



**Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica**

**Síntese e caracterização de poli(β -amino ésteres)
para o desenvolvimento de nanopartículas para
libertação controlada de agentes terapêuticos
anticancerígenos**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção
do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada
sob a orientação do Doutor Jorge Coelho do
Departamento de Engenharia Química (DEQ)*

Cíntia Patrícia Horta Ramos

Coimbra, Setembro de 2013

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



Este projecto foi desenvolvido na seguinte instituição:

Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

“ Pois ainda que ande por um vale escuro como a morte

Não temerei mal algum,

Pois tu, ó Senhor Deus estarás comigo;

Tu me proteges e me diriges”

Salmos:21.4;

Agradecimentos

Embora este trabalho seja de cariz individual, tenho consciência que o mesmo não teria sido possível sem a preciosa ajuda e orientação das pessoas que me acompanharam ao longo desta caminhada dando-me não só suporte moral mas também académico. A estas pessoas que tanto fizeram por mim não poderia deixar de aqui registar palavras que expressam o meu eterno agradecimento:

Ao Dr. Jorge Coelho, pela oportunidade concedida de realizar este projecto, podendo, assim, adquirir conhecimentos que me servirão para toda a vida.

Ao Dr. Arménio Serra, meu orientador, deixo aqui um especial agradecimento pela sua disponibilidade e empenho em me orientar, pela paciência e toda a atenção que me dispensou, mesmo nos momentos mais difíceis. Ser-lhe-ei eternamente grata por sempre ter acreditado em mim, mesmo em momentos de incertezas e dúvidas.

À minha orientadora de laboratório, Rosemeyre Cordeiro, pelo apoio, pela paciência, e por todo o incentivo demonstrado ao longo deste ano. Faltam palavras para expressar a minha eterna gratidão.

A todo o pessoal do laboratório, por toda a simpatia e disponibilidade que sempre tiveram em me ajudar. Um especial agradecimento ao Nuno e à Patrícia Mendonça.

A todos os professores que, sem aqui nomear, serei eternamente grata, não apenas por me terem ensinado, mas também, e, sobretudo por me terem feito aprender.

Ao IPAD pelo importante apoio financeiro que me foi concedido através da atribuição de uma Bolsa de Estudo, um sincero obrigado.

Aos colegas do curso, especialmente à Cláudia, Mónica, Daniela, Raquel, Licas e à Vanessa, minhas irmãs branquinhas que estiveram sempre comigo em todos os momentos.

Aos meus amigos de Coimbra, em especial ao Leu ,à Lúcia, Gene, Heloísa e Waldmar pelo convívio, camaradagem, e amizade demonstrado ao longo destes anos. Jamais os esquecerei.

Aos meus tios de Coimbra por me terem “adoptado” e cuidado de mim ao longo destes anos dando-me todo o amor e suporte familiar de que necessitava. Não tenho palavras para exprimir tamanha gratidão que nutro por vós.

Aos meus amigos de Cabo Verde, que embora distantes sempre estiveram sempre presentes ao longo destes anos, em especial ao Tony, Helga, Mara e à Jéssica.

À Romina e à Sandra por me terem recebido desde meu primeiro dia em Coimbra e por terem permanecido sempre ao meu lado ao longo desta caminhada.

À minha família: meus irmãos, meus amados tios e em especial às minhas três Marias (Maria Luiza, Maria Lúcia e Maria da Luz), pelo amor, incentivo, motivação, compreensão e carinho que sempre demonstraram.

Ao meu pai, Alírio Silva Pinto, meu amado pai que estando tão longe sinto tão perto. Obrigada por tudo o que por mim fizeste, por ter-me escolhido como filha dando-me a graça de seres meu pai! Pai, eu consegui, nós conseguimos!

À mais importante de todas as minhas Marias, minha mãe, Maria de Fátima, meu refúgio, minha força, meu aconchego e minha vida!

Por último, mas não menos importante, a Deus que esteve sempre comigo, que nunca desistiu de mim, que me levou ao colo quando fraquejei que sempre me acudiu quando por ele chamei. Por ele tudo sou e tudo posso!

Um bem-haja a todos!

Índice

Agradecimentos.....	vii
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Abreviaturas:.....	xv
Resumo	xvii
Abstrat.....	xviii
1 Introdução.....	1
1.1 Cancro.....	2
1.1.1 Tratamento.....	2
1.1.1.2 Terapia Génica no tratamento do Cancro.....	3
Imunoterapia-	3
Viroterapia oncolítica	3
Transfecção de Genes-.....	3
1.2 Sistemas de libertação controlada de fármacos.....	5
1.2.1 Sistemas de libertação controlada de fármacos de base poliméricas.....	7
Polímeros Naturais	7
Polímeros Sintéticos.....	7
Polímeros Semi-sintéticos.....	8
Sistemas de libertação controlada por difusão -	9
Sistemas de libertação controlados por acção química	9
Sistemas de libertação activados pelo solvente	9
Sistemas de libertações controladas por acção magnética.....	10
1.3 Nanosistemas para a libertação controlada de fármacos.....	10
Micelas -	10
Lipossomas.....	11
Dendrímos-	11
Nanopartículas poliméricas	11
Pró-fármaco e Pró-proteínas.....	11
1.4 Nanotransportadores “Inteligentes” e sua aplicação como SLCF	12
1.4.1 Nanotransportadores que respondem ao pH.....	13
1.4.2 Nanotransportadores que respondem à temperatura.....	14
1.4.3 Nanotransportadores que respondem ao potencial Redox.....	15
1.5 Poli(β -amino ésteres).....	16

1.6	Reacções de <i>click chemistry</i>	19
1.7	Objectivos propostos	21
2	Protocolo Experimental	23
2.1	Materiais	23
2.2	Técnicas	23
2.3	Preparação dos sistemas poliméricos.....	24
2.3.1	Síntese do Poli(beta-amino éster) (PβAE) em Acetona	24
2.3.2	Preparação do copolímero de PEG- PβAE-PEG	24
2.3.3	Reacção de Click Chemistry (≡-PβAE-≡ + N3-PEG)	25
	PEG-PβAE-PEG	25
2.4	Caracterização	28
2.4.1	Ressonância Magnética Nuclear de Protão (RMN- ¹ H)	28
2.4.2	Cromatografia de Separação de tamanhos (SEC)	28
2.4.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR)	28
2.4.4	Determinação da curva de titulação dos polímeros sintetizados e estimação do valor de pK _b	28
2.4.5	Avaliação solubilização do PβAE em água a diferentes pHs	29
2.4.6	Avaliação da variação do peso molecular com o tempo de reacção e com a temperatura de reacção	29
2.4.7	Degradação <i>in vitro</i>	29
2.4.8	Avaliação da viabilidade celular através do ensaio de Alamar Blue.....	30
2.4.9	Preparação de partículas por complexação de PβAE com alginato	32
2.4.10	Medição de tamanhos e de potencial Zeta.....	32
3	Resultados e discussão.....	33
3.1	Síntese e caracterização do PβAE	33
3.1.1	Confirmação da estrutura química por RMN- ¹ H e cálculo do peso molecular (M _{n, RMN-¹H}) por RMN- ¹ H.....	35
3.1.2	Análise química por FTIR-ATR	36
3.1.3	Cromatografia de separação de Tamanhos (SEC)	37
3.1.4	Determinação do Pk _b do PβAE e avaliação da sua solubilidade a diferentes pHs...39	
3.1.5	Análise da degradação <i>in vitro</i>	42
3.1.6	Viabilidade celular do PβAE com terminais acrilato.....	44
3.2	Preparação e caracterização de partículas por complexação de PβAE com alginato	45
3.3	Preparação do copolímero de PEG-PβAE-PEG.....	48
3.4	Modificação dos terminais do PβAE com Glucosamina.....	51

3.5 Síntese de P β AE com glucosamina.....	54
4 Conclusão e perspectivas de trabalho futuro.....	59
5 Referências.....	61
6 Anexos.....	63

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema representativo das diversas estratégias usadas na terapia Génica aplicada ao cancro. (A) abordagens usadas em imunoterapia. (B) diagrama representativo da viroterapia oncolítica. (C) diagrama representativo da terapia por transfecção (adaptado de [5]).	4
Figura 2: Libertação controlada de fármaco utilizando nanotransportadores, (A) SLCF não direccionada a uma alvo específico, (B) SLCF direccionado a um alvo. Neste último caso o nanotransportador é reconhecido pela célula alvo devido a interacção ligando/receptor (adaptado de [11]).	6
Figura 3: Polímeros usados nos SLCF(adaptado de [10]).	9
Figura 4: Nanotransportadores poliméricos aplicados na libertação controlada de fármacos (adaptado de [10]).	12
Figura 5. Síntese de PBAE por adição de Michael, a partir de uma diamina com diacrilato (fonte [24]).	17
Figura 6: Lista de monómeros de acrilatos e de amins usados para a síntese da base de dados de PBAE (fonte [28]).	18
Figura 7: Cicloadição de Husegem entre um terminal alcino e um terminal azida, catalizada por temperatura, cobre ou ruténio(adaptado de [33]).	20
Figura 8:(A) Reacção do PBAE; (B) Modificação dos terminais acrilatos do PBAE com propargilamina; (C) Modificação dos terminais do PEG; (D) Reacção de Click Chemistry entre o \equiv -PBAE- \equiv e o PEG-N3.	26
Figura 9: (A) Reacção da modificação dos terminais do PBAE com glucosamina; (B) Síntese de PBAE com glucosamina.	27
Figura 10: (A) Complexação do PBAE com alginato; (B) Estrutura do PBAE e do alginato (adaptado de [36]).	32
Figura 11: Variação do peso molecular do PBAE com o tempo de reacção (h).	35
Figura 12: Espectros característicos do PBAE e estrutura química correspondente, com a devida correspondência entre os picos característicos e os "H" a que correspondem.	36
Figura 13: Espectro de FTIR-ATR do PBAE (CH17).	37
Figura 14: Representação gráfica dos valores de índice de refração em função da concentração e determinação do dn/dc.	38
Figura 15: (A) Curva de titulação em água milli-Q, obtida para PBAE de diferentes pesos moleculares e determinação do pKb. (B) Transmitância do PBAE a 500 nm a diferentes pH.	41
Figura 16: Titulação de controlo do PBAE com vista a verificar se existe degradação do polímero ao longo do processo de titulação.	42
Figura 17: Estudo da degradação in vitro do PBAE em soro fisiológico durante 17 dias.	43
Figura 18: Espectro do FTIR das amostras a diferentes dias de degradação.	43
Figura 19: Avaliação da hidrólise das cadeias por SEC.	44
Figura 20 - Ensaio de viabilidade celular para diferentes concentrações de PBAE na linha celular 3T3-L144	
Figura 21- Ensaio de viabilidade celular para diferentes concentrações de PBAE na linha celular TSA.	45
Figura 22: Correlograma das amostras; a vermelho o PBAE; a rosa o Alginato, a verde CH17(1/10), a azul CH17(1/15) e a preto CH17(1/20). Note que as curvas dos complexos encontram-se mais afastadas da origem dos eixos, indicando que, após serem misturados o PBAE e o Alginato complexam formando agregados maiores.	47
Figura 23: Distribuição em intensidade da amostra CH17 (1/20) antes e após ter sido filtrada.	47
Figura 24: Distribuição em volume da amostra CH17 (1/20) antes e após ter sido filtrada.	48
Figura 25: Em cima, caracterização do espectro de ^1H -RMN do PBAE antes da modificação de terminais acrilato, em baixo, PBAE após a modificação de terminais.	50
Figura 26: Espectro de FTIR-ATR do PEG-N3.	50
Figura 27: A azul, o espectro de FTIR-ATR do CH6 (\equiv -PBAE- \equiv), a vermelho o espectro de FTIR-ATR do CH14 (PEG-PBAE-PEG).	51

Figura 28: Espectro de H-RMN do PBAE antes da modificação dos terminais (CH5) e após a modificação dos terminais (CH8). Note que efectivamente se verifica um aumento no valor do DP calculado em relação aos terminais acrilato de 16 para 45. _____ 53

Figura 29: Espectro de H-RMN do PBAE obtido a partir da reacção de diacrilato de 1,4-butanodiol e glucosamina hidroclorídrica. _____ 56

Figura 30: A azul, o espectro de FTIR-ATR do glucosamina hidroclorídrica, a vermelho o espectro de FTIR-ATR do diacrilato de 1,4-butanodiol e a verde o espectro de FTIR-ATR do CH19 resultante da adição de Michel entre os dois reagentes. _____ 56

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Vectores virais usados na entrega no material genético e suas respectivas vantagens e limitações (fonte [7]).</i>	5
<i>Tabela 2: Síntese de PBAE à temperatura ambiente e avaliação da variação M_n^{RMN} com o tempo de reacção.</i>	34
<i>Tabela 3: Cálculo do $M_{n, RMN-1H}$ do PBAE (CH17) através dos valores dos integrais dos desvios químicos característicos e e j.</i>	36
<i>Tabela 4: Resumo dos M_n obtidos para a amostra CH17 por RMN e SEC usando a calibração convencional e a universal.</i>	38
<i>Tabela 5: Resultado do potencial Zeta (mV) médio das amostras calculado com base nas 3 medições efectuadas para cada amostra.</i>	46
<i>Tabela 6: Condições de reacção testadas e resumo dos resultados obtidos.</i>	52
<i>Tabela 7: Resumos das condições de reacções testadas.</i>	54

Lista de Abreviaturas e Siglas :

DCM	Diclorometano
DMEM-HG	Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DP	Grau de polimerização
DV	Viscosímetro diferencial
FBS	Fetal bovine serum
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada
GPC	Cromatografia por permeação em gel
GSH	Glutathiona reduzida
HCl	Ácido clorídrico
MSCI	Cloreto de metanosulfonilo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	Polidispersividade
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietileno imina
PS	Poliestireno
P β AE	poli(beta amino ésteres)
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
SEC	Cromatografia de separação de tamanhos
SLCF	Sistemas de libertação controlada de fármacos
TSCI	Temperatura de solução crítica inferior
TSCS	Temperatura de solução crítica superior
(\equiv - P β AE - \equiv)	poli(beta amino ésteres) com terminais alcino
PEG-N3	Polietilenoglicol com uma azida no terminal
PEG- P β AE-PEG	Copolímero de poli(beta amino ésteres) e Polietilenoglicol com três blocos com

Resumo

O poli(*beta*-amino ésteres) (P β AE) é um polímero catiónico, biodegradável com elevado potencial na complexação e entrega do material genético. O presente trabalho visa a síntese e caracterização do P β AE para a obtenção de nanotransportadores a partir da sua conjugação com o polietilenoglicol (PEG) para entrega de fármacos e/ou material genético. Para isso, procedeu-se à síntese do P β AE por adição de Michael entre o diacrilato de 1,4-butanodiol e 5-amino-1-pentanol (1,2/1) em acetona. Deste modo, foram obtidos polímeros com pesos moleculares entre 3300-10000 g.mol⁻¹, tendo sido demonstrado que o aumento da temperatura de reacção é determinante para o aumento do peso molecular. A confirmação da estrutura química foi realizada por ¹H-RMN e por FTIR-ATR. O pK_b do polímero foi determinado por titulação com NaOH, tendo-se obtido um valor de pK_b ≈ 5. Os valores medidos de transmitância demonstraram que para valores de pH superiores a 5 o valor da transmitância vai diminuindo rapidamente, indicando o P β AE torna-se solúvel como resultado da protonação do grupo amino. A degradação do P β AE foi avaliada em soro fisiológico tendo-se concluído que, nestas condições, a degradação ocorre por hidrólise das cadeias sendo o tempo de meia vida da amostra estimada em 7 dias. A viabilidade celular das células na presença de diferentes concentrações de P β AE foi avaliada pelo teste de Alamar Blue. Os resultados mostraram uma elevada viabilidade celular mesmo para altas concentrações de polímero. Os dados de potencial Zeta e da medição de tamanhos das partículas, preparadas por complexação com alginato de sódio, indicaram que houve agregação das partículas, formando-se agregados de tamanho superiores a 1 μ m. A preparação do copolímero PEG-P β AE-PEG foi feita por uma reacção de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen (azida-alcino) catalisada por cobre Cu (I) (*Click Chemistry*), após prévia modificação dos terminais do P β AE e do PEG com um grupo alcino e azida, respectivamente. Apesar dos resultados da análise FTIR indicarem que a reacção foi bem-sucedida não foi possível confirmar por outros métodos de caracterização físico-química, tornando-se, por isso, inviável a continuação do projecto inicialmente proposto. De forma a contornar este resultado, foram propostos dois novos objectivos ao projecto inicial, a modificação dos terminais acrilato do P β AE com glucosamina e a preparação de um novo P β AE preparado com o diacrilato de 1,4-butanodiol e a glucosamina. Relativamente à modificação dos terminais acrilato com glucosamina conseguiu-se uma modificação na ordem dos 85%. Os resultados da síntese de P β AE com glucosamina revelaram-se promissores, contudo necessitam de mais experiências de modo a otimizar a síntese.

Palavras-chave: poli(*beta*-amino ésteres); polietilenoglicol ; nanotransportadores; adição de Michael; cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen (azida-alcino) catalisada por cobre Cu (I); glucosamina;

Abstract

Poly(β -amino ester)s (P β AE) are biodegradable cationic polymers that have significant potential as gene delivery vectors. The present work aims to the synthesis and characterization of P β AE in order to obtain nanocarriers from the combination with polyethylene glycol (PEG) for drug and/or genetic material delivery. To achieve this purpose, P β AE synthesis was carried out by Michael addition between 1,4-butanediol diacrylate and 5-amino-1-pentanol (1,2/1), in acetone. As a result, polymers with molecular weights between 3300-10000 g.mol⁻¹, were obtained. The high temperature of the reaction is the determinant factor to the of the molecular weight increase. The confirmation of the chemical structure was done by ¹H-RMN and by FTIR-ATR. The pK_b of the polymer was determined by titration with NaOH and a value around 5 having been obtained. Light transmittance measures of aqueous solution of the polymer demonstrated that, for pH values greater than 5 the transmittance value quickly decreases, showing that the P β AE becomes soluble as a result of the amine group protonation. The degradation of the P β AE was examined in physiological saline and it has been concluded that, in these conditions, the degradation occurs by hydrolysis of the chains with a half-life estimated to 7 days. The cell viability in the presence of different P β AE concentrations was evaluated by the Alamar Blue test. The results showed an high cell viability even for high concentrations of the polymer. The data regarding Zeta potential and size measurement of particles prepared by complexation with sodium alginate suggested that there was particles aggregation, with aggregates of size superior than 1 μ m being formed. The preparation of the copolymer PEG-P β AE was made by copper-catalyzed (azide-alkyne) Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition reaction, Cu (I) (Click Chemistry), after previous end-modification of the P β AE and the PEG with an alkyne and an azide group respectively. .

The end-modification of the P β AE acrylate with glucosamine and the preparation of a new P β AE made with 1,4-butanediol diacrylate and glucosamine hydrochloride was attempted . Regarding the end-modification of acrylate with glucosamine, a modification of around 85% was achieved. The results of the P β AE synthesis with glucosamine seem promising. However it requires more experiments in order to optimize the synthesis.

Keywords: Poly(β -amino ester)s; polyethylene glycol (PEG); gene delivery vectors; Michael addition; Copper-catalyzed, Cu (I) , (azide-alkyne) Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition reaction; glucosamine;

1 Introdução

Para dar resposta aos problemas com os quais somos confrontados diariamente, torna-se indispensável a colaboração entre várias ciências antes vistas como independentes. Assim, o desenvolvimento das novas tecnologias tem passado pela valorização da interdisciplinaridade onde a colaboração entre Biologia, Bioquímica, Medicina, Farmácias, Engenharias bem como os demais ramos científicos revela-se fundamental. A Engenharia Biomédica surge, neste âmbito, como um excelente exemplo, onde pela conjugação de conhecimentos de várias áreas se tem conseguido desenvolver novas tecnologias ou melhorar as existentes contribuindo, assim, para um grande desenvolvimento da medicina.

O uso de biomateriais em medicina tem vindo a aumentar a cada dia. As aplicações são diversas, desde o fabrico de implantes, sistemas de assistência cirúrgicos ou dispositivos para a realização de exames, ou seja, grande parte dos dispositivos hoje usados em medicina são biomateriais. Por outro lado, novas correntes têm surgido como o caso da engenharia de tecidos, para a prática da medicina regenerativa, bem como a nanotecnologia, que tenta explorar algumas características únicas que os materiais apresentam à escala nanométrica (usualmente, definida de 1-100nm).

Se pensarmos bem, a relação entre Biomateriais e “nano” é maior do que se imagina, pois ao projectarmos um produto devemos ter em conta a finalidade da aplicação final. Dado que o tamanho determina vários aspectos da aplicação, nomeadamente, o mecanismo de entrada do material nas células (por exemplo, por receptores, fagocitose, ou outro) e a interacção do material com o meio biológico que determinará se o material será bem-sucedido ou se, pelo contrário, será rejeitado. Assim, a Nanobiotecnologia (convergência entre nanotecnologia e biotecnologia) tem sido considerada como uma das mais vantajosas e mais promissoras áreas da nanotecnologia. As aplicações incluem diagnóstico molecular, imagem, terapia, bem como a reparação de tecidos a nível celular. Deste modo espera-se que o desenvolvimento da nanobiotecnologia trará avanços significativos tanto ao nível do diagnóstico quanto ao nível do tratamento de doenças. Assim, tem-se verificado, na última década, um crescente aumento da investigação científica nesta área.

O presente trabalho visa a síntese e caracterização de um polímero catiónico, poli (beta amino ésteres) (P β AE) para a obtenção de nanotransportadores de fármacos. O trabalho encontra-se estruturado em capítulos sendo que: “i” No primeiro capítulo se faz uma introdução teórica de conceitos importantes, características fundamentais que um nanotransportador polimérico tem de ter para ser aplicado na libertação controlada de fármaco bem como uma

1. Introdução

breve descrição do estado da arte referente ao P β AE; “ii” No segundo capítulo descreve-se o procedimento experimental utilizado para a síntese, caracterização e complexação do P β AE; “iii” O terceiro capítulo diz respeito aos resultados obtidos e à discussão dos mesmos; “iv” Por fim, no último capítulo apresenta-se as conclusões e considerações acerca do trabalho desenvolvido, bem como as perspectivas futuras.

1.1 Cancro

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o cancro é uma doença caracterizada por um rápido crescimento e proliferação celular. As células do cancro podem invadir os tecidos vizinhos ou muitas vezes migrar para outras partes do corpo provocando metástases do tumor noutros órgãos.

Actualmente, o cancro é a doença com a segunda maior taxa de mortalidade no mundo. De acordo com o último relatório da incidência mundial da doença, publicada pela OMS em 2008, prevê-se que até 2030 o número de incidência da doença poderá ser de 27 milhões, sendo a mortalidade associada de 17 milhões. Anualmente, estima-se que sejam diagnosticados cerca de 10 milhões de novos casos [1]. Este rápido crescimento da taxa de incidência da doença levou a que o cancro seja considerado um problema de saúde pública.

1.1.1 Tratamento

O tratamento do cancro tem como principal objectivo a excisão do tumor tentando poupar, ao máximo, os tecidos sãos. Para tal, actualmente, existem três abordagens possíveis [2]:

A cirurgia que visa a excisão (parcial ou total) da massa tumoral, nódulos linfáticos adjacentes e por vezes parte do tecido adjacente que tenha sido afectado;

Radioterapia que visa a regressão do tumor pela exposição à radiação ionizante proveniente de isótopos radioactivos ou de aceleradores lineares. A fonte de radiação pode ser externa, radioterapia externa, ou interna quando os isótopos radioactivos são localmente inseridos no tecido alvo, braquiterapia;

Quimioterapia na qual a regressão do tumor é provocada pelo recurso a fármacos antineoplásicos.

Para aumentar a eficiência do tratamento estas técnicas são, muitas vezes, utilizadas em combinação, designando-se por terapia combinada.

Uma das principais limitações das terapias existentes para o cancro é falta de especificidade para com o tecido alvo e consequente citotoxicidade para as células sãs, o que faz

com que a sua utilização seja limitada [3]. Assim, o seu uso é sempre condicionado a uma estimativa de risco/benefício para o doente.

Com vista a ultrapassar estas limitações, vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos visando encontrar soluções que possam melhorar a especificidade das terapias já existentes ou, até mesmo encontrar novas formas de terapias. Neste âmbito, a terapia génica surge como uma possível alternativa para o tratamento de tumores.

1.1.1.2 Terapia Génica no tratamento do Cancro

O termo terapia génica refere-se a uma variada gama de terapias que usam material genético exógeno para modificar, geneticamente, células (*in vivo* ou *in vitro*) com o propósito de prevenir ou curar uma determinada doença. Esta tecnologia tem vindo a ser aplicada em diversas doenças, tais como: doenças monogénicas, doenças auto-imunes, doenças infecciosas, doenças vasculares, doenças oncológicas, entre outras [4].

O recurso à terapia génica para o tratamento do cancro tem-se revelado uma área com um vasto potencial. Diversas estratégias têm vindo a ser exploradas pela comunidade científica, podendo-se subdividir em três categorias [5]:

Imunoterapia- Que visa “treinar” o sistema imunitário para reconhecer e destruir as células cancerígenas. Este “treino” é feito de três formas: pela modificação genética de células cancerígenas (*in vitro*) de modo a serem mais facilmente reconhecidas pelo sistema imunitário e sua posterior incorporação numa vacina; pela entrega directa ao tecido tumoral (*in vivo*) de genes imuno-estimuladores ou, ainda, pela directa alteração das células do sistema imunitário (Figura 1 A);

Viroterapia oncolítica -Esta estratégia visa o desenvolvimento de vírus geneticamente modificados de modo a destruir as células cancerígenas permanecendo inócuos para o resto do organismo (vectores virais). Os vectores oncolíticos são projectados de modo a promover a morte celular pela propagação do vírus, pela expressão de proteínas citotóxicas ou pela promoção da lise celular (Figura 1 B);

Transfecção de Genes- Nesta técnica, são introduzidos novos genes nas células cancerígenas ou nas células do tecido circundante para induzir morte celular ou reduzir o crescimento do cancro. São utilizados genes suicidas (que quando expressos induzem morte celular), genes inibidores da angiogênese e genes que inibem o crescimento celular (Figura 1C);

1. Introdução

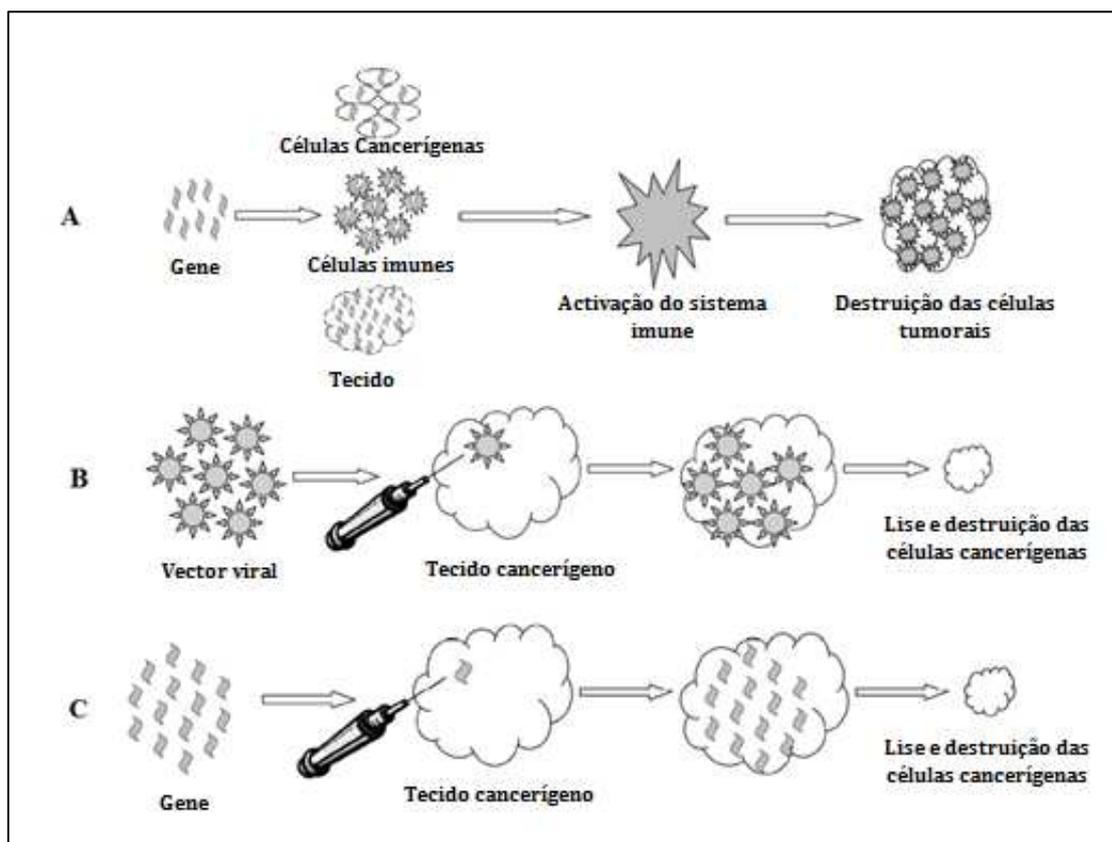


Figura 1: Esquema representativo das diversas estratégias usadas na terapia Génica aplicada ao cancro. (A) abordagens usadas em imunoterapia. (B) diagrama representativo da viroterapia oncolítica. (C) diagrama representativo da terapia por transfecção (adaptado de [5]).

O ramo da terapia génica aplicada ao tratamento de tumores tem vindo a ter um rápido avanço. Tendo já sido desenvolvidos várias vacinas, muitas das quais se encontram numa fase avançada de ensaio clínico. Por outro lado, a transfecção de genes tem mostrado ser uma mais-valia no melhoramento das actuais técnicas de quimioterapia existentes.

A entrega do material genético tem de ser feita usando vectores que protejam o material de sofrer degradação, permitam a entrada na célula e não permitam a rápida eliminação renal do DNA. Os primeiros vectores a serem testados foram os virais, todavia estes possuem algumas desvantagens (Tabela 1), nomeadamente, poderem desencadear uma resposta imune e serem assim tóxicos.

Deste modo, a entrega do material genético ao tecido tumoral, *in vivo*, continua sendo um dos principais desafios desta técnica [6], à semelhança da entrega de fármacos em quimioterapia, mantendo-se a necessidade do desenvolvimento sistemas mais eficazes para a entrega destes agentes.

Tabela 1: Vectores virais usados na entrega no material genético e suas respectivas vantagens e limitações (adaptado de [7]).

Vírus	Genoma	Tamanho	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	ssRNA	7-10 kb	Expressão a longo termo	Aplicação é limitada a células replicativas Possibilidade de mutagêneses de inserção
Adenovírus	dsDNA	36 kb	Capacidade de transferir genes episomais numa vasta gama de células e tecidos Cresce facilmente em grandes quantidades	A resposta do hospedeiro ao vírus parece limitar a duração da expressão e da habilidade para repetir doses
AAV	ssDNA	5 kb	Estruturalmente simples Provoca menos resposta das células hospedeiras	Extremamente difícil crescer em grandes quantidades

1.2 Sistemas de libertação controlada de fármacos

A libertação controlada de fármacos tem como objectivo o controlo temporal e espacial da concentração do fármaco, *in vivo*, de modo a maximizar o efeito terapêutico e minimizar os efeitos secundários [8].

Vários factores têm de ser tidos em atenção quando se fala da libertação controlada de fármacos, nomeadamente as características da patologia que se pretende tratar, o tempo de acção necessário para que haja um efeito terapêutico, a via de administração, as propriedades do fármaco que se pretende libertar, entre outros.

A libertação controlada de fármacos implica a associação química ou física de fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas designados de sistemas de libertação controlada de fármacos (SLCF). Estes sistemas devem possibilitar não só a libertação do fármaco de forma controlada mas também a manutenção da concentração do fármaco no organismo dentro da gama terapêutica desejada. Devem ainda, quando possível, conduzir o fármaco até ao sítio específico onde este deve actuar (entrega ao alvo) [9].

De facto, a entrega do fármaco a um alvo específico (Figura 2) é extremamente importante para maximizar o efeito terapêutico. Deste modo a libertação direccionada a um alvo tem sido

1. Introdução

objecto de um intenso estudo pela comunidade científica o que proporcionou um desenvolvimento considerável desta área na última década. Neste caso, a concepção do SLCF deve ser de tal modo que tenha elevada especificidade para determinadas áreas do corpo e que possa sofrer degradação no alvo libertando o fármaco [10]. Neste âmbito o uso de polímeros ditos “inteligentes”, ou seja polímeros que “respondem” a um estímulo específico (como por exemplo, temperatura, pH, força iónica, entre outros), mudando a sua conformação tem sido muito explorado. Uma abordagem mais aprofundada sobre este tipo de sistemas será feita mais adiante.

O desenvolvimento dos SLCF, pela complexidade e variedade dos factores a modelar, implica o envolvimento de várias áreas do saber, nomeadamente engenharia de materiais, genética, biologia, fisiologia, engenharia química, farmacologia, entre outros, pelo que é uma área claramente interdisciplinar [9].

Para o encapsulamento de fármacos tem sido utilizado materiais de natureza lipídica, inorgânica e orgânica (naturais ou sintéticos), de entre os quais os materiais poliméricos têm tido especial interesse [8].

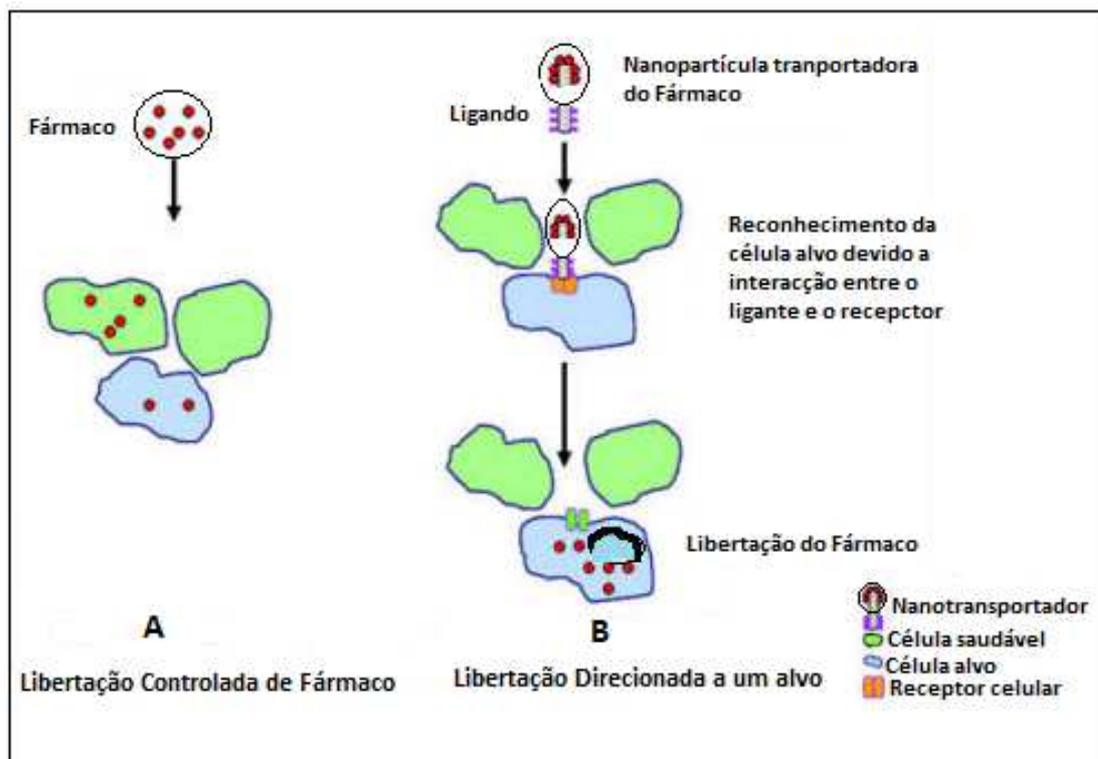


Figura 2: Libertação controlada de fármaco utilizando nanotransportadores, (A) SLCF não direcionada a um alvo específico, (B) SLCF direcionada a um alvo. Neste último caso o nanotransportador é reconhecido pela célula alvo devido a interacção ligando/receptor (adaptado de [11]).

1.2.1 Sistemas de libertação controlada de fármacos de base poliméricas

Para que um material polimérico seja utilizado como SLCF deve cumprir alguns requisitos essenciais, nomeadamente, ser biocompatível e, por sua vez, os produtos da sua degradação não devem ser tóxicos. Para além deste, outro aspecto a ter em conta refere-se à degradação do material, nomeadamente, se é biodegradável, bioerodível ou, ainda, não biodegradável. Neste âmbito, considera-se: "i" biodegradável qualquer material que possa sofrer degradação *in vivo*, por hidrólise ou acção enzimática originando produtos não tóxicos e biocompatíveis capazes de serem metabolizados e eliminados pelas vias fisiológicas normais; "ii" bioerodível materiais que, embora não sofram degradação química (hidrólise) ou enzimática, em condições fisiológicas são dissolvidos (degradação da massa). Os polímeros biodegradáveis/bioerodíveis são preferidos uma vez que não carecem de uma intervenção cirúrgica *à posteriori* para a sua remoção [9, 10, 12].

Os SLCF podem ser preparados com base em polímeros naturais, sintéticos ou semi-sintéticos (Figura 3) [8, 10] .

Polímeros Naturais- os polímeros naturais tem sido usados como materiais de base para os SLCF uma vez que contém uma excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixo custo. Todavia, existem algumas limitações inerentes ao uso deste tipo de polímeros, nomeadamente a forte resposta imunológica associada, possibilidade de transmissão de doenças, difícil purificação e falta de uniformidade dos materiais, ou seja, as propriedades podem sofrer variações de lote para lote.

Os polímeros mais usados neste caso são a classe das proteínas e dos polissacarídeos. As proteínas mais usadas são: o colagénio (proteína estrutural muito abundante no organismo, encontra-se maioritariamente na cartilagem tendões e ossos), gelatina (obtido pela desnaturação do colagénio) e albumina (molécula constituinte do plasma sanguíneo). Sendo que entre os polissacarídeos se destacam o quitosano (polissacarídeo catiónico obtido pela desacetilação da quitina), o alginato (extraído das algas castanhas) e o dextrano (homopolissacarídeo de origem bacteriana). Esta família de polímeros tem sido usada não só para entrega de fármacos (tanto de baixo como elevado peso molecular) mas também de factores de crescimento, proteínas e material genético.

Polímeros Sintéticos - esta classe de polímeros tem sido cada vez mais usada nos SLCF uma vez que possuem a vantagem de, pela mudança dos monómeros usados e/ou processo de

1. Introdução

síntese, controlar a sua estrutura química e tridimensional de acordo com a aplicação biológica desejada. Por outro lado, o processo de síntese é reproduzível sendo fácil obter um novo sistema com as mesmas especificações. Podem ser biodegradáveis quando a sua estrutura é formada essencialmente por grupos ésteres, anidrido, orto-ésteres, ureia, ligações de uretano ou α -aminoácidos. É possível controlar a cinética da biodegradabilidade do polímero introduzindo, na sua estrutura, os grupos acima referidos.

No caso dos polímeros não biodegradáveis deve se ter uma especial atenção ao peso molecular (distribuição uniforme de pesos), uma vez que a excreção do polímero ocorre por via renal, deste modo o tamanho das cadeias devem ser adequadas de modo a possibilitarem a excreção renal sem ficarem retidos.

Dos polímeros sintéticos os mais usados para este tipo de aplicação são os da família dos poliéster, poli(orto ésteres), dos poli(cianoacrilato de alquilo) e dos acrilatos.

Polímeros semi-sintéticos - derivam da modificação dos polímeros naturais de modo a melhorar a suas propriedades. Constituem uma interessante alternativa para o uso em SLCF uma vez que se consegue aliar, num mesmo material, as melhores propriedades dos polímeros naturais (biocompatibilidade e biodegradabilidade) às melhores propriedades dos polímeros sintéticos (por exemplo, as propriedades mecânicas). Um dos mais usados são os derivados de celulose. A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza constituída por unidades de glucose com ligações glucosídeas $\beta(1-4)$, cada um apresenta 3 grupos hidroxilos. Os grupos hidroxilos são responsáveis pelas ligações de hidrogénio estabelecidas entre as cadeias de glucose. Estes grupos podem ser facilmente funcionalizados obtendo-se materiais de propriedades distintas denominados de derivados de celulose. Os derivados de celulose têm sido usados para a libertação de vários tipos de fármacos: diclofenac de sódio, cetoprofeno, betametasona, nimesulida, 5-fluorouracil e cefpodoxima proxetil.

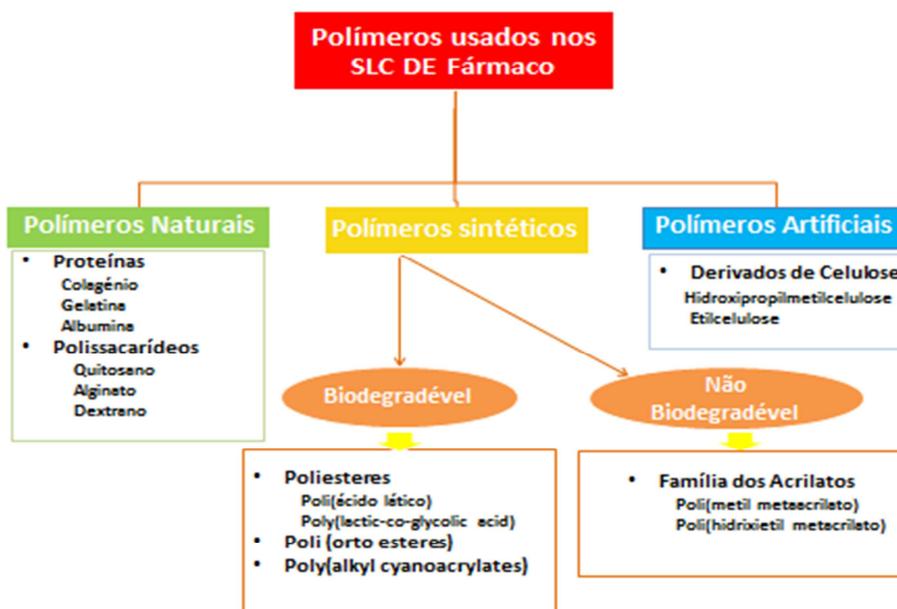


Figura 3: Lista do principais polímeros usados nos SLCF(adaptado de [10]).

De acordo com o mecanismo pelo qual o fármaco é libertado, os SLCF de base polimérica podem ser subdivididos em 4 categorias [9, 10]:

Sistemas de libertação controlada por difusão - que, por sua vez, encontra-se subdividido em dois tipos: os sistemas matriciais e os sistemas de reservatórios. O primeiro tipo consiste numa matriz onde o fármaco é distribuído uniformemente, enquanto o segundo tipo consiste numa membrana polimérica que envolve o núcleo que contém o fármaco. Em ambos os casos a libertação se dá por difusão.

Sistemas de libertação controlados por acção química – são normalmente subdivididos em sistemas de cadeias pendentes e biodegradáveis/bioerodíveis. No primeiro caso, o fármaco encontra-se quimicamente ligado à cadeia do polímero, por ligações que sofrem degradação *in vivo* (por hidrólise ou acção enzimática) conduzindo à libertação do fármaco a uma taxa moderada. No caso dos sistemas biodegradáveis/bioerodíveis o fármaco encontra-se disperso ou dissolvido numa matriz sendo a taxa de libertação controlada pela desintegração da matriz.

Sistemas de libertação activados pelo solvente - neste caso a libertação do fármaco é controlado por osmose ou pela absorção de água (*swelling*). Os sistemas controlados por pressão osmótica baseiam-se numa partícula com uma membrana semipermeável (permeável a fluidos e impermeável ao fármaco) que contem o fármaco no seu interior. A pressão osmótica originada pela diferença de concentração do fármaco do interior em relação ao exterior leva a que haja um fluxo de água para o interior da partícula o que, por sua vez, faz aumentar a pressão dentro da camara que contem o medicamento, forçando a sua saída pelo orifício presente na

partícula. No caso dos sistemas controlados pela absorção de água baseiam-se num polímero hidrofílico reticulado, capaz de absorver grandes quantidades de água sem se dissolver (hidrogel). A libertação do fármaco é controlada pela absorção de água pela matriz polimérica que leva a difusão da droga para o exterior.

Sistemas de libertações controladas por acção magnética - estes sistemas são obtidos pela combinação de polímeros com partículas magnéticas. Deste modo, o movimento destas partículas, no corpo, pode ser controlado por um campo magnético externo. No entanto, para que isso aconteça, a força magnética aplicada tem de vencer a força hemodinâmica. Todavia, tratando-se de um sistema biológico não é recomendável o uso de campos magnéticos muito intensos. Razão pela qual se recorre a materiais com forte magnetização com é o caso do ferro, níquel e cobalto.

1.3 Nanosistemas para a libertação controlada de fármacos

Uma das mais vastas áreas de aplicação dos nanomateriais é na entrega e libertação controlada de fármacos. A definição de nanosistema remete a um sistema cuja dimensão vai até 100 nm ou, ainda, a uma partícula de diâmetro inferior a 1 μm . Nos sistemas de libertação controlada de fármaco, normalmente o fármaco encontra-se dissolvido, aprisionado, adsorvido, ligado ou encapsulado a uma matriz polimérica com dimensões nano ou micro [9]. O uso de nanosistemas na entrega e libertação controlada de fármaco demonstrou ser vantajoso. Uma vez que as nanopartículas conseguem permanecer na circulação sanguínea por longos períodos sem serem reconhecidos pelos macrófagos, transportar grandes quantidades de fármaco, difundirem-se facilmente pelos capilares e membranas fisiológicas penetrando nos tecidos, apresentam alta captação celular. Assim, conduzem a melhores respostas terapêuticas no tecido e conseguem manter esta resposta por um longo período de tempo (dias ou até semanas) [12, 13].

Os nanosistemas aplicados na libertação controlada de fármacos podem ser classificados de [10, 14]:

Micelas - resultam da reorganização de copolímeros anfipáticos (constituído por um bloco hidrofílico e outro hidrofóbico) que em solução aquosa adquirem uma configuração de modo a manter a extremidade hidrofílica exposta ao exterior e a extremidade hidrofóbica virada para o interior. Este tipo de nanotransportador é ideal para encapsulação de fármacos hidrofóbicos. Normalmente, as micelas possuem diâmetros inferiores a 100 nm o que lhes concede maior tempo em circulação e facilidade em se difundir pelas células endoteliais da vizinhança de

tumores sólidos. Possibilitam, ainda, pela ligação de ligandos ou anticorpos específicos à sua superfície, uma entrega direccionada a um determinado alvo (*targeted drug delivery*).

Lipossomas-são pequenas vesículas esféricas, de diâmetro entre 50 nm a 500 nm, constituídas por uma ou mais camadas lipídicas (fosfolípidos ou colesterol) separadas por fases aquosas, cujo cerne é um compartimento aquoso. As suas propriedades podem ser modeladas pela sua composição, tamanho, carga de superfície (pelo uso de lípidos catiónicos ou aniónicos) e método de preparação. São conhecidas aplicações tais como a encapsulação de fármacos, vacinas, cosméticos e nutracêuticos (produto nutricional com valor terapêutico). A encapsulação de fármacos em lipossomas tem como vantagens melhorar a farmacocinética do composto, redução da toxicidade sistémica e impede a degradação precoce do encapsulado. Os lipossomas também possibilitam, pela manipulação da sua superfície, a ligação de outros polímeros, como PEG, levando a um aumento do seu tempo de meia-vida em circulação ou, ainda, a ligação de ligandos ou anticorpos essenciais para uma entrega direccionada (*targeted drug delivery*).

Dendrímos- São pequenas moléculas, de origem poliméricas, constituídas por um núcleo e uma série de ramificações, simétricas, em torno do núcleo. Podem apresentar vários grupos funcionais nas ramificações, como aminas, carboxilas e hidróxilas os quais aumentam com o número de gerações (G0, G1, G2, etc). A arquitectura globular, o tamanho, facilidade de preparação e facilidade de funcionalizações fazem dos dendrímeros um sistema promissor para a libertação controlada de fármacos. Por outro lado, alterando os grupos superficiais conseguimos ter dendrímeros com interior hidrofóbico e exterior hidrofílico e vice-versa adaptando o sistema ao caso específico. O fármaco pode ir tanto encapsulado no interior do núcleo, como ligados aos grupos superficiais (pró-fármaco). Aplicações como a entrega de fármacos, vacinas, antibióticos e antivírus são já conhecidas.

Nanopartículas poliméricas Podem ser classificadas em nanoesferas e nanocapsulas. No primeiro caso o fármaco encontra-se aprisionado na cavidade central de uma vesícula, rodeada por uma membrana polimérica. No caso das nanoesferas o fármaco encontra-se, uniformemente, disperso na matriz polimérica e vai sendo libertado à medida que a mesma se degrada. Pela variação o método de preparação consegue-se obter nanopartículas de diferentes características e perfil de libertação sendo uma das áreas muito estudadas actualmente. As nanopartículas poliméricas tem-se mostrado poderosos nanotransportadores de diferentes fármacos inclusive os insolúveis bem como na libertação e transporte de material genético.

Pró-fármaco e Pró-proteínas Consiste na ligação de um fármaco ou de uma proteína à cadeia polimérica inactivando-o. Normalmente tem um estrutura tripla constituída pelo polímeros um ligante e a molécula bioactiva, que é libertado no alvo quando as ligações (no

1. Introdução

ligante) são clivadas na degradação do polímero, ficando, assim, na sua forma activa. Estas nanoestruturas são um espécie de “cavalo de tróia” que visam “mascarar” a presença do fármaco ou proteína ligando-o a uma estrutura polimérica que lhe confere melhores propriedades para a aplicação desejada (protege da degradação, facilita a entrada nas células). Estes sistemas são constituídos, habitualmente, por polímeros solúveis em água, com baixo peso molecular, biodegradáveis e não-tóxicos[15-17].

Nos últimos anos a utilização clínica de polímeros ligados a proteínas tem vindo a aumentar, composto como o SMANCS (*Zinostatin stimalamer*) já está no mercado desde 1990. Por outro lado a ligação de polímeros sintéticos a proteínas, principalmente o Polietilenoglicol (PEG), demonstrou aumentar a resistências dos compostos ao plasma, diminuir a sua imunogenicidade e potenciar o efeito terapêutico. Compostos como o PEG-L-asparaginase, PEG-GCSF, PEG-IFN α 2a e PEG-IFN α 2b já são comerciais [18].

Relativamente aos pró-fármacos vários compostos já se encontram em ensaios clínico com é o caso do poliglutamato-paclitaxel, HPMA-DOX, dextrano-DOX e o PEG-camptotecina , entre outros [18].

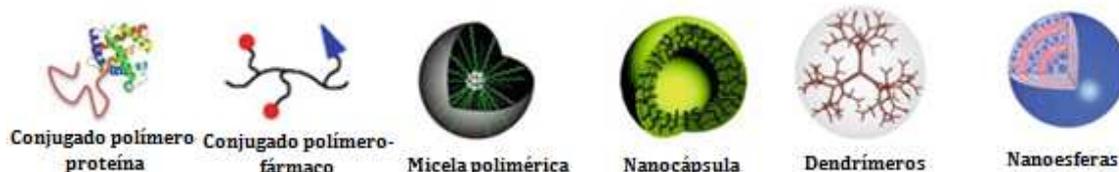


Figura 4: Nanotransportadores poliméricos aplicados na libertação controlada de fármacos (adaptado de [10]).

1.4 Nanotransportadores “Inteligentes” e sua aplicação como SLCF

Os avanços científicos na compreensão molecular de várias patologias, bem como o rápido desenvolvimento das tecnologias de manipulação de materiais e das técnicas de nanobiotecnologia, possibilitaram a concepção de um novo tipo de nanotransportador cuja aplicação proporcionaria uma grande revolução na prevenção, diagnóstico e terapia de várias doenças [19].

Os nanotransportadores que respondem a um estímulo específico ditos “inteligentes” constituem uma importante classe dos SLCF onde o nanotransportador deixa de ter um papel passivo como um simples veículo contendo o fármaco e passa a ter um papel activo e determinante para a optimização da terapia. Neste tipo de SLCF, os polímeros sintéticos são preferidos, uma vez que pela manipulação da estrutura, consegue-se obter um

nanotransportador com resposta a estímulos. Os nanotransportadores que respondem a um estímulo demonstram ter especial interesse quando o estímulo em questão é característico da patologia que se pretende tratar, pelo que a sua concepção requer um conhecimento aprofundado da mesma [20].

De acordo com o estímulo a que respondem, os nanotransportadores podem ser classificados de [19-22]:

1.4.1 Nanotransportadores que respondem ao pH

O pH intracelular e extracelular dos sistemas biológicos é geralmente afectado em casos patológicos. Por exemplo, no caso de doenças inflamatórias, infecciosas e tumores o pH do tecido afectado apresenta alterações, significativas, relativamente ao pH dos tecidos sãos (é menor). Estas diferenças podem ser exploradas para libertação controlada de fármaco. No caso dos nanotransportadores de origem polimérica, tem especial interesse o uso de um material com um pK_a/pK_b adequado e que, conseqüentemente, sofra alterações significativas na sua estrutura química que possam conduzir a alterações das propriedades físicas tais como absorção/libertação de água (*swelling/deswelling*) ou agregação/desagregação da nanopartícula, possibilitando a entrega do fármaco num determinado ambiente fisiológico específico (entrega ao alvo).

Os SLCF que respondem ao pH têm sido muito explorados para a entrega de agentes anti-cancerígenos (fármacos e material genético). Isto porque, dado a rápida proliferação dos tumores (sólidos) os vasos responsáveis pela irrigação tornam-se insuficientes para suprir as necessidades nutricionais e de oxigénio. Nestas condições há produção de ácido láctico que vai contribuir para que o pH extracelular das células tumorais seja, significativamente, inferior (<6,5) aos dos tecidos sãos (7,5) enquanto que o pH intracelular continua semelhante aos tecidos normais. Deste modo forma-se um gradiente transmembranar. Esta característica dos tumores sólidos tem sido explorada no desenvolvimento de nanotransportadores com um pK_a apropriado (5-8) para entrega de agentes anticancerígenos [22].

Neste âmbito, o uso de nanotransportadores de poli(β -amino éster) (P β AE), polímero biodegradável, catiónico e sensível ao pH, tem demonstrado ter bons resultados na entrega de fármaco. O P β AE é um polímero sensível ao pH, sendo que em condições ácidas (pH<6,5) o P β AE dissolve-se rapidamente libertando o seu conteúdo (fármaco/agente genético) [19]. Um estudo mais detalhado sobre este polímero será apresentado mais adiante.

1.4.2 Nanotransportadores que respondem à temperatura

A temperatura é uma outra variável fisiológica que pode ser usada com um gatilho (“*trigger*”) na libertação controlada de fármaco. Os avanços associados à instrumentação e às técnicas de medição de temperatura, dos últimos 20 anos, permitiram uma melhor compreensão dos processos fisiológicos e patológicos associados a um aumento de temperatura. Actualmente, já se consegue, usando nanotransportadores sensíveis à temperatura, obter sistemas que só libertam o fármaco a temperaturas que rondam os 37°C. Estes sistemas, normalmente são constituídos por nanotransportadores que sofrem transições de fase (*volume phase transition*) a uma determinada temperatura passando de hidrofílico para hidrofóbico ou vice-versa. Estes polímeros tornando-se insolúveis ou solúveis quando aquecidos/arrefecidos. Nestes casos, considera-se duas temperaturas críticas da solução: (i) temperatura de solução crítica inferior (TSCI) aplicada aos polímeros que se tornam insolúveis por aquecimento; (ii) temperatura de solução crítica superior (TSCS), aplicada aos polímeros que se tornam solúveis com o aumento da temperatura. Em ambos os casos o estado de solvatação da solução é alterado. Esta transição de fase é explicada pela termodinâmica como sendo efeito da diminuição da entalpia devido às ligações de pontes de hidrogénio entre a água e o polímero, em comparação com o ganho de entropia do sistema como um todo. Neste caso as ligações por pontes de hidrogénio inter/intramoleculares são preferidas em comparação com os estabelecidos com a água. Assim, o TSCI/TSCS é dependente das capacidades de ligação de hidrogénios dos monómeros constituintes do polímero, deste modo ela pode ser “afinada” pela manipulação do teor de co-monómeros hidrofílico e hidrofóbicos usados. Materiais com base em copolímero de N-isopropilacrilamida (por exemplo a poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm)) com várias temperaturas de transição de fase já foram reportados [22, 23].

O uso da hipertermia (elevação e/ou manutenção da temperatura do organismo a patamares capazes de comprometer, ou mesmo de colapsar seu metabolismo) como terapia complementar da radioterapia e da quimioterapia tem sido alvo de um intenso estudo nas últimas décadas. Isto porque as células tumorais demonstram possuir uma maior sensibilidade aos danos causados pelo aumento da temperatura do que as células normais. Por outro lado, estudos demonstram que a libertação controlada de fármacos a um alvo específico (ex. Doxiciclina) por nanotransportadores poliméricos pode ser potenciada pelo aumento local da temperatura. Neste caso recorre-se a nanosistemas que conseguem manter o fármaco encapsulado no sistema circulatório e em contacto com os tecidos. No entanto, quando sujeitos a estímulos externos que levam a um aumento da temperatura na zona que se pretende tratar

(hipertermia), estes nanosistemas sofrem uma transição de fase, conseguindo libertar o fármaco [19, 22].

Actualmente a maioria dos sistemas de hipertermia baseiam-se em nanopartículas ou lipossomas paramagnéticos contendo óxido de ferro. Após a injeção, as partículas podem ser direccionadas a um local específico a partir de um campo magnético externo apropriado. Posteriormente, pela exposição local de um campo de 100-120 kHz por aproximadamente 30 minutos consegue-se chegar a temperaturas entre 40-45 °C induzindo, assim a libertação local do fármaco. Estes sistemas apresentam, ainda, a vantagem de criar microembolias nos vasos tumorais restringindo a passagem de nutrientes e oxigénio [19].

1.4.3 Nanotransportadores que respondem ao potencial Redox

A grande diferença entre o potencial redox existente entre o espaço intracelular e extracelular (100-1000 vezes) é, também, um dos factores explorados para a libertação controlada de fármaco. Neste caso, os nanotransportadores projectados, normalmente, contêm ligações dissulfureto (que são reduzidos na presença de um baixo potencial de redução). Estes nanotransportadores são captados por endocitose e quando expostos ao meio, intracelular onde o potencial redox é baixo, devido ao excesso de glutathione reduzida (GSH), as ligações por pontes de dissulfureto são clivadas (redução do dissulfureto) conduzindo, assim, à libertação do fármaco ou material genético.

Vários estudos usando nanotransportadores sensíveis ao potencial redox tem vindo a ser levados a cabo. A sua aplicação na libertação de material genético tem vindo a ser muito explorada, por exemplo usando complexos de polietilenimina (PEI)/DNA contendo ligações de dissulfureto conseguiu-se aumentar a transfecção. Estudos envolvendo o acoplamento do poli(etilenoglicol) (PEG) a policatiões também tiveram bons resultados na libertação de material genético [19].

1.5 Poli(β -amino ésteres)

O crescente desenvolvimento da Terapia Génica levou a uma busca por vectores não virais para a entrega de material genético. Esta necessidade, conduziu a um manifesto interesse sobre a classe de polímeros catiónicos (normalmente contendo grupos aminos) que pudessem, por interacção das suas cargas positivas com as cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA, complexar com o DNA de modo a protegê-lo de sofrer degradação [24]. A poli(etileno amina), a poli(lisina) e a poli(amido amina) foram os primeiros a serem testados para este fim. Todavia, embora tenham apresentado bons resultados tanto na complexação com o DNA como na libertação do material genético em linhas celulares, a sua citotoxicidade (a curto ou longo prazo) e a sua não biodegradabilidade (em muitos casos) limitavam a sua aplicação [24]. Deste modo, tornava-se necessário o desenvolvimento de novos polímeros catiónicos contendo ligações hidrolisáveis cujos produtos de degradação não fossem tóxicos.

A síntese de poliésteres catiónicos e biodegradáveis constituiu uma boa alternativa, tendo sido estudados polímeros tais como poli(L-lactido-co-lisina), poli(éster-4-hidroxi-L-prolina), poli(L-ácido(4-aminobutil)-L-ácido glicólico), poli(éster-serina), poli(éster-hidroxi-L-prolina) e poli-[α -(4-aminobutil)-L-ácido glicólico] [25]. No entanto, embora fossem menos tóxicos do que os primeiros (tanto eles como os seus respectivos produtos de degradação) e, embora apresentassem bons resultados na complexação de material genético, a sua síntese era um processo complicado e de alto custo, envolvendo a pré-preparação de monómeros e protecção/desprotecção dos grupos amina [24]. Pensa-se que a citotoxicidade apresentada pelos poliésteres catiónicos dever-se-ia a uma acumulação polimérica na superfície celular que inibiria funções membranares vitais da célula. Por outro lado, as amins terciárias dos polímeros catiónicos podem interferir com processos intracelulares importantes tais como a perturbação das funções da proteína cinase que conduz a uma alteração do PKC [26]. Todavia, estes estudos demonstraram que o uso de poliésteres catiónicos contendo grupos aminos pendentos nas cadeias laterais poderia ser uma boa via para a obtenção de novos vectores para a entrega de material genético.

No ano de 2000, *David M. Lynn* e *Robert Longer* reportaram, pela primeira vez, a síntese de poli(β -amino ésteres) (P β AE) [24], um poliéster contendo amins terciárias na sua estrutura, obtido por adição de *Michael* entre amins ou diaminas com diacrilatos (Figura 5). A facilidade do processo de síntese do P β AE aliado à sua biocompatibilidade tornou-o logo num excelente candidato para a entrega de material genético. Por outro lado, a sua fácil degradação por

hidrólise das ligações ésteres originando subprodutos não tóxicos conferiram ao P β AE todas as características necessárias para a libertação do material genético (DNA). Deste modo o P β AE se distingue dos demais como um polímero catiónico que pode complexar e transportar o material genético protegendo-o da degradação enzimática e que, por outro lado, ao sofrer degradação permite a descomplexação do material possibilitando uma eficiente transfecção do mesmo.

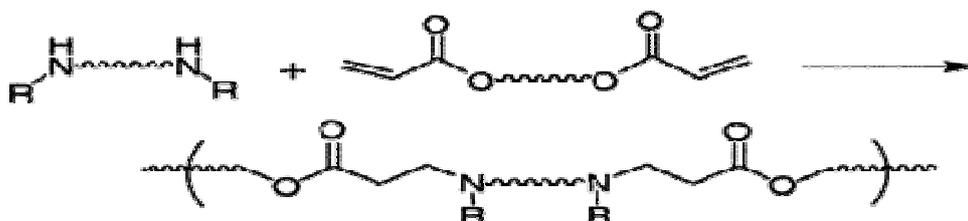


Figura 5. Síntese de P β AE por adição de Michael, a partir de uma diamina com diacrilato (fonte [24]).

Desde a divulgação da sua síntese, os P β AE tem sido alvo de um intenso interesse pela comunidade científica.

Após a primeira síntese, *Robert Longer* e os seus colaboradores reportaram a síntese e caracterização de uma base de dados de P β AEs contendo 140 diferentes P β AEs sintetizados a partir da combinação de 7 monómeros distintos de acrilatos com 20 monómeros contendo grupos aminos, em diclorometano, a 45 °C e por tempos de reacção que iam até aos 5 dias [27].

Em 2003, Daniel G. Anderson e os seus colaboradores sintetizaram (em DMSO e a 60°C) e caracterizaram uma nova base de dados de 2350 P β AEs (Figura 6) com diferentes estruturas e diferentes pesos moleculares e testaram o perfil de complexação e libertação dos polímeros tendo chegado a importantes conclusões, nomeadamente [28]: (i) os P β AE formados por monómeros de amino-álcoois demonstraram ter melhores resultados tanto na complexação como na transfecção do material genético; (ii) os três melhores polímeros estruturalmente diferiam unicamente em um carbono; (iii) os melhores resultados na complexação eram obtidos para P β AEs de peso molecular igual ou superior a 10000 Da; (iv) o grupo terminal do P β AE também afectava, significativamente, a eficiência de transfecção; (v) as partículas (P β AE+DNA) com menor tamanho (71,79 e 82 nm) eram as mais eficientes; (vi) as nanopartículas com maior eficiência de transfecção eram, por sua vez, positivamente carregadas à superfície, com um potencial zeta (ξ) superior a +10 mv. Estes resultados constituíram uma importante “orientação” para a concepção de novos P β AEs com aplicação na complexação e transfecção de material genético.

1. Introdução

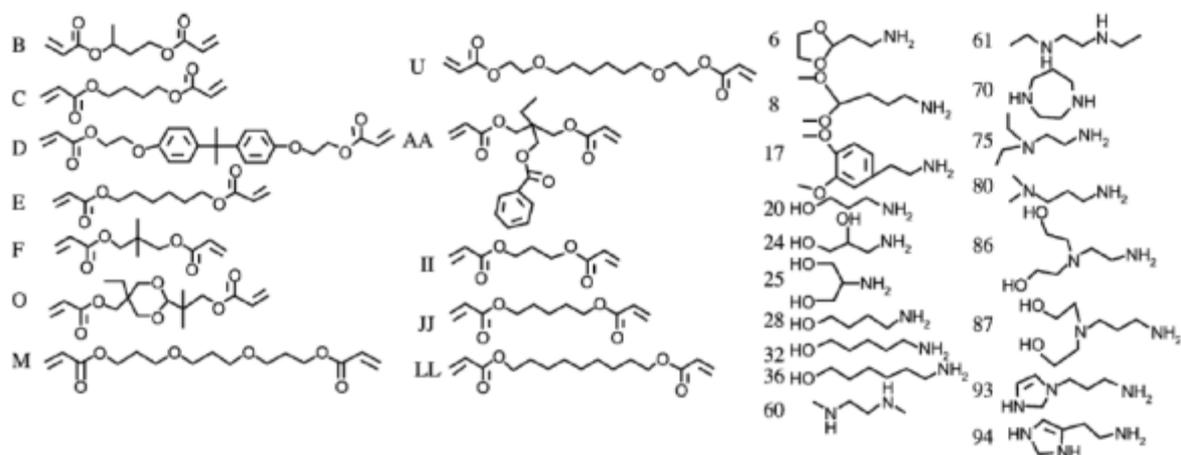


Figura 6: Lista de monómeros de acrilatos e de aminas usados para a síntese da base de dados de PBAE (fonte [28]).

Em 2005, *Mi Ram Park* e os seus colaboradores sintetizaram e caracterizaram copolímeros de PBAE e polietilenoglicol (PEG) de vários pesos moleculares, tendo chegado à conclusão que o copolímero contendo o PEG de maior peso molecular possuía uma degradação mais lenta ($\approx 25h$)[29].

Em 2007 *Jinyoung Ko* e seus colaboradores e *Su Jong Hwang* e seus colaboradores, desenvolveram e caracterizaram micelas poliméricas sintetizadas a partir de um bloco hidrofílico de PEG e de um bloco hidrofóbico de PBAE formando um copolímero anfifílico (PEG-PBAE) que em solução aquosa, por *self-assembly*, dava origem a micelas aptas à encapsulação e libertação de fármacos. Demonstraram, ainda, que a concentração micelar crítica dependia do pH do meio, sendo bem menor a pH ácidos ($\approx 6,4$) quando comparado com o pH fisiológicos ($\approx 7,4$). O perfil de libertação do fármaco revelou-se francamente mais rápido a pH ácidos. Deste modo estas micelas poliméricas sensíveis ao pH poderiam ser boas transportadoras de fármacos anticancerígenos (como por exemplo, doxorrubicina (DOX)) [3, 30]. Três anos mais tarde, *Kyung Hyun Min* e os seus colaboradores [31] avaliaram a biodistribuição das micelas de PEG-PBAE encapsulando uma molécula fluorescente e um fármaco anticancerígeno e usando um modelo animal (rato) de cancro de mama. Verificou-se um aumento da eficácia terapêutica destes nanotransportadores quando comparados com outros modelos de controlo (fármaco livre e fármaco encapsulado em micelas de PEG-poli(L-ácido láctico)). Por outro lado, por imagiologia observou-se uma maior fluorescência no tecido tumoral (pH $\approx 6,8$) quando comparado com os outros tecidos, ou seja, a entrega do fármaco foi direccionada ao tecido tumoral.

Geger T. Zugates e os seus colaboradores [32] avaliaram o papel do grupo terminal do PBAE na transfecção genética, tendo concluído que a presença de terminais amino, hidrofílicos,

contendo grupos hidroxilos ou grupos aminos adicionais apresentavam uma maior eficiência na transfecção.

Estudos recentes reportam o desenvolvimento de aerossóis com base em P β AE (com base de espermina) para a entrega, por inalação, de material genético no cancro do pulmão. Os estudos preliminares demonstraram bons resultados na entrega do fármaco pelos aerossóis, demonstrando que o sistema poderia ser um portador seguro para este tipo de aplicação [33].

Actualmente, o P β AE apresenta-se como sendo um polímero promissor para diversos tipos de aplicações. Todavia, para que possa ser aplicado clinicamente será necessário efectuar mais estudos pré-clínicos tais como o controlo exacto de qualidade do polímero (QC), a farmacocinética dos complexos formados bem como a realização de mais estudos de citotoxicidade.

1.6 Reacções de *click chemistry*

O termo *click chemistry* utilizada, em 2001, para designar reacções que cumprissem a um conjunto de critérios rigorosos, nomeadamente reacções controláveis, de elevado rendimento, que originassem subprodutos não tóxicos e de fácil eliminação e que fossem, ainda, estereoespecíficas [34].

Até a data a reacção mais popular que consegue cumprir estes critérios é a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen entre um terminal azida e um terminal alcino, descoberta no início de séc. 20. Esta reacção provou ter um grande potencial uma vez que os componentes alcinos e a azida podem ser incorporados numa vasta gama de compostos[35].

Todavia, as duas grandes desvantagens que o processo apresentava eram o facto de ser necessário altas temperaturas reaccionais e o tempo de reacção ser, também, muito grande. Em 2002 dois grupos de investigação independentes, reportaram que os sais de cobre eram capazes de acelerar o processo até 10 milhões de vezes sem ser preciso aumentar a temperatura, ou caso fosse preciso, recorrendo, apenas, a um ligeiro aquecimento. Esta descoberta veio a revolucionar a concepção da reacção, antes descrita, tornando-a muito mais fácil. Na figura 7 encontra-se esquematicamente sumariado o processo reaccional da cicloadição de Huisgen.

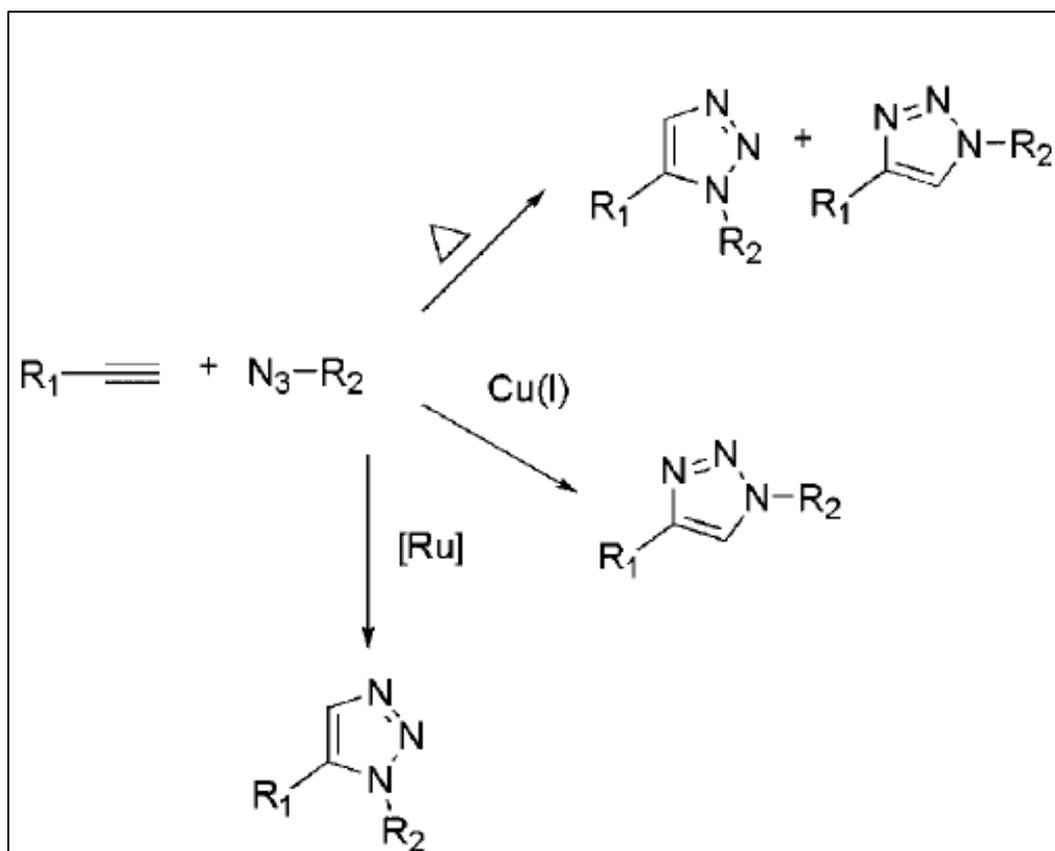


Figura 7: Cicloadição de Huisgen entre um terminal alcino e um terminal azida, catalizada por temperatura, cobre ou rutênio (adaptado de [34]).

1.7 Objectivos propostos

Com este trabalho pretende desenvolver-se nanotransportadores de copolímero de base poli(beta-amino éster) e polietilenoglicol (PEG) para a libertação de fármacos e/ou material genético, utilizando um procedimento passível de ser transposto para a indústria farmacêutica.

Para tal existem um conjunto de metas propostas:

- Preparação de P β AE C32-Ac em acetona;
- Modificação terminal do P β AE com grupos alcino (\equiv -PBAE- \equiv);
- Modificação terminal do PEG de forma a obter o PEG-N₃;
- Reacção de 'click chemistry' entre o \equiv - P β AE - \equiv e PEG-N₃ para obtenção do copolímero PEG-P β AE-PEG;
- Caracterização do copolímero PEG-P β AE-PEG;
- Avaliação biomédica (teste de citotoxicidade; encapsulação de material genético; eficiência de transfecção e biodistribuição);

2 Protocolo Experimental

2.1 Materiais

5-Amino-1-pentanol 97% (Alfa Aesar, Alemanha), 1,4-butenodiol diacrilato 99% (Alfa Aesar, Alemanha), polietilenoglicol (PEG) $M_n = 200$ e 2000 g/mol (Sigma Aldrich, Alemanha), glucosamina hidrocloreídica (Sigma Aldrich, Alemanha), alginato (Sigma Aldrich, Alemanha), cloreto de mesilo (Sigma Aldrich, Alemanha), azida de sódio (Sigma Aldrich, Alemanha), tolueno (Sigma Aldrich, Alemanha), bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich, Alemanha), hexano (Sigma Aldrich, Alemanha), tetrahidrofurano (THF) (Sigma Aldrich, Alemanha), dimetilformamida (DMF) (Sigma Aldrich, Alemanha), dimetilsulfóxido (DMSO) 99,8% (Acros Organics, USA e Sigma Aldrich, Alemanha), clorofórmio deuterado 99,5% (Sigma Aldrich, USA), água deuterada (Sigma Aldrich, Alemanha), DMSO deuterado (Sigma Aldrich, Alemanha), brometo de cobre 98% (Sigma Aldrich, Alemanha), pentametil-dietilenotriamina (PMDETA) 99% (Sigma Aldrich, Alemanha), éter dietílico (Fisher Scientific, Reino Unido), isopropanol (Fisher Scientific, Reino Unido), propagilamina (Sigma Aldrich, Alemanha), diclorometano (DCM) (Sigma Aldrich, Alemanha), óxido de prata (Sigma Aldrich, Alemanha), cloreto de metanosulfonilo (MSCI) (Sigma Aldrich, Alemanha), membranas de diálise (*cut-off* 100 e 3000 g/mol, Orange Scientific), foram usados tal como fornecidos. Acetona (Sigma Aldrich, Alemanha) foi previamente seca e destilada.

2.2 Técnicas

Os espectros de RMN- ^1H foram adquiridos no espectrómetro Buker Avance III de 400 MHz com sondas TXI de 5 mmol. A partir dos espectros obtidos foi confirmada a estrutura química dos compostos e o peso molecular ($M_{n, \text{RMN-}^1\text{H}}$). A análise dos dados foi feita no *software* MestReNova versão 6.02-5475.

A determinação do peso molecular do polímero e a dispersividade (PDI) foi analisada por cromatografia por permeação em gel (SEC) em THF, no equipamento Viscotek (TDA max) com: viscosímetro diferencial (DV), ângulo de dispersão de raios laser a 90° , baixo ângulo de dispersão e baixo índice de refração dos detectores. O conjunto é constituído por uma pré-coluna de PL de 10 mmol, seguido de uma coluna Viscotek T200 de 6 mmol, duas colunas contendo a mistura de PL e gel, uma de $3 \mu\text{m}$ seguido de outras de $5 \mu\text{m}$. O sistema foi calibrado com padrões de poliestireno (PS) com pesos moleculares entre 1820 a 9600 g/mol. O dn/dc do P β AE considerado foi o de $0,074017176 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ (determinado utilizando um refractómetro automático da *Rodolph Research* segundo o procedimento descrito na secção de caracterização). Para efeito de comparação o peso molecular médio ($M_{n, \text{SEC}}$) foi determinado utilizando a calibração universal e

2. Protocolo Experimental

a convencional. A análise dos dados recolhidos foi feita usando o *software* OmniSec, versão 4.6.1.354.

A espectroscopia de infravermelho com reflexão total atenuada (FTIR-ATR) foi realizada num espectrofotómetro Jasco modelo 4000 (Reino Unido). Para cada análise foram realizadas 128 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} sendo a região de análise situada entre $500\text{-}4500\text{ cm}^{-1}$.

Para medir o tamanho das partículas e o potencial Zeta das mesmas foi utilizado o equipamento *Nano-ZS Nanosizer* (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), com raios laser de 632,8 nm e dispersão angular de 173° .

2.3 Preparação dos sistemas poliméricos

2.3.1 Síntese do Poli(*beta*-amino éster) (P β AE) em Acetona

O poli(*beta*-amino éster) (P β AE) foi sintetizado por uma polimerização via adição de Michael [28]. Num vial adicionou-se diacrilato de 1,4-butanodiol (3,20 mL, 17,45 mmol), 5-amino-1-pentanol (1,5 g, 14,54 mmol) e acetona seca (4,96 mL, razão volúmica 1:1). A reacção decorreu à temperatura ambiente ou a $50\text{ }^\circ\text{C}$ (em refluxo) sob agitação constante durante um período de tempo pré-estabelecido (48 h). O P β AE foi precipitado em éter dietílico, lavado três vezes em éter dietílico frio e levado ao evaporador rotativo para evaporar o solvente. O polímero foi seco numa estufa de vácuo a $40\text{ }^\circ\text{C}$ durante uma noite e guardado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até ser utilizado.

2.3.2 Preparação do copolímero de PEG- P β AE-PEG

A preparação do copolímero foi feita por uma reacção de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen (azida-alcino) catalisada por cobre Cu (I) (*Click Chemistry*). Para tal foi necessário efectuar, primeiramente, duas reacções intermediárias: a modificação dos terminais acrilatos do P β AE com propargilamina e a preparação do PEG-N₃ [34].

Modificação de terminais acrilatos do P β AE com propargilamina (\equiv - P β AE \equiv)

A modificação dos terminais do P β AE foi realizada através de uma adição de Michael [32]. Num *vial* adicionou-se P β AE 2500 g/mol (1,0 g, 4 μmol), propargilamina (110,16 mg, 2 μmol) e DMSO seco (1 mL). A reacção decorreu à temperatura ambiente sob agitação constante durante a noite. O produto final foi precipitado e lavado em éter dietílico frio, que foi posteriormente removido no evaporador rotativo. O polímero foi seco numa estufa de vácuo a $40\text{ }^\circ\text{C}$ durante uma noite e guardado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até ser utilizado.

Modificação de terminais do polietilenoglicol (PEG-N3)

A modificação dos terminais do PEG foi realizada através de dois procedimentos consecutivos: uma mesilação seguida de uma azidação [36].

Mesilação do PEG

Num balão adicionou-se o PEG 200 g/mol (1g, 6 mmol) e DCM (10 mL) e pôs-se a agitar em atmosfera inerte num banho de gelo. De seguida, juntou-se aos poucos o óxido de prata (Ag_2O) (1,27 g, 5,48 mmol) e deixou-se agitar aproximadamente 15 minutos. Num vial juntou-se DCM (2 mL) e cloreto de metanosulfonilo MSCl (0,46 mL, 0,0435 mmol) e adicionou-se, gota-a-gota, à primeira solução preparada. Deixou-se agitar em atmosfera inerte e à temperatura ambiente durante 48 horas. No fim da reacção, filtrou-se num funil de placas porosa com celite, evaporou-se o solvente e, por último, pôs-se a secar na estufa de vácuo a 40 °C durante a noite.

Azidação (PEG-N3)

Ao composto mesilado obtido anteriormente, juntou-se DMF (7 mL) e pôs-se a agitar. De seguida, adicionou-se lentamente, a azida de sódio (0,6 g, 9,23 mmol). Deixou-se a solução reagir em refluxo, num banho a 100 °C durante 2 horas. De seguida adicionou-se um pouco de tolueno e levou-se ao evaporador rotativo para a eliminação dos solventes. A purificação foi efectuada por diálise contra água destilada com uma membrana (*cut-off* 100 g/mol) e por fim liofilizou-se e guardou-se num exsiccador à temperatura ambiente.

2.3.3 Reacção de Click Chemistry ($\equiv\text{-P}\beta\text{AE}\text{-}\equiv$ + N3-PEG) para obtenção do copolímero

PEG-P β AE-PEG

Num reactor de Schlenk dissolveu-se o PEG-N₃ (118 mg, 0,591 mmol) em 9 mL de isopropanol, de seguida pôs-se a mistura num banho de óleo a 50°C. Num *vial* dissolveu-se P β AE (500 mg, 0,236 mmol), brometo de cobre(I) (118,6 mg, 0,827 mmol) e PMDETA (143,3 mg, 0,827 mmol) em 2 mL do isopropanol. Em seguida adicionou-se a mistura ao reactor de Schlenk, tendo-se, procedido à desgaseificação do reactor recorrendo a um processo cíclico de arrefecimento (com azoto liquido), vácuo e descongelamento. O ciclo foi repetido 4 vezes. De seguida encheu-se o reactor de azoto e deixou-se reagir, em atmosfera inerte, durante 24 h em banho de óleo a 50 °C. A purificação do polímero foi feita por diálise com uma membrana (*cut-off* 3000 g/mol) contra isopropanol a 50 °C.

2. Protocolo Experimental

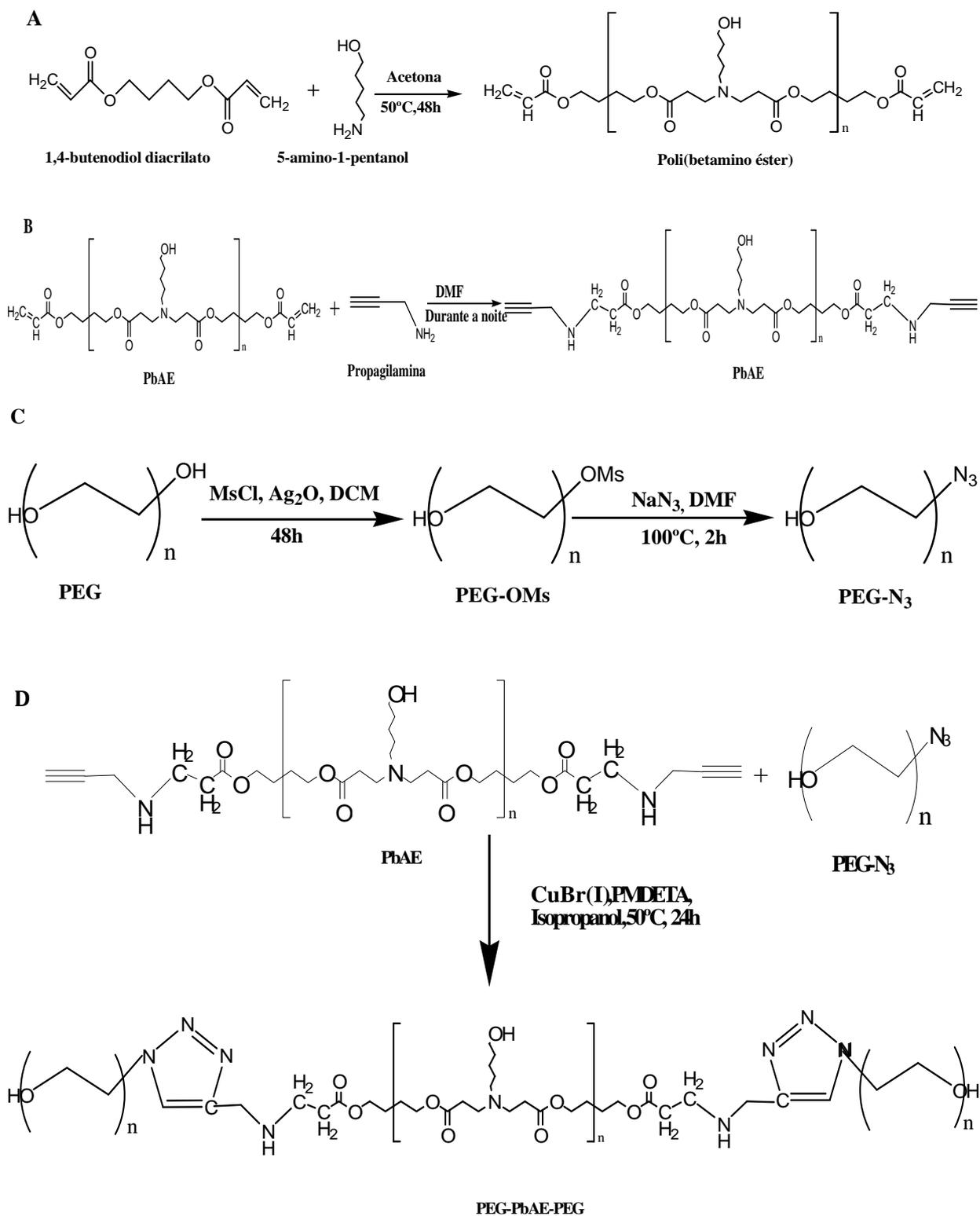


Figura 8:(A) Reacção do PβAE; (B) Modificação dos terminais acrilatos do PβAE com propargilamina; (C) Modificação dos terminais do PEG; (D) Reacção de Click Chemistry entre o ≡- PβAE ≡ e o PEG-N₃.

Modificação dos terminais do PβAE com glucosamina

A modificação dos terminais do PβAE com glucosamina, foi realizada através de uma adição de Michael [32]. Num *vial* adicionou-se PβAE de 3815 g/mol (1 g, 0,262 mmol), glucosamina hidrocloreídrica (234,82 mg, 1,31 mmol), bicarbonato de sódio (275,26 mg, 3,28 mmol) e, por último, adicionou-se DMSO seco (1 mL). A reacção ocorreu à temperatura ambiente sob agitação constante durante um período de tempo pré-estabelecido. O produto final foi precipitado e lavado três vezes em éter dietílico frio que foi posteriormente removido no evaporador rotativo. O polímero foi seco numa estufa de vácuo a 40 °C durante a noite e armazenado a -20 °C até ser utilizado.

Síntese de PβAE com glucosamina

A síntese foi realizada por uma polimerização de adição de Michael. Num *vial* adicionou-se de glucosamina hidrocloreídrica (0,5 g, 2,32 mmol), bicarbonato de sódio (0,39 g, 4,64 mmol), diacrilato 1,4-butanodiol (1,5 g, 17,45 mmol) e DMSO (2mL). A reacção ocorreu a 50 °C, sob agitação constante durante 48 horas. O produto final foi precipitado e lavado três vezes em éter dietílico frio. A purificação do produto foi feita por diálise (membrana com *cut-off* de 1000 g/mol) contra água destilada a 35°C com trocas de água a cada hora durante 24 horas. No final liofilizou-se, e guardou-se a -20 °C até ser utilizado.

Numa segunda fase, repetiu-se o processo de síntese em acetona (2mL) e à temperatura ambiente usando a tetra-acetil-glucosamina (0,3 g, 0,77 mmol) e o diacrilato 1,4-butanodiol (0,12 mL, 0,64 mmol). A purificação foi feita recorrendo a um processo de precipitação em hexano e éter etílico frio (90%/10%, respectivamente) seguido de três lavagens. Procedeu-se à evaporação para eliminação de solventes e guardou-se a -20 °C até à sua utilização.

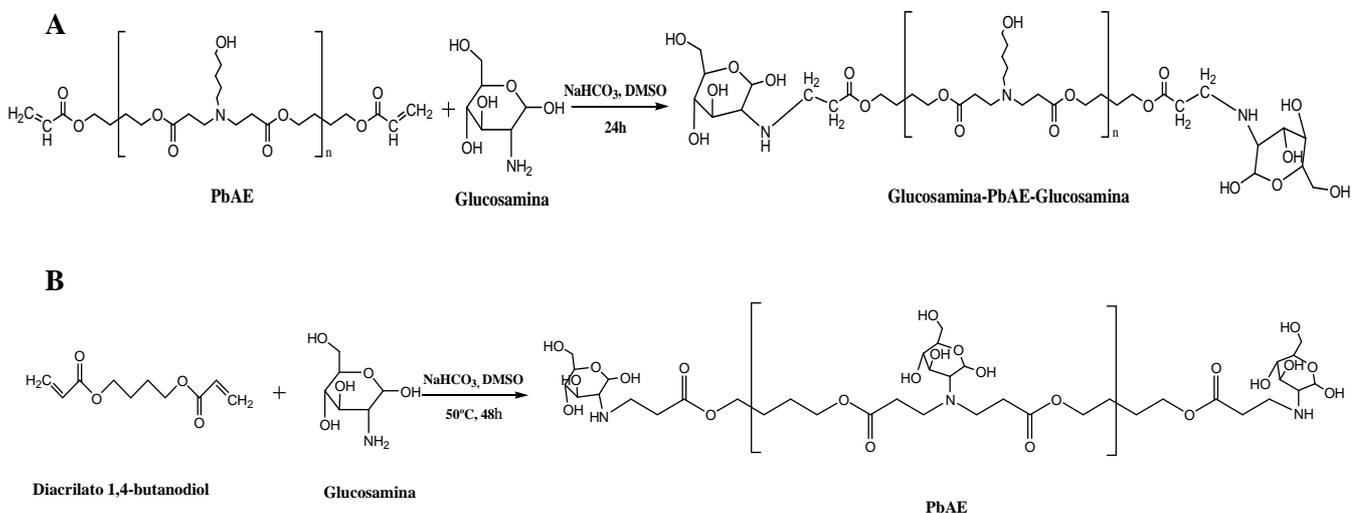


Figura 9: (A) Reacção da modificação dos terminais do PβAE com glucosamina; (B) Síntese de PβAE com glucosamina.

2.4 Caracterização

2.4.1 Ressonância Magnética Nuclear de Protão (RMN-¹H)

Dissolveu-se cerca de 1-3 mg de P β AE, já purificado e seco, em 600 μ L clorofórmio deuterado. No caso das reacções de modificação de terminais e da síntese com glucosamina os espectros foram obtidos em DMSO deuterado (200 μ L) e água deuterada (600 μ L), respectivamente.

2.4.2 Cromatografia de Separação de tamanhos (SEC)

Dissolveu-se 3 mg de polímero, previamente purificado, em 1mL de THF. A amostra foi filtrada num filtro com tamanho de poro de 0,2 μ m e, posteriormente injectada para análise. A curva de calibração foi obtida através de padrões de poliestireno e o peso molecular médio ($M_{n,SEC}$) foi calculado usando as calibrações convencional e a universal no *software* OmniSec. O dn/dc do P β AE em THF foi calculado usando diferentes concentrações do polímero, nomeadamente 1, 2, 3, 4, 7 e 10 mg/mL. Primeiramente, foi efectuada um branco medindo o índice de refacção do THF seguido de 3 medidas de índice de refacção para cada concentração usada, tendo sido considerado o valor médio para cada concentração. De seguida foi traçado o gráfico com os valores do índice de refacção em função da concentração e feito um ajuste linear. O dn/dc (0,074017176 mL/g) do polímero foi obtido pelo valor do declive da recta de ajuste.

2.4.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR)

Aplicou-se uma pequena quantidade de polímero, previamente purificado e seco, no recipiente do espectrofotómetro com acessório ATR e procedeu-se à análise da composição química do polímero.

2.4.4 Determinação da curva de titulação dos polímeros sintetizados e estimação do valor de pK_b

Num recipiente, adicionou-se 15 mg do polímero e 10 mL de H₂O Milli-Q (DI H₂O). Em seguida adicionou-se um pouco de uma solução de ácido clorídrico (HCl) (0,1 M) de modo a baixar o pH para valores próximos de 3. Posteriormente, foi-se adicionando incrementos de 25 μ L de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) (0,1M) e registando a variação do pH da solução com recurso a um medidor de pH em contínuo. O pK_b do polímero foi definido como sendo o pH em que haveria a neutralização de 50% de amina terciária do P β AE a partir do

traçado da curva de titulação. Para efeitos de comparação esta curva foi obtida para P β AE com diferentes pesos moleculares.

Para avaliar se durante o processo de titulação não existia degradação do P β AE foi realizada, para uma das amostras, um ciclo (base-ácido-base) onde foi sendo adicionada (incrementos de 25 μ L) solução de NaOH (0,1 M) até atingir o pH \approx 12, seguido da adição da solução de HCl até se atingir um pH \approx 2 e por fim adicionou-se novamente solução de NaOH até se atingir novamente um pH \approx 12. O perfil da curva foi avaliada com vista a verificar se existe alguma alteração no seu perfil, o que seria indicativo da degradação do polímero.

2.4.5 Avaliação solubilização do P β AE em água a diferentes pHs

Dissolveu-se 2 mg de polímero, previamente purificado e seco, em 10 mL de água destilada e o pH da solução foi, gradualmente, diminuído pela adição de solução de HCl (1% m/v). Para cada valor de pH foi medido a transmitância da amostra usando um espectrofotómetro a 500 nm (UV-VIS).

2.4.6 Avaliação da variação do peso molecular com o tempo de reacção e com a temperatura de reacção

Mantendo-se as condições de reacção de síntese do P β AE, avaliou-se a variação do peso molecular com o tempo de reacção à temperatura ambiente e a 50 $^{\circ}$ C durante 8 dias. Foram analisados os seguintes tempos: 24, 48, 72, 96 e 144 h. As amostras foram purificadas conforme o método descrito anteriormente. A variação do peso molecular foi avaliada por RMN- 1 H e por SEC.

2.4.7 Degradação *in vitro*

Pesou-se uma pequena quantidade de P β AE e adicionou-se 1 mL de soro fisiológico (NaCl 0,9%, pH 7,4) com 1% de azida de sódio (m/v). Guardou-se numa estufa a 37 $^{\circ}$ C de modo a reproduzir as condições fisiológicas. Nos tempos previamente estabelecidos retiraram-se as amostras, removeu-se o soro e lavou-se 3 vezes com água destilada. As amostras foram imediatamente liofilizadas e posteriormente mediu-se a sua massa. A degradação foi calculada pela percentagem de massa perdida usando a seguinte expressão:

$$m_{perdida} = \left[1 - \left(\frac{m_{final}}{m_{inicial}} \right) \right] * 100 \%$$

2. Protocolo Experimental

O ensaio teve a duração de 12 dias, tendo sido colhido amostras nos 1º, 2º, 3º, 5º, 7º e 12º dia. Para cada dia foram usadas três réplicas. No fim, a estrutura química das amostras foi avaliada por FTIR.

2.4.8 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio de Alamar Blue

2.4.8.1 Procedimento de subcultura celular das linhas celulares TSA e 3T3-L1

As células da linha celular TSA (linha celular do adenocarcinoma mamário de ratinho fêmea BALB/c) e 3T3-L1 (linha celular de fibroblastos embrionários de ratinho) foram mantidas a 37 °C, sob 5% CO₂, em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco rico em glucose (Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM-HG)) Irvine Scientific, Santa Ana, CA) suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino inativado por calor (heat inactivated fetal bovine serum (FBS)) (Sigma, St. Louis, MO), penicilina ((100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Após o seu crescimento, em monocamada, as células foram destacadas através de tratamento com uma solução de tripsina a 0.25% (Sigma, St. Louis, MO). Para os ensaios de viabilidade celular, foram cultivadas 24 horas antes do início do ensaio 5×10^4 células TSA ou 3.5×10^4 células 3T3-L1 em 1 mL de meio de cultura para cada poço numa placa de 48 poços e usadas com uma confluência de aproximadamente 70%.

2.4.8.2 Esterilização e preparação das diferentes soluções de PβAE com terminais acrilatos

Mediu-se a massa de 5 mg de PβAE com terminais acrilato para um *vial* transparente. Adicionou-se um magneto e esterilizou-se tudo sob a acção de luz ultravioleta durante 15 minutos na câmara de fluxo laminar. Ainda na câmara de fluxo laminar, adicionou-se 1 mL de água Milli-Q estéril. Deixou-se a agitar durante a noite na câmara fria. Novamente na câmara da fluxo laminar, preparam-se as soluções com as concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL através da diluição com meio de cultura da solução inicial. As soluções com as concentrações 0,1, 0,5, 2,5, 5 µg/mL foram preparadas através da diluição da solução de 10 µg/mL preparada anteriormente. Pipetou-se 1 mL de cada solução para 3 poços da placa de 48 poços (ensaio feito em triplicado). Foram realizadas três réplicas do ensaio.

2.4.8.3 Ensaio de viabilidade celular de Alamar Blue

Após 48 horas de incubação, avaliou-se a viabilidade celular, para as diferentes condições experimentais, utilizando o ensaio de Alamar blue. Este ensaio baseia-se na conversão, pelo ambiente redutor da célula, da resazurina (forma oxidada) em resorufina, a forma reduzida do composto. A resazurina é azul e não é fluorescente, enquanto que a resorufina é vermelha e altamente fluorescente. Deste modo, este ensaio permite medir a capacidade redox das células e determinar a viabilidade celular no período de cultivo, sem que ocorra o destacamento das células aderentes. Neste sentido, preparou-se meio de cultura DMEM-HG com 10% (v/v) de resazurina e adicionou-se 300 µl desta solução a cada poço da placa com as diferentes condições experimentais. Após a adição dos 300 µl, as células foram colocadas na incubadora, a 37 °C, até que ocorresse uma mudança de cor de azul para rosa nos poços das células controlo, ou seja, nos poços de células que não foram sujeitas a qualquer tipo de tratamento. Depois de ter ocorrido a mudança de cor, a incubação foi dada como terminada e foram retirados 200 µl do sobrenadante de cada poço, para uma placa de 96 poços, lendo-se a absorvância a 570 e 600 nm no espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384 (Molecular Devices). A viabilidade celular (em percentagem relativamente ao controlo) é calculada através da seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ celular = \frac{(A_{570} - A_{600})}{(A'_{570} - A'_{600})} \times 100 (\% \text{ de controlo})$$

Em que A_{570} e A_{600} são as absorvâncias referentes às amostras e A'_{570} e A'_{600} as absorvâncias referentes ao controlo, no comprimento de onda indicado (570 nm e 60nm, respectivamente).

2.4.8.4 Análise estatística

Os dados são apresentados como a média dos resultados para cada condição \pm desvio padrão e analisados usando o software GraphPad Prism® (versão 5.0). A significância dos resultados foram estatisticamente analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) com o teste de Tukey. A significância estatística foi definida para valores de $p < 0,05$.

2. Protocolo Experimental

2.4.9 Preparação de partículas por complexação de PβAE com alginato

Dissolveu-se 4 mg de alginato (0,023 mmol de $(C_6H_8O_6)_n$) em 200 mL de solução de acetato de sódio (25 mmol, pH 5,01) e 6,84 mg de PβAE (0,023 mmol de $(C_{15}NO_5H_{27})_n$) em 200 mL de solução de acetato de sódio (25 mmol, pH 5,01). De seguida as duas soluções foram misturadas de modo a obter diferentes rácios alginato/PβAE (1/1, 1/5, 1/10, 1/15 e 1/20). Cada solução foi agitada durante 5 minutos no vórtex e 30 minutos numa placa de agitação a 700 rpm. De seguida procedeu-se à medição dos tamanhos e do potencial zeta dos complexos.

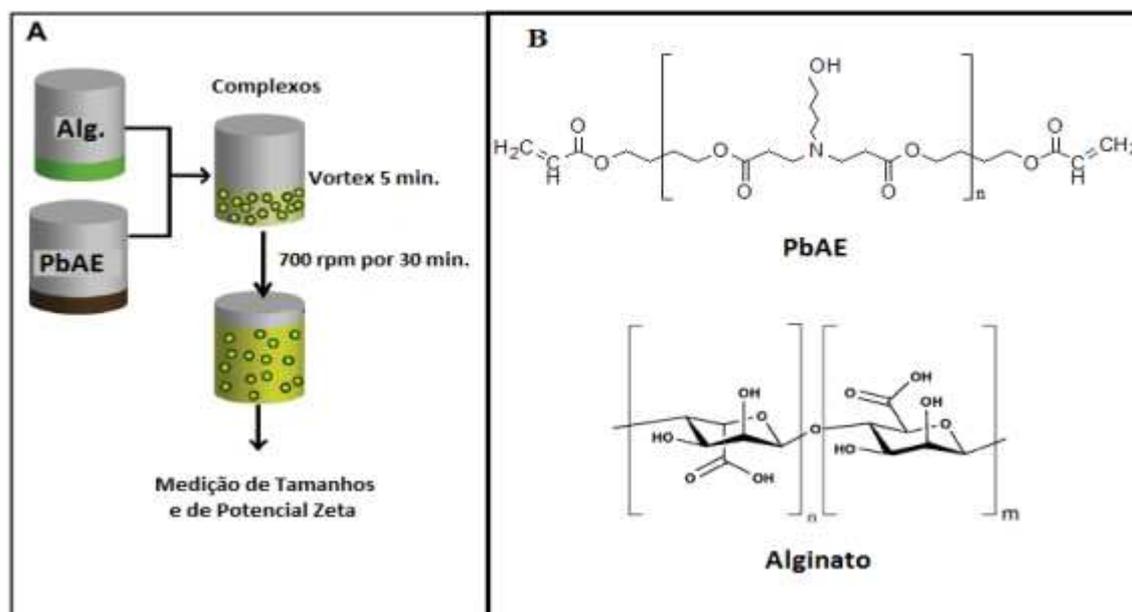


Figura 10: (A) Complexação do PβAE com alginato; (B) Estrutura do PβAE e do alginato (adaptado de [37]).

2.4.10 Medição de tamanhos e de potencial Zeta

Os tamanhos e o potencial zeta foram medidos no equipamento *Nano-ZS Nanosizer* (*Malvern Instruments*) a 25 °C. Adicionou-se uma pequena quantidade da solução dos complexos preparada anteriormente numa célula e procedeu-se à sua análise. Para cada amostra fizeram-se três medições. Voltou-se a repetir as medições após filtragem das amostras com um filtro com tamanho de poro de 1 μm.

O potencial Zeta das partículas foi determinado de maneira semelhante tendo sido usado uma célula próprio do equipamento. Para cada amostra foram feitas 30 medições (*runs*). Todos os resultados foram processados e analisados no *software* ZetaSizer Software versão 7.2 (*Malvern Instruments*).

3 Resultados e discussão

3.1 Síntese e caracterização do P β AE

Desde a sua síntese, o P β AE demonstrou possuir grande potencial para a libertação controlada de fármacos, principalmente, na entrega de material genético.

Estudos demonstraram que, para a complexação e libertação de DNA, o P β AE com melhor desempenho é o preparado a partir dos monómeros de 1,4-butanodiol diacrilato e 5-amino-1-pentanol numa razão molar 1:1,2, em DMSO a 60°C designado por C32 [28]. Estudos posteriores evidenciaram que usando um ligeiro excesso de diacrilato (1,2:1) levaria a formação de um polímero semelhante ao C32 todavia com terminais acrilatos. E que estes terminais (acrilatos) possibilitariam um conjunto de modificações de terminais por adição de Michael com compostos contendo grupos amina (NH₂) [32].

A síntese do P β AE até à data tem sido descrita maioritariamente em DMSO pelo que neste trabalho procedeu-se à síntese do P β AE com terminais acrilatos (C32-Ac) tentando-se a mudança do solvente para acetona, que é muito mais favorável quando se pensa na sua posterior utilização em estudos biológicos.

Numa primeira fase, a síntese foi feita usando como monómeros o diacrilato de 1,4-butanodiol e 5-amino-1-pentanol, numa proporção molar de (1,2:1) à temperatura ambiente. Com vista a determinar o tempo “ótimo” de reacção, realizou-se um estudo preliminar, onde se avaliou a variação do peso molecular das amostras com o tempo de reacção (durante 8 dias), mantendo-se constante as outras condições de reacção.

A partir da análise dos espectros de RMN-¹H foi confirmada a estrutura química e calculados os pesos moleculares ($M_n, RMN-^1H$), tendo sido obtido pesos da ordem dos 3300-5600 g.mol⁻¹.

3. Resultados e Discussão

Tabela 2: Síntese de PBAE a temperatura ambiente e avaliação da variação M_n^{RMN} com o tempo de reacção.

Amostra	Tempo de reacção (h)	M_n^{RMN} (g.mol ⁻¹)
CH15	24	3357
CH15	48	3402
CH15	72	3643
CH15	168	3848
CH15	192	4149
CH15 (Purificado)	192	5593

Através da análise da Tabela 2, pode verificar-se que, embora o peso molecular aumente com o tempo de reacção este aumento não é muito significativo. Tendo-se obtido, ao fim de 192 h de reacção, um peso molecular máximo de 4149 g.mol⁻¹. Note ainda, que após a purificação houve um aumento significativo do peso molecular obtido analisado por ¹H-RMN. Tal resultado deve-se ao facto de no processo de purificação terem sido eliminadas as cadeias de menor peso molecular, bem como os vestígios de monómero ainda existentes que levavam a uma diminuição do peso molecular médio ($M_{n, RMN-^1H}$). No entanto, os pesos moleculares obtidos são baixos quando comparados com os dos PBAE sintetizados em DMSO descritos na literatura [28, 32, 38].

Para tentar aumentar o peso molecular, recorreu-se ao mesmo processo de síntese mas a uma temperatura de 50 °C durante 48 horas mantendo-se as restantes condições de reacção (amostra CH17). Dado ao facto de, a 50 °C já estarmos perto do ponto de ebulição da acetona (56-57 °C) a reacção foi feita em refluxo. Do processo de síntese resultou um polímero cujo peso molecular é, consideravelmente, maior $M_{n, RMN-^1H} = 9842$ g.mol⁻¹.

Conclui-se, então, que o aumento de temperatura de reacção levou a que fosse obtido um polímero com, aproximadamente, o dobro do peso molecular máximo obtido anteriormente (5593 g.mol⁻¹, 192h), tendo sido o tempo de reacção reduzido para 1/4 (Figura 11).

A amostra CH17 foi então caracterizada e, posteriormente, usada na preparação das partículas por complexação com alginato. Os resultados da caracterização serão apresentados a seguir.

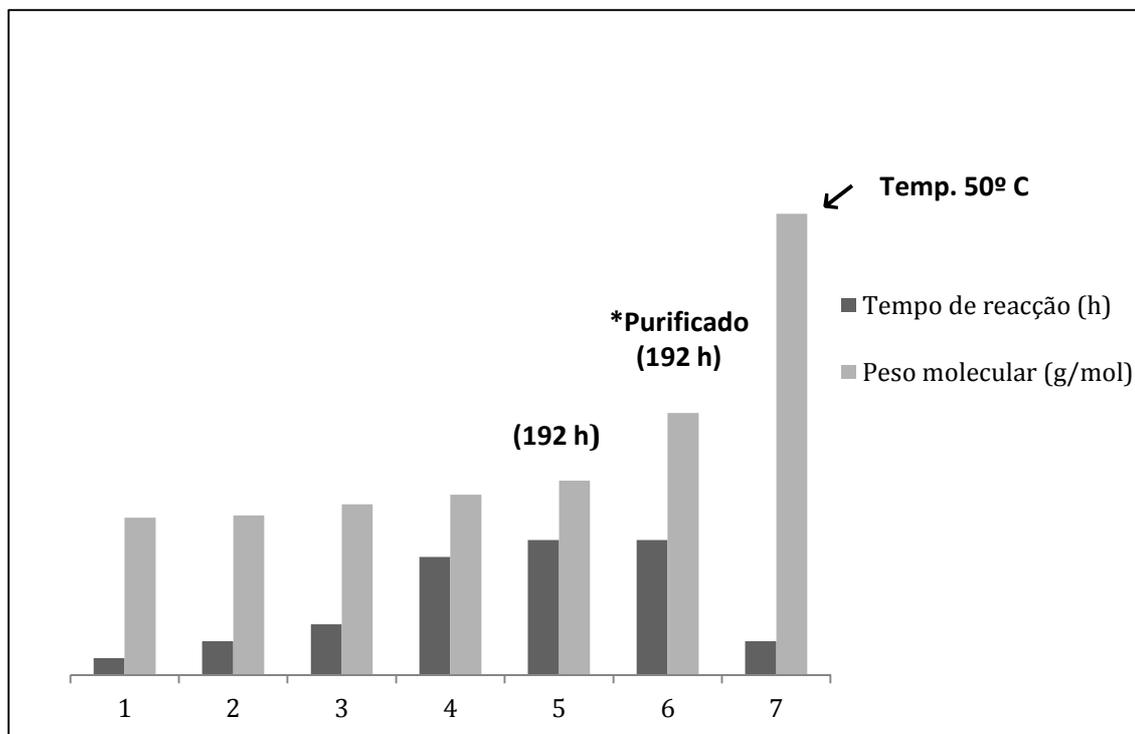


Figura 11: Variação do peso molecular do PβAE com o tempo de reação (h).

3.1.1 Confirmação da estrutura química por RMN-¹H e cálculo do peso molecular (M_n , RMN-¹H) por RMN-¹H

O espectro de RMN-¹H (Figura 12), obtido em clorofórmio deuterado, permitiu confirmar a estrutura química do composto e identificar os desvios químicos característicos (**a1: 1.226-1.260 ppm**, **a2: 1.306-1.398 ppm**, **a3: 1.407-1.625 ppm**, **b: 1.654-1.801 ppm**, **c : 2.369-2.496 ppm**, **d: 2.698-2.879 ppm**, **e: 3.540-3.667 ppm**, **f: 4.015-4.162 ppm**, **g: 4.180-4.235 ppm**, **h: 4.318-4.382 ppm**). Verificou-se, ainda a presença dos picos característicos do acrilato na região de **5.5-6.5 ppm** (**i, j, i**) indicando que o polímero tem terminais acrilatos conforme o previsto. O peso molecular (Tabela 3) foi obtido calculando primeiramente o grau de polimerização (DP) a partir de dois desvios químicos bem definidos, um pertencente à unidade de repetição (**e** : [2H, NCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH], 3.5-3.7 ppm) e outro pertencente ao terminal acrilato do polímero (**j**: [dd, COOCH=CH₂], 5.5-6.5 ppm), tendo sido usado a seguinte expressão:

3. Resultados e Discussão

$$M_n^{NMR} = DP \times m_{UR} + 2 \times m_T \quad DP = \frac{\int e}{\frac{\int j}{2}}$$

Onde m_T é massa da cadeia terminal e m_{UR} é a massa da unidade de repetição.

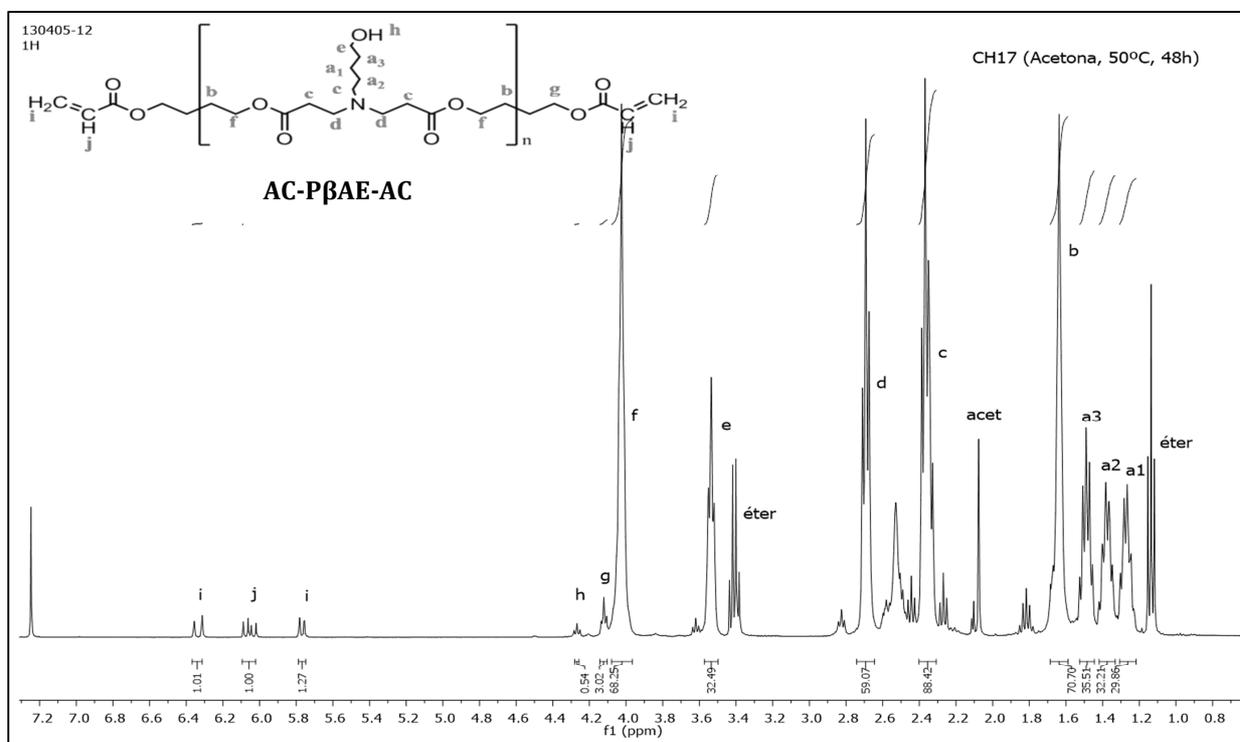


Figura 12: Espectros característicos do PβAE e estrutura química correspondente, com a devida correspondência entre os desvios químicos característicos e os prótons a que correspondem.

Tabela 3: Cálculo do M_n^{NMR} do PβAE (CH17) através dos valores dos integrais dos desvios químicos característicos e e j.

Amostra	DP	M_n^{NMR} (g.mol ⁻¹)
CH17	$\frac{32.49}{\frac{1.00}{2}} =$	$32 \times 301.37858 + 2 \times 99.10788 = 9842,330$

3.1.2 Análise química por FTIR-ATR

A análise do espectro mostra a presença de bandas de absorção características de grupos ésteres (COOR), nomeadamente, a banda estreita, típica da ligação C=O a cerca de 1750-1740 cm⁻¹ e o pico referente à ligação C-O, também característica dos grupos ésteres, na região de 1300-1050 cm⁻¹. Ainda se verificou a presença de uma banda alargada na região de 3600-3200

cm^{-1} típico das ligações OH e de um pico característico de ligações CH na região de 3000-2700 cm^{-1} .

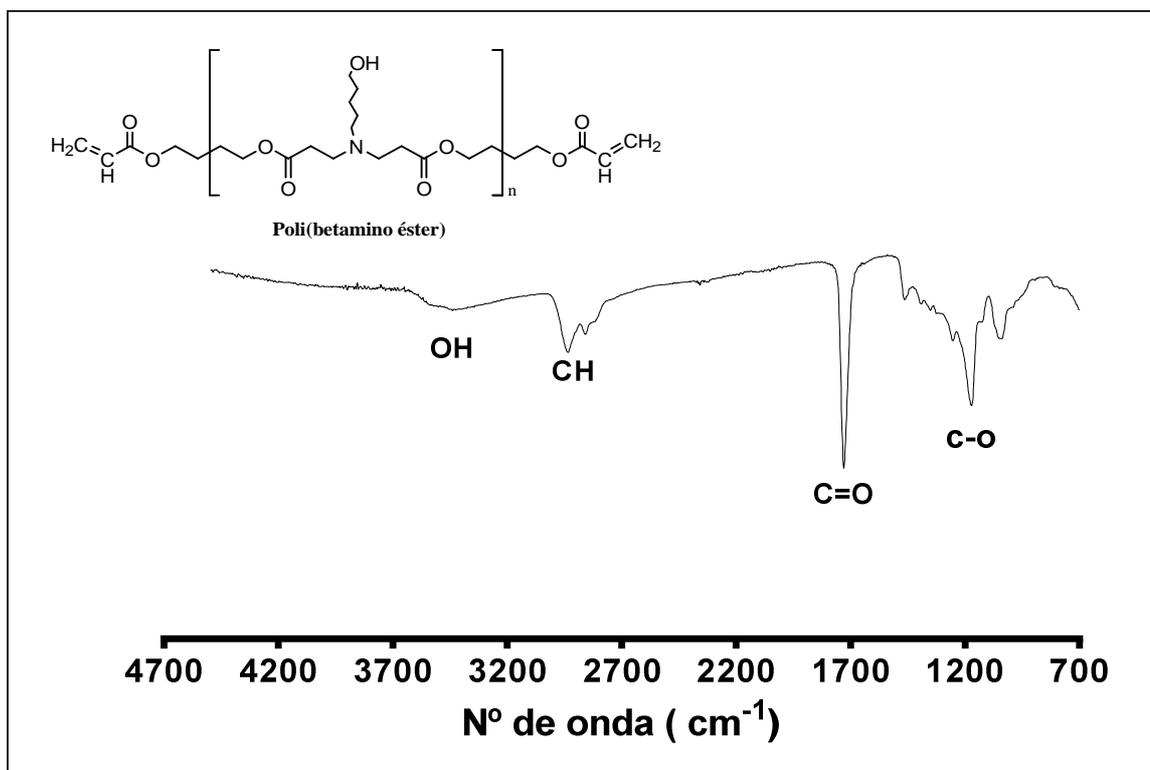


Figura 13: Espectro de FTIR-ATR do PβAE (CH17).

3.1.3 Cromatografia de separação de Tamanhos (SEC)

- **Determinação do dn/dc do PβAE**

Para proceder ao cálculo do peso molecular pela calibração universal, foi necessário determinar o valor do índice de refração específico da combinação entre o polímero e o eluente (dn/dc), dado que a calibração universal tem em conta o valor da viscosidade da amostra. Na verdade, o cálculo do peso molecular de um polímero por técnicas de *light scattering* requer a determinação, prévia, do dn/dc dos mesmos uma vez que este factor afecta grandemente os resultados obtidos (factor quadrático)[39].

O dn/dc do polímero em THF foi obtido a partir do cálculo do declive da recta de ajuste dos valores medidos de índice de refração em função da concentração. É de notar que o valor de $R^2=0,875$ indica que existe algum erro no ajuste. No entanto, podemos ver que o valor determinado para o índice de refração do THF $n=1,3986$ é próximo do valor real tabelado

3. Resultados e Discussão

$n=1,407$ (20 °C) pelo que são bons indicadores de que o valor determinado de dn/dc do P β AE deve estar próximo do valor real.

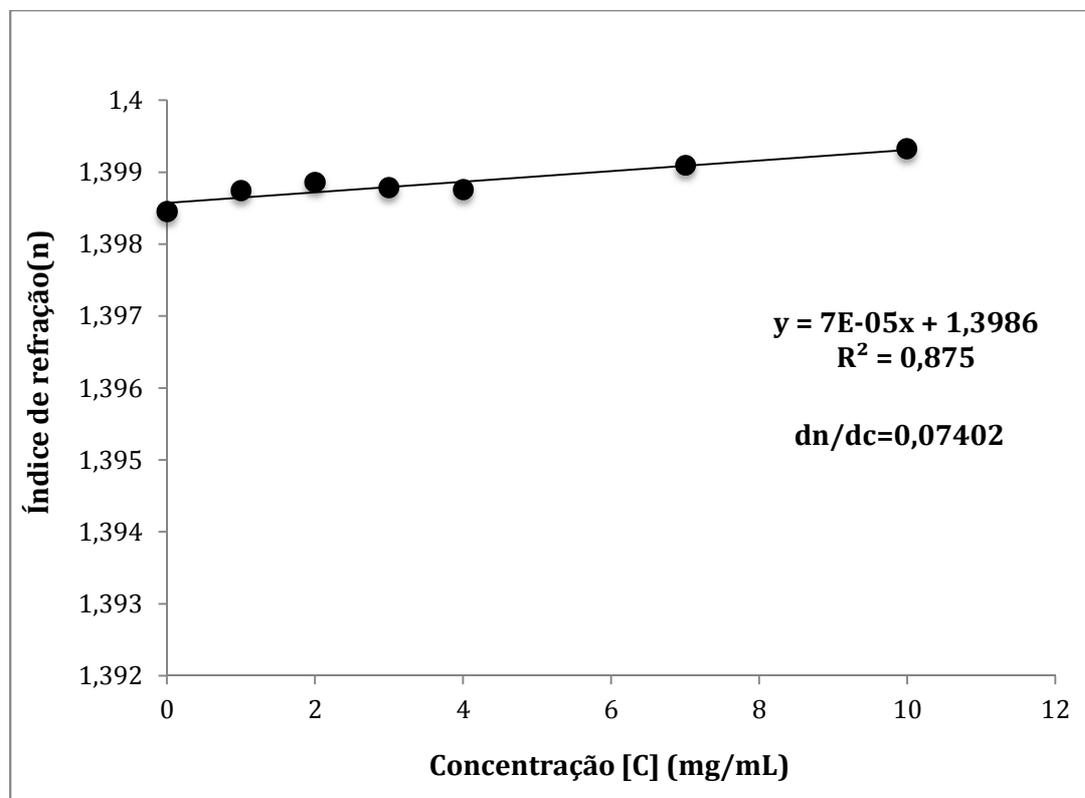


Figura 14: Representação gráfica dos valores de índice de refração em função da concentração e determinação do dn/dc para o P β AE.

- **Medição do peso molecular por SEC**

Após a determinação do dn/dc , o peso molecular do P β AE foi determinado por cromatografia de permeação de gel (GPC) usando como eluente o THF. Os valores obtidos (Tabela 4) foram calculados usando a calibração convencional e a universal, em que é utilizado o valor da viscosidade e necessita do parâmetro dn/dc .

Tabela 4: Resumo dos M_n obtidos para a amostra CH17 por RMN e SEC usando a calibração convencional e a universal.

Calibração	$M_{n,SEC}$ (g.mol ⁻¹)	$M_{w,SEC}$ (g.mol ⁻¹)	PDI
Convencional	1300	3702	2,85
Universal	1005	2674	2,66

Os dados obtidos demonstram haver uma leve diferença entre os pesos moleculares determinados usando a calibração convencional e a universal (considerando o dn/dc calculado). A dispersividade (PDI) da amostra é grande, chega a ser ≈ 3 , demonstrando que na amostra existe uma larga distribuição de pesos moleculares das suas cadeias. No entanto, o valor obtido de PDI encontra-se na gama do PDI típico deste tipo de reacções ($\approx 2-3$) [40]. Por outro lado, o valor do peso molecular obtido por SEC é muito inferior (≈ 3 a 4 vezes menor) ao calculado por (9842 $g \cdot mol^{-1}$). Tais diferenças deverão ser devidas ao facto do cálculo do peso molecular, por SEC, ser feito relativamente a padrões de poliestireno que tem uma estrutura química destinta do P β AE. Por outro lado, tais diferenças também poderão dever-se a possíveis interacções entre o polímero (catiónico) e as colunas do SEC. Tudo isso, aliado ao facto da caracterização por RMN ter sido bem conseguida, estando os picos referentes aos diferentes ambientes químicos do polímero devidamente identificados, e não sobrepostos, verificando-se não só a confirmação da estrutura química mas também de todas as proporções a nível de intensidade relativa dos picos, (quando sujeitos a integração), levou a que os pesos moleculares considerados ao longo do trabalho (para efectuar todos os cálculos estequiométricos) fossem os determinados por 1H -RMN. Sendo que os dados obtidos por SEC serão utilizados, neste trabalho, única e exclusivamente para estudos de cariz comparativos, como por exemplo no estudo da biodegradação do polímero.

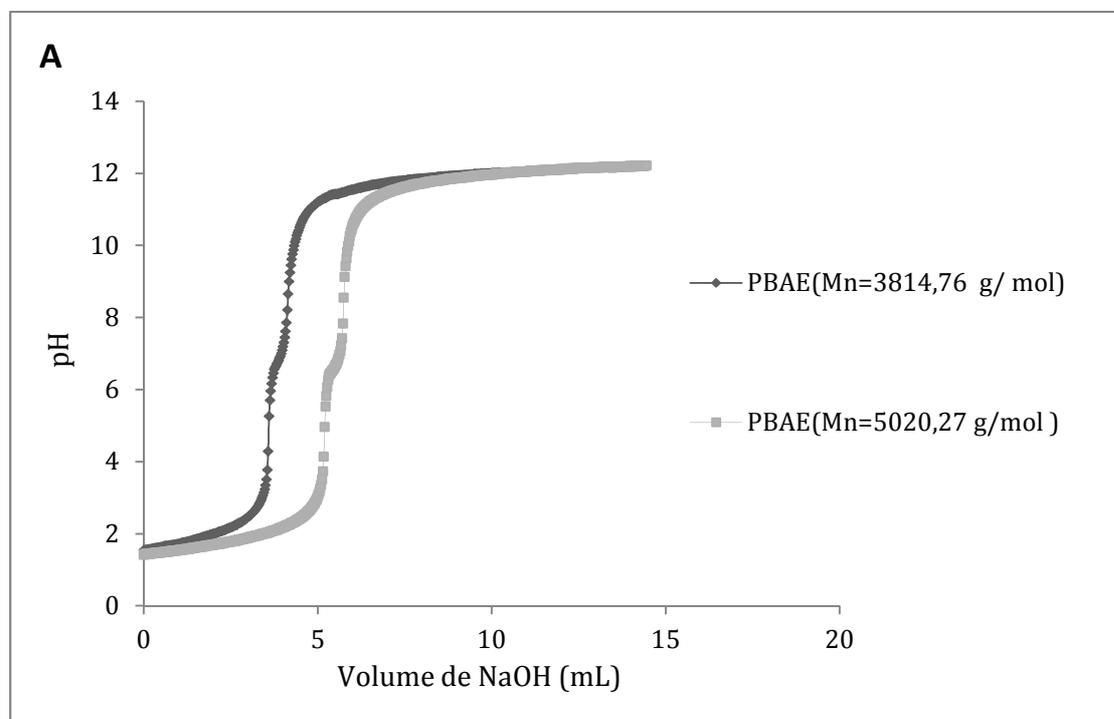
3.1.4 Determinação do Pk_b do P β AE e avaliação da sua solubilidade a diferentes pHs

O pK_b do P β AE foi determinado com base na curva de titulação com NaOH (Figura 15-A) a partir dos pontos de inflexão da curva para o P β AE de diferentes pesos moleculares. É de notar que o perfil da curva apresenta poucas variações para os diferentes pesos moleculares testados.

A análise matemática das curvas de titulação do polímero no Cutiplox, determinou dois pontos de inflexão sugerindo uma possível existência de dois grupos destintos a serem ionizados, à semelhança do que se passa na titulação de um aminoácido. Todavia esta teoria não é suportada por dados da literatura. Uma justificação mais plausível, já cientificamente descrita no caso da titulação de outros polímeros [41], é a de que a esta curva de titulação teria de ser efectuada uma correcção que levasse em conta três aspectos: um branco determinado a partir da titulação da água repetindo as mesmas condições mas na ausência de polímero; um factor de correcção que levasse em conta a quantidade exacta de HCl que foi necessário utilizar para baixar o pH até valores próximos de 2 no início do processo de titulação; considerar o erro associado ao próprio medidor de pH. Feita a correcção, que aqui neste trabalho não foi possível

3. Resultados e Discussão

apresentar por falta de tempo experimental, chegar-se-ia à conclusão que a primeira parte da curva de titulação, que contém o primeiro ponto de inflexão, na verdade deve-se à interacção do titulante com a água e com o H^+ provenientes do HCl adicionado e não propriamente devido a interacção com a amina terciária do PBAE. Feita esta análise ter-se-ia determinado, pelo método da segunda derivada, o ponto de inflexão e o volume máximo a ele associado, e por conseguinte o pK_b . Pela análise do Curtiplox foi possível determinar um $pK_b \approx 5$. Este resultado, embora não seja 100% fiável, encontra algum suporte nos resultados medidos de transmitância do PBAE (Figura 15 B) que acompanham o processo de titulação. Estes, por sua vez, indicam que para valores de pH menores do que 5 o polímero encontra-se solúvel formando uma solução quase transparente cujo valor de transmitância é de $\approx 90\%$. Por outro lado, nota-se que para valores de pH superiores a 5 o valor da transmitância vai diminuindo rapidamente, indicando que a solubilidade do polímero vai diminuindo. Estes resultados confirmam que, a pH inferior a 5 (pK_b) o PBAE torna-se solúvel como resultado da protonação do grupo amino. No entanto a transição de fase (solúvel-insolúvel) não é instantânea. Embora os dois resultados sejam coerentes, entre si, é preciso ter em conta que se afastam do valor do pK_b do PBAE descrito na literatura ($\approx 6,4$). Tal deslocamento no valor do pK_b determinado poderá dever-se a uma possível propagação de um erro sistemático durante o processo de titulação e de medição da transmitância, nomeadamente, o facto de não se ter deixado passar tempo suficiente para a solução estabilizar antes de se retirar um valor, ou então a algum erro inerente ao equipamento.



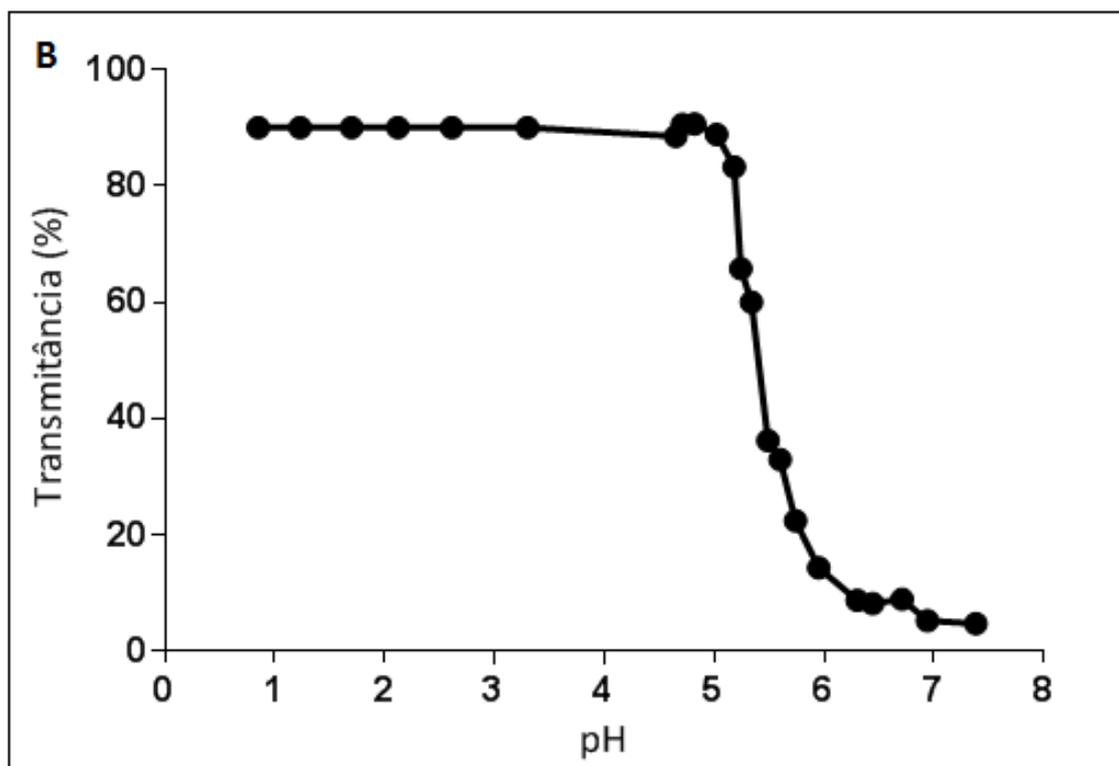


Figura 15: (A) Curva de titulação em água milli-Q, obtida para P β AE de diferentes pesos moleculares e determinação do pK_b. (B) Transmissão do PBAE a 500 nm a diferentes pH.

De modo a certificar que o polímero não sofre degradação ao longo do processo de titulação, avaliou-se o perfil da curva de titulação do P β AE ao longo de ciclos de adição de base (NaOH 0.1 M) e ácido (HCl 0.1 M) sucessivamente (Figura 16). Nota-se que o perfil da curva é, aproximadamente, simétrico o que é indicativo de que não há degradação do polímero ao longo do processo.

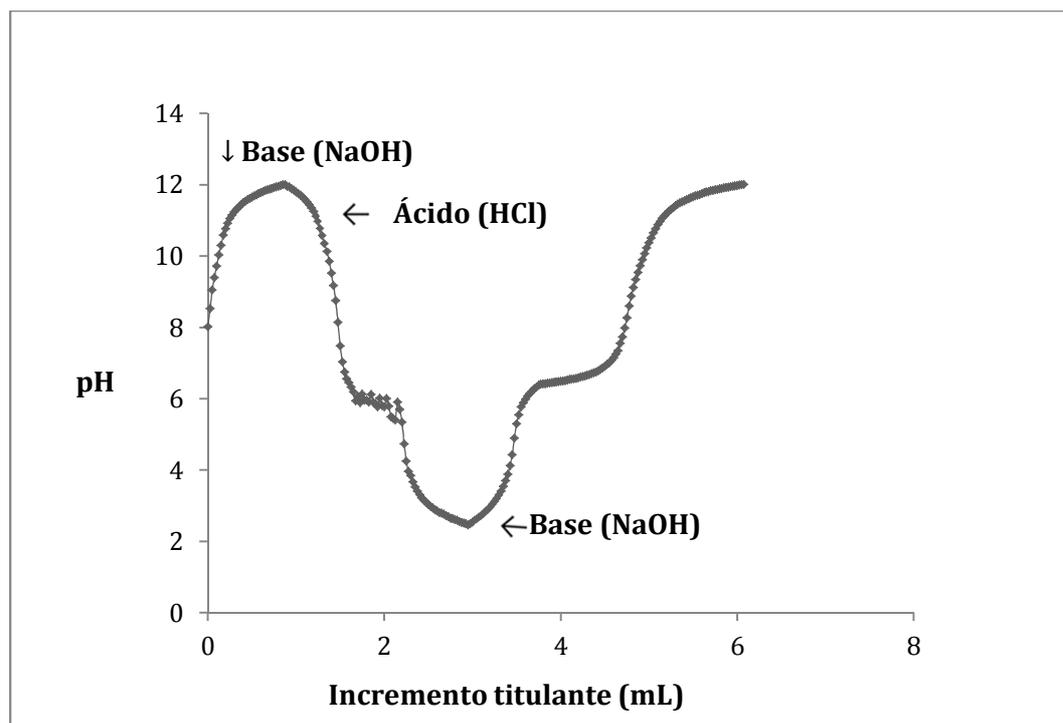


Figura 16: Titulação de controle do P β AE com vista a verificar a possível degradação do polímero ao longo do processo de titulação.

3.1.5 Análise da degradação *in vitro*

O estudo da degradação *in vitro* do polímero foi realizado em soro fisiológico pH=7,4 durante 17 dias, a 37 °C (Figura 17). Os dados sugerem que a degradação do P β AE nestas condições é relativamente lenta sendo o tempo de meia vida ($T_{1/2}$) aproximadamente 7 dias. Quanto ao mecanismo pelo qual a degradação ocorre, a diminuição do pico C=O na zona de 1750-1740 cm^{-1} sugere uma clivagem das ligações esteres (COOR) confirmando o mecanismo proposto na literatura [24, 38, 42-44]. Por outro lado, uma análise do peso molecular das cadeias no SEC usando como eluente a água e a comparação com os padrões de PEG demonstra que existe uma diminuição do peso molecular das cadeias iniciais do polímero ao longo do tempo sendo que a amostra é totalmente degradada ao fim de 17 dias.

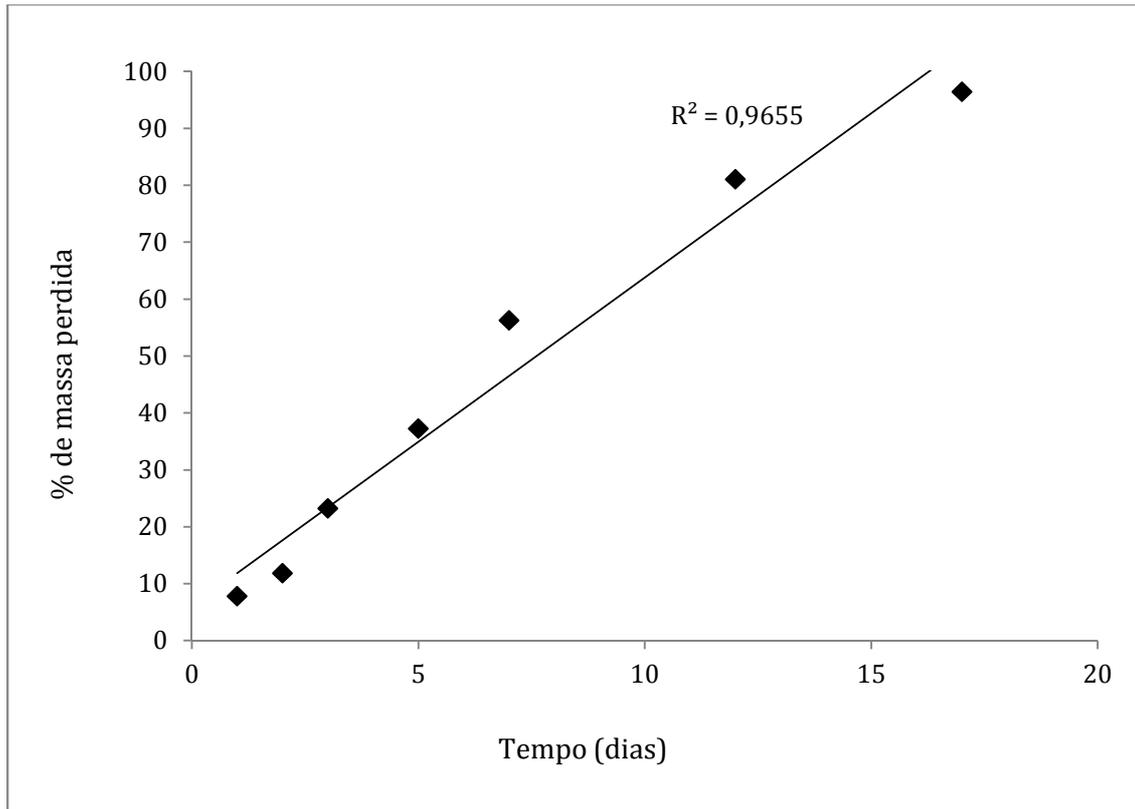


Figura 17: Estudo da degradação *in vitro* do PβAE em soro fisiológico durante 17 dias.

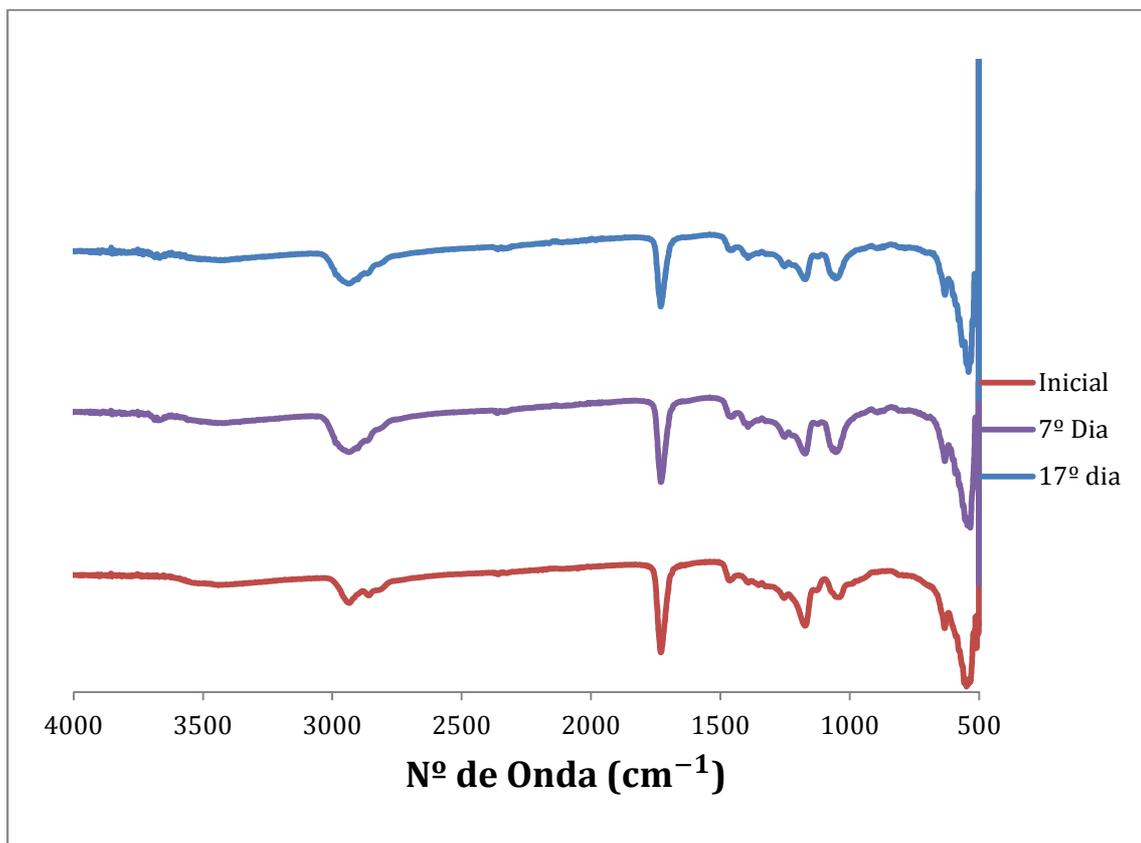


Figura 18: Espectro de FTIR das amostras a diferentes dias de degradação.

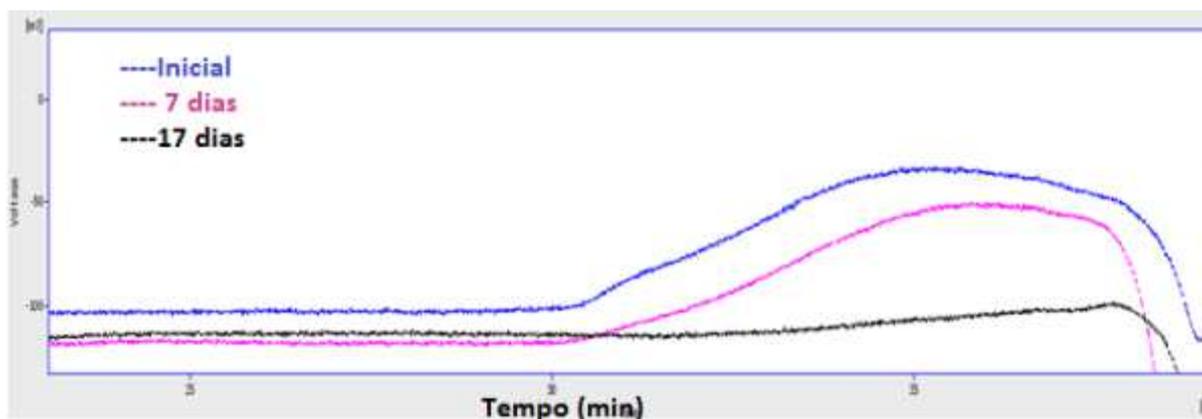


Figura 19: Avaliação da hidrólise das cadeias por SEC.

3.1.6 Viabilidade celular do PβAE com terminais acrilato

Os resultados referentes à viabilidade celular do PβAE para diferentes concentrações estão representados nas Figura 20 e Figura 21 para as linhas celulares 3T3-L1(linha celular de fibroblastos embrionários de ratinho) e TSA(linha celular do adenocarcinoma mamário de ratinho fêmea BALB/c), respectivamente.

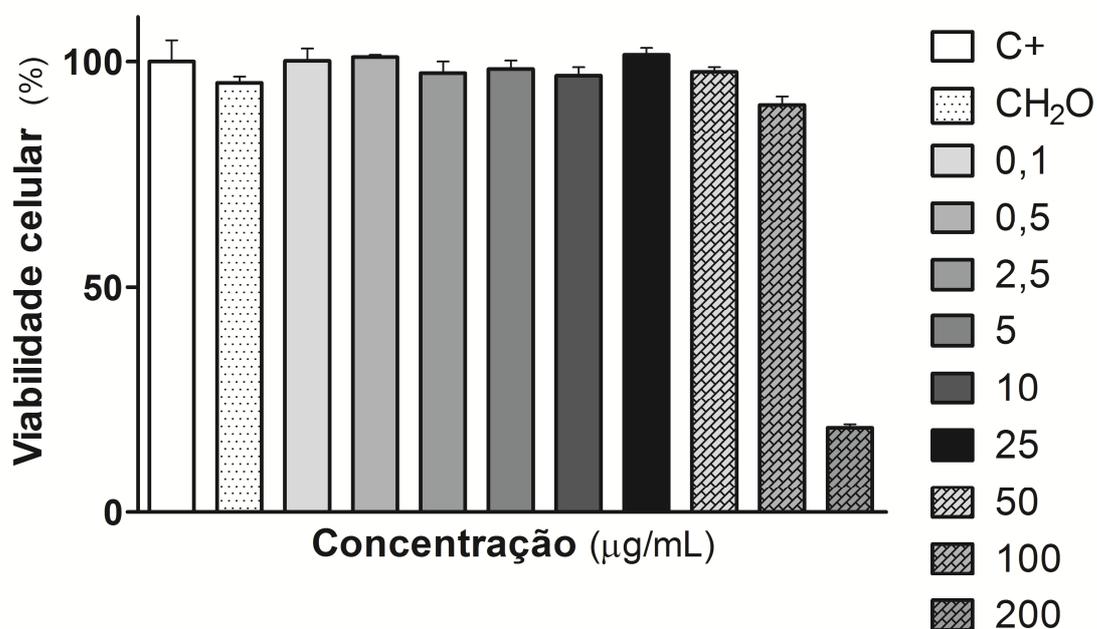


Figura 20 - Ensaio de viabilidade celular para diferentes concentrações de PβAE na linha celular 3T3-L1

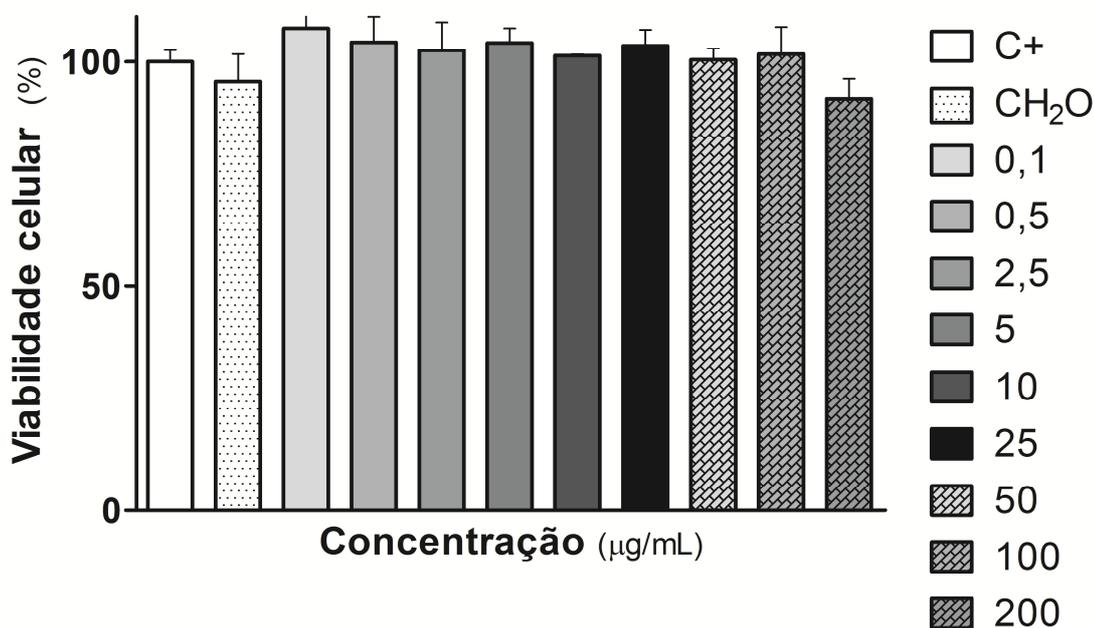


Figura 21- Ensaio de viabilidade celular para diferentes concentrações de PβAE na linha celular TSA.

Após análise das Figura 20 e Figura 21 verificamos que, de um modo geral, a viabilidade celular na presença de PβAE é bastante elevada nos dois tipos de linhas celulares estudadas, mesmo para altas concentrações. Comparando os resultados entre as duas linhas celulares, a única diferença encontra-se para a concentração correspondente a 200 μg/mL de PβAE, apresentando uma maior viabilidade para a linha celular TSA relativamente à 3T3-L1. Este resultado pode ser explicado pelo facto da linha celular TSA ser uma linha tumoral e por isso ter um crescimento celular maior.

3.2 Preparação e caracterização de partículas por complexação de PβAE com alginato

Para simular o processo de complexação destes polímeros em termos de formação de partículas e capacidade de interacção com o DNA fomos testar o comportamento na presença de alginato conhecido por ser um polímero carregado negativamente, à semelhança da molécula de DNA.

Os resultados da medição do potencial Zeta, calculado a partir das médias entre os valores das 3 medições efectuadas indicam que existe uma neutralização de cargas sugerindo que houve agregação das partículas de alginato com os polímeros preparados. Note ainda que o

3. Resultados e Discussão

potencial Zeta médio dos complexos vai se tornando menos negativos à medida que se aumenta a proporção de P β AE com excepção da amostra 1:10 que apresenta um potencial Zeta médio ligeiramente superior ao das amostras de 1:15 e 1:20.

Por outro lado, os resultados do correlograma indicam que quando se juntam as amostras de P β AE e de alginato dão origem a partículas maiores havendo um afastamento da curva do correlograma relativamente à origem dos eixos [45], indicando potencialmente a presença de agregados de maiores dimensões que os polímeros originais. A formação destes agregados deverá ser originada pela complexação do P β AE e do alginato. Relativamente à medição de tamanhos os resultados obtidos não são conclusivos uma vez que a distribuição em intensidade da amostra é muito baixa. Uma das possíveis razões que pode ser apontada, é a formação de complexos com uma alta polidispersividade de tamanhos hidrodinâmicos. Todavia poderá especular-se a formação de agregados de tamanhos superiores a 1 μ m uma vez que repetindo as análises efectuadas após a sua filtragem com um filtro de 1 μ m de diâmetro de poro, a análise do espectro mostra que há uma grande diminuição no tamanho dos agregados após esta operação, sendo obtidas as distribuições apresentadas na Figura 23 e Figura 24. Esta diminuição de tamanho indica que parte do composto foi retida no filtro. Estes resultados, embora inconclusivos são indicadores de que é possível haver complexação, todavia todo o processo tem de ser optimizado sendo que a finalidade última será desenvolver um método eficaz de complexação do P β AE com o DNA.

Tabela 5: Resultado do potencial Zeta (mV) médio das amostras calculado com base nas 3 medições efectuadas para cada amostra .

* razão (alginato:poli(β -amino ester)

Amostra	Potencial Zeta (mV)
P β AE	3,8
Alginato	-11
Complexo (1:5)*	-1,9
Complexo (1:10)*	-0,11
Complexo (1:15)*	-0,29
Complexo (1:20)*	-0,20

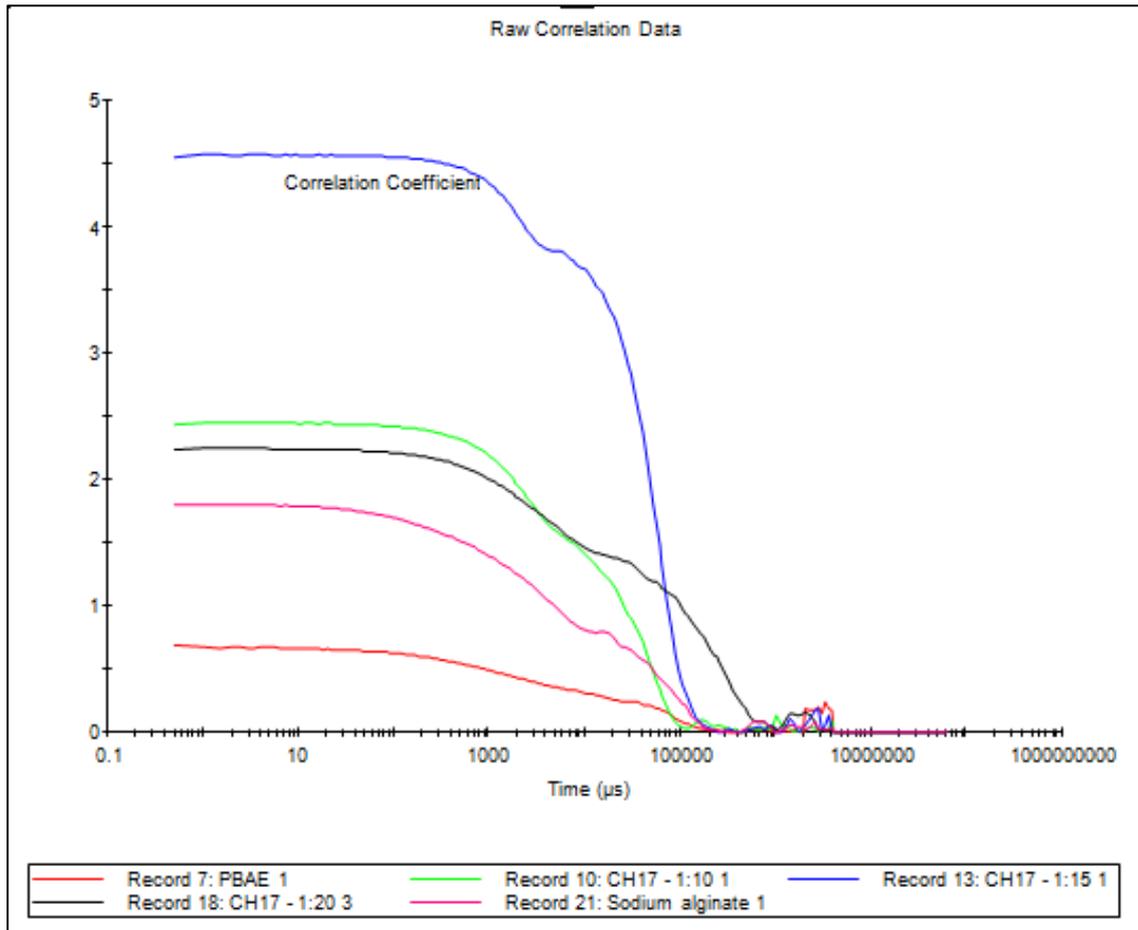


Figura 22: Correlograma das amostras: a vermelho o P β AE; a rosa o alginato; a verde o complexo com razão1: 10, a azul o complexo com razão1: 15 e a preto o complexo com razão1: 20. Note que as curvas dos complexos encontram-se mais afastadas da origem dos eixos, indicando que, após serem misturados o P β AE e o alginato complexam formando agregados maiores.

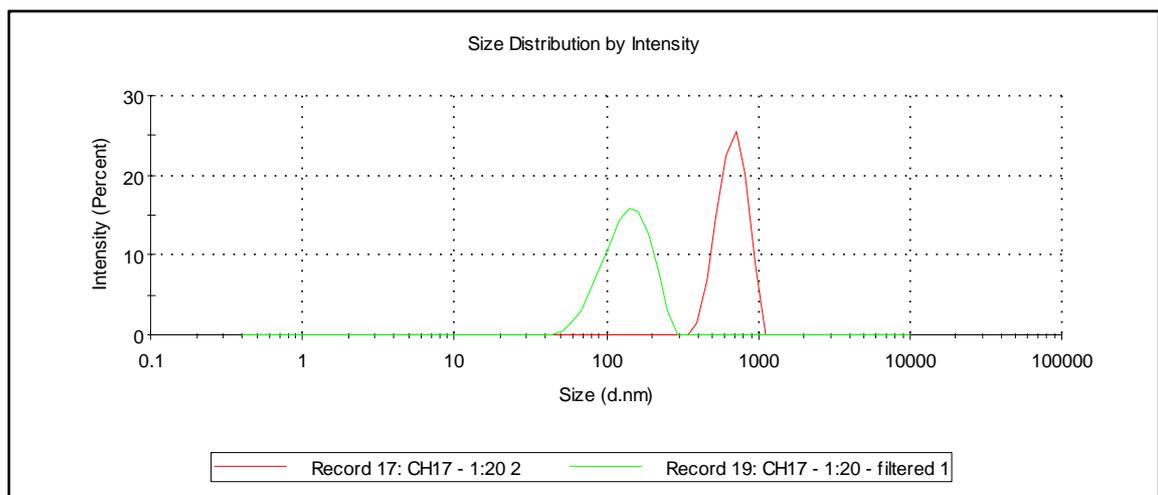


Figura 23: Distribuição em intensidade do complexo com razão1:20(alginato:P β AE) antes (a vermelho) e após ter sido filtrada (a verde).

3. Resultados e Discussão

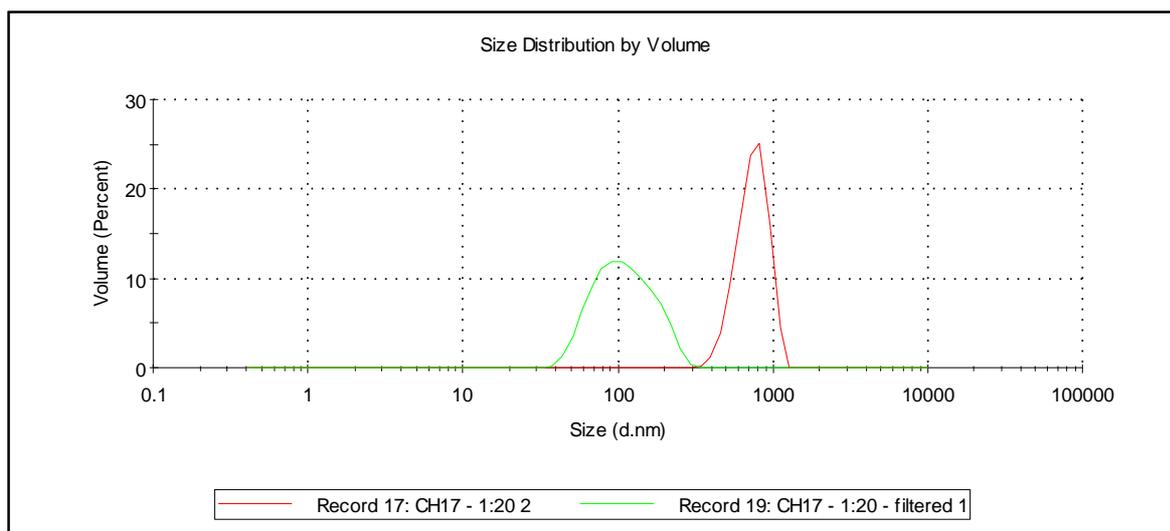


Figura 24: Distribuição em volume do complexo com razão 1:20 (alginato:P β AE) antes (a vermelho) e após ter sido filtrada (a verde).

3.3 Preparação do copolímero de PEG-P β AE-PEG

A preparação do copolímero de PEG-P β AE-PEG, implicou um conjunto de reacções com vista a preparar os respectivos precursores. Procedeu-se então à modificação dos terminais acrilatos do P β AE com propargilamina de forma a ter nos terminais a ligação tripla necessária para que posteriormente reaja com um terminal azida através de uma reacção de tipo *click chemistry*. A adição de Michael da propargilamina e do P β AE-diacrilato conduziu à obtenção de um composto com 95% de rendimento. Os dados do RMN- 1 H (Figura 25) do produto mostram a modificação dos terminais. Os sinais relativos aos grupos acrilatos (δ 5.5 – 6.5 ppm), representado na figura pelas letras *i* e *j*, desapareceram, sendo um grande indicador de que houve reacção. Para a parte relativa ao PEG-N $_3$ o FTIR (Figura 26), obtido evidenciou a presença da banda da azida na zona de 2160-2120 cm^{-1} sugerindo que a reacção de modificação de terminal do PEG foi, por sua vez, bem-sucedida.

Após a reacção entre P β AE e PEG-N $_3$ procedeu-se à caracterização do produto (CH14). A análise do espectro do FTIR da amostra (Figura 27), e a sua comparação com o espectro dos precursores, mostraram que o pico referente à azida (de 2160-2120 cm^{-1}), presente no espectro do PEG-N $_3$ desaparece, sendo um indicador de que os dois precursores reagiram por *click*, tendo-se, assim, formado o copolímero PEG-P β AE-PEG. Após a reacção foi necessário remover os sais de cobre presentes pelo que se procedeu a uma diálise contra água seguida da liofilização da amostra. Após a liofilização da amostra verificou-se que a solubilidade do composto foi drasticamente diminuída tendo-se formado uma espécie de “pedra”. Uma

explicação possível para esta diminuição da solubilidade é o facto de que no processo de liofilização da amostra, as cadeias do polímero teriam se aproximando de tal forma que teriam formado uma estrutura compacta de difícil permeação pelos solventes. Desse modo tornou-se impossível a obtenção de espectros de ^1H -RMN do composto apesar de se ter testado num grande conjunto de solventes deuterados (DMSO- d_6 , D_2O , clorofórmio deuterado, DMF- d_6 e metanol deuterado). Assim não foi possível proceder à caracterização do composto por ^1H -RMN e nem fazer a confirmação da estrutura química proposta. Por este motivo não foi possível reunir informações de caracterização suficientes para avançar com o projecto inicialmente proposto.

Em suma, embora os dados do FTIR indicassem que possivelmente a reacção de *click chemistry* foi eficaz, a eliminação do cobre usado na reacção constitui um problema uma vez que a dialise contra água (que é o melhor método de eliminar o cobre) seguida da liofilização mostrou levar a uma diminuição acentuada da solubilidade do composto. Por outro lado, o processo de preparação do copolímero é muito complexo, envolvendo duas modificações de terminais, sendo que no caso do PEG esta modificação, por sua vez, envolve duas reacções (mesilação e azidação). Tendo em conta que o objectivo primordial do projecto é o desenvolvimento de um sistema de nanotransportadores utilizando um processo experimental simples e passível de ser transposto para a indústria farmacêutica, o processo escolhido não cumpre os requisitos pré-estabelecidos.

3. Resultados e Discussão

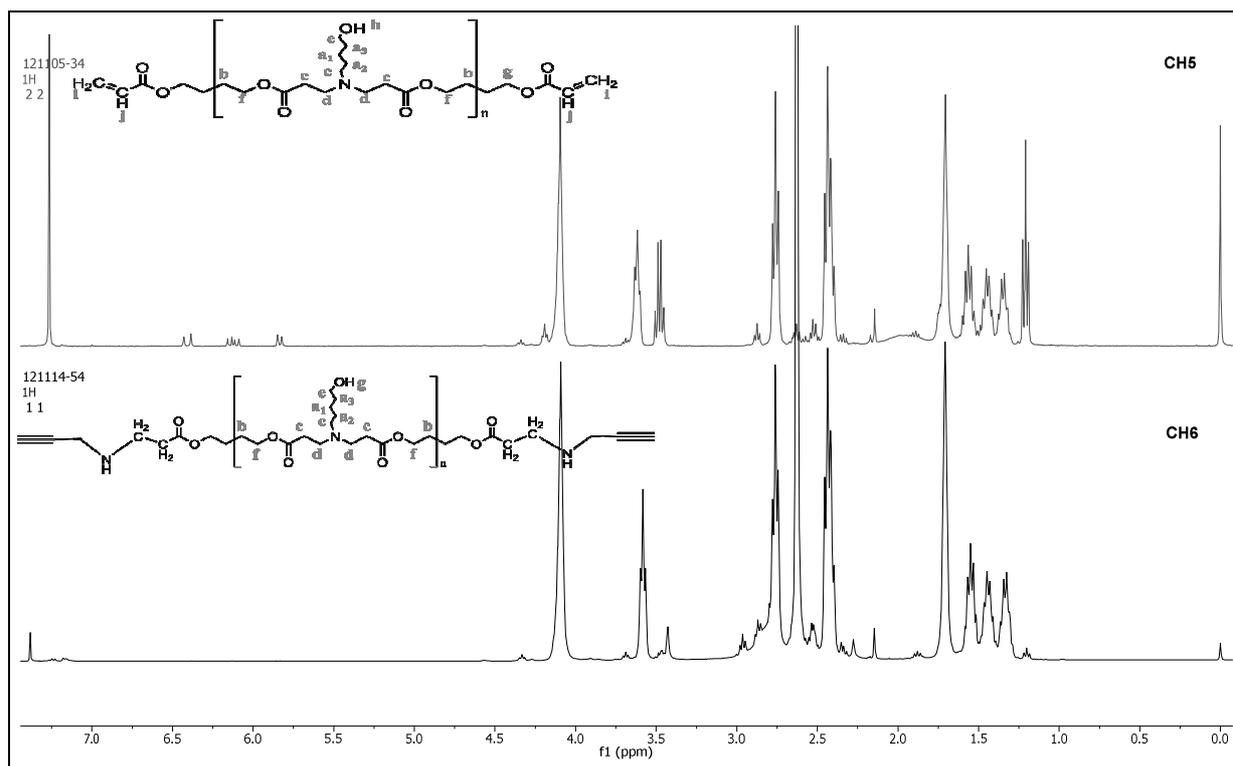


Figura 25: Em cima, caracterização do espectro de ^1H -RMN do PBAE antes da modificação de terminais acrilato, em baixo, PBAE após a modificação de terminais.

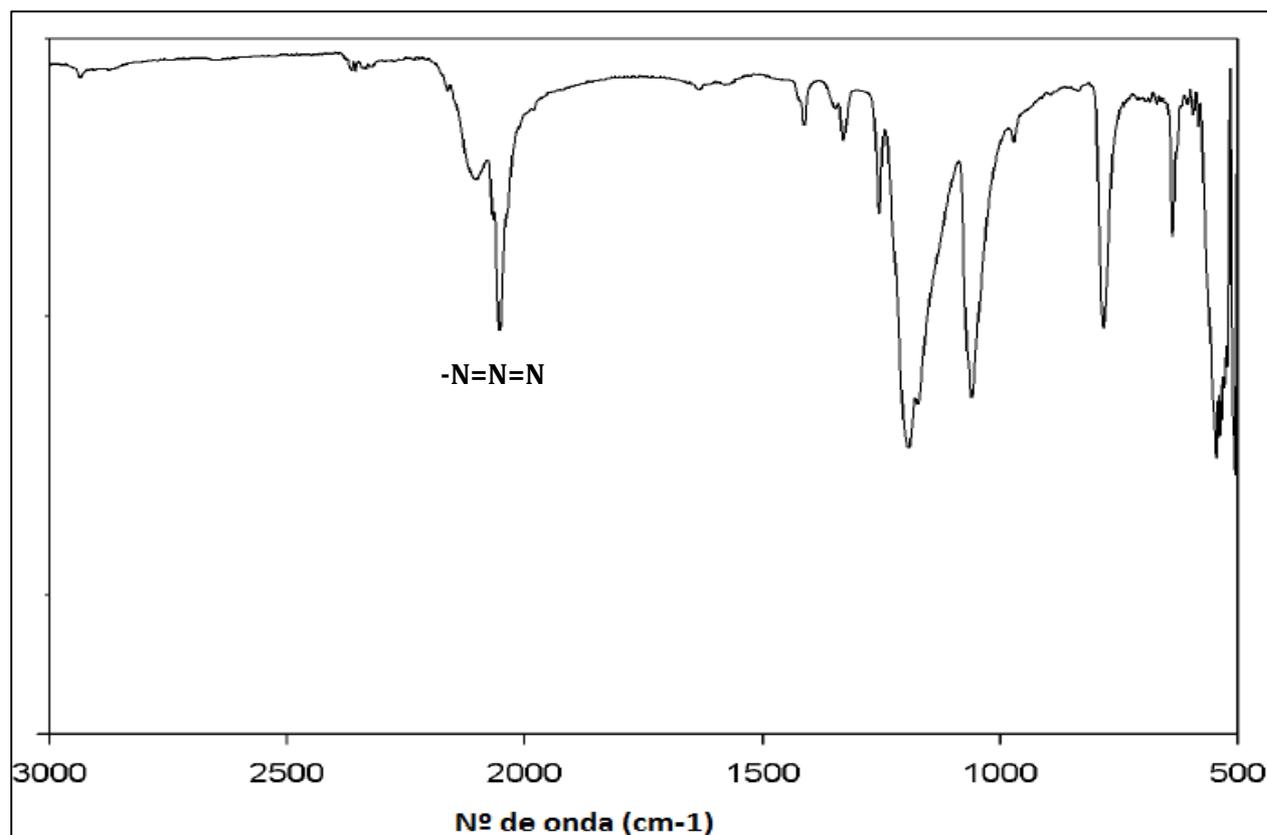


Figura 26: Espectro de FTIR-ATR do PEG-N3.

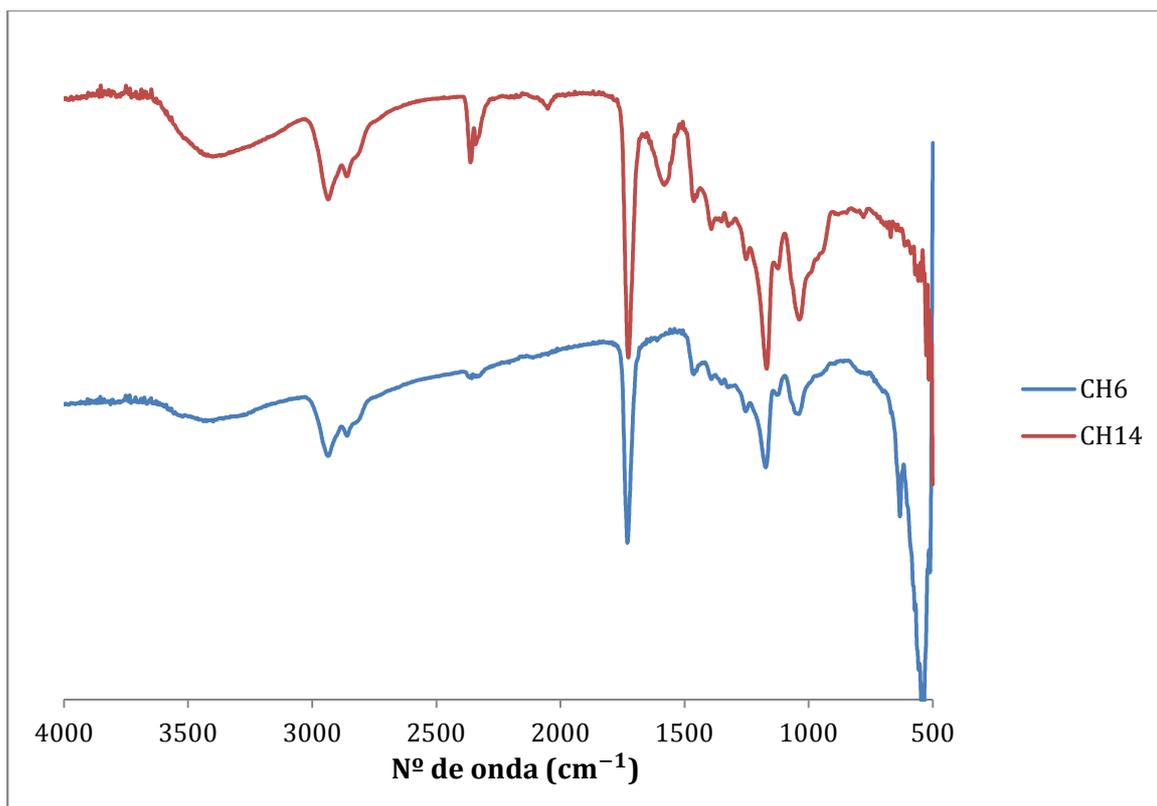


Figura 27: A azul, o espectro de FTIR-ATR do CH6 (\equiv -P β AE \equiv), a vermelho o espectro de FTIR-ATR do CH14 (PEG-P β AE-PEG).

3.4 Modificação dos terminais do P β AE com Glucosamina

Em 2005, Daniel G. Anderson e os seus colaboradores, após terem construído uma base de dados de P β AEs e testado as suas características e capacidade de complexação com DNA, concluíram que o grupo terminal do P β AE poderia ser o ponto chave para aumentar a eficiência de transfecção [28, 46].

Deste modo, sendo que o P β AE com terminais acrilato sintetizado possibilita uma vasta gama de mudanças de terminais com compostos contendo NH_2 , por adição de Michael e, sendo que a primeira modificação efectuada com propagilamina teve sucesso, procedeu-se a modificação dos terminais acrilatos com glucosamina. A escolha da glucosamina teve em conta o facto de se tratar duma modificação ainda não descrita na literatura e, por outro lado, o facto de o composto possuir boas características para aplicações biomédicas. Dado que a glucosamina se apresenta sob a forma de hidrocloreto foi necessário neutralizar com hidrogenocarbonato de sódio para que apresentasse as características nucleofílicas. O produto da reacção após isolamento é um óleo de cor acastanhada e muito viscoso.

3. Resultados e Discussão

As condições de reacção testadas bem como os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 6.

Tabela 6: Condições de reacção testadas e resumo dos resultados obtidos.

Amostra	Razão molar PBAE/Gluc.	Temperatura	Tempo	Razão molar Gluc/ NaHCO ₃	% de Modificação
CH8	1/5	Ambiente	Uma noite	1:1	64%
CH16	1/6 (½ no inicial e ½ após 24h)	35° C	48h	1:1	85%
CH18	1/6	40°C	48h	1:2,5	-

A percentagem de modificação foi calculada por ¹H-RMN (Figura 28) comparando os picos relativos à parte do acrilato antes da modificação e depois da modificação, ou seja, calculou-se o DP (grau de polimerização) antes da modificação e um novo DP depois da modificação de terminal. A percentagem de modificação é, então calculada a partir da seguinte expressão:

$$\% \text{ de Modificação} = \left(1 - \frac{DP(\text{inicial})}{DP(\text{final})} \right) \times 100 \qquad DP = \frac{\int e}{\frac{\int j}{2}}$$

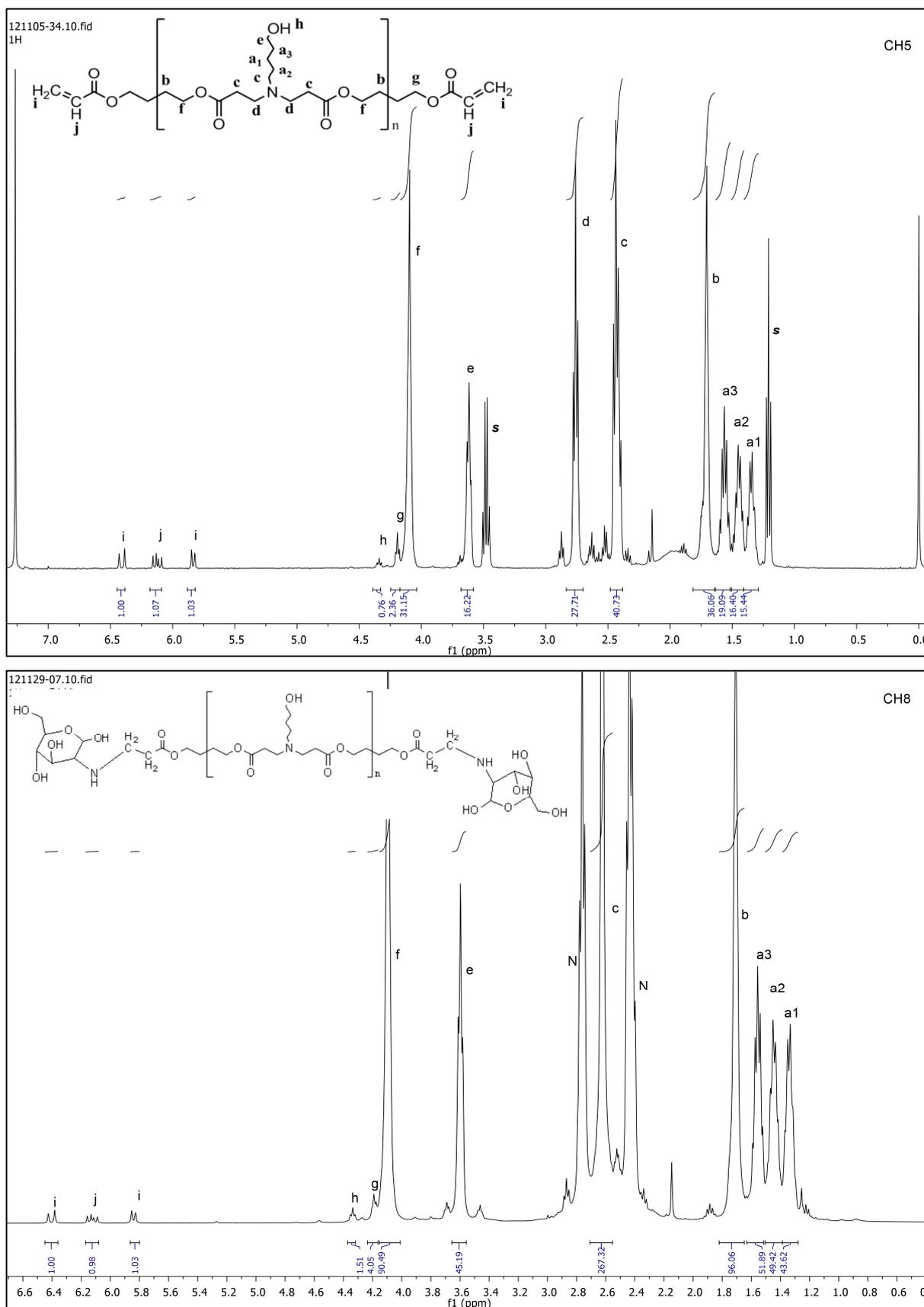


Figura 28: Espectro de RMN- ^1H do PBAE antes da modificação dos terminais (CH5) e após a modificação dos terminais (CH8). Note que efectivamente se verifica um aumento no valor do DP calculado em relação aos terminais acrilato de 16 para 45.

3. Resultados e Discussão

Através da análise da Tabela 7, nota-se que o aumento do tempo da reacção, o aumento da temperatura para 35°C (CH16) e o facto de se ter adicionado a glucosamina em duas porções levou a que houvesse um aumento da % de modificação de 64% para 85%. No entanto, não são perceptíveis os sinais da glucosamina que se deveriam situar entre 3 e 4 ppm devido ao facto da substituição se dar apenas nos grupos terminais. No caso do CH18 não foi possível calcular a % de modificação devido à má qualidade do RMN-¹H (ver anexo) obtido, embora não seja quase perceptível os picos referentes aos grupos acrilatos sendo um indicador de que houve modificação.

A análise do espectro de FTIR do CH5 e do CH8 (ver anexo) não mostra haver grandes diferenças, o que já era, de certa forma, esperado dado tratar-se de uma modificação apenas do terminal do polímero. É perceptível um aumento ligeiro no pico típico das ligações OH na zona de 3600-3200 cm⁻¹ do espectro. Tal aumento dever-se-á aos grupos OH presentes na glucosamina.

3.5 Síntese de PβAE com glucosamina

O sucesso, relativo do processo de modificação por adição de Michael levou a que ambicionássemos desenvolver um PβAE mas com a glucosamina de raiz, ou seja, fazer um novo PβAE, não antes descrito que aliasse as características já conhecidas do PβAE aos da glucosamina. Os resultados obtidos serão apresentados em seguida.

O processo de síntese foi testado em diversas condições tendo-se variado as proporções molares, o solvente, a temperatura e o tempo de reacção (**Erro! Autoreferência de indicador não válida.**).

Tabela 7: Resumos das condições de reacções testadas.

Amostra	Razão molar Acril./Gluc.	Solvente	Tempo	Temperatura	Razão molar
					Gluc./ NaHCO ₃
CH10	1,2/1	Acetona	24 h	40 °C	1/1
CH12	1,2/1	DMSO	24 h	40 °C	1/1
CH19	1,2/1	DMSO	48 h	50 °C	1/2
CH20	1,2/1	H ₂ O	48 h	50 °C	1/2
CH21	1,2/1	H ₂ O	48 h	85 °C	1/2

Dos métodos testados o que se mostrou mais eficaz foi o usado na síntese do CH19 sendo que os resultados obtidos para as outras amostras não foram satisfatórios.

Comparativamente com acetona, a síntese em DMSO mostrou ser mais eficaz, uma vez que a glucosamina demonstrou ser pouco solúvel. Em água, um solvente mais ecológico e em que a glucosamina é bastante solúvel, a reacção não se mostrou eficiente, obtendo-se um baixo rendimento. Por outro lado, os espectros RMN-¹H (ver anexo) evidenciam a não ocorrência de reacção.

Para tentar resolver o problema da pouca solubilidade da glucosamina hidrocloreídrica em acetona, fez-se a substituição da mesma por glucosamina acetilada. No entanto os resultados obtidos indicam que não houve reacção uma vez que os espectros de RMN-¹H (ver anexo) obtido são iguais ao do composto antes da reacção. De modo a confirmar que não houve uma eventual perda do produto no processo de purificação, analisou-se os líquidos de precipitação tendo-se confirmado a presença maioritária de monómeros de acrilato ainda por reagir. Deste modo, conclui-se, novamente, que para a reacção em causa o melhor solvente é o DMSO.

O aumento da temperatura também mostrou ser um outro aspecto importante para o aumento eficiência da reacção, bem como o aumento da quantidade de NaHCO₃ relativamente à glucosamina hidrocloreídrica para o dobro, terá possivelmente proporcionado a existência de mais moléculas de glucosamina aumentando, assim, a eficiência da reacção.

Pela análise dos dados de RMN-¹H e de FTIR do CH19 (Figura 29 e Figura 30) temos alguma indicação de que houve reacção. Nomeadamente, no caso do RMN-¹H, é de notar a presença dos picos de acrilato muito pouco intensos e de sinais muito largos na zona correspondente à glucosamina. O espectro do FTIR também demonstra que o produto da reacção contém picos que estão presentes no espectro da glucosamina e, também, o pico do C=O da ligação éster. Estes dados suportam a conclusão de que, efectivamente poderá ter havido formação de polímero. No entanto é preciso afinar o processo de síntese tendo em conta as informações extraídas desta primeira etapa. Por outro lado, é necessário proceder-se à caracterização em detalhe, bem como confirmar a estrutura química antes de se passar à fase seguinte.

3. Resultados e Discussão

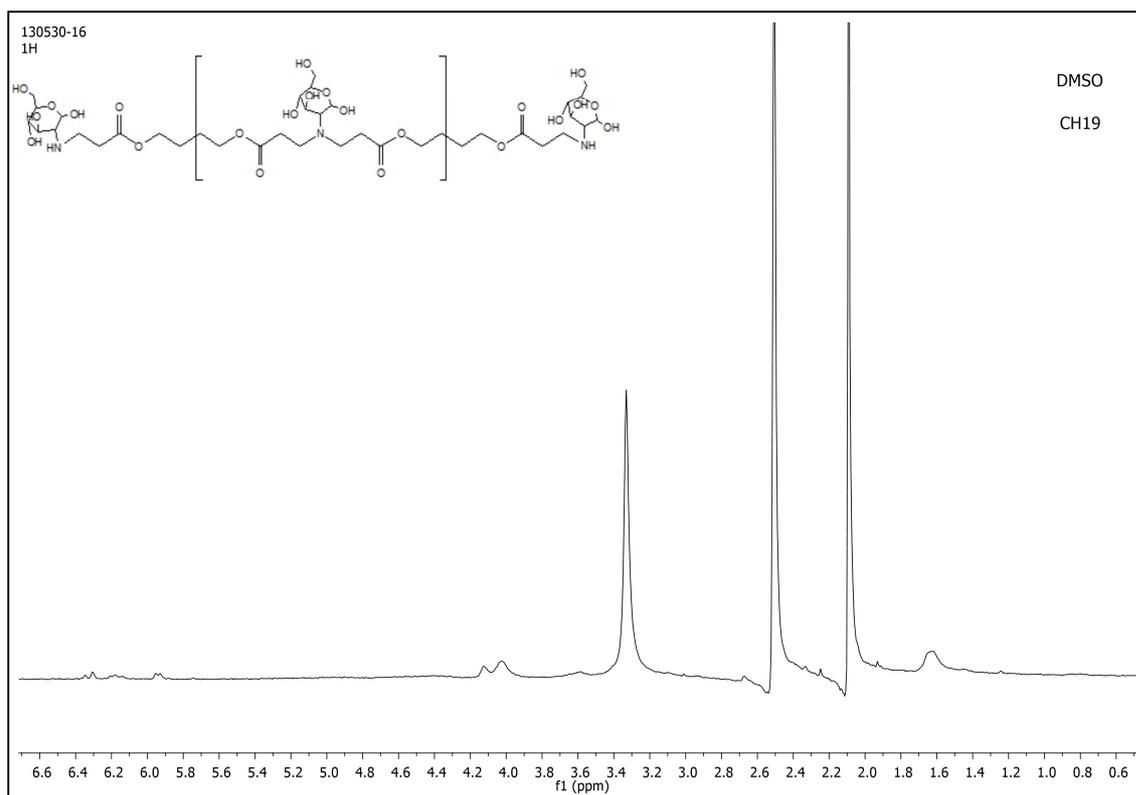


Figura 29: Espectro de H-RMN do PβAE obtido a partir da reação de diacrilato de 1,4-butanodiol e glucosamina hidrocloreídica.

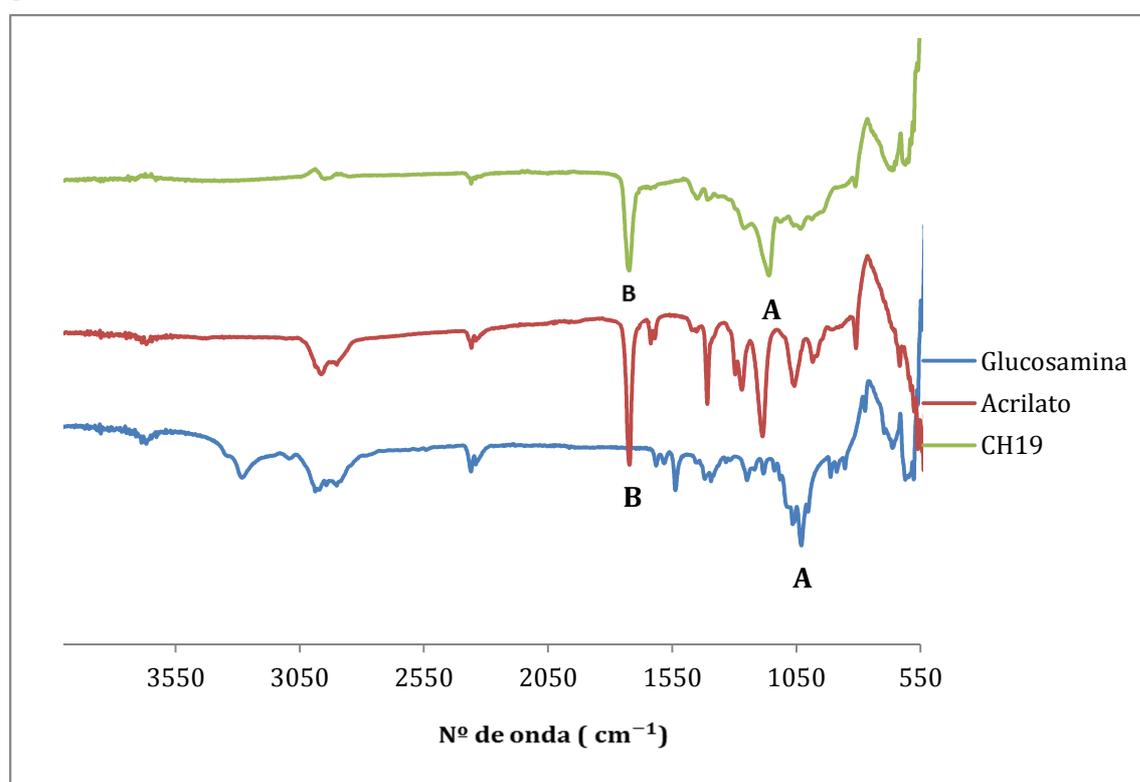


Figura 30: A azul, o espectro de FTIR-ATR do glucosamina hidrocloreídica, a vermelho o espectro de FTIR-ATR do diacrilato de 1,4-butanodiol e a verde o espectro de FTIR-ATR do CH19 resultante da adição de Michel entre os dois reagentes.

4 Conclusão e perspectivas de trabalho futuro

O primeiro objectivo proposto foi a optimização do processo de síntese do P β AE em acetona. Com efeito, a melhores condição de síntese determinada foi a uma temperatura de 50°C. De facto, o aumento da temperatura revelou-se fundamental para a obtenção de polímeros de pesos moleculares maiores do que os obtidos em DMSO. O processo desenvolvido tem como vantagem o facto de a acetona ser um solvente menos tóxico do que o DMSO e de fácil eliminação. Os resultados da viabilidade celular revelaram-se muito favoráveis mostrando que mesmo em concentrações muito elevadas o polímero sintetizado não é tóxico e/ou não contém nenhum vestígio de compostos tóxicos.

Relativamente à resposta ao pH, os dados de titulação e de transmitância comprovaram que para pHs superiores aos do $pK_b \approx 5$, o valor da transmitância diminui, indicando que o P β AE torna-se insolúvel nestas condições. Relativamente à degradação, ficou provada que ela ocorre por hidrólise das cadeias. A avaliação da complexação do P β AE com o alginato de sódio demonstrou ser preciso afinar o processo uma vez que os tamanhos obtidos em muito se afastam do objectivo proposto, que era a obtenção de nanopartículas, apesar dos elevados valores do tamanho das partículas indicarem problemas de agregação.

Quanto ao segundo objectivo proposto, referente a obtenção do copolímero de PEG-PBAE-PEG, embora os dados do FTIR indicassem que possivelmente houve reacção de *click*, a eliminação do cobre usado na reacção constituiu um problema uma vez que a diálise contra água (que é o melhor método de eliminar o cobre) seguida da liofilização mostrou levar a uma diminuição acentuada da solubilidade do composto. Por outro lado, o processo de preparação do copolímero é muito complexo, envolvendo duas modificações de terminais, sendo que no caso do PEG esta modificação, por sua vez, envolve duas reacções (mesilação e azidação). Tendo em conta que o objectivo primordial do projecto, o desenvolvimento de um sistema de nanotransportadores utilizando um processo experimental simples, o processo experimentado não cumpre os requisitos pré-estabelecidos. Uma possível alternativa à obtenção do copolímero, provavelmente mais eficaz, poderia ser por modificação dos terminais via adição de Michael a partir do PEG-NH₂, uma vez que esta reacção tem-se mostrado muito eficaz.

O ligeiro excesso de acrilato usado na síntese mostrou ser o suficiente para a formação de terminais acrilatos conforme a informação encontrada na literatura. Verificou-se ainda a rápida modificação destes terminais por adição de Michael com compostos contendo terminais NH₂. Neste caso o DMSO provou ser o melhor solvente. A modificação com glucosamina hidrocloreídica foi um importante resultado obtido, visto tratar-se de uma modificação ainda não descrita que abriu caminho para um passo ainda mais ousado que foi a síntese, de raiz, do

4. Conclusão e perspectivas de trabalho futuro

P β AE com glucosamina, também não descrito. No entanto a caracterização detalhada destes novos compostos, constitui ainda uma etapa a cumprir antes de passar a avaliação biológica. No caso do Gluc-P β AE-Gluc, um dos ensaios futuros seria testar inicialmente também a complexação com o alginato, comparando com os resultados agora obtidos para o P β AE com terminais acrilato, uma vez que no caso da complexação com o material genético, é cada vez mais comprovado a ideia de que o grupo terminal do P β AE faz toda a diferença. Alguns autores já postulam que o grupo terminal do P β AE pode ser a chave para o aumento da eficiência de complexação do P β AE com o material genético.

5 Referências

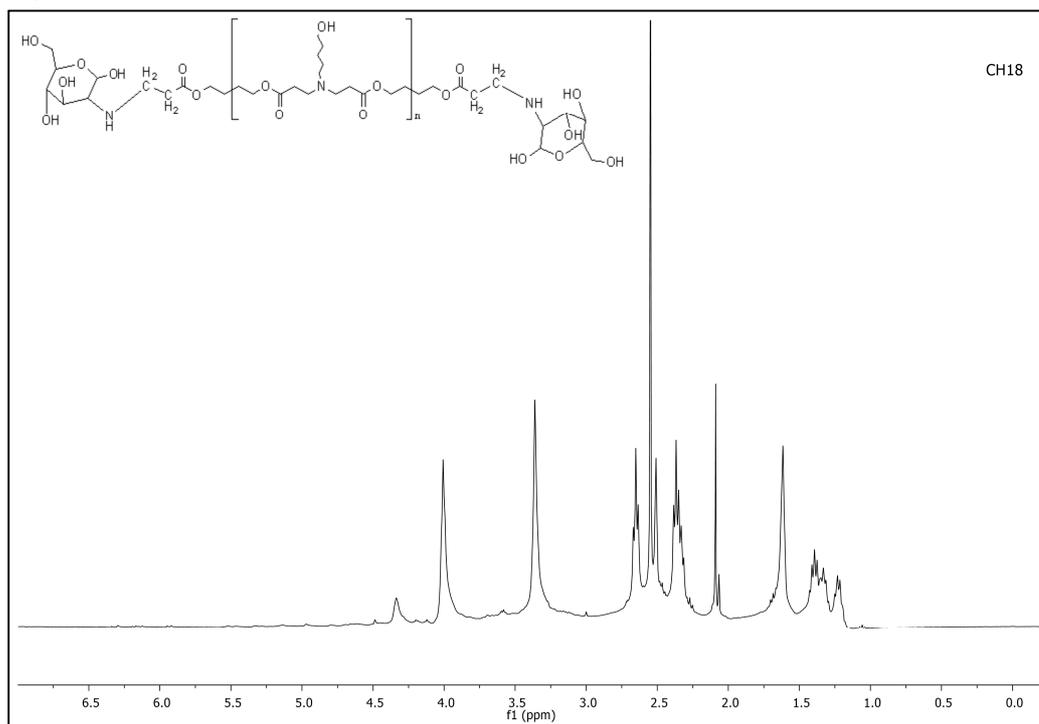
1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012*. European Journal of Cancer, (0).
2. Organization, W.H., *WHO (World Health Organization, Genf) Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment*. 1979: WHO.
3. Ko, J., et al., *Tumoral acidic extracellular pH targeting of pH-responsive MPEG-poly (β -amino ester) block copolymer micelles for cancer therapy*. Journal of Controlled Release, 2007. **123**(2): p. 109-115.
4. Roth, J.A. and R.J. Cristiano, *Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going?* Journal of the National Cancer Institute, 1997. **89**(1): p. 21-39.
5. Cross, D. and J.K. Burmester, *Gene therapy for cancer treatment: past, present and future*. Clinical medicine & research, 2006. **4**(3): p. 218-227.
6. Wysocki, P.J., M. Mackiewicz-Wysocka, and A. Mackiewicz, *Cancer gene therapy – state-of-the-art*. Reports of Practical Oncology & Radiotherapy, 2002. **7**(4): p. 149-155.
7. Smith, A.E., *Viral vectors in gene therapy*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 807-38.
8. Schatzlein, A., Eds. Taylor & Francis: Boca Raton, *Polymers in drug deliver*. Uchegbu, I., Introduction. Vol. I. 2006.
9. Coimbra, P.M.A., *Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural*. 2010, Universidade de Coimbra.
10. Ana C. Fonseca, P.F., Rosemeyre A. Cordeiro, Patrícia V. Mendonça, Joana R. Góis e jorge F. J. Coelho, *Drug Delivery Systems for Predictive Medicine: Polymers as Tools for Advanced Applications*, S.S.B.M. Dordrecht, Editor. 2013.
11. <http://nano-techgroup.com/delive6.jpg>.
12. Mozafari, M.R., *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*. 2007: Springer Dordrecht, The Netherlands.
13. Nie, S., et al., *Nanotechnology applications in cancer*. Annu. Rev. Biomed. Eng., 2007. **9**: p. 257-288.
14. Hasirci, N., *Micro and nano systems in biomedicine and drug delivery*, in *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*. 2007, Springer. p. 1-26.
15. Kopeček, J., *Polymer–drug conjugates: Origins, progress to date and future directions*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(1): p. 49-59.
16. Pasut, G. and F.M. Veronese, *Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8–9): p. 933-961.
17. Vicent, M.J. and R. Duncan, *Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer*. Trends in Biotechnology, 2006. **24**(1): p. 39-47.
18. Duncan, R., *Polymer conjugates as anticancer nanomedicines*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(9): p. 688-701.
19. Ganta, S., et al., *A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery*. Journal of Controlled Release, 2008. **126**(3): p. 187-204.
20. Onaca, O., et al., *Stimuli-Responsive Polymersomes as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery*. Macromolecular bioscience, 2009. **9**(2): p. 129-139.
21. Rapoport, N., *Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8): p. 962-990.
22. Schmaljohann, D., *Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(15): p. 1655-1670.
23. de las Heras Alarcón, C., S. Pennadam, and C. Alexander, *Stimuli responsive polymers for biomedical applications*. Chemical Society Reviews, 2005. **34**(3): p. 276-285.
24. Lynn, D.M. and R. Langer, *Degradable Poly(β -amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(44): p. 10761-10768.

5. Referências

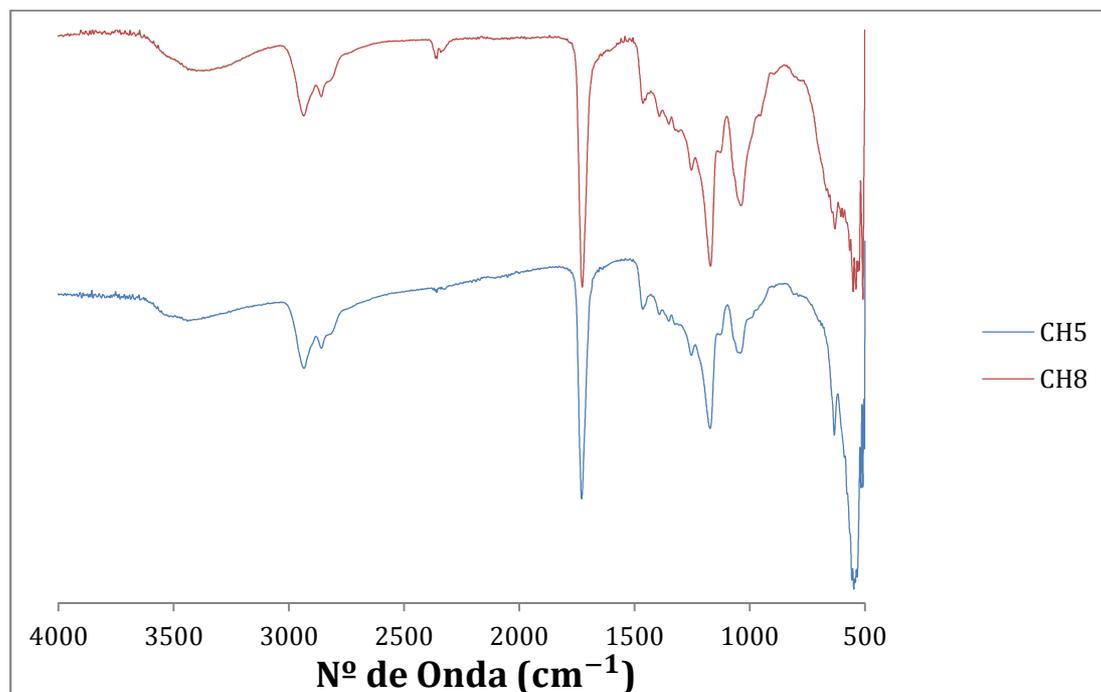
25. Zhong, Z., et al., *A versatile family of degradable non-viral gene carriers based on hyperbranched poly(ester amine)s*. Journal of Controlled Release, 2005. **109**(1–3): p. 317-329.
26. Wong, K., et al., *PEI-g-chitosan, a Novel Gene Delivery System with Transfection Efficiency Comparable to Polyethylenimine in Vitro and after Liver Administration in Vivo*. Bioconjugate Chemistry, 2005. **17**(1): p. 152-158.
27. Kim, Y.-K., et al., *Poly (amino ester) s-Based Polymeric Gene Carriers in Cancer Gene Therapy*. 2013.
28. Anderson, D.G., et al., *Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly (β -amino esters)*. Molecular Therapy, 2005. **11**(3): p. 426-434.
29. Park, M.R., et al., *Degradable polyethylenimine-*alt*-poly (ethylene glycol) copolymers as novel gene carriers*. Journal of controlled release, 2005. **105**(3): p. 367-380.
30. Hwang, S., et al., *pH-sensitivity control of PEG-poly(β -amino ester) block copolymer micelle*. Macromolecular Research, 2007. **15**(5): p. 437-442.
31. Min, K.H., et al., *Tumoral acidic pH-responsive MPEG-poly(beta-amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy*. J Control Release, 2010. **144**(2): p. 259-66.
32. Zugates, G.T., et al., *Rapid optimization of gene delivery by parallel end-modification of poly(beta-amino ester)s*. Mol Ther, 2007. **15**(7): p. 1306-12.
33. Kim, Y.-K., et al., *Poly(amino ester)s-Based Polymeric Gene Carriers in Cancer Gene Therapy*. Novel Gene Therapy Approaches. 2013.
34. Tron, G.C., et al., *Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1, 3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes*. Medicinal research reviews, 2008. **28**(2): p. 278-308.
35. Kolb, H.C., M. Finn, and K.B. Sharpless, *Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions*. Angewandte Chemie International Edition, 2001. **40**(11): p. 2004-2021.
36. Svedhem, S., et al., *Synthesis of a Series of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Alkanethiol Amides Designed to Address Structure and Stability of Biosensing Interfaces*. The Journal of Organic Chemistry, 2001. **66**(13): p. 4494-4503.
37. Tzeng, S.Y., et al., *Non-viral gene delivery nanoparticles based on poly(beta-amino esters) for treatment of glioblastoma*. Biomaterials, 2011. **32**(23): p. 5402-10.
38. Anderson, D.G., et al., *A combinatorial library of photocrosslinkable and degradable materials*. Advanced Materials, 2006. **18**(19): p. 2614-2618.
39. Burchard, W., *Static and dynamic light scattering from branched polymers and biopolymers*. 1983: Springer.
40. Shen, Y., et al., *Degradable Poly(β -amino ester) nanoparticles for cancer cytoplasmic drug delivery*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2009. **5**(2): p. 192-201.
41. Lee, H., et al., *A discussion of the pH-dependent protonation behaviors of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) (PDMAEMA) and poly(ethylenimine-ran-2-ethyl-2-oxazoline) (P(EI-r-EOz))*. J Phys Chem B, 2011. **115**(5): p. 844-60.
42. Hawkins, A.M., et al., *Synthesis and analysis of degradation, mechanical and toxicity properties of poly(β -amino ester) degradable hydrogels*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(5): p. 1956-1964.
43. Lutén, J., et al., *Biodegradable polymers as non-viral carriers for plasmid DNA delivery*. Journal of Controlled Release, 2008. **126**(2): p. 97-110.
44. Safranski, D.L., et al., *The effect of chemistry on the polymerization, thermo-mechanical properties and degradation rate of poly(β -amino ester) networks*. Polymer, 2010. **51**(14): p. 3130-3138.
45. Instruments, M., *Zetasizer nano series user manual*. Worcestershire: Malvern Instruments Ltd, 2004.
46. Green, J.J., R. Langer, and D.G. Anderson, *A Combinatorial Polymer Library Approach Yields Insight into Nonviral Gene Delivery*. Accounts of Chemical Research, 2008. **41**(6): p. 749-759.

6 Anexos

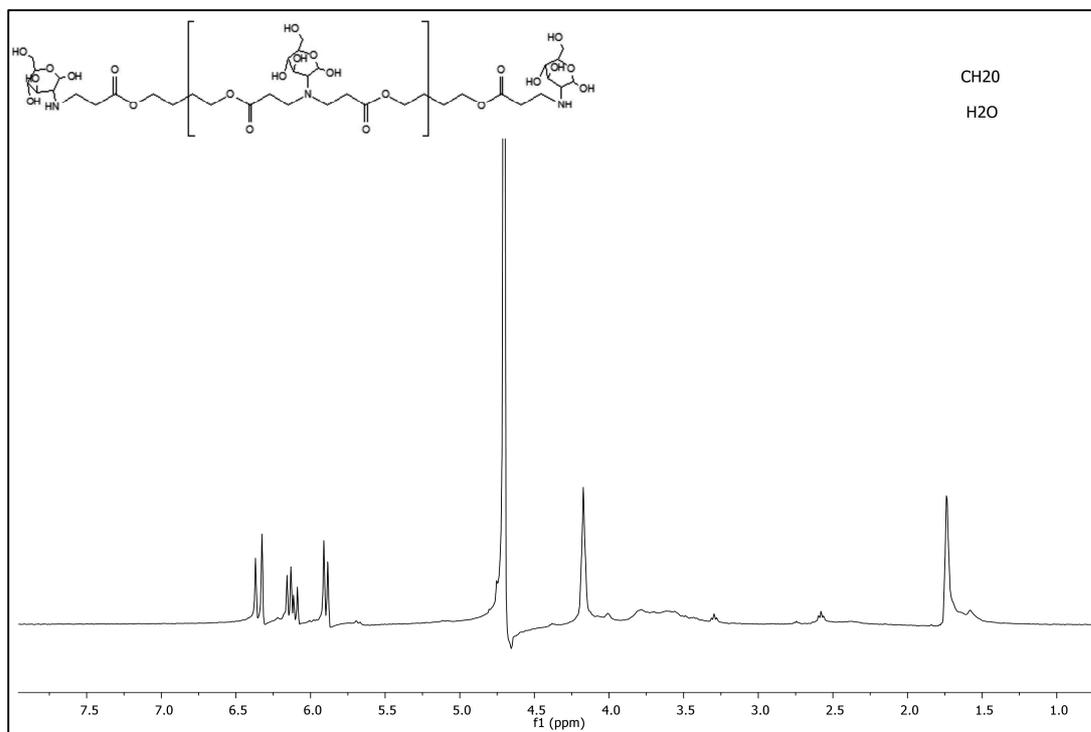
Espectro de H-RMN do CH18.



Espectro de FTIR-ATR do PβAE antes da modificação de terminais com glucosamina (CH5) e após a modificação de terminais (CH8).



Espectro de ^1H -RMN do CH20 em H₂O, resultante da reacção entre a glucosamina e o 1,4-butanodiol diacrilato.



Espectro de ^1H -RMN do CH21 em H₂O, resultante da reacção entre a glucosamina e o 1,4-butanodiol diacrilato.

