



Ana Patrícia Simões Fernandes

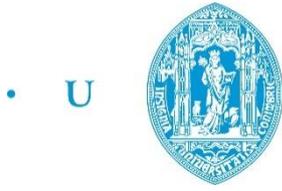
DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE BASE POLIMÉRICA PARA ENTREGA DE MATERIAL GENÉTICO

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Fevereiro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



C •

FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Patrícia Simões Fernandes

Desenvolvimento de Nanopartículas de Base Polimérica para Entrega de Material Genético

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Engenharia
Biomédica*

Orientadores:

Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho (DEQ – FCTUC)

Doutor Arménio Coimbra Serra (DEQ – FCTUC)

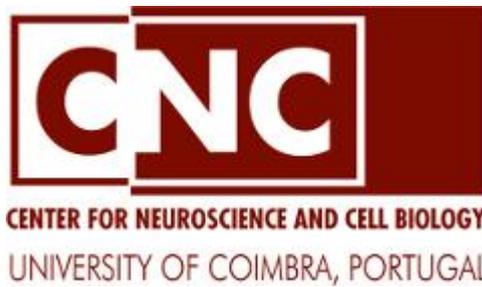
Doutor Henrique Manuel dos Santos Faneca (CNC)

Coimbra, 2016

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:



POLYMER RESEARCH GROUP
polymer synthesis · modification · characterization



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Agradecimentos

Ao chegar ao fim desta etapa da minha formação académica, não posso deixar de agradecer às inúmeras pessoas que marcaram este percurso.

Em primeiro lugar, o meu profundo agradecimento aos meus orientadores, Prof. Doutor Jorge Coelho, Doutor Arménio Serra e Doutor Henrique Faneca, pela orientação, apoio e disponibilidade prestados ao longo deste trabalho. Ter a oportunidade de trabalhar num tema tão entusiasmante foi muito gratificante.

À Doutora Rosemeyre Cordeiro, o meu agradecimento sentido por todos os ensinamentos e sábios conselhos transmitidos, essenciais à realização deste trabalho.

A todos os elementos do Grupo de Polímeros do Departamento de Engenharia Química, o meu agradecimento por todo o apoio que me deram no laboratório.

À Dina e à Daniela, do grupo de Vetores e Terapia Génica do CNC, agradeço a ajuda preciosa na realização dos ensaios *in vitro*. Obrigada também pela vossa companhia, sempre motivadora, ao longo do meu trabalho no CNC.

Aos amigos de faculdade, obrigada por terem partilhado comigo os bons e os maus momentos da vida de estudante. A vossa presença fez com que tudo fosse mais fácil e divertido. Fica a certeza de que são amigos para a vida!

Às amigas de sempre, obrigada pela vossa compreensão em relação às minhas, por vezes longas, ausências.

Esta caminhada nem sempre foi fácil. À Liliana Simões, o meu sincero obrigado pelas palavras de incentivo e encorajamento, nos momentos de dificuldade e de dúvida.

Ao meu afilhado Dudu, devo um pedido de desculpa, por não ter estado presente tanto quanto desejava durante este ano que passou.

À Beatriz, a melhor amiga e irmã que jamais sonhei ter, agradeço o apoio incondicional durante esta jornada. Soubeste como ninguém dar-me a força necessária para ultrapassar sempre as circunstâncias mais difíceis. E obrigada por teres tido a paciência de me ouvir e por teres, na tua forma ainda simples e ingénua de ver o mundo, encontrado sempre uma forma de me dar ânimo e alegria.

Aos meus pais, os grandes responsáveis por aquilo que sou hoje, devo a minha eterna gratidão. Obrigada por me terem dado a possibilidade de ter a formação académica que a vocês foi negada. A vossa dedicação extraordinária permitiu que os meus (nossos) sonhos se tornassem realidade. A vocês, dedico este trabalho.

Resumo

A terapia génica é reconhecida como um dos grandes avanços da medicina, ao permitir o tratamento de doenças a nível genético, mudando o atual paradigma da terapêutica. A terapia génica tem como objetivo a inserção de material genético nas células e tecidos alvo de um indivíduo, de forma a curar doenças do foro genético, como, por exemplo, o cancro. Neste sentido, o desenvolvimento de vetores de entrega de material genético seguros e eficientes surge como o grande desafio para a sua aplicação clínica.

Das duas classes de vetores existentes, os de natureza viral são os mais eficientes. No entanto, a sua utilização é potencialmente perigosa, provocando, entre outros danos, reações imunitárias e inflamatórias graves, razão pela qual existe um interesse crescente sobre os vetores não-virais, onde se incluem os de base polimérica. Os vetores não virais oferecem como vantagens a sua segurança e reduzida resposta por parte do sistema imunitário, assim como flexibilidade de construção e facilidade de fabrico. Neste campo, a engenharia de polímeros possibilita a afinação das propriedades químicas e físicas dos polímeros, adaptando-os, de forma a conseguir polímeros com características ótimas para a entrega de material genético.

O objetivo deste trabalho foi assim investigar o potencial de um novo sistema de base polimérica para a entrega de material genético, constituído por diferentes combinações entre três polímeros catiónicos: poli(etileno glicol)-*bloco*-poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PEG-*b*-PDMAEMA), poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA) e poli(β -amino éster) (P β AE), sendo ainda de especial relevância o estudo da influência do PEG sobre o sistema. Foram sintetizados três copolímeros de bloco PEG-*b*-PDMAEMA, com segmentos de PEG com pesos moleculares entre os 400 e os 2000 g.mol⁻¹ e um homopolímero de PDMAEMA. A síntese realizou-se com recurso a técnicas de polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP), o que permitiu obter polímeros com massas molares e dispersividades controladas. Foi sintetizado um quinto polímero, o P β AE, por uma reação de adição de Michael. Por limites temporais, apenas três destes polímeros foram testados *in vitro* como vetores de entrega de material genético: os dois homopolímeros e o copolímero PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA.

A atividade de transfeção *in vitro* foi avaliada em células COS-7 através de ensaios de luminescência. Paralelamente, outros parâmetros como a citotoxicidade, o grau de condensação do DNA e o tamanho e a carga superficial das nanopartículas foram também estimados.

Os resultados obtidos indicaram que os políplexos baseados na combinação de polímeros proposta são bons candidatos para a entrega de material genético, devido à sua grande capacidade de transfeção, principalmente quando comparada com o *gold standard* dos vetores poliméricos, a polietilenimina ramificada (bPEI). De acordo com o presente estudo, a introdução de PEG não teve influência sobre a atividade de transfeção do sistema, já que as variações na quantidade de polímero PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA não se traduziram em alterações significativas na atividade biológica das diferentes formulações. Todas as outras análises efetuadas indicaram que os políplexos produzidos têm propriedades físico-químicas adequadas à sua aplicação, nomeadamente, carga superficial positiva, diâmetro médio abaixo dos 150 nm e uma excelente condensação do DNA.

Palavras-chave: RDRP, ATRP, copolímeros de bloco, polímeros catiónicos, terapia génica.

Abstract

Gene therapy is recognized as a major breakthrough of molecular medicine, by allowing disease treatment at a genetic level, changing today's therapeutic paradigm. Its main goal is to insert exogenous genetic material into specific cells or tissues of the patient in order to cure genetic diseases, such as cancer. In this context, the development of a safe and efficient gene delivery system arises as the main challenge for its clinical application.

Even though viral vectors are highly efficient as gene carriers, they have some issues regarding their safety. Indeed, among others, they can cause host immune and inflammatory reactions. For this reason, there is an increasing interest to develop non-viral vectors, which includes polymeric-based vectors. These gene carriers are advantageous especially due to their safety and low immune response, but also because of their construction flexibility and facile fabrication. However, these vectors have low transfection efficiency. Among them, polymeric-based non-viral vectors have a great potential due to ease and fine tune of their physicochemical properties through polymer engineering.

The aim of this work was to investigate a new polymeric-based system for gene delivery, composed by different combinations of three cationic polymers: poly(ethylene glycol)-*block*-poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] (PEG-*b*-PDMAEMA), poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] (PDMAEMA) and poly(β -amino ester) (P β AE), focusing on the influence of PEG in the transfection efficiency. Three PEG-*b*-PDMAEMA block copolymers with different molecular weight of PEG segments, ranging from 400 to 2000 g.mol⁻¹, and a PDMAEMA homopolymer were synthesized by atom transfer radical polymerization (ATRP). This polymerization technique enables total control over polymer structure and functionality. There was a fifth polymer, P β AE, synthesized by a Michael addition reaction. Due to time constraints, only three of these polymers were evaluated *in vitro* as gene carriers: the two homopolymers and the PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA copolymer.

In vitro transfection activity was assessed in COS-7 cell line through luminescence. In addition, other parameters like their cytotoxicity, degree of DNA condensation, size and surface charge were evaluated.

The obtained results demonstrate that polyplexes based on the proposed polymer combination are good candidates for gene delivery, owing to their high transfection capacity when compared to a *gold standard* polymeric-based gene delivery system, branched poly(ethyleneimine) (bPEI). According to the data obtained in this work, the introduction of a PEG segment has revealed no influence on transfection efficiency of the prepared polyplexes. In fact, the different amounts of PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA copolymer introduced did not lead to significantly different levels of transfection activity in the multiple formulations tested. Moreover, the other experimental studies revealed that the polyplexes designed with the three polymers mentioned above present suitable physicochemical properties for its application, such as, positive surface charge, mean diameter under 150 nm and a high level of DNA condensation.

Keywords: RDRP, ATRP, block copolymers, cationic polymers, gene therapy, gene delivery.

Lista de Siglas

- ^1H RMN – Espectroscopia ressonância magnética nuclear
ATRP – Polimerização radicalar por transferência de átomo
BBiB – Brometo de α -bromoisobutirilo
bPEI – Polietilenimina ramificada
BSA – Albumina do soro bovino
 D – Polidispersividade
DCM – Diclorometano
DLS – Difusão Dinâmica da Luz
DMAEMA – 2-(dimetilamino)etil metacrilato
DMAP – 4-dimetil(amino piridina)
DMEM-HG – Dulbecco's modified Eagle medium – high glucose
DMF – Dimetilformamida
DMSO – Dimetil sulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DP – Grau de polimerização
EBiB – Etil α -bromoisobutirato
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético
EtBr – Brometo de etídio
FBS – Soro fetal bovino
FRP – Polimerização radicalar livre
IPA – Isopropanol
Luc – Luciferase
 M_n – Peso molecular médio numérico
mPEG – Poli(etileno glicol) metil éter
 M_w – Peso molecular médio ponderado
N/P – Rácio azoto/fosfato
PBS – Tampão fosfato-salino
PDMAEMA – Poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]
pDNA – Plasmídeo de ácido desoxirribonucleico
PEG – Poli(etileno glicol)
PEI – Polietilenimina

PMDETA – N,N,N',N'',N''' Pentametildietilenotriamina

P β AE – Poli(β -amino éster)

RDRP – Polimerização radicalar por desativação reversível

RNA – Ácido ribonucleico

SARA ATRP – Polimerização radicalar por transferência de átomo com ativador
suplementar e agente redutor

SEC – Cromatografia por exclusão de tamanhos

TEA – Trietilamina

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão

THF – Tetrahydrofurano

Índice

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract.....	xi
Lista de Siglas.....	xiii
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Equações	xxi
1. Introdução.....	2
1.1. Terapia Génica	2
1.2. Utilização de vetores na Terapia Génica	4
1.2.1. Vetores virais vs. Vetores não-virais.....	5
1.2.2. Polímeros catiónicos como vetores não-virais	7
1.2.2.1. Poli[2-(dimetilamino) etil metacrilato] (PDMAEMA).....	8
1.2.2.2. Poli(β -amino éster) (P β AE)	9
1.2.2.3. Polietilenimina (PEI)	10
1.2.3. O papel do PEG na Terapia Génica.....	11
1.3. Polímeros e a sua síntese.....	13
1.3.1. Polimerização Radicalar Livre	15
1.3.1.1. Polimerização Radicalar por Desativação Reversível (RDRP).....	16
1.3.1.2. Principais Métodos de RDRP	17
1.3.1.3. Polimerização Radicalar por Transferência de Átomo (ATRP)	19
1.3.2. Polimerização por reação de Adição de Michael	21
1.3.3. Caracterização dos Polímeros	22
1.3.3.1. Cromatografia por Exclusão de Tamanhos (SEC).....	23
1.3.3.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	24
1.4. Considerações Finais	24
2. Materiais e Métodos	26
2.1. Síntese dos Polímeros	26
2.1.1. Materiais.....	26
2.1.2. Síntese do Macroiniciador PEG-Br.....	27
2.1.3. Síntese do PDMAEMA e PEG- <i>b</i> -PDMAEMA.....	28

2.1.4. Síntese do P β AE.....	29
2.1.5. Técnicas de caracterização dos Polímeros	30
2.1.5.1. Cromatografia por Exclusão de Tamanhos (SEC).....	30
2.1.5.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	31
2.2. Atividade Biológica e Caracterização dos Políplexos	31
2.2.1. Materiais	31
2.2.2. Linha celular e condições de cultura	31
2.2.3. Preparação dos políplexos	32
2.2.4. Transfeção <i>in vitro</i> – ensaio de luminescência.....	33
2.2.5. Viabilidade celular	34
2.2.6. Caracterização físico-química dos políplexos.....	34
2.2.6.1. Análise da Difusão Dinâmica da Luz (DLS) e Potencial Zeta	34
2.2.6.2. Ensaio de intercalação do brometo de etídio	35
3. Resultados e Discussão.....	38
3.1. Caracterização dos Polímeros	38
3.1.1. Caracterização do Macroiniciador PEG-Br.....	38
3.1.2. Caracterização do PDMAEMA e PEG- <i>b</i> -PDMAEMA	40
3.1.3. Caracterização do P β AE.....	47
3.2. Atividade Biológica e Caracterização dos Políplexos	49
3.2.1. Transfeção <i>in vitro</i> – ensaio de luminescência.....	50
3.2.2. Viabilidade celular	53
3.2.3. Caracterização físico-química dos políplexos.....	55
3.2.3.1. Tamanho e potencial zeta dos políplexos	55
3.2.3.2. Condensação do DNA	57
4. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	62
5. Referências	66
6. Anexos.....	74
6.1. Espectros de ¹ H RMN do PEG-Br	74
6.2. Espectros de ¹ H RMN do PEG- <i>b</i> -PDMAEMA.....	76

Lista de Figuras

Figura 1: Número de ensaios clínicos aprovados mundialmente envolvendo terapia génica entre 1989 e 2015. ⁹	3
Figura 2: Representação da estrutura de um lípido catiónico típico (DOTMA). ¹⁵	6
Figura 3: Lipossomas (estruturas vesiculares constituídas pelos lípidos catiónicos) complexam-se com o DNA para formar lipoplexos. ¹⁷	6
Figura 4: Formação dos poliplexos (a); imagem TEM de poliplexos (escala = 200 nm) (b). ⁵	7
Figura 5: Acrilatos e aminas usados para construir a biblioteca de P β AE. ³³	10
Figura 6: Classificação dos copolímeros quanto à sua composição: aleatório (a), alternado (b), de bloco (c) e enxertados (d). ³⁹	13
Figura 7: Reação gradual entre dois tipos de monómeros (a); reação gradual entre a mesma espécie de monómero (b). A e B referem-se aos diferentes grupos funcionais. ³⁹	14
Figura 8: Mecanismo geral da RDRP (trocas entre espécies ativas e espécies dormentes).	17
Figura 9: Mecanismo geral da ATRP.	19
Figura 10: Mecanismo geral do SARA ATRP mediado por Cu(0) e Cu(II)X ₂ . ⁵⁴	20
Figura 11: Representação esquemática geral da reação de adição de Michael.	21
Figura 12: Reação catalisada pela luciferase e que conduz à emissão de luz.	33
Figura 13: Reação de esterificação do PEG. ⁶²	38
Figura 14: Espectro de ¹ H RMN de PEG ₁₀₀₀ -Br puro em CDCl ₃	39
Figura 15: Reação de síntese do PDMAEMA por SARA ATRP.	41
Figura 16: Espectro de ¹ H RMN de uma amostra não purificada de PDMAEMA em CDCl ₃	42
Figura 17: Representação gráfica da conversão e ln[M] ₀ /[M] em função do tempo (a) e de M _n ^{SEC} e M _w /M _n (D) em função da conversão para ATRP do DMAEMA em IPA/H ₂ O. Condições: [DMAEMA] ₀ /[IPA]/[H ₂ O] = 1/0,9/0,1 (v/v); [DMAEMA] ₀ /[EBiB] ₀ /[Fe(0)] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[PMDETA] ₀ = 100/1/1/0,1/1,1 (molar).	42
Figura 18: Curvas de SEC para as amostras de PMDMAEMA obtidas a diferentes tempos de reação. Condições: [DMAEMA] ₀ /[IPA]/[H ₂ O] = 1/0,9/0,1 (v/v); [DMAEMA] ₀ /[EBiB] ₀ /[Fe(0)] ₀ /[CuBr ₂] ₀ / [PMDETA] ₀ = 100/1/1/0,1/1,1 (molar).	43

Figura 19: Reação de síntese do PEG- <i>b</i> -PDMAEMA por SARA ATRP.	43
Figura 20: Espectro de ¹ H RMN de PDMAEMA (purificado) em CDCl ₃ ($M_n^{SEC} = 7187$ g.mol ⁻¹ , $D = 1,41$). Condições: [DMAEMA] ₀ /[IPA]/[H ₂ O] = 1/0,9/0,1 (v/v); [DMAEMA] ₀ /[EBiB] ₀ /[Fe(0)] ₀ /[CuBr ₂] ₀ / [PMDETA] ₀ = 100/1/1/0,1/1,1 (molar), temperatura ambiente).	45
Figura 21: Espectro de ¹ H RMN de PEG ₁₀₀₀ - <i>b</i> -PDMAEMA (purificado) em CDCl ₃ ($M_n^{SEC} = 8564$ g.mol ⁻¹ , $D = 1,25$). Condições: [DMAEMA] ₀ /[IPA]/[H ₂ O] = 1/0,9/0,1 (v/v); [DMAEMA] ₀ /[mPEG ₁₀₀₀ -Br] ₀ /[Fe(0)] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[PMDETA] ₀ = 100/1/1/0,1/1,1 (molar), temperatura ambiente).	46
Figura 22: Síntese do α,ω -acrilato-poli(β -amino éster).	47
Figura 23: Espectro de ¹ H RMN do α,ω -acrilato-poli(β -amino éster) em CDCl ₃	48
Figura 24: Efeito da composição e do rácio N/P (50/1 (a) e 100/1 (b)) dos poliplexos na sua atividade de transfeção em células COS-7, na presença e ausência de soro. Os diferentes polímeros e combinações de polímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc de acordo com o rácio polímero/DNA N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. A atividade biológica é expressa em RLU (unidades relativas de luz) de luciferase por miligrama de proteínas celular total (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos duas experiências independentes.	51
Figura 25: Efeito da composição e do rácio N/P (50/1 (a) e 100/1 (b)) dos poliplexos na viabilidade celular na linha COS-7, na presença e na ausência de soro. Os diferentes polímeros e combinações de polímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc de acordo com o rácio polímero/DNA N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. Os dados são expressos em percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células sem tratamento) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos duas experiências independentes.	54
Figura 26: Tamanhos das partículas formadas pelos polímeros/DNA num rácio N/P 50/1 (a) e 100/1 (b). Os poliplexos foram preparados com 1 μ g de pCMV.Luc e com os diferentes polímeros e combinações de polímeros para o rácio polímero/DNA N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. O tamanho de partícula é expresso em nanómetros (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes.	56
Figura 27: Potencial zeta das partículas formadas pelos polímeros/DNA num rácio N/P 50/1 (a) e 100/1 (b). Os poliplexos foram preparados com 1 μ g de pCMV.Luc e com os	

diferentes polímeros e combinações de polímeros para o rácio polímero/DNA N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. O potencial zeta é expresso em milivolts (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes. 57

Figura 28: Acessibilidade do brometo de etídio ao DNA dos diferentes poliplexos preparados para um rácio polímero/DNA N/P de 50/1 (a) e 100/1 (b), à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. A quantidade de DNA disponível para interagir com a sonda foi calculada subtraindo os valores da fluorescência residual aos obtidos para as amostras e expressos como percentagem do controlo. O controlo corresponde a DNA livre na mesma quantidade que o associado aos complexos (100% de acessibilidade do EtBr). Os dados são expressos como acesso do EtBr (% do controlo) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes..... 58

Figura 29: Espectro ^1H RMN de PEG₂₀₀₀-Br puro em CDCl₃. 74

Figura 30: Espectro ^1H RMN de PEG₄₀₀-Br puro em CDCl₃. 75

Figura 31: Espectro ^1H RMN de PEG₂₀₀₀-*b*-PDMAEMA puro em CDCl₃. 76

Figura 32: Espectro ^1H RMN de PEG₄₀₀-*b*-PDMAEMA puro em CDCl₃. 76

Lista de Tabelas

Tabela 1: Vetores de entrega de genes.	4
Tabela 2: Principais etapas da polimerização radicalar livre. ⁴³	15
Tabela 3: Principais métodos de RDRP. ⁵⁰	18
Tabela 4: Expressões para o cálculo da massa molar média numérica (M_n), massa molar média ponderada (M_w) e índice de polidispersividade (D), em que N_i é o número de moléculas da espécie i com massa molar M_i . ⁴¹	22
Tabela 5: Caracterização dos macroiniciadores PEG-Br.	40
Tabela 6: Propriedades do homopolímero e copolímeros sintetizados.	44
Tabela 7: Polímeros cujo potencial de ação como vetores de entrega de material genético foi avaliado.	49
Tabela 8: Percentagens de cada polímero usadas em cada formulação para a preparação dos poliplexos.	49

Lista de Equações

Equação 1: Cálculo da massa de cada polímero numa dada formulação.	32
Equação 2: Cálculo da conversão da reação.	41
Equação 3: Cálculo por ¹ H RMN do peso molecular do P β AE.	47

Introdução

1. Introdução

1.1. TERAPIA GÉNICA

A medicina, bem como a abordagem terapêutica, está em permanente evolução, sendo esta proporcionada pelo desenvolvimento constante das mais variadas áreas do saber. A engenharia genética e a biotecnologia são duas dessas áreas. Desde 1953, ano marcado pela proposta do modelo em dupla hélice para a molécula de DNA por Watson e Crick¹, têm sido inúmeras as inovações nestas duas disciplinas. Mais recentemente, a descoberta da tecnologia do DNA recombinante permitiu aos cientistas olhar para os genes e para a engenharia genética com outros olhos, ao prometer melhorar drasticamente a prática médica. A terapia génica surge assim como um dos novos métodos que pretende revolucionar a medicina e a forma como a sociedade olha para a doença.²

Enquanto que a maioria das terapêuticas disponíveis atualmente apenas tratam os sintomas de dada doença, a terapia génica é um método promissor que tem por objetivo tratar ou eliminar as suas causas.³ A terapia génica pode assim vir a alterar o atual paradigma da terapêutica. O conceito básico da terapia génica é a entrega e transferência de material genético a células específicas de um paciente, de forma a curar uma doença ou pelo menos desacelerar o seu progresso.⁴ Esta nova estratégia pode ser útil principalmente para doenças genéticas hereditárias ou adquiridas, como a hemofilia, distrofia muscular, fibrose cística, doenças cardiovasculares, neurológicas e infecciosas e cancro.⁵ A terapia génica pode ser dirigida a células germinativas, caso em que as alterações são passadas para as gerações seguintes, sendo este mecanismo altamente eficiente na cura e erradicação de doenças genéticas hereditárias, ou a células somáticas, caso em que as alterações são restritas ao indivíduo tratado. No entanto, quer a nível técnico quer ético, a terapia génica em células somáticas é a alternativa mais viável para o futuro próximo.⁶

Apesar da terapia génica ter imenso potencial terapêutico, a sua aplicação na prática clínica ainda está longe de ser uma realidade. Desde 1990, ano em que se realizou o primeiro ensaio clínico envolvendo terapia génica,⁷ o número de estudos aprovados anualmente tem variado (Figura 1). Este facto pode ser atribuído à alternância entre os resultados positivos e as reações adversas sofridas por alguns pacientes envolvidos nestes

estudos, nomeadamente no caso de pacientes que, após o tratamento bem-sucedido da imunodeficiência SCID-X1, acabaram por desenvolver leucemia provocada por esse mesmo tratamento. Todavia, a trajetória dos ensaios clínicos relativos a esta área é claramente positiva, sendo acompanhada por evidências dos benefícios da terapia génica relativos a um número crescente de doenças.⁸

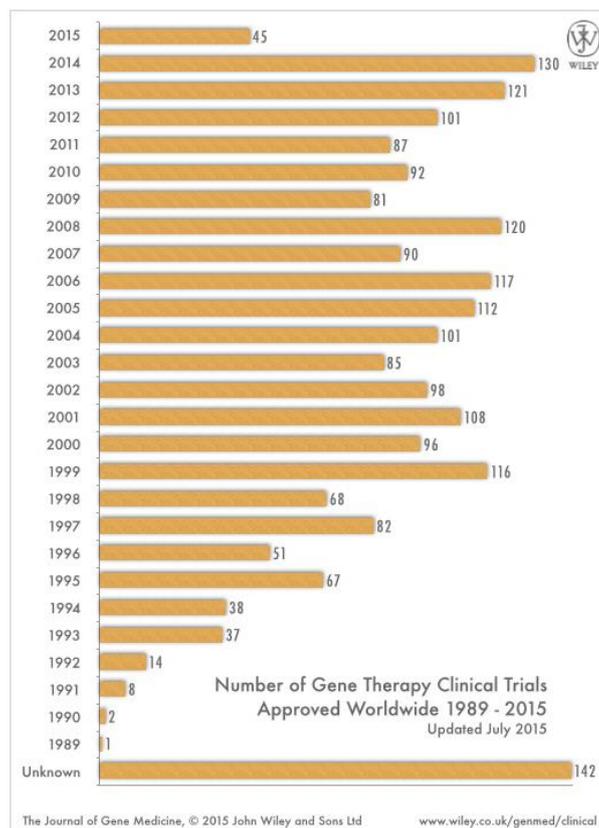


Figura 1: Número de ensaios clínicos aprovados mundialmente envolvendo terapia génica entre 1989 e 2015.⁹

A utilização de ácidos nucleicos, como o DNA e o RNA, como agentes terapêuticos é particularmente difícil, uma vez que, até chegar ao seu alvo, o material genético tem de atravessar inúmeras barreiras biológicas. Assim, para além das moléculas deverem ser estáveis em fluidos biológicos e terem a capacidade de escapar aos mecanismos de vigilância do sistema imunitário e a fenómenos de *clearance* (depuração), estas têm ainda de contornar barreiras celulares como as membranas plasmáticas e nucleares, a via endocítica e a potencial degradação por enzimas citoplasmáticas. Assim, torna-se evidente que para haver uma transfeção (introdução de material genético numa célula) segura e eficaz devem ser utilizados sistemas de transporte e entrega de material genético com capacidade de ultrapassar estes obstáculos fisiológicos e celulares.¹⁰

1.2. UTILIZAÇÃO DE VETORES NA TERAPIA GÉNICA

As estratégias desenvolvidas para a terapia génica são constituídas por dois componentes: o vetor de transporte e o material genético. A abordagem mais estudada tem sido a entrega de plasmídeos de DNA (pDNA) com vista à expressão de transgenes terapêuticos. Recentemente, também o RNA de interferência (RNAi) tem sido estudado para este propósito através da utilização de moléculas como microRNAs (miRNAs), *small interference RNAs* (siRNAs). Apesar de possuir a mesma base molecular que o pDNA, o RNAi enfrenta diferentes desafios relativamente à entrega, já que o seu tamanho, estabilidade dos complexos formados, mecanismo e local de ação são diferentes.¹¹ No que toca aos vetores de transporte do material genético, estes podem ser divididos em duas categorias: vetores virais e não-virais (Tabela 1).¹² Os vetores não-virais podem ainda ser divididos em dois grupos: os métodos físicos, onde se incluem, entre outros, a eletroporação, a microinjeção e a injeção hidrodinâmica, e os métodos químicos, onde se incluem os de natureza catiónica e de base lipídica ou polimérica.¹⁰

Tabela 1: Vetores de entrega de genes.

Vetores virais ¹³	Vetores não-virais ¹⁰	
	Métodos físicos	Métodos químicos
Adenovírus <i>Adeno-associated vírus</i>	Eletroporação	Base lipídica
Lentivírus Retrovírus	Microinjeção	
Vírus herpes simplex Pox vírus	Injeção hidrodinâmica	Base polimérica

Idealmente, os sistemas de entrega de material genético devem proteger os ácidos nucleicos da degradação, ser eficazmente internalizados pelos seus alvos, promover a libertação da sua carga no local específico (citosol ou núcleo, dependendo do material genético em causa), exibir alta atividade biológica a baixas doses, não ser citotóxicos, ter um bom perfil de biossegurança para aplicações terapêuticas *in vivo*, ser de fácil produção e ter uma validade razoável que permita a sua distribuição e a sua utilização generalizada.¹⁰ Com estas características em mente, no ponto seguinte irão ser discutidos os métodos virais e não-virais em mais pormenor.

1.2.1. VETORES VIRAIS VS. VETORES NÃO-VIRAIS

A principal atividade de um vírus é transportar eficazmente o seu genoma de uma célula hospedeira para outra, entrar na nova célula alvo, navegar até ao núcleo e iniciar a expressão do seu genoma – apenas com o propósito da auto-replicação. Alguns vírus, como os referidos na Tabela 1, podem ser transformados em vetores de entrega pela substituição de parte do seu genoma por um gene terapêutico. Por norma, estes vetores são altamente eficientes, porque, no fundo, os vírus são eles próprios sofisticados veículos de entrega de material genético.⁵

Os vetores virais têm como principais vantagens a sua alta eficiência de transdução e um nível alto de expressão dos genes. No entanto, este tipo de vetor apresenta algumas limitações, principalmente ao nível da sua segurança. Algumas dessas limitações são a carcinogénese (indução de mutações tumorigénicas), imunogenicidade e inflamação dos tecidos, potencial para formar outros vírus e gerar outras partículas virais por recombinação, restrições no tamanho do gene inserido, dificuldade de produção e custo excessivo.^{14,15}

Os problemas associados à transdução de vetores virais abriram caminho a um novo tipo de vetores: os vetores não-virais. Estes vetores assumem-se como uma alternativa aos virais principalmente nos casos em que há uma administração repetida do tratamento, uma vez que esta leva a efeitos adversos ainda mais evidentes.⁵ Mesmo tendo uma eficácia menor que os vetores virais, os vetores não-virais são mais seguros, pois apresentam uma resposta imunitária menor e menos reações inflamatórias, não têm limitações quanto ao tamanho do gene inserido e não há indução de mutações. Para além disto, estes vetores são versáteis e de produção fácil, relativamente barata e reprodutível, sendo possível afinar as suas propriedades físicas e químicas de forma a adquirirem múltiplas funções na entrega de material genético, nomeadamente através da introdução de ligandos dirigidos a tecidos específicos.^{5,10, 12,16}

Como referido no ponto 1.2, os vetores não-virais podem-se basear em métodos físicos ou químicos. Contudo, os primeiros não são uma alternativa viável para a prática clínica e têm uma transfeção ineficiente, pelo que os segundos são os mais estudados.¹⁰ Os vetores não-virais químicos são geralmente de base lipídica ou polimérica, sendo estes possuidores das vantagens já referidas relativamente aos vetores virais.

Possuindo cargas positivas, de uma forma geral, estes vetores sintéticos são materiais com capacidade de formar ligações electrostáticas com o DNA ou o RNA,

condensar o material genético em nanopartículas com diâmetro de algumas dezenas a centenas de nanômetros, proteger os genes e mediar a sua entrada na célula. Os complexos de DNA/RNA com lípidos ou polímeros catiónicos são conhecidos como lipoplexos ou poliplexos, respectivamente.⁵

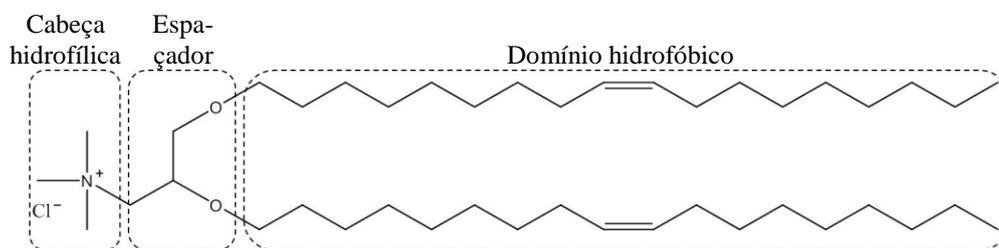


Figura 2: Representação da estrutura de um lípido catiónico típico (DOTMA).¹⁵

Os lípidos catiónicos são moléculas anfifílicas constituídas por três partes: um domínio hidrofóbico (uma cadeia alifática, por exemplo), um domínio hidrofílico (uma amina quaternária, por exemplo) e um espaçador (uma ligação éster e um glicerol, por exemplo), que faz a ligação entre os dois domínios (Figura 2). As cabeças polares hidrofílicas, com uma ou mais cargas positivas, estabelecem ligações electrostáticas com o DNA, que por sua vez está carregado negativamente devido aos grupos fosfato. Assim, num processo de *self-assembly*, os lípidos catiónicos complexam com o DNA, formando estruturas multilamelares, os lipoplexos.¹⁵

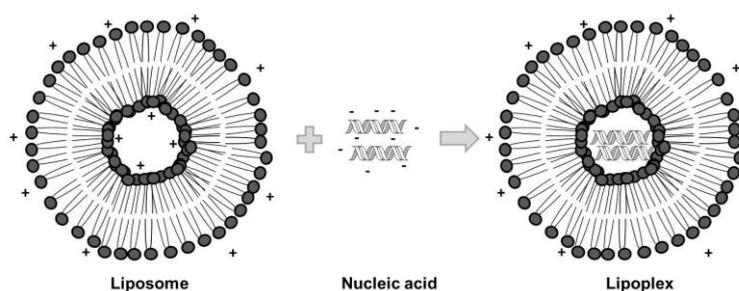


Figura 3: Lipossomas (estruturas vesiculares constituídas pelos lípidos catiónicos) complexam-se com o DNA para formar lipoplexos.¹⁷

Porém, os lípidos catiónicos também têm características menos atrativas, como a sua baixa eficiência, devido à sua baixa estabilidade, tendência para formar *clusters* na circulação e rápida depuração, o que leva a potenciais riscos para a saúde e alguma toxicidade.^{14,18} Os polímeros catiónicos surgem como uma classe de vetores não-virais bastante atraente, resultado da sua imensa diversidade química e potencial

funcionalização. Dado que os vetores usados neste trabalho são de base polimérica, o próximo ponto será dedicado à sua discussão mais pormenorizada. No entanto, tendo por base todas as considerações feitas, fica desde já comprovada a relevância dos vetores não-virais face aos de natureza viral, principalmente em termos de segurança, fator primordial na área biomédica.

1.2.2. POLÍMEROS CATIÓNICOS COMO VETORES NÃO-VIRAIS

A utilização de polímeros catiónicos como vetores de entrega de material genético revela especial interesse devido à facilidade com que as propriedades físicas e químicas dos mesmos podem ser afinadas. Alterações na composição química, peso molecular ou arquitetura, assim como a introdução de grupos funcionais dirigidos a determinados alvos, podem influenciar a eficiência da transfeção dos genes transportados. Por outro lado, estes materiais são robustos, estáveis e de síntese relativamente fácil.¹⁹ Estas são também algumas das vantagens destes vetores relativamente aos lípidos catiónicos. De uma forma geral, as cargas positivas do polímero catiónico (átomos de azoto) interagem electrostaticamente com as cargas negativas dos ácidos nucleicos (grupos fosfato), formando uma partícula denominada poliplexo. Este complexo é produzido espontaneamente pela simples mistura de uma solução policatiónica com DNA. Por norma, estas partículas têm uma carga superficial (potencial zeta, ζ) positiva, dado que se usa um excesso de polímero catiónico; cada partícula é constituída por várias moléculas de DNA e centenas de cadeias poliméricas (Figura 4).⁵

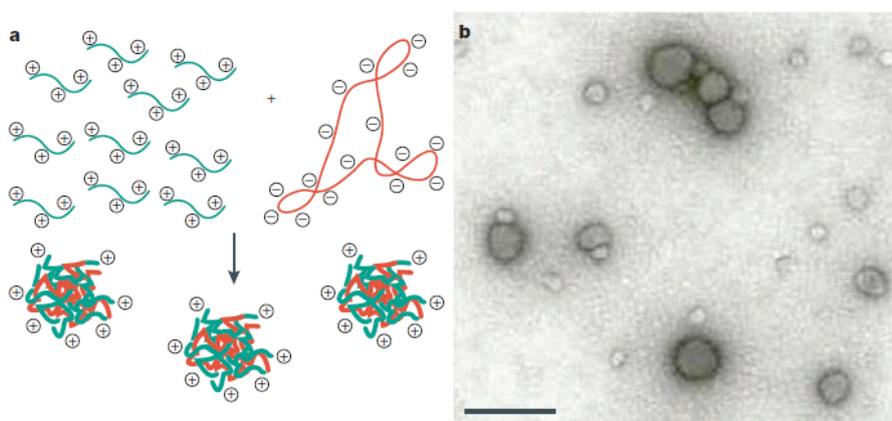


Figura 4: Formação dos poliplexos (a); imagem TEM de poliplexos (escala = 200 nm) (b).⁵

Apesar de promissora, esta tecnologia ainda não passou para a clínica, principalmente devido à baixa eficiência e citotoxicidade destes sistemas. A baixa

eficiência está provavelmente associada à dificuldade dos sistemas em ultrapassar algumas das inúmeras barreiras extra e intracelulares.¹² Quanto à citotoxicidade induzida pelos polímeros catiónicos, esta estará relacionada com o peso molecular e com a densidade de cargas positivas do polímero e com a sua influência sobre as membranas celulares.²⁰

O primeiro polímero catiónico usado em ensaios de transfeção foi o dietilaminoetil funcionalizado com dextrano, em 1965 por Vaheri e Pagano.²¹ Muitos polímeros têm sido testados desde então: poli(L-lisina) (PLL), polietilenimina (PEI), poliamidoamina (PAMAM),⁵ quitosano, poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA)¹⁶ e poli(β -amino éster)²² são apenas alguns deles. Uma vez que este trabalho visa o estudo do PDMAEMA e do P β AE como vetores para entrega de material genético, estes serão aprofundados de seguida.

1.2.2.1. POLI[2-(DIMETILAMINO) ETIL METACRILATO] (PDMAEMA)

O poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA) foi estudado como vetor de entrega de entrega de material genético pela primeira vez em 1996, por Cherng e seus colaboradores.²³ O PDMAEMA é um polímero catiónico que pode ser facilmente sintetizado por ATRP²⁴ e que responde a variações de temperatura e pH, que desde então tem sido usado devido à sua capacidade de atuar como *buffer* e de ser menos citotóxico.²⁵

O estudo de aspetos como o peso molecular, o tamanho dos poliplexos e parâmetros de transfeção como o pH, a força iónica, temperatura, viscosidade, rácio polímero/DNA e presença de estabilizadores é crucial para o sucesso da utilização do PDMAEMA como sistema de entrega de material genético. De entre todos estes aspetos do polímero, o peso molecular é talvez o mais importante, tendo sido já demonstrada a sua correlação com a eficácia da transfeção e a toxicidade.²⁵ De facto, verifica-se que PDMAEMA's com pesos moleculares elevados produzem poliplexos mais pequenos e mais eficazes na transfeção; no entanto, a eficácia do sistema é conseguida à custa de um aumento da citotoxicidade.^{26, 27}

O carácter catiónico do PDMAEMA revela-se a pH inferior ao seu pK_a , situação em que as aminas terciárias da sua cadeia ficam carregadas positivamente; assim a pH fisiológico, o polímero está parcialmente carregado positivamente ($pK_{aPDMAEMA} < 7$).²⁸ Esta característica permite ao polímero tamponizar o endossoma, agir como esponja de

protões e promover a libertação do material genético transportado para o citoplasma. Ao serem internalizados por endocitose, os polímeros evitam a acidificação do endossoma (ao absorver protões) e levam à entrada passiva de iões de cloro (Cl^-), que é seguida de um aumento da pressão osmótica e consequente rutura membranar. Esta capacidade de libertação do material genético a nível intracelular é fundamental para a eficiência da transfeção. Por outro lado, a pH neutro (mais alto que o $\text{p}K_a$), os grupos amina só estão parcialmente ionizados, o que diminui as suas interações com as proteínas do soro, que estão carregadas negativamente.^{28,29}

Tal como acontece com outros polímeros como o PEI, os problemas principais do PDMAEMA são a sua natureza não-biodegradável, a sua toxicidade e a necessidade de melhoria do seu poder de transfeção. Assim, ainda há espaço para continuar a investigação à volta deste polímero. Uma das estratégias propostas na literatura para melhorar este sistema é a síntese de copolímeros de bloco, com a introdução de segmentos de poli(etileno glicol) (PEG) ou de segmentos hidrofóbicos.³⁰ No ponto seguinte (1.2.3) será explorado o papel do PEG na entrega de material genético.

1.2.2.2. POLI(B-AMINO ÉSTER) (PBAE)

Os poli(amino ésteres) são uma classe de polímeros catiónicos, tendo sido primeiramente usados como vetor de entrega em 2000, por Langer et al.²² A sua utilização é bastante promissora devido à biocompatibilidade e elevada capacidade de transfeção do polímero. Os PBAE podem ser sintetizados através de uma reação de adição de Michael entre uma amina primária ou uma bis(amina secundária) e diacrilatos.¹¹ A grande vantagem dos PBAE é a sua degradação, possível pela hidrólise da ligação éster presente na sua cadeia, que dá origem a fragmentos de bis(β -amino ácidos) e dióis. O facto de este polímero se degradar e dar origem a produtos não tóxicos aumenta a segurança do vetor e promove a transfeção, uma vez que, apesar de ser necessário que o polímero seja capaz de complexar o DNA, compactando-o e protegendo-o, em última análise será sempre obrigatória a sua separação, para permitir uma correta e eficiente transcrição.²²

As propriedades físico-químicas dos PBAE, como a densidade de carga, solubilidade em água, cristalinidade e perfil de degradação podem ser ajustados de modo a alcançar os requisitos específicos da transfeção devido à grande disponibilidade de monómeros que constituem as cadeias deste polímero.³¹ Em 2001 foi reportada a utilização de uma biblioteca de monómeros para a síntese de PBAE. A abordagem

combinatória utilizada (contrária à tradicional iterativa) permitiu identificar os polímeros com mais potencial para vetores de transporte e demonstraram as variações estruturais com mais impacto na eficácia da transfeção. De referir que este *screening* é facilitado pela própria natureza do polímero em causa: os monómeros são relativamente baratos e estão disponíveis no mercado, a polimerização é feita num só passo e não é necessária purificação do produto final.³²

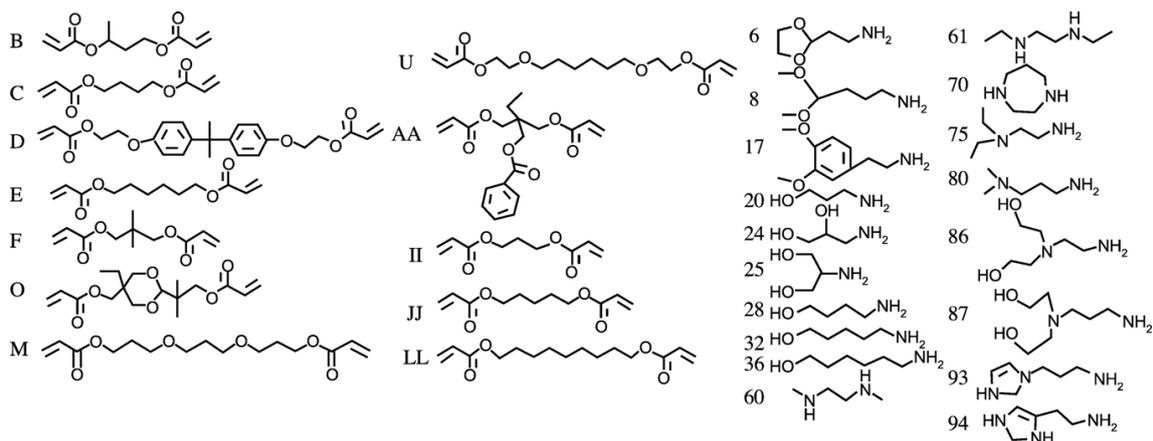


Figura 5: Acrilatos e aminas usados para construir a biblioteca de PBAE.³³

Já em 2004 foi descrita a síntese e caracterização de uma biblioteca de 486 PBAE de segunda geração, composta por 70 estruturas primárias com 6 a 12 pesos moleculares diferentes para cada uma delas (Figura 5). Estes polímeros foram caracterizados quanto ao seu peso molecular, tamanho de partícula e carga superficial após a formação do poliplexo, rácio N/P (polímero/DNA) ótimo e eficiência da transfeção. Curiosamente, a estrutura dos três PBAE com melhor desempenho difere apenas em um carbono. Esta convergência na estrutura sugere um modo comum no seu mecanismo de ação e serve como guia de preparação e modificação destes polímeros. O polímero resultante da reação entre o diacrilato de 1-4-butanodiol e o 5-amino-1-pentanol (C32) foi o que de entre os três revelou maior capacidade de transfeção. Referir ainda que este foi o polímero que originou poliplexos de menor tamanho (71 nm), com um potencial zeta (ζ) acima dos 10 mV.³³

1.2.2.3. POLIETILENIMINA (PEI)

A polietilenimina (PEI) é considerado como o *gold standard* de entre os vários polímeros catiónicos³⁴ e pode ser encontrado no mercado sob a forma linear ou ramificada, com pesos moleculares de entre algumas centenas a 1500 kDa. O PEI

ramificado (bPEI) de 25 kDa é o mais usado devido à sua relativa eficácia: tem uma maior capacidade de condensação do DNA do que a versão linear (devido à maior percentagem de aminas) e forma poliplexos mais pequenos (< 200 nm) com maior atividade de transfeção do que espécies com peso molecular menor (< 2 kDa).³⁵ Este polímero tem ainda a vantagem de ser capaz de transfectar uma grande variedade de células.¹⁶ Apesar de ser o tipo de PEI que apresenta o melhor compromisso entre citotoxicidade e capacidade de transfeção, o perfil de biocompatibilidade do bPEI é uma desvantagem face a outros polímeros, cuja toxicidade é menor.^{12, 35} O bPEI (25 kDa) será usado neste trabalho como termo de comparação das formulações catiónicas sintetizadas.

1.2.3. O PAPEL DO PEG NA TERAPIA GÉNICA

A eficiência da transfeção depende do transporte dos poliplexos catiónicos para o seu alvo, transporte esse severamente afetado pelas ligações não específicas entre os poliplexos (carregados positivamente) e os componentes do sangue (carregados negativamente).³⁶ Após a sua entrada em circulação, os poliplexos são rapidamente reconhecidos por proteínas do soro³⁷ como a albumina, ocorrendo a adsorção dos poliplexos às proteínas, causando a sua agregação e levando à sua rápida eliminação por fagocitose e pelo sistema reticuloendotelial, impedindo que estes cheguem ao seu alvo.⁵

Neste contexto, uma das estratégias mais utilizadas para aumentar a eficiência dos sistemas de libertação de fármacos e de entrega de material genético é a incorporação de um segmento de poli(etileno glicol) (PEG) no sistema, a chamada *PEGylation*. O PEG é um polímero inerte, que resiste às interações com os componentes da corrente sanguínea e por isso designado por polímero *stealth* (furtivo), sendo o mais usado neste campo devido ao seu longo historial de segurança e à classificação de *Generally Regarded as Safe* (GRAS) pela FDA. O PEG é um polímero hidrofílico, característica que faz com que as cadeias ligadas às nanopartículas gerem uma camada de hidratação (um escudo protetor) à volta do poliplexo, o que, por efeitos estéreos, evita a interação dos mesmos com os componentes do sangue e outras nanopartículas, prolongando o tempo de vida dos poliplexos na corrente sanguínea.³⁷

No entanto, a utilização do PEG constitui um dilema. Apesar de os poliplexos com PEG serem mais furtivos e escaparem ao sistema imunitário, a sua utilização provoca uma diminuição na internalização dos poliplexos e dificulta o desempacotamento do poliplexo, impedindo a correta libertação do DNA para o núcleo.²⁵

Um dos parâmetros que permite equilibrar a ação do PEG é o peso molecular. Por exemplo, caso de copolímeros de PEI e PEG, verificou-se que o aumento do peso molecular e da densidade de cadeias de PEG impede a complexação do DNA. Por outro lado, cadeias pequenas ($M_w \leq 500 \text{ g.mol}^{-1}$) não conseguem produzir o escudo protetor à volta dos poliplexos; já cadeias com pesos moleculares entre 2000 e 5000 g.mol^{-1} são capazes de produzir esse efeito, sendo por isso este o intervalo de valores considerado ótimo.¹²

Ainda assim, as vantagens dos copolímeros com PEG para entrega de material genético fazem com que se deva apostar na sua utilização. Os polímeros conjugados com PEG caracterizam-se por possuir baixa citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, aumentarem a solubilidade em água dos complexos polímero/DNA, reduzirem as interações com as proteínas do soro e aumentarem o tempo de circulação do complexo. Por último, possibilitam a introdução de um ligando num polímero catiónico (funcionando o PEG como espaçador), permitindo direcionar os poliplexos para um alvo específico. O PEG é assim um dos polímeros mais usados nesta área, com o objetivo de desenvolver vetores de transporte de material genético seguros e eficientes.³⁸

1.3. POLÍMEROS E A SUA SÍNTESE

Um polímero é uma grande molécula (macromolécula) construída a partir da união de unidades estruturais muito mais pequenas, os chamados monómeros, ligadas covalentemente.³⁹ A classificação dos polímeros pode ser feita de acordo com as suas diferentes características, como o método de polimerização, a sua estrutura e o seu comportamento face ao processamento por via térmica (podendo aqui ser divididos em termoplásticos e termofixos).⁴⁰

As propriedades dos polímeros são bastante influenciadas pelos detalhes da sua estrutura. Assim, um polímero pode ser formado por apenas uma espécie de monómero, situação em que é denominado homopolímero (ou simplesmente polímero). Já quando as cadeias poliméricas são compostas por dois ou mais tipos de unidades estruturais, este designa-se copolímero. Neste último caso é relevante classificar a sequência das unidades de repetição, que surgem com formas de organização diferenciadas ao longo do polímero. Desta forma, têm-se copolímeros aleatórios, alternados, de bloco e enxertados (Figura 6).³⁹

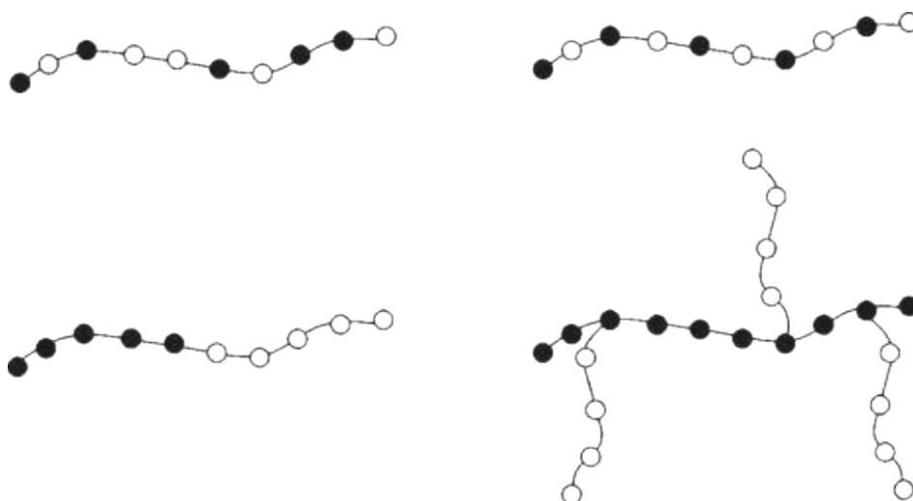


Figura 6: Classificação dos copolímeros quanto à sua composição: aleatório (a), alternado (b), de bloco (c) e enxertados (d).³⁹

A polimerização, reação que dá origem aos polímeros, pode ocorrer segundo dois mecanismos: reação gradual (*step-growth*) ou reação (ou crescimento) em cadeia (*chain-growth*).

As reações de polimerização gradual caracterizam-se pela união aleatória de moléculas de monómeros, oligómeros e polímeros, formando-se assim dímeros, trímeros e espécies macromoleculares. Estas reações ocorrem em passos discretos e requerem longos períodos de tempo para que cada macromolécula se forme, períodos esses tipicamente medidos em horas. Neste tipo de polimerização, o monómero é consumido no início da reação sendo que o peso molecular aumenta lentamente ao longo de toda a reação. Por outro lado, os terminais das cadeias poliméricas permanecem reativos durante todo o processo, não existindo etapa de terminação (nem de iniciação – não é necessário um iniciador para que a polimerização se inicie). Assim, a polimerização gradual decorre no seu todo sob o mesmo mecanismo de reação.⁴¹ Através da reação gradual podem ser preparados poliésteres, poliamidas e poliuretanos.⁴⁰

A polimerização gradual pode ser dividida em dois grupos, de acordo com o tipo de monómeros (sempre bifuncionais) envolvidos na reação. Num primeiro grupo, podem ser incluídas as reações que se dão entre dois tipos distintos de monómeros, também eles com grupos funcionais diferentes entre si (mas o mesmo em cada terminal do monómero) (Figura 7 (a)). Num segundo grupo, incluem-se as reações de polimerização gradual entre uma única espécie de monómero, mas neste caso com diferentes grupos funcionais em cada um dos seus terminais (Figura 7 (b)).³⁹

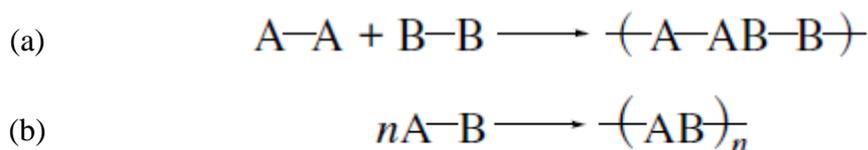


Figura 7: Reação gradual entre dois tipos de monómeros (a); reação gradual entre a mesma espécie de monómero (b). A e B referem-se aos diferentes grupos funcionais.³⁹

Relativamente aos polímeros formados por polimerização em cadeia, estes dependem de um centro ativo nos terminais das cadeias poliméricas em crescimento. É a propagação destes terminais ativos que permite o crescimento do polímero, através da adição de monómero a esse mesmo terminal. Estas adições são muito rápidas e o crescimento pode-se dar numa fração de segundo, dado que as cadeias ativas reagem com o monómero sucessivamente. Deste modo, contrariamente ao que acontece na polimerização gradual, o monómero é consumido lentamente e está presente na mistura reacional ao longo de todo o processo de polimerização em cadeia. Também o mecanismo de reação não é o mesmo ao longo de toda a reação: para além das duas etapas principais

– a iniciação e a propagação – pode haver uma terceira etapa, a terminação da cadeia polimérica.⁴¹

A polimerização em cadeia requer a presença de uma molécula iniciadora, que ao sofrer decomposição forma uma espécie reativa, podendo-se assim ligar a um monómero para dar início à polimerização. A espécie iniciadora pode ser um radical ou um ião (ânion ou catião). Por conseguinte, a polimerização em cadeia pode ser radicalar ou iónica (respetivamente).⁴⁰ Polímeros como o polietileno (PE), o polipropileno (PP) e o policloreto de vinilo (PVC) são exemplos deste tipo de polimerização.

1.3.1. POLIMERIZAÇÃO RADICALAR LIVRE

A polimerização radicalar livre (FRP) é um dos tipos de polimerização em cadeia mais versáteis, sendo usado tanto na indústria como à escala laboratorial. É um método robusto que pode ser aplicado a uma grande variedade de monómeros e que, ao contrário de outros métodos, não exige condições tão exigentes a nível da presença de impurezas, não requerendo uma rigorosa purificação do monómero, e é menos sensível a solventes, tolerando até solventes próticos, como a água.⁴² O mecanismo da FRP pode ser dividido em três fases: a iniciação, a propagação e a terminação (Tabela 2).⁴³

Tabela 2: Principais etapas da polimerização radicalar livre.⁴³

	Reação^a
Iniciação	$I \rightarrow 2R^\bullet$ $R^\bullet + M \rightarrow P_1^\bullet$
Propagação	$P_n^\bullet + M \rightarrow P_{n+1}^\bullet$
Terminação	$P_n^\bullet + P_m^\bullet \rightarrow P_{n+m}$ $P_n^\bullet + P_m^\bullet \rightarrow P_n + P_m$

^a Onde I representa o iniciador, R[•] o radical inicial, M o monómero e P[•] a cadeia polimérica em crescimento.

A iniciação começa com a produção de radicais R[•], resultantes da cisão homolítica do iniciador. De seguida, o radical reage com a unidade de monómero, dando assim início à propagação da cadeia polimérica. Uma sucessão de adições rápidas de monómero conduz ao crescimento da cadeia – etapa conhecida como propagação. O processo de polimerização é concluído na etapa de terminação, quando o radical que permite a

propagação é desativado, resultado de reações bimoleculares entre os radicais.⁴⁴ Estas reações podem ser de combinação ou de dismutação. Na terminação por combinação, dois elétrons com *spins* desemparelhados, cada um no seu terminal de uma molécula polímero-radical (P_n^\bullet), unem-se para formar uma ligação covalente, originando uma grande molécula de polímero (P_{n+m}). Na dismutação, duas moléculas polímero-radical (P_n^\bullet) reagem e uma abstrai um átomo à outra, o que resulta na formação de duas cadeias poliméricas inativas ($P_n + P_m$).⁴¹

Porém, a FRP apresenta alguns problemas, relacionados principalmente com o controlo da reação. A propagação da cadeia polimérica dura, em média, 1 segundo, período durante o qual são adicionadas centenas de monómeros, seguindo-se depois a etapa da terminação. A implementação de um processo de desenho e síntese de arquiteturas moleculares complexas bem controladas é assim inexequível, considerando o tão curto espaço de tempo referido.

Posto isto, tornou-se imperativo procurar um processo de polimerização que oferecesse condições para a introdução da chamada engenharia macromolecular, permitindo desta forma sintetizar polímeros com propriedades melhoradas, como, por exemplo, peso molecular, índice de polidispersividade, composição e arquitetura macromolecular controlados, bem como a adição de outros monómeros ou de grupos funcionais com vista à síntese de copolímeros de bloco ou polímeros funcionalizados, respetivamente.⁴⁴

1.3.1.1. POLIMERIZAÇÃO RADICALAR POR DESATIVAÇÃO REVERSÍVEL (RDRP)

A polimerização radicalar por desativação reversível (RDRP) (anteriormente conhecida como polimerização radicalar viva – LRP)⁴⁵ surgiu como alternativa à FRP tradicional, permitindo ultrapassar as principais limitações da mesma, como o pouco controlo sobre o peso molecular e a sua distribuição (polidispersividade), composição, topologia, arquitetura e funcionalizações dos terminais.

A polimerização viva foi reportada pela primeira vez em 1956 por Szwarc, que a definiu como uma polimerização em que não ocorrem reações de terminação. No seu trabalho, Szwarc usou técnicas de polimerização aniónica para preparar copolímeros de bloco.^{46, 47}

entanto, as estratégias usadas para mediar este equilíbrio podem diferir, podendo assim ser divididas em duas categorias: ativação/desativação reversível de radicais (efeito de radical persistente – PRE) e transferência reversível de cadeia (processo de transferência degenerativa – DT).⁵⁰

Na polimerização mediada pelo efeito de radical persistente (PRE), o estado estacionário é conseguido pelo balanço entre as taxas de ativação e de desativação. Durante a etapa de ativação, os radicais em crescimento são formados devido à troca de átomos que, como passo de ativação, geram radicais com capacidade de se propagar. Desta forma, deixa de ser necessária a presença de um iniciador de radical convencional. Na transferência degenerativa (DT) a iniciação é lenta e a terminação é rápida, havendo um equilíbrio no número de radicais em crescimento. Nestes sistemas, o equilíbrio é preservado pela transferência de cadeias entre as cadeias poliméricas em crescimento e os agentes de transferência, sendo obrigatória a introdução de um iniciador que forme radicais.^{48,50} Na Tabela 3 estão patentes as principais técnicas de RDRP mais usadas atualmente.⁵⁰

Tabela 3: Principais métodos de RDRP.⁵⁰

<p><i>Efeito de Radical Persistente (Persistent Radical Effect – PRE)</i></p>	<p>Polimerização Radicalar por Radicais Livres Estáveis (SFRP)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polimerização mediada por Nitróxidos (NMP) <p>Polimerização Radicalar por Desativação Reversível de Catalisadores Metálicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polimerização Radicalar por Transferência de Átomo (ATRP) • Polimerização Radicalar Viva por Transferência de Eletrão SET-LRP)
<p><i>Transferência Degenerativa (Degenerative Transfer – DT)</i></p>	<p>Processos de Transferência Degenerativa (DT)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polimerização por Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (RAFT) • Polimerização (Reversível) por Transferência de Átomo de Iodo (ITP/RITP)

De entre os vários tipos de RDRP, a polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP) é o mais estudado devido à sua simplicidade, alta tolerância a monómeros funcionalizados e ao facto de os catalisadores e iniciadores requeridos estarem disponíveis comercialmente. O mecanismo de polimerização por ATRP baseia-se na

formação de radicais ativos através de um processo redox catalisado por um complexo de transição (Mt^n/L). Este complexo é responsável pelo controlo dos mecanismos de ativação e desativação, mantendo a concentração de radicais baixa, de forma a minimizar as reações de terminação.⁵¹ Um dos polímeros testados neste trabalho, o PDMAEMA (e o seu copolímero), foi sintetizado por ATRP, razão pela qual este método de polimerização radicalar por desativação reversível irá ser descrito mais detalhadamente no ponto seguinte.

1.3.1.3. POLIMERIZAÇÃO RADICALAR POR TRANSFERÊNCIA DE ÁTOMO (ATRP)

O mecanismo da polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP) baseia-se na criação de um equilíbrio rápido entre as espécies dormentes (macroiniciadores, P_n-X , em que X representa um halogéneo ou pseudo-halogéneo) e as espécies ativas (macroradical, P_n^\bullet) (Figura 9). As espécies dormentes são ativadas por um complexo de metal de transição num estado de oxidação mais baixo (Mt^m/L , em que Mt^m representa a espécie de metal de transição no estado de oxidação m e L é um ligando) que age como ativador já que, ao quebrar homoliticamente a ligação entre o halogéneo e o iniciador (ou entre o halogéneo e a cadeia polimérica), forma intermitentemente radicais em crescimento (P_n^\bullet) e gera um complexo de metal de transição num estado de oxidação mais elevado ($X-Mt^{m+1}/L$) (a uma taxa constante de k_{act}). O macroradical (P_n^\bullet) pode então assim propagar-se, ao ser adicionado mais monómero (K_p) ou ser desativado reversivelmente (k_{deact}) pelo complexo $X-Mt^{m+1}/L$ e formar uma cadeia polimérica dormente com um halogéneo num dos seus terminais (P_n-X). Apesar de possível, a terminação (k_t) é evitada resultado do efeito de radical persistente proporcionado pelo complexo $X-Mt^{m+1}/L$. Assim, o equilíbrio dinâmico da reação de ATRP desloca-se fortemente para o sentido das espécies dormentes (taxa constante de ativação \ll taxa constante de desativação).^{48,52}

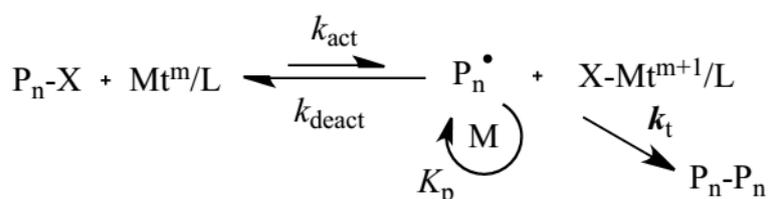


Figura 9: Mecanismo geral da ATRP.

Nos sistemas de ATRP, a pesquisa tem-se focado na avaliação de diversos complexos de metais de transição, numa tentativa de aumentar a gama de funcionalidades de monómeros polimerizáveis. O complexo de metal de transição é formado por um haleto de metal e um ligando. A presença do ligando à volta do centro metálico afeta não só a solubilidade do complexo no meio de reação como também a reatividade da reação redox ao ajustar o potencial redox do metal.⁴⁹ De entre os metais de transição usados em ATRP, como o cobre, ruténio, ferro, níquel, entre outros, o mais amplamente utilizado é o cobre, sendo este superior em termos de *performance* e custo. No que toca aos ligandos, os mais usados são os baseados em azoto.⁴⁸

Com isto, pode-se concluir que as grandes vantagens da técnica de ATRP são a disponibilidade a nível comercial da maior parte dos reagentes necessários, do grande número de complexos catalíticos e monómeros que podem ser utilizados, da gama abrangente de temperaturas de polimerização e do facto de ser possível obter copolímeros de bloco.⁴⁸

Contudo, e mesmo tendo em conta os avanços e vantagens notáveis dos materiais preparados por ATRP, continuam a existir algumas limitações que necessitam de ser ultrapassadas. O principal problema centra-se na quantidade residual de complexo de metal de transição no produto final. No caso de aplicações biomédicas esta questão é fulcral, devido à citotoxicidade induzida. Mais, este é um problema transversal a todas as áreas, visto que o uso de metais de transição revela questões ao nível da cor do produto final, da complexidade e custo do processo e, mais importante, entra muitas vezes em conflito com a legislação ambiental.⁵³

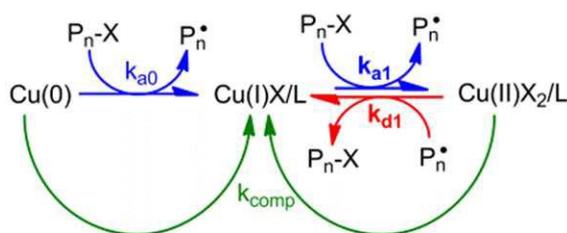


Figura 10: Mecanismo geral do SARA ATRP mediado por $\text{Cu}(0)$ e $\text{Cu}(II)X_2$.⁵⁴

De forma a minimizar este problema, têm sido desenvolvidas novas vertentes da técnica de ATRP, que pretendem utilizar novos sistemas catalíticos com concentrações mais baixas de catalisadores metálicos e novos sistemas com solventes *eco-friendly*.⁵⁵ O ATRP com ativador suplementar e agente redutor (SARA ATRP) é umas dessas novas

vertentes e recorre a metais de valência zero (ou sulfitos inorgânicos) para mediar a polimerização. No caso do cobre, como ativador suplementar, o Cu(0) gera lentamente radicais e Cu(I)X; como agente redutor regenera lentamente a espécie de Cu(I)X (Figura 10). Para além de reduzir a quantidade de catalisador usada, este método é útil para a preparação de polímeros para aplicações biomédicas, uma vez que a polimerização pode decorrer em solventes menos tóxicos e à temperatura ambiente.⁵⁴

Recentemente, foi desenvolvido um sistema polimerização do 2-(dimetilamino)etil metacrilato (DMAEMA) em SARA ATRP catalisado por Fe(0)/Cu(II).²⁴ Este foi o sistema escolhido para preparar os polímeros e copolímeros de PDMAEMA.

1.3.2. POLIMERIZAÇÃO POR REAÇÃO DE ADIÇÃO DE MICHAEL

A reação de adição de Michael consiste numa adição nucleofílica entre um carbanião (ou outro nucleófilo) e um composto carbonilo α,β -insaturado. Constitui uma adição conjugada e conduz à formação de ligações C–C.⁵⁶

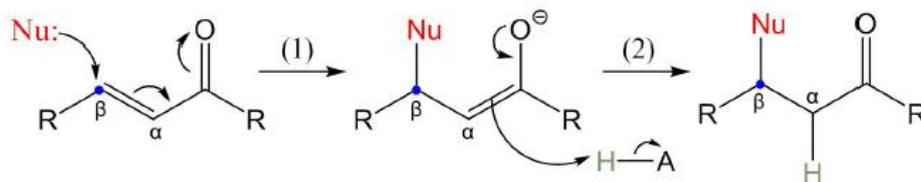


Figura 11: Representação esquemática geral da reação de adição de Michael.

O nucleófilo pode conter EWG (*electron-withdrawing group*), como grupos acilo ou o ciano; este ataca o carbono β , formando assim uma espécie intermediária que evolui para o produto final por abstração de um protão (passo 2). Por norma, os grupos substituintes do nucleófilo são denominados dadores de Michael, enquanto que os substituintes no alceno ativado são os aceitadores de Michael.⁵⁶

As reações por adição de Michael são caracterizadas por condições de reação suaves (em termos de solvente e temperatura), alta tolerância a diferentes grupos funcionais, uma grande variedade de monómeros polimerizáveis e precursores funcionais, bem como taxas de reação favoráveis e conversões elevadas. Estas características fazem com que este tipo de reação tenha vindo a ganhar especial importância como estratégia para a síntese de polímeros com arquiteturas macromoleculares controladas. A reação de Michael é assim indicada para diversas

aplicações biomédicas, entre as quais se enquadram a transfeção de genes, *scaffolds* para células e substituição de tecidos.⁵⁷ O poli(β -amino éster) testado neste trabalho foi sintetizado por uma reação de adição de Michael.

1.3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

Um dos parâmetros que influencia o sucesso da terapia génica com recurso a vetores poliméricos é o peso molecular dos polímeros utilizados, assim como o seu índice de polidispersividade (\mathcal{D}). Importa salientar que a obtenção de um polímero com propriedades controladas e bem definidas é um dos objetivos primordiais da polimerização por ATRP. Assim, a caracterização dos polímeros sintetizados em termos de peso molecular e \mathcal{D} é essencial, de forma a avaliar a polimerização efetuada.

Uma das características que distingue os polímeros de outras moléculas é a incapacidade de se lhes atribuir uma massa molar exata. A natureza dos mecanismos de polimerização leva a que o comprimento da cadeia polimérica formada seja determinado por eventos aleatórios, pelo que o polímero é, na realidade, uma mistura de moléculas com diferentes comprimentos.³⁹

Assim, os polímeros são moléculas cujas massas molares apresentam uma certa distribuição (e não um valor único), sendo caracterizados por uma massa molar média numérica e ponderada. A massa molar média numérica (M_n) é uma média simples das massas moleculares, pelo que cada cadeia polimérica contribui da mesma forma para a grandeza. A massa molar média ponderada (M_w) é uma grandeza mais sensível a macromoléculas com massa molecular mais elevada, atribuindo-lhes um peso maior, o que explica o facto de $M_w > M_n$.

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (1)$$

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad (2)$$

$$\mathcal{D} = \frac{M_w}{M_n} \quad (3)$$

Tabela 4: Expressões para o cálculo da massa molar média numérica (M_n), massa molar média ponderada (M_w) e índice de polidispersividade (\mathcal{D}), em que N_i é o número de moléculas da espécie i com massa molar M_i .⁴¹

O índice de polidispersividade (D) é a grandeza que relaciona o valor de M_n e de M_w , permitindo avaliar se a distribuição de tamanhos é estreita ou alargada. Como referido anteriormente, a técnica de ATRP (e restantes técnicas de RDRP) é caracterizada pelo bom controlo sobre o peso molecular, a D e a arquitetura da cadeia, graças ao equilíbrio dinâmico rápido entre as espécies ativas e dormentes.⁴⁸ Assim, e como todas as cadeias se iniciam quase ao mesmo tempo, a D destes polímeros deve ficar abaixo dos 1,5, dado que todas as cadeias poliméricas devem ter um peso molecular semelhante.

A caracterização das massas molares e D dos polímeros sintetizados neste trabalho foi feita com recurso à cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC). Para além desta técnica, foi usada a ressonância magnética nuclear (^1H RMN) para a comparação da estrutura dos polímeros e obtenção da massa molar média numérica.

1.3.3.1. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHOS (SEC)

A técnica de cromatografia por exclusão de tamanhos é usada em tecnologia de polímeros como forma de determinar a distribuição de pesos moleculares de polímeros, permitindo, através do cromatograma, calcular o peso molecular médio (M_n), o peso molecular médio ponderado (M_w), bem como a sua D .

A teoria do SEC baseia-se na separação de moléculas tendo em conta o seu raio/volume hidrodinâmico. O equipamento de SEC possui colunas, colunas essas constituídas por um material polimérico poroso. Assim, ao atravessarem a coluna, as moléculas da amostra injetada são separadas com base no seu tamanho: as moléculas de maior dimensão não conseguem entrar nos poros ao longo da coluna, sendo logo excluídas; já as de menores dimensões, como são suficientemente pequenas para entrarem nos poros, demoram mais tempo a atravessar a coluna. Quando a amostra sai da coluna passa por um ou mais detetores, permitindo assim a construção do cromatograma.

Para a correta análise de um SEC é necessário construir uma curva de calibração. Esta curva é formada a partir de curvas de SEC de amostras poliméricas com peso molecular conhecido e de baixa D , sendo então assim possível determinar os parâmetros físicos do polímero, como o seu peso molecular e a sua D .

1.3.3.2. ESPETROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica que permite estudar a estrutura e composição dos mais diversos compostos. Este tipo de análise pode ser utilizado em sólidos, soluções ou líquidos. De modo a evitar a interferência entre os prótons da amostra e os do solvente, são utilizados solventes com uma pequena percentagem de prótons; recorre-se assim a solventes deuterados, nomeadamente, D₂O, CDCl₃ e d₆DMSO. O RMN pode ser aplicado no estudo de qualquer núcleo com *spin*, ou seja, qualquer núcleo com número de massa ímpar ou número atômico ímpar. Podem assim ser estudados elementos como o ¹H, ²H, ¹³C, ¹⁴N e ¹⁷O, uma vez que possuem *spin*. Para a caracterização dos polímeros sintetizados ao longo deste trabalho foi usada a técnica de RMN para ¹H (¹H RMN).

1.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de copolímeros é uma das estratégias exploradas para obter novos e melhores sistemas de entrega de material genético, visto que a combinação de polímeros permite juntar as características e vantagens das diferentes estruturas químicas numa só molécula. Recentemente, foi divulgada a utilização de copolímeros de bloco compostos por PβAE e PDMAEMA.²⁸ Este copolímero é totalmente catiónico, tem uma alta densidade de cargas positivas, responde a estímulos como o pH e possui propriedades de degradação e biocompatibilidade melhoradas graças à presença do segmento de PβAE.

Dados os resultados promissores apresentados por Cordeiro et al. e tendo em conta o objetivo deste trabalho, neste documento é explorada uma abordagem que pretende simular o copolímero citado, introduzindo como nova variante um segmento de PEG. Desta forma, neste trabalho é proposto um *blend* (mistura) de três polímeros: PβAE, PDMAEMA e PEG-*b*-PDMAEMA (copolímero de bloco). Este novo sistema de entrega de material genético foi testado na linha celular COS-7 e comparado com o polímero *gold standard*, o PEI ramificado (25 000 g.mol⁻¹), e um dos copolímeros sintetizados por Cordeiro et al., de modo a validar a sua capacidade como vetor de entrega para a terapia génica.

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. SÍNTESE DOS POLÍMEROS

2.1.1. MATERIAIS

Os seguintes reagentes foram usados como recebidos: 2-propanol (IPA) (Fisher Chemical); 5-amino-1-pentanol (Alfa Aesar, 97%); acetona e etanol provenientes da Ghataran Shimi T. Co.; água Milli-Q (Milli-Q[®], Millipore, resistividade >18 MΩ·cm), obtida por osmose inversa; brometo de cobre II (CuBr₂) (Acros, +99%, extra puro, anidro); brometo de α -bromoisobutirilo (BBiB) (Aldrich, 98%); clorofórmio deuterado (CDCl₃) (Euriso-top, +1% tetrametilsilano (TMS)); diacrilato de 1-4-butanodiol (Alfa Aesar, +99%); éter dietílico (>99,8%, Sigma-Aldrich); Etil- α -bromoisobutirato (EBiB) (Aldrich, 98%); ferro (pó) (Fe(0)); N,N,N',N'',N''' Pentametildietilenotriamina (PMDETA) (Aldrich, 99%); n-hexano (Fisher Chemical); poli(etileno glicol) monometil éter (mPEG) (Aldrich, M_n 1000 g.mol⁻¹); poli(etileno glicol) monometil éter (mPEG) (Aldrich, M_n 2000 g.mol⁻¹); Poli(etileno glicol) monometil éter (mPEG) (Aldrich, M_n 400 g.mol⁻¹); sulfato de magnésio (Sigma-Aldrich, +97%); tetrahidrofurano (THF) (Fisher Chemical).

O 2-(dimetilamino)etil metacrilato (DMAEMA) (Aldrich, 98%) foi passado por colunas de areia e alumina para remoção do inibidor; o 4-(dimetil amino)piridina (DMAP) (Sigma-Aldrich, +99%) foi previamente recristalizado em tolueno; o diclorometano (DCM) (Fisher Scientific, +99,6%) seco por destilação com hidreto de cálcio seco; o dimetilsulfóxido (DMSO) (Fisher Chemical), destilado e seco sobre condições de baixa pressão; a trietilamina (TEA) (Sigma-Aldrich, 96%) foi também destilada.

Para a Cromatografia por Exclusão de Tamanhos (SEC) foram usados *standards* de poli(metil metacrilato) (PMMA) (Polymer Laboratories) (Acros, 99% , ~70 mesh) e para a cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) foi usado DMF (Panreac, HPLC grade), que foi usado como recebido.

2.1.2. SÍNTESE DO MACROINICIADOR PEG-BR

Em muitas situações é necessário remover os resíduos de água dos reagentes de forma a que os procedimentos de síntese posteriores sejam levados a cabo em condições inertes. No caso do PEG, a água é retirada por destilação azeotrópica em tolueno. Com este procedimento garante-se que não existe água no sistema que possa vir a reagir com os brometos de ácido utilizados para a esterificação do PEG.

Em primeiro lugar o mPEG e o tolueno são adicionados a um balão de fundo redondo com uma entrada, numa proporção de 1:4 (ou seja, por 20 g de PEG, adicionam-se 80 mL de tolueno). O PEG foi dissolvido no tolueno através de agitação magnética. O balão deve estar ligado a um condensador e colocado num banho de óleo. Este banho foi de seguida aquecido até uma temperatura máxima de 130 °C. A reação deve ser mantida até que 75 a 90% do tolueno adicionado ser recolhido no copo de recolha. De seguida, o PEG foi arrefecido até atingir a temperatura ambiente e foi armazenado na hotte.⁵⁸

A síntese do Macroiniciador mPEG-Br foi adaptada de um procedimento descrito na literatura.⁵⁹ O DMAP (2,75 g, 22,5 mmol) foi dissolvido em 10 mL de diclorometano (DCM) seco, obtido previamente por destilação em hidreto de cálcio. A esta solução foi adicionada a TEA (2,10 mL, 15 mmol), sendo o total depois transferido para um balão de fundo redondo com três entradas, preparado previamente com entrada e saída de gás e agitação magnética. Colocou-se o balão num banho de gelo, para que a temperatura atingisse os 0 °C. O BBiB (4,64 mL, 37,5 mmol) (previamente dissolvido em 10 mL de DCM seco) é adicionado gota a gota, formando uma dispersão amarela. De seguida, o mPEG (M_n 1000 g.mol⁻¹) (15,00 g, 15,0 mmol) (previamente seco por destilação azeotrópica), dissolvido em 50 mL de DCM seco, é adicionado gota a gota durante uma hora sob atmosfera de azoto. A temperatura foi elevada à temperatura ambiente, mantendo-se a reação durante 24 horas com agitação magnética. Para purificar o polímero, a solução foi filtrada e metade do solvente foi evaporado através de evaporação rotativa, sendo de seguida precipitada em éter dietílico frio. O produto foi filtrado, lavado com éter dietílico e seco sob vácuo.

Uma vez que o processo de purificação acima descrito revelou graves problemas ao nível da sua eficiência, isto é, apenas uma pequena percentagem do polímero inicial era recuperada após a purificação, foi encontrado um procedimento alternativo para a purificação do macroiniciador.⁶⁰ Deste modo, seguiu-se um procedimento idêntico ao já descrito para a síntese do mPEG-Br. No entanto, para efeitos de purificação do polímero,

a solução foi filtrada e metade do solvente foi evaporado por evaporação rotativa. A solução foi precipitada em éter dietílico frio e seca sob vácuo. O polímero foi dissolvido em água Milli-Q a pH 8-9, sendo depois extraído com diclorometano, sendo as camadas orgânicas secas com sulfato de magnésio durante a noite. A solução foi filtrada e o diclorometano removido através de evaporação rotativa, sendo depois precipitada em éter dietílico frio e seca sob vácuo.

A reação de síntese do macroiniciador mPEG-Br é catalisada por duas substâncias: o DMAP e a TEA. Neste trabalho foram sintetizados três macroiniciadores mPEG-Br com pesos moleculares que variaram entre os 2000 g.mol⁻¹ e os 400 g.mol⁻¹, o que levantou uma questão relativamente à quantidade de catalisador necessária. Sabe-se que, para a mesma massa inicial de polímero, à medida que o seu peso molecular diminui, aumenta a quantidade de catalisador a usar. Surgiu assim a necessidade de encontrar um método alternativo que permitisse diminuir a quantidade de catalisador utilizada. Este novo método eliminou a necessidade de secar previamente o mPEG. Assim, o mPEG (M_n 400 g.mol⁻¹) (25 g, 62,5 mmol) foi dissolvido em 300 mL de tolueno num balão de fundo redondo com três entradas. Depois da destilação azeotrópica de 30 a 40 mL de tolueno a pressão reduzida para remover resíduos de água, foi adicionada a TEA (15 mL, 107,63 mmol) e o balão foi depois colocado num banho de gelo de modo a baixar a temperatura para os 0 °C. Seguidamente, adicionou-se o BBiB (14,99 mL, 121,25 mmol), gota a gota, através de uma seringa, durante uma hora. A reação foi mantida durante 24 horas, com agitação magnética e à temperatura ambiente.⁶⁰ O processo de purificação adotado foi igual ao segundo método de purificação apresentado.

2.1.3. SÍNTESE DO PDMAEMA E PEG-*b*-PDMAEMA

A síntese do PDMAEMA foi efetuada por SARA ATRP do DMAEMA e catalisada por um sistema de [Fe(0)]₀/[CuBr₂]₀/[PMDETA]₀ = 1/0,1/1,1.²⁴

Para um grau de polimerização (DP) igual a 100, foi pesada num reator *Schlenk* uma mistura de CuBr₂ (4,26 mg, 0,02 mmol), PMDETA (36,38 mg, 0,21 mmol), IPA (2,89 ml) e água Milli-Q (321,5 µL) (solventes previamente borbulhados com azoto durante 15 minutos). De seguida, adicionou-se ao reator o DMAEMA (3 g, 19,08 mmol) e o EBiB (37,22 mg, 0,19 mmol). Por fim, adicionou-se Fe(0) (10,66 mg, 0,19 mmol). A amostra foi agitada e depois congelada em azoto líquido. O reator *Schlenk* com a mistura da reação foi assim desoxigenado através de quatro ciclos de degaseificação

(congelamento-vácuo-descongelamento), sendo introduzido azoto após o último ciclo, de modo a garantir que a reação decorre sob atmosfera de azoto. O reator foi então colocado num banho de óleo à temperatura da reação (25 °C) com agitação magnética. A reação foi parada ao fim de 2,5 horas de forma a obter o peso molecular necessário (com base na cinética da reação efetuada). Para efeitos de purificação, o PDMAEMA foi precipitado em *n*-hexano e dissolvido novamente em THF, sendo depois passado numa coluna de alumina para remover os catalisadores metálicos. A solução foi concentrada sob baixa pressão num evaporador rotativo e reprecipitada em *n*-hexano. O polímero foi colocado numa estufa de vácuo durante uma noite a 40 °C.

A síntese do copolímero de PEG-*b*-PDMAEMA foi feita de modo semelhante ao descrito acima. Assim, para um DP igual a 28, num reator *Schlenk* foi pesada uma mistura de CuBr₂ (71,02 mg, 0,32 mmol), PMDETA (606,07 mg, 3,50 mmol), IPA (13,50 mL) e água Milli-Q (1,5 mL) (solventes previamente borbulhados com azoto durante 15 minutos). De seguida, adicionou-se ao reator o DMAEMA (14 g, 89,02 mmol) e o mPEG-Br (3,65 g, 3,18 mmol). Por fim, adicionou-se Fe(0) (177,6 mg, 3,18 mmol). A amostra foi agitada até à completa dissolução do iniciador mPEG-Br e depois congelada em azoto líquido. O reator *Schlenk* com a mistura da reação foi desoxigenado através de quatro ciclos de degaseificação (congelamento-vácuo-descongelamento), sendo introduzido azoto após o último ciclo, de modo a garantir que a reação decorre sob atmosfera de azoto. O reator foi então colocado num banho de óleo à temperatura da reação, neste caso 50 °C, dado que o iniciador mPEG-Br não é muito solúvel em IPA a 20 °C, com agitação magnética. A reação foi parada ao fim de 4 horas de forma a obter o peso molecular pretendido (com base na cinética da reação previamente realizada). Para efeitos de purificação, o copolímero foi precipitado em *n*-hexano e dissolvido novamente em THF, sendo depois passado numa coluna de alumina para remover os catalisadores metálicos. A solução foi concentrada sob baixa pressão num evaporador rotativo e reprecipitada em *n*-hexano. O polímero foi colocado numa estufa de vácuo durante uma noite a 40 °C.

2.1.4. SÍNTESE DO P β AE

O α,ω -acrilato-poli(β -amino-éster) foi sintetizado através de uma reação de adição de Michael, já descrita na literatura.^{33,28} O 5-amino-1-pentanol (1,5 g, 14,54 mmol) foi pesado num *vial* opaco, ao qual foi adicionado o diacrilato de 1-4-butanodiol (2,67 mL, 14,54 mmol). Depois de inserir uma barra magnética com revestimento de *teflon*, o *vial*

foi selado com uma tampa de rosca e fita de *teflon*. De seguida, a reação foi colocada num banho pré-aquecido a 90 °C com agitação. Ao fim de 6 horas foi feita uma segunda adição de 5-amino-1-pentanol (0,5 g, 4,85 mmol) e de diacrilato de 1-4-butanodiol (1,067 mL, 5,82 mmol). Passadas 12 horas sobre o início da reação, foi feita ainda uma terceira adição de monómeros, com quantidades iguais às da segunda. Nesta fase foi ainda adicionado 1 mL de DMSO seco. Decorridas 24 horas, a reação foi arrefecida até atingir a temperatura ambiente e foi precipitada e lavada três vezes com éter dietílico frio. O polímero foi seco durante a noite numa estufa com vácuo a 40 °C. O polímero foi armazenado a -20 °C até ser usado.

2.1.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

Para a caracterização das várias características físicas dos polímeros sintetizados foram usadas duas técnicas: a Cromatografia por Exclusão de Tamanhos e a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.

2.1.5.1. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHOS (SEC)

Neste trabalho, o equipamento de SEC utilizado foi um Viscotek (detetor Dual 270, Viscotek, Houston, EUA) equipado com um viscosímetro diferencial (DV), um *light scattering* (RALLS, Viscotek) e um detetor de índice de refração (RI, Knauer K-2301). O sistema de coluna era constituído por uma coluna de guarda PL 10 mm (50×7,5 mm²) seguida por duas colunas MIXED PL-B (300×7,5 mm², 10mm). Com o auxílio de uma bomba HPLC (Knauer K-1001) o caudal foi mantido a 1 mL/min. As medições foram realizadas com uma solução a 0,02% de LiBr em DMF a 60 °C, usando para isso um aquecedor Elder CH-150. O sistema tem também acoplado um degaseificador Knauer *online*. Antes da injeção da amostra, esta foi filtrada com uma membrana de tetrafluoretileno (PTFE) com poros com 0,2 µm. Para a determinação dos pesos moleculares (médio e ponderado) e da dispersividade foi utilizado o *software* OmniSEC 4.6.1.354, com a convecção convencional, tendo o sistema sido calibrado com padrões de PMMA.

2.1.5.2. ESPETROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As amostras poliméricas, quer das misturas reacionais, quer dos polímeros purificados, foram analisadas num espectrómetro Bruker Advance III 400 MHz, com um detetor de tripla ressonância de 5-mm TXI, utilizando como solvente da amostra CDCl_3 com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

A análise dos espectros de RMN foi feita com recurso ao *software* MestReNova 6.0.2-5475, que permitiu integrar os picos relativos aos diferentes monómeros e polímeros, permitindo assim saber a conversão da reação e o peso molecular do polímero.

2.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DOS POLIPLEXOS

2.2.1. MATERIAIS

No estudo da atividade biológica foram usados os seguintes materiais: ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich); albumina do soro bovino (BSA) (Sigma); cloreto de magnésio (MgCl_2) (Sigma); DCTM Protein Assay (Bio-Rad); DL-ditiotretitol (Sigma); D-luciferina; sal sódico (Synchem, 99%); Dulbecco's modified Eagle medium – high glucose (DMEM-HG) (Sigma-Aldrich); glicerol (Sigma); PEI (ramificado, M_w 25000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Sigma); plasmídeo que codifica a luciferase (pCMV.Luc) (Vical); resazurina; sal sódico (Sigma-Aldrich); tri-fosfato (Sigma); TritonTM X-100 (Sigma).

2.2.2. LINHA CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

A linha celular COS-7 deriva do rim do Macaco Verde Africano, *Cercopithecus aethiops*. Estas células são semelhantes a fibroblastos humanos e adequam-se à transfeção através de vetores, razão pela qual foram escolhidas para a realização deste estudo.

As células COS-7 foram mantidas no meio de cultura Dulbecco's modified Eagle medium – high glucose (DMEM-HG) (Sigma-Aldrich, MO, USA), contendo 10% (V/V) de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS) (Sigma-Aldrich, MO, USA), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO_2 . As células foram cultivadas em frascos de 75 cm^2 (Corning®) efetuando-se a sua passagem

duas vezes por semana, de modo a não ultrapassar uma confluência superior a 80%. Para a passagem das células, primeiro procedeu-se à remoção do meio de cultura, seguida de uma lavagem com PBS. Depois, adicionaram-se 1,5 mL de tripsina, para destacar as células, e o frasco foi colocado na incubadora (durante aproximadamente 5 minutos) para garantir que as células ficassem em suspensão. Imediatamente depois, foram adicionados 8,5 mL de meio de cultura, para inativar a ação da tripsina, de modo a perfazer 10 mL no total. A linha celular foi passada numa razão de 1:10 para um novo frasco, ao qual foram adicionados 20 mL de novo meio de cultura.

2.2.3. PREPARAÇÃO DOS POLIPLEXOS

Para analisar o comportamento dos polímeros anteriormente sintetizados em termos de capacidade para mediar transfeção e em termos de viabilidade celular, foram preparados complexos de polímero e DNA (poliplexos).

Em termos práticos, para a correta preparação dos poliplexos é necessário calcular a massa de cada polímero em cada formulação. Esta massa é calculada de acordo com a Equação 1, em que N é o rácio de polímero no N/P, $3,03 \times 10^{-9}$ é o número de cargas negativas presentes numa micrograma de DNA (massa de DNA usada para a preparação dos poliplexos), $\text{cargas}^+ \cdot n_{\text{polímero}}^{-1}$ é a quantidade de cargas positivas por mol de polímero, M_n é a massa molar média do polímero e α é a fração molar com que o dado polímero contribui para a formulação em causa ($\alpha = \frac{\% \text{ molar}}{100}$).

$$\text{massa}_x = N \times \frac{3,03 \times 10^{-9}}{\text{cargas}^+ \cdot n_{\text{polímero}}^{-1}} \times M_n \times \alpha$$

Equação 1: Cálculo da massa de cada polímero numa dada formulação.

Assim, várias combinações com diferentes percentagens de cada polímero foram dissolvidas em água milli-Q e misturados com 1 μg de pCMV-Luc (plasmídeo que contém o gene da luciferase) de acordo com o rácio de carga polímero/DNA (N/P, +/-) pretendido. Os poliplexos foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente, período após o qual foram imediatamente usados.

2.2.4. TRANSFEÇÃO *IN VITRO* – ENSAIO DE LUMINESCÊNCIA

Para avaliar a sua capacidade de transfeção, os polímeros foram complexados com um plasmídeo de DNA que contém o gene da luciferase. A enzima luciferase é encontrada em organismos que emitem luz naturalmente (bioluminescência), como os pirilampos. Na presença da luciferase, a luciferina é convertida a oxiluciferina, havendo também libertação de energia na forma de luz, sendo esta facilmente quantificada (Figura 12). Como a reação só pode ser catalisada pela luciferase, é possível relacionar a quantidade de luz emitida com a quantidade de luciferase presente na amostra, ou seja, com a expressão do gene que foi introduzido nas células pelos vetores poliméricos. Esta técnica é bastante sensível, sendo indicada para a análise de amostras com pequenas diferenças. Ao contrário de outras técnicas, o ensaio de luminescência quantifica o transgene expresso pelas células e não a quantidade de células transfectadas.



Figura 12: Reação catalisada pela luciferase e que conduz à emissão de luz.

De modo a realizar os ensaios de transfeção, as células COS-7 foram plaqueadas aquando de um estado de confluência de 70 a 80%, ou seja, numa fase ótima de crescimento. Em primeiro lugar, as células foram tripsinizadas e suspensas em meio de cultura, sendo depois determinada a densidade de células na suspensão através da contagem de células num hemocitómetro. Para efeitos de avaliação da expressão da luciferase, foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células por poço em placas de 48 poços. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 300 μL de DMEM-HG (com ou sem soro). De seguida, foram adicionados 50 μL de poliplexos (correspondendo a 1 μg de DNA) a cada poço. As células foram depois incubadas durante 4 horas (a 37°C e sob uma atmosfera de 5% de CO_2), sendo depois o seu meio removido e substituído com DMEM-HG com 10% (V/V) de soro e antibióticos e as células incubadas por mais 44 horas para permitir a expressão do gene da luciferase.

Passadas 48h sobre a transfeção, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e 100 μL de tampão de lise [1 mM ditioneitol; 1 mM EDTA; 25 mM tri-fosfato (pH 7,8); 8 mM MgCl_2 ; 15% glicerol; 1% v/v TritonTM X-100] foram adicionados a cada poço. A quantificação da expressão de luciferase nas células lisadas foi feita através da deteção da produção de luz pela luciferase num luminómetro Lmax

II384 (Molecular Devices). A proteína total das células lisadas foi medida com o DC™ Protein Assay (Bio-Rad) com padrões de albumina do soro bovino (BSA). Os dados obtidos foram expressos em Unidades Relativas de Luz (RLU) de luciferase por miligrama de proteína total celular.

2.2.5. VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada através de um ensaio modificado de *Alamar Blue*, paralelamente ao ensaio de luminescência. Esta técnica permite medir o potencial de oxidação/redução das células decorrente da produção de metabolitos em resultado do crescimento celular e possibilita a determinação da viabilidade durante o ensaio sem destacar as células (aderentes). Este corante azul é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas (presentes em células metabolicamente ativas) ao aceitar elétrons e, conseqüentemente, sofre uma alteração do seu tom para rosa fluorescente.

Assim, 47 horas após a transfeção, as células foram incubadas com 300 µL de uma solução a 10% (v/v) de corante *Alamar Blue* em DMEM-HG, preparado a partir de uma solução stock de 0,1 mg/mL de *Alamar Blue*. Uma hora após a incubação, foram pipetados, de cada poço, 180 µL de sobrenadante para uma placa transparente de 96 poços. De seguida, a absorvância das amostras foi medida a 570 e 600 nm, num espectrofotómetro SPECTRAMax PLUS 384 (Molecular Devices). A viabilidade celular (apresentada como uma percentagem de células controlo não tratadas) foi calculada de acordo com a fórmula $(A_{570}-A_{600})$ de células tratadas $\times 100/(A_{570}-A_{600})$ de células de controlo.⁶¹

2.2.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLIPLÉXOS

A caracterização físico-química dos complexos polímero/DNA foi feita em termos de tamanho, carga eléctrica superficial e protecção do DNA dada pelos polímeros.

2.2.6.1. ANÁLISE DA DIFUSÃO DINÂMICA DA LUZ (DLS) E POTENCIAL ZETA

O tamanho das nanopartículas pode ser determinado pela difusão dinâmica da luz (DLS). Este método baseia-se no movimento *browniano* das nanopartículas suspensas num líquido, que provoca a dispersão da luz com diferentes intensidades. A análise da

variação da intensidade permite calcular a velocidade com que as partículas se movem e, conseqüentemente, o tamanho da partícula. O potencial zeta é uma medida da carga elétrica à superfície das nanopartículas, baseada na mobilidade eletroforética resultante da aplicação de um campo elétrico.

As medições de DLS foram realizadas num Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). A distribuição de tamanhos das partículas (em intensidade), o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (z-médio) e o índice de polidispersividade (PDI) foram determinados com o *software* Zetasizer 6.20. As medidas foram efetuadas a 25 °C e com um ângulo de dispersão oposto de 173°.

As medições do potencial zeta foram também realizadas num Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) acoplado a um laser de eletroforese doppler. Esta grandeza foi determinada através do modelo de *Smoluchovski*.

Para a realização destes ensaios, os polímeros foram dissolvidos em água Milli-Q e misturados com 4 µg de pCMV-Luc de acordo com o rácio de carga polímero/DNA (N/P, +/-) pretendido e com a concentração utilizada nos ensaios de atividade biológica (tal como descrito no ponto 2.2.3). Os poliplexos foram incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, período após o qual foram imediatamente usados. Foram realizados dois ensaios independentes, em triplicado, tanto para o tamanho como para o potencial zeta das nanopartículas.

2.2.6.2. ENSAIO DE INTERCALAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO

A condensação do DNA provocada pelos polímeros em estudo foi analisada através do ensaio de intercalação do brometo de etídio (EtBr).

Os poliplexos foram preparados de acordo com o ponto 2.2.3. Passados os 15 minutos de incubação, foram transferidos 50 µL de cada amostra para uma placa de 96 poços preta (Costar, Cambridge, CA, USA). De seguida, 50 µL de uma solução de EtBr foi adicionada de forma a atingir uma concentração final de 400 nM. Após um período de incubação de 10 minutos, a fluorescência foi medida num fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a $\lambda_{exc} = 518$ nm e $\lambda_{em} = 605$ nm.

A escala de fluorescência foi calibrada de forma a que a fluorescência inicial do EtBr fosse estabelecida como a fluorescência residual. Para tal, adicionaram-se 50 µL de solução de EtBr a 50 µL de água Milli-Q, de modo a obter uma concentração final de EtBr de 400 nM. O valor de fluorescência obtido com 1 µg de DNA isolado, dissolvido

em 50 μL de água Milli-Q (controle), foi estabelecido como o máximo (100%). A quantidade de DNA disponível para interagir com a sonda foi calculado subtraindo o valor da fluorescência residual aos valores obtidos para as amostras e expresso como percentagem do controle.

Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo deste trabalho. Dada a sua natureza, esta secção está dividida em duas partes: a caracterização dos polímeros sintetizados e a avaliação da atividade biológica das nanopartículas formadas por esses mesmos polímeros.

3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

Dado o objetivo deste trabalho, o desenvolvimento de nanopartículas de base polimérica para entrega de material genético, foram sintetizados três tipos de polímeros: PEG-*b-b*-PDMAEMA, PDMAEMA e PβAE. Como referido no ponto 1.4, a escolha destes três polímeros foi feita com base nos resultados promissores apresentados na literatura. Assim, nesta subsecção serão apresentados e discutidos os resultados relativos à síntese destes polímeros, com especial ênfase nos pesos moleculares e *D*.

3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO MACROINICIADOR PEG-Br

A primeira fase deste trabalho consistiu em sintetizar três macroiniciadores PEG-Br, com diferentes pesos moleculares (400, 1000 e 2000 g.mol⁻¹), com o objetivo de os mesmos serem posteriormente utilizados na síntese dos copolímeros de PEG-*b*-PDMAEMA. Os macroiniciadores PEG-Br foram sintetizados através da esterificação do polímero PEG com brometo de α-bromoisobutirilo (Figura 13), de acordo com o procedimento experimental mencionado no ponto 2.1.2.

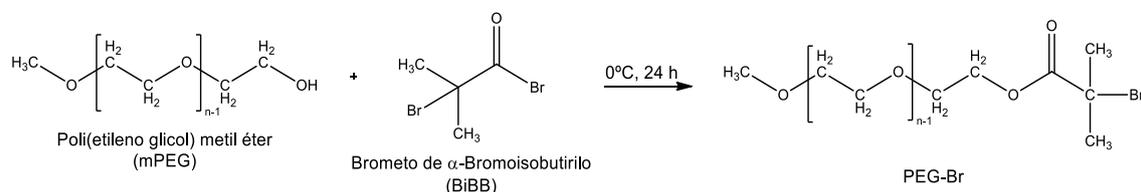


Figura 13: Reação de esterificação do PEG.⁶²

Com a reação de esterificação pretende-se funcionalizar o PEG, ou seja, substituir o grupo hidroxilo (OH) presente no terminal da cadeia polimérica e introduzir um halogéneo (bromo, neste caso) no seu lugar. Esta modificação na estrutura química

do polímero permite que o mesmo seja mais tarde utilizado para a síntese do copolímero de PEG-*b*-PDMAEMA, assumindo o PEG-Br o papel de macroiniciador na reação de ATRP, cujo mecanismo está descrito no ponto 1.3.1.3.

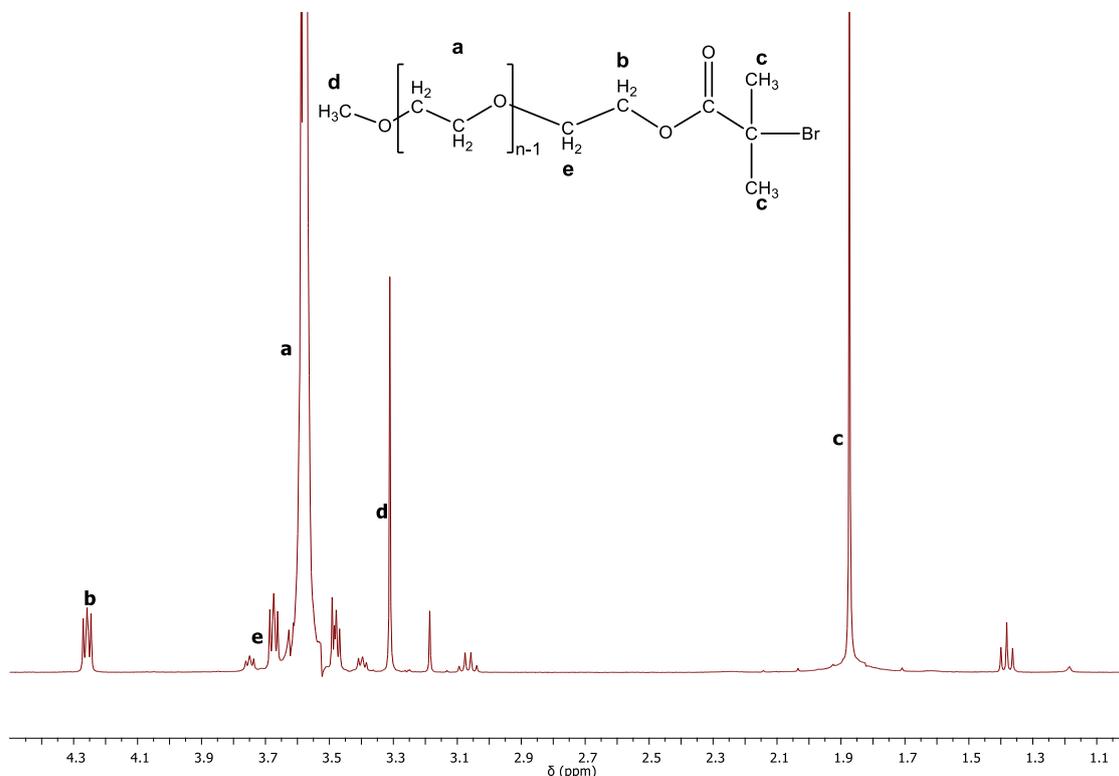


Figura 14: Espectro de ¹H RMN de PEG₁₀₀₀-Br puro em CDCl₃.

Após a síntese e purificação dos macroiniciadores PEG-Br, procedeu-se à sua análise pelas técnicas de ¹H RMN e SEC, oferecendo estas informações sobre o peso molecular e *D* do polímero. No caso de uma reação de esterificação, a análise do espectro de ¹H RMN é especialmente relevante, pois permite caracterizar a estrutura química do polímero através da observação dos desvios químicos presentes no seu espectro, dando assim a possibilidade de avaliar o grau de funcionalização atingido. Antes da sua funcionalização, o espectro de ¹H RMN do PEG diferencia-se pela presença de um pico a 2,45 ppm, relativo ao grupo hidroxilo. Assim, e como se pode comprovar pela Figura 14, o grupo referido foi substituído, dado que não é visível nenhum pico naquela localização. Ainda associados à esterificação do PEG estão os sinais de absorção de prótons a 4,33 ppm (2H, -CH₂-) e 1,94 ppm (6H, -CH₃-) ((b) e (c), respetivamente). Tendo em consideração que o pico a 3,33 ppm (d) corresponde a um grupo metil, ou seja, a três prótons, a área de integração dos picos c, b e d terá de obedecer à proporção 6:2:3, sendo esta garantia de uma correta funcionalização do PEG, ou seja, da formação do

macroiniciador PEG-Br.⁶² O espectro de ¹H RMN permite ainda calcular o grau de polimerização (DP) do PEG, cujo valor é assim dado pelo quociente entre a área de integração do pico a 3,57 ppm (a) e o número de prótons a que se refere (quatro). Na Tabela 5 são apresentados os resultados relativos à esterificação dos três macroiniciadores, assim como os seus DP's, pesos moleculares calculados por RMN (M_n^{th}) e por SEC (M_n^{SEC}) e D . Os espectros de ¹H RMN dos restantes macroiniciadores PEG-Br encontram-se no Anexo 6.1.

Tabela 5: Caracterização dos macroiniciadores PEG-Br.

	Desvios Químicos (ppm)				DP	M_n^{th} (g.mol ⁻¹)	M_n^{SEC} (g.mol ⁻¹)	D
	3,57 (a)	4,33 (b)	1,94 (c)	3,33 (d)				
PEG ₄₀₀ -Br	32,35	2,18	7,09	3	8	356	793	1,113
PEG ₁₀₀₀ -Br	112,46	2,06	6,57	3	28	1234	1494	1,062
PEG ₂₀₀₀ -Br	208,16	2,29	6,58	3	52	2293	2796	1,060

Analisando os dados relativos às áreas de integração dos picos (b), (c) e (d) é possível concluir que os macroiniciadores foram corretamente sintetizados, dada a concordância entre a proporção acima referida e as obtidas. Pode-se assim concluir que os macroiniciadores sintetizados podem ser usados posteriormente para a síntese do copolímero de bloco PEG-*b*-PDMAEMA.

3.1.2. CARACTERIZAÇÃO DO PDMAEMA E PEG-*b*-PDMAEMA

A síntese do polímero de PDMAEMA e de PEG-*b*-PDMAEMA seguiu o procedimento mencionado no ponto 2.1.3. A escolha deste método foi motivada pelos seus atributos, que o tornam ideal para aplicações biomédicas. Esta metodologia de síntese, proposta por Cordeiro et al.²⁴, baseia-se num sistema catalítico de Fe(0) e CuBr₂ com PMDETA como ligando em IPA e H₂O. O PMDETA é um dos ligandos mais usados em ATRP devido à sua disponibilidade a nível comercial e baixo custo. Um dos solventes tipicamente utilizados na síntese de PDMAEMA é o IPA. Contudo, a introdução de pequenas quantidades de água no sistema proporciona um maior controlo sobre a polimerização, o que diminui significativamente os valores de D obtidos, e evita o uso de altas temperaturas de reação, podendo esta decorrer assim à temperatura ambiente (25 °C). Desta forma, os solventes utilizados foram o IPA e a H₂O, numa proporção de 9/1 (v/v), respetivamente. Por último, referir que o sistema catalítico eleito, composto por um

metal de valência zero (Fe(0)) e pequenas quantidade de CuBr₂, para além de permitir um estrito controlo e taxas mais elevadas de polimerização, é o mais indicado para aplicações biomédicas, pois o ferro é um metal biocompatível (o que facilita a purificação). Do ponto de vista ambiental, os solventes alcoólicos são também mais vantajosos. A reação de síntese do PDMAEMA é apresentada na Figura 15.

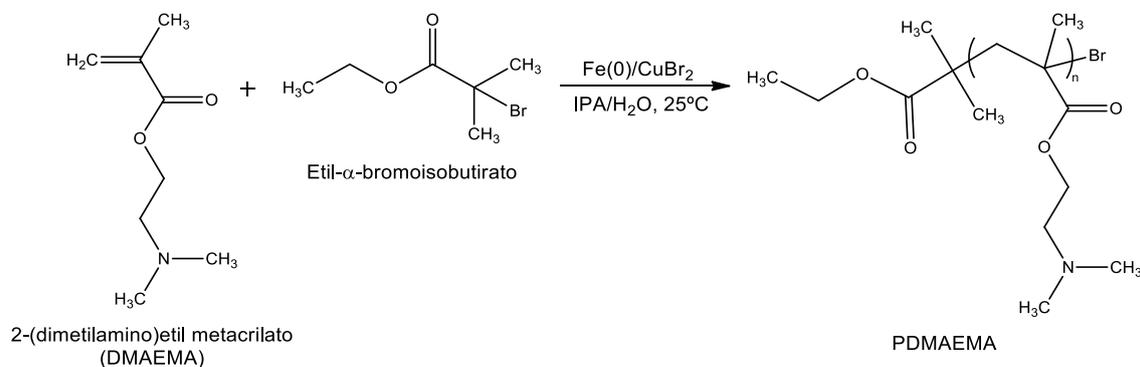


Figura 15: Reação de síntese do PDMAEMA por SARA ATRP.

Apesar da cinética da reação já se encontrar descrita na literatura, optou-se por realizar uma nova, de modo a melhor caracterizar o peso molecular e a \bar{D} do polímero ao longo da reação de síntese, assim como prever possíveis alterações no seu comportamento (Figura 17). No decorrer da reação foram recolhidas amostras da mistura reacional, que foram depois analisadas por SEC e RMN. A primeira técnica de caracterização oferece informação sobre o peso molecular médio (M_n^{SEC}) e a \bar{D} (M_w/M_n) do polímero, enquanto que a segunda a permite calcular a conversão da reação. A integração dos picos correspondentes à ressonância de prótons do monómero de DMAEMA (a 6 e 5,5 ppm) e de um pico característico do PDMAEMA, entre 1 e 0,7 ppm (picos (m₁) e (m₂) e (b+d), respetivamente - Figura 16) possibilita o cálculo da conversão (Equação 2), tendo esta estimativa base no número de prótons correspondentes a cada sinal.

$$\text{Conversão} = \frac{\frac{\delta(1 - 0,7)}{3}}{\frac{\delta(6) + \delta(5,5)}{2} + \frac{\delta(1 - 0,7)}{3}} \times 100 (\%)$$

Equação 2: Cálculo da conversão da reação.

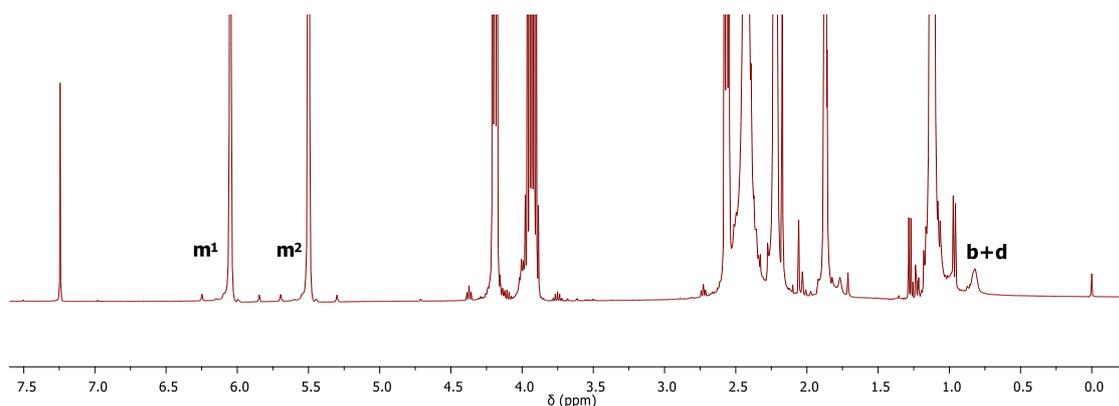


Figura 16: Espectro de ^1H RMN de uma amostra não purificada de PDMAEMA em CDCl_3 .

De acordo com a cinética obtida (Figura 17), foi possível obter conversões acima dos 80% e pesos moleculares relativamente controlados (\mathcal{D} abaixo dos 1,5). Ainda assim, estes valores ficam aquém dos descritos na literatura, podendo isso dever-se a fatores como a presença de impurezas no monómero ou a limitações no controlo da temperatura da reação, uma vez que a mesma decorreu à temperatura ambiente. A polimerização por RDRP tem cinética de primeira ordem, facto que se comprova, pois $\ln[M]_0/[M]$ varia linearmente com o tempo.

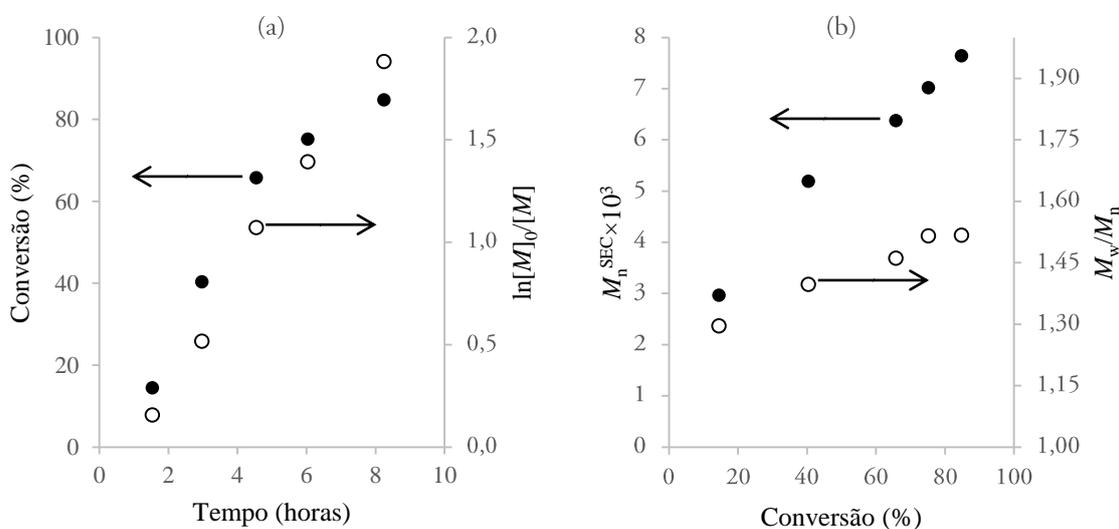


Figura 17: Representação gráfica da conversão e $\ln[M]_0/[M]$ em função do tempo (a) e de M_n^{SEC} e M_w/M_n (\mathcal{D}) em função da conversão para ATRP do DMAEMA em IPA/ H_2O . Condições: $[\text{DMAEMA}]_0/[\text{IPA}]/[\text{H}_2\text{O}] = 1/0,9/0,1$ (v/v); $[\text{DMAEMA}]_0/[\text{EBiB}]_0/[\text{Fe}(0)]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{PMDETA}]_0 = 100/1/1/0,1/1,1$ (molar).

Analisando as curvas de SEC das amostras (Figura 18), pode-se concluir que, para conversões acima dos 60%, algumas das cadeias perderam o terminal halogenado,

deixando assim de poder continuar a crescer, uma vez que as curvas estão um pouco sobrepostas, principalmente nas zonas de menor volume de retenção, o que explica o aumento da D .²⁴

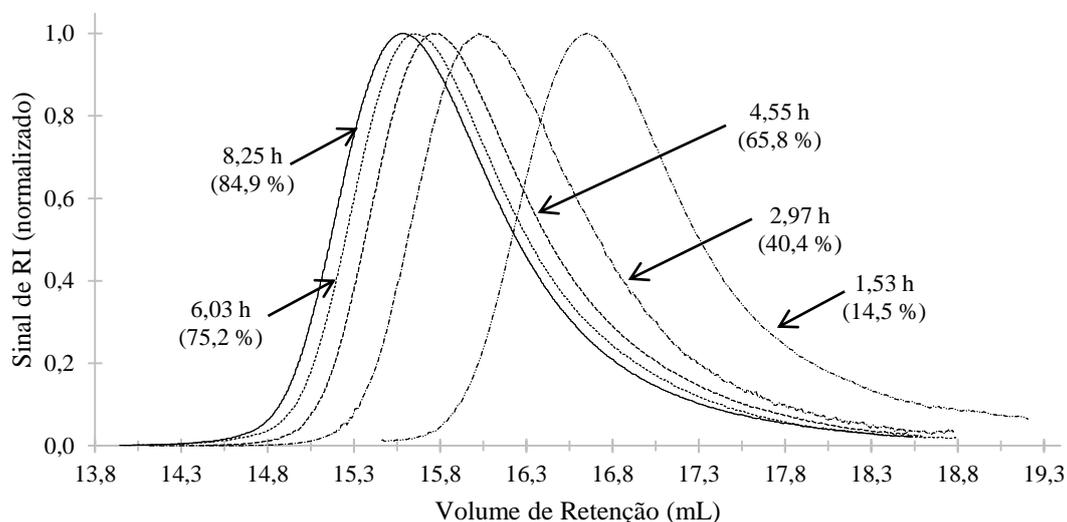


Figura 18: Curvas de SEC para as amostras de PMDMAEMA obtidas a diferentes tempos de reação. Condições: $[DMAEMA]_0/[IPA]/[H_2O] = 1/0,9/0,1$ (v/v); $[DMAEMA]_0/[EBiB]_0/[Fe(0)]_0/[CuBr_2]_0/[PMDETA]_0 = 100/1/1/0,1/1,1$ (molar).

Comparando a síntese do copolímero de bloco PEG-*b*-PDMAEMA com a do seu homopolímero, esta tem como diferenças o iniciador utilizado (enquanto que a síntese do PDMAEMA é feita com recurso ao iniciador EBiB, a do PEG-*b*-PDMAEMA é iniciada com o macroiniciador PEG-Br) e a temperatura de reação, que neste caso é 50 °C (para garantir a solubilidade do PEG-Br) (ponto 3.1.1 acima) (Figura 19). Dadas as semelhanças entre as cinéticas da síntese dos copolímeros de bloco e a acima explorada, as mesmas não serão aqui documentadas.

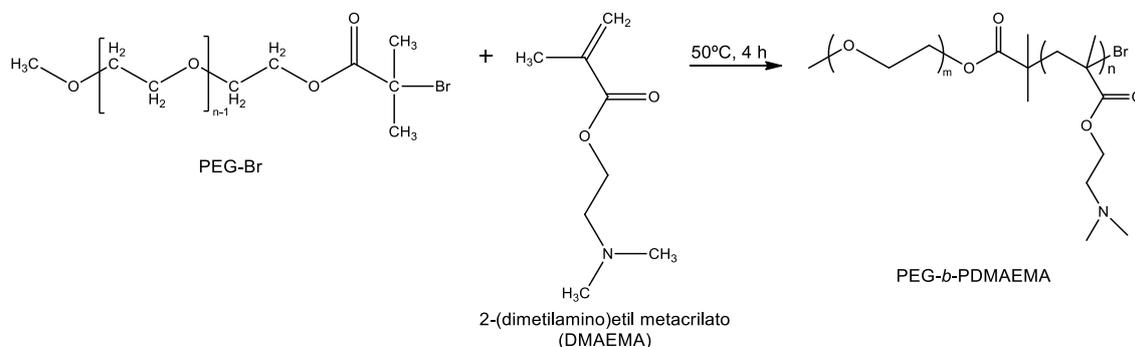


Figura 19: Reação de síntese do PEG-*b*-PDMAEMA por SARA ATRP.

Assim, prosseguiu-se para a segunda parte de síntese polimérica, a do polímero PDMAEMA e dos copolímeros de bloco PEG-*b*-PDMAEMA. Estas reações foram projetadas tendo em mente a informação obtida na reação de cinética do PDMAEMA (Figura 17). Uma vez que para conversões acima dos 60% a \bar{D} do polímero é relativamente elevada, teve-se como objetivo parar a reação a um tempo que correspondesse a uma conversão inferior a esse valor (ou seja, tempos de reação entre as 3 e 5 horas). Quanto ao DP da reação, o seu valor foi planeado para que à conversão referida o polímero tivesse uma massa molecular de DMAEMA entre os 5000 e 7500 g.mol⁻¹. Os quatro polímeros sintetizados encontram-se caracterizados na Tabela 6, sendo que todos os valores são relativos a amostras de polímero purificado.

Tabela 6: Propriedades do homopolímero e copolímeros sintetizados.

	Tempo de reação (min)	PEG		PDMAEMA		PEG- <i>b</i> -PDMAEMA	M_n^{SEC} (g.mol ⁻¹)	\bar{D}
		DP	M_n^{th} (g.mol ⁻¹)	DP	M_n^{th} (g.mol ⁻¹)	M_n^{th} (g.mol ⁻¹)		
PDMAEMA	300	–	–	63	10229	–	7187	1,41
PEG ₄₀₀ - <i>b</i> -PDMAEMA	240	11	485	42	6603	7237	5333	1,33
PEG ₁₀₀₀ - <i>b</i> -PDMAEMA	195	26	1146	48	7546	8886	8564	1,25
PEG ₂₀₀₀ - <i>b</i> -PDMAEMA	195	44	1939	32	5031	7119	7694	1,35

Todos os polímeros foram analisados por SEC e ¹H RMN, de modo a obter parâmetros como a \bar{D} e o peso molecular. Este último é particularmente importante na fase seguinte do trabalho, na medida em que, sabendo que cada monómero de DMAEMA tem um átomo de azoto, é possível saber qual é a massa de polímero necessária para preparar poliplexos com o rácio polímero/DNA N/P pretendido. Este assunto será mais explorado no ponto referente à Atividade Biológica das nanopartículas preparadas.

As estruturas químicas dos polímeros foram analisadas por ¹H RMN. Como já foi referido, esta técnica também permite calcular o peso molecular do polímero e, consequentemente, o seu DP (número de vezes que o monómero se repete ao longo de cada cadeia polimérica). O espectro de ¹H RMN obtido para o PDMAEMA (Figura 20) vai de encontro ao esperado, sendo semelhante ao exposto na literatura.²⁴ Assim, os sinais observados a 4,07 ppm (e) (2H, –CH₂–), a 2,58 ppm (f) (2H, –CH₂–), a 2,35-2,20 ppm (g) (6H, –N(CH₃)₂–), a 2,00-1,75 ppm (c) (2H, –CCH₂C–) e a 1,00-0,80 ppm (d) (3H, –

CCH₃Br-) estão de acordo com a estrutura química esperada para o PDMAEMA. Os prótons do grupo metil (CH₃-CH₂O-) (a) do iniciador EBiB são visíveis a 1,42 ppm. A integração deste sinal devia permitir calcular o peso molecular do polímero (integrando também um sinal relativo ao polímero, como o sinal (e), (f) ou (g)). Todavia, não foi possível delinear bem os limites para a integração do pico a, dada a sua indefinição, razão pela qual o valor do peso molecular teórico difere tanto do obtido por SEC (Tabela 6).

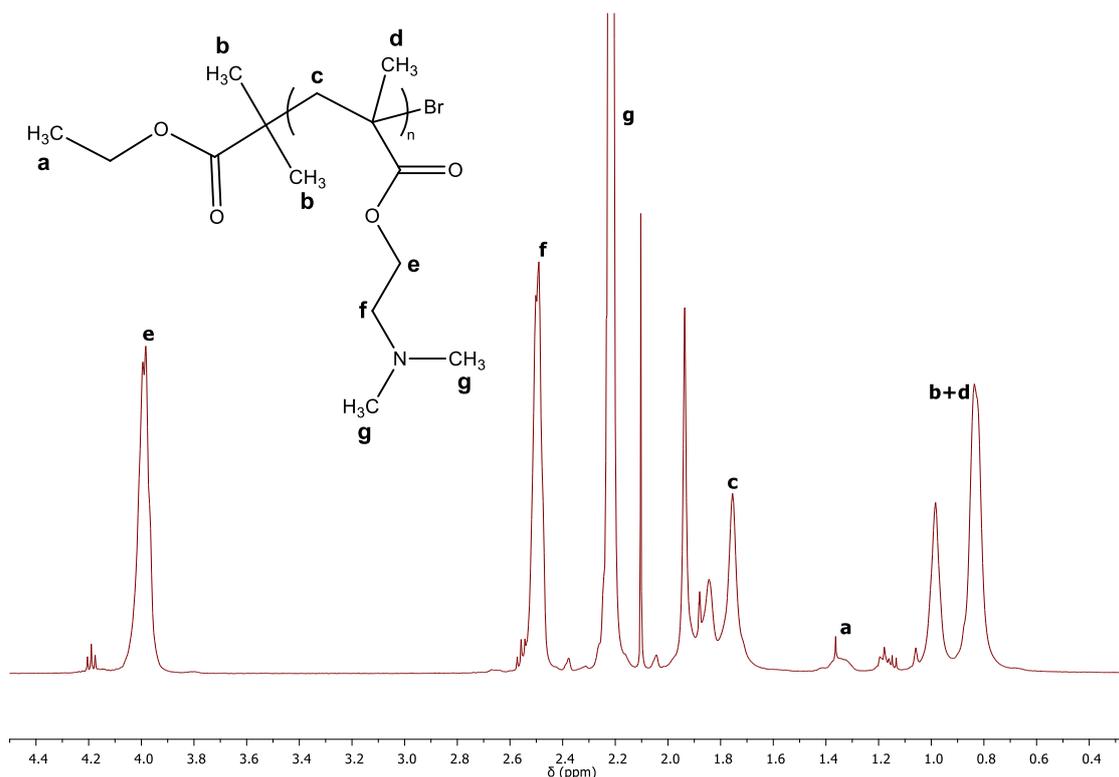


Figura 20: Espectro de ¹H RMN de PDMAEMA (purificado) em CDCl₃ ($M_n^{SEC} = 7187 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $D = 1,41$). Condições: [DMAEMA]₀/[IPA]/[H₂O] = 1/0,9/0,1 (v/v); [DMAEMA]₀/[EBiB]₀/[Fe(0)]₀/[CuBr₂]₀/[PMDETA]₀ = 100/1/1/0,1/1,1 (molar), temperatura ambiente).

No espectro de ¹H RMN do PEG-*b*-PDMAEMA podem ser visualizados os sinais de ressonância dos prótons do PDMAEMA e do PEG, o que comprova o sucesso da copolimerização (Figura 21). Assim, o sinal observado a 3,65 ppm (f) foi atribuído aos prótons do etileno do etileno glicol (4H, -O(CH₂)₂O-) e o a 3,35 ppm (g) aos prótons do grupo metil (3H, CH₃O-) do PEG. A partir deste último pico, o (g), é possível deduzir o DP de cada um dos segmentos do copolímero, assim como os seus pesos moleculares parciais e total (Tabela 6). Assim, assumindo que os picos do DMAEMA (e) e (c) correspondem, respetivamente, a 3 e 6 prótons, e tendo como termo de comparação o DP do segmento do PEG, é fácil calcular o DP do segmento de PDMAEMA. Considerando

o caso específico do copolímero PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA, obteve-se um DP do PDMAEMA de 48, que corresponde a um peso molecular de 7646 g.mol⁻¹, a que se deve somar o peso do segmento de PEG, de maneira a obter o peso molecular do copolímero, que, desta forma, é 8886 g.mol⁻¹.

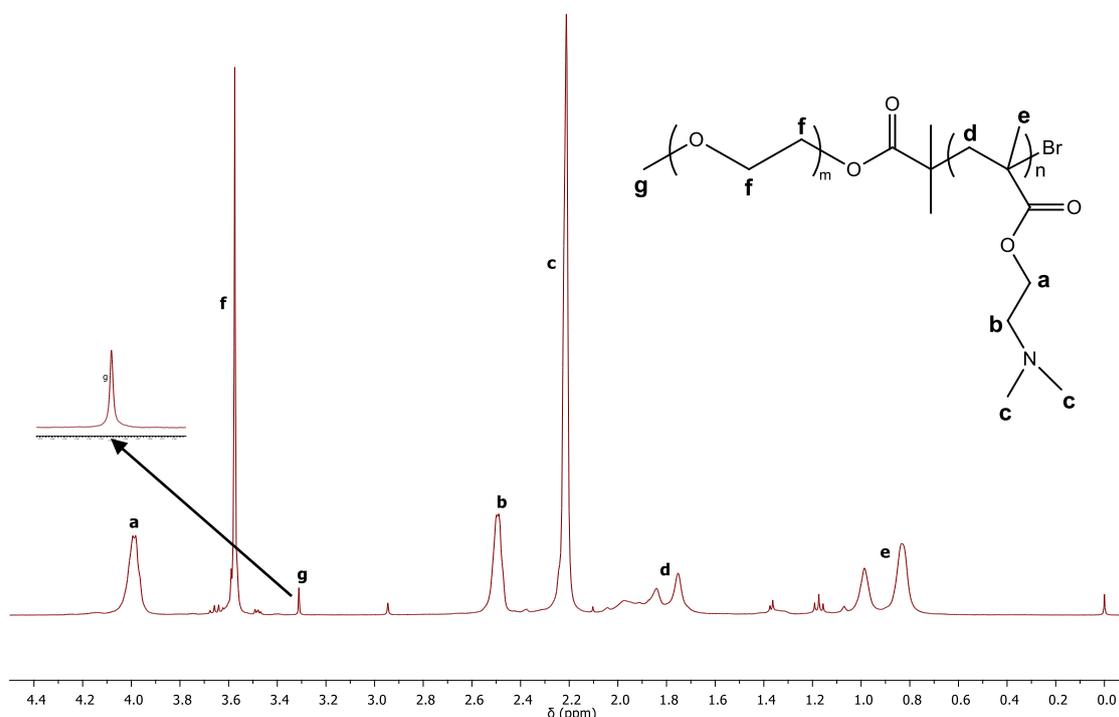


Figura 21: Espectro de ¹H RMN de PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA (purificado) em CDCl₃ ($M_n^{SEC} = 8564$ g.mol⁻¹, $D = 1,25$). Condições: [DMAEMA]₀/[IPA]/[H₂O] = 1/0,9/0,1 (v/v); [DMAEMA]₀/[mPEG₁₀₀₀-Br]₀/[Fe(0)]₀/[CuBr₂]₀/[PMDETA]₀ = 100/1/1/0,1/1,1 (molar), temperatura ambiente).

Por último, importa dizer que todas as polymerizações foram controladas (todos as D ficaram abaixo dos 1,5). Relativamente às diferenças entre os pesos moleculares calculados por ¹H RMN e os obtidos por SEC, estas podem ser justificadas, em primeiro lugar, pela própria diferença entre métodos de caracterização, e em segundo, pela calibração convencional usada na análise dos dados obtidos por SEC – neste ponto, para melhores resultados, devia ter sido calculado o dn/dc do polímero para as condições de operação do instrumento. Os espectros de ¹H RMN dos restantes copolímeros PEG-*b*-PDMAEMA estão disponíveis no Anexo 6.2.

3.1.3. CARACTERIZAÇÃO DO P β AE

O poli(β -amino éster) (P β AE) foi sintetizado por uma reação de adição de Michael, cujo procedimento está descrito no ponto 2.1.4 acima. O P β AE resulta da reação entre os monómeros diacrilato de 1,4-butanodiol e o 5-amino-1-pentanol, a uma temperatura de 90 °C, durante 24 horas (Figura 22). Referir ainda que esta reação de síntese não oferece condições para que exista um controlo estrito sobre o peso molecular e a D do polímero. O tempo de reação é assim o único parâmetro que deve ser ajustado, em função do peso molecular alvo.

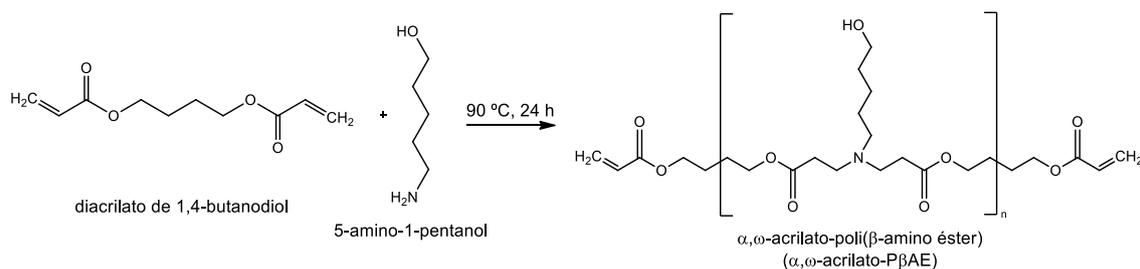


Figura 22: Síntese do α,ω -acrilato-poli(β -amino éster).

O P β AE sintetizado foi analisado por SEC e ^1H RMN, a fim de caracterizar a sua estrutura química. O espectro de ^1H RMN deste polímero (Figura 23) é caracterizado pelos sinais a 1,30-1,38 ppm (a_1) (2H), 1,42-1,49 ppm (a_2) (2H), 1,53-1,60 ppm (a_3) (2H), 1,65-1,77 (b) (4H), 2,35-2,46 ppm (c) (6H), 2,68-2,81 (d) (4H), 3,55-3,65 ppm (e) (2H), 4,03-4,14 ppm (f) (4H), 4,18-4,23 ppm (g) (4H), 4,31-4,38 ppm (h) (1H), 5,81-5,88 e 6,36-6,45 (i) (2H) e 6,06-6,18 (j) (2H). Estes desvios químicos estão de acordo com o esperado.¹⁷ A presença de sinais relativos aos prótons do terminal acrilato possibilita o cálculo do peso molecular do P β AE através da integração dos sinais (d) e (j).

$$M_{n,NMR} = DP \times m_{UR} + 2 \times m_T = DP \times 301,37858 + 2 \times 99,10788$$

$$\text{em que } DP = \frac{\int d}{\frac{\int j}{2}}$$

Equação 3: Cálculo por ^1H RMN do peso molecular do P β AE.

De acordo com a fórmula presente na Equação 3, em que m_{UR} e m_T são a massa molar da unidade de repetição e do terminal do P β AE, respetivamente, obteve-se um peso molecular de 8938 g.mol⁻¹, o que corresponde a um grau de polimerização igual a 29.

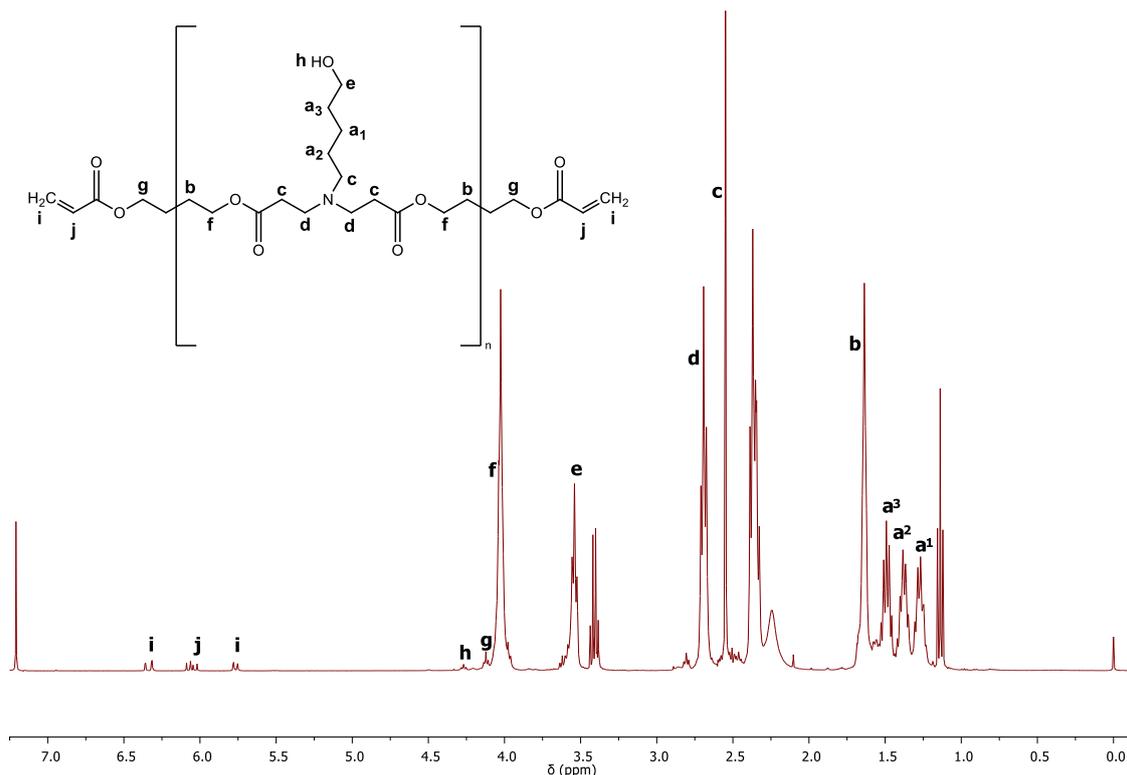


Figura 23: Espectro de ^1H RMN do α,ω -acrilato-poli(β -amino éster) em CDCl_3 .

Os resultados obtidos por SEC relativos ao polímero em nada são semelhantes aos acima apresentados ($M_n^{\text{SEC}} = 1821 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $D = 7,854$). Este desvio é expectável e justificado pela já descrita inexistência de controlo sobre a reação de adição de Michael que conduz à polimerização do P β AE.

Em suma, foram sintetizados cinco polímeros: três copolímeros de PEG-*b*-PDMAEMA e dois homopolímeros, um de PDMAEMA e outro de P β AE. Sendo o objetivo do presente trabalho o estudo da influência de um segmento de PEG num sistema de entrega de material genético baseado em polímeros de PDMAEMA e P β AE e havendo algumas limitações em termos de tempo, o estudo da atividade biológica incidirá apenas na combinação entre os polímeros totalmente catiónicos PDMAEMA e P β AE e um terceiro polímero, o PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA. Estes foram os polímeros escolhidos por duas razões: a semelhança entre o peso molecular do segmento de PDMAEMA no copolímero e no homopolímero e o facto do PEG presente no copolímero ter um valor central, de entre os três sintetizados. O próximo ponto será então dedicado à atividade biológica do conjunto de polímeros escolhidos.

3.2. ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DOS POLIPLEXOS

Após o desenvolvimento dos polímeros, o seu potencial de ação como vetores de entrega de material genético foi avaliado. Assim, neste ponto referente à atividade biológica e caracterização dos complexos formados pelos polímeros/DNA, irão ser apresentados e discutidos os dados relativos à atividade de transfeção *in vitro* e citotoxicidade induzida pelos poliplexos e à caracterização biofísica dos mesmos (tamanho, potencial elétrico da sua superfície e capacidade de proteção do DNA). De referir que, pelas razões já expostas no final do ponto anterior (3.1.3), apenas três dos polímeros sintetizados foram testados.

Tabela 7: Polímeros cujo potencial de ação como vetores de entrega de material genético foi avaliado.

	M_n (g.mol ⁻¹)	cargas ⁺ · $n_{polímero}^{-1}$
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA	8886	48
PβAE	8938	29
PDMAEMA	7187	44

Na Tabela 7 encontram-se descritas as propriedades dos polímeros testados, nomeadamente o seu peso molecular médio (M_n) e a quantidade (mol) de cargas positivas por mol de polímero. Uma vez que o objetivo deste trabalho é a avaliação do impacto do PEG sobre a combinação de polímeros PβAE e PDMAEMA, foi necessário desenhar um conjunto de formulações para a preparação dos poliplexos com estes três polímeros (Tabela 8).

Tabela 8: Percentagens de cada polímero usadas em cada formulação para a preparação dos poliplexos.

	% molar			% (g) PEG
	PβAE	PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA	PDMAEMA	
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA	0%	100%	0%	12,768
PβAE	100%	0%	0%	0,000
PDMAEMA	0%	0%	100%	0,000
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA (60 %)	40%	60%	0%	6,006
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA (30 %)	40%	30%	30%	3,116
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA (15 %)	40%	15%	45%	1,588
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA (10 %)	40%	10%	50%	1,066
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA (5 %)	40%	5%	55%	0,536
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA (2 %)	40%	2%	58%	0,215
PEG ₁₀₀₀ -PDMAEMA (0 %)	40%	0%	60%	0,000

De acordo com a Tabela 8, as formulações são caracterizadas pela introdução de uma percentagem decrescente (entre 60 e 0%) de copolímero PEG₁₀₀₀-PDMAEMA, sendo esta diminuição compensada pelo aumento da percentagem do homopolímero PDMAEMA. De forma a não introduzir mais variáveis no sistema, a percentagem de P β AE foi mantida constante (40%). Em termos de massa, o contributo do PEG para a massa total de polímero presente nas formulações varia entre os 6% (aproximadamente) e os 0%. Referir ainda que as três primeiras formulações apresentadas na Tabela 8 são compostas por 100% de cada um dos polímeros, funcionando, deste modo, como controlos. De forma a poder avaliar o impacto do rácio entre cargas positivas e negativas nos poliplexos, foram testados dois rácios polímero/DNA (N/P): 50/1 e 100/1. Esta escolha foi feita com base nos resultados presentes na literatura, que defendem ser estes os rácios com maior capacidade de transfeção para estes polímeros.¹⁷

Ainda para avaliar a *performance* destes polímeros catiónicos como agentes de transfeção, recorreu-se à bPEI (N/P 50/1), considerada como o *gold standard* dos sistemas poliméricos de entrega de material genético, e a um dos copolímeros PDMAEMA-*b*-P β AE-*b*-PDMAEMA desenvolvidos por Cordeiro et al., o PDMAEMA₃₀₀₀-*b*-P β AE₁₂₀₀₀-*b*-PDMAEMA₃₀₀₀ (denotado como 206), para efeitos de comparação.

3.2.1. TRANSFEÇÃO *IN VITRO* – ENSAIO DE LUMINESCÊNCIA

Os polímeros catiónicos desenvolvidos foram avaliados como vetores não-virais para entrega de material genético em células COS-7. A capacidade de transfeção foi analisada através de ensaios de luminescência, nos quais se avaliou a expressão da luciferase. Este ensaio é muito utilizado no estudo da capacidade de transfeção envolvendo a expressão de transgenes, pois permite obter resultados quantitativos de forma rápida e não muito dispendiosa, sendo possível medir a expressão do gene transfectado.

A atividade de transfeção dos polímeros e copolímero desenvolvidos foi avaliada tendo como base as condições mencionadas na Tabela 8. Como ilustrado na Figura 24, a combinação de polímeros proposta – PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA, P β AE e PDMAEMA – revela-se capaz de entregar o plasmídeo de DNA às células COS-7. Tal como já havia sido demonstrado na literatura²⁸, os homopolímeros PDMAEMA e P β AE têm uma baixa atividade de transfeção. Ainda assim, o PDMAEMA a um rácio N/P 100/1, aplicado num meio com soro, revela uma maior capacidade de transfeção que o P β AE, nas mesmas

condições. Quanto ao copolímero com PEG, este tem uma capacidade de transfeção muito reduzida.

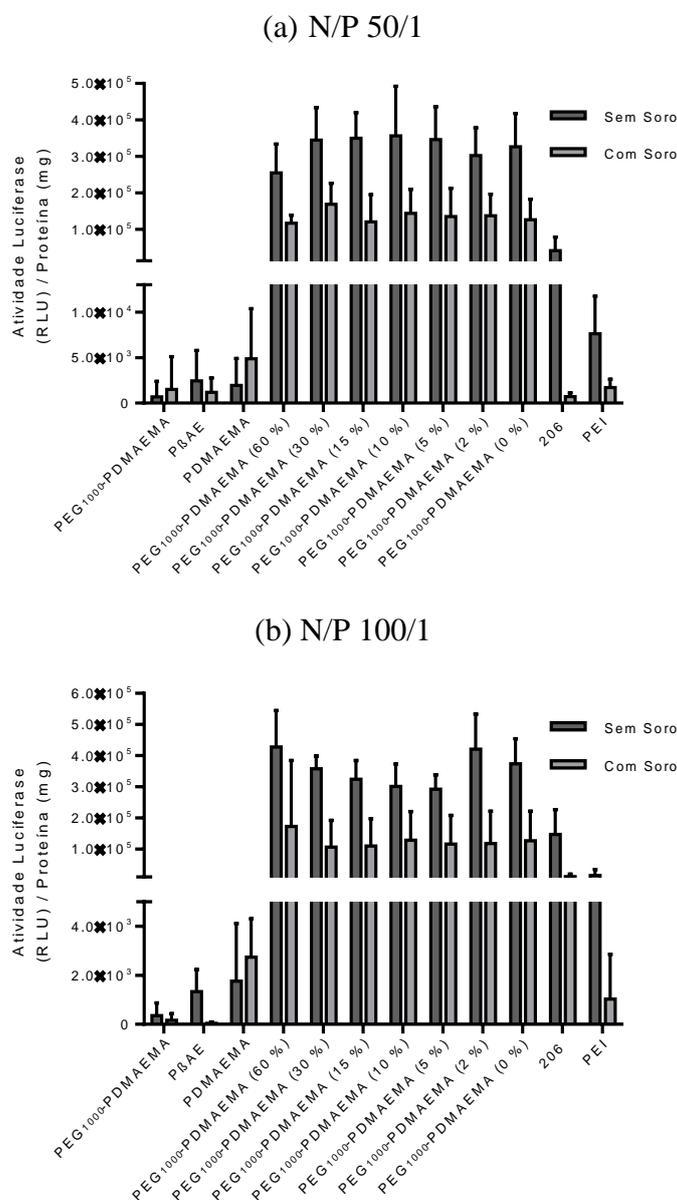


Figura 24: Efeito da composição e do rácio N/P (50/1 (a) e 100/1 (b)) dos políplexos na sua atividade de transfeção em células COS-7, na presença e ausência de soro. Os diferentes polímeros e combinações de polímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc de acordo com o rácio polímero/DNA N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. A atividade biológica é expressa em RLU (unidades relativas de luz) de luciferase por miligrama de proteínas celular total (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos duas experiências independentes.

A combinação de polímeros proposta, com uma percentagem constante de P β AE e variável de PEG-*b*-PDMAEMA e PDMAEMA, demonstra uma elevada capacidade de transfeção. Pode-se concluir assim que há um claro efeito sinérgico entre os polímeros,

que contribui para o aumento da sua atividade biológica. Contudo, verifica-se que o PEG não tem influência no conjunto de polímeros utilizados como vetores, uma vez que não existem diferenças significativas entre as formulações com diferentes percentagens do copolímero PEG-*b*-PDMAEMA. Mais, não há alterações notórias entre a atividade de transfeção dos poliplexos com a maior percentagem de copolímero com PEG (PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA (60%)) e a dos poliplexos preparados apenas com os dois homopolímeros (PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA (0%)).

Observando a Figura 24, conclui-se que as propriedades de transfeção dos poliplexos são afetadas negativamente pela presença de soro, pois a expressão do gene da luciferase diminui, aproximadamente, três vezes, para os dois rácios N/P testados. Esta diminuição já era esperada, dadas as interações que podem ocorrer entre as proteínas do soro carregadas negativamente e os poliplexos. Estas ligações podem provocar uma diminuição da internalização celular dos poliplexos, porque podem impedir a sua ligação à membrana celular (que tem carga negativa) ou a sua internalização pela via endocítica, por causa do aumento de tamanho dos complexos.⁶³ A introdução do segmento de PEG no copolímero de PDMAEMA tinha como objetivo diminuir as interações dos poliplexos com as proteínas do soro carregadas negativamente, entre outros. Não obstante, e tal como acontece na sua ausência, na presença de soro os poliplexos com diferentes quantidades de PEG não têm desempenhos diferentes entre si nem com os que não têm PEG. Desta forma, aparentemente, a presença de PEG não modifica o comportamento do sistema polimérico de entrega de material genético.

A Figura 24 mostra que a atividade de transfeção gerada pelos poliplexos não depende do seu rácio N/P, uma vez que não existem diferenças significativas entre a capacidade de transfeção dos poliplexos com um rácio polímero/DNA de 100/1 e os com um N/P de 50/1. Este facto deve-se ao grau ótimo de complexação entre o plasmídeo e os polímeros, o que facilita a sua ligação e entrada nas células. Provavelmente, este ótimo é atingido com um N/P de 50/1, o que explica a inexistência de diferenças significativas a nível da capacidade de transfeção entre os poliplexos preparados com os dois rácios N/P estudados. Pode-se inferir que, para rácios superiores, como 150/1, a expressão do gene da luciferase diminuiria, pois as interações entre os polímeros e o DNA seriam demasiado fortes, dificultando a libertação do material genético dos poliplexos. Contrariamente, para rácios inferiores, seriam estabelecidas menos interações electrostáticas, que não seriam suficientes para proteger convenientemente o DNA. Portanto, e com base em trabalhos

anteriores, pensa-se que estes dois rácios N/P são os que se traduzem numa maior atividade de transfeção.

Os resultados até aqui discutidos foram comparados com os relativos à PEI ramificada e com um dos copolímeros desenvolvidos por Cordeiro et al. (PDMAEMA₃₀₀₀-*b*-PβAE₁₂₀₀₀-*b*-PDMAEMA₃₀₀₀, denotado como 206). Relativamente à bPEI, a capacidade de transfeção da combinação proposta neste trabalho é indubitavelmente superior, principalmente na presença de soro: para um N/P de 50/1, a combinação de polímeros com 30% de PEG-*b*-PDMAEMA tem 97 vezes mais capacidade de transfeção; para um N/P de 100/1 este número é ainda maior: a formulação com 60% de PEG-*b*-PDMAEMA apresenta uma expressão do gene da luciferase 167 vezes superior à da bPEI. Por último, referir que a atividade de transfeção dos polímeros desenvolvidos neste trabalho é superior à do copolímero sintetizado por Cordeiro et al., o PDMAEMA₃₀₀₀-*b*-PβAE₁₂₀₀₀-*b*-PDMAEMA₃₀₀₀ (206), pelo que fica comprovada a eficiência dos polímeros PDMAEMA e PβAE, não só quando utilizados copolimerizados, como também como simples mistura de polímeros.

3.2.2. VIABILIDADE CELULAR

A aplicação de polímeros catiónicos como vetor de entrega de material genético está normalmente associada a alguma citotoxicidade, sendo esta uma das suas principais limitações. Como tal, a avaliação da viabilidade celular após o tratamento com poliplexos é de extrema importância. Um dos métodos mais comuns para medir a citotoxicidade *in vitro* é a utilização de reagentes colorimétricos, como o *Alamar Blue*. Ao não ser tóxico, permite a continuação do ensaio e a viabilidade celular é proporcional à absorvância medida.

A Figura 25 mostra que a toxicidade dos poliplexos depende do seu rácio N/P e da composição do meio de cultura (presença ou ausência de soro). Deste modo, são observadas menores viabilidades para rácios polímero/DNA mais altos. Considerando a combinação de polímeros com percentagens variáveis de PEG, enquanto que para o rácio N/P 50/1 a viabilidade ronda os 70%, este valor diminui, aproximadamente, quinze pontos percentuais no caso do rácio N/P 100/1, na ausência de soro. Esta dependência não surpreende: rácios N/P mais elevados correspondem a uma maior quantidade de polímero, o que causa maior toxicidade, provavelmente devido a uma maior interação com as membranas celulares (carregadas negativamente), já que as interações

electroestáticas são mais fortes; por outro lado, pode existir uma maior quantidade de polímero livre (que não está a interagir com o DNA), e que pode induzir maior citotoxicidade nas células, devido às interações com a membrana celular.¹²

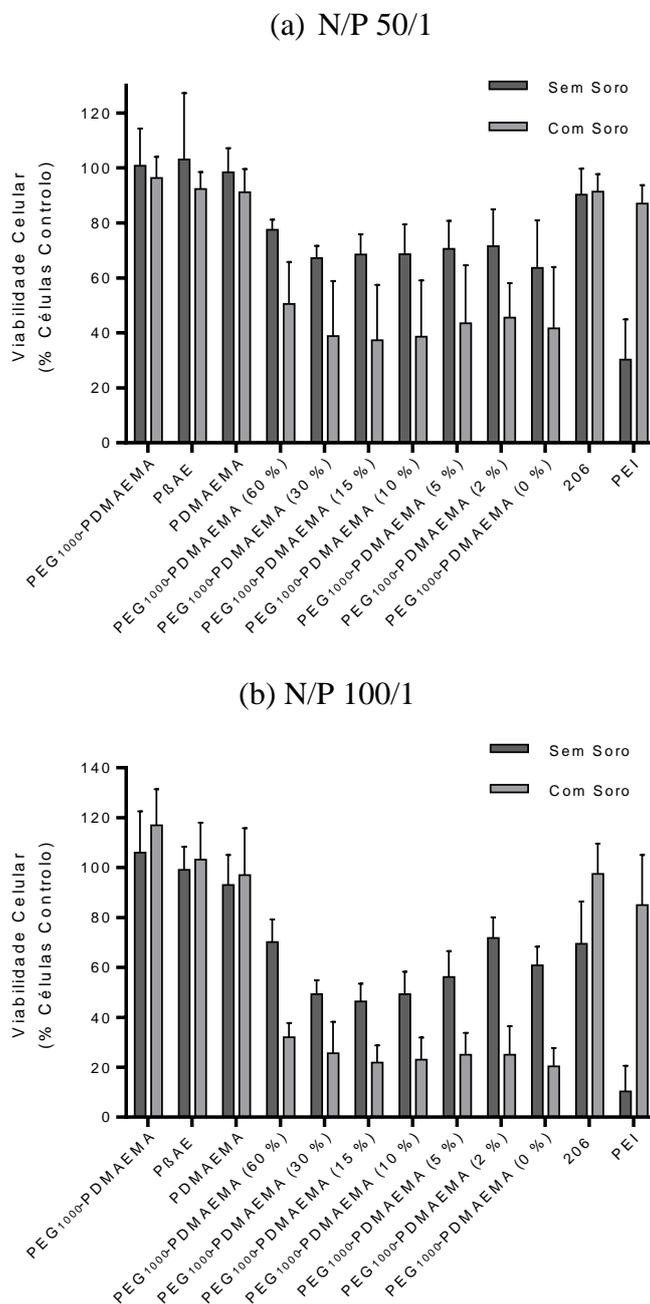


Figura 25: Efeito da composição e do rácio N/P (50/1 (a) e 100/1 (b)) dos políplexos na viabilidade celular na linha COS-7, na presença e na ausência de soro. Os diferentes polímeros e combinações de polímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc de acordo com o rácio polímero/DNA N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. Os dados são expressos em percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células sem tratamento) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos duas experiências independentes.

Apesar de a combinação entre os três polímeros ser consideravelmente tóxica para as células, os complexos polímero/DNA preparados com os homopolímeros PDMAEMA e P β AE e o copolímero PEG-*b*-PDMAEMA não são tóxicos. A viabilidade das células tratadas com estes poliplexos é, aproximadamente 100%. No entanto, e mesmo tendo uma reduzida citotoxicidade, estas formulações não têm uma boa capacidade de transfeção.

Surpreendentemente, na presença de soro verifica-se um aumento da toxicidade dos poliplexos. De acordo com a Figura 25, a viabilidade celular, após a incubação com os poliplexos desenvolvidos com os três polímeros, num meio de cultura completo diminui cerca de 20 a 30% em relação à verificada num meio sem soro, tanto no rácio N/P 100/1 como no rácio N/P 50/1. Esta observação não era esperada, uma vez que, por norma, a presença de soro induz um aumento da viabilidade, o que pode ser explicado pelas melhores condições de crescimento e desenvolvimento das células e até mesmo pela redução da toxicidade dos poliplexos devido à sua interação com as proteínas do soro. Esta dependência confirma-se nos polímeros testados como controlo, a bPEI e o PDMAEMA₃₀₀₀-*b*-P β AE₁₂₀₀₀-*b*-PDMAEMA₃₀₀₀ (206), cujas toxicidades num meio com soro são inferiores (ou pelo menos semelhantes) às de um meio incompleto (sem soro). Desta forma, pode-se depreender que existem interações entre os polímeros (quando aplicados em conjunto) e/ou os poliplexos e as proteínas do soro, que se traduzem num aumento da sua citotoxicidade.

3.2.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLIPLÉXOS

As propriedades físico-químicas dos vetores têm um papel importante na sua habilidade para mediar a entrega do material genético às células alvo. A capacidade de condensar e proteger o DNA, o tamanho e a carga superficial (potencial zeta), são algumas dessas propriedades, pelo que o seu estudo se torna relevante, na medida em que clarifica a correlação entre estes parâmetros e a atividade de transfeção do sistema.⁶⁴ A existência de tal correlação permite ainda desenhar e desenvolver novos sistemas mais eficientes.

3.2.3.1. TAMANHO E POTENCIAL ZETA DOS POLIPLÉXOS

O tamanho das nanopartículas tem uma influência direta sobre a forma como são internalizadas e pode ser determinado pela difusão dinâmica da luz (DLS). As interações electrostáticas entre os polímeros catiónicos e o plasmídeo de DNA são estabelecidas

durante a preparação dos políplexos, pela simples mistura destes dois componentes numa solução aquosa. Neste processo, o DNA é condensado pelos polímeros, formando com eles nanoestruturas.

O tamanho médio dos políplexos desenvolvidos está abaixo dos 150 nm, à exceção dos complexos preparados unicamente com P β AE (Figura 26). Estas dimensões são de reconhecida importância, uma vez que a entrega eficiente dos genes depende da sua entrada nas células por endocitose. Por exemplo, a endocitose mediada por clatrina, uma das principais vias endocíticas, é viável para partículas com tamanhos abaixo dos 200 nm.^{64,65} Relativamente aos tamanhos específicos dos políplexos pertencentes a cada formulação, não existe nenhuma tendência significativa. Além disso, as diferenças entre os tamanhos das nanopartículas preparadas nos dois rácios N/P não são muito relevantes. Uma das explicações possíveis para esta observação é o facto de que para o rácio N/P 50/1 a condensação do DNA já ter atingido o seu máximo, o que justifica a inexistência de alterações significativas face ao tamanho das partículas preparadas com um rácio N/P de 100/1.

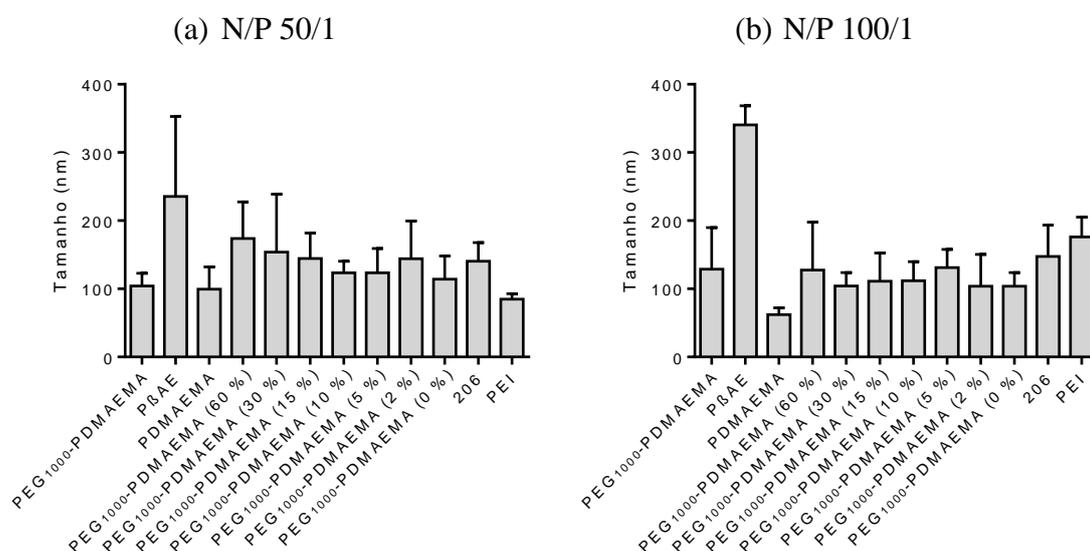


Figura 26: Tamanhos das partículas formadas pelos polímeros/DNA num rácio N/P 50/1 (a) e 100/1 (b). Os políplexos foram preparados com 1 μ g de pCMV.Luc e com os diferentes polímeros e combinações de polímeros para o rácio polímero/DNA N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. O tamanho de partícula é expresso em nanómetros (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

A Figura 27 mostra o potencial zeta (ζ) dos políplexos preparados para os dois rácios N/P considerados. Todas as formulações desenvolvidas a partir dos polímeros

catiônicos sintetizados têm uma carga superficial positiva, entre os 27,1 e os 40 mV, o que demonstra a presença de polímero catiônico na superfície dos políplexos. A carga superficial positiva favorece a entrega de material genético, na medida em que promove as interações com a membrana celular, facilitando a entrada dos políplexos.¹² As cargas positivas também podem estar envolvidas na destabilização da membrana dos endossomas, o que resulta na liberação dos políplexos para o citosol e, conseqüentemente, no aumento da sua atividade biológica.

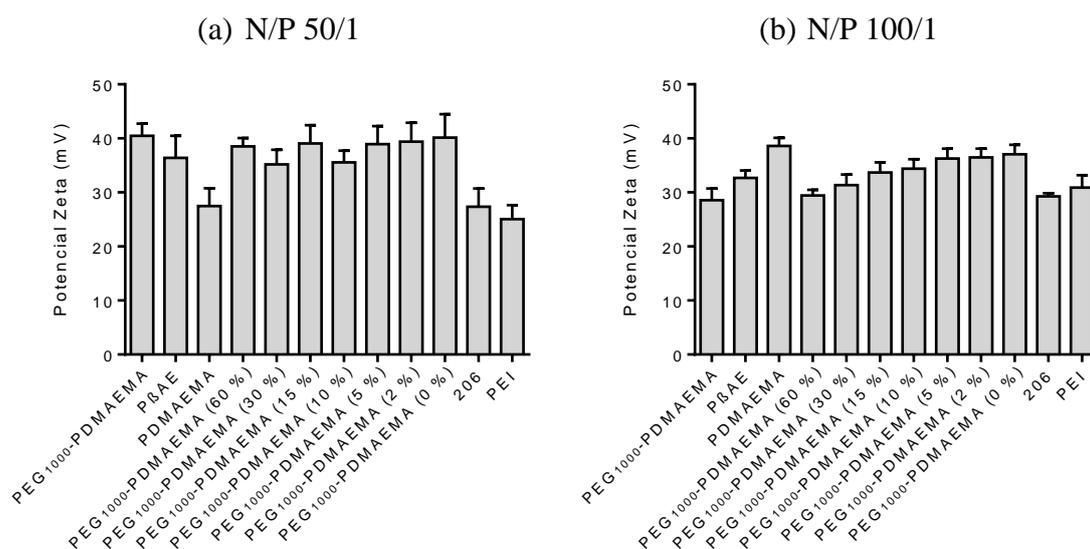


Figura 27: Potencial zeta das partículas formadas pelos polímeros/DNA num rácio N/P 50/1 (a) e 100/1 (b). Os políplexos foram preparados com 1 μ g de pCMV.Luc e com os diferentes polímeros e combinações de polímeros para o rácio polímero/DNA N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. O potencial zeta é expresso em milivolts (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

Estes resultados indicam que as nanopartículas baseadas nos polímeros catiônicos PDMAEMA, PBAE e PEG-*b*-PDMAEMA com tamanhos abaixo dos 150 nm e com carga superficial positiva são capazes de interagir com as células alvo e sofrer a chamada internalização celular, libertar o DNA e, conseqüentemente, promover a expressão do transgene.

3.2.3.2. CONDENSAÇÃO DO DNA

Como já foi referido, o sucesso de um vetor de entrega de material genético também depende da sua capacidade para proteger a sua carga, a partir do momento em

que é administrado até alcançar o seu alvo. Particularmente, os polímeros catiónicos protegem o DNA condensando-o, evitando assim algumas das ameaças a que está sujeito.

O brometo de etídio (EtBr) é um agente monovalente intercalante do DNA, cujas propriedades de fluorescência são usadas para detetar a acessibilidade ao DNA, uma vez que a fluorescência do composto aumenta drasticamente quando forma um complexo com o DNA. Como se comprova pelos resultados apresentados na Figura 28, os poliplexos desenvolvidos com o conjunto dos três polímeros protegem o DNA na totalidade, pois o acesso do brometo de etídio ao material genético dos poliplexos é muito reduzido ou mesmo nulo. Isto indica que a quantidade de polímero presente nos poliplexos é suficiente para estabelecer ligações electrostáticas com todo o DNA, condensando e protegendo-o. Como já foi referido no ponto correspondente ao tamanho dos poliplexos, no rácio N/P 50/1 já se verifica uma condensação máxima do plasmídeo, sendo esta a explicação para o igual nível de condensação conferido pelos poliplexos preparados nos dois rácios polímero/DNA estudados.

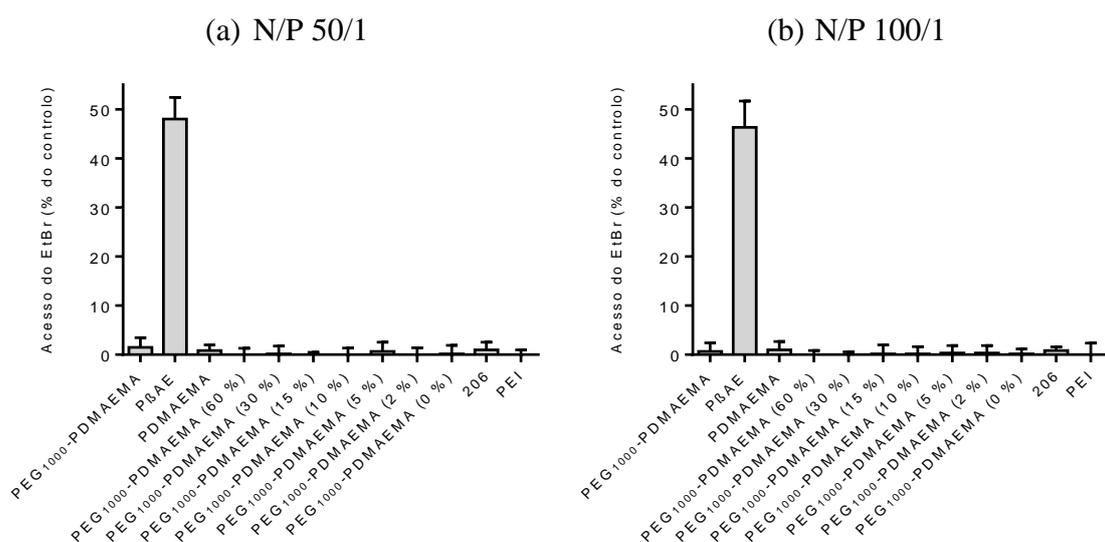


Figura 28: Acessibilidade do brometo de etídio ao DNA dos diferentes poliplexos preparados para um rácio polímero/DNA N/P de 50/1 (a) e 100/1 (b), à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. A quantidade de DNA disponível para interagir com a sonda foi calculada subtraindo os valores da fluorescência residual aos obtidos para as amostras e expressos como percentagem do controlo. O controlo corresponde a DNA livre na mesma quantidade que o associado aos complexos (100% de acessibilidade do EtBr). Os dados são expressos como acesso do EtBr (% do controlo) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

O PβAE é o único polímero cujo comportamento difere e que permite a intercalação da molécula do EtBr no plasmídeo de DNA (Figura 28). O facto de o PβAE

não ser capaz de condensar o material genético pode justificar quer a sua baixa capacidade de transfeção, quer o elevado tamanho dos poliplexos baseados unicamente neste polímero. Esta incapacidade pode estar relacionada com a estrutura química mais rígida do polímero e com o diferente arranjo tridimensional dos resíduos catiónicos, com mais espaço entre os grupos amina e logo, menor densidade de carga positiva.

É sabido que níveis elevados de proteção e condensação do DNA podem reduzir a atividade de transfeção das nanopartículas de base polimérica, já que as interações electrostáticas são tão fortes que impedem a correta libertação do plasmídeo no citosol. Uma vez que não foram estudados rácios N/P inferiores a 50/1, não é possível concluir se este nível elevado de condensação do DNA é prejudicial à atividade biológica do sistema de base polimérica aqui proposto.

Conclusões e Perspetivas Futuras

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

A terapia génica é vista como uma estratégia promissora para o tratamento de muitas doenças incuráveis, quer adquiridas, quer hereditárias. Todavia, há ainda um longo caminho a percorrer até a terapia génica se tornar uma prática clínica corrente. A falta de vetores de entrega suficientemente seguros e eficazes é tida como uma das grandes limitações que impedem a sua utilização *in vivo*.

Os sistemas não-virais de base polimérica para a entrega de material genético são considerados uma excelente alternativa dada a sua segurança e facilidade com que a sua estrutura pode ser alterada, através da engenharia de polímeros. Porém, estes sistemas ainda não possuem as características necessárias à sua afirmação categórica como vetor para a terapia génica. Neste sentido, o PDMAEMA, o P β AE e o PEG são três dos polímeros mais estudados.

O presente trabalho introduz um novo sistema de entrega de material genético, baseado em combinações de três polímeros catiónicos: dois homopolímeros (PDMAEMA e P β AE) e um copolímero de bloco (PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA). Os polímeros, sintetizados por SARA ATRP e reação de adição de Michael, foram caracterizados por SEC e ¹H RMN. Numa segunda fase, procedeu-se à avaliação do potencial dos polímeros desenvolvidos como vetores de entrega de DNA. Assim, as diferentes formulações de poliplexos, com percentagens variáveis de PEG-*b*-PDMAEMA e PDMAEMA, foram submetidas a diferentes estudos, com o objetivo de avaliar a atividade de transfeção *in vitro*, a citotoxicidade, o tamanho e carga superficial e a condensação e proteção conferida ao DNA pelas nanopartículas desenvolvidas.

Os resultados revelam que a combinação proposta é capaz de mediar a entrega de material genético às células. A atividade de transfeção relativa aos dois rácios polímero/DNA estudados (N/P 50/1 e 100/1) mostra que o sistema é eficiente e que existe um efeito sinérgico entre os polímeros catiónicos utilizados. Porém, a introdução do copolímero com PEG não aparenta ter influência sobre a atividade biológica. Foram desenhadas diversas formulações de poliplexos com PEG, cuja percentagem em massa variou entre os 13 e os 0%. Ao longo dos vários ensaios de transfeção verificou-se que não existiam alterações significativas na expressão do gene da luciferase relativas às diversas formulações, o que indica que a presença de PEG não tem influência sobre a ação dos polímeros desenvolvidos. Ao contrário do esperado, o PEG também não

melhorou a biocompatibilidade do sistema, sendo esta uma das premissas da sua utilização na área biomédica. A citotoxicidade dos poliplexos preparados com diferentes percentagens de PEG não varia significativamente e não segue nenhuma linha de tendência. Por outro lado, o aumento da toxicidade do sistema na presença de soro também foi surpreendente, já que a introdução do PEG tinha como objetivo mitigar as interações entre os poliplexos e as proteínas do soro. Talvez devido a esta diminuição da viabilidade celular, a atividade biológica também diminuiu consideravelmente na presença de um meio com soro.

A relevância deste novo sistema polimérico como agente de transfeção é confirmada pela atividade de transfeção superior à do polímero bPEI, considerado o *gold standard* nesta área. Em células COS-7, a atividade de transfeção dos poliplexos preparados com PDMAEMA, P β AE e PEG₁₀₀₀-*b*-PDMAEMA, nos rácios 50/1 e 100/1, é 47 e 28 vezes superior, respetivamente, à atividade dos poliplexos preparados com bPEI (a um rácio N/P 25/1, tido como ótimo). Na presença de soro, esta diferença é ainda maior: os poliplexos com os três polímeros têm uma capacidade de transfeção 97 e 167 vezes mais elevada que os poliplexos com bPEI (em condições iguais às anteriores).

A importância do sistema é corroborada pela comparação da sua eficiência com a de um copolímero tribloco PDMAEMA₃₀₀₀-*b*-P β AE₁₂₀₀₀-*b*-PDMAEMA₃₀₀₀. Todas as formulações resultantes da combinação de polímeros introduzidos neste trabalho possuem maior capacidade de transfeção que o copolímero referido, em iguais condições polímero/DNA e com/sem soro.

Relativamente às características físico-químicas, os poliplexos baseados nos polímeros desenvolvidos revelam propriedades adequadas à sua utilização, nomeadamente uma boa condensação do DNA, fulcral para a proteção do material genético de possíveis danos que possam ocorrer até à sua chegada ao alvo, e um tamanho pequeno e uma carga superficial positiva, que facilitam a sua internalização na célula alvo.

Apesar deste novo sistema de entrega de DNA já possuir boas propriedades de transfeção, existem aspetos que devem ser mais explorados, de forma a poder melhorar a eficácia e segurança do sistema, com vista a uma possível utilização *in vivo*. Em primeiro lugar, a independência da atividade biológica face à presença de PEG deve ser esclarecida. A avaliação *in vitro* da capacidade de transfeção de copolímeros com PEG com outros pesos moleculares, como os existentes nos outros dois copolímeros sintetizados na primeira fase deste trabalho, deve assim ser um dos próximos passos.

Sabe-se que as linhas celulares usadas em ensaios *in vitro* têm comportamentos diferentes entre si. Como tal, este conjunto de polímeros deve ser validado junto de outro tipo de células, como as HeLa e as MDA-MB-31. Para além do gene da luciferase, deveriam também ser preparados poliplexos com o gene da GFP, de modo a poder quantificar a percentagem de células que foram transfectadas. Seria de especial interesse estudar as interações dos poliplexos com e sem PEG com os componentes do soro, de modo a compreender o aumento de citotoxicidade e a redução de atividade biológica verificados, sendo uma das primeiras abordagens a medição dos tamanhos e do potencial zeta dos poliplexos após incubação com soro.

A longo prazo, seria importante estudar a capacidade de transfeção dos vetores baseados em polímeros de PDMAEMA, P β AE e PEG-*b*-PDMAEMA num modelo animal, assim como avaliar a sua eficácia no transporte de outros ácidos nucleicos, como o siRNA ou microRNA. Um outro caminho igualmente importante seria a introdução de um ligando, de forma a conferir especificidade aos vetores para determinado tipo de célula.

Referências

5. Referências

1. Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
2. Mulligan, R. C., The basic science of gene therapy. *Science* **1993**, *260* (5110), 926-932.
3. Mountain, A., Gene therapy: the first decade. *Trends in Biotechnology* **2000**, *18* (3), 119–128.
4. Verma, I. M.; Weitzman, M. D., Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annual Review of Biochemistry* **2005**, *74*, 711-38.
5. Pack, D. W.; Hoffman, A. S.; Pun, S.; Stayton, P. S., Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4* (7), 581-93.
6. Bank, A., Human somatic cell gene therapy. *BioEssays* **1996**, *18* (12), 999-1007.
7. Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F., T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA– SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* **1995**, *270* (5235), 475-480.
8. Ginn, S. L.; Alexander, I. E.; Edelstein, M. L.; Abedi, M. R.; Wixon, J., Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *The Journal of Gene Medicine* **2013**, *15* (2), 65-77.
9. Number of Gene Therapy Clinical Trials Approves Worldwide 1989-2015. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> (accessed 10/02/2016).
10. Faneca, H.; Cardoso, A. L.; Trabulo, S.; Duarte, S.; Lima, M. C. P. d., Cationic Liposome-Based Systems for Nucleic Acid Delivery: From the Formulation Development to Therapeutic Applications. In *Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine*, Coelho, J., Ed. Springer Netherlands: 2013; pp XVII, 421.
11. Kim, Y.-K.; Zhang, C.; Cho, C.-S.; Cho, M.-H.; Jiang, H.-L., *Poly(amino ester)s-Based Polymeric Gene Carriers in Cancer Gene Therapy*. InTech: 2013.
12. Yue, Y.; Wu, C., Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery. *Biomaterial Sciences* **2013**, *1* (2), 152-170.
13. Edelstein, M. L.; Abedi, M. R.; Wixon, J., Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update. *The Journal of Gene Medicine* **2007**, *9* (10), 833-842.

14. Yin, H.; Kanasty, R. L.; Eltoukhy, A. A.; Vegas, A. J.; Dorkin, J. R.; Anderson, D. G., Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics* **2014**, *15* (8), 541-55.
15. Zhi, D.; Zhang, S.; Cui, S.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Zhao, D., The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24* (4), 487-519.
16. Park, T.; Jeong, J.; Kim, S., Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58* (4), 467-486.
17. Cordeiro, R. A. Development of non-viral vectors based on poly(B-amino ester) segments for gene delivery. University of Coimbra, Coimbra, 2015.
18. Rehman, Z.; Zuhorn, I. S.; Hoekstra, D., How cationic lipids transfer nucleic acids into cells and across cellular membranes: recent advances. *Journal of Controlled Release* **2013**, *166* (1), 46-56.
19. Liu, Z. H.; Zhang, Z. Y.; Zhou, C. R.; Jiao, Y. P., Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Progress in Polymer Science* **2010**, *35* (9), 1144-1162.
20. Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J.; Kissel, T., In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **2003**, *24* (7), 1121-1131.
21. Vaheri, A.; Pagano, J. S., Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology* **1965**, *27* (3), 434-436.
22. Lynn, D. M.; Langer, R., Degradable Poly(β -amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (44), 10761-10768.
23. Cherng, J.-Y.; van de Wetering, P.; Talsma, H.; Crommelin, D. J. A.; Hennink, W. E., Effect of Size and Serum Proteins on Transfection Efficiency of Poly ((2-dimethylamino)ethyl Methacrylate)-Plasmid Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **1996**, *13* (7), 1038-1042.
24. Cordeiro, R. A.; Rocha, N.; Mendes, J. P.; Matyjaszewski, K.; Guliashvili, T.; Serra, A. C.; Coelho, J. F. J., Synthesis of well-defined poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) under mild conditions and its co-polymers with cholesterol and PEG using Fe(0)/Cu(ii) based SARA ATRP. *Polymer Chemistry* **2013**, *4* (10), 3088-3097.
25. Agarwal, S.; Zhang, Y.; Maji, S.; Greiner, A., PDMAEMA based gene delivery materials. *Materials Today* **2012**, *15* (9), 388-393.

26. 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* **2011**, *3* (4), 693-718.
27. Eltoukhy, A. A.; Siegwart, D. J.; Alabi, C. A.; Rajan, J. S.; Langer, R.; Anderson, D. G., Effect of molecular weight of amine end-modified poly(beta-amino ester)s on gene delivery efficiency and toxicity. *Biomaterials* **2012**, *33* (13), 3594-603.
28. Cordeiro, R. A.; Farinha, D.; Rocha, N.; Serra, A. C.; Faneca, H.; Coelho, J. F., Novel cationic triblock copolymer of poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-block-poly(beta-amino ester)-block-poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]: a promising non-viral gene delivery system. *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15* (2), 215-228.
29. Behr, J.-P., The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *CHIMIA International Journal for Chemistry* **1997**, *51* (1-2), 34-36.
30. Zhang, Y.; Zheng, M.; Kissel, T.; Agarwal, S., Design and Biophysical Characterization of Bioresponsive Degradable Poly(dimethylaminoethyl methacrylate) Based Polymers for In Vitro DNA Transfection. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (2), 313-322.
31. Devalapally, H.; Shenoy, D.; Little, S.; Langer, R.; Amiji, M., Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 3. Therapeutic efficacy and safety studies in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2007**, *59* (4), 477-84.
32. Lynn, D. M.; Anderson, D. G.; Putnam, D.; Langer, R., Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: parallel synthesis and screening of a degradable polymer library. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (33), 8155-8156.
33. Anderson, D. G.; Akinc, A.; Hossain, N.; Langer, R., Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(beta-amino esters). *Molecular Therapy* **2005**, *11* (3), 426-34.
34. Mahato, M.; Kumar, P.; Sharma, A. K., Amphiphilic polyethylenimine polymers mediate efficient delivery of DNA and siRNA in mammalian cells. *Molecular BioSystems* **2013**, *9* (4), 780-91.

35. Parhamifar, L.; Larsen, A. K.; Hunter, A. C.; Andresen, T. L.; Moghimi, S. M., Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy—focus on polyethylenimine. *Soft Matter* **2010**, *6* (17), 4001.
36. Park, I. K.; Singha, K.; Arote, R. B.; Choi, Y. J.; Kim, W. J.; Cho, C. S., pH-Responsive Polymers as Gene Carriers. *Macromolecular Rapid Communications* **2010**, *31* (13), 1122-33.
37. Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M., PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2015**.
38. Lee, M.; Kim, S. W., Polyethylene Glycol-Conjugated Copolymers for Plasmid DNA Delivery. *Pharmaceutical Research* **2005**, *22* (1), 1-10.
39. Cowie, J. M. G.; Arrighi, V., *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials, Third Edition*. CRC Press: 2007; p 520.
40. Fried, J. R., *Polymer Science and Technology*. Prentice Hall PTR Englewood: New Jersey, 1995.
41. Ravve, A., *Principles of Polymer Chemistry*. 3rd ed.; Springer-Verlag New York: Niles, IL, USA, 2012; p XV, 801.
42. Moade, G.; Solomon, D. H., *The Chemistry of Radical Polymerization*. Elsevier: 2006.
43. O'Driscoll, K. F., Free radical polymerization kinetics - revisited. *Pure and Applied Chemistry* **1981**, *53* (3), 617–626.
44. Matyjaszewski, K.; Davis, T. P., *Handbook of Radical Polymerization*. Matyjaszewski: 2002; p 936.
45. Jenkins, A. D.; Jones, R. G.; Moad, G., Terminology for reversible-deactivation radical polymerization previously called "controlled" radical or "living" radical polymerization (IUPAC Recommendations 2010). *Pure and Applied Chemistry* **2009**, *82* (2).
46. Szwarc, M., 'Living' Polymers. *Nature* **1956**, *178*, 1168-1169.
47. Szwarc, M.; Levy, M.; Milkovich, R., Polymerization initiated by electron transfer to monomer. A new method of formation of block copolymers. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78* (11), 2656-2657.
48. Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K., Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32* (1), 93-146.

49. Xue, Z.; He, D.; Xie, X., Iron-catalyzed atom transfer radical polymerization. *Polymer Chemistry* **2015**, *6* (10), 1660-1687.
50. Matyjaszewski, K.; Sumerlin, B. S.; Tsarevsky, N. V., *Progress in Controlled Radical Polymerization: Mechanisms and Techniques*. 2012; Vol. 1100.
51. Rocha, N.; Mendonça, P.; Góis, J. R.; Cordeiro, R.; Fonseca, A.; Ferreira, P.; Guliashvili, T.; Matyjaszewski, K.; Serra, A.; Coelho, J., Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment. In *Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine*, Coelho, J., Ed. Springer Netherlands: 2013; pp XVII, 421.
52. Mendonça, P. V.; Serra, A. C.; Coelho, J. F. J.; Popov, A. V.; Guliashvili, T., Ambient temperature rapid ATRP of methyl acrylate, methyl methacrylate and styrene in polar solvents with mixed transition metal catalyst system. *European Polymer Journal* **2011**, *47* (7), 1460-1466.
53. Rao, J. P.; Geckeler, K. E., Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* **2011**, *36* (7), 887-913.
54. Mendonça, P. V.; Konkolewicz, D.; Averick, S. E.; Serra, A. C.; Popov, A. V.; Guliashvili, T.; Matyjaszewski, K.; Coelho, J. F. J., Synthesis of cationic poly((3-acrylamidopropyl)trimethylammonium chloride) by SARA ATRP in ecofriendly solvent mixtures. *Polymer Chemistry* **2014**, *5* (19), 5829.
55. Matyjaszewski, K., Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **2012**, *45* (10), 4015-4039.
56. Morrison, R. T.; Boyd, R. N., *Química Orgânica*. 13 ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1996.
57. Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E., Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Progress in Polymer Science* **2006**, *31* (5), 487-531.
58. Kinard, L.; Kasper, K.; Mikos, A., Drying poly(ethylene glycol). *Nature Publishing Group* **2012**.
59. Jankova, K.; Chen, X.; Kops, J.; Batsberg, W., Synthesis of Amphiphilic PS-*b*-PEG-*b*-PS by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **1998**, *31* (2), 531-548.
60. Liu, S.; Weaver, J. V. M.; Save, M.; Armes, S. P., Synthesis of pH-Responsive Shell Cross-Linked Micelles and Their Use as Nanoreactors for the Preparation of Gold Nanoparticles. *Langmuir* **2002**, *18* (22), 8350-8357.

-
61. Faneca, H.; Faustino, A.; Pedroso de Lima, M. C., Synergistic antitumoral effect of vinblastine and HSV-Tk/GCV gene therapy mediated by albumin-associated cationic liposomes. *Journal of Controlled Release* **2008**, *126* (2), 175-184.
62. Sun, X.; Zhang, H.; Huang, X.; Wang, X.; Zhou, Q.-F., Synthesis of poly(ethylene oxide)-block-poly(methyl methacrylate)-block-polystyrene triblock copolymers by two-step atom transfer radical polymerization. *Polymer* **2005**, *46* (14), 5251-5257.
63. Dash, P.; Read, M.; Barrett, L.; Wolfert, M.; Seymour, L., Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene therapy* **1999**, *6* (4), 643-650.
64. Aied, A.; Greiser, U.; Pandit, A.; Wang, W., Polymer gene delivery: overcoming the obstacles. *Drug Discovery Today* **2013**, *18* (21-22), 1090-1098.
65. El-Sayed, A.; Harashima, H., Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Molecular Therapy* **2013**, *21* (6), 1118-30.

Anexos

6. Anexos

6.1. ESPECTROS DE ^1H RMN DO PEG-BR

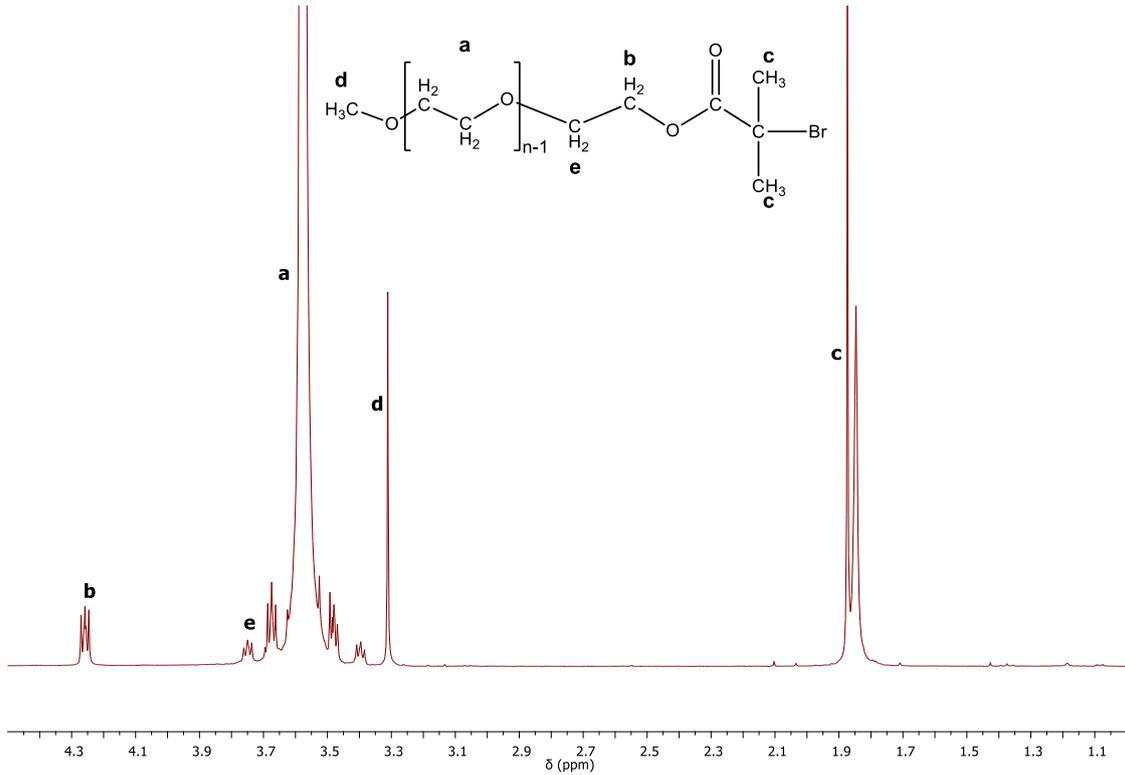


Figura 29: Espectro ^1H RMN de PEG₂₀₀₀-Br puro em CDCl_3 .

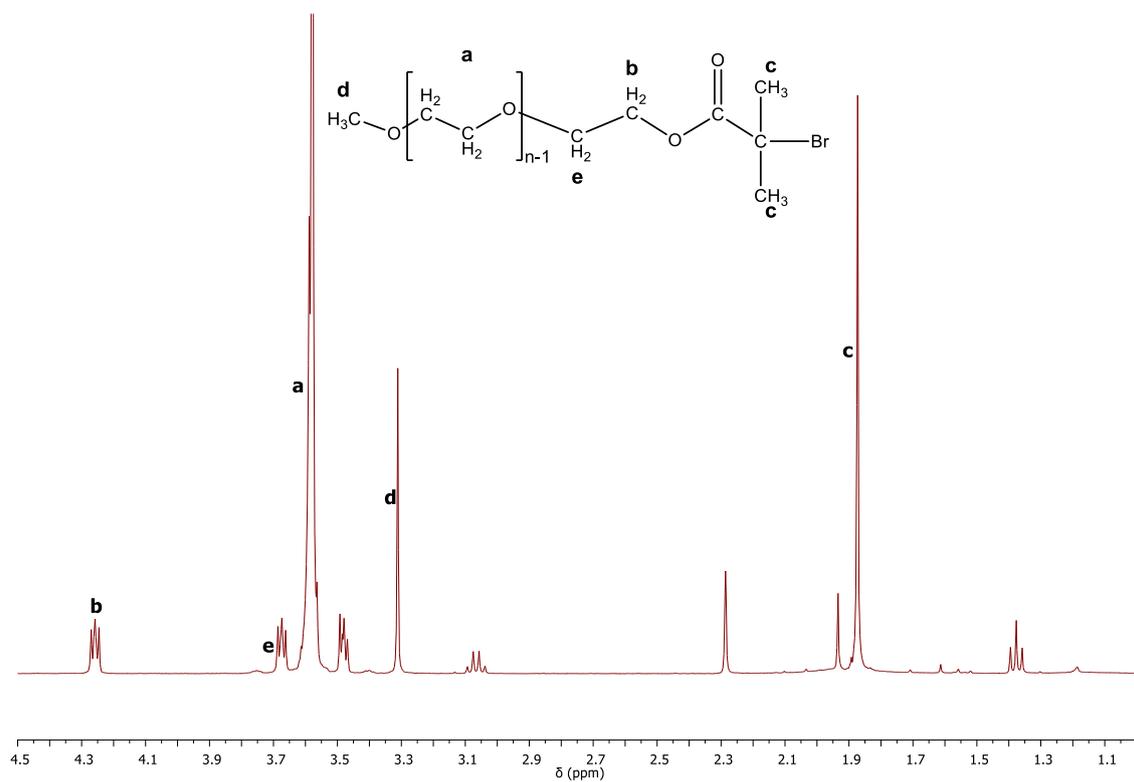


Figura 30: Espectro ¹H RMN de PEG₄₀₀-Br puro em CDCl₃.

6.2. ESPECTROS DE ^1H RMN DO PEG-*b*-PDMAEMA

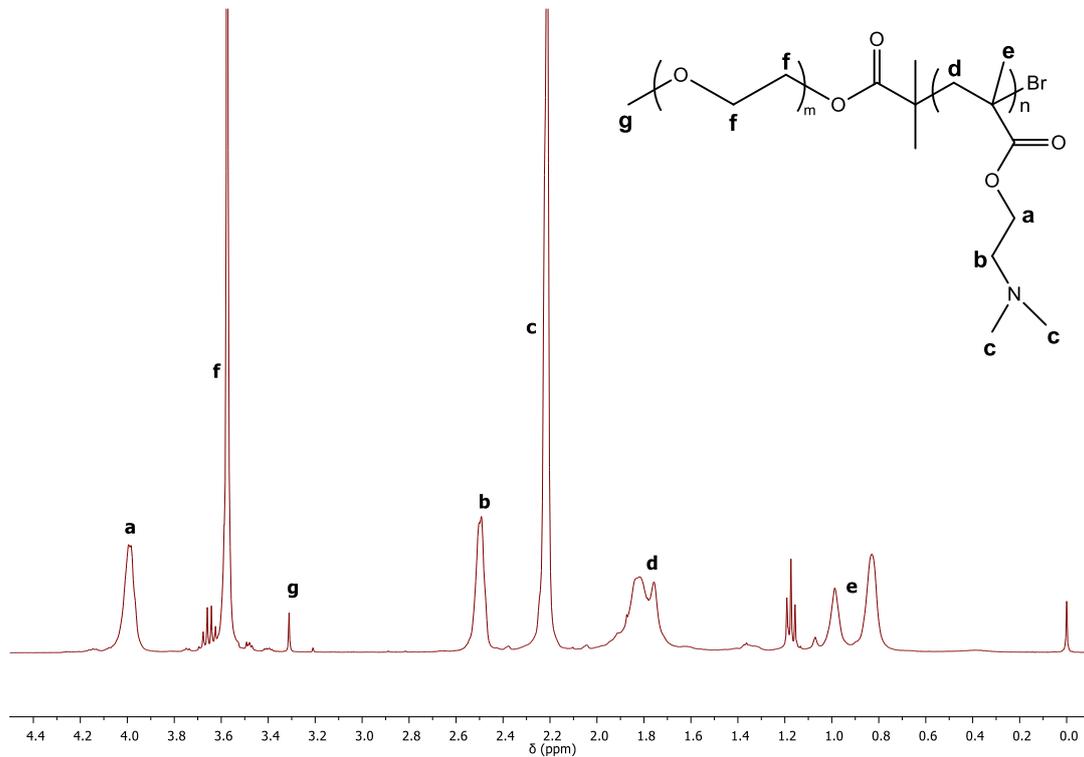


Figura 31: Espectro ^1H RMN de PEG₂₀₀₀-*b*-PDMAEMA puro em CDCl₃.

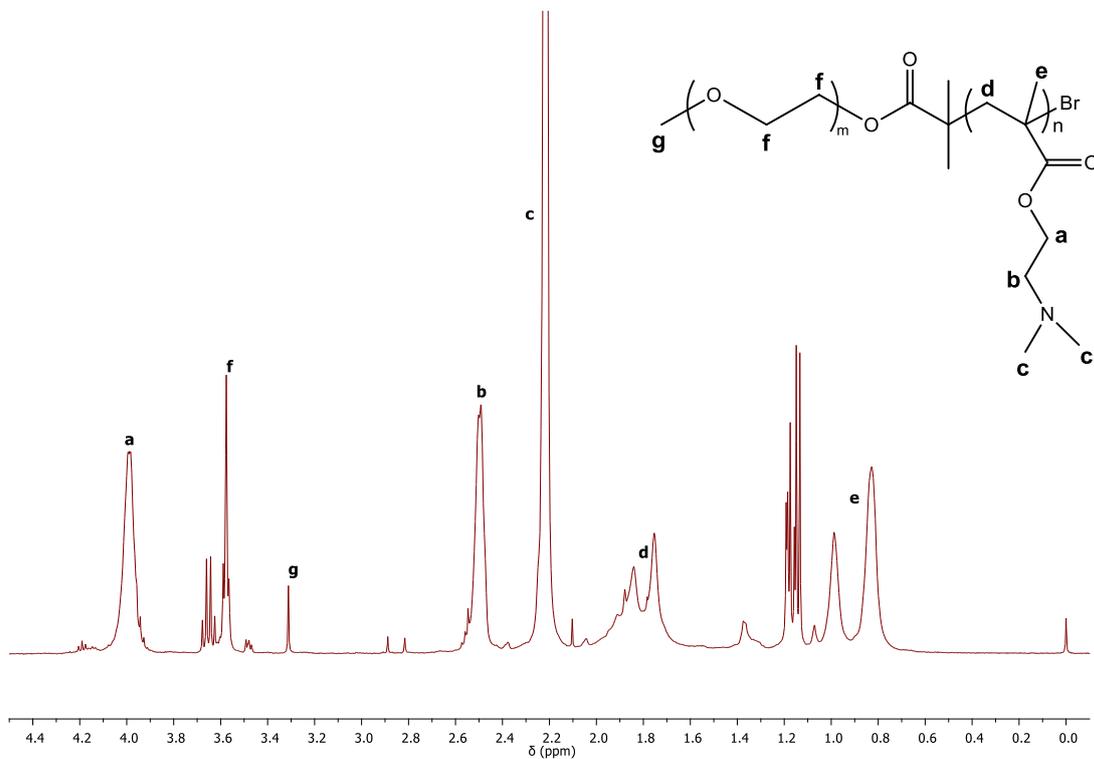


Figura 32: Espectro ^1H RMN de PEG₄₀₀-*b*-PDMAEMA puro em CDCl₃.