detergente, sua membrana foi dissolvida para que houvesse permeação do meio. Foram feitas vesículas em solução de enzima por troca de solventes. Desse material, 5 mL foi passado em uma membrana hidrofílica de 0,22 μm e lavado com 10 mL de solução tampão (a mesma da solução enzimática). Esses 10 mL de lavagem, após filtrados, foram separados para análise futura. A solução contida na membrana foi sugada e misturada ao material que foi lavado para análise. Assim, nos 5 mL de material lavado ficaram predominantemente vesículas com enzimas encapsuladas, foram chamados de “Vesículas lavadas” e nos 10 mL de lavagem ficaram predominantemente enzimas livres, externas às vesículas, foram chamados de “Tampão de lavagem”. Por fim, as “Vesículas lavadas” foram misturadas ao detergente Triton X-100 numa concentração previamente testada de 3,5% (mínimo para rompimento das vesículas) e chamadas de “Vesículas rompidas”. Foram analisados os tamanhos de partículas por DLS e atividade enzimática dessas amostras.

Para a atividade enzimática foi adicionado à cada tubo de ensaio:

Branco: 0,75 mL de água + 0,25 mL de sacarose;

Vesículas lavadas, Tampão de lavagem e Vesículas estouradas: 0,25 mL de água + 0,50 mL da amostra + 0,25 mL de sacarose

O tempo foi cronometrado e após 5,5 minutos interrompeu-se a reação adicionando 0,5 mL de DNS em cada tubo. Esses tubos aquecidos em água sob ebulição por 5 minutos, resfriados e, ao final, adicionado mais 0,5 mL de água. O volume total de cada tubo foi de 2,0 mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização dos polímeros

Todos os materiais sintetizados na EEL-USP foram via RAFT em duas etapas – sendo a primeira a que gerou o macroagente de transferência para a segunda, sempre em batelada ou em solução. Os copolímeros dibloco sintetizados foram purificados, caracterizados quanto às massas molares e composição por GPC, FTIR e RMN ¹H. As massas molares desejadas foram calculadas estabelecendo que se atingiria uma conversão de 30% (f=0,3). O fator determinante para o término das reações foi a viscosidade do material, devido às limitações da utilização de agitação magnética e também ao fato de um material muito viscoso geralmente indicar alta conversão de monômeros em polímeros. Os dados obtidos pelas caracterizações estão apresentados na Tabela 3 e serão discriminados, para cada material, nos itens seguintes. Os subíndices referentes a cada bloco foram calculados a partir da razão m/n (Equação 3) determinada pela área dos sinais de RMN e da massa total obtida por GPC.

Tabela 3 – Dados obtidos por caracterização dos polímeros sintetizados

Material	Mn GPC g.mol ⁻¹	Mw/Mn	Mn RMN g.mol ⁻¹
PDMAEMA ₁₄₇ *	23148	1,79	-
PDMAEMA ₂₇₇ *	43522	1,42	-
PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₃₁₇	38582	1,97	52504
PDMAEMA ₂₇₇ - <i>b</i> -PS ₈₆	24994	1,97	76563
P(DMAEMA ₆₅ - <i>co</i> -HEMA ₃)	51476	1,24	10999
P(DMAEMA ₆₅ - <i>co</i> -HEMA ₃)- <i>b</i> -PS ₃₂₇	45432	1,96	45057
PS ₁₇₁ *	17896	-	-
PS ₁₇₁ - <i>b</i> -PtBA ₆₃₂	36443	-	98813
PS ₉₈ - <i>b</i> -PtBA ₃₄₃	49959	1,20	54169

* Calculados apenas com base na massa obtida por GPC

Fonte: Própria.

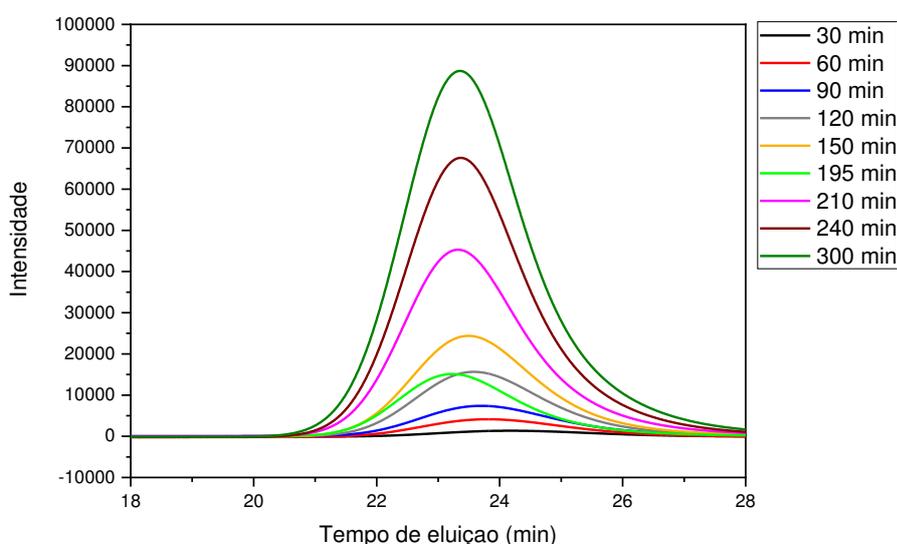
5.1.1 PDMAEMA₁₄₇

O PDMAEMA₁₄₇ foi o primeiro material a ser sintetizado. Por ser responsivo a estímulos, era de grande interesse para esse estudo que fossem feitos copolímeros anfifílicos em bloco a partir dele. A massa inicial de monômero utilizada foi de 30 g, a massa atingida após a síntese foi aproximadamente 7,5 g, atingindo um rendimento de aproximadamente 25%. Para analisar a futura utilização do material, primeiramente foi feita sua caracterização pelas técnicas de GPC, RMN e FTIR.

5.1.1.1 GPC

Os dados obtidos pela análise de GPC estão apresentados na Figura 18. A análise das curvas mostra a conversão do monômero em polímero ao longo do tempo. As curvas representam as alíquotas que foram retiradas periodicamente a fim de se fazer um acompanhamento do aumento gradual e distribuição da massa molar do polímero. Os tempos de retirada de cada alíquota após o início da reação está na legenda do gráfico em minutos.

Figura 18 – Curvas de GPC para o PDMAEMA₁₄₇



Fonte: Própria.

Na Tabela 4 estão apresentados, para cada alíquota, o tempo de reação, massa molar (M_n) e dispersidade (D) obtidos na análise de GPC. Nessa primeira síntese, a proporção

controlador – iniciador foi de 2:1. Pôde-se perceber na tabela que a dispersidade do tamanho das cadeias do material foi maior que o esperado, indicando que não houve um controle adequado da reação, o que pode ser verificado pelo fato de não haver deslocamento do pico para volumes de eluição menores à medida que a reação prossegue (Figura 18). Por esse fato, decidiu-se realizar uma nova síntese, com uma proporção maior de controlador e menor de iniciador, para que a reação ocorresse de forma mais lenta e controlada.

Tabela 4 - Dados obtidos da análise de GPC para o PDMAEMA₁₄₇

Alíquota	Tempo de reação (min)	Mn	<i>D</i>
1	30	16009	1,76
2	60	19460	1,71
3	90	23315	1,49
4	120	24256	1,52
5	150	24979	1,54
6	195	29535	1,46
7	210	25353	1,64
8	240	24018	1,71
9	300	23148	1,79

Fonte: Própria.

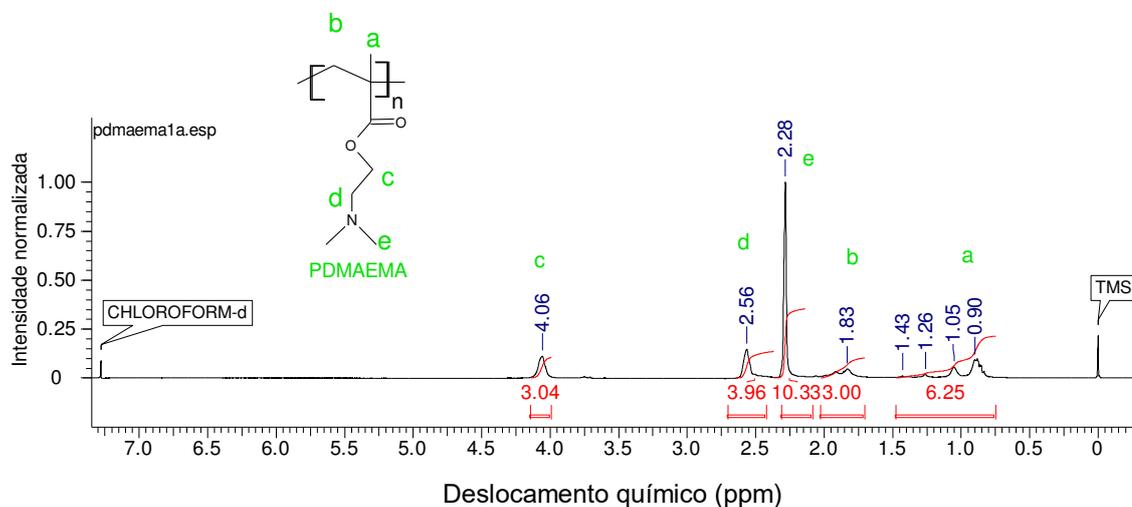
A massa molar final do PDMAEMA₁₄₇ foi de 23148 g.mol⁻¹, sendo que a massa molar desejada (teórica) foi de 35000 g.mol⁻¹. A partir de aproximadamente 200 minutos, percebe-se um aumento no *D* e diminuição da massa molar média, indicando que o controle da reação deve ter sido perdido a partir desse tempo de reação. Devido ao fato ocorrido, decidiu-se por realizar nova síntese de polímero PDMAEMA.

5.1.1.2 RMN

A análise de RMN do material PDMAEMA₁₄₇ está apresentada na Figura 19. O deslocamento químico em 7,26 ppm indica o solvente clorofórmio deuterado e em 0 ppm o TMS, esses servem de referência para os demais sinais, os quais são característicos da estrutura de PDMAEMA (LIU; URBAN, 2008). Sendo eles: as metilas (RCH₃) - tipicamente encontradas na região de 0,9 ppm e atribuídos à letra “a”. Entre 1,6 e 3,0 ppm se encontram os sinais característicos de CH₂, atribuídos à letra “b”. Os grupos -O-CH₂- da cadeia lateral

da unidade de PDMAEMA são encontrados em 4,08 ppm, em “c”. O sinal atribuído a “d”, apesar de também ser um CH₂ é mais deslocado no gráfico devido à proximidade ao grupamento amina e o sinal de maior intensidade representa os seis prótons ligados à extremidade da amina (-N-CH₃), atribuído a “e”.

Figura 19 – Espectro de RMN para o PDMAEMA₁₄₇

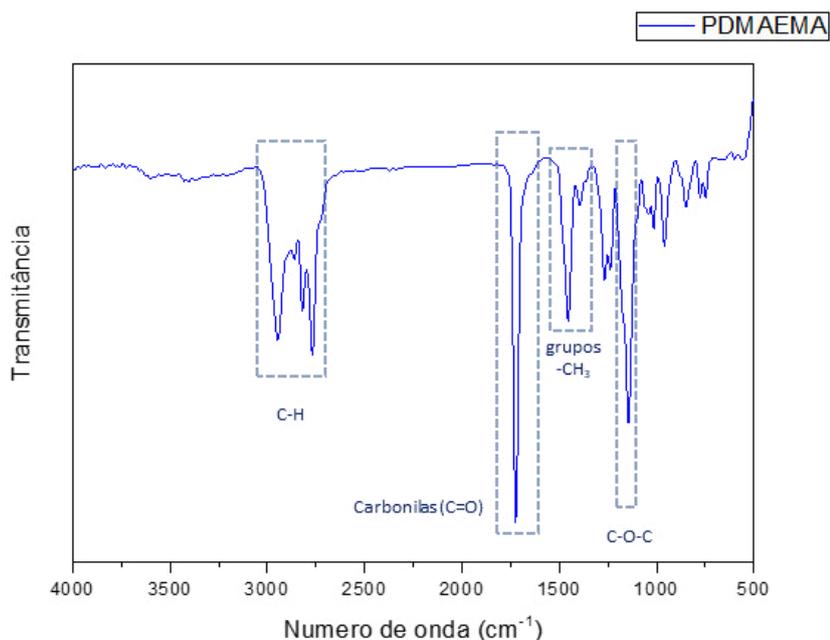


Fonte: Própria.

5.1.1.3 FTIR

A técnica FTIR foi empregada por método ATR, com o material sólido, para medir a fração da energia absorvida em relação à incidente em determinados números de onda. O intuito da análise foi observar as funções orgânicas presentes nos materiais sintetizados.

O espectro de FTIR para o PDMAEMA₁₄₇ está apresentado na Figura 20. Nele, pode-se destacar bandas características de PDMAEMA (JIANG *et al.*, 2016; YIN *et al.*, 2017) nos comprimentos de ondas de: 1135, 1266, 1455, 1726, 2767 e 2944 cm⁻¹. As bandas em 1135 e 1266 cm⁻¹ são características de deformações de C-O-C; em 1455 cm⁻¹ atribuídas a vibração de estiramento deformacional de -N(CH₃)₂; em 1726 própria da vibração de estiramentos de carbonilas C=O do controlador e da PDMAEMA e em 2944 ocasionadas por estiramentos de metilas (C-H).

Figura 20 - Espectro de FTIR do PDMAEMA₁₄₇

Fonte: Própria.

5.1.2 PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇

O PDMAEMA₂₇₇ foi o primeiro bloco que deu origem a dois novos copolímeros dibloco: o PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ e o PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆, sendo que o segundo terá seus dados apresentados no item 5.1.3. Uma vez definido que na síntese do polímero PDMAEMA₁₄₇ não houve um controle adequado da reação e que isso poderia provocar um prejuízo ao material no futuro, decidiu-se por sintetizar novamente o PDMAEMA, obtendo o PDMAEMA₂₇₇. A partir desse macroCTA, que foi caracterizado por GPC, RMN e FTIR, deu-se origem ao PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇, o qual também foi caracterizado pelas mesmas técnicas. A massa de monômero DMAEMA utilizada foi de 30 g, gerando um macroCTA com aproximadamente 11 g, tendo um rendimento de aproximadamente 37%. Nos subitens a seguir, serão mostrados os resultados do copolímero juntamente com o do macroCTA para que possam ser observadas as diferenças entre os materiais após a incorporação do segundo bloco.

5.1.2.1 GPC

A proporção controlador – iniciador da síntese do primeiro bloco (PDMAEMA₂₇₇), foi de 5:1 e mostrou, por meio da Tabela 5, de acordo com os \bar{D} s mais baixos que da Tabela 4, que houve um maior controle da reação. Na tabela também é possível observar que a massa foi aumentando constantemente, o que é característica de uma síntese RDRP. A massa molar alcançada pelo macroCTA foi de 43522 g.mol⁻¹, o que, de acordo com a Equação 2, indica uma conversão de aproximadamente 37%. Porém esse material, após purificação, apresentou uma massa molar de 24845 g.mol⁻¹ e \bar{D} de 1,4. Isso indica que parte do material pode ter se perdido na purificação do polímero.

Tabela 5 - Dados obtidos da análise de GPC da síntese de PDMAEMA₂₇₇

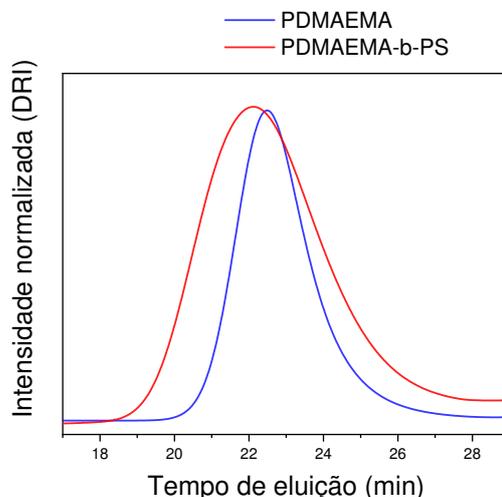
Alíquota	Tempo de reação (min)	Mn	\bar{D}
1	30	13134	1,35
2	60	15581	1,36
3	90	18243	1,33
4	120	21294	1,31
5	150	24549	1,29
6	195	27955	1,27
7	210	31624	1,26
8	240	35543	1,24
9	300	30972	1,27
10	420	39056	1,24
11	480	43522	1,24

Fonte: Própria.

Para a reação do PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇, utilizou-se 6 g do PDMAEMA₂₇₇ purificado como primeiro bloco, juntamente com 15 g do monômero STY. O cálculo da massa molar teórica foi feito considerando a massa molar média do PDMAEMA₂₇₇ como a do CTA, uma vez o agente de transferência foi ligado à cada cadeia do polímero. Os picos existentes no cromatograma (Figura 21) mostram que a polimerização em bloco pôde ser realizada, que o CTA agiu como um agente de transferência entre as cadeias de cada bloco. Ambas as curvas mostram uma população única, o que confirma que o segundo bloco cresceu a partir do macroCTA.

A massa molar final atingida pelo bloco foi de $38583 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e foi gerado um copolímero com aproximadamente 5,5 g, tendo um rendimento de aproximadamente 26%.

Figura 21 – Curvas de GPC do PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇

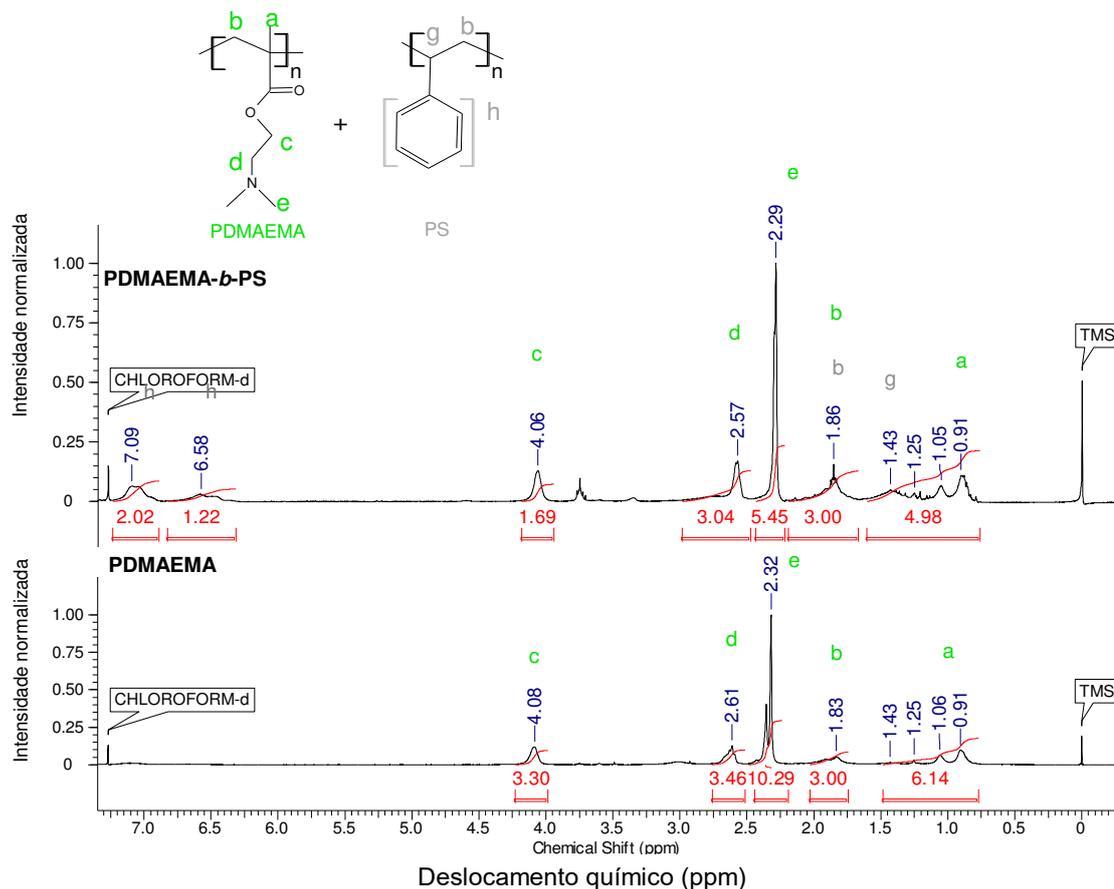


Fonte: Própria.

5.1.2.2 RMN

No copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇, devido à presença de um bloco de estireno, mostra sinais característicos de aromáticos entre 6,0 e 8,5 ppm, indicados como “h” na Figura 22. Os demais sinais, típicos de PDMAEMA, foram relacionados aos grupos funcionais e atribuídos às letras “a” a “e”, seguindo a Figura 19. Por meio das intensidades dos sinais relacionados à quantidade de prótons exclusiva de cada polímero, pôde ser calculada a proporção dos blocos de PDMAEMA e PS. Considerou-se os 5 prótons atribuídos à letra “h” para representar o bloco de PS e os 2 prótons atribuídos a “c” para representar o bloco de PDMAEMA. A proporção obtida foi de PDMAEMA 1,30:1 PS, considerando-se as áreas desses sinais. Nesse gráfico pode ser notado um pequeno sinal em 3,75 ppm. Ele pode ser característico de resquícios do solvente THF, que foi usado em mínimas quantidades na purificação dos materiais. Esse solvente também pode apresentar sinal em 1,83 ppm.

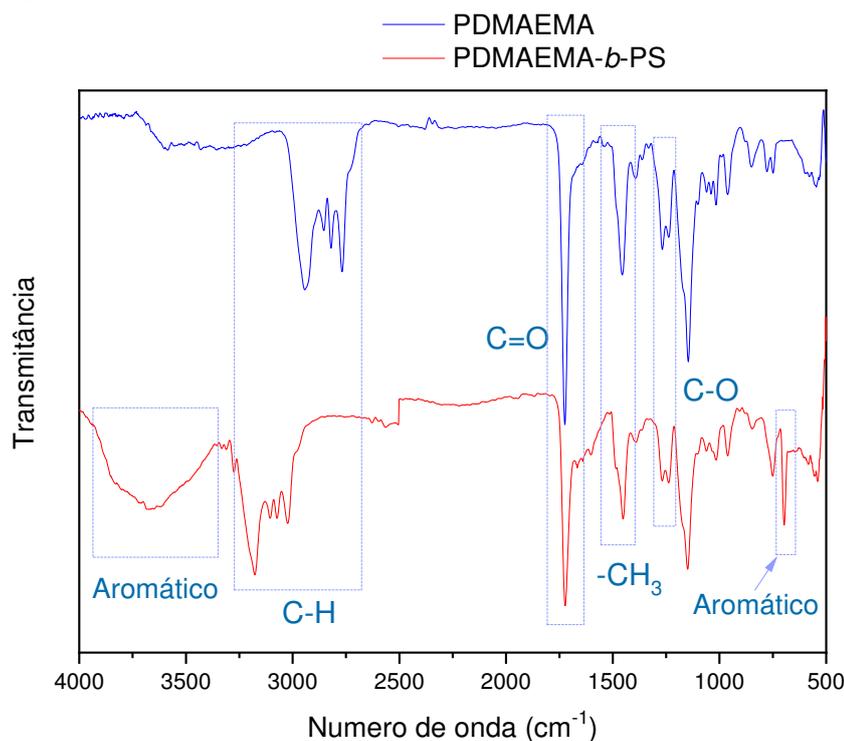
Figura 22 – Espectro de RMN para o PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ e do bloco (PDMAEMA₂₇₇) que deu origem a esse material



Fonte: Própria.

5.1.2.3 FTIR

Os espectros de FTIR para o PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ estão apresentados na Figura 23. As bandas em destaque nessa análise foram: 699, 1135, 1266, 1455, 1726, 2767, 2932 e 3429 cm⁻¹. Quando comparados os espectros do primeiro e segundo bloco, a principal diferença entre eles é a banda em 699 cm⁻¹, típica de aromáticos e as bandas acima de 3000 cm⁻¹, as quais podem ser atribuídas à incorporação do bloco de estireno e a estiramentos de carbono sp² C-H.

Figura 23 - Espectro de FTIR do PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇

Fonte: Própria.

5.1.3 PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆

De maneira análoga à descrição do item 5.1.2, o PDMAEMA₂₇₇ foi o macroCTA que deu origem ao PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆. As caracterizações do PDMAEMA₂₇₇ aparecerão novamente nos subitens a seguir para que possam ser observadas as modificações do copolímero em relação ao seu macroCTA, ambos foram caracterizados por GPC, RMN e FTIR.

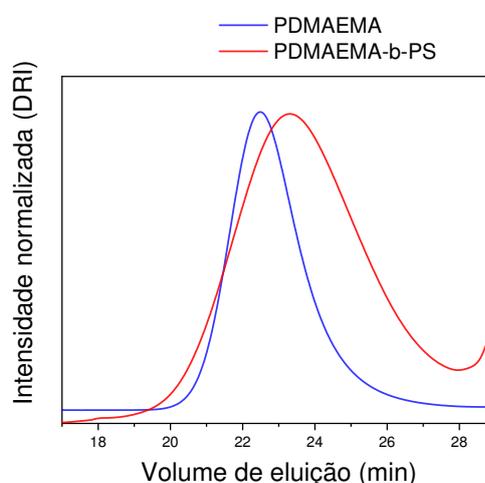
5.1.3.1 GPC

A síntese do PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ foi realizada de maneira análoga à do PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ e a partir do mesmo macroCTA, o PDMAEMA₂₇₇. O cromatograma obtido pela análise de GPC está apresentado na Figura 24. A massa molar final do copolímero em bloco foi de 24994 g.mol⁻¹. Também pode ser observado, como no material PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇, que houve uma diminuição da massa molar identificada pela técnica de GPC do copolímero em relação ao macroCTA, como o material anterior. A explicação

pode estar em perda do macroCTA durante a purificação ou ainda pode-se levar em conta outros fatores que serão discutidos no parágrafo a seguir.

A técnica de GPC relaciona o volume hidrodinâmico com o tempo de eluição. Materiais de menor volume têm uma eluição mais lenta e considera-se que possuem menor massa molar em relação aos de maior volume. Se o material se enovela, o que é uma característica percebida em polímeros contendo PDMAEMA, ele pode apresentar um menor volume hidrodinâmico e, para esse método, pode a massa molar aparente diminuir, mesmo que a massa molar real tenha aumentado. Isso pode acontecer devido a interação do grupamento amina do PDMAEMA com a fase móvel utilizada no GPC (THF). Alguns estudos observaram que em solução aquosa, em pH fisiológico, o PDMAEMA apresenta-se na forma básica, com a porção acrílica enovelada. Uma vez que esse polímero pode apresentar alterações de acordo com o meio, podem haver divergências significativas em relação à técnica de GPC e outras utilizadas para cálculo de massa molar, como RMN (HUANG; XIAO; LANG, 2012; MCKEE *et al.*, 2006). Além disso, os padrões de massa molar utilizados pelo equipamento de GPC disponível no laboratório são de PMMA e, trata-se de uma técnica relativa. Portanto, os valores obtidos também podem apresentar alterações. Sendo assim, para esse estudo, as massas molares também foram obtidas por meio da técnica de RMN e estão apresentadas na Tabela 3, no início dos resultados. Por se tratar de uma técnica que não necessita de padrões e por ser mais precisa, a técnica de RMN pode representar melhor a massa do material nesses casos.

Figura 24 – Curvas de GPC do PDMAEMA₂₇₇-b-PS₈₆

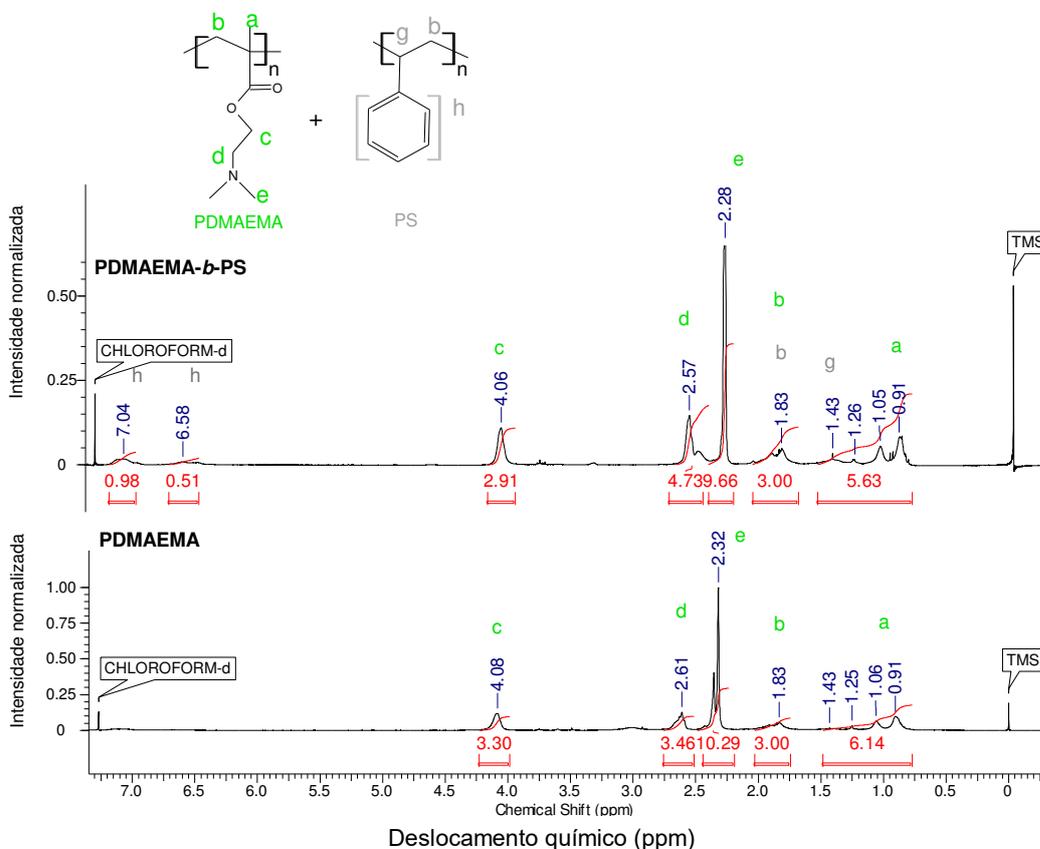


Fonte: Própria.

5.1.3.2 RMN

O copolímero PDMAEMA₂₇₇-b-PS₈₆ foi planejado com um bloco de estireno diferente do PDMAEMA₂₇₇-b-PS₃₁₇, para que houvesse uma variação de materiais e de possíveis aplicações futuras. Na Figura 25 encontram-se os espectros de RMN do PDMAEMA₂₇₇ e do PDMAEMA₂₇₇-b-PS₈₆ e as atribuições que foram feitas para cada grupo funcional. Essas atribuições foram as mesmas do copolímero PDMAEMA₂₇₇-b-PS₃₁₇. Os sinais encontrados estão nas mesmas frequências em ppm. As diferenças estão nas intensidades desses sinais que, mesmo copolímeros de composição igual, têm proporções e, com isso, características também diferentes. Por meio das intensidades dos sinais “h” para PS e “c” para PDMAEMA e utilizando a Equação 3 (Equação 3, foi possível calcular as unidades repetitivas de cada bloco.

Figura 25 – Espectro de RMN do PDMAEMA₂₇₇-b-PS₈₆

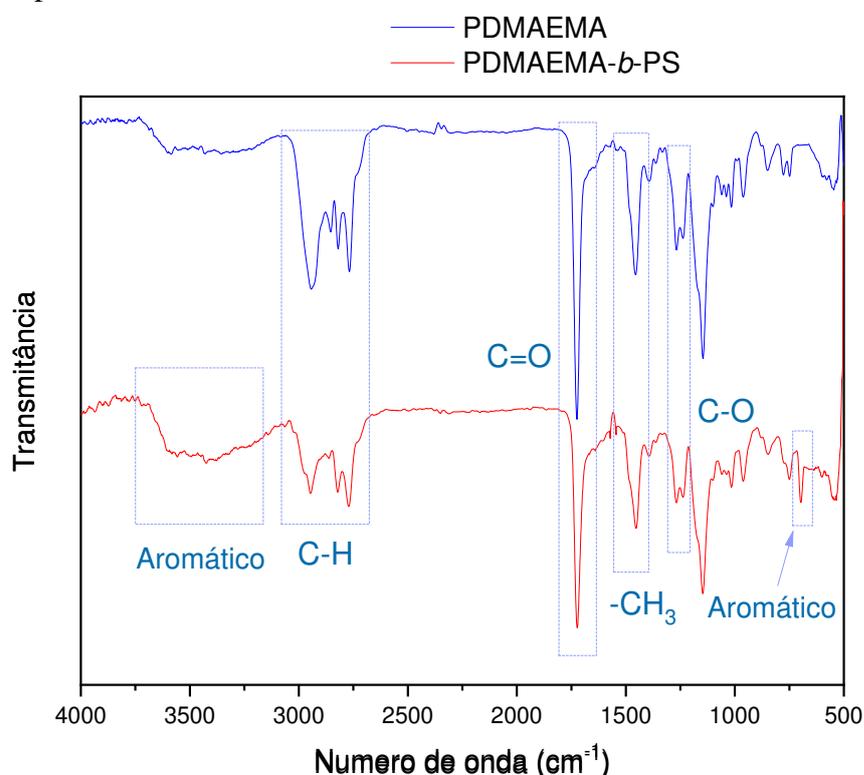


Fonte: Própria.

5.1.3.3 FTIR

O espectro de FTIR do copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ está apresentado na Figura 26. As bandas em destaque são características dos materiais sintetizados. De forma análoga à análise do copolímero anterior de mesma composição, pode-se distinguir os blocos. Por meio do gráfico percebeu-se a principal diferença entre o macroCTA PDMAEMA₂₇₇ e o copolímero formado a partir dele em 699 cm⁻¹, uma vez que essa banda pôde ser atribuída ao bloco de estireno. Acima de 3000 cm⁻¹, também pode ser observada uma maior vibração devido à incorporação do bloco de estireno e a estiramentos de carbono sp² C-H. A intensidade no gráfico em relação às demais bandas é menor que a observada nessa região no espectro do copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇, provavelmente porque o PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ possui um bloco menor, ou seja, menor concentração de PS.

Figura 26 - Espectro de FTIR do PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆



Fonte: Própria.

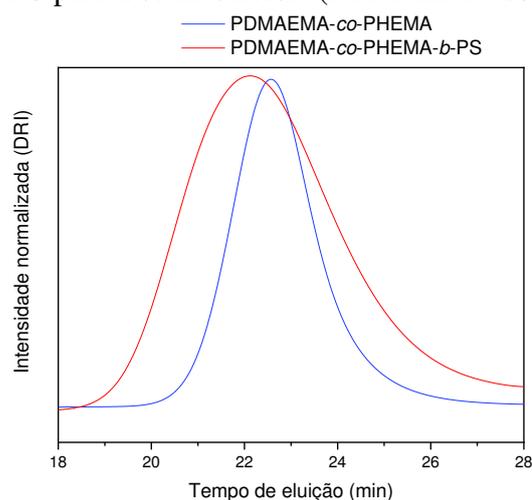
5.1.4 P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇

5.1.4.1 GPC

A síntese do primeiro bloco, o macroCTA P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃), foi planejada na proporção DMAEMA 9:1 HEMA. O crescimento do bloco foi uniforme, apresentando apenas uma população observada na curva verde da Figura 27, demonstrando que houve uma polimerização do copolímero.

A proporção controlador – iniciador dessa síntese também foi de 5:1. A massa molar alcançado pelo macroCTA foi de 51476 g.mol⁻¹, com dispersidade (D) igual a 1,24. Após a formação do copolímero P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇, a massa molar final do material foi para 45432 g.mol⁻¹ e $D= 1,96$, o que, assim como em copolímeros previamente sintetizados, pode indicar um enovelamento do primeiro bloco devido à presença do PDMAEMA ou uma dificuldade de caracterização por GPC devido à diferença de composição do material em relação ao padrão do equipamento. Ainda assim, observa-se que não houve crescimento de uma segunda população no copolímero final.

Figura 27 – Curvas de GPC para a sexta síntese: (PDMAEMA-*co*-PHEMA)-*b*-PS



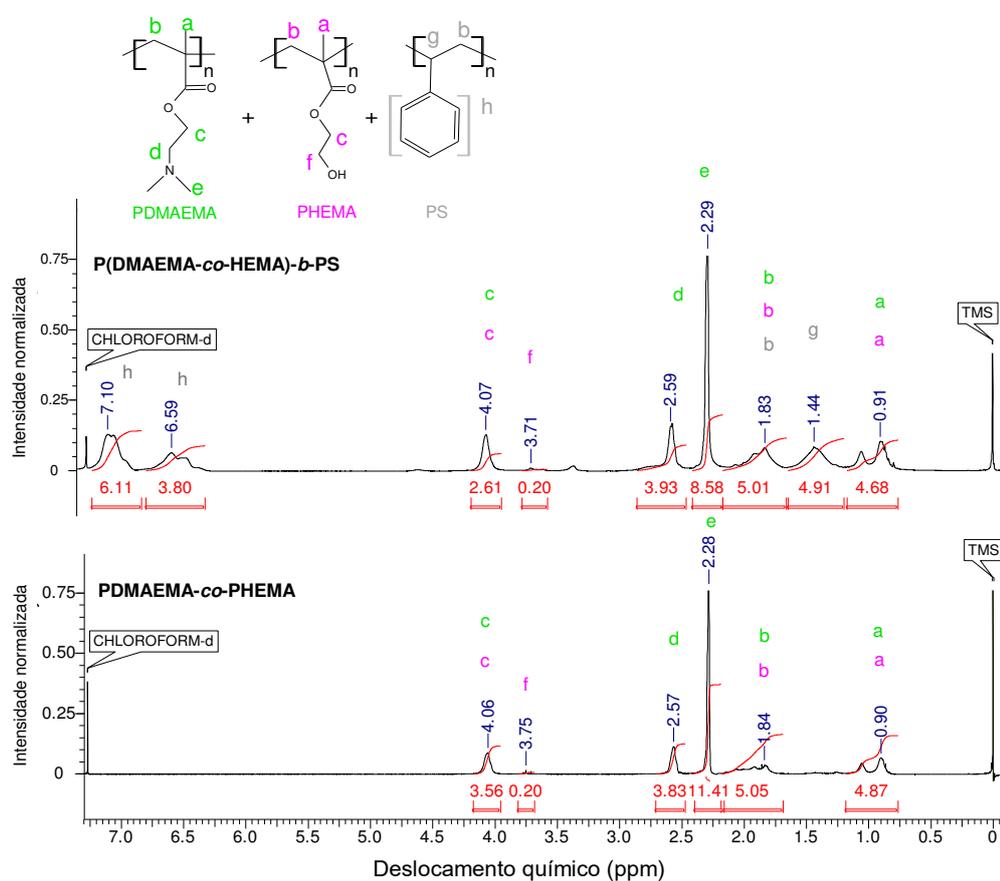
Fonte: Própria.

5.1.4.2 RMN

O espectro de RMN, apresentado na Figura 28, mostra as intensidades dos sinais característicos à cada grupo funcional e suas atribuições, indicadas das letras (a) até (h). Os sinais que indicam a presença de PHEMA, segundo a literatura, são: 0,91 ppm; 1,83 ppm;

aproximadamente 3,71 ppm e 4,06 ppm. Os dois primeiros e o último também são característicos de PDMAEMA, devido à sua estrutura química análoga ao PHEMA. Portanto, o único sinal que diferencia as duas estruturas é o atribuído à letra (f), em aproximadamente 3,71 ppm. Ele deve ser encontrado entre 3,5 e 4,0 ppm (RAMALINGAM *et al.*, 2012; DAVIS; SKRTIC, 2011; LAURENTI; GROCHOWICZ; VALENTINA, 2018). Para o cálculo das unidades repetitivas dos blocos, relacionou-se a área de “h” com os 5 prótons característicos de PS e a área de “c” com os 2 prótons de cada polímero (PDMAEMA e PHEMA), totalizando 4 prótons. O cálculo das proporções de PDMAEMA e PHEMA no primeiro bloco foi feito com base nos sinais de “d” e “f”, respectivamente.

Figura 28 – Espectro de RMN para o P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃)-b-PS₃₂₇



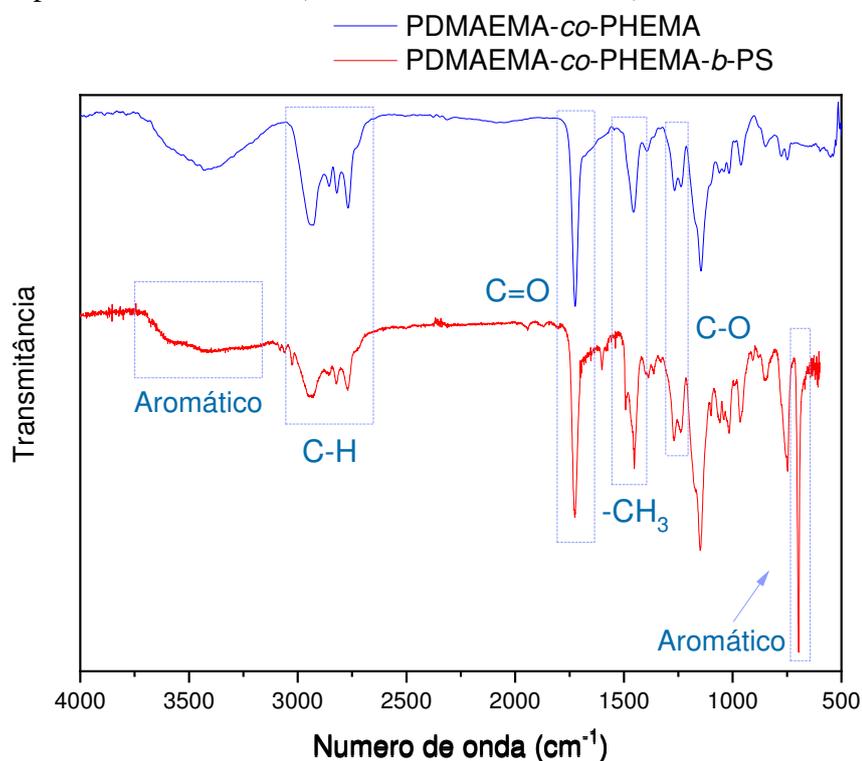
Fonte: Própria.

5.1.4.3 FTIR

O espectro de FTIR para o P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃)-b-PS₃₂₇ está apresentado na Figura 29. Nele, podemos destacar as bandas em 1135, 1266, 1455, 1726, 2767, 2932 e 3429 cm⁻¹. As bandas em 1135 e 1266 (típicas de deformações de éteres C-O-C); 1455

relacionadas aos estiramentos de metilas (C-H); 1726 típicas de estiramentos de carbonilas (C=O) e 2767 características de metilas (C-H) são idênticas às apresentadas nas análises anteriores para os materiais compostos por PDMAEMA. As bandas típicas de aromáticos, em 699 cm^{-1} e acima de 3000 cm^{-1} , devido à presença de estireno, também puderam ser observadas bem como nos outros materiais previamente sintetizados. A diferença nesse gráfico foram as últimas bandas, um pouco deslocadas para a direita (regiões de menor comprimento de onda) em 2932 e 3429 cm^{-1} . Ambas representam os mesmos grupos funcionais, sendo a primeira devido aos estiramentos de metilas (C-H) relacionados aos monômero e a segunda, em 3429 , uma região típica para o grupo hidroxila de PHEMA (SAMSONOVA *et al.*, 2011). A estrutura da HEMA diferencia-se da DMAEMA pela presença de álcool (OH) em detrimento de amina ($\text{CH}_3\text{-N-CH}_3$).

Figura 29 - Espectro de FTIR do $\text{P(DMAEMA}_{65}\text{-co-HEMA}_3\text{)-b-PS}_{327}$



Fonte: Própria.

5.1.5 PS₆₃-*b*-PtBA₂₃₃

Na Tulane University, foram realizadas diversas sínteses, todas via RAFT, com e sem ACOMP. O material escolhido para posterior hidrólise foi o PS₆₃-*b*-PtBA₂₃₃. A conversão do material pode ser observada visualmente na Figura 30 e os dados de ACOMP (Tabela 6) foram utilizados para os cálculos e análises.

5.1.5.1 ACOMP

A partir dos dados coletados por ACOMP, a massa molar (Mw) foi obtida e, em seguida, comparado à obtida por GPC. Os resultados estão apresentados na Tabela 6. É possível observar que os valores foram próximos e que as massas de cada bloco também foram parecidas, como desejado, o que auxilia a formação de vesículas poliméricas. Os dados de massa fornecidos por ACOMP são mais confiáveis por utilizarem diversas técnicas em conjunto.

Tabela 6 – Resultados obtidos por ACOMP para o monitoramento da síntese de PS-*b*-PtBA

Reação	Primeiro bloco	Segundo bloco
tBA:Sty (%m:%m)	0,0694	50:50***
[tBA] (mol/L)	-	6,797
[Sty] (mol/L) x 10 ²	869,9	-
[AIBN] (mol/L) x 10 ³	3,646	3,543
[BM1433] (mol/L) x 10 ²	1,823	0,1275***
Mw estipulada (g/mol)	50000	250000
Mw (g/mol)	17896**	31088*/ 36443**
Viscosidade reduzida (cm ³ /g)	-	50,70
Conversão fracional total (%)	-	27,96

*Calculado por ACOMP

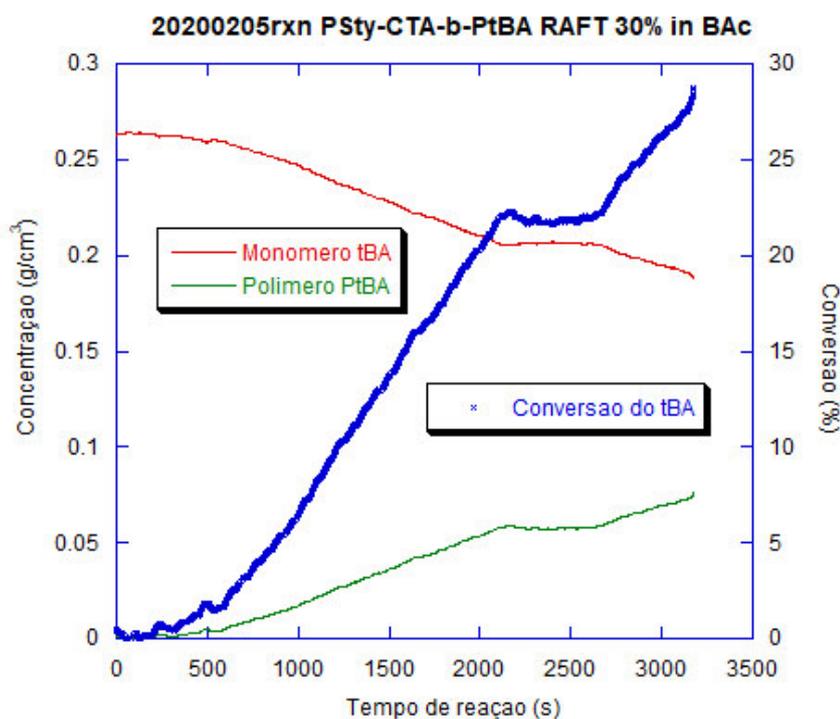
**Calculado por GPC

***PSty-CTA – primeiro bloco

Fonte: Própria.

A Figura 30 apresenta a conversão de tBA em PtBA monitorada por ACOMP. Por meio do gráfico é possível observar a concentração de monômero diminuindo e a de polímero aumentando.

Figura 30 – Análise de conversão de tBA em PtBA por ACOMP

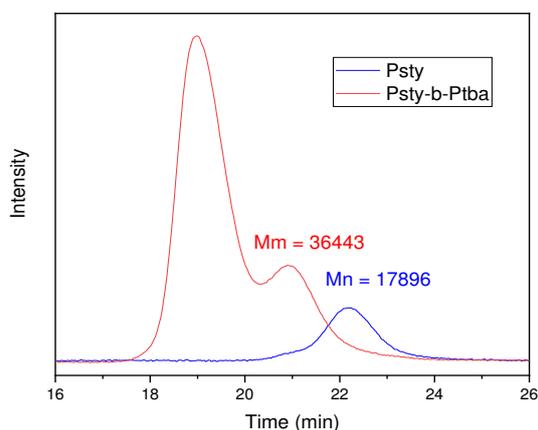


Fonte: Própria.

5.1.5.2 GPC

A partir das análises de GPC primeiramente foi obtida a massa molar (M_n) do macroCTA PS₁₇₁ e a partir dela, objetivou-se alcançar o dobro da massa para o copolímero que continha PtBA. Pode se observar no cromatograma (Figura 31) uma curva referente ao macroCTA ($M_n=17896$) e outra referente ao copolímero PS₁₇₁-*b*-PtBA₆₃₂ ($M_n=36443$). Na curva do copolímero pode se observar que ocorreu o crescimento de duas populações. Isso pode ter ocorrido devido à alta reatividade do polímero PtBA, o mesmo pode ter polimerizado em paralelo ao bloco (por PRL). Sendo assim, para os cálculos essa segunda população foi desconsiderada. Levou-se em conta apenas uma população para os cálculos das unidades repetitivas.

Figura 31 - Cromatogramas de poliestireno e poli(estireno-*bloco*-acrilato de *terc* butila)

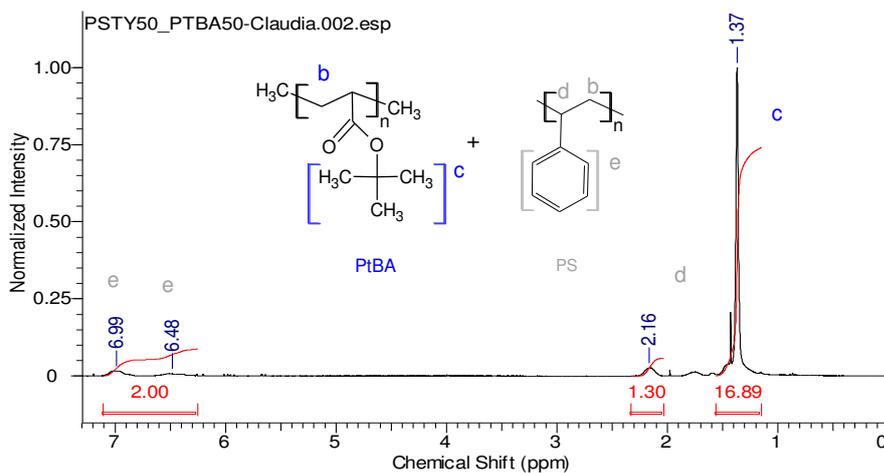


Fonte: Própria.

5.1.5.3 RMN

Por meio da análise de RMN, apresentada na Figura 32, pode-se observar as regiões típicas do PtBA nos sinais em 2,16 e 1,37 ppm (mais blindado, região de campo alto) e região de PS (menos blindado, região de campo baixo) nos sinais em 6,99 e 6,48 ppm. Essa técnica pode ser utilizada para cálculo de proporções entre os blocos, porém devido ao crescimento inesperado de homopolímero PtBA, essa análise não pôde ser feita. As proporções entre os blocos foram estipuladas com base na análise de GPC.

Figura 32 – Espectro do poli (estireno-*bloco*-acrilato de *terc* butila) antes da hidrólise

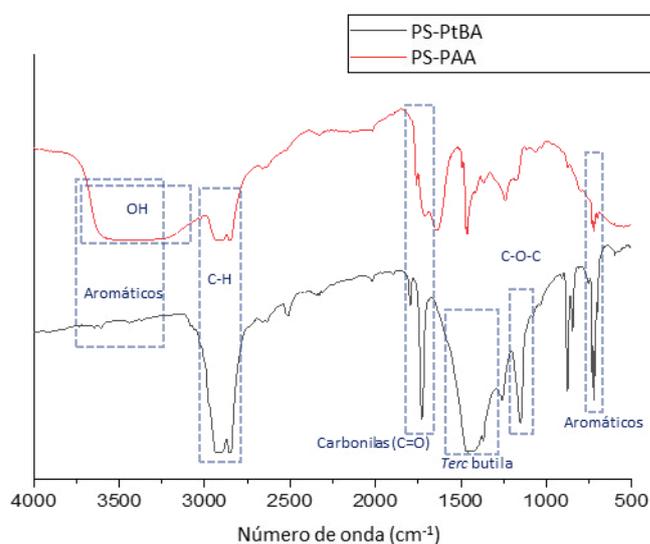


Fonte: Própria.

5.1.5.4 FTIR

Os experimentos de FTIR foram realizados a partir do material seco para analisar as bandas características dos polímeros e seus resultados estão apresentados na Figura 33. Inicialmente o material era composto por poliestireno e poli acrilato de *terc* butila (PS₁₇₁-*b*-PtBA₆₃₂) e, após a hidrólise, houve formação de ácido acrílico e ele se tornou PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂. Para esse último material, percebe-se principalmente uma alteração no espectro referente às bandas entre 3000 e 3800 cm⁻¹. Os números de onda entre 1385 e 1395 cm⁻¹ representam a região típica de *terc* butila, percebe-se que a banda antes da hidrólise diminuiu consideravelmente em relação ao material após hidrólise.

Figura 33 – Espectro do PS₁₇₁-*b*-PtBA₆₃₂ antes e após hidrólise (PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂)



Fonte: Própria.

5.2 Caracterização de vesículas de copolímeros em solução aquosa – Estudo da incorporação de moléculas hidrofílicas

Os copolímeros PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇, PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆, P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇, PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂ (PS₁₇₁-*b*-PtBA₆₃₂ hidrolisado) e PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃ foram testados quanto à capacidade de se autoagregarem em meio aquoso para a formação de vesículas que pudessem agir como polimerossomos. A primeira análise realizada para cada material foi a de DLS, uma vez que é uma técnica de fácil disponibilidade no laboratório e,

a partir dela, já se pode perceber se o copolímero será capaz de formar vesículas ou não. Nessa primeira etapa já se optou por descontinuar os testes com a amostra PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ (o que será explicado a seguir). Após essa análise, foram feitos testes colorimétricos e imagens de MEV com o PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆. Os testes colorimétricos foram bastante satisfatórios, já por meio das imagens de MEV não foi possível observar vesículas, devido à limitação de detecção do aparelho, apenas agregados. Também foram feitas imagens de TEM para as amostras PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇, PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ e P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇, porém apenas para o P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇ as imagens foram satisfatórias. Para as amostras hidrolisadas PS₁₇₁-*b*-PtBA₆₃₂ e PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃, os resultados de DLS indicaram formação de vesículas com tamanhos compatíveis com os de vesículas (BELLUATI *et al.*, 2020; GONZATO *et al.*, 2014; IKKENE *et al.*, 2021).

5.2.1 PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇

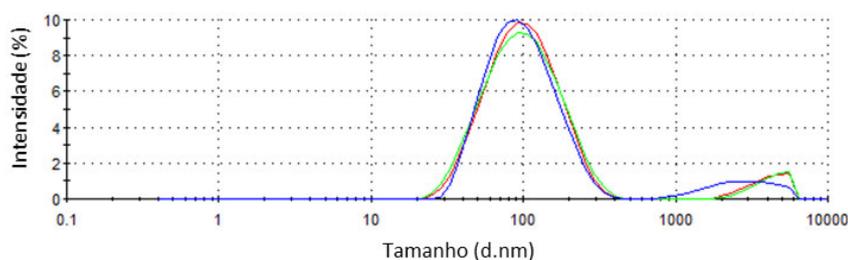
Para caracterizar as vesículas, a análise de DLS é de grande importância, uma vez que seus gráficos quando bem simétricos indicam que foi possível formar coloides e os valores fornecidos pela análise de diâmetro hidrodinâmico mostram se as partículas têm tamanho condizente com vesículas. A baixa dispersidade (quanto mais próxima de zero, melhor) por sua vez, é um parâmetro indicativo de homogeneidade ou não dos tamanhos de partículas.

As vesículas formados a partir do copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ foram caracterizados por DLS e os resultados serão discutidos a seguir.

5.2.1.1 DLS

O copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ foi analisado quanto à formação de vesículas por DLS em triplicata. As médias apresentaram uma dispersidade (D) de 0,308. A região de maior frequência apresentou D_H médio de 107 nm e a região de menor frequência e alto D_H (> 800nm) provavelmente se deve à agregação de partículas. Na Figura 34 está apresentado o gráfico de tamanho (nm) do D_H por intensidade (%).

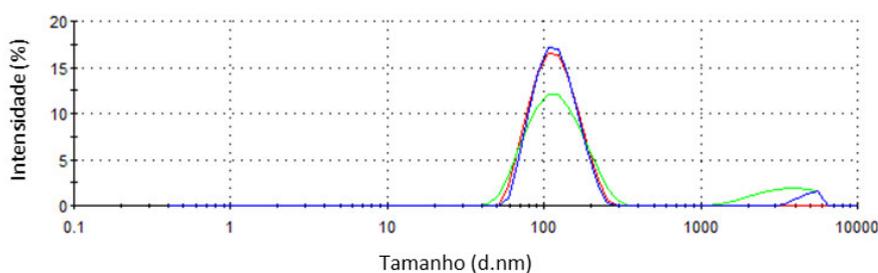
Figura 34 – Distribuição dos tamanhos (D_H) para as vesículas de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ em água



Fonte: Própria.

Esse mesmo material, foi também analisado em meio tamponado pH 7,0 a 25 °C (Figura 35). As médias apresentaram uma $D=0,220$ e a região de maior frequência dos picos apresentou D_H médio de 120 nm. Percebeu-se que o meio, fosse ele tamponado ou não, não apresentava impacto significativo no diâmetro hidrodinâmico das vesículas. Assim, para fins de medição de diâmetro, optou-se por agregar materiais sempre em água.

Figura 35 – Distribuição dos tamanhos (D_H) para as vesículas de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ em solução tampão pH 7,0



Fonte: Própria.

As amostras utilizadas nessas análises foram armazenadas por sete dias para observação da estabilidade das vesículas formados. Em três dias os materiais já começaram a se precipitaram e formaram corpo de fundo. O sistema mostrou-se, portanto, cineticamente instável (em geral vesículas são termodinamicamente instáveis). Isso pode ter ocorrido provavelmente por uma proporção inadequada entres os blocos, uma vez que para a formação de vesículas é necessário que a porção hidrofóbica seja maior que a hidrofílica, como discutido no item 2.2 e observado na Figura 8. Pode ter ocorrido a formação de vesículas e outras conformações não desejadas nesse estudo. Isso também foi confirmado pela análise de MET, onde não foi possível obter imagens com boa qualidade e que

mostrassem formato vesicular das estruturas. Por isso, decidiu-se prosseguir com as análises em outros copolímeros.

5.2.2 PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆

O copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ também foi testado inicialmente quanto à formação de vesículas por DLS. Após apresentar resultados promissores, também foi analisado por teste colorimétrico em UV-Visível, MEV e MET. Essa última, por ter alcançado sucesso, não será apresentada nesse trabalho.

5.2.2.1 DLS

Os resultados de diâmetro hidrodinâmico obtidos para o copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ estão apresentados na Tabela 7. Assim como para o copolímero anterior foi avaliado se o meio tamponado impactaria ou não o diâmetro hidrodinâmico das vesículas formadas, para o copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆, alguns fatores foram variados para se observar impactos na formação das vesículas. Variou-se a concentração da solução de vesículas, que foi diluída em água e se a filtração em membrana de 0,22 µm para observar se essa iria romper as vesículas ou não, se isso afetaria os diâmetros.

Tabela 7 – Diâmetro hidrodinâmico de vesículas de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ em água

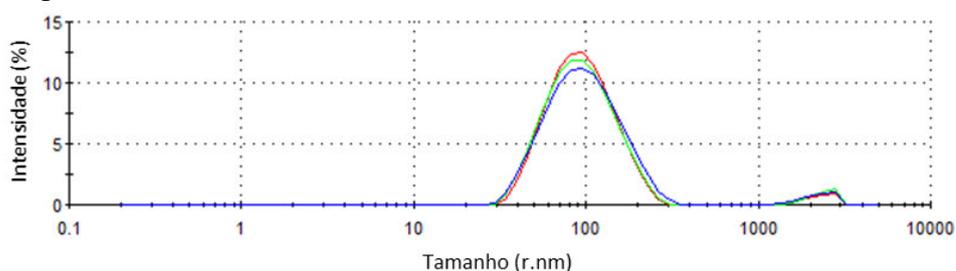
Amostra	Concentração (mg.ml ⁻¹)	D _H (nm)	Média
Polímero 1 mg/mL	1	117	140 ± 32
Polímero 1 mg/mL (filtrado)	1	162	
Diluído 10x	0,1	200	161 ± 56
Diluído 10x (filtrado)	0,1	121	
Diluído 20x	0,005	227	202 ± 36
Diluído 20x (filtrado)	0,005	176	
Diluído 50x	0,0001	232	191 ± 58
Diluído 50x (filtrado)	0,0001	150	
Média total			173 ± 44

Fonte: Própria.

Os dados obtidos para os diâmetros das vesículas nessas diferentes condições, entre 140 e 191 nm, mostram que os coloides formados tiveram tamanhos compatíveis com vesículas, corroborando com as análises de Gonzato *et al.* (2014), Belluati *et al.* (2020) e Ikkene *et al.* (2021).

Uma vez que não foi possível observar impacto significativo nos diâmetros hidrodinâmicos das vesículas formados a partir do PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆, também se analisou a distribuição dos tamanhos por meio de DLS (Figura 36). As médias apresentaram uma dispersidade (*D*) de 0,253. A região de maior frequência dos picos apresentou *D_H* médio de 105,0 nm, próximos aos encontrados na Tabela 7. A Figura 36 apresenta o gráfico de tamanho (nm) do *D_H* por intensidade (%).

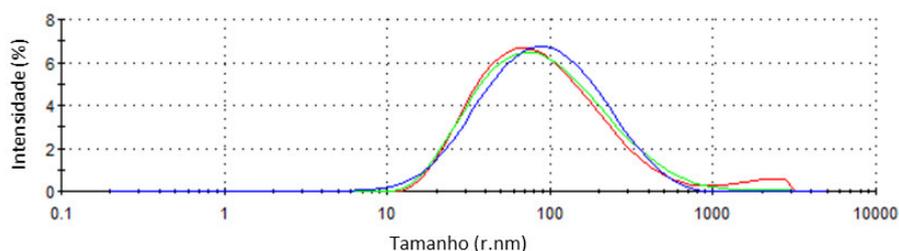
Figura 36 – Distribuição dos tamanhos (*D_H*) para as vesículas de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ em água em triplicata



Fonte: Própria.

Em seguida, deu-se início ao teste de incorporação de azul de metileno. Primeiro foi analisado se, ao formar vesículas em solução de azul de metileno, seria possível analisá-los por DLS e se os diâmetros hidrodinâmicos obtidos teriam tamanhos compatíveis com vesículas. Na Figura 37 está apresentada a análise feita com essas vesículas de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇ em solução de azul de metileno.

Figura 37 – Distribuição dos tamanhos (*D_H*) para as vesículas de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ em azul de metileno em triplicata



Fonte: Própria.

As médias apresentaram $D=0,383$ e a região de maior frequência dos picos apresentou D_H médio de 121,4 nm, tamanho compatível com vesículas. A análise mostrou que a presença do azul de metileno pode ter gerado um aumento na dispersidade das vesículas, mas que o aprofundamento de estudos com esse reagente pode ser realizado, uma vez que ele não impediu a autoagregação do material.

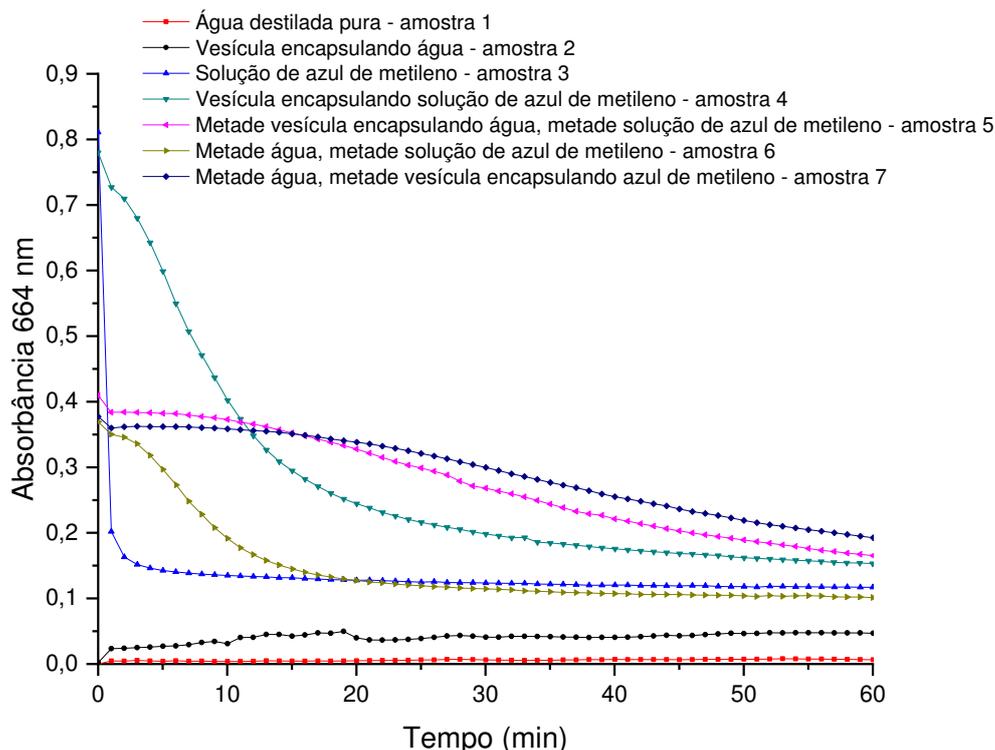
5.2.2.2 Teste de incorporação de azul de metileno usando espectrofotometria UV-Vis

A partir dessa análise satisfatória de DLS, decidiu-se realizar um novo estudo com as vesículas de PDMAEMA₂₇₇-b-PS₈₆ utilizando azul de metileno. Como explicado no item 4.6.6, quando se adiciona o agente redutor tiocianato de amônio em azul de metileno, forma-se leucometileno e a solução se torna incolor. Além de apresentar tamanho compatível com vesícula, para se comprovar que o agregado de PDMAEMA₂₇₇-b-PS₈₆ consegue agir como um polimerossomo e aprisionar uma molécula, foi analisada a cinética de sete amostras de diferentes composições (Figura 38). A análise foi realizada em triplicata, porém como o comportamento das triplicatas foi muito parecido e para facilitar a visualização, foi apresentado apenas um gráfico e os outros dois estão nos apêndices.

A técnica de Espectroscopia UV/Vis permitiu observar a diferença do comportamento de materiais que continham azul de metileno encapsulado (amostras 4 e 7) das que não continham. As curvas dessas amostras mostraram maior resistência à ação do agente redutor, ou seja, menor diminuição da absorbância, declive mais lento ao longo do tempo.

Quando comparadas às amostras de vesículas encapsulando azul de metileno (amostra 4) com as de solução de azul de metileno puro (amostra 3), percebe-se que a absorbância da segunda diminui drasticamente, enquanto a da primeira diminui mais lentamente e, ao fim dos 60 minutos, a amostra de vesículas encapsulando azul de metileno ainda apresenta maior absorbância que as demais.

Figura 38 – Estudo fotométrico da incorporação do azul de metileno frente à ação do agente redutor tiocianato em vesículas de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆

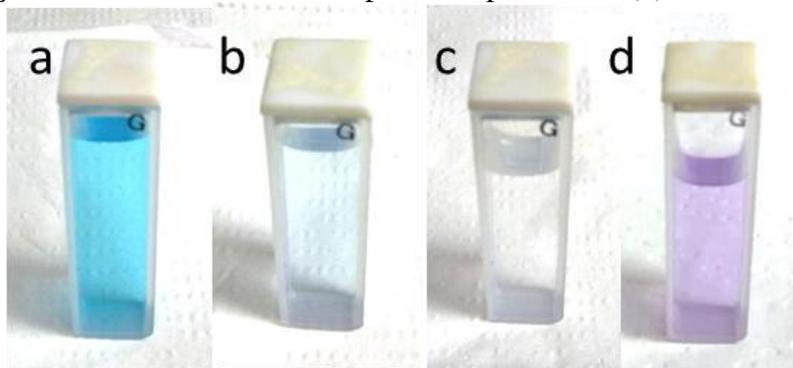


Fonte: Própria.

Os dados obtidos mostram que a absorbância da água destilada (amostra 1) se mantém em zero mesmo com a adição de tiocianato. Já a amostra 2, contendo vesícula encapsulando água, apresentou uma pequena resposta ao agente redutor. As amostras contendo solução de azul de metileno (amostras 5 e 6) apresentaram queda na absorbância, bem como alteração visual considerável (Figura 39). A amostra 5 apresentou menor declive, talvez por alguma interferência na cor gerada pela vesícula, como o que aconteceu na amostra 2. Por meio da Figura 39, também pode ser feita uma análise visual do material em diferentes etapas.

O PDMAEMA que constitui as vesículas é um polímero hidrofílico catiônico, ou seja, possui cargas positivas, bem como o azul de metileno. Esses materiais, quando aproximados devem se repelir. O azul de metileno poderia ter se fixado na parede externa da membrana do copolímero, nela ter sofrido ação do agente redutor e por isso as amostras com azul de metileno encapsulado (amostras 4 e 7) terem apresentado uma cinética de redução mais lenta. Contudo as cargas desses materiais indicam que isso não ocorreu e sim, que o azul de metileno foi encapsulado pelo copolímero.

Figura 39 – Solução de azul de metileno (a), solução de azul de metileno com 3 gotas de tiocianato após 1 hora (b), vesícula em água com 3 gotas de tiocianato após 1 hora (c) e vesícula com solução de azul de metileno encapsulada após 1 hora (d).

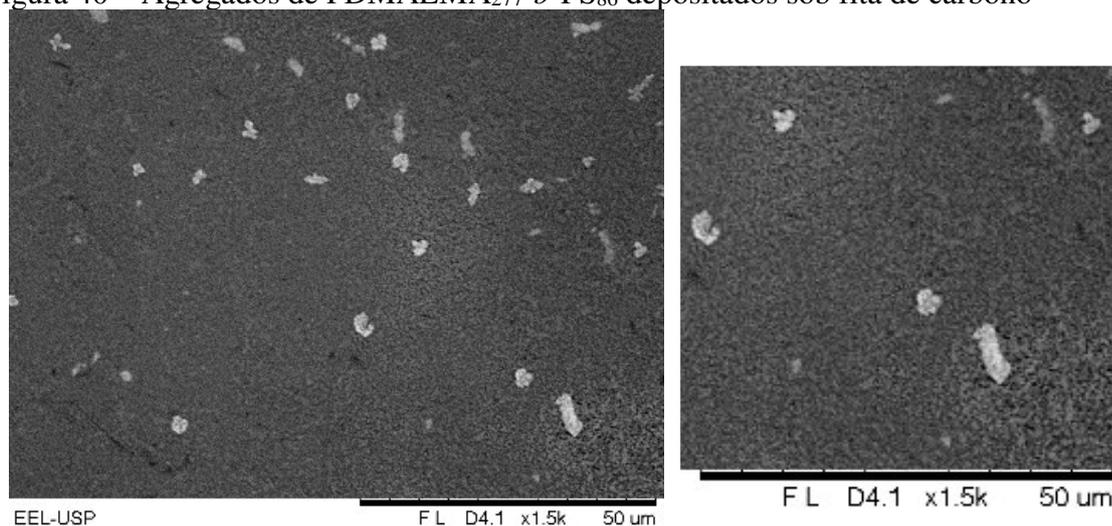


Fonte: Própria.

Considerando que a análise fotométrica indicou que as vesículas continham um ambiente aquoso interno, característico de vesículas, optou-se por, em seguida, analisar imagens das amostras em busca da visualização de vesículas.

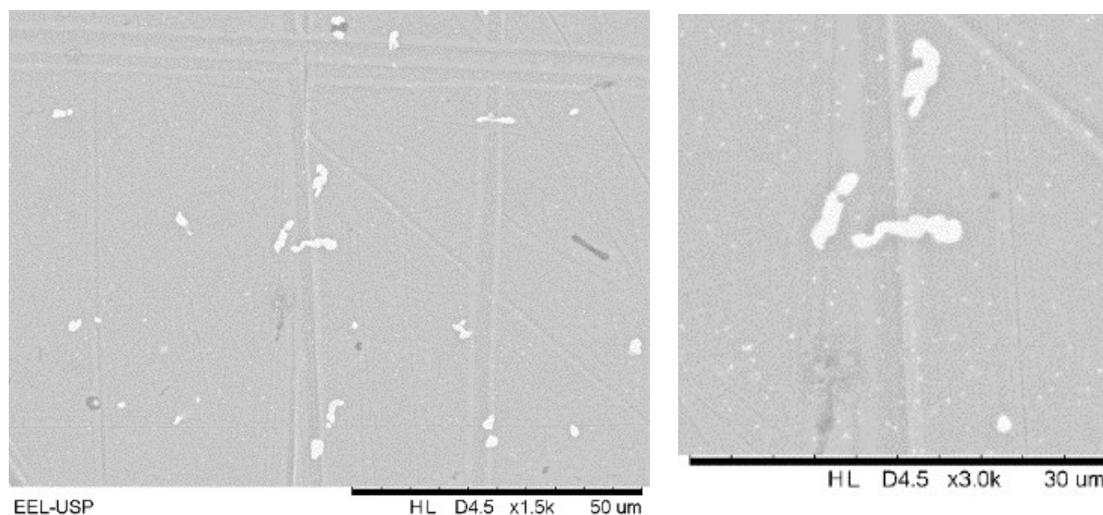
5.2.2.3 MEV

Por meio do MEV foram feitas micrografias que estão apresentadas na Figura 40. Inicialmente a amostra foi depositada sobre uma superfície de fita de carbono. Na imagem vê-se agregados maiores, de formatos variados, que são compostos por diversos agregados menores. Acredita-se que os agregados menores possuem conformação em vesículas, porém devido às limitações de ampliação da técnica, não é possível garantir imagens de melhor visualização e com uma escala nanométrica.

Figura 40 – Agregados de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ depositados sob fita de carbono

Fonte: Própria.

Na Figura 41, observa-se a amostra, também na análise de MEV, que foi depositada sob uma superfície de metal polido. Bem como a imagem anterior, são observados agregados maiores, de formatos variados e agregados menores que parecem ser vesículas, mas não se pode afirmar com certeza devido a limitação do equipamento. O equipamento MEV possui baixa capacidade de ampliação para o material utilizado. Assim, as vesículas foram observadas, mas não puderam ser utilizados para medidas, apenas para observação das estruturas.

Figura 41 – Agregados de PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆ depositados sob metal polido

Fonte: Própria.

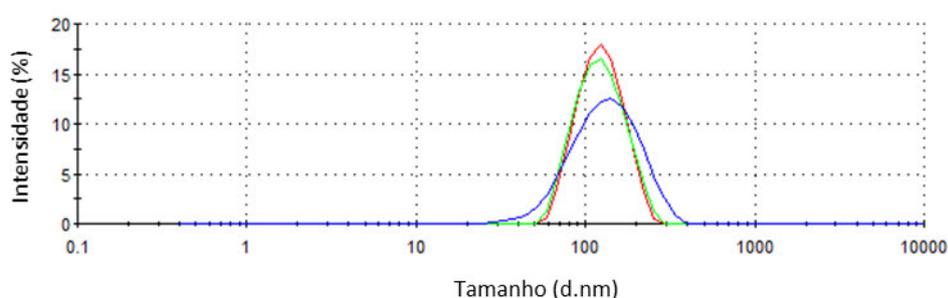
5.2.3 P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇

O copolímero P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇ apresentou diâmetros hidrodinâmicos médios compatíveis com vesículas e baixas dispersidades, os resultados de DLS foram bastante satisfatórios e, por isso, as vesículas desse copolímero também foram submetidas à análise de MET.

5.2.3.1 DLS

Preparou-se também vesículas com P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇ em solução de ureia 1M, para observar se o diâmetro hidrodinâmico variava em relação às vesículas formadas em água, mas esse fator não impactou significativamente. As médias apresentaram $\bar{D}=0,161$ e D_H médio de 117,6 nm. Outras análises de DLS foram realizadas para vesículas formadas a partir desse copolímero e ele apresentou \bar{D} médios mais baixos que as vesículas de outros copolímeros e visualmente foi observada boa estabilidade das soluções de vesículas, as quais não formavam corpo de fundo após três dias de armazenamento. Na Figura 42, está apresentado o gráfico a distribuição de D_H por intensidade (%) dessas vesículas em solução de ureia.

Figura 42 – Distribuição dos tamanhos (D_H) para as vesículas de P(DMAEMA_{65-co}-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇ em ureia



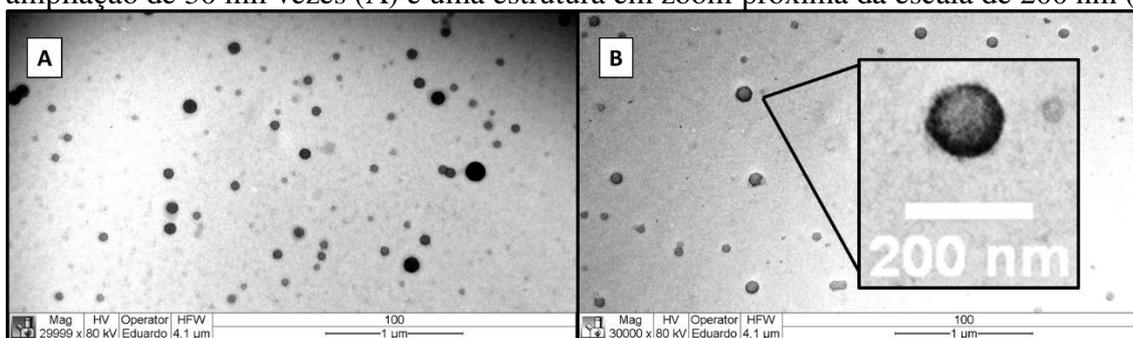
Fonte: Própria.

Devido à boa homogeneidade no tamanho das partículas (baixa \bar{D}), esse copolímero foi selecionado para análise por MET com o intuito de confirmar sua estrutura vesicular.

5.2.3.2 MET

O equipamento MET possui maior capacidade de ampliação que o MEV para análise das estruturas vesiculares nanométricas. Além disso, nessa técnica utilizou-se um contraste (acetato de uranila) para facilitar a visualização do material. Por meio da Figura 43, observa-se as estruturas distribuídas na superfície do *grid*. Ainda foi possível confirmar o diâmetro hidrodinâmico do agregado por meio de uma escala utilizando o programa ImageJ®.

Figura 43 – Micrografias de vesículas de P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇ com ampliação de 30 mil vezes (A) e uma estrutura em zoom próxima da escala de 200 nm (B).



Fonte: Própria.

Os resultados foram bastante satisfatórios. Além da visualização da estrutura que deixa claro o formato circular e, com a tonalidade mais clara, um interior provavelmente aquoso (o que diferencia vesícula de micelas). Os tamanhos das vesículas são próximos dos obtidos por DLS (entre 100 e 200 nm) e são compatíveis com vesículas, conforme é encontrado na literatura. Sendo assim, as análises do copolímero P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇ cumprem com o principal objetivo desse trabalho que é formar agregados compatíveis com vesículas a partir de copolímeros anfifílicos. Com isso, resta apenas provar que essas vesículas podem agir como polimerossomos e além de aprisionar materiais em seu interior, ser capaz de liberá-lo quando necessário.

5.2.4 PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂

O PS₁₇₁-*b*-PtBA₆₃₂ foi sintetizado na Tulane University e depois hidrolisado para se tornar o copolímero anfifílico PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂. Inicialmente foram realizadas análises de DLS, em diferentes concentrações a fim de se observar o comportamento do material quanto à difusão em meio aquoso e, em seguida foi realizada uma análise em ARGEN.

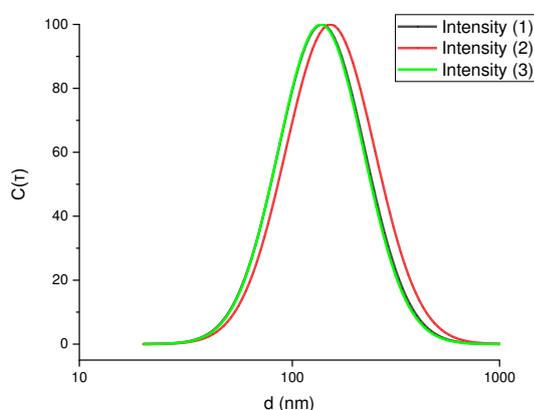
5.2.4.1 DLS em múltiplas amostras simultâneas

As vesículas formadas a partir do copolímero PS₁₇₁-b-PAA₆₃₂ em diferentes concentrações foram analisados por DLS em triplicata. Todos os materiais foram filtrados previamente à análise para evitar agregados acumulados.

Nas Figura 44 a 47 podem ser observadas as curvas de intensidade das triplicatas analisadas. As curvas são muito próximas e isso indica vesículas mais uniformes e com menor dispersidade entre eles.

Na Tabela 8 é possível observar uma dispersidade alta em relação às demais amostras desse item. Observa-se com isso um erro padrão de 3,82 na análise realizada.

Figura 44 – Análise por DLS de tamanho das vesículas formadas por PS-*b*-PtBA hidrolisado em solução aquosa na concentração de 0,1 mg/mL



Fonte: Própria.

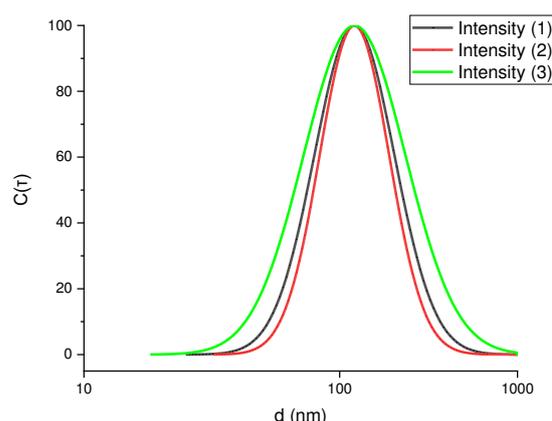
Tabela 8 – Análise por DLS de vesículas de PS₁₇₁-b-PAA₆₃₂ em solução aquosa na concentração de 0,1 mg/mL

Amostra	Diametro (nm)	D	Linha de base	Count Rate (kcounts/s)	Dados retidos (%)	Coefficiente de difusão (cm ² /s)
1	131.03	0.172	5.3	10.2	95.31	3.745E-08
2	141.97	0.184	0.0	10.5	93.29	3.457E-08
3	130.04	0.166	3.8	10.3	99.68	3.774E-08
Média	134.35	0.174	3.1	10.4	96.09	3.659E-08
Erro Padrão	3.82	0.005	1.6	0.1	1.89	1.013E-09
Desvio Padrão	6.62	0.009	2.8	0.2	3.27	1.754E-09

Fonte: Própria.

Na Figura 45, as curvas de intensidade também são muito próximas, indicando boa homogeneidade entre as triplicatas. A Tabela 9, por sua vez, apresenta a baixa dispersidade obtida e o erro padrão de 0,03 dessa análise, bem mais baixo em relação à análise anterior (Tabela 8). O erro da análise anterior é maior provavelmente porque os pontos no gráfico mostram maior dispersão (dispersão de pontos, não da amostra em si) devido à baixa concentração.

Figura 45 – Análise de DLS de tamanho dos vesículas formadas por PS-b-PtBA hidrolisado em solução aquosa na concentração de 0,8 mg/mL



Fonte: Própria.

Tabela 9 – Análise por DLS de vesículas de PS₁₇₁-b-PAA₆₃₂ em solução aquosa na concentração de 0,8 mg/mL

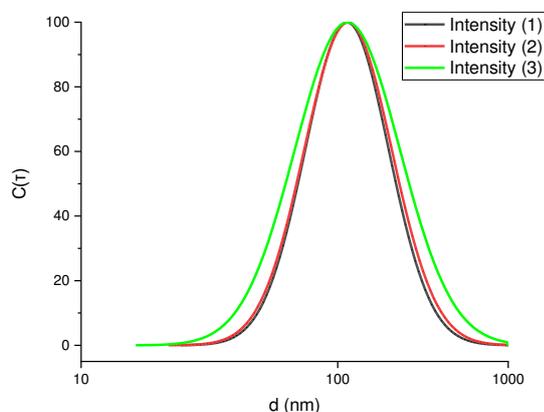
Amostra	Diametro (nm)	Đ	Linha de base	Count Rate (kcounts/s)	Dados retidos (%)	Coefficiente de difusão (cm ² /s)
1	110.65	0.079	9.0	116.1	100.00	4.435E-08
2	110.67	0.059	6.8	112.7	100.00	4.434E-08
3	110.74	0.131	8.6	113.8	96.81	4.432E-08
Média	110.69	0.090	8.1	114.2	98.94	4.434E-08
Erro Padrão	0.03	0.021	0.7	1.0	1.06	1.075E-11
Desvio Padrão	0.05	0.037	1.2	1.7	1.84	1.862E-11

Fonte: Própria.

Na Figura 46, assim como na Figura 45, as curvas de intensidade apresentam boa homogeneidade das triplicatas. A Tabela 10 também apresenta a baixa dispersidade obtida e

o erro padrão nessa análise é de 0,22, bem mais baixo em relação à primeira análise (Tabela 8), porém levemente mais alto em relação ao resultado da Tabela 9. Isso se dá, provavelmente devido ao ligeiro aumento da dispersidade das medidas.

Figura 46 – Análise de DLS de tamanho dos vesículas formadas por PS-b-PtBA hidrolisado em solução aquosa na concentração de 1 mg/mL



Fonte: Própria.

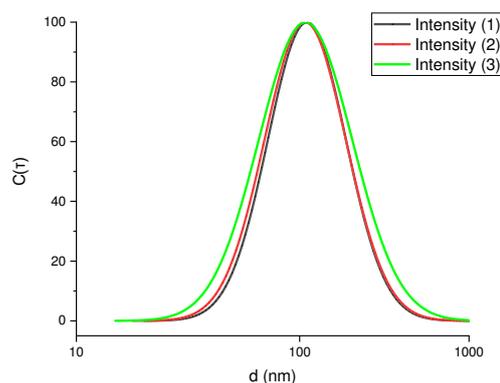
Tabela 10 – Análise por DLS de vesículas de PS₁₇₁-b-PAA₆₃₂ em solução aquosa na concentração de 1 mg/mL

Amostra	Diâmetro (nm)	D	Linha de base	Count Rate (kcounts/s)	Dados retidos (%)	Coefficiente de difusão (cm ² /s)
1	106.68	0.088	8.2	59.4	100.00	4.600E-08
2	107.45	0.097	9.6	59.0	98.42	4.567E-08
3	106.97	0.143	8.4	59.9	100.00	4.588E-08
Média	107.04	0.109	8.7	59.4	99.47	4.585E-08
Erro Padrão	0.22	0.017	0.4	0.3	0.53	9.531E-11
Desvio Padrão	0.39	0.029	0.8	0.4	0.91	1.651E-10

Fonte: Própria.

Na Figura 47, assim como nas Figuras 45 e 46, as curvas de intensidade também apresentam aspecto homogêneo. A Tabela 11 apresenta uma maior dispersidade em relação às duas análises anteriores o erro padrão nessa análise é de 0,49.

Figura 47 – Análise de DLS de tamanho dos vesículas formadas por PS-b-PtBA hidrolisado em solução aquosa na concentração de 1,5 mg/mL



Fonte: Própria.

Tabela 11 – Análise por DLS de vesículas de PS₁₇₁-b-PAA₆₃₂ em solução aquosa na concentração de 1,5 mg/mL

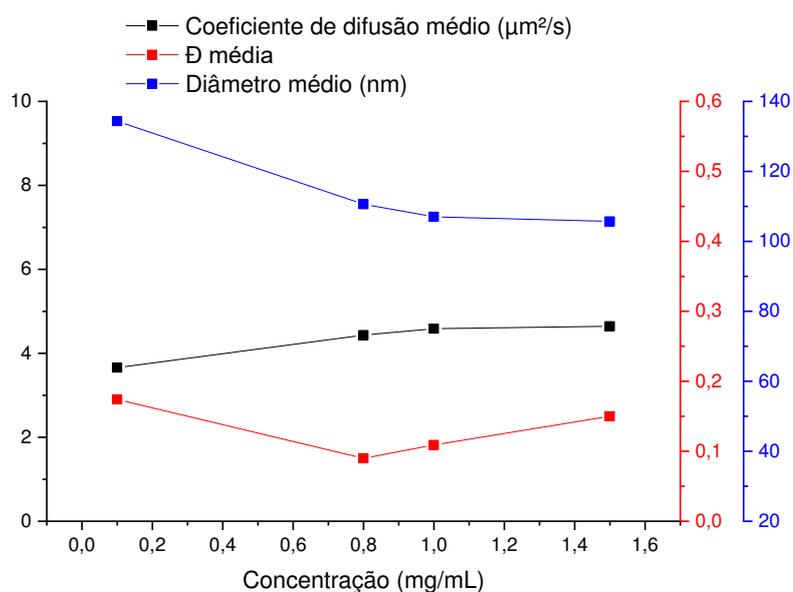
Amostra	Diametro (nm)	\bar{D}	Linha de base	Count Rate (kcounts/s)	Dados retidos (%)	Coefficiente de difusão (cm ² /s)
1	106.66	0.127	8.8	104.8	100.00	4.601E-08
2	105.06	0.138	7.6	103.9	100.00	4.671E-08
3	105.35	0.186	7.9	113.4	100.00	4.658E-08
Média	105.69	0.150	8.1	107.4	100.00	4.643E-08
Erro Padrão	0.49	0.018	0.4	3.0	0.00	2.154E-10
Desvio Padrão	0.85	0.032	0.6	5.2	0.00	3.731E-10

Fonte: Própria.

Por fim, a Figura 48 mostra o comportamento de difusão do material de acordo com a concentração de polímeros. As medições de DLS são geralmente usadas para soluções diluídas, mas os instrumentos atuais podem ajudar na medição do coeficiente de difusão de amostras em altas concentrações (Malvern Panalytical, 2014).

Também foram comparados os diâmetros e dispersidades médias. A partir do DLS foi possível obter o coeficiente de difusão das macromoléculas em solução, a partir da análise da distribuição de frequências das flutuações na intensidade de luz espalhada.

Figura 48 – Coeficiente de difusão, dispersidade e diâmetro médios a partir de vesículas de PS₁₇₁-b-PAA₆₃₂ formados em diferentes concentrações



Fonte: Própria.

Observa-se por meio do gráfico (Figura 48) que o diâmetro apresentou tendência de diminuição com o aumento da concentração, mas que, para todas as amostras, ele foi compatível com o tamanho de vesículas (entre 100 e 140 nm). Chakraborty *et al.* (2021) fizeram simulações computacionais e estudaram copolímeros de PS e PAA. Eles concluíram em seus estudos que a espessura da membrana diminui e a sobreposição da membrana aumenta com o aumento da concentração do copolímero e que os polímeros que compõem o bloco podem afetar seu coeficiente de difusão.

O coeficiente de difusão, por sua vez, apresentou comportamento contrário, indicando uma menor difusividade em vesículas mais compactadas e mais concentradas. Esses dados eram esperados e mostram que maiores concentrações de copolímeros podem gerar membranas mais densas e, conseqüentemente menor difusão.

Itel *et al.* (2014) realizaram estudos de difusão com copolímeros anfifílicos dibloco e tribloco de diferentes composições e massas molares entre 2100 e 8700 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Mesmo com massas muito menores, a média dos coeficientes de difusão encontrados para os copolímeros dibloco ($3,825 \mu\text{m}^2/\text{s}$) foi muito próxima da obtida no presente estudo ($4,33 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Para os copolímeros tribloco, os coeficientes apresentados eram menores, por volta de $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ e ainda comparou-se com lipídeos, que a difusão $12,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Paxton *et al.* (2018) estudaram a adsorção e fusão de vesículas híbridas de lipídio e polímero em superfícies variando pH e perceberam que a medida do coeficiente de difusão depende fortemente da quantidade de

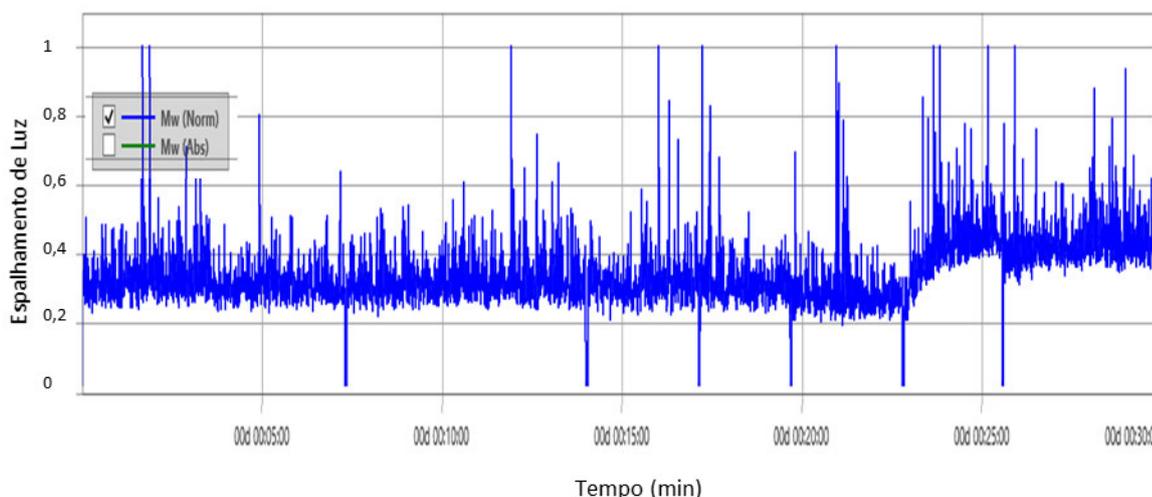
polímero usada na preparação das vesículas. O que indica que a análise feita nesse estudo corrobora com os dados da literatura e menores concentrações de copolímero possibilitam maior difusão.

Para sistemas de DLS em múltiplas amostras simultâneas, o aumento na concentração do copolímero no meio pode gerar efeitos como o aumento na largura de distribuição, dispersidade e uma diminuição no tamanho médio ou diâmetro hidrodinâmico. Isso pode ser observado no gráfico e pode ser indicativo de efeitos repulsivos entre coloides e coeficiente virial positivo para esse copolímero. Essa repulsão entre os podem indicar boa estabilidade coloidal (MALVERN PANALYTICAL, 2014; QUIGLEY; WILLIAMS, 2015) das vesículas formadas a partir do copolímero PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂.

5.2.4.2 Análise de formação de partículas por ARGEN

Após as análises de DLS, as vesículas formadas em solução aquosa 1 mg/mL (concentração usada ao longo desse trabalho como padrão para formação de vesículas) a partir do copolímero de PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂ foram analisados utilizando o equipamento ARGEN. Aliquotas de solução de vesículas foram adicionadas em água para observar o comportamento da agregação do copolímero, se essas vesículas iriam se romper ou se iriam incorporar a água do meio. Na Figura 49 observamos o leve aumento em relação ao tempo da concentração de material capaz de espalhar luz.

Figura 49 – Análise de formação de vesículas por ARGEN



Fonte: Própria.

O tempo de duração total da análise foi de 30 minutos. Por meio do gráfico, é possível observar um aumento da intensidade dos sinais das vesículas entre 20 e 25 minutos. A partir desse tempo, há um aumento do espalhamento de luz identificado pelo equipamento (eixo y). Se as vesículas estivessem se rompendo, a intensidade diminuiria e se estivessem se mantendo do mesmo tamanho, ela se manteria. Esse espalhamento também indica indiretamente o Mw normalizado que, devido à maior agregação que faz com que a média de massa molar das partículas aumente.

5.2.5 PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃

Os trabalhos com o copolímero PS₁₇₁-*b*-PAA₆₃₂ tiveram que ser encerrados devido a pandemia, porém ainda havia a curiosidade de se explorar mais um material de composição diferente dos sintetizados anteriormente quanto a formação de coloides compatíveis com vesículas. O PS₉₈-*b*-PtBA₃₄₃, que após hidrólise se tornou o PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃ não foi sintetizado pela autora desse trabalho, porém ele vinha mostrando excelentes resultados em análises de DLS no grupo. Resolveu-se então testá-lo quanto ao objetivo final do trabalho: encapsulação e liberação de uma molécula hidrofílica.

5.2.5.1 Testes de incorporação – Quantificação de açúcares redutores

Foi realizado um teste de incorporação da enzima invertase. Para a avaliação desse teste, utilizou-se como parâmetro a quantificação de açúcares redutores pelo método de Miller com DNS. Após análise das absorvâncias geradas a partir de diferentes concentrações de glicose em duplicata, foi plotada a curva que está apresentada na Figura 50.

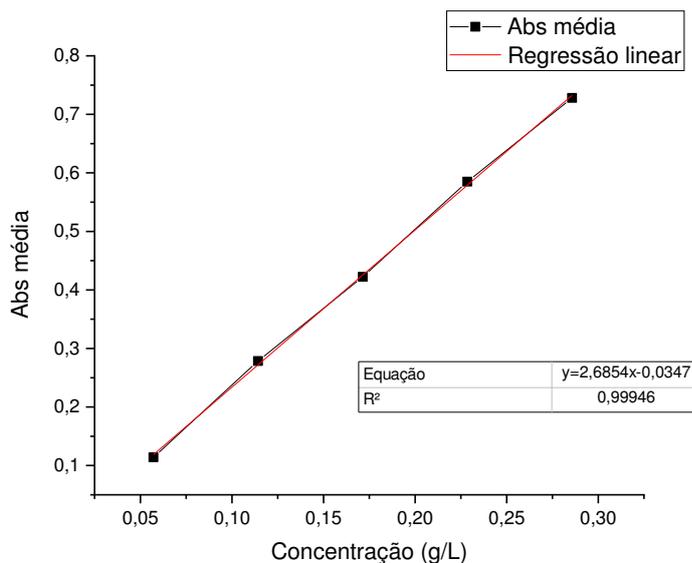
A curva analítica de glicose gerada foi:

$$y = 2,6854x - 0,0347 \quad (\text{Equação 5})$$

Reajustando a Equação 5 e considerando os termos da Equação 4, temos que:

$$\text{Concentração de glicose} = \frac{\text{Abs/min} + 0,0347}{2,6854} \quad (\text{Equação 6})$$

Figura 50 – Curva analítica de glicose gerada a partir das concentrações de glicose pelas absorvâncias obtidas



Fonte: Própria.

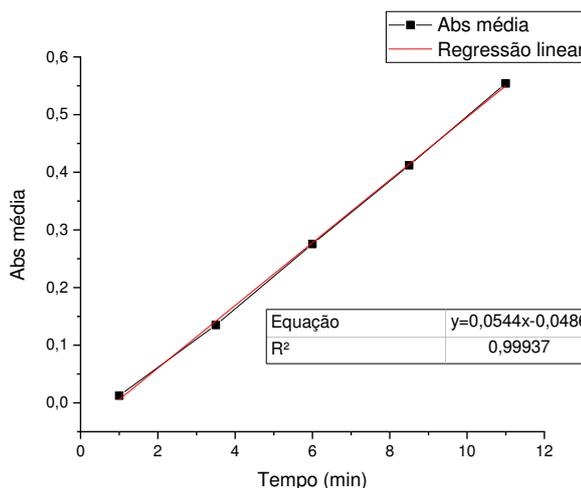
A atividade enzimática diz respeito à taxa da reação catalisada. Para obtenção dessa taxa (atividade), são realizados experimentos cinéticos em que a geração dos produtos (ou desaparecimento dos reagentes) é monitorada no tempo. Neste caso, a geração de açúcares redutores foi determinada em diferentes tempos por meio do método de Miller como DNS. A Tabela 12 mostra esses resultados e, a partir deles, a Figura 51 foi gerada. O coeficiente angular da reta na Figura 51 foi considerado como a taxa da reação e, portanto, utilizado para o cálculo da atividade enzimática.

Tabela 12 – Absorvâncias obtidas para análise da conversão de açúcares redutores pelo tempo pelo método do DNS

Tempo (min)	Abs 1	Abs 2	Abs média	Abs/min
1	0,012	0,013	0,013 ± 0,001	0,013
3,5	0,132	0,138	0,135 ± 0,004	0,039
6	0,269	0,282	0,276 ± 0,009	0,046
8,5	0,409	0,415	0,412 ± 0,004	0,048
11	0,552	0,556	0,554 ± 0,003	0,050

Fonte: Própria.

Figura 51 – Cinética da geração de açúcares redutores pelo tempo, para a determinação da atividade enzimática



Fonte: Própria.

Utilizando o coeficiente angular obtido na curva e substituindo na Equação 6, conclui-se que 1 mg de invertase geraram 0,0332 g de glicose em 1 minuto. Com isso, a atividade da enzima invertase comercial utilizada nesse estudo foi calculada com base nas especificações da enzima pelo fabricante (Sigma Aldrich®). Nelas é dado que 1 unidade (U) de enzima gera 1 μmol de sacarose/min. Portanto, a atividade foi calculada como:

$$\text{Atividade} = \frac{\text{concentração de glicose (g } L^{-1} \text{ min}^{-1})}{180 \text{ g de glicose} \times 10^{-6} \text{ mols de sacarose}} \quad (\text{Equação 7})$$

Utilizando a Equação 7, a atividade enzimática encontrada foi de 184 U. As especificações indicam uma atividade ente 200 e 300 U. O valor pouco abaixo da especificação pode ter sido encontrado devido ao tempo de armazenamento do material e outras variáveis. Porém, com esse resultado, a enzima ainda apresenta uma atividade satisfatória para o estudo.

5.2.5.2 Encapsulamento da invertase em polimerossomos de PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃

Para a análise da atividade enzimática da enzima encapsulada na vesícula de PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃, é necessário que em certo momento essas vesículas sejam rompidas, para a liberação da enzima e a determinação da sua atividade. Para isso, testes foram realizados com os

detergentes Triton X-100 e 1,1-Difenil-eter (DPE), o quais foram adicionados esperando-se romper a membrana da vesícula. Esses detergentes são conhecidos por apresentarem essa ação (GÓRECKI *et al.*, 2021). A quantidade de detergente foi testada para ser suficiente para o rompimento da membrana, mas sem que houvesse desnaturação da enzima pelo detergente. Usando-se DLS, a queda no diâmetro hidrodinâmico com o acréscimo de detergente pode indicar ruptura de parte das vesículas.

Inicialmente fez-se testes com a vesícula encapsulando apenas solução tampão e posterior adição do detergente Triton X-100 até 4,4% m/v (Tabela 13). O estudo foi realizado com a finalidade de observar o comportamento da vesícula mediante à adição de detergente, ou seja, se esse romperia a membrana ou não. Ao final, percebeu-se uma redução de 41,3% no DH médio das vesículas.

Tabela 13 – Efeito da adição de detergente Triton-X100 no diâmetro hidrodinâmico em vesículas de PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃.

Concentração detergente (%m./v)	D _H médio (nm)	<i>D</i> média
0	522 ± 153	0,379
0,625	450 ± 71	0,383
1,25	422 ± 20	0,240
1,875	412 ± 109	0,389
2,5	472, ± 129	0,298
4,375	306 ± 99	0,250

Fonte: Própria.

Em seguida, foi avaliada a atividade enzimática da solução de enzima com adição de diferentes concentrações dos detergentes Triton X-100 e DPE para verificar quais concentrações de tensoativos poderiam ser usadas sem que houvesse desnaturação das enzimas. Essas atividades foram medidas em diferentes tempos. Para o cálculo, esse tempo deve ser levado em conta e faz-se a divisão da absorbância por ele, seguindo as Equações 6 e 7. Portanto, observar se havia linearidade no comportamento das enzimas e comparar com os resultados de atividade encontrados ajudaria a estabelecer um tempo ótimo de reação para as demais análises e decisões futuras. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 14. A partir desses dados, foram confeccionados os gráficos da Figura 52 que, considerando apenas as absorbâncias, mostra que os materiais apresentaram um comportamento linear ao longo da análise. Porém ao realizar o cálculo da atividade, percebe-se que a atividade não é linear,

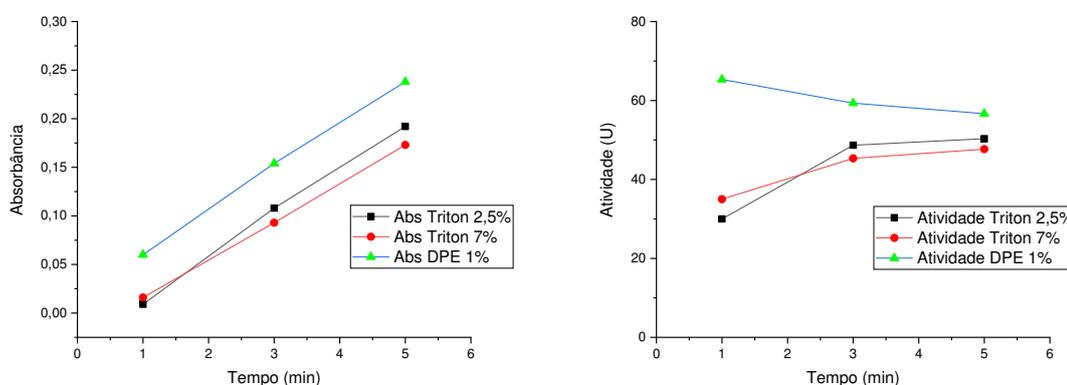
o que é esperado, porque a atividade enzimática tem um valor máximo, ela não é infinita de acordo com o tempo.

Tabela 14 – Análise das atividades enzimáticas após adição dos detergentes Triton X-100 e DPE em solução enzimática

Amostra	Abs			Atividade (U)		
	1 min	3 min	5 min	1 min	3 min	5 min
Triton 2,5%	0,009	0,108	0,192	30	49	50
Triton 7%	0,016	0,093	0,173	35	45	47
DPE 1%	0,060	0,154	0,238	65	59	56

Fonte: Própria.

Figura 52 – Curvas de absorbâncias e atividades enzimáticas calculadas a partir da análise de açúcares redutores das enzimas com adição de detergentes



Fonte: Própria.

A partir da Tabela 14 e da Figura 52 pode se observar que as atividades enzimáticas para cada detergente e sua respectiva concentração apresentaram comportamentos diferentes. O DPE 1% em 1 minuto atingiu uma atividade enzimática cerca de 50% superior aos demais. Esse surfactante pode ter causado desnaturação das enzimas ou estar afetando a leitura da absorbância no equipamento e, isso justificaria a queda da atividade nos tempos seguintes, tornando-o incompatível com esse sistema. Para o Triton 2,5 e 7%, o aumento da atividade foi gradativo ao longo do tempo de análise e isso indicaria que houve uma liberação constante do conteúdo aprisionado. O Triton já vem sendo empregado em alguns estudos com copolímeros (GÓRECKI *et al.*, 2021; ROTTET *et al.*, 2020). Com esses dados, concluímos que, dentre as opções estudadas nesse trabalho, o detergente Triton X-100 seria mais adequado para o rompimento das vesículas e, uma vez que houve pouca variação entre

as concentrações empregadas, uma concentração entre 2,5 e 7% pode produzir resultados satisfatórios.

Também foram realizados testes para a determinação do efeito do Triton X-100 e do DPE no diâmetro hidrodinâmico das partículas da solução de enzimas, os dados estão apresentados nas Tabelas 15 e 16. Altas concentrações desses detergentes geralmente levam à desnaturação proteica e, neste caso, conseqüente diminuição do tamanho das partículas.

A análise das Tabelas 15 e 16 mostra que com cerca de 2,6% de Triton X-100, houve uma redução de 51,9% no DH médio das partículas da amostra. Para os testes com o detergente DPE, com apenas 0,85% de detergente, já houve uma queda de 64,8% no D_H médio.

Tabela 15 – Teste de adição de detergente Triton-X100 em solução enzimática

Concentração (%m./v)	DH1	DH2	DH3	DH Médio (nm)	Count Rate (kcounts/s)
0,00	128	130	116	125 ± 7	36
0,85	100	119	94	104 ± 13	81
2,55	63	53	65	60 ± 6	160
4,25	56	58	51	55 ± 4	239
7,65	13	13	13	13 ± 0	281
9,35	16	16	16	16 ± 0	389

Fonte: Própria.

Tabela 16 – Teste de adição de detergente DPE em solução enzimática

Concentração (%m./v)	DH1	DH2	DH3	DH Médio (nm)	Count Rate (kcounts/s)
0,00	128	130	116	125 ± 7	36
0,85	42	47	42	44 ± 2	89
1,70	33	32	32	32 ± 1	156
2,55	26	27	30	28 ± 2	215
2,55	25	25	27	26 ± 1	237

Fonte: Própria.

Apesar do diâmetro hidrodinâmico inicial das enzimas apresentado nas Tabelas 15 e 16 ser menor do que os das Tabelas 13 e 17, ele é alto para o tamanho esperado da enzima invertase. Provavelmente essa estrutura gera uma interferência no espalhamento de luz dinâmico. As medidas das Tabelas 15 e 16 não são absolutas e não se pode afirmar que os

diâmetros sejam de fato em torno de 128 nm, mas o objetivo principal dessa análise foi o comparativo dessas partículas entre elas mesmas. Então, mesmo que indiretamente, os percentuais de queda dos diâmetros são análises válidas para observar o efeito dos detergentes sobre as enzimas.

Também foi feito o estudo com a solução contendo enzima encapsulada e adição dos detergentes Triton-X100 e DPE para observar se a vesícula era capaz de proteger a enzima de uma desnaturação causada pelo detergente. Os resultados estão na Tabela 17.

Tabela 17 – Teste de adição dos detergentes Triton X-100 e DPE em vesículas contendo solução enzimática

Amostra	DH Médio (nm)	Média	Count Rate (kcounts/s)
Vesícula sem detergente	218 ± 3	224	1400
Vesícula sem detergente (2)	229 ± 5		890
Triton 3,4%	179 ± 6		875
Triton 5,1%	167 ± 3		872
DPE 1,7%	197 ± 1		575
DPE 3,4%	94 ± 5		541

Fonte: Própria.

Com 5,1% de Triton, reduziu-se 25,3% o DH médio das vesículas. Já para a concentração de 3,4% de DPE, houve uma redução de 58% no DH médio. Esses resultados indicam que o DPE apresenta um efeito muito grande na redução do DH médio e o Triton apresenta um efeito menor, porém também apresenta. Essa queda no diâmetro hidrodinâmico pode indicar indiretamente rompimento das membranas das vesículas. Esse rompimento que garante a liberação do conteúdo encapsulado e será estudado no tópico a seguir.

5.2.5.3 Rompimento de vesículas - Atividade enzimática e DLS

Como descrito no item 4.8, uma solução contendo vesículas do copolímero PS98-b-PAA343 foi separada em três amostras: “Vesículas lavadas”: contendo vesículas com enzima encapsuladas; “Tampão de lavagem”: material rico em enzimas que não foram aprisionadas nas vesículas e “Vesículas rompidas”: vesículas que apresentavam enzima encapsulada e foram rompidas pela adição de detergente Triton X-100 na concentração de

3,5% (m/v). As absorbâncias foram lidas após um tempo de incubação de 5,5 min e a atividade enzimática calculada a partir delas está apresentada na Tabela 18.

Tabela 18 – Atividade enzimática das vesículas contendo enzima aprisionada, do tampão contendo enzimas livres e de vesículas rompidas com Triton 3,5%

	Absorbância		Abs Média	Atividade (U)
	1ª Duplicata	2ª Duplicata		
Vesículas lavadas	0,005	0,007	0,006 ± 0,001	14
Tampão de lavagem	0,061	0,081	0,071 ± 0,014	18
Vesículas rompidas	0,012	0,019	0,016 ± 0,005	15

Fonte: Própria.

Por meio da Equação 7, a atividade enzimática para as Vesículas lavadas foi de 14 U. Para o tampão de lavagem, foi de 18 U. Já para as vesículas rompidas, 15 U. As amostras Vesículas lavadas e Tampão de lavagem são o mesmo material que foi filtrado e originou as duas frações. A soma delas foi 32 U. As Vesículas rompidas são as Vesículas lavadas após adição do detergente. Na atividade das Vesículas lavadas para as Vesículas rompidas, houve um leve crescimento na atividade de 1 U. Mesmo sendo um crescimento pequeno, considerando que o conteúdo é aprisionado em vesículas de escala nanométrica, ou seja, em áreas muito pequenas, isso indicou que o tensoativo Triton X-100 foi efetivo no rompimento do copolímero anfipático para rompimento das vesículas formadas.

As análises de DLS apresentadas na Tabela 19 mostram que as Vesículas lavadas apresentam valores médios de diâmetro hidrodinâmico de 294 nm. Esses dados são condizentes com tamanhos de vesículas encontradas na literatura (BELLUATI *et al.*, 2020; GONZATO *et al.*, 2014; IKKENE *et al.*, 2021) e, quando comparados aos valores previamente testados nesse estudo, são próximos. Apesar do procedimento para formação de vesículas e a operadora serem os mesmos, o tamanho das partículas pode ter uma certa variação devido a pequenas diferenças nas condições do experimento, dado que se trata de um sistema fora do equilíbrio (meta-estável). A dispersidade é um dado que indica a distribuição dos tamanhos de partículas, quanto mais próxima ela for de 0, há maior uniformidade entre os valores. Nas Vesículas lavadas elas apresentam uma média de 0,200. O *count rate* por sua vez, indica a quantidade de partículas no meio por tamanho, quanto mais alto, maior a quantidade de vesículas presentes, mais concentrado é o meio. O valor encontrado foi de 516 kcounts/s.

Para o tampão de lavagem esses valores para o diâmetro hidrodinâmico foram próximos aos das Vesículas lavadas, de 305 nm. A dispersidade também foi próxima, de 0,243. Mas o fator mais interessante de ser analisado nesse caso foi o *count rate* 90% menor (54 kcounts/s) que o das Vesículas lavadas. Esse parâmetro indica que podem ter passado algumas vesículas pela membrana filtrante, porém a quantidade foi muito baixa e a maior parte do material ficou retido.

Já para as Vesículas rompidas, o diâmetro hidrodinâmico em relação às Vesículas lavadas caiu 60% para 120 nm. \bar{D} aumentou para 0,358 e o *count rate* ficou próximo das Vesículas lavadas, em 484 kcounts/s. \bar{D} aumentou porque algumas vesículas podem não ter sido rompidas ou o material pode ter se auto agregado novamente de outras formas (o que também explica a pouca variação do *count rate*), como micelas. A queda nos valores do diâmetro hidrodinâmico reforça essa afirmação. Em seus estudos com lipopolimerossomos híbridos, Nam *et al.* (2012) perceberam que o Triton X-100 em concentrações acima de 2% é capaz de desintegrar a barreira da membrana, formando buracos e fazendo com que haja permeação de materiais. Rottet *et al.* (2020) e Górecki *et al.* (2021) estudaram a ação do mesmo detergente em copolímeros e perceberam a desestabilização da estrutura da membrana ao utilizá-lo. Em todos esses estudos é citado que a ação do Triton X-100 é rápida e que a estrutura lamelar dos polimerossomos pode muitas vezes se auto conformar em micelas.

Tabela 19 - Análise dos diâmetros hidrodinâmicos da vesícula contendo enzima aprisionada, do tampão contendo enzimas livres e da vesícula estourada com Triton 3,5%

	Replicata	DH med (nm)	\bar{D}	Count Rate (kcounts/s)
Vesículas lavadas	1	299 ± 12	0,202	530
	2	290 ± 2	0,197	503
Tampão de lavagem	1	298 ± 3	0,233	53
	2	311 ± 2	0,252	5
Vesículas rompidas	1	127 ± 8	0,349	501
	2	113 ± 8	0,366	467

Fonte: Própria.

Os testes de rompimento de vesículas foram repetidos de forma análoga para confirmação dos resultados. Na Tabela 20 podemos observar similaridade dos dados em relação aos da Tabela 18.

Tabela 20 – Atividade enzimática das vesículas contendo enzima aprisionada, do tampão contendo enzimas livres e de vesículas rompidas com Triton 3,5%

	Absorbância		Abs Média	Atividade (U)
	1ª Duplicata*	2ª Duplicata*		
Vesículas lavadas	0,056	0,035	0,045 ± 0,015	17
Tampão de lavagem	0,093	0,084	0,089 ± 0,006	20
Vesículas rompidas**	0,065/0,057	0,071/0,060	0,063 ± 0,006	18

* Replicata de preparação diferente

** Análise em duplicata

Fonte: Própria.

Novamente as vesículas lavadas e o tampão de lavagem são provenientes do mesmo material que foi filtrado e originou as partes, a soma das atividades delas foi 37 U. Na atividade das vesículas lavadas para as rompidas também houve um crescimento de 1 U. Esse aumento é relativamente baixo. Provavelmente houve perda de atividade pela sensibilidade da enzima. Porém deve-se ressaltar que em ambas as análises houve aumento da atividade enzimática após o rompimento da vesícula com o detergente. Considerando que a área interna das vesículas é extremamente pequena.

Também foi realizada novamente a análise do tamanho das partículas por meio do diâmetro hidrodinâmico por DLS. Os resultados estão na Tabela 21. Quando se analisa as Vesículas lavadas nota-se uma variação entre os diâmetros hidrodinâmicos e também na variação das absorbâncias na Tabela 20. Em ambas as análises houve um leve aumento da atividade que não foi proporcional aos diâmetros.

Tabela 21 – Segunda análise dos diâmetros hidrodinâmicos da vesícula contendo enzima aprisionada, do tampão contendo enzimas livres e da vesícula estourada com Triton 3,5%

			Replicata	DH med (nm)	\bar{D}	Count Rate (kcounts/s)
Vesículas enzimática	com	solução	1	252 ± 48	0,276	41
			2	130 ± 5	0,278	34
Vesículas lavadas			1	349 ± 25	0,284	40
			2	108 ± 1	0,354	9
Tampão de lavagem			1	747 ± 76	0,363	45
			2	110 ± 10	0,327	10
Vesículas rompidas			1	12 ± 1	0,172	219
			2	13 ± 3	0,136	216

Fonte: Própria.

Como foi dito anteriormente, a análise foi realizada com enzimas que são sensíveis e podem perder atividade ao longo do processo. Existem também variações ao longo da confecção das vesículas, por ser um procedimento manual, não haver equipamento que a faça e conter o erro do operador e condições externas (como temperatura) que afetam o seu desenvolvimento. Ainda assim, os resultados se mostraram promissores e satisfatórios. Foram reprodutíveis e os métodos empregados podem ser repetidos em pesquisas futuras.

Os estudos confirmaram a confecção de vesículas visualmente e por meio de testes de encapsulação. As variações de tamanhos de partículas ocorreram, porém mantiveram padrões de acordo com o material ou análise efetuada.

6 CONCLUSÕES

Polímeros em bloco anfífilos foram sintetizados via RAFT e caracterizados por GPC, RMN e FTIR. Por meio das caracterizações foi possível gerar blocos e apresentar as proporções entre eles. A partir dos copolímeros PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₈₆, P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇ e de PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃ foram produzidas vesículas, em diferentes meios, que foram caracterizadas por DLS. Para o copolímero PDMAEMA₂₇₇-*b*-PS₃₁₇, o uso da técnica de Espectroscopia UV/Vis e de um agente redutor, permitiu observar a diferença do comportamento de materiais encapsulados por vesículas em relação aos não encapsulados, apresentando maior resistência à ação do agente redutor. Foram obtidas imagens de microscopia TEM com o P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇, por meio das quais pôde se observar a conformação vesicular do material. Foram realizados testes com enzimas encapsuladas em de PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃ e esses confirmaram o aprisionamento da invertase na vesícula formada, além de mostrar que o sistema foi capaz de liberar o conteúdo encapsulado quando desejado. Por fim, o material PS₁₇₁-*b*-PtBA₆₃₂ foi sintetizado, monitorado por ACOMP e caracterizado quanto à formação de vesículas por DLS e ACM. Todo o trabalho foi concluído apesar das interrupções devido à COVID-19.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As sugestões para trabalhos futuros foram estabelecidas de acordo com o que foi realizado nessa tese, visando aplicações futuras dos polimerossomos como nanorreatores:

- Testes de incorporação de enzimas com outros copolímeros sintetizados;
- Incorporação de outras enzimas, além da invertase;
- Incorporação de outras moléculas;
- Testes de resposta aos estímulos como temperatura e pH para todos os copolímeros sintetizados.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. M. R.; FONSECA, A. C.; ROCHA, N. M. P.; GUTHRIE, J. T.; SERRA, A. C.; COELHO, J. F. J. Poly(Vinyl Chloride): Current Status and Future Perspectives via Reversible Deactivation Radical Polymerization Methods. **Progress in Polymer Science**, v. 87, p. 34–69, Dec. 2018.
- ALB, A. M.; DRENSKI, M. F.; REED, W. F. Automatic Continuous Online Monitoring of Polymerization Reactions (ACOMP). **Polymer International**, v. 57, n. 3, p. 390–396, 2008.
- AMARAL, L. Q. do. Supramolecular Aggregates: Hardness Plus Softness. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4233, Jan. 2021.
- APOLINÁRIO, A. C.; PACHIONI-VASCONCELOS, J. A.; PESSOA JR., A.; RANGEL YAGUI, C. O. Polimerossomos versus lipossomos: a evolução da “Bala Mágica”. **Química Nova**, 15 maio 2017. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6602&nomeArquivo=RV20160593.pdf. Acesso em: 10 set. 2021.
- ARRABITO, G.; FERRARA, V.; BONASERA, A.; PIGNATARO, B. Artificial Biosystems by Printing Biology. **Small**, v. 16, n. 27, p. 1907691, 2020.
- ATZET, S.; CURTIN, S.; TRINH, P.; BRYANT, S.; RATNER, B. Degradable Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate)-Co-Polycaprolactone Hydrogels for Tissue Engineering Scaffolds. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 12, p. 3370–3377, Dec. 2008.
- BABIN, J.; PELLETIER, M.; LEPAGE, M.; ALLARD, J.-F.; MORRIS, D.; ZHAO, Y. A New Two-Photon-Sensitive Block Copolymer Nanocarrier. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 18, p. 3329–3332, 2009.
- BARNER-KOWOLLIK, C. **Handbook of RAFT Polymerization**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008. 560 p.
- BASINA, G.; MOUNTRICHAS, G.; DEVLIN, E.; BOUKOS, N.; NIARCHOS, D.; PETRIDIS, D.; PISPAS, S.; TZITZIOS, V. Synthesis and Magnetic Properties of Fe₃O₄ Nanoparticles Coated with Biocompatible Double Hydrophilic Block Copolymer. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 8, p. 4753–4759, Aug. 2009.
- BELLUATI, A.; THAMBOO, S.; NAJER, A.; MAFFEIS, V.; VON PLANTA, C.; CRACIUN, I.; PALIVAN, C. G.; MEIER, W. Multicompartment Polymer Vesicles with

Artificial Organelles for Signal-Triggered Cascade Reactions Including Cytoskeleton Formation. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 32, p. 2002949, 2020.

BHUSHAN, V.; HEITZ, M. P.; BAKER, G. A.; PANDEY, S. Ionic Liquid-Controlled Shape Transformation of Spherical to Nonspherical Polymersomes via Hierarchical Self-Assembly of a Diblock Copolymer. **Langmuir**, v. 37, n. 16, p. 5081–5088, Apr. 2021.

BLANAZS, A.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and Their Biological Applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, n. 4–5, p. 267–277, Feb. 2009.

BLEUL, R.; THIERMANN, R.; MASKOS, M. Techniques To Control Polymersome Size. **Macromolecules**, v. 48, n. 20, p. 7396–7409, Oct. 2015.

BRINKHUIS, R. P.; RUTJES, F. P. J. T.; VAN HEST, J. C. M. Polymeric Vesicles in Biomedical Applications. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 7, p. 1449, 2011.

BROZ, P.; DRIAMOV, S.; ZIEGLER, J.; BEN-HAIM, N.; MARSCH, S.; MEIER, W.; HUNZIKER, P. Toward Intelligent Nanosize Bioreactors: A pH-Switchable, Channel-Equipped, Functional Polymer Nanocontainer. **Nano Letters**, v. 6, n. 10, p. 2349–2353, Oct. 2006.

BUENO, C. Z.; APOLINÁRIO, A. C.; DURO-CASTANO, A.; POMA, A.; PESSOA, A.; RANGEL-YAGUI, C. O.; BATTAGLIA, G. l-Asparaginase Encapsulation into Asymmetric Permeable Polymersomes. **ACS Macro Letters**, v. 9, n. 10, p. 1471–1477, Oct. 2020.

CANEVAROLO JR, S. V. Técnicas de caracterização de polímeros. **Artliber, São Paulo**, v. 430, n. 2004, 2004.

CERRITELLI, S.; VELLUTO, D.; HUBBELL, J. A. PEG-SS-PPS: Reduction-Sensitive Disulfide Block Copolymer Vesicles for Intracellular Drug Delivery. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1966–1972, June 2007.

CHAKRABORTY, K.; KHATUA, P.; SHINODA, W.; LOVERDE, S. M. Domain Formation in Charged Polymer Vesicles. **Macromolecules**, v. 54, n. 20, p. 9258–9267, Oct. 2021.

CHANDRAWATI, R.; CARUSO, F. Biomimetic Liposome- and Polymersome-Based Multicompartmentalized Assemblies. **Langmuir**, v. 28, n. 39, p. 13798–13807, Oct. 2012.

CHANG, H.-Y.; SHENG, Y.-J.; TSAO, H.-K. Structural and Mechanical Characteristics of Polymersomes. **Soft Matter**, v. 10, n. 34, p. 6373–6381, Aug. 2014.

CHEN, A. H.; SILVER, P. A. Designing Biological Compartmentalization. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 12, p. 662–670, Dec. 2012.

CHOI, H.-J.; MONTEMAGNO, C. D. Artificial Organelle: ATP Synthesis from Cellular Mimetic Polymersomes. **Nano Letters**, v. 5, n. 12, p. 2538–2542, Dec. 2005.

CIRPAN, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; HEPUZER, Y.; YAGCI, Y. Immobilization of Invertase in Conducting Copolymers of 3-Methylthienyl Methacrylate. **Bioelectrochemistry**, v. 59, n. 1, p. 29–33, Apr. 2003.

DAVIS, C.; SKRTIC, D. Determination of Leachable Components from an Experimental Endodontic Sealer by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. **Stomatoloski glasnik Srbije**, v. 58, Jan. 2011.

DAVIS, K. A.; MATYJASZEWSKI, K. Atom Transfer Radical Polymerization of *Tert*-Butyl Acrylate and Preparation of Block Copolymers. **Macromolecules**, v. 33, n. 11, p. 4039–4047, May 2000.

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, Aug. 2012.

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

DISCHER, D. E. Polymer Vesicles. **Science**, v. 297, n. 5583, p. 967–973, Aug. 2002.

DISCHER, D. E.; AHMED, F. Polymersomes. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 323–341, 2006.

DU, J.; FAN, L.; LIU, Q. PH-Sensitive Block Copolymer Vesicles with Variable Trigger Points for Drug Delivery. **Macromolecules**, v. 45, n. 20, p. 8275–8283, Oct. 2012.

DU, J.; O'REILLY, R. K. Advances and Challenges in Smart and Functional Polymer Vesicles. **Soft Matter**, v. 5, n. 19, p. 3544, 2009.

DUARTE, L. J. N.; CANSELIER, J. P. Extração no ponto nuvem de compostos orgânicos homólogos e isômeros. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 426–432, Jun. 2005.

FLORENZANO, F. H. Perspectivas atuais para a obtenção controlada de polímeros e sua caracterização. **Polímeros**, v. 18, n. 2, p. 100–105, Jun. 2008.

FONG, W.-K.; SÁNCHEZ-FERRER, A.; GIOVANNI ORTELLI, F.; SUN, W.; J. BOYD, B.; MEZZENGA, R. Dynamic Formation of Nanostructured Particles from Vesicles via Invertase Hydrolysis for On-Demand Delivery. **RSC Advances**, v. 7, n. 8, p. 4368–4377, 2017.

GELBART, W. M.; BEN-SHAUL, A.; ROUX, D. **Micelles, Membranes, Microemulsions, and Monolayers**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012. 620 p.

GENTEKOS, D. T.; DUPUIS, L. N.; FORS, B. P. **Beyond Dispersity: Deterministic Control of Polymer Molecular Weight Distribution**. rapid-communication. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jacs.5b13565>. Acesso em: 30 set. 2021.

GODY, G.; MASCHMEYER, T.; ZETTERLUND, P. B.; PERRIER, S. Pushing the Limit of the RAFT Process: Multiblock Copolymers by One-Pot Rapid Multiple Chain Extensions at Full Monomer Conversion. **Macromolecules**, v. 47, n. 10, p. 3451–3460, May 2014.

GONZATO, C.; SEMSARILAR, M.; JONES, E. R.; LI, F.; KROOSHOF, G. J. P.; WYMAN, P.; MYKHAYLYK, O. O.; TUINIER, R.; ARMES, S. P. Rational Synthesis of Low-Polydispersity Block Copolymer Vesicles in Concentrated Solution via Polymerization-Induced Self-Assembly. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 31, p. 11100–11106, Aug. 2014.

GÓRECKI, R.; ANTENUCCI, F.; NORINKEVICIUS, K.; ELMSTRØM CHRISTIANSEN, L.; MYERS, S. T.; TRZASKUŚ, K.; HÉLIX-NIELSEN, C. Effect of Detergents on Morphology, Size Distribution, and Concentration of Copolymer-Based Polymersomes. **Langmuir**, v. 37, n. 6, p. 2079–2090, Feb. 2021.

HAMLEY, I. W. Nanostructure Fabrication Using Block Copolymers. **Nanotechnology**, v. 14, n. 10, p. R39–R54, Oct. 2003.

HIGUCHI, T.; YABU, H.; SHIMOMURA, M. Differences of Internal Structures Between Amphiphilic and Hydrophobic Block-Copolymer Nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 856–858, Mar. 2007.

HOCINE, S.; LI, M.-H. Thermoresponsive Self-Assembled Polymer Colloids in Water. **Soft Matter**, v. 9, n. 25, p. 5839–5861, June 2013.

HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.

HUANG, X.; XIAO, Y.; LANG, M. Synthesis of star-shaped PCL-based copolymers via one-pot ATRP and their self-assembly behavior in aqueous solution. **Macromolecular Research**, v. 20, p. 597–604, June 2012.

IKKENE, D.; ARTENI, A. A.; OULDALI, M.; FRANCIUS, G.; BRÛLET, A.; SIX, J.-L.; FERJI, K. Direct Access to Polysaccharide-Based Vesicles with a Tunable Membrane Thickness in a Large Concentration Window via Polymerization-Induced Self-Assembly. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 7, p. 3128–3137, July 2021.

MALVERN PANALYTICAL, 2014. **Influence of Concentration Effects and Particle Interactions on DLS Analysis of Bioformulations**. Disponível em: <https://www.newsmedical.net/whitepaper/20141218/Influence-of-Concentration-Effects-and-Particle-Interactions-on-DLS-Analysis-of-Bioformulations.aspx>. Acesso em: 3 jul. 2022.

ITEL, F.; CHAMI, M.; NAJER, A.; LÖRCHER, S.; WU, D.; DINU, I. A.; MEIER, W. Molecular Organization and Dynamics in Polymersome Membranes: A Lateral Diffusion Study. **Macromolecules**, v. 47, n. 21, p. 7588–7596, Nov. 2014.

JIANG, F.; CHEN, S.; CAO, Z.; WANG, G. A Photo, Temperature, and PH Responsive Spiropyran-Functionalized Polymer: Synthesis, Self-Assembly and Controlled Release. **Polymer**, v. 83, p. 85–91, Jan. 2016.

JIANG, X.; LOK, M. C.; HENNINK, W. E. Degradable-Brushed pHEMA–pDMAEMA Synthesized via ATRP and Click Chemistry for Gene Delivery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 2077–2084, Nov. 2007.

KHAN, I.; KHAN, M.; UMAR, M. N.; OH, D. Nanobiotechnology and Its Applications in Drug Delivery System: A Review. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 6, p. 396–400, Dec. 2015.

KIM, E.-M.; JEONG, H.-J. Liposomes: Biomedical Applications. **Chonnam Medical Journal**, v. 57, n. 1, p. 27–35, Jan. 2021.

KIM, K. T.; CORNELISSEN, J. J. L. M.; NOLTE, R. J. M.; VAN HEST, J. C. M. A Polymersome Nanoreactor with Controllable Permeability Induced by Stimuli-Responsive Block Copolymers. **Advanced Materials**, v. 21, n. 27, p. 2787–2791, July 2009.

KITA-TOKARCZYK, K.; GRUMELARD, J.; HAEFELE, T.; MEIER, W. Block Copolymer Vesicles—Using Concepts from Polymer Chemistry to Mimic Biomembranes. **Polymer**, v. 46, n. 11, p. 3540–3563, May 2005.

KUMAR, S.; SARITA; NEHRA, M.; DILBAGHI, N.; TANKESHWAR, K.; KIM, K.-H. Recent Advances and Remaining Challenges for Polymeric Nanocomposites in Healthcare Applications. **Progress in Polymer Science**, v. 80, p. 1–38, May 2018.

LAURENTI, M.; GROCHOWICZ, M.; VALENTINA, C. Porous ZnO/2-Hydroxyethyl Methacrylate Eluting Coatings for Ureteral Stent Applications. **Coatings**, v. 8, p. 376, Oct 2018.

LEONG, J.; TEO, J. Y.; AAKALU, V. K.; YANG, Y. Y.; KONG, H. Engineering Polymersomes for Diagnostics and Therapy. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 8, p. e1701276, Apr. 2018.

LIAO, J.; WANG, C.; WANG, Y.; LUO, F.; QIAN, Z. Recent Advances in Formation, Properties, and Applications of Polymersomes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 23, p. 3432–3441, Aug. 2012.

LIU, Q.; YU, Z.; NI, P. Micellization and Applications of Narrow-Distribution Poly[2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate]. **Colloid and Polymer Science**, v. 282, n. 4, p. 387–393, Feb. 2004.

LÓPEZ-PÉREZ, P. M.; DA SILVA, R. M. P.; PASHKULEVA, I.; PARRA, F.; REIS, R. L.; SAN ROMAN, J. Hydrophobic–Electrostatic Balance Driving the LCST Offset Aggregation–Redissolution Behavior of N-Alkylacrylamide-Based Ionic Terpolymers. **Langmuir**, v. 26, n. 8, p. 5934–5941, Apr. 2010.

MA, Q.; WOOLEY, K. L. The Preparation of T-Butyl Acrylate, Methyl Acrylate, and Styrene Block Copolymers by Atom Transfer Radical Polymerization: Precursors to Amphiphilic and Hydrophilic Block Copolymers and Conversion to Complex Nanostructured Materials. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 38, n. S1, p. 4805–4820, 2000.

MARQUEZ, L. D. S. P. Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Química)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MARTINO, C.; KIM, S.-H.; HORSFALL, L.; ABBASPOURRAD, A.; ROSSER, S. J.; COOPER, J.; WEITZ, D. A. Protein Expression, Aggregation, and Triggered Release from Polymersomes as Artificial Cell-like Structures. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 26, p. 6416–6420, June 2012.

MASON, A. F.; THORDARSON, P. Polymersomes as Proto-cellular Constructs. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 3817–3825, 2017.

MASON, A. F.; YEWDALL, N. A.; WELZEN, P. L. W.; SHAO, J.; VAN STEVENDAAL, M.; VAN HEST, J. C. M.; WILLIAMS, D. S.; ABDELMOHSEN, L. K. E. A. Mimicking Cellular Compartmentalization in a Hierarchical Protocell through Spontaneous Spatial Organization. **ACS Central Science**, v. 5, n. 8, p. 1360–1365, Aug. 2019.

MATYJASZEWSKI, K.; DAVIS, T. P. **Handbook of Radical Polymerization**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2003. 935 p.

MATYJASZEWSKI, K.; SPANSWICK, J. Controlled/Living Radical Polymerization. **Materials Today**, v. 8, n. 3, p. 26–33, Mar. 2005.

MATYJASZEWSKI, K.; XIA, J. Atom Transfer Radical Polymerization. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 9, p. 2921–2990, Sept. 2001.

MCKEE, M. G.; HUNLEY, M. T.; LAYMAN, J. M.; LONG, T. E. Solution Rheological Behavior and Electrospinning of Cationic Polyelectrolytes. **Macromolecules**, v. 39, n. 2, p. 575–583, Jan. 2006.

MESSAGER, L.; GAITZSCH, J.; CHIERICO, L.; BATTAGLIA, G. Novel Aspects of Encapsulation and Delivery Using Polymersomes. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 18, p. 104–111, Oct. 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process. **Australian Journal of Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 379, 2005.

NADEEM, H.; RASHID, M. H.; SIDDIQUE, M. H.; AZEEM, F.; MUZAMMIL, S.; JAVED, M. R.; ALI, M. A.; RASUL, I.; RIAZ, M. Microbial Invertases: A Review on Kinetics, Thermodynamics, Physiochemical Properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1202–1210, Aug. 2015.

NAM, J.; VANDERLICK, T. K.; BEALES, P. A. Formation and Dissolution of Phospholipid Domains with Varying Textures in Hybrid Lipo-Polymersomes. **Soft Matter**, v. 8, n. 30, p. 7982, 2012.

OLTRA, N. S.; NAIR, P.; DISCHER, D. E. From Stealthy Polymersomes and Filomicelles to “Self” Peptide-Nanoparticles for Cancer Therapy. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 5, n. 1, p. 281–299, June 2014.

OSVÁTH, Z.; IVÁN, B. The Dependence of the Cloud Point, Clearing Point, and Hysteresis of Poly(N-Isopropylacrylamide) on Experimental Conditions: The Need for Standardization of Thermoresponsive Transition Determinations. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 218, n. 4, p. 1600470, 2017.

ÖZTOP, H. N.; AKYILDIZ, F.; SARAYDIN, D. Poly(Acrylamide/Vinylsulfonic Acid) Hydrogel for Invertase Immobilization. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 12, p. 1487–1498, 2020.

PALIVAN, C. G.; FISCHER-ONACA, O.; DELCEA, M.; ITEL, F.; MEIER, W. Protein–Polymer Nanoreactors for Medical Applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2800–2823, Mar. 2012.

PALIVAN, C. G.; GOERS, R.; NAJER, A.; ZHANG, X.; CAR, A.; MEIER, W. Bioinspired Polymer Vesicles and Membranes for Biological and Medical Applications. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 2, p. 377–411, 2016.

PANDE, S.; GHOSH, S. K.; NATH, S.; PRAHARAJ, S.; JANA, S.; PANIGRAHI, S.; BASU, S.; PAL, T. Reduction of methylene blue by thiocyanate: kinetic and thermodynamic aspects. **Journal of colloid and interface science**, v. 299, n. 1, p. 421–427, 2006.

PAXTON, W. F.; MCANINCH, P. T.; SHIN, S. H. R.; BRUMBACH, M. T. Adsorption and Fusion of Hybrid Lipid/Polymer Vesicles onto 2D and 3D Surfaces. **Soft Matter**, v. 14, n. 40, p. 8112–8118, 2018.

PETERS, R. J. R. W.; MARGUET, M.; MARAIS, S.; FRAAIJE, M. W.; VAN HEST, J. C. M.; LECOMMANDOUX, S. Cascade Reactions in Multicompartmentalized

Polymersomes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 1, p. 146–150, Jan. 2014.

QIN, S.; GENG, Y.; DISCHER, D. E.; YANG, S. Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly(ethylene oxide)-block-poly(N-isopropylacrylamide). **Advanced Materials**, v. 18, n. 21, p. 2905–2909, 2006.

QUIGLEY, A.; WILLIAMS, D. R. The second virial coefficient as a predictor of protein aggregation propensity: A self-interaction chromatography study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 96, p. 282–290, Oct. 2015.

RAMALINGAM, Murugan et al. (Eds.). Chapter 3 - Bioactive and Biocompatible Polymeric Composites Based on Amorphous Calcium Phosphate. *In*: ANTONUCCI, J.; SKRTIC, D. **Integrated Biomaterials for Biomedical Technology**. John Wiley & Sons, 2012. p 67-120.

R (RAF), B. (Multi)Block Copolymer Synthesis via Controlled Radical Polymerization in Aqueous Dispersions. 2004. Disponível em: [https://research.tue.nl/en/publications/multiblock-copolymer-synthesis-via-controlled-radical-polymerization-in-aqueous-dispersions\(8e662cf6-e785-4802-9651-fbb36739d1ce\).html](https://research.tue.nl/en/publications/multiblock-copolymer-synthesis-via-controlled-radical-polymerization-in-aqueous-dispersions(8e662cf6-e785-4802-9651-fbb36739d1ce).html). Acesso em: 27 ago. 2021.

RIDEAU, E.; DIMOVA, R.; SCHWILLE, P.; WURM, F. R.; LANDFESTER, K. Liposomes and Polymersomes: A Comparative Review towards Cell Mimicking. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 23, p. 8572–8610, 2018.

ROTTET, S.; IQBAL, S.; BEALES, P. A.; LIN, A.; LEE, J.; RUG, M.; SCOTT, C.; CALLAGHAN, R. Characterisation of Hybrid Polymersome Vesicles Containing the Efflux Pumps NaAtm1 or P-Glycoprotein. **Polymers**, v. 12, n. 5, p. 1049, May 2020.

RUDIN, A.; CHOI, P. Polymer Mixtures. *In*: RUDIN, A.; CHOI, P. **The Elements of Polymer Science & Engineering**. 3rd ed. Boston: Academic Press, 2013. Chapter 5, p. 231–274.

SAMSONOVA, O.; PFEIFFER, C.; HELLMUND, M.; MERKEL, O. M.; KISSEL, T. 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, June 2011.

SCHMALJOHANN, D. Thermo- and PH-Responsive Polymers in Drug Delivery☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1655–1670, 30 Dec. 2006.

SELAMPINAR, F.; AKBULUT, U.; ÖZDEN, M. Y.; TOPPARE, L. Immobilization of Invertase in Conducting Polymer Matrices. **Biomaterials**, v. 18, n. 17, p. 1163–1168, Sept. 1997.

SHARMA, A.; PRASHER, P.; ALJABALI, A.; MISHRA, V.; GANDHI, H.; KUMAR, S.; MUTALIK, S.; KUMAR CHELLAPPAN, D.; TAMB UWALA, M.; DUA, K.; KAPOOR, D. Emerging era of “somes”: polymersomes as versatile drug delivery carrier for cancer diagnostics and therapy. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, June 2020.

SHEN, H.; EISENBERG, A. Morphological Phase Diagram for a Ternary System of Block Copolymer PS310-b-PAA52/Dioxane/H₂O. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 44, p. 9473–9487, Nov. 1999.

TANNER, P.; BAUMANN, P.; ENEA, R.; ONACA, O.; PALIVAN, C.; MEIER, W. Polymeric Vesicles: From Drug Carriers to Nanoreactors and Artificial Organelles. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 1039–1049, Oct. 2011.

TEBALDI, M. L.; LEAL, D. A.; MONTORO, S. R.; PETZHOLD, C. Synthesis of Stimuli-Sensitive Copolymers by RAFT Polymerization: Potential Candidates as Drug Delivery Systems. **Materials Research**, v. 17, p. 191–196, Mar. 2014. suppl 1

TONELLI, F. M. P.; RESENDE, R. R. EXPLORANDO A PRIMEIRA CÉLULA ARTIFICIAL COM ORGANELAS FUNCIONAIS. **Nanocell News**, v. 1, n. 7, 20 fev. 2014. Disponível em: <http://www.institutonocell.org.br/explorando-a-primeira-celula-artificial-com-organelas-funcionais/>. Acesso em: 27 ago. 2021.

TROMBINO, S.; CURCIO, F.; CASSANO, R. Chapter 13 - Polymersomes as a promising vehicle for controlled drug delivery. *In*: GAJBHIYE, V.; GAJBHIYE, K. R.; HONG, S. **Stimuli-Responsive Nanocarriers**. [s.l.] Academic Press, 2022. p. 351–366.

UCHEGBU, I. F.; SCHÄTZLEIN, A. G.; CHENG, W. P.; LALATSA, A. (eds.). **Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience**. New York: Springer, 2013.

UNEYAMA, T. Density functional simulation of spontaneous formation of vesicle in block copolymer solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 11, p. 114902, Mar. 2007.

VAN GHELUWE, L.; CHOURPA, I.; GAIGNE, C.; MUNNIER, E. Polymer-Based Smart Drug Delivery Systems for Skin Application and Demonstration of Stimuli-Responsiveness. **Polymers**, v. 13, n. 8, p. 1285, Jan. 2021.

VAN OERS, M.; RUTJES, F.; VAN HEST, J. Cascade Reactions in Nanoreactors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 28, p. 10–16, Aug. 2014.

VARLAS, S.; FOSTER, J. C.; GEORGIU, P. G.; KEOGH, R.; HUSBAND, J. T.; WILLIAMS, D. S.; O'REILLY, R. K. Tuning the Membrane Permeability of Polymersome Nanoreactors Developed by Aqueous Emulsion Polymerization-Induced Self-Assembly. **Nanoscale**, v. 11, n. 26, p. 12643–12654, 2019.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 99–103, Mar. 2016.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51–64, Mar. 2010.

VITOLO, M. ENCAPSULATION OF INVERTASE IN BARIUM ALGINATE BEADS. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 222, Sept. 2019.

VOSLOO, J. J.; DE WET-ROOS, D.; TONGE, M. P.; SANDERSON, R. D. Controlled Free Radical Polymerization in Water-Borne Dispersion Using Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer. **Macromolecules**, v. 35, n. 13, p. 4894–4902, Jun. 2002.

WONG, K. H.; DAVIS, T. P.; BARNER-KOWOLLIK, C.; STENZEL, M. H. Honeycomb Structured Porous Films from Amphiphilic Block Copolymers Prepared via RAFT Polymerization. **Polymer**, v. 48, n. 17, p. 4950–4965, Aug. 2007.

YAO, Z.; CUI, Y.; ZHENG, K.; ZHU, B.; ZHU, L. Composition and Properties of Porous Blend Membranes Containing Tertiary Amine Based Amphiphilic Copolymers with Different Sequence Structures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 437, p. 124–131, Jan. 2015.

YERUSHALMI, R.; SCHERZ, A.; BOOM, M. E. van der; KRAATZ, H.-B. Stimuli Responsive Materials: New Avenues toward Smart Organic Devices. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 42, p. 4480–4487, Oct. 2005.

YIN, J.-J.; WAHID, F.; ZHANG, Q.; TAO, Y.-C.; ZHONG, C.; CHU, L.-Q. Facile Incorporation of Silver Nanoparticles into Quaternized Poly(2-(Dimethylamino)Ethyl Methacrylate) Brushes as Bifunctional Antibacterial Coatings. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 302, n. 6, p. 1700069, 2017.

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, Sept. 2011.

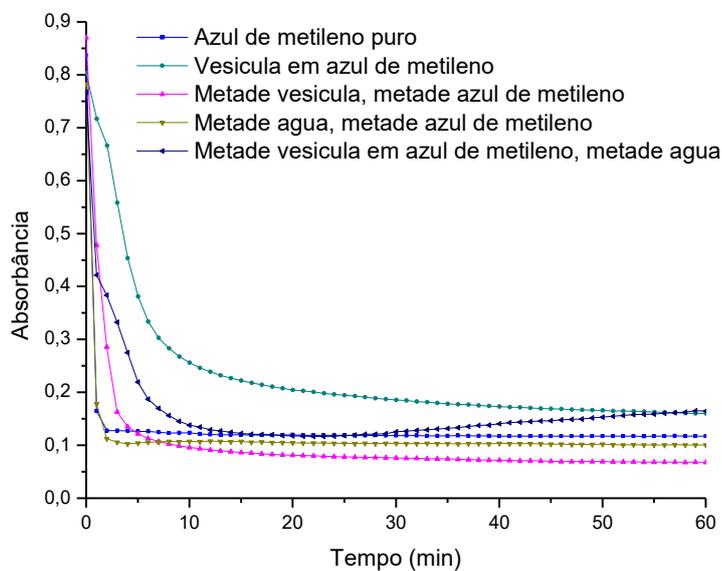
ZHANG, M.; LIU, L.; ZHAO, H.; YANG, Y.; FU, G.; HE, B. Double-Responsive Polymer Brushes on the Surface of Colloid Particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 301, n. 1, p. 85–91, Sept. 2006.

ZHAO, Z.-X.; GAO, S.-Y.; WANG, J.-C.; CHEN, C.-J.; ZHAO, E.-Y.; HOU, W.-J.; ZHU, Y.; GUO, X.; LIU, J.; LI, F.; YANG, D. Emerging Advances of Cell-Free Systems toward Artificial Cells. **Small Methods**, v. 4, n. 10, p. 2000406, 2020.

ZHU, Y.; YANG, B.; CHEN, S.; DU, J. Polymer Vesicles: Mechanism, Preparation, Application, and Responsive Behavior. **Progress in Polymer Science**, v. 64, p. 1–22, Jan. 2017.

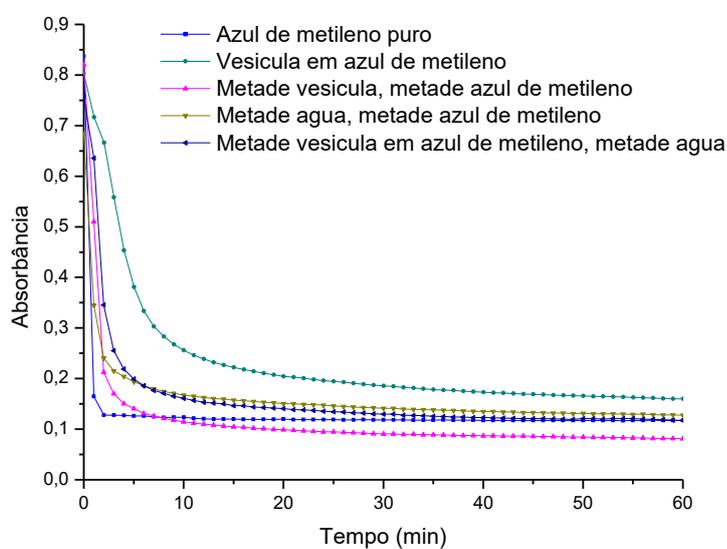
APÊNDICES

APÊNDICE A – Figura do estudo fotométrico da incorporação do azul de metileno frente à ação do agente redutor tiocianato (segunda replicata) em vesículas de PDMAEMA₂₇₇-b-PS₃₁₇



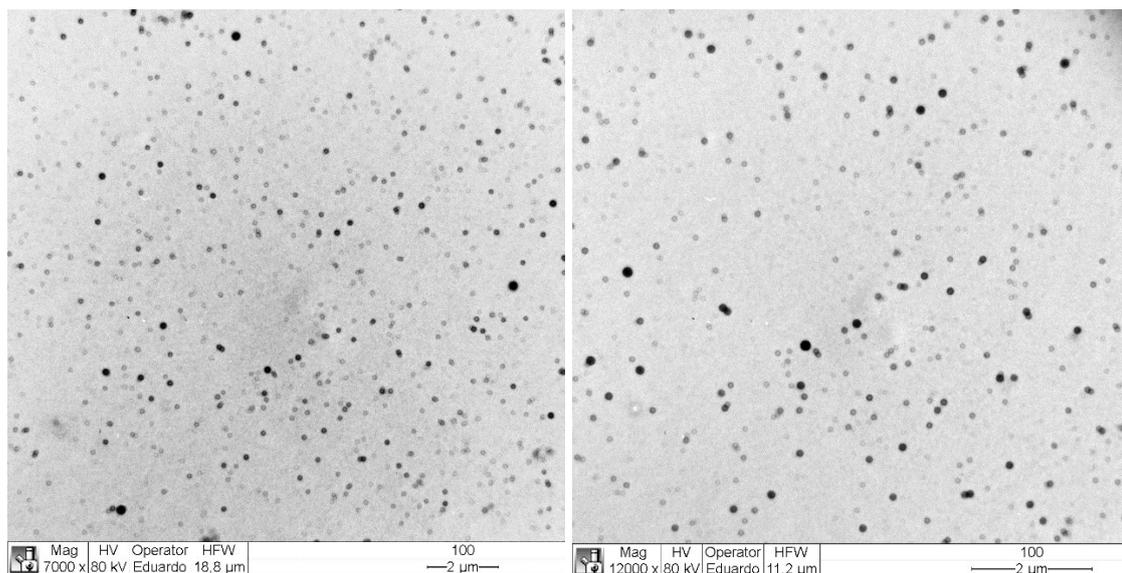
Fonte: Própria.

APÊNDICE B – Figura do estudo fotométrico da incorporação do azul de metileno frente à ação do agente redutor tiocianato (terceira replicata) em vesículas de PDMAEMA₂₇₇-b-PS₃₁₇



Fonte: Própria.

APÊNDICE C – Figuras de MET com ampliação de 7 e 12 mil vezes de P(DMAEMA₆₅-*co*-HEMA₃)-*b*-PS₃₂₇



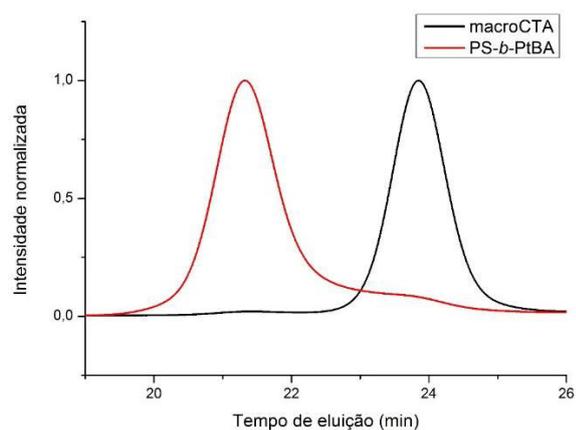
Fonte: Própria.

APÊNDICE D – Figura do aspecto visual do PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃



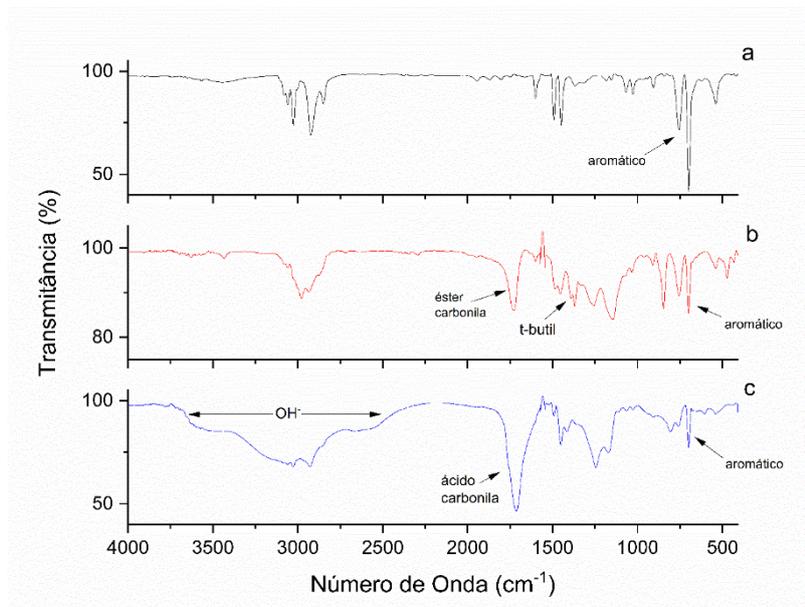
Fonte: Própria.

APÊNDICE E – Figura da análise de GPC do PS₉₈-*b*-PAA₃₄₃



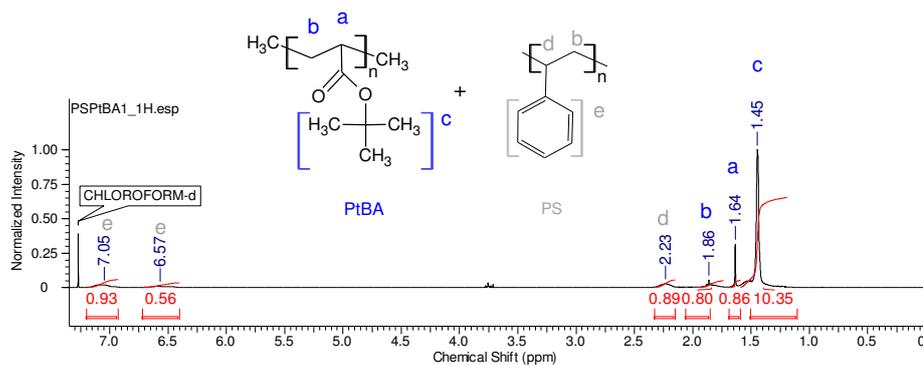
Fonte: Própria.

APÊNDICE F – Figura da análise de FTIR do PS_{98-b}-PAA₃₄₃, onde: a) macroCTA (PS); b) PS_{98-b}-PtBA₃₄₃ e c) PS_{98-b}-PAA₃₄₃



Fonte: Própria.

APÊNDICE G – Figura do espectro de RMN e atribuições do PS_{106-b}-PtBA₃₀₃



Fonte: Própria.

APÊNDICE H – Tabela de absorvâncias obtidas para construção da curva analítica de glicose

Conc glicose (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Média
0,06	0,112	0,116	0,114 ± 0,003
0,11	0,277	0,280	0,279 ± 0,002
0,17	0,436	0,409	0,423 ± 0,019
0,23	0,587	0,583	0,585 ± 0,003
0,29	0,744	0,712	0,728 ± 0,023

Fonte: Própria.