



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Nuno Diogo Pargana Mateus

INFLUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DO PESO MOLECULAR
DE COPOLÍMEROS DE BLOCO CATIONICOS NO SEU
DESEMPENHO COMO VETORES DE ENTREGA DE
MATERIAL GENÉTICO PARA TRATAMENTO DO CANCRO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Química no ramo de
Bioprocessos e Biomateriais orientada pela Doutora Patrícia Vitorino
Mendonça e pela Professora Doutora Fani Pereira de Sousa e
apresentada ao Departamento de Engenharia Química

Setembro de 2023



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Nuno Diogo Pargana Mateus

INFLUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DO PESO MOLECULAR DE
COPOLÍMEROS DE BLOCO CATIONICOS NO SEU DESEMPENHO
COMO VETORES DE ENTREGA DE MATERIAL GENÉTICO PARA
TRATAMENTO DO CANCRO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Engenharia Química no ramo de Bioprocessos e Biomateriais

Orientadora: Doutora Patrícia Vitorino Mendonça

Co-orientadora: Professora Doutora Fani Pereira de Sousa

Coimbra, Setembro de 2023

*“Dificuldades preparam pessoas comuns para
destinos extraordinários” - C.S. Lewis*

Este trabalho teve o apoio do projeto CiNTech - *Technological Hub for Innovation, Translation and Industrialization of Complex Injectable Drugs* -, com a referência n.º C644865576-00000005, co-financiado pela Componente C5 - Capitalização e Inovação Empresarial integrada na Dimensão Resiliência do Plano de Recuperação e Resiliência (PRR), através do fundo NextGenerationEU.



Agradecimentos

O presente trabalho representa um grande objetivo pessoal que contra as expectativas pessoais superou o que esperava e se revelou ser uma etapa que conseguiria alcançar sempre com uma palavra de apoio daqueles que me rodeiam.

Em primeiro lugar, deixar o agradecimento à minha orientadora Doutora Patrícia Mendonça por toda a incansável paciência, disponibilidade e ajuda. Deste tempo de partilha de conhecimento levo aprendizagens enormes que farão a diferença no futuro enquanto profissional, obrigado. Ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde, da Universidade da Beira Interior, na pessoa da Professora Fani dos Santos e do Bruno Baptista, um obrigado pela colaboração e trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação.

À Andreia, um obrigado pela paciência e simpatia com que transmitia e partilhava o seu conhecimento e apoiava em todas as dúvidas que existiram; Ao pessoal do B37, obrigado por toda a ajuda que se vive dentro do grupo e pela forma como recebem novas pessoas em vosso redor. Um obrigado especial, à Mónica e Jéssica.

Aos colegas de casa, palavras seriam poucas para agradecer o apoio, transportámos uma amizade de infância para aquela que seria a nossa segunda casa, a cidade de Coimbra, obrigado Lara e Cardoso.

Aos meus afilhados, o meu muito obrigado, em especial ao João e ao Rodrigo por terem sempre aquela palavra de apoio na hora certa e por todos os momentos e memórias que criei convosco.

Aos tontos, um obrigado por toda a diversão e alegria constante, em especial à Sara e ao Carlos por estarem sempre de sorriso na cara e nos contagiarem com alegria.

À Classe operária, obrigado por todas as horas de galhofa das 8h às 17h, amizade e partilha por estarmos todos nesta caminhada. Em especial aos meus parceiros de sempre Mariana e Chico, desde o dia 1 até à porta do DEQ.

Ao Padrinho, pela incansável ajuda até ao último dia na luta conjunta por esta conquista e por 5 anos fantásticos onde me ensinaste bastante, desde os cantos à cidade até aos estudos.

Finalmente aos mais importantes, a toda a minha família e em especial, mãe, pai e irmã por todo o apoio e dedicação que depositaram desde o início desta etapa e por toda a confiança que mostraram ter, que culminou nesta jornada de 5 anos, especial que é tão partilhada com eles. Ao meu avô Chico que não pode celebrar comigo esta etapa mas que ficará com certeza orgulhoso do “Sr. Engenheiro” dele.

Resumo

Os polímeros têm-se mostrado materiais muito atrativos para aplicações na área da saúde, nomeadamente aplicações de alto valor, como o transporte e entrega de material genético (*gene delivery*). Isto deve-se à elevada versatilidade das estruturas poliméricas e a características mais específicas, como a capacidade de *self-assembly* ou de mascarar respostas imunitárias do organismo. Através do uso de técnicas de polimerização radicalar por desativação reversível (RDRP) é possível preparar polímeros com peso molecular, arquitetura, funcionalidade, composição e polidispersividade pré-determinados, permitindo assim o *fine tuning* das suas características, que têm impacto na sua eficiência terapêutica.

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da polidispersividade de copolímeros de bloco catiónicos no seu desempenho como transportadores de material genético para o tratamento do cancro. Na primeira parte do trabalho, foram sintetizados diferentes copolímeros de bloco, poli(metacrilato de (oligo (óxido de etileno) metil éter))-*bloco*-poli(metacrilato de (2-diisopropilamino) etilo) (POEOMA-*b*-PDPA-Br) com peso molecular semelhante ($M_n \approx 45000$) e polidispersividade diferente ($1,2 < D = M_w/M_n < 1,85$), recorrendo a técnicas de RDRP, nomeadamente polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP). A primeira etapa envolveu a síntese e purificação do macroiniciador POEOMA-Br, cujas cadeias foram posteriormente estendidas com DPA para formar o copolímero de bloco POEOMA-*b*-PDPA-Br. A variação da polidispersividade dos copolímeros foi conseguida através da variação da concentração de catalisador durante a polimerização do DPA. Os copolímeros foram caracterizados por cromatografia de exclusão de tamanhos (SEC), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (^1H RMN) e o seu valor de pK_a ($\approx 6,3$) foi determinado por titulação potenciométrica. Na segunda parte do trabalho, os copolímeros preparados foram complexados com material genético (sRNA), formando poliplexos, e a sua capacidade de encapsulação foi avaliada por espectroscopia UV-Vis e em gel de agarose. Os resultados mostraram que, na gama investigada, não houve influência significativa da polidispersividade dos copolímeros na sua capacidade de complexação de sRNA, que se situou entre 15% e 40%, em amostras comparáveis e dependendo da concentração de copolímero. O tamanho de partícula e potencial Zeta dos poliplexos obtidos com o copolímero que mostrou maior eficiência de complexação de sRNA (POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉) foram determinados por dispersão dinâmica de luz (DLS). Os resultados mostraram que para uma concentração de copolímero de 0,25 mg/mL, houve formação de poliplexos de carga positiva e com tamanho adequado para aplicação em terapia génica para tratamento do cancro. Os

poliplexos preparados com baixa concentração de copolímero (0,05 e 0,1 mg/mL) apresentaram carga negativa, potencialmente decorrente da alta eficiência de encapsulação de sRNA ($\approx 85\%$).

Palavras chave: terapia génica; RDRP; ATRP; POEOMA-*b*-PDPA-Br; sRNA; polidispersividade; poliplexos

Abstract

Polymers are very attractive materials to use in biomedical applications, namely high-value applications such as gene delivery, due to their structural versatility and specific features, such as ability to self-assemble or to avoid organism immune responses in their presence. Using reversible deactivation radical polymerization (RDRP) techniques, it is possible to prepare tailor-made polymers with predetermined molecular weight, architecture, functionality, composition, and molecular weight distribution (dispersity), which have direct impact on their therapeutic efficacy.

The aim of this work was to evaluate the influence of cationic block copolymers dispersity in their performance as gene delivery vectors for cancer treatment. In the first part of the work, poly (oligo (ethylene oxide) methyl ether) methacrylate-*block*-poly (2-diisopropylamino) ethyl methacrylate (POEOMA-*b*-PDPA-Br) with similar molecular weight ($M_n \approx 45000$) and distinct dispersity ($1.2 < \mathcal{D} = M_w/M_n < 1.83$), were synthesized using RDRP techniques, namely atom transfer radical polymerization (ATRP). The first task involved the synthesis and purification of POEOMA-Br macroinitiators, that were further extended with DPA monomer to give POEOMA-*b*-PDPA-Br block copolymers. The variation of the dispersity was achieved through the variation of the catalytic complex concentration during the DPA polymerization. The block copolymers were characterized by size exclusion chromatography (SEC), proton nuclear magnetic resonance (^1H RMN) spectroscopy and their pK_a values (≈ 6.3) were determined by potentiometric titration. In the second part of the work, the copolymers were complexed with genetic material (sRNA) to give polyplexes and their encapsulation efficiency was evaluated by UV-Vis spectroscopy and agarose gel. The results showed that, in the investigated range, there was no significant influence of the copolymers dispersity on their sRNA complexation capacity, which ranged between 15% and 40%, in comparable samples and depending on the copolymer concentration. The particle size and zeta potential of the polyplexes obtained with the copolymer that showed the highest sRNA complexation efficiency (POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉) were determined by dynamic light scattering (DLS). The results showed that for a copolymer at concentration of 0.25 mg/mL, there was formation of polyplexes with positive charge and average diameter suitable for application in gene therapy for cancer treatment. The polyplexes prepared with at copolymer concentration (0.05 e 0.1 mg/mL) exhibited negative charge, most probably due to the high sRNA encapsulation efficiency ($\approx 85\%$).

Key words: gene therapy; RDRP; ATRP; POEOMA-*b*-PDPA-Br; sRNA; polydispersity; polyplexes

Estrutura do Documento

O seguinte documento de dissertação de mestrado está dividido em 5 secções:

1. Motivação e objetivos, que descreve a motivação que levou ao desenvolvimento deste trabalho, bem como os objetivos propostos.

2. Introdução, que contém os conceitos necessários à contextualização do trabalho desenvolvido, nomeadamente os tipos de polimerização radicalar controlada que existem, com foco particular na técnica que é utilizada neste trabalho, o que é a polidispersividade, que propriedades dos polímeros influencia e que maneiras existem de a manipular e em que se baseia a terapia génica, que é a aplicação final dos polímeros sintetizados.

3. Secção experimental, que se centra na descrição de todos os métodos, materiais e procedimentos experimentais que foram necessários à obtenção e caracterização dos polímeros sintetizados.

4. Discussão de resultados, que apresenta todo o trabalho experimental desenvolvido, tal como análise e discussão detalhada dos resultados obtidos e as conclusões que se retiram acerca dos mesmos.

5. Conclusões e proposta de trabalho futuro, que apresenta as conclusões gerais retiradas do trabalho desenvolvido, bem como análise a perspectivas futuras com vista a prosseguir o trabalho nesta área de investigação.

Lista de Acrónimos

e-ATRP – ATRP mediado por eletroquímica

photo-ATRP – ATRP mediado por ação da luz

ARGET – Ativadores regenerados por transferência de eletrão

ATRP – Polimerização radicalar por transferência de átomo

DLS – Dispersão dinâmica de luz

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Grau de polimerização

DPA – Metacrilato de (2-diisopropilamino) etilo

EE – Eficiência de encapsulação

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELS – Dispersão de luz por eletroforese

ICAR – Iniciadores para contínua regeneração de ativadores

IPA – Isopropanol

IV-DP – Viscosímetro

Me₆TREN – Tris [2-(dimetilamino)etil]amina

NMP – Polimerização mediada por nitróxidos

OEOMA – Metacrilato de (oligo (óxido de etileno) metil éter)

PDPA – Poli(metacrilato de (2-diisopropilamino) etilo)

PEG – Polietilenoglicol

PET – Polietilenotereftalato

POEOMA – Poli(metacrilato de (oligo (óxido de etileno) metil éter))

PTFE – Politetrafluoretileno

RAFT – Transferência reversível de cadeia por adição/fragmentação

RALS – Dispersão de luz em ângulo reto

RDRP – Polimerização radicalar por desativação reversível

RI – Índice de refração

RMN – Ressonância magnética nuclear

SARA – Agente redutor e ativador suplementar

SEC – Cromatografia por exclusão de tamanhos

sRNA – Ácido ribonucleico de baixo peso molecular

THF - Tetrahydrofurano

TPMA - Tris[(2-piridil)metil]amina

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

Nomenclatura

D – Distribuição de pesos moleculares ou polidispersividade

$k_{ativação}$ – Constante cinética de reação de ativação

$k_{desativação}$ – Constante cinética de reação de desativação

k_p – Constante cinética de reação de propagação

k_t – Constante cinética de reação de terminação

L_m – Molécula de ligante

M – molécula de monómero

M_i – Peso molecular da espécie i

M_n – Peso molecular médio numérico

M_t – Metal de transição

M_w – Peso molecular médio ponderal

M_n^{SEC} – Peso molecular médio numérico experimental determinado por SEC

M_n^{RMN} – Peso molecular médio numérico experimental determinado por RMN

M_n^{th} – Peso molecular médio numérico teórico determinado pela conversão de monómero

n_i – Número de cadeias poliméricas da espécie, i

$P_{n,m}^*$ – Segmento polimérico em propagação

$P-X$ – Cadeias poliméricas dormentes/sem atividade

R – Cadeia carbonada

X – átomo de halogéneo

w_i – peso médio de uma cadeia polimérica

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Estrutura do Documento.....	vii
Lista de Acrónimos.....	ix
Nomenclatura.....	xi
Índice de Tabelas	xv
Índice de Figuras	xvii
Índice de Esquemas	xix
1. Motivação e objetivos	1
2. Introdução.....	3
2.1 Polimerização radicalar por desativação reversível (RDRP).....	3
2.1.1 Polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP).....	6
2.2 Polidispersividade e controlo por RDRP	9
2.3 Terapia génica	11
2.4 Copolímero poli(metacrilato de oligo (óxido de etileno) metil éter)- <i>bloco</i> - poli(metacrilato de (2-diisopropilamino) etilo) (POEOMA- <i>b</i> -PDPA-Br).....	14
3. Secção experimental.....	17
3.1 Materiais	17
3.2 Métodos	18
3.2.1 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).....	18
3.2.2 Ressonância magnética nuclear.....	19
3.3 Procedimentos de síntese	19
3.3.1 Síntese de macroiniciador POEOMA-Br	19
3.3.2 Síntese de copolímeros de bloco POEOMA- <i>b</i> -PDPA-Br.....	20

3.4	Determinação do pK_a	21
3.5	Preparação dos políplexos com sRNA	21
3.6	Determinação da eficiência de encapsulação	22
3.7	Determinação do tamanho de partículas e potencial zeta.....	22
3.8	Eletroforese em gel de Agarose.....	23
4.	Resultados e Discussão.....	25
4.1	Síntese de macroiniciador POEOMA-Br	26
4.2	Síntese de Copolímeros (POEOMA- <i>b</i> -PDPA-Br).....	30
4.2.1	Variação da concentração de agente SARA $Na_2S_2O_4$	30
4.2.2	Variação da concentração de catalisador $CuBr_2/Me_6TREN$	31
4.2.3	Determinação do pK_a	36
4.3	Influência da polidispersividade na eficiência de encapsulação	38
4.4	Tamanho e carga de superfície das partículas	40
5.	Conclusões e perspectivas de trabalho futuro	43
	Bibliografia	45

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de vetores utilizados em terapia gênica e exemplos de cada um.....	12
Tabela 2 - Reagentes utilizados na síntese do macroiniciador POEOMA-Br.....	17
Tabela 3 - Reagentes utilizados na síntese de copolímeros POEOMA- <i>b</i> -PDPA-Br.....	18
Tabela 4 - Massa de CuBr ₂ e Me ₆ TREN usadas na síntese de copolímeros POEOMA- <i>b</i> -PDPA-Br com diferentes concentrações de metal.	21
Tabela 5 - Concentrações utilizadas na preparação dos poliplexos	22
Tabela 6 - Conversão de monómero e M_n^{SEC} e D dos macroiniciadores POEOMA-Br sintetizados por ICAR ATRP. Condições de reação: [OEOMA] ₀ /[EBPA] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[TPMA] ₀ /[V-50] ₀ = 40/1/0,04/0,08/0,3, IPA/água 95/5% (v/v); [OEOMA] ₀ = 0,43 M; $T = 56^\circ\text{C}$, $V_{total} = 30\text{ mL}$	26
Tabela 7 - Peso molecular e polidispersividade dos macroiniciadores POEOMA-Br obtidos por ICAR ATRP . Condições de reação: [OEOMA] ₀ /[EBPA] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[TPMA] ₀ /[V-50] ₀ = 40/1/0,04/0,08/0,3; solvente: IPA/Água 95/5 % (v/v); [OEOMA] ₀ = 0,43 M; $T = 56^\circ\text{C}$	29
Tabela 8 - Peso molecular médio numérico e polidispersividade dos copolímeros POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA _x obtidos por SARA ATRP. Condições de reação: [DPA] ₀ /[POEOMA] ₀ /[Na ₂ S ₂ O ₄] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[Me ₆ TREN] ₀ = 100/1/0,5/[CuBr ₂] ₀ /0,2, IPA/água 95/5 (v/v)%, [DPA] ₀ = 1,17 M; $T = 40^\circ\text{C}$, $V_{total} = 2\text{ mL}$, $t = 7\text{h}$	33
Tabela 9 - Peso molecular médio numérico e polidispersividade dos copolímeros POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA _x preparados por SARA ATRP (reprodução de procedimentos experimentais).	33
Tabela 10 – Copolímeros POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA _x preparados por SARA ATRP e usados para o estudo da influência da polidispersividade no desempenho dos polímeros como transportadores de material genético.....	35
Tabela 11 - pK _a de copolímeros POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA _x com M_n semelhante e polidispersividade diferente.	37
Tabela 12 - Resultados da medição do potencial zeta de sRNA livre e poliplexos de POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₃₉ /sRNA e tamanho de partícula dos poliplexos, preparados a pH = 4,5, para diferentes concentrações de copolímeros.	41

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do copolímero em bloco POEOMA- <i>b</i> -PDPA-Br.	15
Figura 2 - Espectros de RMN, em D ₂ O, dos macroiniciadores POEOMA ₃₇ -Br, POEOMA ₃₉ -Br e POEOMA ₁₇ -Br puros, obtidos por ICAR ATRP. Condições de reação: [OEOMA] ₀ /[EBPA] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[TPMA] ₀ /[V-50] ₀ = 40/1/0,04/0,08/0,3; IPA/água 95/5% (v/v); [OEOMA] ₀ = 0,43 M; <i>T</i> = 56 °C.	28
Figura 3 - Cromatogramas (sinal RI normalizado pelo <i>M_n</i>), obtidos por SEC THF, dos macroiniciadores POEOMA-Br selecionados.	29
Figura 4 - a) Gráfico de cinética e b) evolução do peso molecular médio numérico (<i>M_n</i>) e polidispersividade (<i>D</i>), da extensão de cadeia de POEOMA-Br com DPA, usando diferentes rácios [POEOMA-Br] ₀ /[Na ₂ S ₂ O ₄] ₀ . Condições de reação: [DPA] ₀ /[POEOMA] ₀ /[Na ₂ S ₂ O ₄] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[Me ₆ TREN] ₀ = 100/1/0,5/0,1/0,2, IPA/água 95/5 (v/v)%, [DPA] ₀ = 1,17 M; <i>T</i> = 40 °C, <i>V</i> _{total} = 2 mL	31
Figura 5 - a) Gráfico de cinética e b) evolução do peso molecular médio numérico (<i>M_n</i>) e polidispersividade (<i>D</i>), da extensão de cadeia de POEOMA-Br com DPA, usando diferentes [CuBr ₂] ₀ . Condições de reação: [DPA] ₀ /[POEOMA] ₀ /[Na ₂ S ₂ O ₄] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[Me ₆ TREN] ₀ = 100/1/0,5/[CuBr ₂] ₀ /0,2, IPA/água 95/5 (v/v)%, [DPA] ₀ = 1,17 M; <i>T</i> = 40 °C, <i>V</i> _{total} = 2 mL.....	32
Figura 6 – Espectros de ¹ H RMN em CDCl ₃ dos copolímeros POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA _x em estudo.	34
Figura 7 - Cromatogramas(sinal RI normalizado pelo <i>M_n</i> ^{SEC}), obtidos por SEC aquoso, dos copolímeros POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA _x em estudo.....	36
Figura 8 - a) Curva de titração e (b) curva da evolução do grau de protonação em função do pH POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA _x com <i>M_n</i> semelhante e polidispersividade diferente	37
Figura 9 – Gráfico da eficiência de encapsulação em função da concentração de copolímero. ...	38
Figura 10 - Eficiência de encapsulação em função da concentração de copolímero POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA _x (<i>x</i> = 39, 58 ou 74) a pH = 4,5, obtida por eletroforese em gel de agarose. A linha C representa a mobilidade do sRNA livre, a uma concentração de 20 µg/mL, usada como controlo. Os números em cada linha representam a concentração de copolímero em mg/mL.....	40

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Passos envolvidos numa polimerização radicalar	4
Esquema 2 -Equilíbrio dinâmico genérico de RDRP	4
Esquema 3 - Equilíbrio dinâmico em ATRP, RAFT e NMP, onde P_n^\bullet – radical em propagação; M – molécula de monómero; R_1 e R_2 – grupos químicos carbonados; X – halogéneo; L_m – ligante; M_t – metal de transição	5
Esquema 4 - Mecanismo reacional de ATRP	7
Esquema 5 - Passos envolvidos na terapia génica.....	12
Esquema 6 – Exemplo da organização de copolímeros responsivos ao pH (POEOMA- <i>b</i> -PDPA-Br) na presença de material genético.....	16

1. Motivação e objetivos

Os polímeros são macromoléculas formadas por unidades de repetição, monómeros, com características muito interessantes, nomeadamente boas propriedades mecânicas e fácil manuseamento e versatilidade em relação a outro tipo de materiais. Vemos nos dias de hoje, em qualquer ação do dia a dia, produtos derivados de polímeros, como é o exemplo dos plásticos de garrafas, embalagens, os têxteis sintéticos, componentes eletrónicos, entre outros. Recentemente, os polímeros têm sido cada vez mais aplicados na área da saúde onde são utilizados para diferentes fins, desde material e utensílios cirúrgicos (pensos, suturas), membranas de hemodiálise ou oxigenação extracorporal, próteses para o interior de vasos sanguíneos, próteses ósseas, entre outros. (Vroman & Tighzert, 2009) Estes têm-se mostrado também muito relevantes, e intensamente estudados, noutra tipo de aplicação mais específica e de alto valor, inserida na área da saúde, como a entrega de fármacos ou de material genético (terapia génica). Neste tipo de aplicações, é de extrema relevância que o comportamento dos polímeros seja previsível e reprodutível para potenciar a eficácia da estratégia terapêutica. (Maitz, 2015)

De modo a realizar o *fine tuning* das propriedades destes veículos poliméricos, procura-se principalmente o controlo sobre as propriedades que têm alguma influência no resultado da aplicação, como estrutura química, peso molecular, polidispersividade (M_w/M_n ou D), arquitetura e funcionalidade. Isto é possível recorrendo, por exemplo, a técnicas de polimerização radicalar por desativação reversível (RDRP). Existe um vasto número de artigos que avalia a influência da composição química dos polímeros e do peso molecular no seu desempenho como transportadores de material genético. (Jin et al., 2023; Rai et al., 2019; Zu & Gao et al., 2021; Forrest et al., 2003) No entanto, não existe muita informação na literatura sobre o papel da D dos polímeros nesta aplicação. (Wong Y., Sharon Putnam, 2018)

O trabalho de dissertação de mestrado aqui apresentado teve como objetivo principal avaliar a influência da D no desempenho de copolímeros de bloco, nomeadamente, poli(metacrilato de oligo (óxido de etileno) metil éter)-*bloco*-poli(metacrilato de (2-diisopropilamino) etilo) (POEOMA-*b*-PDPA-Br), na entrega de material genético. Para tal, pretendeu-se primeiro desenvolver métodos de RDRP capazes de fornecer polímeros com pesos moleculares semelhantes e D diferentes. Posteriormente, foi pretendido avaliar o comportamento dos polímeros desenvolvidos na sua capacidade de complexação com material genético, sRNA (RNA de baixo peso molecular). (Baptista et al., 2023) Neste sentido, o trabalho desenvolvido contribui para a contínua investigação

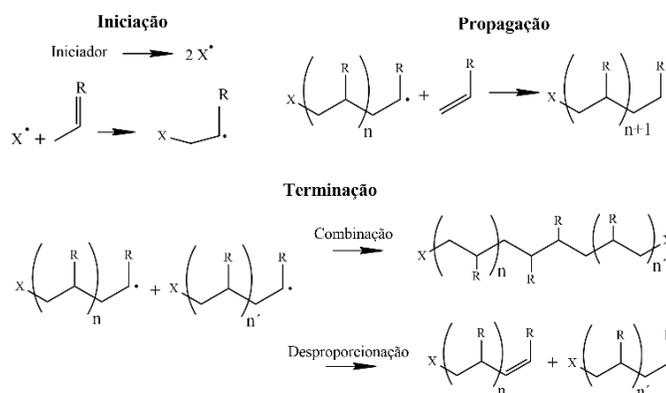
acerca dos vetores poliméricos utilizados em terapia génica, de modo a fornecer ferramentas que assistam à preparação de polímeros mais eficientes.

2. Introdução

Nas últimas três décadas, o trabalho desenvolvido nas polimerizações radiculares tomou um rumo diferente desde as primeiras publicações científicas sobre a criação de uma nova técnica que permite realizar uma reação de polimerização radicalar controlada (Wang & Matyjaszewski, 1995; Greszta et al., 1994), ou seja, com reações de terminação negligenciáveis, para a síntese de novos (co)polímeros com variadas estruturas e propriedades. Desde aí, foram desenvolvidas várias técnicas de polimerização radicalar controlada, atualmente agrupadas num grupo designado RDRP, que têm sido alvo de intensa investigação, pelos resultados muito atrativos no desenvolvimento de polímeros altamente funcionais e com características pré-determinadas.

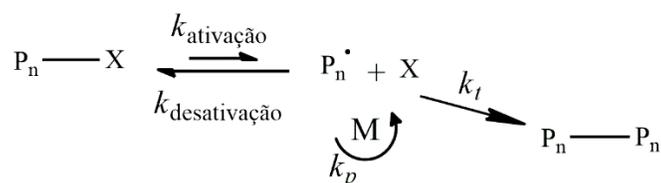
2.1 Polimerização radicalar por desativação reversível (RDRP)

De modo a entender o mecanismo de polimerização por RDRP, é necessário que se entendam todos os mecanismos e passos reacionais de uma polimerização radicalar típica: (i) iniciação, (ii) propagação e (iii) terminação (Esquema 1). No passo de iniciação, através de um estímulo químico-físico (ex.: temperatura, luz, etc.), uma molécula designada de iniciador é decomposta, dando origem à formação de radicais livres. Após ativação desta molécula, os radicais gerados adicionam moléculas de monómero vinílico, promovendo a formação de ligações C–C e de novos radicais capazes de propagar (adicionar unidades monoméricas sucessivamente) e dar origem a cadeias que, na sua fase de crescimento, dão o nome à segunda etapa da polimerização, a propagação. O passo final, terminação, compreende a etapa mais crucial para o *fine tuning* do produto final da polimerização. (Matyjaszewski & Spanswick, 2005) Durante esta etapa podem formar-se as cadeias finais por dois mecanismos diferentes: desproporcionação, gerando-se duas cadeias mais pequenas ou combinação, formando-se uma cadeia mais longa.



Esquema 1 - Passos envolvidos numa polimerização radicalar, adaptado de (Noble & Coote, 2013)

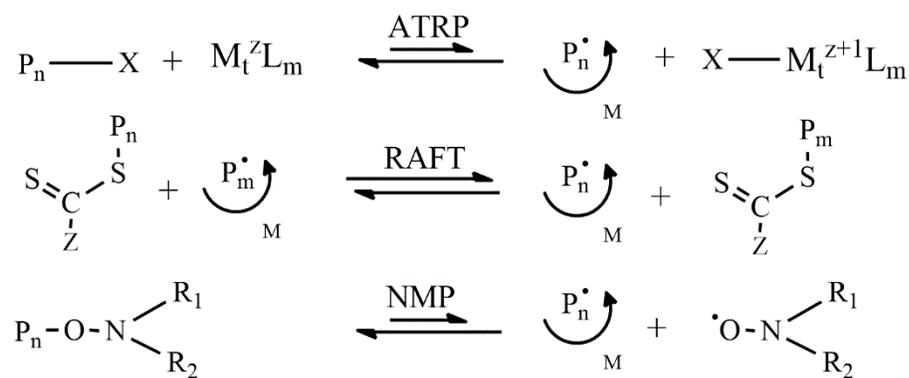
Em sistemas RDRP, o passo de iniciação deve ser o mais rápido, sendo a propagação mais lenta que este, para que todas as cadeias comecem ao mesmo tempo e tenham a mesma probabilidade de crescer. A terminação será o passo mais dependente do mecanismo de desactivação dos radicais em propagação e pretende-se que não aconteça ou que seja insignificante para que se atinja uma reação controlada. É durante o passo de propagação que o controlo é efetuado através do equilíbrio reversível entre espécies dormentes (sem atividade, P_n-X , Esquema 2) e espécies ativas (radicais em propagação, P_n^\bullet , Esquema 2). De modo a evitar que a propagação das cadeias seja dominada pela presença das espécies ativas, o que iria originar cadeias mortas (terminadas) e uma distribuição de pesos moleculares larga ($D \approx 2$) (Whitfield et al., 2020), devido à elevada reatividade dos radicais, é necessário recorrer a mecanismos de desativação das espécies ativas e conduzir o equilíbrio da reação para a predominância de espécies dormentes. (Zhou & Luo, 2016) Deste modo, é possível reduzir a concentração de radicais a um valor tão baixo que evite a ocorrência significativa de reações de terminação. Como consequência, os polímeros obtidos por RDRP apresentam terminais de cadeia ativos, ou seja, podem ser reiniciados numa polimerização subsequente dando origem à formação de copolímeros de bloco.



Esquema 2 - Equilíbrio dinâmico genérico de RDRP, adaptado de (Peng et al., 2013)

A estratégia adotada em todas as técnicas de RDRP é a mesma, manter o equilíbrio dinâmico durante a polimerização, diferendo entre si apenas na maneira e nos compostos usados para mediar

esse equilíbrio. Existem várias técnicas de RDRP reportadas na literatura, sendo que as três mais estudadas são a *nitroxide mediated polymerization* (NMP), *reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization* (RAFT) e *atom transfer radical polymerization* (ATRP) (Esquema 3). (Zhou & Luo, 2016)



Esquema 3 - Equilíbrio dinâmico em ATRP, RAFT e NMP, onde Pn• – radical em propagação; M – molécula de monómero; R1 e R2 – grupos químicos carbonados; X – halogéneo; Lm – ligante; Mt – metal de transição, adaptado de (Noble & Coote, 2013)

Na técnica de NMP, a forma de dar origem às cadeias dormentes é através da adição de radicais estáveis, nomeadamente nitróxidos, que têm capacidade de desativar reversivelmente os radicais em propagação. Para realizar NMP, pode usar-se um iniciador convencional em combinação com um nitróxido ou então uma espécie com dupla função, que tanto produz os radicais que darão início à polimerização, como os radicais estáveis que irão controlar o crescimento das cadeias (nitróxidos). (Lamontagne & Lessard, 2020) A cinética deste tipo de reações é função, tanto, da reatividade das espécies de controlo como também da reatividade do monómero. Um dos aspetos que também influencia a cinética de reação é o rácio entre a quantidade de nitróxidos presentes e de iniciador, tendo esta que ser otimizada para que se atinja o controlo pretendido. As polimerizações por NMP estão associado, regra geral, ao uso de elevadas temperaturas (>100°C) e a reagentes nitróxido dispendiosos e de sínteses complexas, fazendo com que esta técnica seja mais favorável para a produção de certos tipos de polímeros específicos, como por exemplo polímeros mais ácidos, devido à sua compatibilidade com o sistema de polimerização. No entanto, devido aos recentes desenvolvimentos nesta área, nomeadamente a melhoria contínua na síntese de iniciadores nitróxido e no processo de síntese, surgiram novas variantes de NMP que permitiram alargar a gama de monómeros à qual a técnica se adequa e diminuir a temperatura de polimerização para perto da temperatura ambiente. (Audran et al., 2020) Por isto, e pela ausência de recurso a metais como agentes de controlo da polimerização, o que

facilita os processos de purificação, os polímeros produzidos por NMP já têm vindo a ser usados em aplicações tanto biológicas como eletrónicas.

Em RAFT, a polimerização é iniciada do mesmo modo que em NMP, através da interação entre a molécula de monómero e o radical primário obtido pela ativação de um iniciador convencional, formando-se os primeiros radicais para a etapa de propagação. Para o controlo do equilíbrio dinâmico são usados agentes de transferência de cadeia (também designados por agentes RAFT), que são compostos de base tiocarbonilotio. As principais vantagens apontadas a esta técnica são: condições de operação simples permitindo a fácil otimização; pode ser aplicada a uma gama alargada de monómeros (monómeros não ativados, met(acrilamidas), met(acrilatos), estirenos, etc.) e tem a capacidade de dar origem a polímeros com estruturas complexas (multibloco, estrelas, hiper ramificados, reticulados) e altamente funcionais. (Tian et al., 2018)

Na secção seguinte irá ser discutida a técnica de ATRP com maior detalhe, pois foi a técnica estudada neste trabalho.

2.1.1 Polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP)

De todas as técnicas de RDRP, uma das mais utilizadas e que tem sido alvo de maior estudo pela comunidade científica é a técnica de ATRP. Esta técnica tem como princípio base utilizar a substituição atómica para cumprir o objetivo de conduzir o equilíbrio químico para a predominância de cadeias dormentes durante a polimerização. Para isso, são utilizados como agentes de controlo, complexos catalíticos formados por um metal de transição (M_t) (os mais usados são os de base cobre) e um ligante (L), normalmente de base amina.

Relativamente ao mecanismo ATRP, este prende-se com a utilização de iniciadores halogenados (base halogeneto de alquilo), que são ativados através da transferência do átomo de halogéneo para o complexo catalítico no estado mais baixo de oxidação (M_t^m/L), que é designado de ativador (Esquema 4). Com isto, forma-se um radical, capaz de propagar (adicionar unidades de monómero) e o catalisador no estado de oxidação mais elevado (M_t^{m+1}/L), que tem a função de desativar os radicais em propagação. Assim, o controlo sobre a polimerização em ATRP é mantido através deste equilíbrio oxidação-redução estabelecido. (Matyjaszewski, 2012)

terminação são suprimidos mais eficazmente, o que leva a um melhor controlo. Pode então subdividir-se a técnica de ATRP em diferentes tipos de sistema, conforme o tipo de mecanismo/agente redutor utilizado na regeneração do catalisador: ativadores regenerados por transferência de eletrão (ARGET ATRP) (Jakubowski et al., 2006); iniciadores para regeneração contínua de ativador (ICAR ATRP) (Matyjaszewski et al., 2006), ativador suplementar e agente redutor (SARA ATRP) (Dadashi-Silab & Matyjaszewski, 2018), ATRP mediado por eletroquímica (*e*-ATRP) (Chmielarz et al., 2017) e ATRP induzido por ação de luz (*photo*-ATRP). (Konkolewicz et al., 2012) Existe também uma técnica de ATRP que usa fotocatalisadores orgânicos, livres de metais. (Hola et al., 2021)

Em ARGET ATRP, os agentes redutores mais referenciados são espécies como por exemplo o ácido ascórbico ou a glucose, que permitem que sejam utilizadas quantidades menores de catalisador, devido à constante regeneração do mesmo, como referido anteriormente. (Jakubowski et al., 2006; Borsari et al., 2021) Esta torna-se a vantagem principal das variações de ATRP, visto que elevadas concentrações de catalisador metálico podem dificultar a purificação dos polímeros ou comprometer o seu uso em áreas como eletrónica ou aplicações biomédicas. (Lamontagne & Lessard, 2020) Na técnica de ICAR ATRP, geralmente são utilizados iniciadores radiculares convencionais (ex.: compostos azo como o V-50 (2,2'-azobis(2-metilpropionamidina))) que necessitam de temperaturas geralmente altas para a sua ativação, constituindo assim uma desvantagem desta técnica. Outra desvantagem é o facto destes iniciadores poderem dar origem a cadeias poliméricas indesejadas, devido à sua constante formação de radicais livres. (Mohammad Rabea & Zhu, 2014) Deste modo, é muito importante que a concentração de iniciador radicalar convencional a utilizar seja adequada. No que diz respeito à técnica de SARA ATRP, o caso mais particular que existe é a utilização de Cu^0 como agente redutor. O principal papel que desempenha é de reduzir o complexo desativador, regenerando assim o ativador, embora também possa ativar espécies dormentes, mas em menor extensão do que o ativador (M_i^{m+1}/L). (Lorandi et al., 2022) Diferentes sulfitos inorgânicos (ex: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) têm sido também reportados como agentes SARA eficientes, tanto em meio orgânico como em meio aquoso. (Góis et al., 2018, Abreu et al., 2012, 2017) No caso de *e*-ATRP, é utilizada corrente elétrica para gerar uma diferença de potencial que funciona como agente redutor. (Chmielarz et al., 2017) Já em *photo*-ATRP, a regeneração do ativador dá-se através de irradiação por luz, a comprimentos de onda selecionados, sendo possível também usar luz natural. (Konkolewicz et al., 2012) A utilização de luz também se aplica ao uso

de fotocatalisadores orgânicos, na transformação dos mesmos em agentes redutores, na técnica de ATRP na ausência de metais. (Soly et al., 2022; Zaborniak & Chmielarz, 2022)

A técnica de ATRP é das mais utilizadas para síntese de polímeros com alta funcionalidade, arquiteturas e propriedades específicas e pré-determinadas, como, por exemplo, o peso molecular e a polidispersividade. O recurso a ATRP contribui para a fácil obtenção deste tipo de produtos visto ser uma técnica com condições simples de implementação (tempo, reagentes e procedimento), é compatível com solventes aquosos e orgânicos, sistemas heterogêneos e em solução e com utilização de baixa concentração de metais, contribuindo para uma síntese mais verde e amiga do ambiente.

2.2 Polidispersividade e controlo por RDRP

Um dos parâmetros de maior relevância neste trabalho é a polidispersividade. Como referido anteriormente, este é um parâmetro que quantifica a distribuição dos pesos moleculares das cadeias poliméricas e é representativo do quociente entre o peso molecular médio em massa (M_w – equação 1) e peso molecular médio numérico (M_n – equação 2). Valores de polidispersividade mais próximos de 1 são indicativos de cadeias poliméricas semelhantes entre si (que cresceram ao mesmo ritmo), enquanto que valores mais próximos de 2 representam uma distribuição de pesos moleculares mais larga ($D = M_w/M_n$ – equação 3), onde nem todas as cadeias cresceram ao mesmo ritmo e têm pesos diferentes entre si. Como tal, através do valor da polidispersividade, é possível perceber o nível de homogeneidade das cadeias de um dado polímero.

$$\overline{M}_w = \frac{\sum w_i \cdot M_i}{w_i} \quad (1)$$

$$\overline{M}_n = \frac{\sum n_i \cdot M_i}{n_i} \quad (2)$$

$$D = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad (3)$$

Em RDRP, a busca pela obtenção de distribuições de pesos moleculares monomodais, simétricas e estreitas sempre foi um objetivo, visto representar o controlo ocorrido durante a polimerização. Contudo, tem-se verificado que este parâmetro influencia as propriedades e funcionalidades dos polímeros e nem sempre uma polidispersividade baixa corresponde a um

melhor desempenho do polímero numa determinada aplicação. (Doncom et al., 2017a) Em termos de propriedades físicas os polímeros podem sofrer alterações na sua reologia, comportamento mecânico e ainda na estabilidade térmica. Em casos mais particulares como copolímeros anfífilicos, a polidispersividade pode influenciar características como a capacidade de *self-assembly* (auto organização em nanoestruturas) e o tamanho das nanoestruturas originadas, tendo isto impacto na aplicação do produto final. (Whitfield et al., 2019, Gentekos et al., 2019) Uma forma mais simples e rudimentar de provocar a variação da polidispersividade é através da mistura (*blending*) de vários polímeros que apresentam polidispersividades diferentes, sendo necessário o estudo prévio do rácio ideal entre polímeros a ser utilizado. Autores verificaram que a combinação de diferentes polímeros, com diferentes polidispersividades, resulta num novo polímero com um novo valor de polidispersividade e, potencialmente, com uma distribuição de pesos moleculares mais simétrica do que a apresentada pelos polímero individuais. (Corrigan et al., 2018)

Fazendo uso das potencialidades das técnicas de RDRP, várias alternativas têm vindo a ser desenvolvidas para fazer variar a polidispersividade dos polímeros de maneira controlada e previsível, algumas destas com recurso a estímulos físico-químicos e outras a espécies químicas suplementares ao sistema reacional que influenciam o decorrer global da polimerização. (Whitfield et al., 2019) Por exemplo, através da adição de iniciador (*feeding*) ao longo da polimerização por NMP, é possível provocar variações na polidispersividade devido à constante formação de cadeias poliméricas ao longo da reação. Em condições ótimas, e adicionando um caudal de solução de iniciador variável ao longo da polimerização, foi possível alterar a forma da distribuição de pesos moleculares e obter distribuições mais simétricas. (Gentekos et al., 2016) Outra estratégia usada, em técnicas de ATRP, consiste na variação da concentração de catalisador. (Brar & Kaur, 2006; Queffelec et al., 2000) Esta tem sido alvo de intenso estudo na literatura, por ser muito atrativa para a aplicação dos (co)polímeros desenvolvidos em áreas onde a presença de contaminantes metálicos deve ser evitada, como componentes eletrónicos ou biomateriais. Por exemplo, modificando a concentração de cobre e usando a adição de iniciador em simultâneo, foi possível preparar polímeros altamente funcionais e com uma gama de polidispersividades alargada ($\mathcal{D} = [1,08 - 1,75]$) por *photo*-ATRP. (Marathianos et al., 2019) Por fim, ainda existe a possibilidade de adicionar à polimerização espécies químicas, como por exemplo fenilhidrazina, responsáveis por terminar irreversivelmente cadeias poliméricas, originando polímeros com uma gama de polidispersividades alargada ($\mathcal{D} = [1,08 - 1,80]$). (Yadav V. et al., 2018)

2.3 Terapia génica

A terapia génica é uma técnica que tem representado um grande avanço e inovação nos tratamentos disponíveis na medicina, que consiste na procura do tratamento, prevenção ou cura das mais diversas doenças. Esta técnica consiste na adição ou substituição de gene(s) em células e ou tecidos afetados. (Zhang & Zhi-Ying, 2023) Esta abordagem terapêutica é maioritariamente utilizada em doenças para as quais não existem outras estratégias totalmente eficazes para a sua cura, como é o caso do cancro. (Y. K. Sung & Kim, 2019)

Com recurso à manipulação genética, podem existir diferentes vias para desempenhar esta terapia:

- Substituição de uma porção genética com mutações por uma sequência correta;
- Eliminação da expressão do gene com mutação;
- Introdução de novos genes com função de proteção da expressão dos alterados.

As doenças que podem ser alvo de tratamento genético têm maioritariamente como ponto de partida malformações genéticas que resultam no mau funcionamento de células ou órgãos, levando por exemplo, a alterações na expressão génica, que podem provocar um aumento da expressão de oncogenes ou diminuição da expressão de genes supressores de tumor, originando um cancro. (Gustafson et al., 2023) O cancro representa uma das doenças onde mais se tem investigado o uso da terapia génica, quer para a sua prevenção ou para o seu tratamento, visto ser cada vez mais uma doença emergente globalmente. (Y. K. Sung & Kim, 2019) Dados que remontam a 2020 mostram que 19,3 milhões de novos casos ocorreram nesse ano, dos quais 51% resultaram em fatalidades. (H. Sung et al., 2021) O cancro tem origem numa mal formação celular, podendo dever-se a erros no seu ciclo de reprodução, danos em material genético ou causas hereditárias. A multiplicação de células com estas malformações pode dar origem a um aglomerado denominado tumor. (National Cancer Institute, 2021) Recentemente tem-se intensificado o estudo acerca da eficácia de diferentes terapêuticas na tentativa de alcance de elevada especificidade e prevenção de complicações como, por exemplo, a fibrose. É possível encontrar na literatura, sistemas de DNA plasmídeo complexado com polietilenoimina no tratamento de células cancerígenas pancreáticas ou ainda a utilização de vírus como citomegalovírus para promover a expressão dos genes terapêuticos ao alvo específico. (Barbey et al., 2023; Landolt et al., 2022; Montañó-Samaniego et al., 2020)

A eficácia da terapia génica nas mais diversas doenças está diretamente associada ao transporte de ácidos nucleicos, nomeadamente DNA ou RNA, às células alvo (Esquema 5). É de extrema relevância que os ácidos nucleicos permaneçam de forma íntegra e estável nos veículos de transporte, denominados vetores, e que estes sejam eficazes e assegurem uma entrega específica dos genes no local pretendido. Assim, para se alcançar uma terapia adequada e eficaz, a escolha do vetor a utilizar representa um dos principais pontos a considerar, isto porque devido às particularidades dos diferentes vetores existentes, no interior do organismo, poderão apresentar diferentes eficácias e respostas imunogénicas. Deste modo, a compatibilidade/afinidade química com a estrutura celular permite uma maior capacidade de transfeção, podendo reduzir a toxicidade associada. (L.Zhou et al.,2022)



Esquema 5 - Passos envolvidos na terapia génica, Adaptado de (Ramamoorth & Narvekar, 2015)

Existem duas grandes famílias de vetores, virais e não-virais (Tabela 1).

Tabela 1 - Tipos de vetores utilizados em terapia génica e exemplos de cada um (Y. K. Sung & Kim, 2019)

Vetores virais	Vetores não-virais
Retrovírus	Partículas Inorgânicas
Adenovírus	Cromossomas
Poxvírus	Plasmídeos
Herpes vírus	(Co)polímeros
-	Lipossomas

Os vetores virais têm por base a utilização de famílias de vírus conhecidas para efetuar o transporte das biomacromoléculas sendo uma das vantagens o facto da função destes ser incorporar o seu genoma dentro das células do hospedeiro e usar a maquinaria celular para reproduzir o seu material genético. Estes não estão sujeitos ao efeito de enzimas celulares que degradam material genético, no entanto, estão sujeitos à resposta imunitária do organismo e pode comprometer a integridade do material genético que carregam, o que constitui uma desvantagem da sua utilização. Também têm menor capacidade de identificação das células-alvo (*targeting*). Dependendo da

família de vírus, existem vetores virais de base DNA e outros de base RNA. (L. Zhou et al., 2022) Os vetores não-virais (ex.: polímeros, lipossomas, etc.) surgem das suas vantagens sobre os virais na capacidade de mascarar ou diminuir a resposta imunitária do organismo e obter melhor *targeting* dos sistemas de entrega tornando-o mais específico e seguro para o alvo. A estrutura deste tipo de vetores também influencia a proteção do material genético da sua degradação, sendo um dos objetivos dos vetores, manter a molécula estável. Vetores não virais de base lipídica são atrativos pela sua semelhança aos componentes da barreira celular, sendo estes apontados como bons protetores do material genético. (Rai et al., 2019) Com a descoberta deste tipo de vetores, a tentativa de sintetizar vetores com comportamento semelhante deu oportunidade ao estudo da eficácia do uso de (co)polímeros catiónicos. Este tipo de vetores são de fácil obtenção e síntese e permitem construir o vetor com características mais específicas e até incorporar biomoléculas na sua estrutura para os funcionalizar, facilitando o *targeting*. (Ramamoorth & Narvekar, 2015)

De entre os tipos de vetores não virais aqueles que se tem mostrado mais interessantes ao critério da investigação, são os polímeros. Os polímeros são uma família versátil com processos de síntese que permitem a fácil manipulação de propriedades dando origem a vetores com a funcionalização e arquitetura pretendida. Os mais estudados e utilizados em estudos clínicos são os polímeros catiónicos com grupos de base amina, pela sua facilidade de complexação com o material genético, condensando-o e tornando-o estável através das interações electrostáticas entre os grupos protonados (grupos amina, N) do polímero e as cargas negativas de DNA/RNA (grupos fosfato, P). Estas ligações depreendem um parâmetro importante na avaliação da eficácia destes vetores, o rácio N:P onde é descrito que valores acima de 2 representam a produção de poliplexos (complexo vetor-material genético) de tamanho adequado e estáveis. (L. Zhou et al., 2022) Quando os vetores poliméricos entram em contacto com o meio fisiológico, o objetivo é chegar às células-alvo, interagir com a superfície celular e através do processo de transfeção celular entregar eficazmente o material genético. Através da funcionalização das nanoestruturas sintetizadas é possível melhorar a capacidade de *targeting* e de transfeção. Por exemplo, podem ser incorporadas moléculas (peptídeos, glicoproteínas, anticorpos) que não só permitem o alcance e interação dos vetores com as células-alvo de forma mais eficaz, como também garantem proteção do material genético e reduzem a citotoxicidade do sistema. Ainda assim, é necessário garantir uma resposta imunitária inespecífica inexistente ou diminuta. Isso poderá ser conseguido geralmente com a

incorporação de segmentos de polietilenoglicol (PEG), que é capaz de mascarar essa resposta e garantir uma eliminação mais rápida dos vetores da corrente sanguínea. (Zolnik et al., 2010)

Sabe-se que a composição química e arquitetura dos polímeros influenciam a sua capacidade da transfeção. (Rai et al., 2019; L. Zhou et al., 2022) Outro parâmetro que também pode influenciar o comportamento dos polímeros, como vetores de material genético é a polidispersividade, objeto de estudo deste trabalho. Não existem na literatura muitos estudos realizados acerca desta influência, embora esteja reportado um estudo sobre o seu efeito na transfeção celular de políplexos polimetacriloxisuccinimida/DNA, [poli(MAOS)]/DNA. (Wong Y., Sharon Putnam, 2018) Neste estudo, polímeros com peso molecular médio semelhante ($M_n = 30k$ ou $50k$) e polidispersividade diferente ($\mathcal{D} = 1,3$ e $2,0$) foram avaliados e os autores verificaram que os políplexos formados pelos polímeros com polidispersividade mais elevada eram mais estáveis. Por outro lado, não afirmam haver correlação direta entre a polidispersividade e a capacidade de transfeção, visto não existir uma grande diferença nos resultados obtidos.

O *design* deste tipo de vetores poliméricos é de extrema relevância, sendo cada vez mais procuradas vias de síntese que permitam atingir o equilíbrio entre estrutura e propriedades dos polímeros desenvolvidos, garantindo a alta funcionalidade das cadeias. Pretende-se que os vetores sintetizados consigam ser eficazes no transporte, apresentem elevada eficiência de complexação, transfeção celular e que apresentem baixa toxicidade. (Yin et al., 2014) De entre vários fatores, são apontados como os mais importantes, o tipo de grupos químicos que os polímeros incorporam e a arquitetura dos polímeros. De modo a obter vetores poliméricos que assistam todas estas características existem disponíveis técnicas de síntese como a utilizada neste trabalho, SARA ATRP, sendo possível preparar vetores poliméricos catiónicos com distribuições de peso molecular e pesos moleculares adequados, quando aplicados à terapia génica de células cancerígenas. Na secção seguinte irá ser descrito o copolímero utilizado como vetor neste trabalho em pormenor.

2.4 Copolímero poli(metacrilato de oligo (óxido de etileno) metil éter)-*bloco*-poli(metacrilato de (2-diisopropilamino) etilo) (POEOMA-*b*-PDPA)

O copolímero selecionado para estudo neste trabalho (POEOMA-*b*-PDPA-Br) tem como base resultados anteriormente publicados pelo grupo de investigação, que mostram que esta estrutura apresenta vantagens em relação a outros copolímeros utilizados como vetores de entrega de material genético. (Baptista et al., 2023) Este é um copolímero em bloco constituído por dois

segmentos distintos POEOMA e PDPA, que foi obtido por síntese através de SARA ATRP e ICAR ATRP, respetivamente. Este é um método de síntese, conhecido por permitir um grande controlo sobre as propriedades dos polímeros pelos motivos já apresentados anteriormente e que permite a síntese de polímeros altamente funcionais. (Góis et al., 2018) Neste trabalho, pretende-se obter vários copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br com peso molecular semelhante e diferentes polidispersividades, *D*.

Neste tipo de aplicações é procurado muitas vezes a utilização de polímeros com segmentos de polietilenoglicol, PEG, devido à sua capacidade de mascarar os sistemas de entrega quando estes estão sujeitos ao meio fisiológico, evitando uma resposta do sistema imunitário à presença dos mesmos e aumento a sua estabilidade no meio. É, portanto, parte integrante do monómero utilizado neste copolímero, oligo (óxido de etileno) metil éter) metacrilato, OEOMA, sendo este o segmento hidrofílico. A incorporação do segmento de PDPA, segmento hidrofóbico, pretende conferir um carácter ionizável ao copolímero, que é dado pela presença dos grupos amina, em particular aminas terciárias. A baixo pH, este segmento encontra-se protonado ($pK_a \sim 6.5$), permitindo assim a complexação de material genético através de interações electrostáticas. (Baptista et al., 2023)

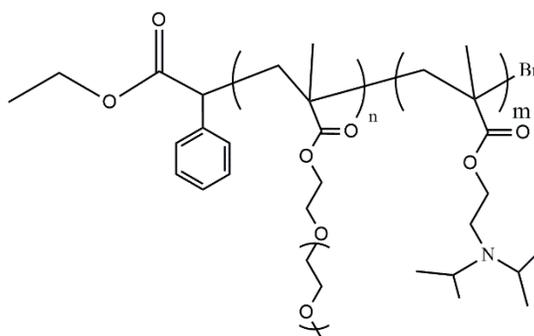
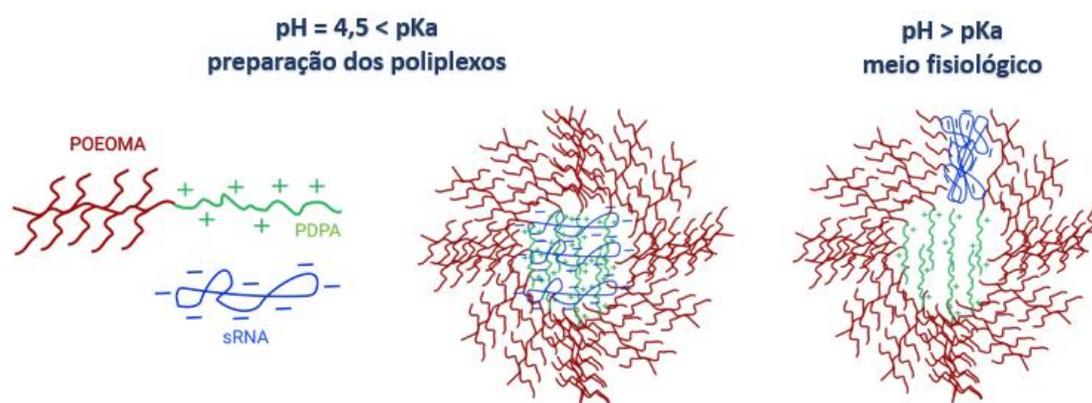


Figura 1 - Estrutura química do copolímero em bloco POEOMA-*b*-PDPA-Br.

O copolímero POEOMA-*b*-PDPA-Br (Figura 1) apresenta assim uma região de transição hidrofílica/hidrofóbica por volta de $pH = 6,5$, sendo hidrofílico quando o pH está abaixo desse valor, devido à protonação dos grupos amina do PDPA, e anfifílico quando o pH está acima do seu valor de pK_a , devido desionização do PDPA tornando este segmento hidrofóbico (Esquema 6). (Baptista et al., 2023) Este mecanismo é o responsável pela origem dos nanosistemas complexados de polímero-ácido nucleico, conhecidos por poliplexos. (Doncom et al., 2017b)



Esquema 6 – Exemplo da organização de copolímeros responsivos ao pH (POEOMA-*b*-PDPA-Br) na presença de material genético.

A preparação dos poliplexos polímero-ácido nucleico é feita a um pH inferior ao pKa do copolímero (Esquema 6), ao qual a maioria dos grupos amina estão protonados e disponíveis para interagir com o material genético, através de interações eletrostáticas, formando poliplexos. Posteriormente, aquando da sua aplicação, estes são sujeitos ao meio fisiológico com pH mais alto, onde a desprotonação dos grupos amina desencadeia a libertação do material genético. O pKa é então o valor de pH que representa esta região de transição do comportamento dos grupos amina, sendo que, ao valor de pH igual ao pKa , 50% dos grupos amina estão protonados. Devido aos resultados promissores obtidos, são atualmente produzidos mais estudos em torno dos copolímeros de POEOMA-*b*-PDPA-Br para este tipo de aplicação, procurando-se formas de otimização tanto da complexação com o material genético, como da eficiência de entrega. (Baptista et al., 2023; Góis et al., 2014)

3. Secção experimental

3.1 Materiais

Foram utilizados, para a análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H RMN), água deuterada (D_2O , Aldrich) e clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Cambridge Isotope Laboratories). Os reagentes utilizados na síntese dos polímeros, bem como a sua função, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Reagentes utilizados na síntese do macroiniciador POEOMA-Br.

Reagente	Abreviatura	Função	Fornecedor
Metacrilato de poli (oligo (óxido de etileno) metil éter) ($M_n = 500$ g/mol)	OEOMA	Monómero	Aldrich
α -bromofenilacetato de etilo	EBPA	Iniciador	Alfa Aesar
tris[(2-piridil)metil]amina	TPMA	Ligante	*
2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) dihidroclorato	V-50	Agente redutor	Aldrich
Brometo de cobre (II)	CuBr_2	Metal de transição	Aldrich
Água MilliQ	H_2O	Solvente	Millipore
Isopropanol	IPA	Solvente	Fisher Scientific

* Sintetizado

Os reagentes utilizados na síntese dos polímeros foram os mesmos em todas as experiências realizadas e usados como recebidos, à excepção do monómero. Este (OEOMA) foi passado por uma coluna de alumina, antes da polimerização, para remoção do inibidor. O ligante TPMA foi previamente sintetizado por elementos do grupo de investigação de acordo com a literatura.(Tyeklar, 1993) Água MilliQ foi obtida por osmose inversa.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na síntese de copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br

Reagente	Abreviatura	Função	Fornecedor
Poli [metacrilato de poli (oligo (óxido de etileno) metil éter)]	POEOMA-Br	Macroiniciador	-
Metacrilato de 2-(diisopropilamino) etilo	DPA	Monómero	Scientific Polymer Products
Tris [2-(dimetilamino)etil]amina	Me₆TREN	Ligante	Alfa Aesar
Ditionito de sódio	Na₂S₂O₄	Agente SARA	ACROS Organics
Brometo de cobre (II)	CuBr₂	Metal de transição	Aldrich
Água MilliQ	H₂O	Solvente	Millipore
Isopropanol	IPA	Solvente	Fisher Scientific

Os reagentes utilizados na síntese dos copolímeros foram os mesmos em todas as experiências realizadas e usados como recebidos, à exceção do monómero. Este (DPA) foi passado por uma coluna de alumina, antes da polimerização, para remoção do inibidor. O processo de síntese de POEOMA-Br será descrito na secção seguinte (4.1), seguindo a literatura. (Baptista et al., 2023) Água MilliQ foi obtida por osmose inversa.

3.2 Métodos

3.2.1 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

As amostras de POEOMA-Br (macroiniciador) foram analisadas por SEC utilizado tetrahydrofurano (THF) como eluente, com caudal de injeção de 1 mL/min a 30 °C. O equipamento SEC possui o seguinte conjunto de colunas: PL 10 mm (coluna de guarda, 50 × 7.5 mm²), seguida de Viscotek T200 (6 μm), Viscotek T3000 (6 μm) e Viscotek LT4000L (7 μm). As amostras foram preparadas com concentração de 3 mg/mL e foram previamente filtradas com filtros de seringa com membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de poro com diâmetro de 0,2 μm. O peso molecular do POEOMA-Br foi determinado por calibração TriSEC (três detetores: RALLS, IV-DP e RI)

usando $dn/dc = 0.0717$ (Góis et al., 2018) e um padrão de poliestireno, com recurso ao software Omniseq (versão 4.1.6).

Para análise das amostras de copolímero em bloco POEOMA-*b*-PDPA-Br, foi utilizado o equipamento de SEC com eluente aquoso a $\text{pH} = 3$, com caudal de injeção de 0,5 mL/min a 40 °C. O equipamento possui o seguinte conjunto de colunas: Shodex OHpak SB-G (coluna de guarda), seguida de OHpak SB-802.5HQ e OHpak SB-804HQ. As amostras foram preparadas com concentração de 3 mg/mL e foram previamente filtradas em filtros de seringa com membrana de polietileno tereftalato (PET) de poro com diâmetro de 0,45 μm . O peso molecular dos copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br foi determinado por calibração convencional (detetor RI) com padrões de polietilenoglicol (PEG), com recurso ao software Omniseq (versão 4.1.6).

3.2.2 Ressonância magnética nuclear

As amostras de POEOMA-Br foram analisadas em D_2O e as amostras de copolímero POEOMA-*b*-PDPA-Br foram analisadas em CDCl_3 , num espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz, com uma sonda de deteção de ressonância a 5mm, TXI triple. Foram integrados os sinais de monómero e polímero de amostras de reação, para determinação da conversão de monómero durante as polimerizações, e de amostras de polímeros puros, para confirmação da estrutura química e determinação do peso molecular médio numérico (M_n^{RMN}), utilizando o *software* MestreReNova (versão 12.0.0.20080).

3.3 Procedimentos de síntese

As condições de reação selecionadas foram adquiridas de trabalhos anteriormente reportados pelo grupo de investigação. (Baptista et al., 2023; Góis et al., 2014)

3.3.1 Síntese de macroiniciador POEOMA-Br

A síntese de POEOMA-Br foi realizada por ICAR ATRP com recurso a V-50 como agente redutor. Em primeiro lugar foram colocados 54 μL (75mg, 0,3 mmol) de EBPA num reator *Schlenk*, e de seguida foi adicionado o monómero, OEOMA (6g, 12 mmol) ao reator. Posteriormente, foram adicionados ao reator, CuBr_2 (2,68 mg, 0,012 mmol), V-50 (24,9 mg, 0,09 mmol), TPMA (6,96 mg, 0,02 mmol), água (18,70 mL) e IPA (9,20 mL). O reator foi fechado utilizando uma tampa de vidro e a mistura reacional foi borbulhada com azoto durante um período de tempo pré-definido para remoção do oxigénio presente. O reator foi colocado num banho de óleo, à temperatura de 56

°C, e a reação foi conduzida durante um período de tempo pré-definido. No final de reação, foram analisadas amostras da mistura reacional por SEC e por espectroscopia de ^1H RMN, para determinação de peso molecular e conversão de monómero, respetivamente. Para recuperação do polímero puro, a mistura reacional foi dialisada contra água destilada (membrana com cut-off = 3500) e posteriormente liofilizada.

Na síntese de macroiniciador POEOMA-Br, foram testados vários tempos de reação (100, 110 e 120 min) e tempo de borbulhamento com azoto (30, 40 e 60 min), como explicado na secção discussão de resultados.

3.3.2 Síntese de copolímeros de bloco POEOMA-*b*-PDPA-Br

A síntese de POEOMA-*b*-PDPA-Br foi realizada por SARA ATRP com recurso a ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) como agente SARA. Primeiramente, o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ foi adicionado a um reator *Schlenk* (2,4 mg, 11,7 μmol ou 1,44 mg, 7,03 μmol). De seguida, foi preparada uma solução-mãe de catalisador com CuBr_2 (5,2 mg, 23,4 μmol) e Me_6TREN (13,6 mg, 46,8 μmol) em 1 mL de água MilliQ. Num *vial* de vidro foi preparada uma solução de POEOMA-Br (443 mg, 234 μmol), DPA (500 mg, 2,34 mmol), 100 μL da solução-mãe de catalisador em IPA (1,8 mL). Ambos os sistemas, *vial* e reator *Schlenk*, foram selados com um *stopper* de borracha e purgados com azoto durante 30 min, para remoção do oxigénio presente. A solução contida no *vial* foi transferida para o reator *Schlenk*, por meio de seringa e agulha sob azoto. O reator foi colocado num banho de água, à temperatura de 40 °C, e a reação foi conduzida durante um período de tempo pré-definido. Várias amostras foram recolhidas ao longo da reação, sob atmosfera inerte de azoto, e analisadas por SEC e por espectroscopia de ^1H RMN, para determinação de peso molecular e conversão de monómero, respetivamente. Para recuperação do polímero puro, a mistura reacional foi dialisada contra água destilada (membrana com cut-off = 1000) e posteriormente liofilizada.

Foram ainda sintetizados polímeros com condições diferentes de reação, nomeadamente alterando a concentração de catalisador. O método de síntese manteve-se o mesmo e foram apenas alteradas as quantidades de CuBr_2 e Me_6TREN usadas na preparação da solução-mãe de catalisador. (Tabela 4)

Tabela 4 - Massa de CuBr₂ e Me₆TREN usadas na síntese de copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br com diferentes concentrações de metal

[CuBr ₂] ₀ (ppm)*	CuBr ₂ (mg)	Me ₆ TREN (mg)
1500	7,9	20,4
1000	5,2	13,6
750	3,9	10,2
500	2,6	6,8
250	1,3	3,4

* Relativo à concentração de monómero (DPA)

3.4 Determinação do p*K*_a

A determinação do valor de p*K*_a dos copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br foi efetuada por titulação. Em primeiro lugar dissolveu-se o copolímero puro (20 mg) em água MilliQ (20 mL) e a mistura foi colocada num banho de água a 25°C numa placa sob agitação, com monitorização contínua do valor de pH. Posteriormente foi adicionado HCl (0,1 M aq.) para ajuste de pH até 2. De seguida, a mistura foi titulada com adição de alíquotas de 25µL de NaOH (0,1 M aq.) e a evolução do valor de pH em função do volume de base adicionado foi registada. Posteriormente foram obtidas as curvas de titulação e do grau de protonação para determinação do p*K*_a.

3.5 Preparação dos poliplexos com sRNA

As seguintes secções (de 3.5 a 3.8) foram procedimentos efetuados por investigadores da Universidade da Beira Interior (UBI) de acordo com a literatura. (Baptista et al., 2023)

Os poliplexos preparados foram obtidos com base na interação entre os grupos catiónicos dos copolímeros (grupos amina protonados) e os grupos aniónicos dos ácidos nucleicos (grupo fosfato), sRNA. Foram testadas para o efeito da encapsulação diferentes concentrações de copolímeros (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentrações utilizadas na preparação dos políplexos

[POEOMA- <i>b</i> -PDPA-Br] (mg/mL)
1,0
0,5
0,25
0,1
0,025

Todos estas soluções foram preparadas a partir de 1 mg/mL em solução de acetato de sódio a 0,1M. Esta solução mãe deu origem às restantes por diluições sucessivas. A solução de sRNA foi preparada a 20 µg/mL e utilizada para todas as amostras. Foram adicionados, gota-a-gota, 100 µL da solução de copolímero a 400 µL da solução anterior, sob agitação em vortéx. Para a recuperação dos complexos, estes estiveram à temperatura ambiente durante 15 min, seguido de um processo de centrifugação a 15,000g durante 20 min a 4°C.

3.6 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE, equação 4) foi determinada com base na quantidade de ácidos nucleicos que restavam no sobrenadante após a centrifugação. Quantidade essa determinada com recurso à determinação da absorvância a um comprimento de onda de 260 nm. O cálculo da eficiência de encapsulação tem por base a seguinte fórmula:

$$EE(\%) = \frac{[(RNA_{total} - RNA_{sobrenadante})]}{RNA_{total}} \cdot 100 \quad (4)$$

3.7 Determinação do tamanho de partículas e potencial zeta

Os tamanhos das partículas obtidas foram determinados com recurso à técnica de DLS (*Dynamic Light Scattering*), utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Os políplexos foram previamente diluídos em 800 µL de água Milli-Q como meio disperso e posteriormente incubados por 15 min à temperatura ambiente (~25°C). De seguida procedeu-se à determinação dos tamanhos, em modo automático e com um ângulo de deteção de luz espalhada de 173°.

Do mesmo modo que preparados para a determinação dos tamanhos de partícula, os políplexos foram preparados para a determinação do potencial zeta, com recurso à técnica de ELS (*Electrophoretic Light Scattering*). Para além disso, foi ainda tendo sido realizado uma medição do potencial zeta do sRNA, como controlo. Através do Zetasizer Nano ZS foram analisadas as cargas de superfície dos políplexos, através do uso de uma *zeta dip cell*, a uma temperatura de 25°C e utilizando constante de Henry [F(Ka)1,5] e modelos de Smoluchowsky. Os valores médios de tamanho e potencial zeta foram calculados a partir de dados de três medições \pm desvio padrão. O tamanho de partícula relatado foi determinado como uma distribuição de intensidade por análise cumulativa no software Malvern PCS 6.20.

3.8 Eletroforese em gel de Agarose

O processo de eletroforese foi efetuado num sistema horizontal utilizando 0,8% de gel de agarose com adição de *Green Safe* a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para identificação visual do sRNA no sobrenadante. A corrida do gel foi realizada a 120 volts durante 40 min, numa solução tampão de tris-acetato-EDTA (TAE, com a seguinte composição, 40 mM Tris base, 20mM de ácido acético e 1mM Ácido etilendiaminotetracético, a pH 8). Os géis foram visualizados sob incidência de luz ultravioleta.

4. Resultados e Discussão

O principal objetivo deste trabalho centrou-se na avaliação da influência da polidispersividade de polímeros na sua função como vetores de transporte e entrega de material genético. Para tal, escolheu preparar-se copolímeros em bloco POEOMA-*b*-PDPA-Br, por haver conhecimento prévio, no grupo de investigação, sobre a síntese dos mesmos por SARA ATRP (Góis et al., 2018) e sobre a preparação e caracterização dos poliplexos formados com material genético (sRNA). (Baptista et al., 2023) O ponto de partida foi a síntese dos copolímeros em bloco responsivos ao pH, com peso molecular semelhante e polidispersividade diferente, para posterior caracterização, com vista à sua aplicação como vetores de entrega de material genético para terapia génica aplicada ao tratamento do cancro.

O trabalho laboratorial foi dividido em três principais etapas:

1. **Síntese de macroiniciadores POEOMA-Br:** através da técnica de ICAR ATRP, com posterior caracterização (SEC e RMN) e purificação dos polímeros. Foram efetuados testes para otimização das condições de reação e foram sintetizados 3 lotes de macroiniciador POEOMA-Br, posteriormente utilizados para a síntese dos copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br;
2. **Síntese de copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br:** através da técnica de SARA ATRP, com posterior caracterização (SEC e RMN) e purificação dos copolímeros. Foram adotadas duas estratégias para obter lotes de copolímeros com pesos moleculares semelhantes e polidispersividades diferentes: (i) variação da concentração de agente SARA Na₂S₂O₄ e (ii) variação da concentração de catalisador Cu(II)Br₂/Me₆TREN;
3. **Avaliação do desempenho dos copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br na complexação de sRNA:** realizada por Bruno Almeida, do Centro de Investigação de Ciências de Saúde da Universidade da Beira Interior com recurso à determinação da eficiência de encapsulação, por espectroscopia UV-Vis e gel em agarose, e à determinação do tamanho e potencial Zeta dos poliplexos, pela técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS).

4.1 Síntese de macroiniciador POEOMA-Br

A síntese do macroiniciador POEOMA₂₂-Br, ou seja, com grau de polimerização (DP) 22, foi o primeiro passo para a obtenção dos copolímeros em bloco POEOMA-*b*-PDPA-Br pretendidos. A síntese foi realizada por ICAR ATRP, de acordo com procedimentos descritos na literatura (Baptista et al., 2023), sendo expectável que se atingisse uma conversão de monómero próxima de 50 % ao final de 100 min de reação, para um DP alvo de 40 (condições experimentais descritas na Tabela 6) e um polímero com $M_n \approx 16000$ e $D \approx 1,15$. Parar a polimerização a baixa conversão de monómero é importante para garantir elevada funcionalidade do polímero, que é essencial para o passo seguinte de formação do copolímero POEOMA-*b*-PDPA-Br. No entanto, apesar de terem sido seguidas as condições experimentais descritas na literatura, nem sempre foram verificados os resultados pretendidos (Tabela 6). Para além disso, nem sempre se obtiveram resultados reproduzíveis em todas as tentativas de síntese de macroiniciadores POEOMA₂₂-Br (entradas 1 e 2, Tabela 6).

Tabela 6 - Conversão de monómero e M_n^{SEC} e D dos macroiniciadores POEOMA-Br sintetizados por ICAR ATRP. Condições de reação: [OEOMA]₀/[EBPA]₀/[CuBr₂]₀/[TPMA]₀/[V-50]₀ = 40/1/0,04/0,08/0,3, IPA/água 95/5% (v/v); [OEOMA]₀ = 0,43 M; $T = 56^\circ\text{C}$, $V_{total} = 30$ mL

Entrada	Tempo de purga N ₂ (min)	Tempo reação (min)	Conversão (%)	D	$M_n^{SEC} \times 10^{-3}$	DP ^{th***}
1	30	120	94	1,32	19,1	37
2	30	100	11	1,08	5,6	4
3	40	110	3	*		-
4	40	100	37	*		15
5	60	100	20	*		6
6	60	120	59	*		23
7	60	120	85	1,23	20,1	39
8	90	240	**	**		**
9	90	240	40	1,46	8,5	17

* As amostras não foram analisadas por SEC, porque o equipamento esteve em manutenção, tendo sido apenas analisadas por espectroscopia de RMN

** Verificou-se previamente, por SEC, que o monómero tinha homopolimerizado durante o período de desgaseificação.

*** $DP^{th} = DP^{alvo} \times \text{conversão}/100$, com $DP^{alvo} = [DPA]_0/[EBPA]_0$ (molar)

Pensou-se então que a origem deste problema poderia estar relacionada com a ineficácia da desgaseificação do sistema devido ao volume de mistura utilizado (~30 mL), pois a reação descrita na literatura utiliza menor volume (~15mL) para o mesmo tempo de desgaseificação (30 min). (Baptista et al., 2023) A estratégia adotada em seguida para tentar melhorar os resultados, foi o aumento do tempo de purga da mistura reacional com azoto. A presença de oxigénio tem um papel inibidor no equilíbrio químico das reações redox, oxidando o complexo catalítico metal/ligante, afetando assim a extensão global da polimerização. Por isso, é expectável que a conversão de monómero seja baixa, ou mesmo inexistente, na presença de oxigénio. (Szczepaniak et al., 2021) O tempo de desgaseificação foi variado de 30, 40 e 60 min, sendo que esta estratégia não se revelou totalmente eficaz devido à falta de correlação entre o tempo de purga e o aumento da conversão de monómero (entradas 2, 4 e 5 da Tabela 6). Assim, prosseguiu-se então com o aumento do tempo de reação a fim de verificar se a reação progredia em termos de conversão de monómero. Estabelecido o tempo de desgaseificação de 60 min e o tempo de reação de 120 min, realizaram-se duas sínteses que permitiram obter os macroiniciadores POEOMA₂₃-Br e POEOMA₃₇-Br (entradas 6 e 7 da Tabela 6), com um DP próximo do pretendido. Devido à baixa quantidade de macroiniciador POEOMA₂₃-Br recuperado, este só foi utilizado em posteriores experiências preliminares de preparação de copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br. Relativamente às experiências apresentadas nas entradas 8 e 9 da Tabela 6, estas foram realizadas no final do projeto, com vista a obter outro lote de macroiniciador POEOMA-Br, caso fosse necessário para a síntese de copolímeros, optando-se por fazer o *scale-up* da reação pelo dobro, por motivos de quantidade. Assim, o tempo de reação e de desgaseificação também foram aumentados para o dobro com vista a manter as condições de reação adequadas ao volume da mistura. De modo a avaliar a polimerização em maior escala, prepararam-se amostras para injeção em SEC, após a desgaseificação, no início de reação e no final da reação. Neste processo, verificou-se que durante a desgaseificação ocorreu homopolimerização do monómero (Tabela 6, entrada 8). Sendo a temperatura um fator que promove o início da polimerização, decidiu efetuar-se o processo de desgaseificação com o reator mergulhado num banho de gelo para prevenir a homopolimerização. Esta estratégia revelou-se eficaz, pois a polimerização correu como o esperado, obtendo-se o polímero POEOMA₁₇-Br (Tabela 6, entrada 9).

A estrutura química dos macroiniciadores POEOMA-Br foi confirmada por espectroscopia de ^1H RMN e a Figura 2 apresenta os espectros das amostras selecionadas para a preparação de copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br neste trabalho.

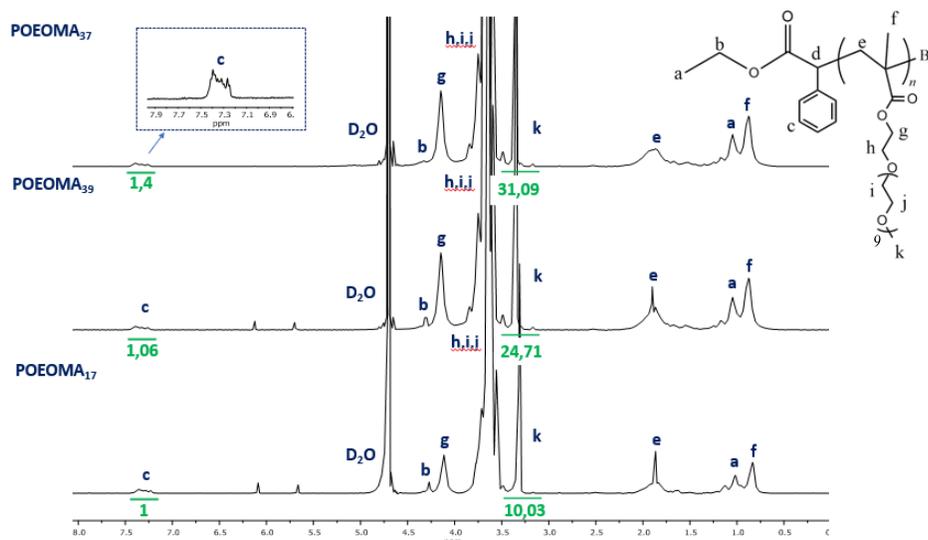


Figura 2 - Espectros de RMN, em D_2O , dos macroiniciadores POEOMA₃₇-Br, POEOMA₃₉-Br e POEOMA₁₇-Br puros, obtidos por ICAR ATRP. Condições de reação: $[\text{OEOMA}]_0/[\text{EBPA}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{TPMA}]_0/[\text{V-50}]_0 = 40/1/0,04/0,08/0,3$; IPA/água 95/5% (v/v); $[\text{OEOMA}]_0 = 0,43 \text{ M}$; $T = 56 \text{ }^\circ\text{C}$.

Através dos espectros de RMN, foi também possível determinar o peso molecular médio dos macroiniciadores POEOMA-Br, pela integração do sinais correspondentes ao fragmento de iniciador e de polímero, de acordo com as equações 5 e 6:

$$\text{DP} = \frac{\frac{\text{sinal } k}{n^\circ \text{ H sinal } k}}{\frac{\text{sinal } c}{n^\circ \text{ H sinal } c}} \quad (5)$$

$$M_n^{\text{RMN}} = \text{DP} \times M_{\text{OEOMA}} + M_{\text{EBPA}} \quad (6)$$

,com M_{OEOMA} , massa molar do monómero e M_{EBPA} , massa molar do iniciador

O peso molecular médio numérico e a polidispersividade dos macroiniciadores POEOMA-Br foram também determinados por SEC em THF (Tabela 7) através da calibração TriSEC e os cromatogramas das amostras encontram-se representados na Figura 3.

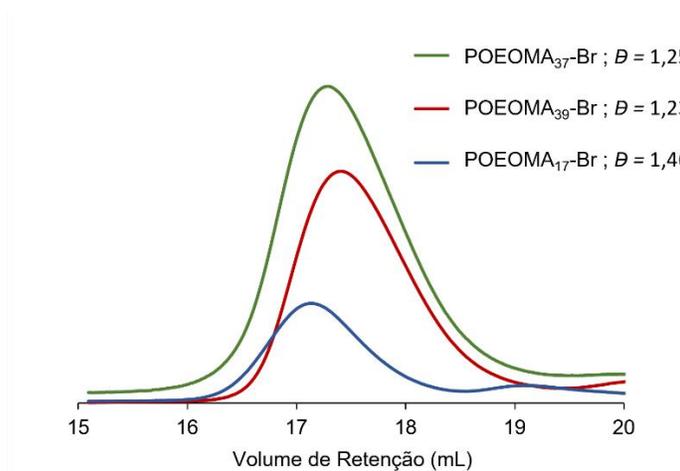


Figura 3 - Cromatogramas (sinal RI normalizado pelo M_n), obtidos por SEC THF, dos macroiniciadores POEOMA-Br selecionados.

A Tabela 7 reúne os pesos moleculares médios numéricos experimentais dos macroiniciadores POEOMA-Br, determinados por espectroscopia de ^1H RMN (M_n^{RMN}) e SEC (M_n^{SEC}), bem como o peso teórico (M_n^{th}), determinado através da conversão de monómero atingida na síntese do respectivo polímero. Os resultados mostram que o (M_n^{th} determinado é concordante com os pesos experimentais (M_n^{SEC} e M_n^{RMN}), sugerindo alta eficiência de iniciação e bom controlo sobre o crescimento das cadeias durante a polimerização ($\bar{D} < 1,50$). Apesar de não se ter atingido o DP pretendido ($\text{DP} = 22$), por limitação de tempo, optou-se por prosseguir para a etapa de síntese de copolímeros com o macroiniciador disponível em maior quantidade (POEOMA₃₉-Br), para que todos os copolímeros POEMA-*b*-PDPA tivessem o mesmo segmento de POEOMA-Br.

Tabela 7 - Peso molecular e polidispersividade dos macroiniciadores POEOMA-Br obtidos por ICAR ATRP . Condições de reação: [OEOMA]₀/[EBPA]₀/[CuBr₂]₀/[TPMA]₀/[V-50]₀ = 40/1/0,04/0,08/0,3; solvente: IPA/Água 95/5 % (v/v); [OEOMA]₀ = 0,43 M; T = 56°C

Macroiniciador	$M_n^{\text{th}} \times 10^{-3}$	$M_n^{\text{RMN}} \times 10^{-3}$	$M_n^{\text{SEC}} \times 10^{-3}$	\bar{D}
POEOMA ₃₇ -Br	18,9	19,6	20,0	1,25
POEOMA ₃₉ -Br	17,8	18,7	19,3	1,23
POEOMA ₁₇ -Br	8,2	8,6	8,9	1,46

4.2 Síntese de Copolímeros (POEOMA-*b*-PDPA-Br)

A síntese dos copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br foi realizada através da extensão de cadeia dos macroiniciadores POEOMA-Br preparados (secção 4.1) com o monómero DPA, utilizando como base um sistema reacional de SARA ATRP descrito na literatura, (Góis et al., 2018) com recurso ao ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) como agente SARA, $\text{CuBr}_2/\text{Me}_6\text{TREN}$ como sistema catalítico em IPA/água a 40°C . Para atingir a variação da polidispersividade dos polímeros, mantendo o peso molecular médio dos mesmos, foram investigadas duas estratégias diferentes: (i) variação da concentração de agente SARA e (ii) variação da concentração de sistema catalítico.

4.2.1 Variação da concentração de agente SARA $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

Em primeiro lugar, foi utilizada a estratégia de alteração da concentração de agente SARA ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). A concentração de agente redutor tem influência na extensão da reação global, modificando a velocidade de redução do complexo $\text{CuBr}_2/\text{Me}_6\text{TREN}$ e formação do complexo ativador $\text{CuBr}_2^{\text{II}}/\text{Me}_6\text{TREN}$. Assim sendo, é de esperar que uma menor concentração de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ resulte numa reação mais lenta e de menor extensão. Na literatura foram testados rácios de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ entre 30, 40 e 50% em relação a concentração molar de iniciador, e os resultados que obtiveram foram polímeros com pesos moleculares na mesma gama ($M_n \sim 18\,000$) e com polidispersividades diferentes entre ($D \sim 1,3$ e $1,4$). (Góis et al., 2014) Nas condições aqui trabalhadas, o objetivo era replicar o descrito, para um DP_{DPA} alvo de 100, atingir conversões de cerca de 80% o que corresponderia ao valor pretendido nesta síntese para originar os copolímeros obtidos (POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇).

Diferentes amostras de mistura reacional foram recolhidas durante as polimerizações realizadas com $[\text{POEOMA-Br}]_0/[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4]_0 = 1/0,3$ e $1/0,5$ para avaliar a evolução da conversão de monómero DPA e do M_n^{SEC} e D dos copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br ao longo do tempo (Figura 4).

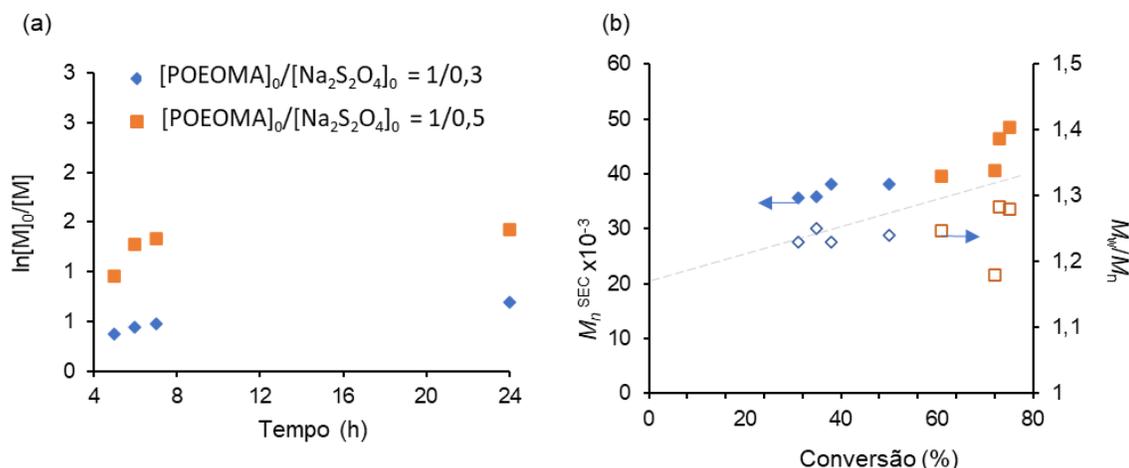


Figura 4 - a) Gráfico de cinética e b) evolução do peso molecular médio numérico (M_n) e polidispersividade (D), da extensão de cadeia de POEOMA-Br com DPA, usando diferentes rácios $[POEOMA-Br]_0/[Na_2S_2O_4]_0$. Condições de reação: $[DPA]_0/[POEOMA]_0/[Na_2S_2O_4]_0/[CuBr_2]_0/[Me_6TREN]_0 = 100/1/0,5/0,1/0,2$, IPA/água 95/5 (v/v)%, $[DPA]_0 = 1,17$ M; $T = 40$ °C, $V_{total} = 2$ mL

Os resultados mostram que, como esperado, a polimerização foi mais lenta quando o rácio molar de $[POEOMA-Br]_0/[Na_2S_2O_4]_0 = 1/0,3$ foi usado, em comparação com rácio molar de 1/0,5 (Figura 4 (a)). No entanto, observando o gráfico da Figura 4 (b), é possível perceber que a variação da polidispersividade em cada uma das reações ao longo do tempo não foi significativa ($D = [1.2 - 1.3]$), como era pretendido. Como os resultados desta estratégia não se mostraram promissores no controlo da polidispersividade dos copolímeros e como o $Na_2S_2O_4$, para além de reduzir o complexo desativador, participa também em reações da ativação suplementar de espécies dormentes, o que poderia tornar o comportamento não tão previsível, decidiu-se investigar outra estratégia para o efeito (ver secção 4.2.2.).

4.2.2 Variação da concentração de catalisador $CuBr_2/Me_6TREN$

De entre as estratégias que existem para controlar a variação da polidispersividade mantendo o peso molecular constante, a selecionada em alternativa à anterior foi a variação de concentração de catalisador ($CuBr_2/Me_6TREN$). O catalisador tem um papel preponderante na velocidade e controlo da reação, já que é ele o responsável pela manutenção do equilíbrio dinâmico entre espécies dormentes e radicais em crescimento. É de esperar que a diminuição progressiva da concentração de $CuBr_2/Me_6TREN$ faça com que a reação seja mais lenta e que haja um alargamento da distribuição de pesos moleculares, devido à menor capacidade de desativação das cadeias poliméricas em propagação. A concentração de $CuBr_2$ utilizada na reação anterior foi de 1000 ppm (em relação à concentração de monómero), sendo que para o estudo da sua variação foram testadas

as seguintes concentrações: 1500, 750, 500 e 250 ppm. O gráfico da Figura 5 (a) ilustra a cinética de primeira ordem das reações de formação dos copolímeros, que parecem apresentar uma velocidade semelhante na gama de concentração de catalisador investigada. Devido ao baixo número de amostras analisadas na maioria das reações, não foi possível determinar o valor da constante aparente de velocidade de propagação.

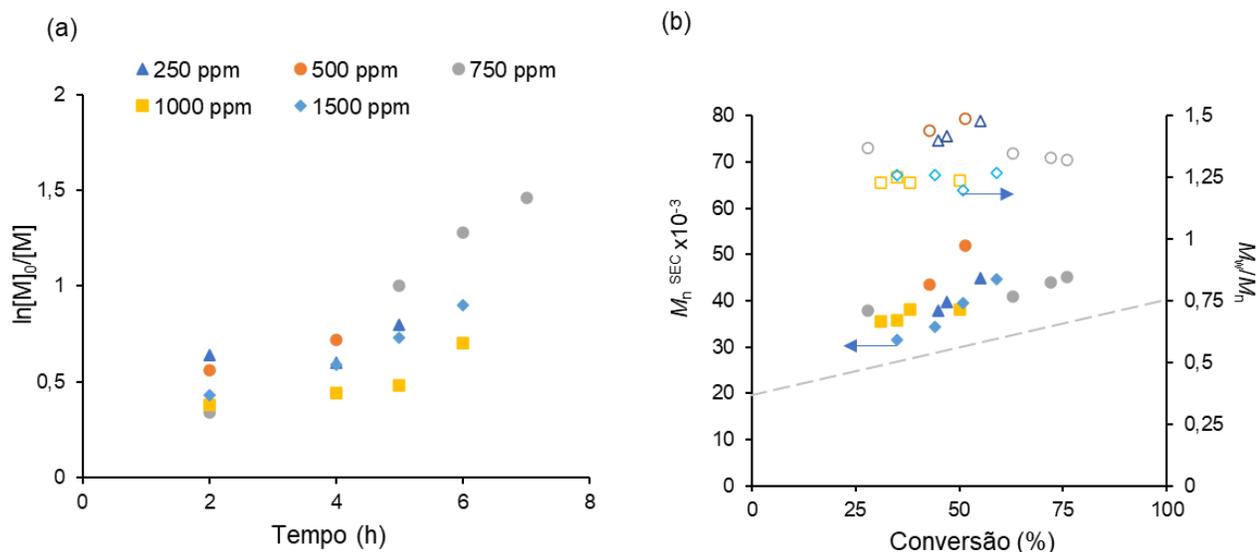


Figura 5 - a) Gráfico de cinética e b) evolução do peso molecular médio numérico (M_n) e polidispersividade (D), da extensão de cadeia de POEOMA-Br com DPA, usando diferentes $[CuBr_2]_0$. Condições de reação: $[DPA]_0/[POEOMA]_0/[Na_2S_2O_4]_0/[CuBr_2]_0/[Me_6TREN]_0 = 100/1/0,5/[CuBr_2]_0/0,2$, IPA/água 95/5 (v/v)%, $[DPA]_0 = 1,17$ M; $T = 40$ °C, $V_{total} = 2$ mL

Relativamente ao peso molecular, fazendo a análise comparativa considerando 50% de conversão de monómero, é possível verificar que houve um aumento do mesmo para as duas concentrações mais baixas de $CuBr_2$ testadas (500 e 250 ppm). Para além disto, foi observada alta viscosidade das misturas reacionais. Isto pode sugerir baixa eficiência de iniciação, o que será de esperar com insuficientes concentrações de catalisador. (Whitfield et al., 2019) Analisando o efeito da redução da concentração de catalisador na variação da polidispersividade, observa-se que a estratégia adotada permitiu preparar copolímeros com uma gama relativamente alargada de polidispersividade ($D = [1,2 - 1,5]$, Tabela 8 e Figura 5 (b)), como esperado. Para além disso, as polimerizações conduzidas com 250, 750 ou 1500 ppm permitiram obter copolímeros com peso molecular semelhante e polidispersividade distinta ($M_n^{SEC} \approx 45\ 000$, $D = 1,48$ ou $1,33$ ou $1,27$, Tabela 8), como pretendido.

Tabela 8 - Peso molecular médio numérico e polidispersividade dos copolímeros POEOMA₃₉-*b*-PDPA_x obtidos por SARA ATRP. Condições de reação: [DPA]₀/[POEOMA]₀/[Na₂S₂O₄]₀/[CuBr₂]₀/[Me₆TREN]₀ = 100/1/0,5/[CuBr₂]₀/0,2, IPA/água 95/5 (v/v)%, [DPA]₀ = 1,17 M; T = 40 °C, V_{total} = 2 mL, t = 7h

Entrada	[CuBr ₂] ₀ ppm*	$M_n^{th} \times 10^{-3}$	$M_n^{SEC} \times 10^{-3}$	\bar{D}
1	1500	28,3	44,6	1,27
2	1000	29,5	38,6	1,24
3	750	32,6	45,2	1,33
4*	500	27,6	52,0	1,49
5	250	36,8	43,2	1,48

* t = 4h.

Deste modo, foram realizadas novas reações de síntese para verificar a reprodutibilidade dos resultados e para preparar amostras em quantidade suficiente para os ensaios de caracterização na presença de material genético. A caracterização dos copolímeros obtidos encontra-se apresentada na Tabela 9.

Tabela 9 - Peso molecular médio numérico e polidispersividade dos copolímeros POEOMA₃₉-*b*-PDPA_x preparados por SARA ATRP (reprodução de procedimentos experimentais).

Copolímero	$M_n^{th} \times 10^{-3}$	$M_n^{RMN} \times 10^{-3}$	$M_n^{SEC} \times 10^{-3}$	\bar{D}
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₇₄	29,5	34,6	40,7	1,27
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₄₁	25,9	27,4	35,9	1,65
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₃₉	25,9	27,0	44,7	1,83

Os resultados obtidos na reprodutibilidade das reações mostraram-se concordantes com os estudos cinéticos realizados, à exceção do copolímero obtido usando [CuBr₂]₀ = 750 ppm, que apresentou $\bar{D} > 1,5$ e M_n^{SEC} relativamente mais baixo que os restantes (Tabela 9), pelo que esta amostra não foi considerada para o estudo. Após a revisão das características dos vários copolímeros sintetizados, e da quantidade disponível de cada um, foi possível selecionar três amostras de POEOMA₃₉-*b*-PDPA_x com valores semelhantes de peso molecular ($M_n \approx 45000$) e polidispersividades diferentes, para serem usadas no estudo da influência da polidispersividade no desempenho dos polímeros como transportadores de material genético. Estes copolímeros foram

purificados por diálise contra água e posteriormente caracterizados por espectroscopia de ^1H RMN (Figura 6) e por SEC (Tabela 10).

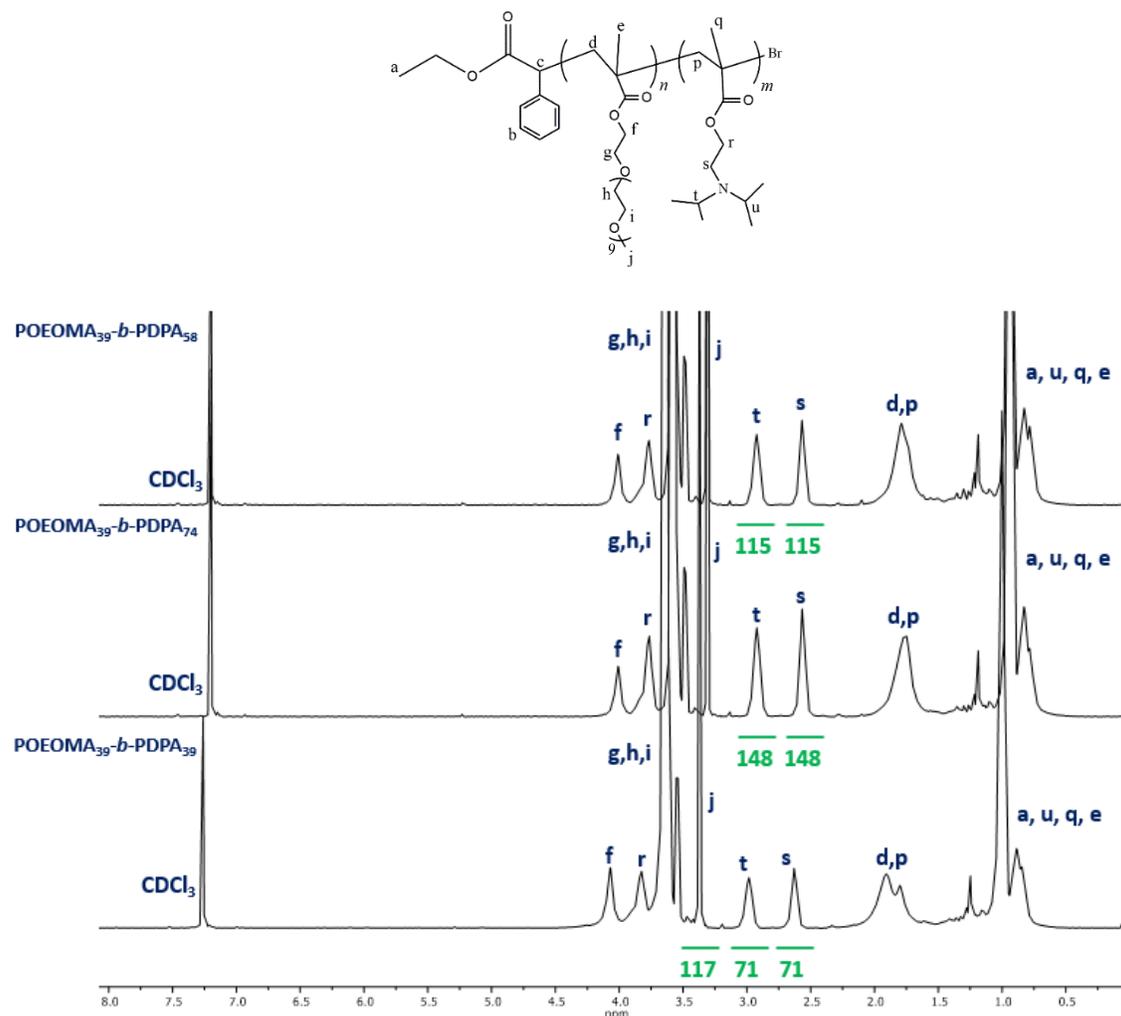


Figura 6 –Espetros de ^1H RMN em CDCl_3 dos copolímeros POEOMA₃₉-b-PDPA_x em estudo.

De modo semelhante ao que foi feito para os macroiniciadores de POEOMA-Br (ver secção 4.1), foi possível determinar o DP do DPA nos copolímeros e, por sua vez o M_n^{RMN} dos copolímeros, através da integração e normalização dos sinais *t* e *s*, relativamente ao sinal *j* (Figura 6). Os valores obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10 – Copolímeros POEOMA₃₉-*b*-PDPA_x preparados por SARA ATRP e usados para o estudo da influência da polidispersividade no desempenho dos polímeros como transportadores de material genético.

Copolímero	$M_n^{\text{th}} \times 10^{-3}$	$M_n^{\text{RMN}} \times 10^{-3}$	$M_n^{\text{SEC}} \times 10^{-3}$	\bar{D}	pKa
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₇₄	29,5	34,6	40,7	1,27	*
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₅₈	36,7	30,2	46,0	1,42	6,25
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₃₉	21,0	27,0	44,7	1,83	*

* Não determinado por amostra insuficiente

A determinação do peso molecular dos copolímeros por SEC (M_n^{SEC}) foi feita com recurso a calibração convencional, apenas baseada no sinal do detetor RI, que é a disponível no SEC aquoso (Figura 7). Como tal, o valor apresentado na Tabela 10 não permite comparação direta com o valor teórico, para aferição do nível de controlo sobre o peso molecular durante a polimerização. A utilização de uma calibração TriSEC permitiria determinar o peso absoluto dos copolímeros pelo facto desta utilizar o sinal três detetores (RI, viscosímetro e *light scattering*), como é o caso do SEC THF disponível no laboratório. No entanto, a análise de soluções de POEOMA-*b*-PDPA-Br em THF mostrou a formação de agregados de copolímero, não sendo por isso possível prosseguir com a injeção das amostras no SEC THF. Pela análise da Tabela 10, pode verificar-se que os pesos moleculares obtidos por SEC se situam próximos do valor de 45 000 e são superiores aos determinados por RMN (M_n^{RMN}) e aos teóricos (M_n^{th}). Curiosamente, o M_n^{RMN} e M_n^{th} são relativamente concordantes, o que poderia indicar um bom controlo sobre a polimerização. No entanto, tendo em conta que os M_n^{RMN} e M_n^{th} do copolímero POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉ são inferiores aos restantes copolímeros, mas o M_n^{SEC} é semelhante, sugere que possa ter havido baixa eficiência de iniciação, apesar de não ser notório nenhum “ombro” para baixos pesos moleculares no cromatograma deste copolímero (Figura 7). A baixa conversão de monómero atingida na síntese do copolímero POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉ (21%) em relação à obtida nas restantes sínteses ($\approx 55\%$), a baixa concentração CuBr₂ utilizada, bem como a elevada polidispersividade do copolímero ($\bar{D} = 1,83$) suportam também esta hipótese. É importante referir que, se for este o caso, as cadeias de macroiniciador POEOMA-Br permanecem na amostra de copolímero, pois estas apresentam um tamanho superior ao do *cut off* (1000) da membrana de diálise usada no processo de purificação do copolímero. Para a verificação desta hipótese, procedeu-se à análise de SEC do macroiniciador POEOMA-Br nas mesmas condições das usadas para os copolímeros (SEC aquoso). No entanto,

infelizmente, mas não foi possível identificar o pico correspondente a este polímero, provavelmente devido a falta de compatibilidade com o eluente usado. Isto também pode explicar a ausência de pico de macroiniciador nas amostras de copolímeros (Figura 7). Sendo assim, muito provavelmente, o DP do DPA do copolímero POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉ é superior ao determinado, o que pode ter influência nos resultados obtidos na presença de material genético, visto que o PDPA é o segmento responsável pela complexação do mesmo.

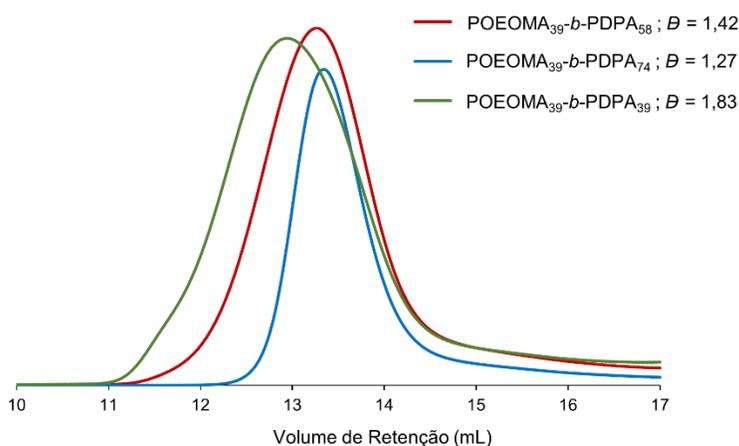


Figura 7 - Cromatogramas (sinal RI normalizado pelo M_n^{SEC}), obtidos por SEC aquoso, dos copolímeros POEOMA₃₉-*b*-PDPA_x em estudo.

4.2.3 Determinação do pKa

Os copolímeros em estudo são sensíveis ao pH devido à presença do segmento de PDPA, que contém grupos amina que ficam protonados a baixo pH e desprotonados a pH elevado. (Baptista et al., 2023) Como tal, a determinação do valor de pKa, ou seja, o valor de pH ao qual 50% dos grupos amina presentes no polímero se encontram protonados, é de extrema importância para os ensaios na presença de material genético. Isto porque a complexação entre material genético e polímero se dá através de interações electrostáticas e, como tal, é necessário conhecer-se o rácio N/P . Este é quantitativo do rácio entre cargas positivas do polímero (grupos amina, N) e cargas negativas do material genético (grupos fosfato, P). Este parâmetro influencia tanto o tamanho da nanopartícula originada como a sua carga superficial que determina a sua performance na interação com o material genético e posteriormente a sua capacidade de transfeção celular. Para valores maiores de N/P , a libertação intracelular de biomoléculas é favorecida. (Dana J. Garya et al., 2013) Através da titulação dos copolímeros com NaOH, foi possível observar a evolução do pH ao longo

da adição de base, permitindo assim a determinação do pK_a e o traçado da curva de grau de ionização em função do pH (Figura 8). As amostras testadas para a medição do pK_a , não foram as testadas para a eficiência de encapsulação à exceção de POEOMA₃₉-*b*-PDPA₅₈, por falta de material. No entanto, os resultados obtidos (Tabela 11) mostram que não houve variação significativa do pK_a com a polidispersividade dos copolímeros. Os polímeros analisados mostram uniformidade nos resultados, apresentando perfis semelhantes quanto à sua capacidade tampão e valor de pK_a (em torno de 6,3), estando de acordo com o reportado na literatura para polímeros semelhantes (POEOMA₃₉-*b*-PDPA₆₄, $pK_a = 6,3$). (Baptista et al., 2023) Importa salientar que ao pH a que os poliplexos são preparados (pH = 4,5) todos os copolímeros estão totalmente protonados (Figura 8 b)).

Tabela 11 - pK_a de copolímeros POEOMA₃₉-*b*-PDPA_x com M_n semelhante e polidispersividade diferente.

Copolímero	$M_n^{SEC} \times 10^{-3}$	\bar{D}	pK_a
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₅₆	44,0	1,20	6,26
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₇₂	44,7	1,32	6,30
POEOMA ₃₉ - <i>b</i> -PDPA ₅₈	46,0	1,42	6,25

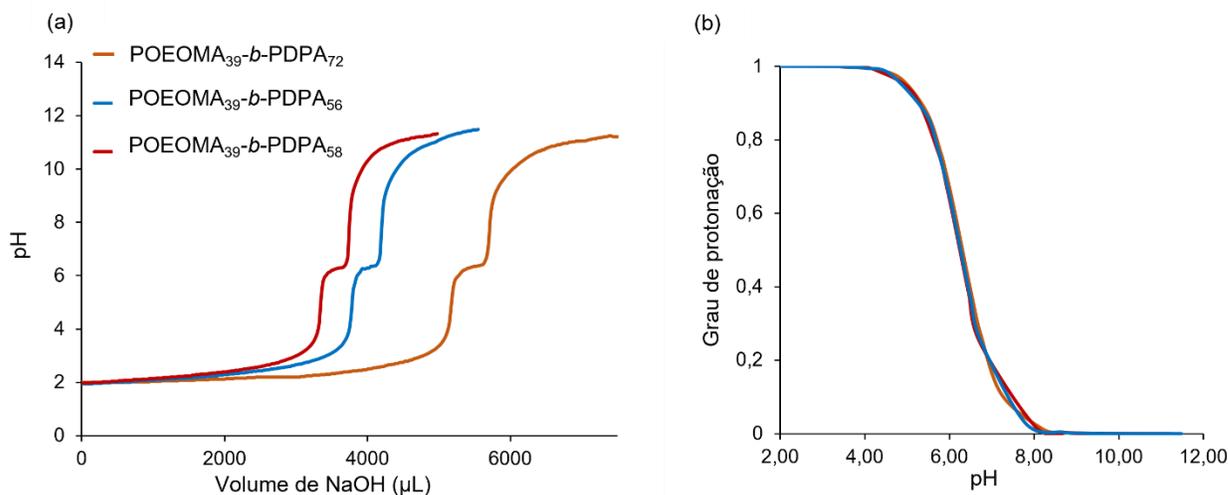


Figura 8 - a) Curva de titração e (b) curva da evolução do grau de protonação em função do pH POEOMA₃₉-*b*-PDPA_x com M_n semelhante e polidispersividade diferente

4.3 Influência da polidispersividade na eficiência de encapsulação

Como já descrito na secção 2.4.1, o copolímero POEMA-*b*-PDPA é responsivo ao pH devido à presença de grupos amina na estrutura química do segmento de PDPA, que ficam protonados em ambiente ácido. Nestas condições, o copolímero adquire carga positiva, permitindo assim a complexação de material genético, através de interações eletrostáticas, para formar poliplexos. Considerando os valores de pK_a determinados e a evolução do grau de protonação dos copolímeros com a variação do pH (Tabela 11 e Figura 8 b)), confirma-se que estes apresentam um grau de protonação perto de 100% ao pH em que foram preparados os poliplexos (solução tampão a pH = 4,5), como referido anteriormente. Assim, todos os grupos ionizados estarão disponíveis para complexação. A eficiência de encapsulação/complexação de sRNA foi determinada para os três copolímeros em estudo, numa gama de concentração de 0,05 mg/mL a 1 mg/mL, e os resultados estão apresentados na Figura 9.

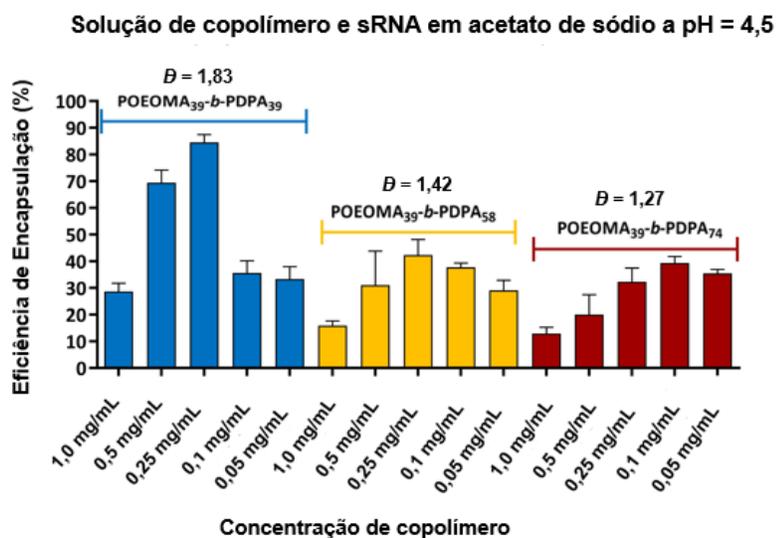


Figura 9 – Gráfico da eficiência de encapsulação em função da concentração de copolímero.

Os resultados sugerem que o aumento da polidispersividade dos copolímeros levou a um aumento da eficiência de encapsulação do material genético, principalmente para concentrações de polímero de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL (Figura 9). No entanto, tendo em consideração as observações feitas na discussão dos resultados da obtenção dos copolímeros em estudo (secção 4.2.2), esta influência pode não se verificar. Isto porque, considerando que a amostra POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉ tem um segmento de PDPA maior do que o determinado, seria expectável que este copolímero apresentasse uma maior eficiência de encapsulação de sRNA. Comparando os

resultados obtidos para as amostras com $D = 1,27$ e $D = 1,42$ (Figura 9), parece não haver uma influência notória da polidispersividade na sua capacidade de complexação de material genético. Para além disso, pode verificar-se que os valores de eficiência de encapsulação encontram-se na mesma gama dos obtidos para um copolímero POEOMA₃₉-*b*-PDPA₆₄ ($M_n^{SEC} = 44,7 \times 10^{-3}$; $D = 1,23$) semelhante aos estudados neste trabalho. (Baptista et al., 2023) Ainda, é possível estabelecer comparação entre os resultados obtidos neste trabalho e o que é reportado na literatura. (Wong Y., Sharon Putnam, 2018) Os autores referem que para poli(MAOS)/imidazol com polidispersividade maior ($D = 2,0$; $M_n = 50000$) foi possível obter complexos polímero/DNA mais estáveis e com alta eficiência de encapsulação e transfeção celular, que polímeros com menor polidispersividade. No entanto, não determinaram uma correlação direta entre a polidispersividade e eficiência de encapsulação, tal como sugeridos pelos resultados mostrados por comparação entre POEOMA₃₉-*b*-PDPA₅₈ e POEOMA₃₉-*b*-PDPA₇₄, já que apresentam eficiências de encapsulação semelhantes para todas as concentrações testadas embora os polímeros tenham polidispersividades distintas ($D = 1,42$ e $D = 1,27$).

Para a confirmação dos resultados obtidos nos testes de eficiência de encapsulação, foram realizadas experiências adicionais de eletroforese em gel de agarose, usando RNA livre como controlo. As imagens apresentadas na Figura 10 permitem verificar que os resultados se mostram concordantes com os obtidos na avaliação da eficiência de encapsulação por espectroscopia de UV-Vis (Figura 10), uma vez que para o polímero POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉ se verifica uma boa interação entre o copolímero e o sRNA. No que diz respeito aos poliplexos formados pelos restantes copolímeros, é possível verificar a possibilidade de existir sRNA livre, visto que as corridas para concentrações maiores de copolímero (1 mg/mL e 0,5 mg/mL) mostram um leve arrastamento.

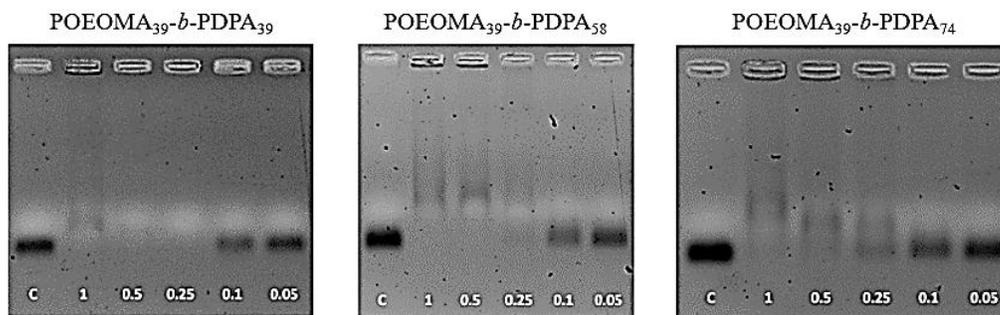


Figura 10 - Eficiência de encapsulação em função da concentração de copolímero POEOMA₃₉-b-PDPA_x (x = 39, 58 ou 74) a pH = 4,5, obtida por eletroforese em gel de agarose. A linha C representa a mobilidade do sRNA livre, a uma concentração de 20 µg/mL, usada como controlo. Os números em cada linha representam a concentração de copolímero em mg/mL.

4.4 Tamanho e carga de superfície das partículas

A avaliação do tamanho e carga dos poliplexos formados, foi efetuada para o copolímero que apresentou maior eficiência de encapsulação, o POEOMA₃₉-b-PDPA₃₉. Como controlo, foi efetuada a medição do sRNA livre. Os resultados apresentados na Tabela 12 permitem dizer que os poliplexos preparados com uma concentração de copolímero entre 1 mg/mL e 0,25 mg/mL são adequados à entrega de material genético em células tumorais, pois a carga de superfície é positiva e o tamanho de partícula situa-se entre 100 nm e 600 nm. (Baptista et al., 2023) Atendendo à eficiência de encapsulação (Figura 9), o sistema mais promissor será aquele preparado com concentração de copolímero de 0,25 mg/mL. Por outro lado, os resultados mostram que os poliplexos formados com concentração de copolímero inferior a 0,25 mg/mL, apresenta carga de superfície negativa. Isto sugere que a quantidade de polímero disponível não é suficiente para encapsular o material genético totalmente na partícula, ficando este possivelmente complexo na periferia das poliplexos. No entanto, atendendo à alta eficiência de encapsulação verificada nestas condições, a carga negativa pode também dever-se à elevada ocupação dos grupos de amina protonados. No geral, os ensaios mostram que há interação entre o sRNA e o copolímero.

Tabela 12 - Resultados da medição do potencial zeta de sRNA livre e políplexos de POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉/sRNA e tamanho de partícula dos políplexos, preparados a pH = 4,5, para diferentes concentrações de copolímeros.

Potencial Zeta de sRNA (mV)			
-47,04 ± 1,56			
Tamanho dos complexos POEOMA₃₉-<i>b</i>-PDPA₃₉-sRNA (nm)			
[POEOMA₃₉-<i>b</i>-PDPA₃₉] (mg/mL)	Tempo de incubação (min)	Potencial Zeta (mV)	Tamanho da Partícula (nm)
1	15	31,2 ± 1,22	109,34 ± 20,32
0,5		32,67 ± 1,03	151,43 ± 25,77
0,25		14,03 ± 0,33	103,87 ± 29,29
0,1		-21,19 ± 3,45	88,4 ± 20,72
0,05		-21,05 ± 3,20	775,87 ± 58,77

5. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

No presente trabalho, foi avaliada a influência da polidispersividade de copolímeros POEOMA_x-*b*-PDPA_y, na sua aplicação enquanto vetores de entrega de material genético para tratamento do cancro. Primeiramente, foi feita a síntese de macroiniciadores de POEOMA-Br por ICAR ATRP. Verificou-se que foi necessário aumentar o tempo de purga e o tempo de reação para obter resultados concordantes com os da literatura, em termos de conversão de monómero e peso molecular do polímero, devido ao maior volume de mistura reacional usada neste trabalho (dobro). Os copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br foram preparados por SARA ATRP, com a utilização de Na₂S₂O₄ como agente SARA, por extensão de cadeia do macroiniciador POEOMA₃₉-Br. Para variação da polidispersividade dos copolímeros, foi variada a concentração de agente SARA, não tendo sido verificadas alterações significativas no parâmetro pretendido ($\mathcal{D} = [1,2 - 1,3]$). A variação da concentração de catalisador ($[\text{CuBr}_2]_0 = [250 - 1500]$ ppm) verificou-se uma estratégia mais promissora na variação da polidispersividade, tendo resultado na preparação de 3 copolímeros com peso molecular semelhante ($M_n \approx 45\ 000$, , POEOMA₃₉-*b*-PDPA₇₄, , POEOMA₃₉-*b*-PDPA₅₈ e POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉) e diferente polidispersividade ($\mathcal{D} = 1,27; 1,42$ e $1,83$, respetivamente). A avaliação dos pesos moleculares M_n^{th} , M_n^{RMN} e M_n^{SEC} sugeriu que houve baixa eficiência de iniciação durante a preparação do copolímero POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉. Os resultados mostraram que não houve influência da polidispersividade no valor de pK_a dos copolímeros.

Os copolímeros, em diferentes concentrações, foram complexados com sRNA e as eficiências de encapsulação foram determinadas por UV-Vis, tendo-se obtido valores desde os 15% até aos 85%, sendo que os valores mais elevados, foram obtidos a uma concentração de 0,25 mg/mL de copolímero. Os resultados mostraram que a maior eficiência de encapsulação foi obtida para o copolímero com o segmento de PDPA menor, POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉, corroborando a análise de pesos moleculares que sugeriu baixa eficiência de iniciação, que conduziu a um segmento de PDPA maior do que o determinado. Comparando as restantes amostras, não se verificou influência da polidispersividade na eficiência de encapsulação. O tamanho (104 nm) e potencial zeta (positivo) dos políplexos POEOMA₃₉-*b*-PDPA₃₉/sRNA preparados com concentração de copolímero 0,25 mg/mL, aliados à alta eficiência de complexação (85%) demonstraram estas nanoestruturas são adequadas para tratamento do cancro.

Perspetivas de trabalho futuro

Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a parte de síntese dos copolímero seja melhor compreendida, antes de avançar com o estudo na presença de material genético. Optar por começar o estudo pela homopolimerização do DPA, será mais vantajoso. As seguintes tarefas são sugeridas como trabalho futuro:

- Avaliar a eficiência de iniciação durante a polimerização do DPA por SARA, partindo de um iniciador de ATRP convencional, para diferentes concentrações de catalisador
- Preparação de homopolímeros de PDPA com peso molecular semelhante e polidispersividade distinta e posterior caracterização dos políplexos formados com sRNA
- Preparar copolímeros POEOMA-*b*-PDPA-Br com base no conhecimento adquirido na estudo da homopolimerização do DPA por SARA ATRP
- Investigar outras técnicas de variação da polidispersividade (ex.: natureza do ligante) na polimerização do DPA, que permitam alta eficiência de iniciação

Bibliografia

- Abreu, C. M. R., Fu, L., Carmali, S., Serra, A. C., Matyjaszewski, K., & Coelho, J. F. J. (2017). Aqueous SARA ATRP using inorganic sulfites. *Polymer Chemistry*, 8(2).
<https://doi.org/10.1039/c6py01779g>
- Abreu, C. M. R., Mendonça, P. V., Serra, A. C., Popov, A. V., Matyjaszewski, K., Guliashvili, T., & Coelho, J. F. J. (2012). Inorganic sulfites: Efficient reducing agents and supplemental activators for atom transfer radical polymerization. *ACS Macro Letters*, 1(11), 1308–1311.
<https://doi.org/10.1021/mz300458x>
- Audran, G., Bagryanskaya, E. G., Marque, S. R. A., & Postnikov, P. (2020). New variants of nitroxide mediated polymerization. *Polymers*, 12(7), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/polym12071481>
- Baptista, B., Oliveira, A. S. R., Mendonça, P., Serra, A. C., Coelho, J. F. J., & Sousa, F. (2023). pH-responsive nanoparticles based on POEOMA-b-PDPA block copolymers for RNA encapsulation, protection and cell delivery. *Biomaterials Advances*, 145(December 2022).
<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213267>
- Barbey, O., Lulka, H., Hanoun, N., Belhadj-Tahar, H., Vernejoul, F., Cambois, G., Tiraby, M., Buscail, L., Gross, F., & Cordelier, P. (2023). Preclinical development of non-viral gene therapy for patients with advanced pancreatic cancer. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 29(June), 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.03.005>
- Borsari, M., Braidi, N., Buffagni, M., Ghelfi, F., Parenti, F., Porcelli, N., Serafini, G., Isse, A. A., Bonifaci, L., Cavalca, G., Longo, A., Morandini, I., & Pettenuzzo, N. (2021). Copper-catalyzed ARGET ATRP of styrene from ethyl α -haloisobutyrate in EtOAc/EtOH, using ascorbic acid/Na₂CO₃ as reducing system. *European Polymer Journal*, 157, 110675.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110675>
- Brar, A. S., & Kaur, S. (2006). Atom transfer radical polymerization of N-vinyl carbazole: Optimization to characterization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 44(5). <https://doi.org/10.1002/pola.21296>
- Chmielarz, P., Fantin, M., Park, S., Isse, A. A., Gennaro, A., Magenau, A. J. D., Sobkowiak, A., & Matyjaszewski, K. (2017). Electrochemically mediated atom transfer radical

polymerization (eATRP). *Progress in Polymer Science*, 69, 47–78.

<https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2017.02.005>

Corrigan, N., Manahan, R., Lew, Z. T., Yeow, J., Xu, J., & Boyer, C. (2018). Copolymers with Controlled Molecular Weight Distributions and Compositional Gradients through Flow Polymerization. *Macromolecules*, 51(12), 4553–4563.

<https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b00673>

Dadashi-Silab, S., & Matyjaszewski, K. (2018). Temporal Control in Atom Transfer Radical Polymerization Using Zerovalent Metals. *Macromolecules*, 51(11), 4250–4258.

<https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b00698>

Dana J. Garya, Jung Bin Minb, Youngwook Kimb, Keunchil Parkb, and Y.-Y., & Won. (2013). The Effect of N/P Ratio on the In Vitro and In Vivo Interaction Properties of PEGylated Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-Based siRNA Complexes. *Macromolecules Biosci*, 8, 1059–1071.

Doncom, K. E. B., Blackman, L. D., Wright, D. B., Gibson, M. I., & O'Reilly, R. K. (2017a). Dispersity effects in polymer self-assemblies: A matter of hierarchical control. In *Chemical Society Reviews* (Vol. 46, Issue 14). <https://doi.org/10.1039/c6cs00818f>

Doncom, K. E. B., Blackman, L. D., Wright, D. B., Gibson, M. I., & O'Reilly, R. K. (2017b). Dispersity effects in polymer self-assemblies: A matter of hierarchical control. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4119–4134. <https://doi.org/10.1039/c6cs00818f>

Forrest, M. L., Koerber, T.J., Pack, W. D. (2003) A Degradable Polyethylenimine Derivate with Low Toxicity for Highly Efficient Gene Delivery, *Bioconjugate Chemistry* 2003 14 (5), 934-940 <https://doi.org/10.1021/bc034014g>

Gentekos, D. T., Dupuis, L. N., & Fors, B. P. (2016). Beyond Dispersity: Deterministic Control of Polymer Molecular Weight Distribution. *Journal of the American Chemical Society*, 138, 1848–1851. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b13565>

Gentekos, D. T., Sifri, R. J., & Fors, B. P. (2019). Controlling polymer properties through the shape of the molecular-weight distribution. *Nature Reviews Materials*, 4(12), 761–774. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0138-8>

- Góis, J. R., Konkolewicz, D., Popov, A. V., Guliashvili, T., Matyjaszewski, K., Serra, A. C., & Coelho, J. F. J. (2014). Improvement of the control over SARA ATRP of 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate by slow and continuous addition of sodium dithionite. *Polymer Chemistry*, 5(16), 4617–4626. <https://doi.org/10.1039/c4py00561a>
- Góis, J. R., Reis, F., Almeida, A. M., Pereira, P., Sousa, F., Serra, A. C., & Coelho, J. F. J. (2018). Preparation of well-defined brush-like block copolymers for gene delivery applications under biorelevant reaction conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 169, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.004>
- Greszta, D., Mardare, D., & Matyjaszewski, K. (1994). “Living” Radical Polymerization. 1. Possibilities and Limitations. *Macromolecules*, 27(3), 638–644. <https://doi.org/10.1021/ma00081a002>
- Gustafson, M. P., Ligon, J. A., Bersenev, A., McCann, C. D., Shah, N. N., & Hanley, P. J. (2023). Emerging frontiers in immuno- and gene therapy for cancer. *Cytotherapy*, 25(1), 20–32. <https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2022.10.002>
- Hola, E., Fiedor, P., Dzienia, A., & Ortyl, J. (2021). Visible-Light Amine Thioxanthone Derivatives as Photoredox Catalysts for Photopolymerization Processes. *ACS Applied Polymer Materials*, 3(11). <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00886>
- Jakubowski, W., Min, K., & Matyjaszewski, K. (2006). Activators regenerated by electron transfer for atom transfer radical polymerization of styrene. *Macromolecules*, 39(1). <https://doi.org/10.1021/ma0522716>
- Jin, Y., Adams, F., Möller, J., Isert, L., Zimmermann, C. M., Keul, D., & Merkel, O. M. (2023). Synthesis and Application of Low Molecular Weight PEI-Based Copolymers for siRNA Delivery with Smart Polymer Blends. *Macromolecular Bioscience*, 23(2). <https://doi.org/10.1002/mabi.202200409>
- Konkolewicz, D., Schröder, K., Buback, J., Bernhard, S., & Matyjaszewski, K. (2012). Visible light and sunlight photoinduced ATRP with ppm of Cu catalyst. *ACS Macro Letters*, 1(10), 1219–1223. <https://doi.org/10.1021/mz300457e>
- Lamontagne, H. R., & Lessard, B. H. (2020). Nitroxide-Mediated Polymerization: A Versatile Tool for the Engineering of Next Generation Materials. *ACS Applied Polymer Materials*,

2(12), 5327–5344. <https://doi.org/10.1021/acsapm.0c00888>

- Landolt, L., Spagnoli, G. C., Hertig, A., Brocheriou, I., & Marti, H. P. (2022). Fibrosis and cancer: shared features and mechanisms suggest common targeted therapeutic approaches. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *37*(6), 1024–1032. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa301>
- Lorandi, F., Fantin, M., & Matyjaszewski, K. (2022). Atom Transfer Radical Polymerization: A Mechanistic Perspective. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 144, Issue 34). <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05364>
- Maitz, M. F. (2015). Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology*, *1*(3), 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>
- Marathianos, A., Liarou, E., Anastasaki, A., Whit, R., Laurel, M., Wemyss, A. M., & Haddleton, D. M. (2019). Photo-induced copper-RDRP in continuous flow without external deoxygenation. *Polymer Chemistry*, *10*, 4402–4406. <https://doi.org/10.1039/c9py00945k>
- Matyjaszewski, K. (2012). Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current status and future perspectives. *Macromolecules*, *45*(10). <https://doi.org/10.1021/ma3001719>
- Matyjaszewski, K., Jakubowski, W., Min, K., Tang, W., Huang, J., Braunecker, W. A., & Tsarevsky, N. V. (2006). Diminishing catalyst concentration in atom transfer radical polymerization with reducing agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(42), 15309–15314. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602675103>
- Matyjaszewski, K., & Spanswick, J. (2005). Controlled/living radical polymerization. *Materials Today*, *8*(3). [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)00745-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(05)00745-5)
- Mohammad Rabea, A., & Zhu, S. (2014). Controlled radical polymerization at high conversion: Bulk ICAR ATRP of methyl methacrylate. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *53*(9). <https://doi.org/10.1021/ie403731m>
- Montaño-Samaniego, M., Bravo-Estupiñan, D. M., Méndez-Guerrero, O., Alarcón-Hernández, E., & Ibáñez-Hernández, M. (2020). Strategies for Targeting Gene Therapy in Cancer Cells With Tumor-Specific Promoters. *Frontiers in Oncology*, *10*(December), 1–18.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.605380>

National Cancer Institute. (2021). *What is cancer?* October 11. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

Noble, B. B., & Coote, M. L. (2013). First principles modelling of free-radical polymerisation kinetics. In *International Reviews in Physical Chemistry* (Vol. 32, Issue 3). <https://doi.org/10.1080/0144235X.2013.797277>

Peng, C. H., Zhong, M., Wang, Y., Kwak, Y., Zhang, Y., Zhu, W., Tonge, M., Buback, J., Park, S., Krys, P., Konkolewicz, D., Gennaro, A., & Matyjaszewski, K. (2013). Reversible-deactivation radical polymerization in the presence of metallic copper. Activation of alkyl halides by Cu⁰. *Macromolecules*, *46*(10), 3803–3815. <https://doi.org/10.1021/ma400150a>

Queffelec, J., Gaynor, S. G., & Matyjaszewski, K. (2000). Optimization of atom transfer radical polymerization using Cu(I)/tris(2-(dimethylamino)ethyl)amine as a catalyst. *Macromolecules*, *33*(23). <https://doi.org/10.1021/ma000871t>

Rai, R., Alwani, S., & Badea, I. (2019). Polymeric nanoparticles in gene therapy: New avenues of design and optimization for delivery applications. *Polymers*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/polym11040745>

Ramamoorth, M., & Narvekar, A. (2015). Non viral vectors in gene therapy - An overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *9*(1), GE01–GE06. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>

Soly, S., Mistry, B., & Murthy, C. N. (2022). Photo-mediated metal-free atom transfer radical polymerization: recent advances in organocatalysts and perfection towards polymer synthesis. In *Polymer International* (Vol. 71, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/pi.6336>

Sun, M., Szczepaniak, G., Dadashi-Silab, S., Lin, T. C., Kowalewski, T., & Matyjaszewski, K. (2023). Cu-Catalyzed Atom Transfer Radical Polymerization: The Effect of Cocatalysts. *Macromolecular Chemistry and Physics*, *224*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1002/macp.202200347>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Sung, Y. K., & Kim, S. W. (2019). Recent advances in the development of gene delivery systems. In *Biomaterials Research* (Vol. 23, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0156-z>

Szczepaniak, G., Fu, L., Jafari, H., Kapil, K., & Matyjaszewski, K. (2021). Making ATRP More Practical: Oxygen Tolerance. *Accounts of Chemical Research*, 54(7). <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00032>

Tian, X., Ding, J., Zhang, B., Qiu, F., Zhuang, X., & Chen, Y. (2018). Recent advances in RAFT polymerization: Novel initiation mechanisms and optoelectronic applications. *Polymers*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/polym10030318>

Tyeklar, Z. (1993). Reversible reaction of dioxygen (and carbon monoxide) with a copper(I) complex. X-ray structures of relevant mononuclear Cu(I) precursor adducts and the trans-(μ -1,2-peroxy)dicopper(II) product. *Journal of the American Chemical Society*, 115(7), 2677–2689.

Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. In *Materials* (Vol. 2, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/ma2020307>

Wang, J. S., & Matyjaszewski, K. (1995). Controlled/“Living” Radical Polymerization. Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of Transition-Metal Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 117(20), 5614–5615. <https://doi.org/10.1021/ja00125a035>

Wang, X. S., & Armes, S. P. (2000). Facile atom transfer radical polymerization of methoxy-capped oligo(ethylene glycol) methacrylate in aqueous media at ambient temperature. *Macromolecules*, 33(18). <https://doi.org/10.1021/ma000671h>

Whitfield, R., Parkatzidis, K., Truong, N. P., Junkers, T., & Anastasaki, A. (2020). Tailoring Polymer Dispersity by RAFT Polymerization: A Versatile Approach. *Chem*, 6(6). <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2020.04.020>

Whitfield, R., Truong, N. P., Messmer, D., Parkatzidis, K., Rolland, M., & Anastasaki, A. (2019). Tailoring polymer dispersity and shape of molecular weight distributions: Methods and

- applications. In *Chemical Science* (Vol. 10, Issue 38, pp. 8724–8734). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9sc03546j>
- Wong Y., Sharon Putnam, D. (2018). The stochastic effect of polydispersity on polymeric DNA Delivery vectors. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(24), 45965-.
<https://doi.org/10.1002/app.46279>
- Yadav V., Hashmi N., Ding W., Li T. H., Mahanthappa M. K., Conrad J. C., R. M. L. (2018). Dispersity control in atom transfer radical polymerizations through addition of phenylhydrazine. *Polymer Chemistry*, 9, 4332.
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 15, Issue 8).
<https://doi.org/10.1038/nrg3763>
- Zaborniak, I., & Chmielarz, P. (2022). Comestible curcumin: From kitchen to polymer chemistry as a photocatalyst in metal-free ATRP of (meth)acrylates. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.10.001>
- Zhang, Y., & Zhi-Ying, W. (2023). Gene therapy for monogenic disorders: challenges, strategies, and perspectives. *Journal of Genetics and Genomics*, 1216.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgg.2023.08.001>
- Zhou, L., Emenuga, M., Kumar, S., Lamantia, Z., Figueiredo, M., & Emrick, T. (2022). Designing Synthetic Polymers for Nucleic Acid Complexation and Delivery: From Polyplexes to Micelleplexes to Triggered Degradation. *Biomacromolecules*, 23(10), 4029–4040. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00767>
- Zhou, Y. N., & Luo, Z. H. (2016). State-of-the-Art and Progress in Method of Moments for the Model-Based Reversible-Deactivation Radical Polymerization. In *Macromolecular Reaction Engineering* (Vol. 10, Issue 6, pp. 516–534). Wiley-VCH Verlag.
<https://doi.org/10.1002/mren.201500080>
- Zolnik, B. S., González-Fernández, Á., Sadrieh, N., & Dobrovolskaia, M. A. (2010). Minireview: Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*, 151(2), 458–465.
<https://doi.org/10.1210/en.2009-1082>

Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *The AAPS Journal*, 23(4), 78. <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00608-7>