

**Preparação e Teste de Hidrogéis Inteligentes Para a Imobilização  
Reversível de Proteínas e de DNA**

**Patrícia Raquel Fernandes Reitor**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão  
Instituto Politécnico de Bragança**

Para obtenção do Grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:  
**Professor Doutor Rolando Carlos Pereira Simões Dias**

Bragança, dezembro de 2014



*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”*

Marie Curie



*“Aos meus pais, Emília e João e ao meu avô, que infelizmente não está presente fisicamente  
mas que ficaria de certeza muito orgulhoso de mim”*



# Agradecimentos

Ao longo destes últimos anos, muitas foram as ajudas, os apoios ou simplesmente os sorrisos que me permitiram completar mais uma etapa da minha vida académica.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, o Autor da Vida, pois sem ele não haveria nada para estudar nem quem o fizesse.

Agradeço ao meu Orientador, Professor Doutor Rolando Dias, pela oportunidade concedida, conhecimento científico, incentivo, amizade e pela independência a nós imputada, possibilitando aos seus alunos procurar as suas próprias soluções, desenvolvendo a nossa maturidade científica e senso crítico.

À Doutora Porkodi Kadhivel pela ajuda na execução da parte experimental, disponibilidade e orientação prestada no laboratório.

À Dra. Maria João do LPQ pelos seus ensinamentos nas medições com espectroscopia UV-Vis. A todos os meus colegas de laboratório, a minha família científica, pela ajuda dispensada e pela companhia nos momentos mais difíceis, particularmente à Tânia, com a qual passei grande parte dos meus dias nos últimos anos.

A todos os meus outros amigos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar esta etapa, dando-me o seu apoio incondicional e alegria ao longo de todos os anos.

Ao departamento de química da ESTIG, pelas instalações e todo o material dispensado para a elaboração deste trabalho.

Ao meu namorado, José Artur por ter estado sempre presente, por toda a paciência, compreensão e conforto nesta etapa da minha vida.

A toda a minha família, especialmente aos meus pais e à minha irmã, que presentes fisicamente ou em espírito deram-me sempre a sua ajuda, carinho e coragem.

E por fim, é agradecido o financiamento desta investigação pela FCT e FEDER, nomeadamente no âmbito dos programas COMPETE (Project PEst-C/EQB/LA0020/2013), QREN/ON2/Project NORTE-07-0162-FEDER-000050 e QREN/ON2/Project NORTE-07-0124-FEDER-0000014-Polymer Reaction Engineering.



## Resumo

Em resultado da sua biocompatibilidade e propriedades muito particulares, os hidrogéis “inteligentes” têm sido aplicados nos anos mais recentes em campos tão distintos como a libertação controlada de fármacos, engenharia de tecidos, terapia genética, cultura celular ou na produção de atuadores biológicos (úteis no desenvolvimento de músculos artificiais). Este trabalho teve como objetivo o estudo da influência das condições de síntese de hidrogéis inteligentes, com sensibilidade à temperatura e ao pH, e a sua utilização na imobilização reversível de proteínas e de DNA.

Obteve-se nesta investigação um conjunto de resultados relativos à síntese, caracterização e teste laboratorial de diferentes tipos de hidrogéis, nomeadamente aniónicos (ácido acrílico-AA), catiónicos (2-(dimetilamino)etil metacrilato-DMAEMA) e termosensíveis (N-isopropilacrilamida-NIPA), tendo sido avaliado o seu desempenho na imobilização reversível de proteínas e de DNA. Para esse efeito, foi feita a imobilização nesses materiais de BSA (albumina de soro bovino) e de DNA de salmão. A dinâmica de libertação desses agentes bioativos (BSA e DNA) a partir dos diferentes hidrogéis sintetizados foi caracterizada através de espectroscopia ultravioleta (UV) e por Cromatografia de Exclusão de Tamanhos (GPC).

Foram também realizados testes considerando diferentes estímulos, decorrentes de alterações impostas no processo de libertação, nomeadamente com pH ácido/pH alcalino (analogia com o esperado entre o estômago/intestino) ou impondo variações na temperatura do ambiente físico-químico (soluções aquosas) de 25 para 37 °C (na gama da fisiologia humana). Demonstrou-se assim a possibilidade de fazer transitar os hidrogéis entre estados de inchamento/colapso em consequência da alteração de parâmetros pré-definidos.

Esta investigação mostra que é possível imobilizar reversivelmente macromoléculas (como proteínas e DNA) em hidrogéis inteligentes, gerando produtos úteis em biomedicina.

**Palavras-chave:** Hidrogéis, Estímulos, Libertação, Agentes Bioativos, BSA, DNA



## Abstract

As a result of its biocompatibility and very particular properties, smart hydrogels have been recently applied on areas like drug delivery controlled systems, tissue engineering, genetic therapy, celular culture and biological actuators production (very useful on artificial muscles development). The purpose of this work is to study the synthesis conditions of smart hydrogels and its influence, with temperature and pH sensitivity, on reversible immobilization of proteins and DNA.

In this research were obtained some results associated with synthesis, characterization and laboratorial test of different hydrogels types, like anionic hydrogels (acrilic acid-AA), cationic hydrogels (N,N-DimethylaminoethylMethacrylate- DMAEMA) and thermosensitive hydrogels (N-isopropylacrylamide-NIPA), being their performance evaluated on reversible immobilization of proteins and DNA. Within this purpose, was made the immobilization on these materials of BSA (bovine serum albumin) and salmon DNA. The delivery dynamics of this bioactive agents on different synthesized hidrogels was studied by UV spectroscopy and Gel Permeation Chromatography-GPC.

Were also performed tests considering different actions, as a result from imposed changes in the delivery process, like acid pH/basic pH (stomach/intestine analogy) or imposing temperature changes from 25 to 37 °C (on human physiology range). In fact, was proved the possibility of make hydrogels switch between swelling/shrinking stages in consequence of changes in predefined parameters.

This research shows that is possible the reversible immobilization of macromolecules (like proteins and DNA) on smart hydrogels, creating useful products on biomedicine.

**Keywords:** Hydrogels, Stimuli, Delivery, Bioactive Agents, BSA, DNA



# Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract .....	xi
Lista de Abreviaturas .....	xvii
Índice de Figuras .....	xxi
Índice de Tabelas.....	xxviii
Índice de Anexos.....	xxix
Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1 Motivação .....	1
1.2 Objetivos e Metodologia de Investigação .....	2
1.3 Limitações e Soluções Adotadas .....	3
1.4 Organização dos Capítulos .....	3
Capítulo 2. Fundamentação Teórica .....	5
2.1 Introdução.....	5
2.2 Materiais Poliméricos como Biomateriais.....	5
2.3 Hidrogéis .....	6
2.4 Hidrogéis Inteligentes.....	7
2.5 Tipos de Hidrogéis Sensíveis à Temperatura .....	9
2.5.1 Hidrogéis Termosensíveis Negativos.....	9
2.5.2 Hidrogéis Termosensíveis Positivos .....	10
2.5.3 Hidrogéis Termoreversíveis .....	10
2.6 Tipos de Hidrogéis Sensíveis ao pH.....	11
2.6.1 Hidrogéis Aniônicos.....	11
2.6.2 Hidrogéis Catiônicos .....	12
2.7 Hidrogéis Sensíveis a Forças Iónicas .....	13
2.8 Sistemas Biológicos.....	14

2.9	Proteínas .....	14
2.9.1	Forma .....	15
2.9.2	Níveis de Organização Estrutural de Proteínas .....	15
2.9.3	Propriedades das Proteínas .....	17
2.10	Engenharia de Proteínas .....	18
2.10.1	Aplicações da Engenharia de Proteínas .....	19
2.11	Albumina de Soro Bovino (BSA) .....	19
2.12	Ácido Desoxirribonucleico (DNA) .....	20
Capítulo 3.	Métodos de Síntese e Caracterização de Hidrogéis .....	23
3.1	Introdução .....	23
3.2	Cromatografia de Permeação de Gel (GPC) .....	23
3.3	Extração em Fase Sólida (SPE) .....	25
3.4	Polimerização Radicalar Clássica (FRP) .....	26
3.5	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis) .....	29
3.6	Curva de Calibração da Proteína BSA .....	29
3.7	Considerações Finais .....	30
Capítulo 4.	Imobilização e Libertação de BSA em Hidrogéis Sensíveis à Temperatura.....	33
4.1	Introdução .....	33
4.2	Materiais .....	34
4.3	Síntese de Hidrogéis por FRP .....	34
4.4	Processo de Imobilização de BSA em redes de PNIPA .....	36
4.4.1	Imobilização de BSA na presença de NaCl .....	38
4.5	Libertação de BSA a partir de Hidrogéis PNIPA .....	39
4.5.1	Testes de Libertação de BSA a 25 e a 40 °C.....	41
4.5.2	Cálculo da Libertação de BSA Usando Análise UV em Modo Fechado .....	42
4.5.3	Resultados e Discussão .....	45
4.6	Análises por GPC .....	48

4.7	Adsorção de BSA por Inchamento de Hidrogéis Impressos (MIH) / Não-Impressos (NIH)	49
4.7.1	Libertação da Proteína Imobilizada.....	50
4.8	Considerações Finais .....	52
Capítulo 5. Imobilização e Libertação de BSA em Hidrogéis Aniônicos Sensíveis ao pH..		57
5.1	Introdução.....	57
5.2	Materiais .....	58
5.3	Preparação de Soluções-Tampão.....	58
5.4	Síntese de Hidrogéis Aniônicos por FRP .....	59
5.5	Ensaio de Libertação de BSA .....	61
5.6	Resultados e Discussão.....	62
5.7	Análises por GPC .....	66
5.8	Considerações Finais .....	67
Capítulo 6. Imobilização e Libertação Comparativa de BSA em Hidrogéis Aniônicos, Catiônicos e Termosensíveis.....		69
6.1	Introdução.....	69
6.2	Materiais .....	70
6.3	Procedimento Experimental .....	70
6.4	Resultados e Discussão.....	76
6.5	Análises por GPC .....	80
6.6	Considerações Finais .....	80
Capítulo 7. Imobilização e Libertação de DNA em Hidrogéis Catiônicos.....		83
7.1	Introdução.....	83
7.2	Materiais .....	83
7.3	Imobilização Interna de DNA em redes de PDMAEMA .....	84
7.4	Libertação de DNA Imobilizado Internamente em redes de PDMAEMA.....	85
7.5	Imobilização Externa de DNA em redes de PDMAEMA (DNA <i>Binding</i> ).....	87
7.5.1	DNA <i>Binding</i> em modo Fechado ( <i>batch</i> ) .....	90

7.5.2	DNA <i>Binding</i> em modo Contínuo (SPE).....	92
7.6	Análises UV em modo Fechado e por GPC .....	94
7.7	Resultados e Discussão.....	95
7.8	Considerações Finais .....	99
Capítulo 8.	Conclusões e Trabalhos Futuros .....	101
Capítulo 9.	Referências Bibliográficas .....	105
Anexos.....		111

# Lista de Abreviaturas

<b>A</b>	<i>Absorvância da Solução</i>
<b>AA</b>	<i>Ácido Acrílico</i>
<b>AAM</b>	<i>Acrilamida</i>
<b>AIBN</b>	<i>2,2'-Azobis (2-metil-propionitrilo)</i>
<b>APS</b>	<i>Persulfato de Amônio</i>
<b>bp</b>	<i>Pares de Bases</i>
<b>BSA</b>	<i>Albumina de Soro Bovino</i>
<b>C</b>	<i>Concentração da Solução (<math>\text{mol L}^{-1}</math>)</i>
<b>CAT</b>	<i>Catalisador</i>
<b><math>C_M</math></b>	<i>Concentração de Monómeros</i>
<b><math>C_{\text{NaCl}}</math></b>	<i>Concentração de NaCl</i>
<b>CR</b>	<i>Reticulante</i>
<b>CRP</b>	<i>Polimerização Radicalar Controlada</i>
<b>DMAEMA</b>	<i>2-(dimetilamino)etil metacrilato</i>
<b>DNA</b>	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
<b><math>\epsilon</math></b>	<i>Absorvidade Molar (<math>\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}</math>)</i>
<b>FRP</b>	<i>Polimerização Radicalar Clássica</i>
<b>GPC</b>	<i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>
<b>HG</b>	<i>Hidrogel</i>
<b>I</b>	<i>Iniciador</i>
<b><math>I_0</math></b>	<i>Intensidade da Radiação Incidente</i>
<b><math>I_T</math></b>	<i>Intensidade da Radiação Transmitida</i>
<b>IV-DP</b>	<i>Viscosidade Intrínseca</i>
<b><math>l</math></b>	<i>Percurso ótico (cm)</i>
<b>LCST</b>	<i>Temperatura de Solução Crítica Inferior</i>

<b>LS</b>	<i>Difração de Luz</i>
<b>MBAm</b>	<i>N, N'-metileno-bis-acrilamida</i>
<b><math>m_{CAT}</math></b>	<i>Massa de Catalisador</i>
<b>MIP</b>	<i>Polímero Molecularmente Impresso</i>
<b><math>m_I</math></b>	<i>Massa de Iniciador</i>
<b><math>m_M</math></b>	<i>Massa de Monómeros</i>
<b><math>m_N</math></b>	<i>Número de moles da base</i>
<b><math>m_S</math></b>	<i>Massa de Solvente</i>
<b>MI</b>	<i>Monómero 1</i>
<b><math>n_{CR}</math></b>	<i>Número de moles do reticulante</i>
<b><math>n_I</math></b>	<i>Número de moles do iniciador</i>
<b>NIH</b>	<i>Polímero Não Impresso Molecularmente</i>
<b>NIPA</b>	<i>N-isopropilacrilamida</i>
<b><math>n_{MI}</math></b>	<i>Número de moles de MI</i>
<b>PAA</b>	<i>Poli (ácido acrílico)</i>
<b>PDMAEMA</b>	<i>Poli (2-(dimetilamino)etil metacrilato)</i>
<b>PI</b>	<i>Ponto Isoelétrico</i>
<b>PM</b>	<i>Peso Molecular</i>
<b>PNIPA</b>	<i>Poli (N-isopropilacrilamida)</i>
<b>PT</b>	<i>Proteína-Alvo</i>
<b><math>r_{CAT}</math></b>	<i>Razão entre <math>m_I</math> e <math>m_{CAT}</math></i>
<b><math>r_{CRPT}</math></b>	<i>Razão entre PT e CR</i>
<b>RI</b>	<i>Índice de Refração</i>
<b><math>r_{MPT}</math></b>	<i>Razão molar entre PT e MI</i>
<b>T</b>	<i>Temperatura (de Síntese)</i>
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N,N' – tetrametilenodiamina</i>
<b>TM</b>	<i>Temperatura de Fusão</i>

<b>S</b>	<i>Solvente</i>
<b>SEC</b>	<i>Cromatografia de Exclusão de Tamanhos</i>
<b>SPE</b>	<i>Extração em Fase Sólida</i>
<b>SR</b>	<i>Razão de Inchamento</i>
<b>ST</b>	<i>Solução-Tampão</i>
<b>UCST</b>	<i>Temperatura de Solução Crítica Superior</i>
<b>UV</b>	<i>Radiação Ultravioleta</i>
<b>UV-Vis</b>	<i>Radiação Ultravioleta Visível</i>
<b>US</b>	<i>Ultrassons</i>
<b>W<sub>DI</sub></b>	<i>Água Desionizada</i>
<b><math>\alpha_{CR}</math></b>	<i>Razão molar do reticulante relativamente a M1</i>
<b><math>\alpha_I</math></b>	<i>Razão molar do iniciador relativamente a M1</i>
<b><math>\alpha_N</math></b>	<i>Fração molar de grupos ácido do monómero que são neutralizados com a base</i>



# Índice de Figuras

Figura 2.1: Representação esquemática do processo de libertação de um princípio ativo, aprisionado num hidrogel, quando este é submetido a um dado estímulo (adaptado de [1]). ...	7
Figura 2.2: Esquema do comportamento de um hidrogel sensível ao pH (adaptado de [21]). ..	8
Figura 2.3: Estruturas representativas de um hidrogel químico e físico, respetivamente (adaptado de [16]). .....	8
Figura 2.4: Esquema ilustrativo do comportamento reversível idealmente esperado para hidrogéis termosensíveis negativos com o aquecimento e o arrefecimento da solução aquosa que os contém [21]. .....	9
Figura 2.5: Estrutura química do polímero sensível à temperatura resultante da polimerização de NIPA [9]. .....	9
Figura 2.6: Cromatograma do monómero NIPA a 0,2% obtida pela técnica de GPC. Análise realizada numa coluna contendo o hidrogel AA sintetizado por este grupo de investigação (LSRE). .....	10
Figura 2.7: Exemplos de estruturas químicas de base de hidrogéis aniónicos com destaque no hidrogel baseado em Ácido Acrílico por se tratar do monómero base em estudo (adaptado de [21]). .....	11
Figura 2.8: Representação esquemática do comportamento esperado para um hidrogel aniónico em meio ácido (contração da rede de polímero) [21]. .....	12
Figura 2.9: Representação esquemática do comportamento esperado para um hidrogel aniónico em meio alcalino (inchamento da rede de polímero) [21]. .....	12
Figura 2.10: Representação esquemática do comportamento esperado para um hidrogel catiónico em meio alcalino (contração da rede de polímero) [21]. .....	12
Figura 2.11: Representação esquemática do comportamento esperado para um hidrogel catiónico em meio ácido (inchamento da rede de polímero) [21]. .....	13

Figura 2.12: Esquema comparativo do comportamento de hidrogéis aniônicos e catiónicos em soluções aquosas ácidas e alcalinas [28]. .....	13
Figura 2.13: Esquema ilustrativo do comportamento teoricamente esperado para hidrogéis iônicos em solução aquosa com adição de um sal (ex. NaCl). A eventual libertação de um agente terapêutico (fármaco, proteína ou DNA) pode ser promovida quando o hidrogel se encontra contraído, por ação do aumento da força iónica [21]. .....	14
Figura 2.14: Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas [31]... 16	
Figura 2.15: Representação esquemática das estruturas secundárias. (A) $\alpha$ -hélice e (B) folha $\beta$ -pregueada [31]. .....	16
Figura 2.16: Série de Hofmeister (adaptado de [16]). .....	18
Figura 2.17: Série de Hofmeister (adaptado de [16]). .....	18
Figura 2.18: Estrutura tridimensional da proteína BSA [35]. .....	19
Figura 2.19: Cromatograma da proteína BSA a 0,2% obtida pela técnica de GPC. Análise realizada numa coluna contendo o hidrogel AA sintetizado por este grupo de investigação (LSRE). .....	20
Figura 2.20: Os pares de bases do DNA ligados por pontes de hidrogénio. A figura mostra a posição e o comprimento das pontes de hidrogénio entre os pares de bases. As ligações covalentes entre os átomos em cada base são mostradas, porém, as ligações duplas e simples não são distinguidas [42]. .....	21
Figura 3.1: Ilustração fotográfica das colunas A3000, A6000 e A7 Guard, respetivamente. Colunas comerciais usadas neste trabalho na análise de polímeros, BSA e DNA. ....	23
Figura 3.2: Representação fotográfica do instrumento de luz UV usado neste trabalho [45]. ..	24
Figura 3.3: Representação esquemática do sistema de GPC em modo aberto e explicação do processo. (A) Aplicação da amostra à coluna; (B) Percurso das moléculas de diferentes volumes moleculares, resultando na eluição das moléculas maiores; (C) Eluição das moléculas de menor volume molecular e, no detalhe, o poro da matriz retardando a passagem das moléculas [31, 44]. .....	25

Figura 3.4: Ilustração fotográfica do sistema analítico para Extração em Fase Sólida (SPE) (vácuo de 12 portas) conectado a uma bomba de vácuo. Equipamento usado neste trabalho.	26
Figura 3.5: Representação esquemática da etapa de decomposição do iniciador (usando AIBN como exemplo) [5].	27
Figura 3.6: Representação esquemática da etapa de iniciação do monómero (usando ácido acrílico como exemplo) [5].	27
Figura 3.7: Representação esquemática da etapa de propagação do monómero [5].	27
Figura 3.8: Representação esquemática da etapa de reticulação com dupla pente de do crosslinker (reticulante) (usando MBAm como exemplo) [5].	28
Figura 3.9: Representação esquemática da etapa de terminação por combinação [5].	28
Figura 3.10: Representação esquemática da etapa de terminação por dismutação [5].	28
Figura 3.11: Ilustração fotográfica das células de quartzo utilizadas na análise das amostras em estudo assim como um esquema ilustrativo da incidência de luz sobre a amostra.	29
Figura 3.12: Curva de calibração da proteína BSA obtida por espectroscopia de ultravioleta (UV) usando um comprimento de onda $\lambda=277$ nm. Calibração inicial.	30
Figura 3.13: Curva de calibração da proteína BSA obtida por espectroscopia de ultravioleta (UV) usando um comprimento de onda $\lambda=277$ nm para confirmação da curva de referência (Figura 3.12). Calibração realizada a meio desta investigação.	30
Figura 4.1: Representação esquemática do processo de imobilização de uma proteína (BSA) em redes PNIPA.	38
Figura 4.2: Ilustração fotográfica da solução BSA/NIPA à qual foi adicionada NaCl após adição de água desionizada (DI).	39
Figura 4.3: Representação esquemática da libertação de BSA a partir de hidrogéis PNIPA...	40
Figura 4.4: Ilustração fotográfica do processo de centrifugação antes das amostras recolhidas serem lidas em espectrofotómetro UV-Vis.	41

Figura 4.5: % Mássica de BSA para contabilizar toda a proteína libertada quando se efetuam lavagens ao hidrogel HG1. ....	46
Figura 4.6: % Mássica de BSA para contabilizar toda a proteína libertada quando se efetuam lavagens ao hidrogel HG2. ....	46
Figura 4.7: % Mássica de BSA para contabilizar toda a proteína libertada quando se efetuam lavagens ao hidrogel HG7. ....	46
Figura 4.8: % Mássica de BSA para contabilizar toda a proteína libertada quando se efetuam lavagens aos hidrogéis HG4, HG5 e HG6 a 25 e a 40 °C, respetivamente. ....	47
Figura 4.9: Análise por GPC de BSA libertada a partir de um hidrogel MIH. ....	50
Figura 4.10: Análise por GPC de BSA libertada a partir de um hidrogel NIH. ....	50
Figura 4.11: Concentração efetiva de BSA (mg/g) medida durante o processo de libertação de BSA a partir de hidrogéis MIH/NIH. ....	51
Figura 4.12: Percentagem de BSA libertada (razão entre a concentração de BSA efetiva e a concentração máxima observável), usando a absorvância UV global da mistura, num comprimento de $\lambda=277$ nm. Comparação de hidrogéis MIH e NIH, respetivamente. ....	51
Figura 5.1: Curva modelo para o estudo da libertação de BSA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH =7) considerando o hidrogel HG9. Esse hidrogel foi usado como referência para avaliação da absorção UV relativa ao monómero AA (branco)..	63
Figura 5.2: Efeito do pH no processo de libertação de BSA a partir de hidrogéis aniónicos para a temperatura de 25 °C. ....	63
Figura 5.3: Libertação da BSA estimulada pelo pH nos hidrogéis HG8 (pH=7,4) e HG10 (pH=2). ....	65
Figura 5.4: Concentração efetiva de BSA (mg/g) medida na solução aquosa. ....	66
Figura 5.5: Valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g de hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de AA por reagir (Concentração de BSA corrigida). ....	66

Figura 5.6: Concentração normalizada de BSA libertada, usando como referência o máximo que seria possível observar.....	66
Figura 5.7: Frascos de análise cromatográfica (~2 mL) colocados no interior do GPC. Esta análise foi usada de forma preliminar para quantificar a BSA em solução. ....	67
Figura 6.1: Ilustração fotográfica dos diversos reagentes usados nas diferentes sínteses dos hidrogéis HG12, HG13, HG14 e HG15. ....	72
Figura 6.2: Ilustração fotográfica dos hidrogéis HG12, HG13, HG14 e HG15, respetivamente. ....	73
Figura 6.3: Ilustração fotográfica do processo de libertação dos hidrogéis HG12 (termossensível), HG13 (aniónico) e HG14 (catiónico) quando colocados a 40 °C, numa solução aquosa a pH=10 e pH=2, respetivamente.....	73
Figura 6.4: Representação esquemática idealizada para a variação da razão de inchamento de hidrogéis aniónicos e catiónicos em soluções aquosas com diferentes valores de pH e a representação de hidrogéis termosensíveis em soluções aquosas com diferentes valores de temperatura, respetivamente.....	75
Figura 6.5: Curva modelo para o estudo da libertação da BSA a partir de hidrogéis DMAEMA. O hidrogel HG15 foi usado como referência para a determinação do efeito do monómero na absorção UV (branco). ....	75
Figura 6.6: Libertação da BSA estimulada pela temperatura no hidrogel HG12. ....	77
Figura 6.7: Libertação da BSA estimulada pelo pH no hidrogel HG13. ....	78
Figura 6.8: Libertação da BSA estimulada pelo pH no hidrogel HG14. ....	79
Figura 7.1: Ilustração fotográfica do processo de libertação de DNA imobilizado internamente a partir dos hidrogéis HG16 a HG21, respetivamente. A comparação visual dos frascos permite avaliar de forma simples a estrutura (colapso/inchamento) dos hidrogéis quando colocados em meios com diferente pH. ....	87
Figura 7.2: Efeito do processo de protonação nos grupos funcionais do polímero PDMAEMA. ....	88

Figura 7.3: Esquema representativo da cadeia de DNA em hélice dupla. Regras de emparelhamento das bases A=T (duas ligações hidrogénio) e G=C (três ligações hidrogénio) [70].	89
Figura 7.4: Curva de calibração de DNA em soluções contendo glucose (esquerda) e $W_{DI}$ (direita) obtida por espectroscopia de ultravioleta (UV) em modo fechado usando o comprimento de onda $\lambda=260$ nm.	90
Figura 7.5: Ilustração fotográfica das soluções de DNA em $W_{DI}$ (frente) e em Glucose (atrás) bem como a solução contendo 5 % de glucose (direita).	91
Figura 7.6: Etapas envolvidas na separação líquido-sólido da solução contendo DNA em glucose e $W_{DI}$ .	93
Figura 7.7: Ilustração fotográfica das soluções de DNA, do hidrogel após a adição de 1 mL de água desionizada (DI), hidrogel ao fim de 24 horas de absorção e inchamento dos hidrogéis no final de todo o processo após 60 minutos, respetivamente.	94
Figura 7.8: Ilustração fotográfica das diferentes etapas do estudo em SPE. Primeiramente observa-se as soluções de baixa concentração (Teste 1 e 6) com o hidrogel protonado, seguidamente as soluções de elevada concentração (Teste 4 e 9) com hidrogel não protonado e protonado, respetivamente.	94
Figura 7.9: Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA em modo <i>batch</i> . Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA <i>Binding</i> ) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e $W_{DI}$ (direita), para as amostras recolhidas nas diferentes concentrações no tempo 0 (após 30 minutos). Testes 1 a 10 descritos na Tabela 7-3.	95
Figura 7.10: Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA em modo <i>batch</i> . Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA <i>Binding</i> ) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e $W_{DI}$ (direita), para as amostras recolhidas nas diferentes concentrações no tempo 1 (após 18 horas). Testes 1 a 10 descritos na Tabela 7-3.	96
Figura 7.11: Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA em modo <i>batch</i> . Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA <i>Binding</i> ) que	

efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e  $W_{DI}$  (direita), para as amostras recolhidas nas diferentes concentrações no tempo 2 (após 74 horas). Testes 1 a 10 descritos na Tabela 7-3. .... 96

Figura 7.12: Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA protonadas em modo SPE. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e  $W_{DI}$  (direita). Condições de imobilização semelhantes às descritas nos testes 4 e 9 da Tabela 7-3. .... 97

Figura 7.13: Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA não protonadas em modo SPE. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e  $W_{DI}$  (direita). Condições de imobilização semelhantes às descritas nos testes 4 e 9 da Tabela 7-3. .... 97

Figura 7.14: Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA protonadas em modo SPE. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e  $W_{DI}$  (direita). Condições de imobilização semelhantes às descritas nos testes 1 e 6 da Tabela 7-3. .... 97

Figura 7.15: % DNA *Binding* em soluções protonadas e não protonadas de DNA na concentração de 0,8 mg/mL em glucose e em  $W_{DI}$ . .... 98

Figura 7.16: % DNA *Binding* na solução protonada de baixa concentração (Teste 1 e 6) e na solução de elevada concentração (Teste 4 e 9). .... 98

Figura 8.1: Representação esquemática do processo de impressão molecular interna (esquerda) e impressão molecular superficial (direita). Embora com alguma perda de proteção das macromoléculas imobilizadas, a impressão molecular superficial poderá conduzir a processos mais precisos e específicos de libertação de macromoléculas como as proteínas. .... 103

# Índice de Tabelas

Tabela 4-1. Descrição e quantidades referentes aos reagentes usados na imobilização de BSA em hidrogéis NIPA.....	36
Tabela 4-2. Condições experimentais na imobilização de BSA em hidrogéis inteligentes sensíveis à temperatura (Parâmetros Relativos).....	37
Tabela 4-3. Condições de libertação de BSA imobilizada em hidrogéis PNIPA. ....	40
Tabela 5-1. Descrição e quantidades dos reagentes usados na imobilização de BSA em hidrogéis aniônicos, utilizando o monómero Ácido Acrílico. ....	59
Tabela 5-2. Condições experimentais na imobilização de BSA em hidrogéis inteligentes sensíveis ao pH (Parâmetros Relativos).....	60
Tabela 5-3. pH da solução final antes da polimerização, pH da solução-tampão e pH de $W_{DI}$ preparada para os diferentes hidrogéis aniônicos.....	61
Tabela 6-1. Descrição e quantidades referentes aos reagentes usados na imobilização de BSA em hidrogéis termosensíveis, aniônicos e catiónicos. ....	70
Tabela 6-2. Condições experimentais na imobilização de BSA em hidrogéis inteligentes sensíveis à temperatura e ao pH (Parâmetros Relativos). ....	71
Tabela 6-3. Condições de libertação da BSA imobilizada em hidrogéis termosensíveis, aniônicos e catiónicos.....	74
Tabela 7-1. Descrição e quantidades referentes aos reagentes usados na imobilização de DNA em hidrogéis catiónicos (baseados em monómeros DMAEMA).....	85
Tabela 7-2. Condições experimentais na imobilização interna de DNA em hidrogéis inteligentes (catiônicos).....	86
Tabela 7-3. Quantidades de hidrogel de DMAEMA, massa de DNA e massa de solução (glucose ou $W_{DI}$ ) incluídas em cada frasco no processo de DNA <i>Binding</i> em modo <i>batch</i> .....	91

# Índice de Anexos

Anexo 1: Liberação de BSA estimulada pela temperatura (hidrogel colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de liberação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG1..... I

Anexo 2: Liberação de BSA estimulada pela temperatura (hidrogel colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$  com incorporação de NaCl aquando da sua polimerização). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de liberação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG2..... II

Anexo 3: Liberação de BSA estimulada pela temperatura (hidrogel colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$  com incorporação de NaCl aquando da sua polimerização). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de liberação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG4..... III

Anexo 4: Liberação de BSA estimulada por meio de duas temperaturas distintas (inicialmente o hidrogel foi colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguidamente a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  com incorporação de NaCl aquando da sua polimerização). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura

(expressa em mg/g hidrogel) do hidrogel colocado em ambas as temperaturas. Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG4. ....IV

Anexo 5: Libertação de BSA estimulada pela temperatura (hidrogel colocado numa solução aquosa a T=25 °C). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG5..... V

Anexo 6: Libertação de BSA estimulada por meio de duas temperaturas distintas (inicialmente o hidrogel foi colocado numa solução aquosa a T=25 °C, seguidamente a T=40 °C). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel) do hidrogel colocado em ambas as temperaturas. Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG5. .... VI

Anexo 7: Libertação de BSA estimulada pela temperatura e pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 7 a T=25 °C). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG6. ....VII

Anexo 8: Libertação de BSA estimulada por meio de duas temperaturas distintas e pelo pH (inicialmente o hidrogel foi colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguidamente a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  em solução de pH 7). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel) do hidrogel colocado em ambas as temperaturas. Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG6..... VIII

Anexo 9: Libertação de BSA estimulada pela temperatura e pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 7 a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG7. .... IX

Anexo 10: Libertação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 2). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG16..... X

Anexo 11: Libertação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 7). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram

obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG17.....XI

Anexo 12: Libertação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 10). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG18.....XII

Anexo 13: Libertação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 2). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG19..... XIII

Anexo 14: Libertação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 7). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG20..... XIV

Anexo 15: Libertação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 10). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como

referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel HG21.....	XV
Anexo 16: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em glucose de 0,2287 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 1 da Tabela 7-3. ....	XVI
Anexo 17: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em glucose de 0,4065 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 2 da Tabela 7-3. ....	XVI
Anexo 18: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em glucose de 0,5905 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 3 da Tabela 7-3. ....	XVI
Anexo 19: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em glucose de 0,8150 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 4 da Tabela 7-3. ....	XVI
Anexo 20: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em glucose de 1,0361 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 5 da Tabela 7-3. ....	XVI
Anexo 21: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em $W_{DI}$ de 0,2043 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 6 da Tabela 7-3. ....	XVII
Anexo 22: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em $W_{DI}$ de 0,4361 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 7 da Tabela 7-3. ....	XVII
Anexo 23: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em $W_{DI}$ de 0,6057 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 8 da Tabela 7-3. ....	XVII
Anexo 24: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em $W_{DI}$ de 0,8593 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 9 da Tabela 7-3. ....	XVII
Anexo 25: % DNA <i>Binding</i> para a concentração de DNA em $W_{DI}$ de 1,0192 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 10 da Tabela 7-3. ....	XVII
Anexo 26: Caracterização por GPC de uma solução contendo proteína BSA com detecção UV a 223 nm.....	XVIII
Anexo 27: Caracterização por GPC de uma solução contendo proteína BSA com detecção UV a 277 nm.....	XIX

Anexo 28: Análise comparativa da caracterização por GPC de uma solução contendo proteína BSA com detecção UV a 223 e 277 nm.....	XX
Anexo 29: Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=7 do hidrogel HG8. .....	XXI
Anexo 30: Caracterização por GPC da 9ª amostra recolhida da solução a pH=7 do hidrogel HG8. ....	XXII
Anexo 31: Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=7 do hidrogel HG9 (sem inclusão de BSA). ....	XXIII
Anexo 32: Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10. ....	XXIV
Anexo 33: Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10 (hidrogel sujeito a diluição em 10 vezes). ....	XXV
Anexo 34: Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10 (hidrogel sujeito a diluição em 20 vezes). ....	XXVI
Anexo 35: Caracterização por GPC da 1ª amostra recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10. ....	XXVII
Anexo 36: Caracterização por GPC da 8ª amostra recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10 (hidrogel sujeito a diluição em 10 vezes). ....	XXVIII
Anexo 37: Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=10 do hidrogel HG11 (hidrogel sujeito a diluição em 10 vezes). ....	XXIX
Anexo 38: Caracterização por GPC da 8ª amostra recolhida da solução a pH=10 do hidrogel HG11. ....	XXX
Anexo 39: Caracterização por GPC de uma solução contendo monómero NIPA. ....	XXXI
Anexo 40: Caracterização por GPC de uma solução contendo monómero AA.....	XXXII
Anexo 41: Caracterização por GPC de uma solução contendo monómero DMAEMA. ....	XXXIII

Anexo 42: Caracterização por GPC de uma amostra referente à libertação de BSA em HG12. .....	XXXIV
Anexo 43: Caracterização por GPC de uma amostra referente à libertação de BSA em HG13. .....	XXXV
Anexo 44: Caracterização por GPC de uma amostra referente à libertação de BSA em HG14. .....	XXXVI
Anexo 45: Caracterização por GPC de uma amostra referente ao processo de purificação de HG15. ....	XXXVII
Anexo 46: Caracterização por GPC de uma solução aquosa de DNA (com filtração). XXXVIII	
Anexo 47: Caracterização por GPC de uma solução aquosa de DNA (sem filtração). ..	XXXIX
Anexo 48: Ilustração fotográfica do equipamento de GPC (deteção simultânea de quatro sinais) utilizado na análise de amostras. ....	XL
Anexo 49: Ilustração fotográfica da coluna de fracionamento A2000 (opcional). ....	XL
Anexo 50: Ilustração fotográfica do espectrofotómetro (UV-VIS V-530) da marca <i>JASCO</i> usado ao longo de todo o estudo na análise das amostras recolhidas bem como do software <i>SPECTRA MANAGER</i> . ....	XLI
Anexo 51: Ilustração fotográfica da balança analítica utilizada ao longo dos procedimentos experimentais. A pesagem rigorosa de todos os componentes utilizados na síntese dos hidrogéis é de extrema importância na obtenção de bons resultados. Também se pode visualizar as várias soluções de BSA utilizadas para a determinação da curva de calibração de BSA. ....	XLI
Anexo 52: Ilustração fotográfica da Albumina de Soro Bovino (BSA). Produto adquirido à Sigma Aldrich. ....	XLII
Anexo 53: Ilustração fotográfica do monómero NIPA. Monómero utilizado na síntese de hidrogéis sensíveis à temperatura. Produto adquirido à Sigma Aldrich. ....	XLII
Anexo 54: Ilustração fotográfica do reticulante (MBAm) e catalisador (TEMED), respetivamente, necessários na síntese de hidrogéis. Produtos adquiridos à Sigma Aldrich. ....	XLIII

Anexo 55: Ilustração fotográfica do iniciador (APS) utilizado no processo de síntese de hidrogéis.....	XLIII
Anexo 56: Ilustração fotográfica do processo de borbulhamento do monómero com argon durante a polimerização. Desta forma, realiza-se a remoção de O <sub>2</sub> (que funciona como inibidor) de modo a manter o meio reacional desgasificado.....	XLIV
Anexo 57: Ilustração fotográfica do processo de síntese do hidrogel HG1 (BSA/NIPA) por FRP à temperatura de 25 °C.....	XLIV
Anexo 58: Ilustração fotográfica de um material contendo BSA após a sua polimerização a 25 °C e com a adição de 100 mL de W <sub>DI</sub> .....	XLIV
Anexo 59: Ilustração fotográfica do instrumento de vácuo no processo de filtragem do polímero.....	XLIV
Anexo 60: Ilustração fotográfica dos polímeros MIH e NIH, respetivamente. Após inchamento em 10 mL de W <sub>DI</sub> contendo BSA.....	XLV
Anexo 61: Ilustração fotográfica dos polímeros MIH e NIH, respetivamente, após secagem depois de absorção de BSA.....	XLV
Anexo 62: Ilustração fotográfica dos polímeros MIH e NIH, respetivamente, obtidas por microscópio eletrónico antes de secagem para posterior libertação de BSA.....	XLV
Anexo 63: Ilustração fotográfica do aspeto morfológico dos hidrogéis MIH (HG1) e NIH (HG3) sintetizados neste trabalho.....	XLVI
Anexo 64: Ilustração fotográfica do aspeto morfológico dos hidrogéis HG2 e HG4 sintetizados neste trabalho.....	XLVI
Anexo 65: Ilustração fotográfica do aspeto morfológico do hidrogel HG5 sintetizado neste trabalho. (Amostras após libertação a 25 e 40 °C, respetivamente).....	XLVII
Anexo 66: Ilustração fotográfica do aspeto morfológico do hidrogel HG6 sintetizado neste trabalho. (Amostras após libertação a 25 e 40 °C, respetivamente).....	XLVII
Anexo 67: Ilustração fotográfica do monómero AA. Monómero utilizado na síntese de hidrogéis sensíveis ao pH. Produto adquirido à Sigma Aldrich.....	XLVIII

Anexo 68: Ilustração fotográfica do reagente ácido clorídrico (HCl) e soda caustica (NaOH), respetivamente, utilizados na síntese de hidrogéis aniônicos e na preparação de soluções- tampão ácidas e básicas.....	XLVIII
Anexo 69: Ilustração fotográfica do processo de medição de pH das soluções com recurso a um elétrodo de pH.....	XLIX
Anexo 70: Ilustração fotográfica do processo de libertação da BSA a partir de hidrogéis aniônicos quando colocados em soluções aquosas com diferentes valores de pH.....	XLIX
Anexo 71: Filtros utilizados nos testes de libertação controlada de agentes bioativos. São da marca <i>Whatman</i> com membrana de celulose, específicos para sistemas aquosos, e com porosidade de 0,45 micron.....	L
Anexo 72: Ilustração fotográfica da centrífugadora utilizada na preparação de amostras.....	L
Anexo 73: Aspeto morfológico do hidrogel HG15 (sem inclusão de BSA) quando colocado em metanol para purificação da rede (lado esquerdo) e aspeto do hidrogel depois de ser levado à estufa de vácuo a secar (lado direito).....	LI
Anexo 74: Estufa de vácuo usada no processo de secagem de hidrogéis.....	LI
Anexo 75: Ilustração fotográfica do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) de salmão. Produto adquirido à Sigma Aldrich.....	LII
Anexo 76: Ilustração fotográfica do iniciador (VA044) utilizado no processo de síntese de hidrogéis.....	LII
Anexo 77: Ilustração fotográfica dos reagentes utilizados na preparação de soluções-tampão. .....	LIII
Anexo 78: Ilustração fotográfica da solução de HCl, solução de PDMAEMA protonada e do polímero pré-sintetizado seco, respetivamente.....	LIII
Anexo 79: Estruturas químicas e propriedades de monómeros e reticulantes usados na síntese de hidrogéis.....	LIV
Anexo 80: Estruturas químicas e propriedades dos iniciadores e catalisadores usados na síntese de hidrogéis.....	LV

Anexo 81: Estruturas tridimensionais e propriedades das moléculas alvo utilizadas neste trabalho..... LVI

# Capítulo 1. Introdução

## 1.1 Motivação

Através deste estudo pretende-se avaliar a utilidade de hidrogéis inteligentes em áreas bastantes importantes como a Medicina, nomeadamente no tratamento de doenças onde a libertação controlada e a libertação localizada de fármacos podem ter um papel crítico. De facto, a tecnologia de libertação de princípios ativos tem evoluído bastante nos últimos anos de modo a tentar ultrapassar algumas falhas dos sistemas de libertação convencionais. A dificuldade em manter os níveis de agentes terapêuticos dentro de um intervalo de concentrações (de modo a evitar a toxicidade inerente ao seu excesso) exemplifica as limitações associadas a muitos tipos de tratamentos. Para além disso, agentes ativos que necessitam de administração frequente, ou contínua, de modo a conseguir-se um efeito longo e prolongado, muitas vezes traduzem-se no desconforto do paciente, ou na necessidade de utilização de cateteres, para aplicação de dispositivos externos. Com a utilização de sistemas de libertação controlada, através de uma dose apenas, consegue suster-se os níveis de agentes ativos dentro dos patamares desejados e por longos períodos de tempo [1]. Sabe-se que para o tratamento de cancro, a administração oral de sistemas que possibilitam uma libertação controlada e local apresenta enormes vantagens relativamente às técnicas convencionais. No entanto, a aplicação destes sistemas é algo complexo devido às barreiras químicas, físicas e fisiológicas presentes no estômago e intestino delgado. Com a degradação ou absorção do princípio ativo nesses locais, o mesmo interage com tecidos e células saudáveis, dando origem a efeitos adversos e originando que a quantidade disponível nas zonas alvo não seja suficiente para garantir a eficácia do tratamento. Em consequência, têm sido desenvolvidas novas estratégias para proteger o princípio ativo, por exemplo das condições adversas do estômago e intestino delgado, minimizando a sua libertação nesses locais. Muitas dessas estratégias passam pela consideração de polímeros biodegradáveis. Esta classe de polímeros tem sido muito utilizada, desde há vários anos, uma vez que aumenta a ação terapêutica dos princípios ativos no organismo, não sendo necessária uma posterior remoção do sistema [2]. Os polímeros possuem diversas propriedades úteis neste contexto, sendo possível conjugá-las e criar sistemas de libertação controlada (ex. no cólon), que protegem o princípio ativo até este ser libertado. Por exemplo, a utilização de polímeros com propriedades específicas tais como a dissolução apenas em meios alcalinos ou a sua degradação por determinados microorganismos presentes no cólon, origina sistemas de libertação cada vez

mais eficazes. O presente trabalho irá focar-se apenas no estudo de agentes terapêuticos biológicos, considerando como macromoléculas modelo a proteína BSA (albumina de soro bovino) e o DNA de salmão. Uma das aplicações mais importantes no recurso aos polímeros biodegradáveis contendo proteínas deriva da sua proteção em ambientes adversos. Estes polímeros operam como transportadores capazes de direcionar o agente terapêutico (ex. proteína), diretamente nos órgãos, tecidos e células [3]. O direcionamento proporciona seletividade e menos toxicidade. Doenças genéticas adquiridas durante a vida, como o cancro, doenças do coração e infeções virais têm sido alvos importantes de estudos recentes em Terapia Genética. Genericamente, nesta área, utilizam-se novos genes com recurso a material genético disponível (vacinas de DNA) na tentativa que possam interferir no metabolismo da célula cancerosa, bloquear a replicação viral ou simplesmente estimular o sistema de defesa imunológico [4]. Os polímeros inteligentes apresentam-se nesta área como potenciais veículos de transporte de genes, o que justifica a intensa atividade de investigação observada nos últimos anos sobre assunto.

### **1.2 Objetivos e Metodologia de Investigação**

O presente estudo enquadra-se no Mestrado de Tecnologia Biomédica, centrando-se principalmente na produção e caracterização de hidrogéis inteligentes, sensíveis a diversos estímulos, à escala laboratorial. Paralelamente, pretende-se conhecer e aplicar de forma aprofundada as diferentes técnicas de síntese, nomeadamente através da polimerização radicalar em fase aquosa (por FRP) e caracterização dos hidrogéis produzidos por espectroscopia UV-Vis, GPC, SPE, etc. O trabalho de investigação que resultou na presente dissertação foi precedido de uma ampla pesquisa bibliográfica. Deste modo, pretendeu-se adquirir um conhecimento global sobre o tema e ganhar sensibilidade para a avaliação dos resultados obtidos na componente experimental. Foi elaborada a planificação da componente experimental tendo em conta a escolha de casos de estudo com características distintas. Foi medida a dinâmica de variação da razão de inchamento dos hidrogéis provocada por estímulos (alterações) sobre a temperatura, o pH, ou temperatura e pH em simultâneo [5]. A variação da força iónica foi também testada através do uso de soluções aquosas com diferentes concentrações de sais (ex. NaCl). O processo de imobilização reversível de BSA ou de DNA de salmão, moléculas alvo, foi quantificado em diferentes condições envolventes, considerando também soluções aquosas de proteínas ou de DNA que procuram recriar meios biológicos. Procurou-se assim também avaliar a seletividade dos hidrogéis preparados tendo em vista

potenciais aplicações na purificação de biomacromoléculas. Ao longo do trabalho foi também realizado o tratamento, análise e discussão dos resultados obtidos nos diversos estudos realizados.

### **1.3 Limitações e Soluções Adotadas**

No que diz respeito ao princípio ativo, o seu tamanho e forma são muito importantes para a ocorrência da sua libertação, nomeadamente quando são visadas aplicações biomédicas. Caso a estrutura polimérica seja porosa e o tamanho dos poros seja superior ao tamanho da molécula de princípio ativo, a difusão é elevada. Caso o polímero tenha poros inferiores ao tamanho da molécula do princípio ativo ou não tenha poros, a difusão é bastante reduzida, devido ao impedimento sofrido pelas moléculas de princípio ativo no seu processo de libertação. Sabe-se que a velocidade de libertação tende a diminuir ao longo do tempo uma vez que o princípio ativo mais próximo da superfície vai ser libertado em primeiro lugar e mais rapidamente em comparação com o que se encontra no interior. Neste estudo foi provocado o inchamento/colapso dos materiais sintetizados (hidrogéis inteligentes) de forma a estudar este impacto na difusão das macromoléculas presentes no seu interior (ex. proteínas). De facto, a utilização de macromoléculas como o BSA e DNA afetou o seu processo de libertação uma vez que estes agentes bioativos difundem-se dificilmente na estrutura reticulada do hidrogel.

### **1.4 Organização dos Capítulos**

O projeto de tese intitulado “Preparação e Teste de Hidrogéis Inteligentes para a Imobilização Reversível de Proteínas e de DNA” envolveu o conhecimento de princípios de engenharia e das ciências da vida. Este documento encontra-se organizado em oito capítulos. Para além deste capítulo introdutório, onde são tecidas considerações sobre o tema abordado e explicitada a sua importância, é feito um enquadramento da temática a desenvolver, assim como traçados os objetivos a atingir. No segundo capítulo faz-se uma fundamentação teórica de toda a investigação realizada. Nesse capítulo é dada a definição de hidrogel, quais as suas possíveis composições químicas e propriedades que justificam a sua utilização para fins biomédicos. No terceiro capítulo são apresentados todos os métodos experimentais que permitiram não só a síntese mas também a caracterização dos hidrogéis. No quarto e quinto capítulo faz-se o estudo da imobilização e libertação de BSA em hidrogéis sensíveis à temperatura e pH, respetivamente. Seguidamente, no sexto capítulo, procede-se à descrição da imobilização e libertação comparativa de BSA em hidrogéis aniónicos (contendo AA), hidrogéis catiónicos (contendo

DMAEMA) e hidrogéis termosensíveis (baseados no monómero NIPA). Por fim, apresenta-se no sétimo capítulo toda a componente experimental relativa à imobilização e libertação de DNA em hidrogéis catiónicos baseados no monómero DMAEMA. As considerações finais e trabalhos futuros acerca da temática abordada são mencionados no oitavo capítulo e visam esclarecer e sistematizar toda a informação recolhida anteriormente. Por fim, enumeram-se as referências bibliográficas que serviram de base ao desenvolvimento do estudo exposto. Apresenta-se também em anexo a este documento principal alguma informação complementar que se considera relevante neste estudo, tal como gráficos obtidos pela técnica de GPC, equipamentos e materiais, bem como a tabela com as estruturas químicas e propriedades dos diversos elementos utilizados.

## Capítulo 2. Fundamentação Teórica

### 2.1 Introdução

Ao longo deste capítulo apresenta-se a fundamentação teórica relativa ao trabalho proposto. Procurar-se-á fazer a descrição das aplicações dos materiais poliméricos na área dos biomateriais. Sabe-se que a utilização de hidrogéis inteligentes, nomeadamente hidrogéis PNIPA, tem sido intensivamente estudada no que diz respeito à influência da estrutura e arquitetura molecular, bem como da morfologia dos materiais, na forma como estes respondem a estímulos que conduzem a mudanças de volume [6]. A imobilização convencional de agentes bioativos ocorre normalmente pela ligação irreversível destes aos hidrogéis, acabando por se aprisionarem no seu interior. Os hidrogéis convencionais são conhecidos pelo seu pequeno tamanho de matriz e por conseguinte não é possível carregá-los com moléculas de grandes dimensões como as proteínas ou o DNA num curto espaço de tempo. Por outro lado, na imobilização através de hidrogéis inteligentes, verifica-se que o inchamento/colapso tem sido usado para facilitar a transferência de massa entre o substrato e o produto imobilizado no hidrogel [6]. Através destes é possível imobilizar biomacromoléculas de forma eficiente. A administração de agentes bioativos pode ser melhorada e facilitada em áreas menos privilegiadas onde por vezes não existe supervisão médica, mantendo-se uma forma de dosagem capaz de assegurar o nível de dose, sem exceder o nível tóxico [7]. Assim, pretende-se em primeiro lugar proceder à síntese de hidrogéis inteligentes de estrutura adequada e seguidamente avaliar a função dessa matriz polimérica na imobilização reversível de biomacromoléculas.

### 2.2 Materiais Poliméricos como Biomateriais

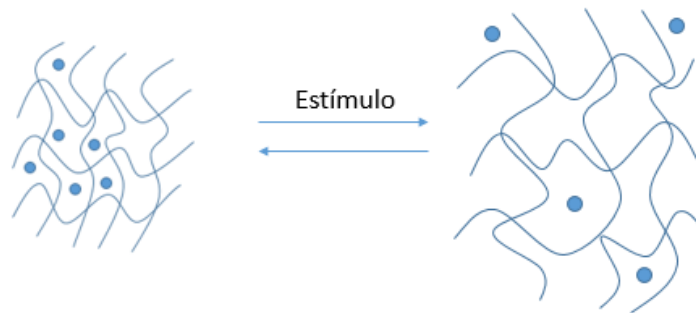
Os materiais poliméricos e a sua utilização quotidiana remontam à Antiguidade, sendo que, no entanto, nesse tempo, apenas eram utilizados materiais de origem natural, como o âmbar, a seda, a celulose, o amido e a borracha natural. Foi a partir do século XVIII, com a evolução da tecnologia de síntese em Química Orgânica, que a produção de novos polímeros de origem sintética e a modificação dos naturais já em uso aumentaram [8]. Biomateriais podem ser descritos como materiais de origem natural ou sintética que são passíveis de serem utilizados ou adaptados para uso médico, implicando a sua interação com sistemas biológicos. Neste contexto específico de aplicação, destacam-se quatro grupos distintos de materiais que podem

ser utilizados como biomateriais: cerâmicos, metais, polímeros e compósitos. O interesse em biomateriais como os polímeros prende-se com a sua facilidade de preparação, a grande variedade de compostos gerados por reações de polimerização e a sua biocompatibilidade. As suas aplicações na área da medicina são vastas, indo desde a oftalmologia (na criação de novas lentes), ortopedia, cardiologia e cirurgia cardiovascular, até aos sistemas de libertação controlada [8]. A utilização de polímeros tem vindo a aumentar na área médica com vista à substituição de materiais clássicos como os metais. Outro fator importante a considerar na utilização de polímeros como biomateriais é a sua biodegradação. Nos casos em que o polímero não se degrada dentro do corpo é necessário a remoção do mesmo com recurso à cirurgia, implicando um elevado custo e risco para o paciente [9]. Desta forma, o uso de polímeros biodegradáveis é muito importante. Este tipo de material degrada-se *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados pelo corpo. A degradação pode ocorrer através de um processo biológico ativo (através da participação de enzimas presentes no organismo), por meio passivo (como resultado de reações químicas) ou simplesmente pela solubilização do polímero [9]. Uma das propriedades mais importantes dos biomateriais é a sua capacidade de desempenhar uma função com uma resposta biológica nos tecidos adequados dentro da aplicação específica a que se destina, sendo designada por biocompatibilidade. Assim, estes materiais devem ser isentos de produzir qualquer tipo de resposta biológica adversa, de maneira que devem ser não-tóxicos, não-carcinogénicos, não-antigénicos, não-mutagénicos e não-trombogénicos [10].

### 2.3 Hidrogéis

Hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos capazes de reter uma grande quantidade de água ou fluídos “biológicos”, mantendo-se sempre no estado sólido, uma vez que são insolúveis devido às suas características físico químicas. Assim, os hidrogéis podem inchar dramaticamente na presença de uma solução aquosa [11]. Embora a definição de “hidrogéis macroporosos” tenha vindo a ser amplamente discutida, em geral eles são definidos como hidrogéis com poros maiores que 50 nm [12-14]. Devido à sua composição, os hidrogéis podem ser divididos em hidrogéis poliméricos naturais ou sintéticos, ou uma combinação das duas classes anteriores [14, 15]. Se os compararmos com os hidrogéis convencionais, verificamos que os hidrogéis macroporosos têm uma taxa de inchamento muito superior. Por exemplo, as suas taxas de inchamento (medidas como o tempo necessário para atingir um determinado nível de inchamento máximo) estão dentro de minutos, enquanto no caso dos hidrogéis convencionais

é uma questão de horas ou dias. Isto deve-se ao facto de o inchamento dos hidrogéis ser controlado por difusão dos solutos para dentro e para fora da matriz de gel, sendo muito mais fácil e mais rápido o soluto passar através de poros de grandes dimensões, como acontece no caso dos hidrogéis macroporosos [14]. Atualmente tem-se observado um interesse crescente em hidrogéis preparados a partir de polissacarídeos. Estes não são mais do que hidratos de carbono nos quais ocorre uma repetição da sua unidade estrutural, um sacarídeo. A sua elevada hidrofiliicidade, a facilidade com que se consegue produzir hidrogéis a partir deles e a sua biocompatibilidade têm feito destes materiais um objeto de estudo extremamente utilizado na preparação de hidrogéis para fins biomédicos [9]. Hennik considerou que um hidrogel de dextrano biodegradável que se baseia em interações físicas é particularmente adequado na libertação controlada de proteínas biologicamente ativas [12]. Outras áreas em que os hidrogéis têm um papel de elevada importância são na engenharia de tecidos (*scaffolds*), em curativos para ferimentos e queimaduras, regeneração e reparação de órgãos, sistemas de libertação controlada de agentes terapêuticos (fármacos ou genes) e em superfícies termosensíveis [10, 16].



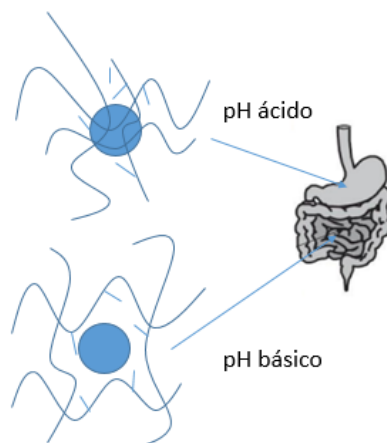
**Figura 2.1:** Representação esquemática do processo de libertação de um princípio ativo, aprisionado num hidrogel, quando este é submetido a um dado estímulo (adaptado de [1]).

Ambientalmente, os hidrogéis sensíveis têm a capacidade de responder a uma série de estímulos fisiológicos do organismo (Figura 2.1) [17]. Podendo apresentar alterações dramáticas no seu comportamento de inchamento, na sua estrutura de rede, permeabilidade, resistência mecânica em resposta a alterações no pH, força iónica do líquido circundante, carga elétrica, luz UV-Vis ou até mesmo na temperatura [1, 14, 18].

## 2.4 Hidrogéis Inteligentes

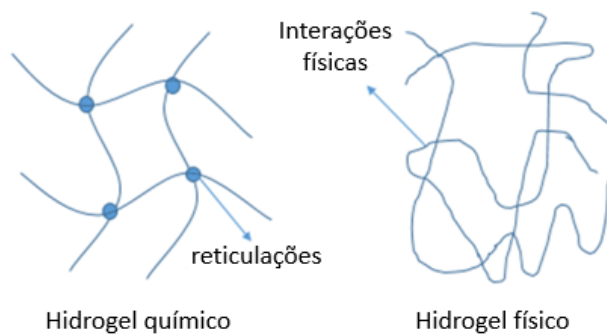
Hidrogéis inteligentes são hidrogéis que incham e colapsam reversivelmente devido a pequenas alterações nas condições ambientais, tais como a temperatura, o pH, o campo elétrico e

magnético, a luz na região UV-Vis, a pressão, a força iônica, o solvente, etc. [11, 19]. A temperatura e o pH são variáveis amplamente utilizadas uma vez que são estímulos fáceis de controlar [12, 20]. O exemplo mais comum de estímulo térmico é a elevação da temperatura corporal sob condições febris provocadas por pirogêneos. Variações de pH estão presentes no corpo humano, em diferentes órgãos, tecidos e compartimentos celulares, ou até mesmo em áreas tumorais. Estas variações tornam-se óbvias no trato gastrointestinal, onde o pH passa de ácido (pH=2) no estômago, a básico (pH=5-8) no intestino (Figura 2.2) [16].



**Figura 2.2:** Esquema do comportamento de um hidrogel sensível ao pH (adaptado de [21]).

Hidrogéis físicos têm uma importância diferente dos hidrogéis químicos. Enquanto os primeiros formam redes transientes que poderão ser “dissolvidas” por adição de aditivos e contêm ligações iônicas na sua constituição, os hidrogéis químicos mantêm a sua integridade por períodos normalmente maiores, não são reversíveis, contêm ligações covalentes e necessitam de um iniciador para a reação (Figura 2.3) [16]. De todos os polímeros existentes, na Química, a N-isopropilacrilamida (PNIPA) representa talvez o polímero mais amplamente estudado, pois responde facilmente às variações de temperatura e pH [5]. O hidrogel PNIPA exibe uma temperatura de transição de cerca de 36 °C quando em solução aquosa [12, 14].



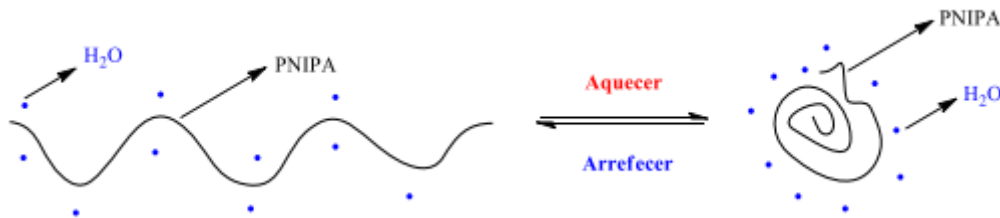
**Figura 2.3:** Estruturas representativas de um hidrogel químico e físico, respectivamente (adaptado de [16]).

## 2.5 Tipos de Hidrogéis Sensíveis à Temperatura

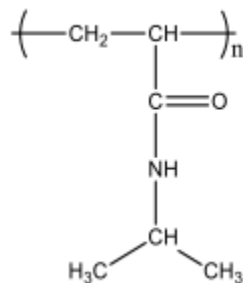
Os hidrogéis sensíveis à temperatura são provavelmente o tipo de hidrogéis mais estudados em sistemas de libertação de agentes terapêuticos. Estes hidrogéis têm a capacidade de inchar e colapsar com mudanças na temperatura do fluido envolvente, podendo ser classificados em hidrogéis termosensíveis negativos, termosensíveis positivos ou termoreversíveis [21, 22].

### 2.5.1 Hidrogéis Termosensíveis Negativos

Hidrogéis termosensíveis negativos têm uma temperatura de solução crítica inferior (LCST) e contraem com o aquecimento acima da mesma (Figura 2.4). São hidrogéis que mostram um comportamento *on/off* na libertação de agentes bioativos, *on* a baixas temperaturas e *off* a altas temperaturas, permitindo uma libertação pulsátil do agente bioativo [21, 23].



**Figura 2.4:** Esquema ilustrativo do comportamento reversível idealmente esperado para hidrogéis termosensíveis negativos com o aquecimento e o arrefecimento da solução aquosa que os contém [21].

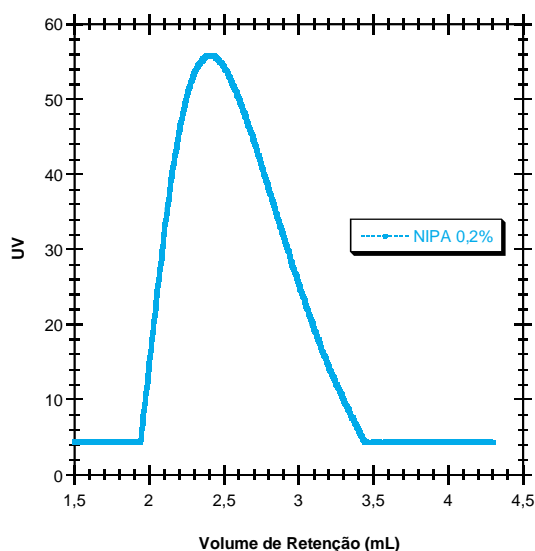


**Figura 2.5:** Estrutura química do polímero sensível à temperatura resultante da polimerização de NIPA [9].

A transição de fases da PNIPA é o resultado do balanço entre os grupos hidrofílicos e hidrofóbicos presentes nas cadeias poliméricas (Figura 2.5). Com a redução da temperatura, o carácter hidrofílico sobrepõe-se ao hidrofóbico, e vice-versa quando a temperatura aumenta. Com base neste aspeto, a estrutura e as propriedades da PNIPA podem ser alteradas. Uma solução aquosa de PNIPA gelifica para temperaturas acima de 32 °C. Abaixo deste valor, a entalpia, que é maioritariamente devida às ligações de hidrogénio entre os grupos polares do polímero e as moléculas de água, leva à total dissolução do polímero [9, 21].

Têm sido realizados diversos estudos de caracterização de géis à base de PNIPA para a sua aplicação como biomaterial. Alvarez-Lorenzo sintetizou um hidrogel contendo quitosano e PNIPA, na tentativa de introduzir uma maior biocompatibilidade do gel, mantendo, ao mesmo tempo, o seu carácter termosensível [9]. Por outro lado, Kurisawa desenvolveu com sucesso um vetor de base PNIPA para que ocorresse a transferência genética, favorecendo a temperaturas baixas a proteção de DNA, impedindo a DNase de degradar a cadeia genética [9, 24]. Outros estudos procuraram ainda verificar a compatibilidade do gel com o organismo permitindo a sua aplicação como biomaterial. Assim, foi estudada a citotoxicidade destes géis em culturas de células intestinais e do pulmão, obtendo-se resultados de baixa ou nenhuma toxicidade do polímero [9, 25, 26].

Na Figura 2.6 encontra-se a análise do monómero NIPA a 0,2 % pela técnica de GPC.



**Figura 2.6:** Cromatograma do monómero NIPA a 0,2% obtida pela técnica de GPC. Análise realizada numa coluna contendo o hidrogel AA sintetizado por este grupo de investigação (LSRE).

## 2.5.2 Hidrogéis Termosensíveis Positivos

Hidrogéis termosensíveis positivos têm uma temperatura de solução crítica superior (UCST). Estes contraem após arrefecimento abaixo da UCST. A razão de inchamento de redes de polímeros de PAA depende ligeiramente da temperatura de forma positiva [21].

## 2.5.3 Hidrogéis Termoreversíveis

São diversos os estudos efetuados com o objetivo de sintetizar e caracterizar hidrogéis com dupla sensibilidade. Tem sido conseguido através de copolimerização de monómeros termosensíveis, como a NIPA, com monómeros sensíveis ao pH, tais como o AA [21]. Neste

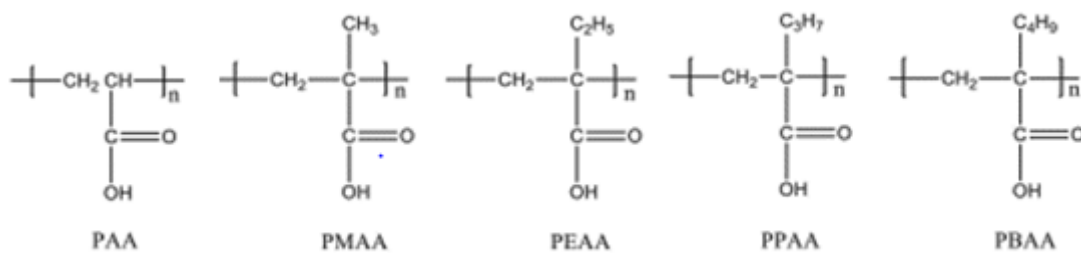
trabalho foram sintetizados hidrogéis sensíveis apenas a um estímulo individualmente. Esta nova classe de copolímeros consegue detetar mudanças ambientais no meio fisiológico e encontra potencial utilidade na libertação intracelular de agentes terapêuticos em que as pequenas diferenças de pH através da membrana endossomal desencadeiam a libertação de proteínas ou DNA [21].

## 2.6 Tipos de Hidrogéis Sensíveis ao pH

Os hidrogéis sensíveis ao pH são produzidos com base em polímeros que possuem grupos iónicos livres. A presença desses grupos, que em solução aquosa estão ionizados, origina forças de repulsão eletrostática, induzindo alterações na rede do polímero (expansão do polímero) [21]. O ácido acrílico (AA), estudado neste trabalho, é um exemplo de um polímero iónico sensível ao pH. O inchamento induzido pelo pH é observado também em polímeros naturais, tais como, albuminas, gelatinas e quitosano [21].

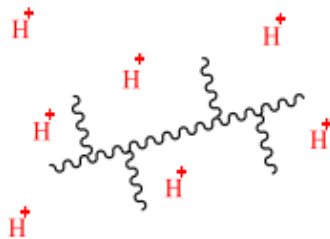
### 2.6.1 Hidrogéis Aniónicos

Redes de hidrogéis aniónicos são geralmente referidas como homopolímeros de ácidos carregados negativamente, monómeros aniónicos ou copolímeros de monómeros aniónicos e neutros. Os hidrogéis aniónicos são conhecidos pela sua capacidade de apresentar uma elevada razão de inchamento com o aumento do pH do meio envolvente [27]. Na Figura 2.7 observa-se um conjunto de polímeros vulgarmente utilizados na composição destes tipos de hidrogéis (redes tridimensionais desses polímeros).

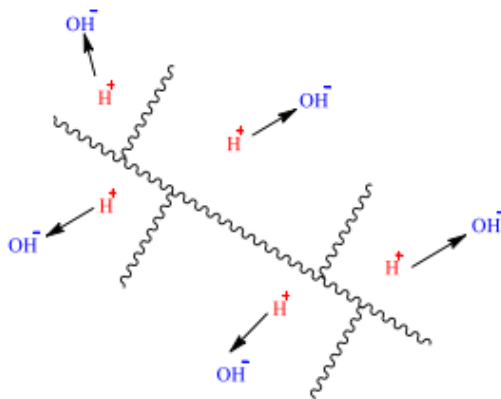


**Figura 2.7:** Exemplos de estruturas químicas de base de hidrogéis aniónicos com destaque no hidrogel baseado em Ácido Acrílico por se tratar do monómero base em estudo (adaptado de [21]).

Vários são os investigadores que têm estudado os comportamentos de inchamento dinâmico de hidrogéis aniónicos sensíveis ao pH. Geralmente, estes contêm grupos carboxílicos, tal como o AA [21]. Nas Figuras 2.8 e 2.9 são ilustrados os comportamentos esperados para os hidrogéis aniónicos em função do pH do meio circundante.



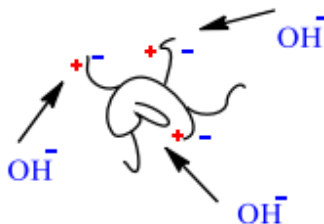
**Figura 2.8:** Representação esquemática do comportamento esperado para um hidrogel aniônico em meio ácido (contração da rede de polímero) [21].



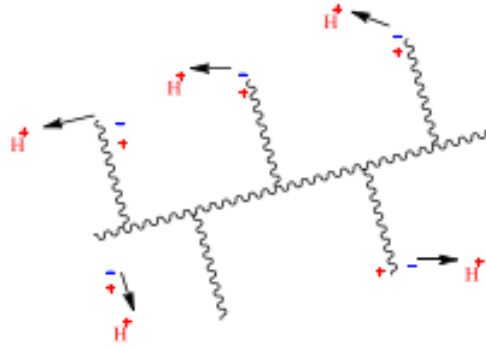
**Figura 2.9:** Representação esquemática do comportamento esperado para um hidrogel aniônico em meio alcalino (inchamento da rede de polímero) [21].

## 2.6.2 Hidrogéis Catiônicos

Homopolímeros básicos carregados positivamente, monómeros catiónicos ou copolímeros de monómeros catiónicos e neutros são geralmente referidos como redes de hidrogéis catiónicos. Redes de polímeros com grupos catiónicos funcionam contrariamente a redes de polímeros com grupos aniônicos, uma vez que permanecem colapsados em meio básico e inchados em meio ácido devido à repulsão eletrostática entre os grupos carregados positivamente [21]. Nas Figuras 2.10 e 2.11 são ilustrados os comportamentos esperados para os hidrogéis catiónicos em função do pH do meio circundante.

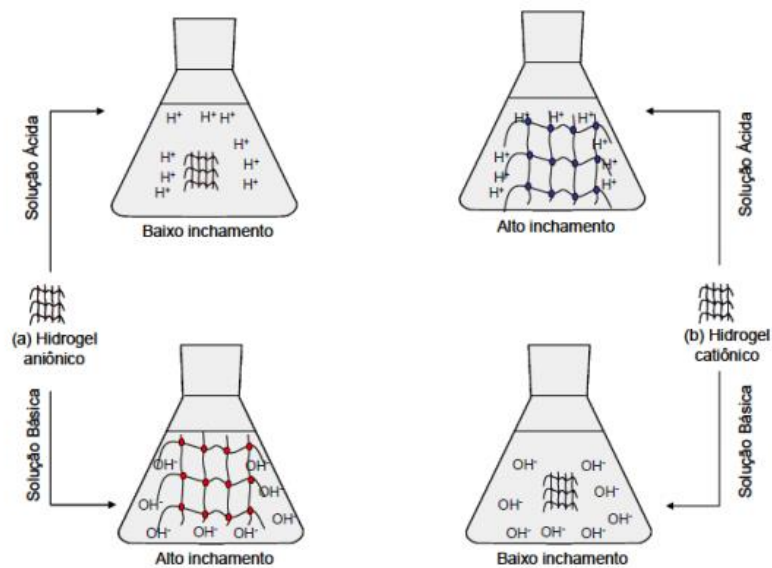


**Figura 2.10:** Representação esquemática do comportamento esperado para um hidrogel catiónico em meio alcalino (contração da rede de polímero) [21].



**Figura 2.11:** Representação esquemática do comportamento esperado para um hidrogel catiónico em meio ácido (inchamento da rede de polímero) [21].

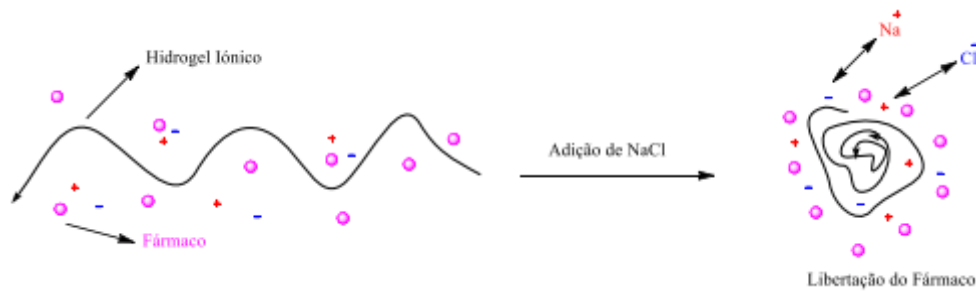
Na Figura 2.12 observa-se o comportamento de hidrogéis aniônicos e catiónicos quando colocados em soluções aquosas.



**Figura 2.12:** Esquema comparativo do comportamento de hidrogéis aniônicos e catiónicos em soluções ácidas e alcalinas [28].

## 2.7 Hidrogéis Sensíveis a Forças Iônicas

Devido ao movimento de íons, tanto os hidrogéis aniônicos como os catiónicos são sensíveis à variação de forças iônicas (concentração de sais), como se ilustra de forma simples na Figura 2.13.



**Figura 2.13:** Esquema ilustrativo do comportamento teoricamente esperado para hidrogéis iônicos em solução aquosa com adição de um sal (ex. NaCl). A eventual liberação de um agente terapêutico (fármaco, proteína ou DNA) pode ser promovida quando o hidrogel se encontra contraído, por ação do aumento da força iônica [21].

## 2.8 Sistemas Biológicos

A Natureza é constituída por um grande número de sistemas biológicos, tanto à macro como à microescala, cujas interações são a base de uma quantidade infindável de processos. As proteínas são um dos elementos fundamentais existentes na natureza [29]. Estas macromoléculas desempenham funções cruciais em essencialmente todos os processos biológicos, atuando como catalisadores, transportadores e armazenadores, fornecem apoio mecânico e proteção imunitária, transmitem impulsos nervosos, controlam o crescimento e diferenciação, entre outras funções. Outra classe muito importante de macromoléculas são os ácidos nucleicos [29]. Os ácidos nucleicos incluem o DNA e o RNA e são os responsáveis pela codificação, transmissão e expressão da informação genética. As proteínas têm a tendência de se associarem a outras macromoléculas, formando complexos estáveis que são a base de muitas funções celulares. Para tal, são essenciais as interações proteína-proteína, proteína-ligando e proteína-ácido nucleico. A correta compreensão deste tipo de interações, devido à sua importância, tem vindo a despertar grande interesse na comunidade científica [29].

## 2.9 Proteínas

As proteínas são biomoléculas de alto peso molecular existentes em todos os organismos vivos. São classificadas de acordo com a sua composição, dividindo-se em dois grandes grupos, proteínas simples e proteínas conjugadas [30]. Muitas proteínas são constituídas apenas por uma cadeia de aminoácidos, não apresentando nenhum outro grupo químico. Estas são consideradas proteínas simples, como a albumina. Entretanto, existem outras proteínas que além dos aminoácidos apresentam outros componentes químicos e são chamadas de proteínas conjugadas [31]. A parte não aminoacídica de uma proteína conjugada é chamada de grupo prostético. As proteínas conjugadas são classificadas de acordo com a natureza dos seus grupos

prostéticos, onde lipoproteínas contêm lípidos, glicoproteínas contêm moléculas de açúcar e metaloproteínas contêm um metal específico. Normalmente este grupo prostético irá desempenhar um papel importante na função das proteínas [31].

A biossíntese de uma proteína consiste num processo complexo de múltiplas reações em que intervêm o mRNA resultante da transcrição do gene codificante para a proteína, ribossomas, tRNA e fatores proteicos. A síntese de uma proteína biologicamente ativa está dependente de múltiplos fatores que estão associados, desde a transcrição do gene que codifica a proteína até às modificações na estrutura final que codificam a atividade da mesma [32].

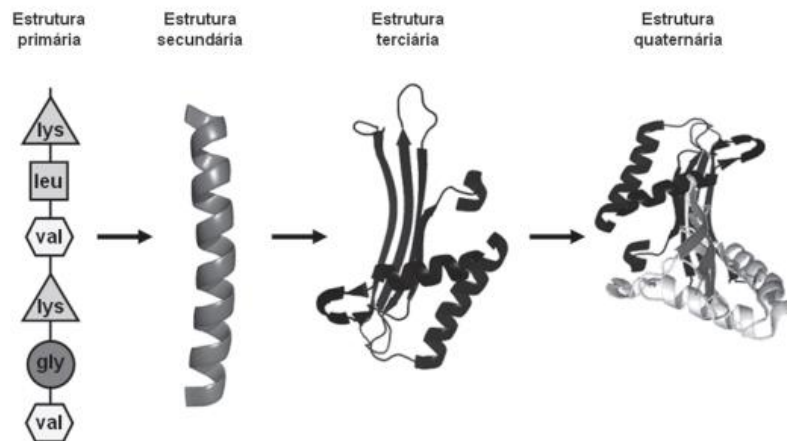
### **2.9.1 Forma**

Relativamente à forma das proteínas estas podem ser globulares, em que a cadeia polipeptídica enovela-se de maneira compacta, resultando numa molécula esférica e globular. São geralmente solúveis em água e desempenham diversas funções, como é o caso das enzimas, albumina, globulinas e a hemoglobina [31]. Por outro lado, quando a cadeia polipeptídica é arranjada em forma de longos cordões ou em forma de folhas, as proteínas designam-se por fibrosas. São geralmente insolúveis em água, sendo exemplo disso o colagénio [31].

### **2.9.2 Níveis de Organização Estrutural de Proteínas**

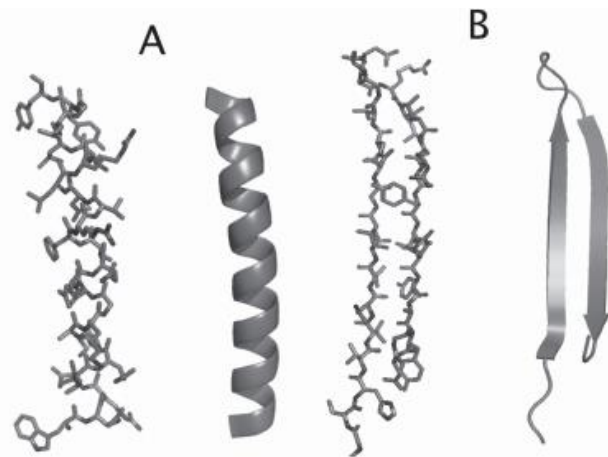
Muitas conformações diferentes são possíveis para uma macromolécula como é o caso das proteínas. Contudo, poucas são as conformações com atividade biológica, sendo chamadas de conformações nativas. Conceitualmente, a estrutura das proteínas pode ser dividida em quatro diferentes níveis de organização: primário, secundário, terciário e quaternário, tal como se observa na Figura 2.14 [31].

A sequência linear dos aminoácidos unidos por ligações peptídicas determina a estrutura primária das proteínas. Esta estrutura resulta numa longa cadeia de aminoácidos, com uma unidade amino numa extremidade ( $\text{NH}_2$ ) e uma unidade carboxil na outra extremidade ( $\text{COOH}$ ) [31]. A estrutura primária pode ser desfeita por meio da hidrólise química ou enzimática das ligações peptídicas, gerando peptídeos ou aminoácidos livres. Esta sequência contém toda a informação necessária para que a proteína se enovele alcançando a sua conformação nativa [31].



**Figura 2.14:** Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas [31].

A estrutura secundária das proteínas refere-se ao dobramento regular de regiões da cadeia polipeptídica [31]. Os dois tipos mais comuns de estrutura secundária são:  $\alpha$ -hélice e folha  $\beta$ -pregueada (Figura 2.15). As estruturas em  $\alpha$ -hélice apresentam-se em aspeto cilíndrico com arranjo helicoidal dos aminoácidos, que é mantido pelas ligações de hidrogénio paralelas ao eixo da hélice. Nas estruturas em folha  $\beta$ -pregueada, as ligações de hidrogénio formam-se entre as regiões adjacentes do polipeptídeo que estão na mesma direção (paralelas) ou em direções opostas (antiparalelas) [31].



**Figura 2.15:** Representação esquemática das estruturas secundárias. (A)  $\alpha$ -hélice e (B) folha  $\beta$ -pregueada [31].

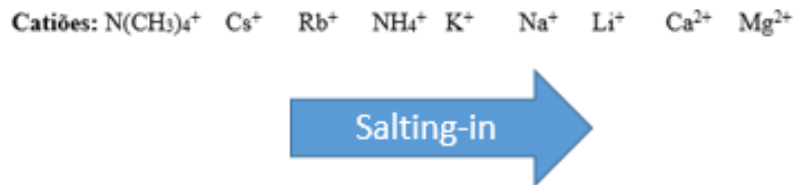
A estrutura terciária refere-se ao arranjo tridimensional de todos os aminoácidos da cadeia polipeptídica. A conformação nativa é mantida pelas múltiplas interações não covalentes que se formam entre os resíduos ou agrupamentos prostéticos. A proteína precisa ainda de estabelecer uma série de ligações não-covalentes entre as diferentes porções da cadeia polipeptídica [31]. Por fim, quando o arranjo estrutural é constituído por duas ou mais cadeias polipeptídicas com estruturas terciárias definidas, as proteínas apresentam-se na forma

quaternária. A natureza da interação entre as diferentes cadeias é do tipo não-covalente gerando desde um dímero (duas cadeias) até um oligômero (mais de duas cadeias) [31]. Cada unidade de uma estrutura quaternária é denominada de subunidade. Oligômeros podem ser do tipo homo-oligômeros (subunidades com a mesma estrutura primária) ou hétero-oligômeros (subunidades com diferentes estruturas primárias) [31].

### 2.9.3 Propriedades das Proteínas

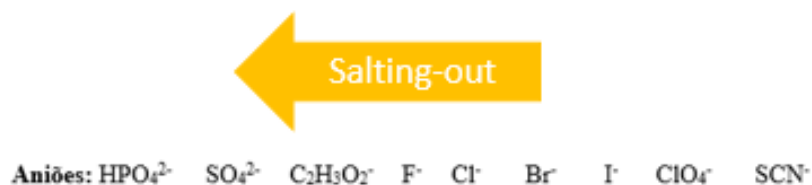
As proteínas apresentam várias propriedades que podem eventualmente ser afetadas pelo seu meio envolvente. Entre essas propriedades destacam-se as propriedades elétricas. Esta característica advém do facto de as cadeias laterais de alguns aminoácidos possuírem a capacidade de se ionizarem em soluções ácidas ou básicas [31]. As proteínas, assim como os peptídeos e aminoácidos constituintes, possuem pontos isoelétricos característicos, nos quais possuem uma carga líquida (soma das cargas positivas e negativas) igual a zero [31]. Por outro lado, existem diversos fatores externos que podem influenciar a solubilidade das proteínas. Esta depende diretamente da composição de aminoácidos da cadeia primária e da sua estrutura tridimensional, uma vez que a organização das cargas e dipolos presentes na molécula é influenciada. A solubilidade das proteínas de uma maneira em geral pode ser modificada por fatores como o pH, a força iónica ou a temperatura [31]. O pH afeta a natureza e a distribuição das cargas das proteínas. De um modo geral, as proteínas são mais solúveis em pH baixos (meios ácidos) ou elevados (meios alcalinos) devido ao excesso de cargas do mesmo sinal presentes na solução aquosa. Estas mesmas cargas irão produzir a repulsão entre as moléculas, o que diminui a formação de agregados (por interação eletrostática) e, além disso, contribui para uma maior solvatação [31]. Contudo, valores extremos de pH podem induzir a uma desnaturação proteica, expondo regiões hidrofóbicas, o que poderá gerar agregados (por interação hidrofóbica) levando a proteína à precipitação. Por outro lado, quando uma proteína se encontra num meio com um pH igual ao seu ponto isoelétrico, ou seja, quando apresenta uma carga líquida nula, a repulsão eletrostática entre as partículas diminui, possibilitando as interações proteína-proteína, gerando uma condição favorável para que as moléculas se aproximem, se unam e se precipitem [31]. Relativamente à força iónica, Hofmeister estudou o efeito da adição de sais a soluções aquosas de proteínas. Este estudo levou a concluir que os aniões, presentes nos solutos iónicos, em geral, têm um efeito bastante mais pronunciado do que os catiões [16]. A solubilidade de uma proteína pode variar de acordo com a concentração de sal à qual ela é submetida. Em baixas concentrações de sal, observa-se um aumento na

solubilidade das proteínas devido à presença de íões na solução. Este fenómeno é chamado de **Salting In** (Figura 2.16) e é caracterizado pela interação entre os íões salinos e os grupos carregados das proteínas, que conduzem à diminuição das interações eletrostáticas intermoleculares proteína-proteína [16].



**Figura 2.16:** Série de Hofmeister (adaptado de [16]).

Por outro lado, pode-se verificar um processo inverso, **Salting Out** (Figura 2.17), produzido pela elevada concentração salina. Este fenómeno conduz a uma diminuição da solubilidade, pois alguns sais, ao interagir com a água, removem a camada de solvatação das proteínas, o que facilita a formação de agregados que levam à sua precipitação [16].



**Figura 2.17:** Série de Hofmeister (adaptado de [16]).

Uma grande parte das proteínas é solúvel à temperatura ambiente. O aumento da temperatura até aos 40 °C em geral favorece a sua solubilidade. O aumento da energia cinética favorece a interação do soluto com o solvente, fazendo com que se alcance um equilíbrio dinâmico, o qual permite que a mesma quantidade de solvente presente no sistema possa participar na solvatação de uma maior quantidade de soluto [31]. A desnaturação também pode ocorrer a baixas temperaturas, sendo que cada proteína terá uma determinada estabilidade. Além disso, mudanças bruscas na temperatura podem levar à desnaturação proteica afetando o seu funcionamento e solubilidade [31].

## 2.10 Engenharia de Proteínas

Em sentido lato, a designação “Engenharia de Proteínas” refere-se ao projeto intencional e subsequente síntese de proteínas com propriedades novas e/ou melhoradas. Em sentido mais restrito e mais vulgarmente utilizado, está relacionada com a área de investigação em proteínas

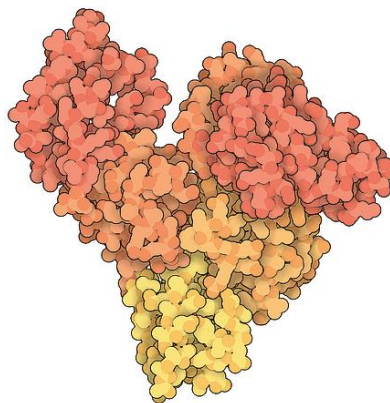
desenvolvida nos últimos 20 anos, como resultado dos desenvolvimentos na determinação da estrutura proteica, computação gráfica, modelação macromolecular e tecnologia do DNA recombinante [33]. Este ramo pode ser usado não só na obtenção de proteínas com melhores propriedades funcionais (atividade, especificidade ou estabilidade), mas também na localização de porções funcionais em proteínas já existentes. Os princípios que surgem da investigação em engenharia de proteínas relacionam a estrutura com a função e são aplicáveis não só às proteínas existentes, mas também ao projeto de produção de proteínas *de novo* [33]. A engenharia de proteínas é presentemente aplicada na indústria e no tratamento de doenças humanas. Normalmente a proteína de interesse é purificada e caracterizada, sendo posteriormente clonada e expressa num organismo hospedeiro apropriado, e modificada de forma a melhorar o seu desempenho [33].

### 2.10.1 Aplicações da Engenharia de Proteínas

A construção de proteínas híbridas com o objetivo de apresentar o antigénio ao sistema imunitário e desencadear uma resposta imunológica é um dos exemplos da aplicação da engenharia de proteínas à área da medicina/farmácia [33]. Existem no mercado vacinas híbridas contra a malária e a hepatite. Finalmente, a libertação direcionada de fármacos beneficiará fortemente do desenvolvimento de proteínas de fusão, projetadas de forma a ligarem-se seletivamente às células causadoras da doença, como, por exemplo, no tratamento de certos tumores [33].

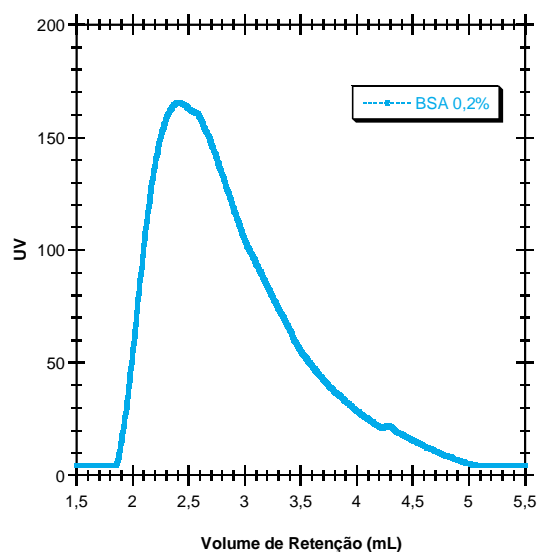
## 2.11 Albumina de Soro Bovino (BSA)

A albumina de soro bovino (BSA) (Figura 2.18) é uma proteína globular existente no plasma do sangue bovino. As forças que determinam a estrutura das proteínas globulares são as mesmas que atuam sobre todas as moléculas [34].



**Figura 2.18:** Estrutura tridimensional da proteína BSA [35].

Esta proteína é uma das proteínas mais estudadas e é a mais abundante no sangue bovino com uma concentração típica de 5 g/100 mL. A sua estrutura é muito similar à estrutura da HSA (*Human Serum Albumin*), apresentando uma percentagem de sequências idênticas de aminoácidos de 76% [34]. O seu peso molecular é de 66,462 g/mol, e o seu ponto isoelétrico (PI) encontra-se em volta dos 4,7-5,6 dependendo da bibliografia consultada [36]. O PI de uma molécula indica o pH no qual ela se encontra com a mesma quantidade de cargas positivas e negativas [37]. Sendo uma das suas principais funções a contribuição para a manutenção da pressão osmótica do sangue e do pH [38]. A análise GPC da BSA usada neste trabalho encontra-se representada na Figura 2.19.



**Figura 2.19:** Cromatograma da proteína BSA a 0,2% obtida pela técnica de GPC. Análise realizada numa coluna contendo o hidrogel AA sintetizado por este grupo de investigação (LSRE).

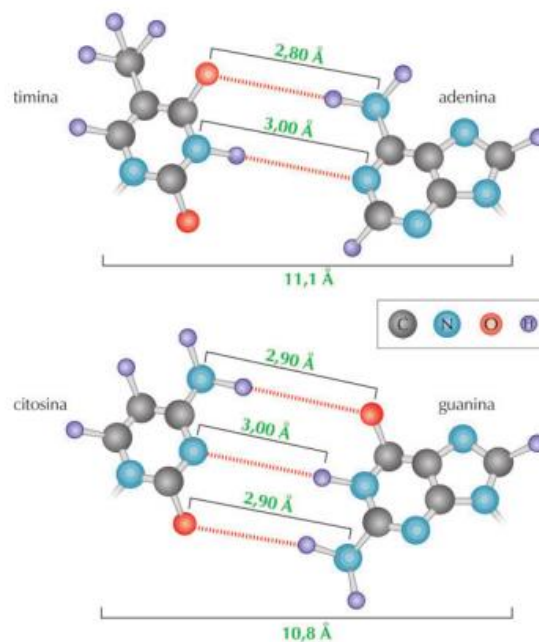
Vários investigadores têm estudado a estrutura e as propriedades da albumina sérica bem como as suas interações com outras proteínas com o intuito de compreender todas as suas funções no organismo. A BSA concentrada é usada no tratamento traumático e em choques hemorrágicos, em queimaduras muito extensas e em casos de perda contínua de proteínas [30].

## 2.12 Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

No início do século XX, pensava-se que polímeros denominados proteínas constituíam as moléculas responsáveis pelo transporte de informação hereditária de geração em geração. Tal noção devia-se sobretudo ao facto de as proteínas possuírem um alfabeto mais rico, composto por 20 aminoácidos, relativamente ao alfabeto do DNA composto por apenas 4 nucleótidos [39]. No entanto, nos anos 40, foi possível demonstrar através de experiências com bactérias

virulentas, que os genes eram compostos por DNA. Conclui-se que a molécula de DNA transporta toda a informação genética necessária para controlar as atividades celulares [39].

Em 1953, Watson e Crick descobriram a estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucleico. O DNA é uma macromolécula polimérica composta por duas cadeias de nucleótidos que formam uma dupla hélice. As duas cadeias da hélice estão presas por pontes de hidrogénio entre as bases. Um nucleótido é uma molécula composta por uma base nitrogenada, um açúcar pentose (desoxirribose no caso do DNA) e um grupo fosfato [40, 41]. Existem quatro tipos de nucleótidos de DNA os quais diferem apenas nas bases nitrogenadas: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) e Timina (T). Como a Adenina faz sempre par com a Timina e a Citosina com a Guanina, as duas cadeias de nucleótidos denominam-se complementares (Figura 2.20) [42].



**Figura 2.20:** Os pares de bases do DNA ligados por pontes de hidrogénio. A figura mostra a posição e o comprimento das pontes de hidrogénio entre os pares de bases. As ligações covalentes entre os átomos em cada base são mostradas, porém, as ligações duplas e simples não são distinguidas [42].

Através da combinação destes quatro tipos de bases heterocíclicas, o DNA codifica, juntamente com o RNA, toda a informação contida no genoma, segundo as condições do meio (pH, hidratação ou força iónica) [42]. O ácido desoxirribonucleico (DNA), utilizado neste estudo, foi obtido a partir de testículos de salmão da espécie *Oncorhynchus keta*. A percentagem (%) de teor de guanina-citosina (G-C) é indicado como sendo de 41,2 %. A sua massa molecular é de  $1,3 \times 10^6$  Da, ou seja, contem aproximadamente 2000 bp (pares de bases) [43].



## Capítulo 3. Métodos de Síntese e Caracterização de Hidrogéis

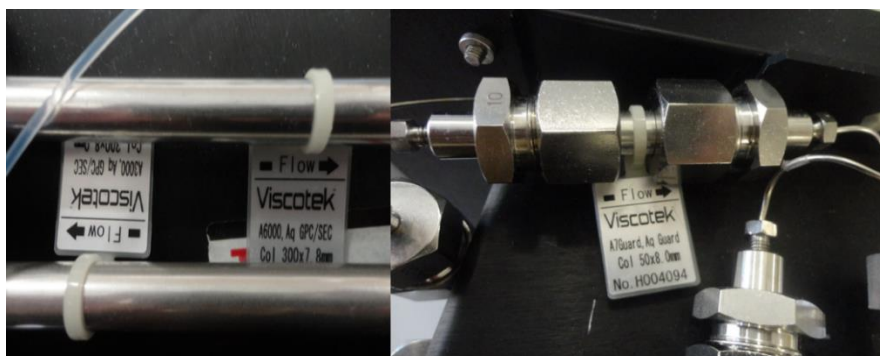
### 3.1 Introdução

Atendendo às diferentes classes de monómeros envolvidos, as condições de síntese (concentrações, pH, temperatura, iniciador, etc.) foram ajustadas a cada caso específico. Um aspeto importante na caracterização de um polímero relaciona-se com a determinação da sua massa molecular média, ou mais propriamente da distribuição da sua massa molecular no caso de polímeros de elevada massa molecular, dado que as suas propriedades físicas e químicas são fortemente influenciadas por este parâmetro. Neste capítulo serão referidos todos os processos de síntese e caracterização dos hidrogéis produzidos neste trabalho.

### 3.2 Cromatografia de Permeação de Gel (GPC)

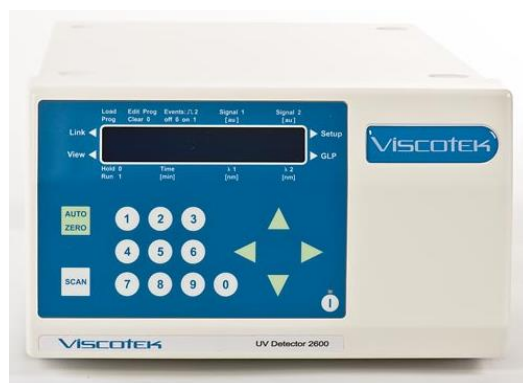
A Cromatografia de Permeação de Gel (“Gel Permeation Chromatography - GPC”), também designada de Cromatografia de Exclusão por Tamanho (“Size Exclusion Chromatography-SEC”), é um dos métodos mais utilizados na separação e análise de materiais poliméricos. Nesta técnica, a separação das espécies ocorre exclusivamente de acordo com o seu tamanho molecular, mais precisamente, de acordo com o seu volume hidrodinâmico [44].

Os empacotamentos das colunas (fase estacionária) utilizadas neste método consistem em partículas pequenas ( $\approx 10 \mu\text{m}$ ) de sílica, de géis de poliestireno ou de um polímero contendo uma rede de poros uniformes nos quais as moléculas do soluto e do solvente podem-se difundir [44]. As colunas utilizadas neste trabalho foram A7 Guard, A6000 e A3000 da marca *Viscotek* (Figura 3.1).



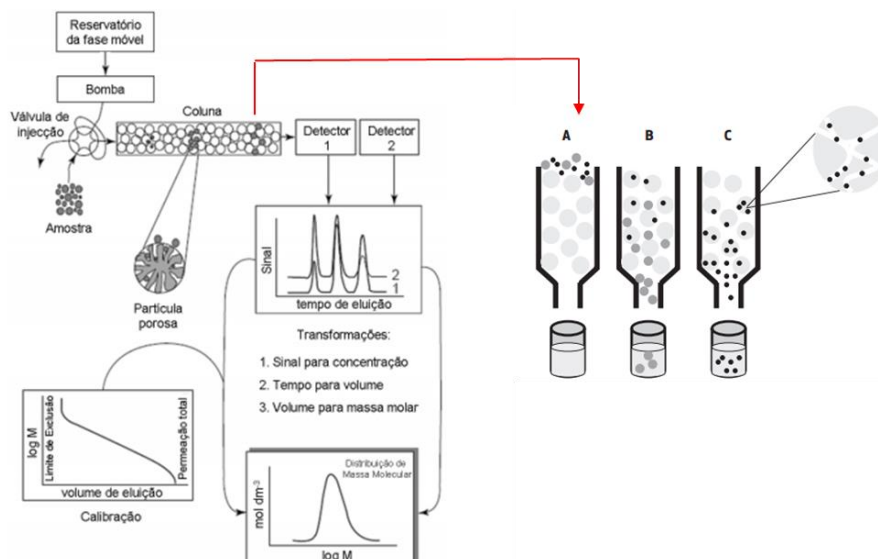
**Figura 3.1:** Ilustração fotográfica das colunas A3000, A6000 e A7 Guard, respetivamente. Colunas comerciais usadas neste trabalho na análise de polímeros, BSA e DNA.

Quando se injeta uma solução de amostra a analisar, o solvente arrasta a amostra através da coluna. As moléculas maiores do que o tamanho médio dos poros da fase estacionária são excluídas e essencialmente não sofrem retenção. Essas espécies são as primeiras a ser eluídas. Moléculas com diâmetros significativamente menores do que os poros podem penetrar ou permear através do emaranhado de poros e ficarem retidas por tempos maiores. Estas são as últimas a serem eluídas [44]. A cromatografia de permeação de gel, a exemplo de outras técnicas cromatográficas, é uma técnica de separação que neste trabalho foi equipada com quatro sinais de detecção, nomeadamente, índice de refração (RI), difração de luz (LS), viscosidade intrínseca (IV-DP) e ultravioleta (UV) [19]. Se o polímero tem uma absorção na região ultravioleta e o solvente não tem, pode-se usar um detetor ultravioleta para detetar a presença de macromoléculas sintéticas ou naturais (ex. BSA ou DNA). Os detetores de LS e IV-DP são necessários na determinação tanto do peso molecular como da viscosidade intrínseca. Os detetores LS fornecem uma medição direta do peso molecular e eliminam a necessidade de calibração. Por fim, o detetor viscosímetro fornece uma medição direta da viscosidade intrínseca e permite a determinação do tamanho molecular, conformação e estrutura [5]. Na Figura 3.2 é apresentado o detetor de UV-PDA, *Viscotek*, utilizado na medição precisa do perfil de eluição do polímero ou da concentração de proteínas e DNA, fornecendo dados sobre o seu peso ou estrutura molecular [45].



**Figura 3.2:** Representação fotográfica do instrumento de luz UV usado neste trabalho [45].

Para que esta técnica seja utilizada na determinação da massa molecular de uma amostra polimérica (caso não se use um método absoluto), é necessário construir inicialmente uma curva de calibração. Para tal, são selecionados padrões de polímeros monodispersos de pesos moleculares conhecidos e com características químicas semelhantes da amostra a analisar [44]. Na Figura 3.3 é apresentada uma representação esquemática simplificada do sistema de GPC-SEC utilizada neste trabalho (ver Anexo 48).

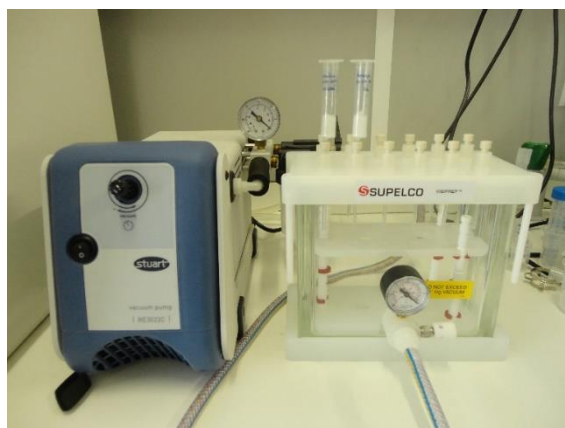


**Figura 3.3:** Representação esquemática do sistema de GPC em modo aberto e explicação do processo. (A) Aplicação da amostra à coluna; (B) Percurso das moléculas de diferentes volumes moleculares, resultando na eluição das moléculas maiores; (C) Eluição das moléculas de menor volume molecular e, no detalhe, o poro da matriz retardando a passagem das moléculas [31, 44].

### 3.3 Extração em Fase Sólida (SPE)

A SPE foi introduzida no início dos anos 70 e passou a estar disponível comercialmente em 1978, na forma de colunas descartáveis (estas são semelhantes a seringas hospitalares sem êmbolo) [46, 47]. É uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, sendo usualmente empregada com o propósito de isolar analitos presentes numa matriz complexa [48]. O equipamento básico utilizado é extremamente simples, podendo, porém, ser sofisticado dependendo do problema a ser resolvido e do grau de automação desejado. As etapas da extração resumem-se na ativação da coluna, percolação da amostra dos analitos no solvente, eliminação dos interferentes da matriz (*clean up*), eluição dos analitos e posterior concentração do composto de interesse [47]. A escolha do tipo e quantidade de solvente, volume de amostra e de solvente para ativação das colunas e para a eluição dos analitos são alguns parâmetros que devem ser considerados [48]. A etapa de condicionamento da coluna (com reservatórios de 0,5 a 10 mL) destina-se a ativar o solvente, sendo que este dependerá principalmente do material a ser ativado [47]. O condicionamento poderá servir também para eluir alguma impureza presente na coluna. A velocidade de aplicação da amostra é importante e pode ser ajustada, controlando-se o vácuo ou a pressão aplicada no processo. Para pequenos volumes de amostra, esta etapa pode ser realizada somente com o auxílio da gravidade. A etapa de limpeza (*clean up*) é fundamental

para eliminar compostos provenientes da matriz, que podem interferir no método analítico [47]. Podem-se utilizar solventes com força de eluição intermédia para eluição de impurezas antes do analito de interesse ser eluído. Esses solventes são denominados de “solventes de lavagem” (*wash solvent*) [47]. As colunas de SPE existem para diversos volumes. A escolha depende de vários fatores, entre os quais o volume de amostra a ser usado, as concentrações e propriedades físico-químicas do composto de interesse presente na amostra, o grau de contaminação e a complexidade da matriz [47]. Neste trabalho, recorreu-se ao uso da técnica de SPE com o objetivo de se fazer passar soluções contendo macromoléculas de DNA de salmão através de hidrogéis catiónicos (baseados no monómero DMAEMA) (Figura 3.4).



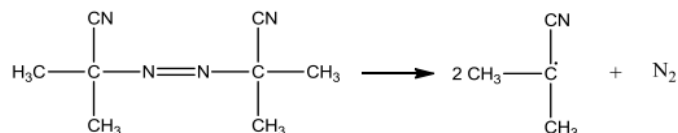
**Figura 3.4:** Ilustração fotográfica do sistema analítico para Extração em Fase Sólida (SPE) (vácuo de 12 portas) conectado a uma bomba de vácuo. Equipamento usado neste trabalho.

### 3.4 Polimerização Radicalar Clássica (FRP)

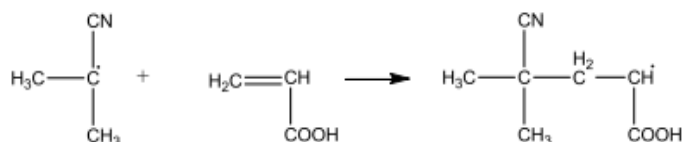
Seguidamente faz-se uma descrição simples dos passos cinéticos envolvidos em reações de adição de radicais livres. É abordada a polimerização radicalar clássica (FRP). No entanto, deve notar-se que a formação de redes de polímero (das quais os hidrogéis são um caso particular) é um assunto complexo por se tratar de um processo não-linear [21].

A polimerização radicalar clássica é normalmente o método de escolha para a síntese de polímeros molecularmente impressos (MIP) devido ao facto de poder ser realizada sob condições moderadas (ex. temperatura ambiente e pressões atmosféricas), sendo também bastante tolerável a grupos funcionais de vários monómeros e a impurezas no sistema (ex. água) [49]. A polimerização radicalar desenvolve-se em três passos distintos e definidos: iniciação, propagação e terminação. Note-se que o número e tipo de mecanismos cinéticos envolvidos na polimerização radicalar pode ser substancialmente maior, sendo aqui apenas apresentada uma ilustração simples destes processos de reação [5, 21]. A polimerização inicia-se com a

decomposição do iniciador, por clivagem homolítica, em dois radicais livres capazes de quebrar a ligação dupla carbono-carbono do monómero e fazer a sua iniciação (Figura 3.5) [5]. Para a iniciação da polimerização podem ser usados diferentes tipos de iniciadores com diferentes propriedades químicas, sendo normalmente usados em quantidades bastante inferiores às do monómero (Figura 3.6).

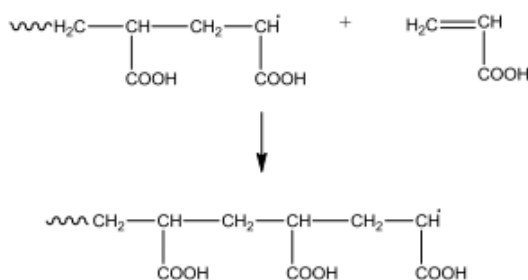


**Figura 3.5:** Representação esquemática da etapa de decomposição do iniciador (usando AIBN como exemplo) [5].



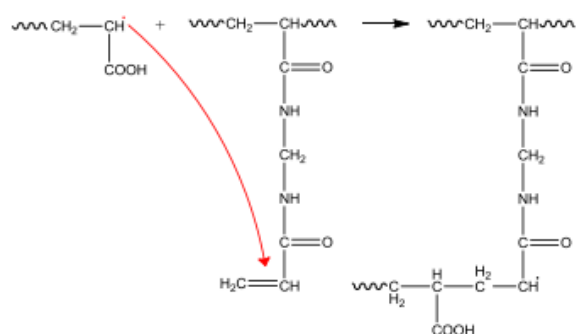
**Figura 3.6:** Representação esquemática da etapa de iniciação do monómero (usando ácido acrílico como exemplo) [5].

Na etapa de propagação do monómero verifica-se o crescimento das cadeias de polímero através da adição de um radical polimérico com uma unidade de monómero (Figura 3.7) [21]. Tipicamente, na polimerização radicalar clássica a velocidade de propagação é muito mais rápida que a de iniciação [49].



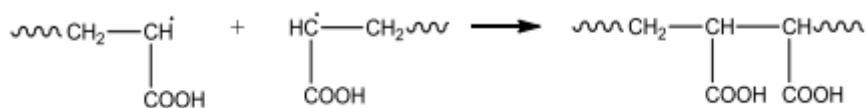
**Figura 3.7:** Representação esquemática da etapa de propagação do monómero [5].

A etapa de reticulação das ligações pendentes do *crosslinker* (reticulante) estabelece a grande diferença entre uma polimerização radicalar linear (geralmente com formação de produtos solúveis) e uma polimerização radicalar não linear (levando potencialmente à formação de géis/hidrogéis insolúveis) (Figura 3.8) [21].



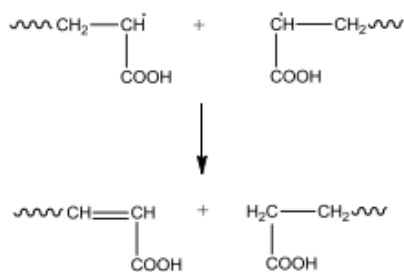
**Figura 3.8:** Representação esquemática da etapa de reticulação com dupla pendente do crosslinker (reticulante) (usando MBAm como exemplo) [5].

Neste último caso, é formada uma rede tridimensional de polímero que não é fusível ou não pode ser solubilizada em qualquer solvente. Em teoria, a reação de propagação pode continuar até que os monómeros sejam totalmente consumidos. No entanto, é altamente improvável esse resultado. Frequentemente, o crescimento da cadeia de um polímero é interrompida pela fase da terminação [21]. A terminação, geralmente ocorre por duas vias: combinação e dismutação. A combinação ocorre quando o polímero finaliza o seu crescimento através de eletrões livres de duas cadeias em crescimento que se juntam e formam uma única cadeia (Figura 3.9) [49].



**Figura 3.9:** Representação esquemática da etapa de terminação por combinação [5].

A dismutação ocorre quando um radical livre capta um átomo de hidrogénio de uma cadeia ativa, originando-se uma ligação dupla na posição do hidrogénio (Figura 3.10). A ligação carbono-carbono toma o lugar do hidrogénio em falta [49].



**Figura 3.10:** Representação esquemática da etapa de terminação por dismutação [5].

As etapas da terminação são responsáveis em grande parte pela geração de produtos com elevada heterogeneidade (população de moléculas com tamanhos distintos).

### 3.5 Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A concentração das amostras recolhidas da solução resultante da libertação/imobilização, nomeadamente de BSA e DNA, foi determinada por espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis). Esta técnica baseia-se na Lei de Beer-Lambert que estabelece a proporcionalidade entre a absorvância ( $A$ ) de uma solução de uma espécie absorvente, a um determinado comprimento de onda, e a sua concentração ( $C$ , em mol L<sup>-1</sup>), através da expressão seguinte:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_T}\right) = \epsilon l C \quad (3.1)$$

Onde  $I_0$  corresponde à intensidade da radiação incidente,  $I_T$  à intensidade da radiação transmitida,  $\epsilon$  à absorvidade molar (em mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>) e  $l$  ao percurso ótico (em cm) [50].



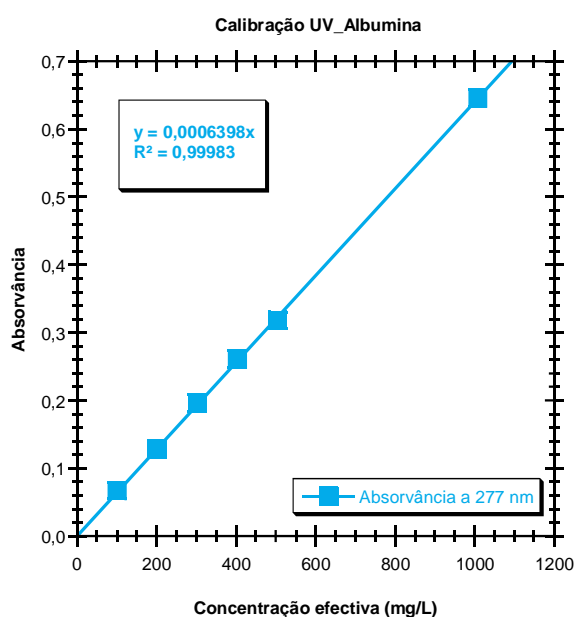
**Figura 3.11:** Ilustração fotográfica das células de quartzo utilizadas na análise das amostras em estudo assim como um esquema ilustrativo da incidência de luz sobre a amostra.

Os espectros foram obtidos com o espectrofotómetro (UV-Vis V-530) da marca *Jasco* com células de quartzo de 2 mm e 5 mm e solvente W<sub>DI</sub> (Figura 3.11). O software usado foi *SPECTRA MANAGER* (ver Anexo 50).

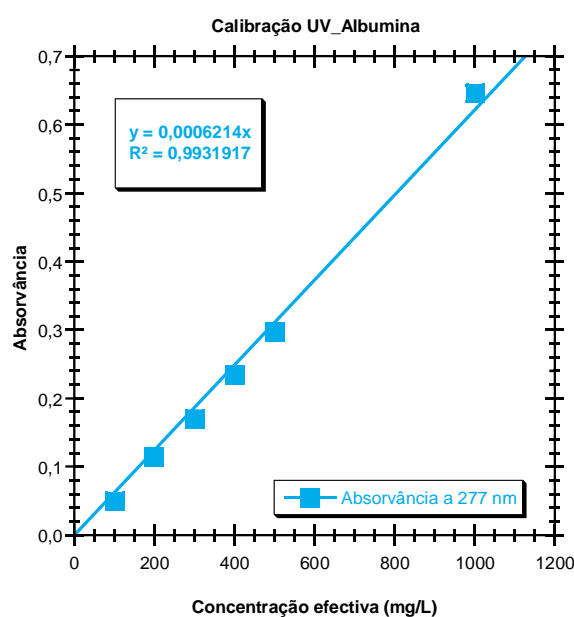
### 3.6 Curva de Calibração da Proteína BSA

A medição da quantidade de proteína presente nas amostras das soluções aquosas analisadas foi efetuada usando a curva de calibração específica para cada caso em estudo. Esta calibração é construída com base na preparação de um conjunto de soluções com concentrações conhecidas e medição das respetivas absorvâncias no UV em modo fechado. Para isso, escolheu-se um comprimento de onda que esteja mais próximo da máxima absorção da resposta da proteína em questão. Segundo diversas referências consultadas e pelos ensaios efetuados considerou-se o valor de 277 nm para o comprimento de onda da albumina de soro bovino (BSA). Inicialmente foi preparada uma solução mãe contendo 100 mL de W<sub>DI</sub> e 101,1 mg de

proteína BSA, sendo levada ao banho de ultrassom (US) de forma a favorecer uma maior interação entre as fases, obtendo-se uma solução homogênea. Através da razão da massa de albumina e do volume de água obtém-se a concentração de albumina da solução mãe (mg/L ou ppm) que será utilizada para calcular as concentrações efetivas para as diversas diluições. Foram efetuadas 5 diluições em frascos de 20 mL, onde se colocaram igualmente 0,02 L de  $W_{DI}$  para diferentes volumes de solução mãe (L) (ver Anexo 51). Nas Figuras 3.12 e 3.13 são apresentadas as curvas de calibração da proteína BSA utilizada neste estudo que foram obtidas através da técnica de espectroscopia UV-Vis.



**Figura 3.12:** Curva de calibração da proteína BSA obtida por espectroscopia de ultravioleta (UV) usando um comprimento de onda  $\lambda=277$  nm. Calibração inicial.



**Figura 3.13:** Curva de calibração da proteína BSA obtida por espectroscopia de ultravioleta (UV) usando um comprimento de onda  $\lambda=277$  nm para confirmação da curva de referência (Figura 3.12). Calibração realizada a meio desta investigação.

A calibração apresentada na Figura 3.12 foi realizada no início desta investigação. Para avaliar eventuais alterações desta calibração (ex. devido ao efeito da lâmpada UV ou das células usadas) foi repetida a calibração a meio desta investigação (Figura 3.13). Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre as duas calibrações.

### 3.7 Considerações Finais

Em resumo, neste capítulo foram descritos os métodos de síntese e caracterização de hidrogéis que serão aplicados na imobilização de BSA e de DNA de salmão. Foi descrita a técnica de GPC que pode ser usada para a caracterização dos materiais produzidos (nomeadamente a

estrutura da parte solúvel dos hidrogéis) e também para quantificar a presença de BSA ou DNA em soluções aquosas (ex. em resultado da sua libertação a partir dos hidrogéis). Neste trabalho foi usado o instrumento de GPC da marca *Viscotek*, modelo GPCmax VE 2001 que integra um módulo de bombagem de eluente (água nesta investigação) e quatro detetores em série, nomeadamente o índice de refração (RI), dispersão de luz (LS), viscosidade intrínseca (IV-DP) e ultravioleta (UV). Consideraram-se diferentes combinações das colunas de fracionamento de tamanhos de molécula disponíveis, nomeadamente a pré-coluna de proteção A7 Guard e as colunas A2000 (opcional) (ver Anexo 49) + A3000 + A6000, todas também da marca *Viscotek*. A deteção UV é aqui especialmente útil dado que tanto o BSA como o DNA podem ser quantificados considerando este sinal. No entanto, como à frente discutido, a operação com estas moléculas de grande dimensão (BSA e DNA) no sistema de GPC é bastante dispendiosa economicamente podendo inclusive danificar o equipamento (ex. entupimento de capilares e colunas). Por esta razão, na monitorização destas moléculas foi privilegiado o uso de deteção UV em modo *batch*, tendo sido considerado neste trabalho o espectrofotómetro da marca *Jasco*, conforme também descrito neste capítulo. Em alternativa ao funcionamento com as colunas comerciais do sistema de GPC, foi também considerada a operação em colunas empacotadas com hidrogéis sintetizados neste laboratório (ex. baseados em ácido acrílico) e posteriormente integradas no sistema GPCmax VE 2001. Foi assim possível analisar de forma mais económica amostras contendo BSA (ex. conforme anteriormente representado na Figura 2.19) ou monómeros cuja presença nas soluções aquosas se pretendia identificar (ex. NIPA, conforme anteriormente representado na Figura 2.6). Foi também descrita neste capítulo, a técnica de Extração em Fase Sólida (SPE) e o respetivo equipamento usado neste trabalho. Esta técnica permitiu de forma simples, analisar e quantificar o processo de imobilização de DNA (*DNA Binding*) nos hidrogéis catiónicos (baseados em DMAEMA) sintetizados nesta investigação, conforme será discutido no Capítulo 7. Por último, foram também descritos, de forma breve, os princípios gerais da técnica de polimerização radicalar clássica (FRP) que estará na base da síntese de todos os hidrogéis inteligentes considerados neste trabalho. Como detalhado nos próximos capítulos, serão sintetizados hidrogéis termosensíveis (baseados em NIPA) e sensíveis ao pH (aniónicos e catiónicos, baseados em AA e DMAEMA, respetivamente) para imobilização (impressão molecular) de BSA. De forma equivalente, serão sintetizados hidrogéis catiónicos de DMAEMA para imobilização reversível de DNA de salmão.



## Capítulo 4. Imobilização e Libertação de BSA em Hidrogéis Sensíveis à Temperatura

### 4.1 Introdução

Neste capítulo apresenta-se uma das partes experimentais envolvidas na realização deste trabalho, a síntese de hidrogéis pelo método de polimerização radicalar clássica (FRP) à temperatura de 25 °C. As experiências realizadas visaram a imobilização de BSA em hidrogéis sensíveis à temperatura. O conjunto de experiências realizadas encontra-se descrito na Tabela 4-1 e inclui a imobilização de BSA em diferentes condições e também a síntese de um hidrogel sem BSA imobilizado. Os agentes ativos (ex. BSA) podem ser incorporados no hidrogel depois deste se encontrar formado ou durante a sua formação. Quando o agente ativo é incorporado durante a formação do hidrogel, este é adicionado à solução precursora, ficando aprisionado na estrutura tridimensional do hidrogel à medida que este se forma [51]. Contudo, nestes casos pode ocorrer, durante o processo de formação da matriz tridimensional, a ligação covalente do agente terapêutico (ex. proteína) aos monómeros ou polímeros constituintes dessa matriz, o que resulta na imobilização permanente do agente ativo na matriz polimérica. Este fenómeno, que tem como consequência a libertação incompleta do agente ativo encapsulado, ocorre com alguma frequência em sistemas onde o agente terapêutico é uma proteína ou DNA [51]. O perfil de libertação do agente ativo é determinado por uma série de fatores, entre eles as características do meio de libertação, as propriedades físico-químicas do agente terapêutico e do polímero/polímeros e as interações estabelecidas entre estes [51]. A forma de incorporação do agente terapêutico, o grau de reticulação, a morfologia do hidrogel (nomeadamente a presença de poros, o seu tamanho e distribuição) e capacidade de absorção de água são outros fatores importantes [51]. Hidrogéis à base de NIPA despertam um grande interesse em aplicações biomédicas e biotecnológicas, uma vez que exibem uma temperatura inferior crítica (LCST) ou temperatura de transição em solução aquosa bem definida em torno de 31-34 °C, próxima da temperatura corporal [6, 52]. Estes hidrogéis apresentam-se inchados a temperaturas na gama dos 20 °C, verificando-se o colapso do material a cerca de 37 °C [52, 53]. Esta temperatura é a consequência do balanço entre o estado hidrofílico e hidrofóbico das redes de gel [52]. Tais hidrogéis bem como macromoléculas biológicas têm sido intensamente estudados na libertação de fármacos mas também têm vindo a ser aplicados no encapsulamento de células, engenharia de tecidos, produção de lentes de contacto, imobilização de enzimas, biossensores assim como

na produção de pele, coração, válvulas e músculos artificiais [17, 19]. A presença de água muitas vezes nestes hidrogéis fazem com que estes sejam macios e elásticos, levando a uma menor irritação por atrito e proporcionando um efeito calmante quando em contacto com o sistema fisiológico [8, 54]. Estudos preliminares com hidrogéis baseados exclusivamente em NIPA resultaram em materiais mecanicamente fracos, sofrendo danos estruturais quando submetidos a um elevado número de ciclos de temperatura [55]. Este procedimento conduziu à perda de NIPA em solução. Assim, e de forma a superar este problema utiliza-se uma proteína de modo a estabilizar os hidrogéis produzidos. A albumina de soro bovino (BSA) funciona então como uma proteína estrutural nos hidrogéis [55]. Para permitir uma melhor compreensão dos resultados obtidos para cada uma das diferentes metodologias de modificação utilizadas, e a distinção das mesmas, o procedimento experimental de cada abordagem será apresentado no respetivo capítulo.

## 4.2 Materiais

Os diferentes reagentes utilizados na realização do trabalho experimental foram adquiridos na mesma empresa fornecedora Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). A proteína BSA, utilizada em todos os ensaios, apresenta um pH entre os 6,5 e 7,5 e pureza de 99 % (ver Anexo 52). Esta proteína é a mais abundante nos vertebrados e a que se encontra disponível comercialmente a um mais baixo custo [56]. Trata-se de uma proteína estável de grande peso molecular e raio hidrodinâmico de 3,4-3,6 nm [57]. A N-Isopropilacrilamida (NIPA), proveniente igualmente da Sigma, apresenta um grau de pureza de 99 %, tendo sido usada tal como foi recebida (ver Anexo 53). Utilizou-se como agente de reticulação o MBAm e como catalisador TEMED (ver Anexo 54). Todos os restantes solventes e reagentes foram utilizados como apresentados na embalagem, não tendo sido alvo de qualquer tratamento ou purificação prévios de forma a tentar reproduzir a prática industrial na síntese dos polímeros. As estruturas químicas e propriedades dos diferentes materiais usados neste trabalho encontram-se detalhadas nos Anexos 79 a 81 deste documento.

## 4.3 Síntese de Hidrogéis por FRP

Com o objetivo de se obterem hidrogéis sensíveis a diversos estímulos, nomeadamente à temperatura (T), realizou-se em ambiente laboratorial um conjunto de polimerizações, tal como se apresentam nas Tabelas 4-1 e 4-2. Nesta última tabela, os parâmetros apresentados têm os seguintes significados:

- A concentração dos monómeros expressa a razão entre a massa de monómeros e a massa de monómeros + massa de solvente, ou seja:

$$C_M = \frac{m_M}{m_M + m_S} \times 100 \quad (4.1)$$

- A razão  $\alpha_{CR}$  expressa a razão molar do reticulante relativamente ao monómero, ou seja:

$$\alpha_{CR} = \frac{n_{CR}}{n_{M1}} \times 100 \quad (4.2)$$

- A razão  $\alpha_I$  expressa a razão molar do iniciador relativamente ao monómero, ou seja:

$$\alpha_I = \frac{n_I}{n_{M1}} \times 100 \quad (4.3)$$

- A razão  $r_{CAT}$  expressa a razão entre a massa de iniciador e de catalisador, ou seja:

$$r_{CAT} = \frac{m_I}{m_{CAT}} \times 100 \quad (4.4)$$

- A razão  $r_{MPT}$  expressa a razão molar entre a molécula alvo (BSA) e o monómero, ou seja:

$$r_{MPT} = \frac{n_{PT}}{n_{M1}} \times 100 \quad (4.5)$$

- A razão  $r_{CRPT}$  expressa a razão molar entre a molécula alvo (BSA) e o reticulante, ou seja:

$$r_{CRPT} = \frac{n_{PT}}{n_{CR}} \times 100 \quad (4.6)$$

Pela técnica de polimerização radicalar clássica podem ser considerados diferentes géneros de monómeros que podem gerar partículas potencialmente estimuláveis a diferentes parâmetros. Como monómero principal, neste capítulo, foi considerado a NIPA (gerador de redes de polímero sensíveis à temperatura) (ver Tabelas 4-1 e 4-2). Neste plano experimental, utilizou-se apenas um reticulante, especificamente o MBAm (duas ligações vinílicas gerando pontos de reticulação tetrafuncionais), obtendo-se uma razão molar entre reticulante e monómeros a variar na ordem do 1 %, sendo o valor geralmente considerado na produção de hidrogéis levemente reticulados (Tabela 4-2) [58]. Em todas as sínteses utilizou-se o mesmo sistema de iniciação em função da gama de temperatura e solvente considerado na síntese, APS/TEMED, uma vez que as polimerizações ocorreram em água a baixa temperatura (ex. 25 °C). A razão entre iniciador e monómeros foi ajustada de modo a tentar garantir uma adequada velocidade de polimerização (aproximadamente 24 horas de reação). É de notar que as concentrações de

monómeros usados têm um grande impacto e podem ser condicionadas pelos limites de solubilidade (ex. parâmetro importante com NIPA em água). Em polimerizações radiculares clássicas (FRP), no qual este estudo incide, verifica-se que devido ao impacto das reações de terminação e outros mecanismos cinéticos secundários, os polímeros e géis resultantes apresentam em geral uma estrutura bastante heterogénea (população abrangendo moléculas com tamanhos muito distintos) [21].

#### 4.4 Processo de Imobilização de BSA em redes de PNIPA

O processo de síntese de hidrogéis por FRP realizou-se sempre nas mesmas condições, nomeadamente, em ambiente de laboratório e a uma temperatura de 25 °C. A preparação das soluções realizou-se de forma idêntica para qualquer tipo de reação efetuada. Preparou-se inicialmente o banho de água necessário à temperatura em questão, com o auxílio de uma placa de aquecimento e do respetivo termopar. Esperou-se até à estabilização da temperatura no valor estipulado. Pesaram-se as quantidades de cada um dos elementos descritos na Tabela 4-1 recorrendo-se a uma balança analítica Radwag® (min. 10 mg, max. 220 g), de acordo com o monómero a ser estudado (NIPA). Aos hidrogéis HG2 e HG4 foi adicionado um sal, especificamente NaCl de modo a compreender-se o efeito deste no aumento da porosidade dos hidrogéis. Posteriormente cada elemento foi diluído separadamente, onde foram colocados no interior de um frasco de 20 mL. Com o objetivo de se promover a dissolução total do monómero e restantes reagentes, por vezes, recorreu-se ao sistema de ultrassons.

**Tabela 4-1.** Descrição e quantidades referentes aos reagentes usados na imobilização de BSA em hidrogéis NIPA.

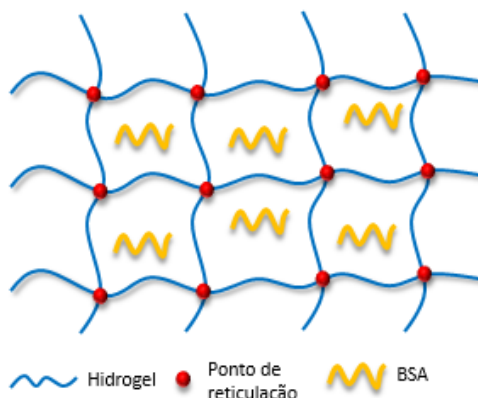
<b>Hidrogel</b>	<b>Monómero [mg] NIPA</b>	<b>Solvente [g] W<sub>DI</sub></b>	<b>Reticulante [mg] MBAm</b>	<b>Iniciador [mL/mg] APS*/TEMED</b>	<b>NaCl [mg]</b>	<b>Proteína [mg] BSA</b>	<b>T [°C]</b>
<b>HG1</b>	680,4	10,0329	10,2	2,0196/13,4	-	100,3	25
<b>HG2</b>	680,2	10,2161	10,2	1,9824/13,7	410,1	100,5	25
<b>HG3</b>	680,4	10,0329	10,2	2,0196/13,4	-	-	25
<b>HG4</b>	680,0	10,2184	10,4	1,9881/13,8	602,2	100,3	25
<b>HG5</b>	680,1	10,1277	10,6	5,0354/13,6	-	100,3	25
<b>HG6</b>	680,8	10,1554	10,3	5,0327/13,7	-	100,6	25
<b>HG7</b>	680,0	10,3329	10,3	5,0380/13,9	-	100,1	25

\* Usou-se uma solução aquosa de APS em água com concentração de 1,46 mg/mL para os hidrogéis HG1 a HG4 e 3,02 mg/mL para os restantes hidrogéis.

**Tabela 4-2.** Condições experimentais na imobilização de BSA em hidrogéis inteligentes sensíveis à temperatura (Parâmetros Relativos).

HG	M1	CR	I	CAT	PT	S	C <sub>NaCl</sub> (mol/L)	C <sub>M</sub> (%)	$\alpha_{CR}$ (%)	$\alpha_I$ (%)	T (°C)	r <sub>CAT</sub> (%)	r <sub>MPT</sub> (%)	r <sub>CRPT</sub> (%)
HG1	NIPA	MBA <sub>m</sub>	APS	TEMED	BSA	Água	-	6,4	1,1	0,2	25	22,0	0,025	2,3
HG2	NIPA	MBA <sub>m</sub>	APS	TEMED	BSA	Água	0,69	6,3	1,1	0,2	25	20,5	0,025	2,3
HG3	NIPA	MBA <sub>m</sub>	APS	TEMED	-	Água	-	6,4	1,1	0,2	25	22,0	-	-
HG4	NIPA	MBA <sub>m</sub>	APS	TEMED	BSA	Água	1,01	6,3	1,1	0,2	25	20,8	0,025	2,3
HG5	NIPA	MBA <sub>m</sub>	APS	TEMED	BSA	Água	-	6,4	1,1	1,1	25	109,0	0,025	2,2
HG6	NIPA	MBA <sub>m</sub>	APS	TEMED	BSA	Água	-	6,4	1,1	1,1	25	111,0	0,025	2,3
HG7	NIPA	MBA <sub>m</sub>	APS	TEMED	BSA	Água	-	6,3	1,1	1,1	25	110,2	0,025	2,3

Inseriu-se primeiramente a solução do monómero com o reticulante, sem o iniciador, cerca de 10 a 15 minutos a borbulhar e a agitar com árgon. Nesta etapa, retirou-se o  $O_2$  do interior da solução, uma vez que este pode reagir com o iniciador, diminuindo a taxa de conversão de monómero em polímero pelo facto de ser responsável pela inibição de radicais livres. Posto isto, adicionou-se o iniciador (solução de APS em água) dando-se início à polimerização (ver Anexo 55). Foi necessário preparar novas soluções de APS sempre que se inicia uma nova síntese. Assim, evita-se que a degradação com o passar do tempo da solução possa eventualmente influenciar a polimerização. Em todas as reações utilizou-se uma pequena quantidade de crosslinker (reticulante), uma vez que as cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por meio de ligações covalentes, produzindo polímeros tridimensionais com uma elevada massa molecular. Formou-se assim uma rede estrutural bastante larga, uma vez que a proteína utilizada pertence à gama das macromoléculas de elevado tamanho. A Figura 4.1 ilustra a imobilização da proteína BSA (molécula alvo) a partir de uma estrutura polimérica obtida pelo monómero NIPA e pelo agente reticulante (MBAm).



**Figura 4.1:** Representação esquemática do processo de imobilização de uma proteína (BSA) em redes PNIPA.

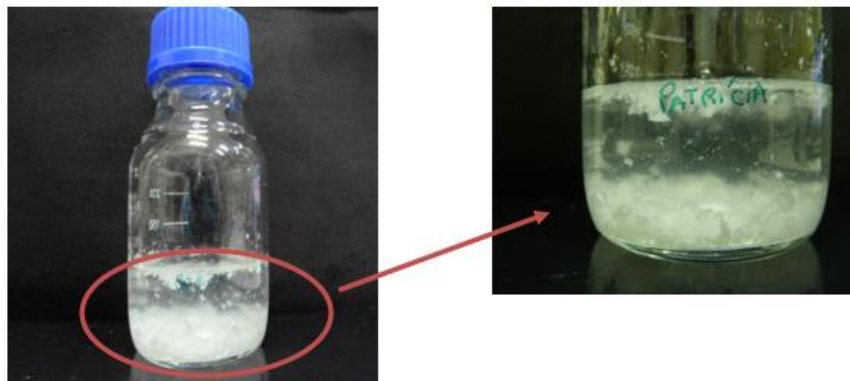
O tempo de polimerização é extremamente importante, uma vez que condiciona a conversão total do monómero NIPA, evitando que este possa ser eventualmente libertado posteriormente. É necessário cobrir o banho de água preparado onde se efetuou a polimerização de modo a garantir que a água com o decorrer do tempo não se evapore. Nos Anexos 56 e 57 observa-se um exemplo do processo de síntese dos hidrogéis sintetizados neste trabalho.

### 4.4.1 Imobilização de BSA na presença de NaCl

A fim de se estudar o comportamento da libertação da proteína BSA na presença de sais foram efetuadas novas sínteses. Esta nova etapa experimental segue um procedimento semelhante ao descrito anteriormente, tendo sido adicionado o cloreto de sódio (NaCl) com uma massa

molecular de 58,44 g/mol à mistura reacional de BSA/NIPA dos hidrogéis HG2 e HG4 (Tabela 4-1). Toda a reação ocorreu igualmente em ambiente de laboratório à temperatura de 25 °C.

A Figura 4.2 ilustra a morfologia da solução de BSA/NIPA após adição de água desionizada (DI) para posterior estudo de libertação de BSA imobilizada.



**Figura 4.2:** Ilustração fotográfica da solução BSA/NIPA à qual foi adicionada NaCl após adição de água desionizada (DI).

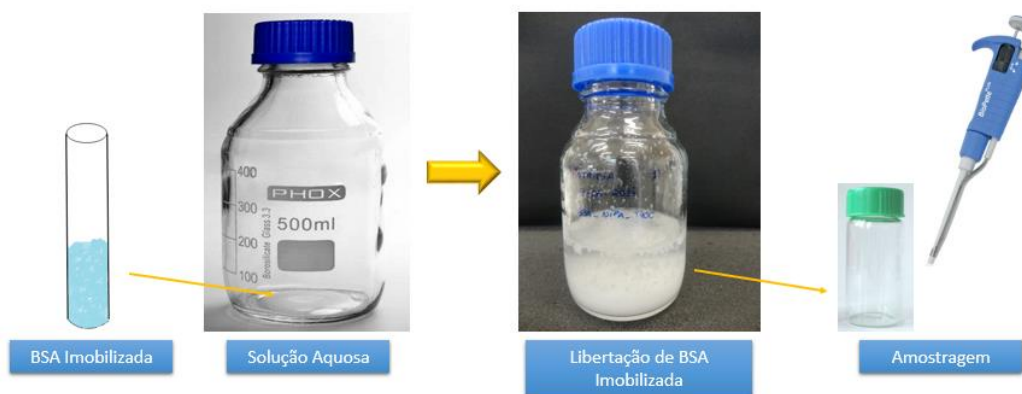
#### 4.5 Libertação de BSA a partir de Hidrogéis PNIPA

Após um período de 24 a 48 horas do início da reação de polimerização, procedeu-se à preparação da solução aquosa onde o hidrogel vai ser adicionado. Esta solução foi preparada com a adição de 100 mL de  $W_{DI}$  ou solução-tampão de pH específico num frasco quando usado o monómero NIPA. Os hidrogéis HG1 a HG5 foram colocados em 100 mL de  $W_{DI}$ . Contudo, os restantes hidrogéis (HG6 e HG7) foram submetidos a diferentes condições de libertação. Para estes hidrogéis foram preparadas soluções-tampão de pH=7. Estas são preparadas a partir de 0,1 M (~1,3611 g) de  $KH_2PO_4$  em 100 mL de  $W_{DI}$  que é posteriormente adicionada a 0,1 M (~ 1,4170 g) de  $Na_2HPO_4$  igualmente em 100 mL de  $W_{DI}$ . O valor de pH foi posteriormente medido com recurso a um eletrodo de pH. O hidrogel HG7 para além de ser colocado em solução aquosa a pH básico, todo o seu processo de libertação ocorreu a 40 °C. Na Tabela 4-3 encontram-se as condições de libertação de BSA imobilizada, nomeadamente a temperatura e pH da solução aquosa, para os diferentes hidrogéis sintetizados neste trabalho. Foram recolhidas amostras, com o auxílio da micropipeta de 10 mL, da solução resultante da libertação de BSA de todos os hidrogéis sintetizados cuja concentração foi determinada por espectroscopia UV-Vis, em intervalos de tempos definidos (entre 6 a 12 horas). Contudo, efetuou-se sempre a reposição de 2 mL de  $W_{DI}$  de modo a manter-se sempre o mesmo volume de solução.

**Tabela 4-3.** Condições de libertação de BSA imobilizada em hidrogéis PNIPA.

Hidrogel	T [°C]	pH da água desionizada	pH da solução-tampão
HG1	25	5,2	-
HG2	25	5,2	-
HG3	25	5,2	-
HG4	25	5,2	-
HG4	40	5,2	-
HG5	25	5,2	-
HG5	40	5,2	-
HG6	25	-	7,4
HG6	40	-	7,4
HG7	40	-	7,4

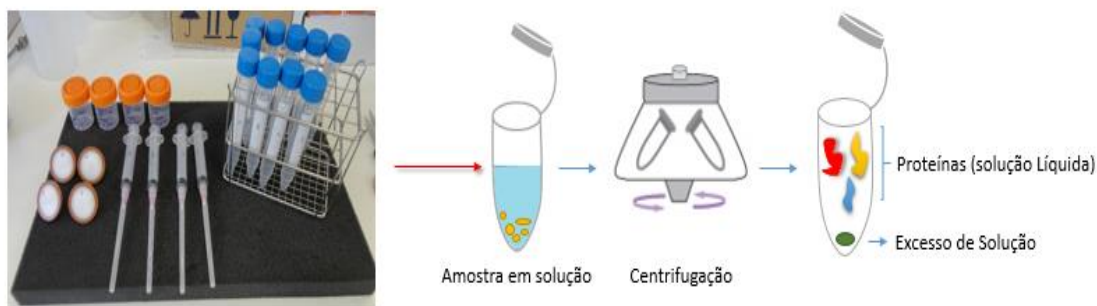
A Figura 4.3 ilustra o processo de libertação em solução aquosa de BSA imobilizada e posterior amostragem da solução resultante da libertação.



**Figura 4.3:** Representação esquemática da libertação de BSA a partir de hidrogéis PNIPA.

As amostras foram conduzidas previamente a uma centrífugadora para se promover a separação das diferentes fases. É importante a eliminação das impurezas da amostra uma vez que estas podem influenciar a leitura no espectrofotómetro UV-Vis. Neste caso em concreto, cada amostra é levada duas vezes à centrífugadora durante aproximadamente 10 minutos, sendo que entre cada centrifugação são utilizados filtros específicos de forma a eliminar-se o polímero em excesso. Assim, pretende-se separar as partículas insolúveis na amostra que sedimentam no fundo do tubo de centrifugação, ficando a fase líquida por cima desse sedimento. Na Figura 4.4 é descrito resumidamente o processo de centrifugação das amostras recolhidas. Todos os processos decorreram até que a concentração de BSA libertada fosse próxima de zero,

concluindo-se assim, que por mais amostras que fossem recolhidas, a proteína em questão já não seria mais libertada da rede tridimensional.



**Figura 4.4:** Ilustração fotográfica do processo de centrifugação antes das amostras recolhidas serem lidas em espectrofotómetro UV-Vis.

À medida que a polimerização ocorre as moléculas de BSA vão formando cavidades de tamanho específico no hidrogel. Para que o hidrogel em causa seja purificado, procedeu-se à sua lavagem com água desionizada (DI), de forma a ser extraído o monómero por reagir e material solúvel [19]. O grau de conversão do monómero, assim como o número de fases de lavagem necessárias para a extração quantitativa dos agentes terapêuticos é dependente do tipo e da quantidade de agente incorporado na matriz polimérica. No estudo dos hidrogéis com BSA imobilizada, este procedimento é extremamente importante uma vez que através dele as moléculas de BSA são removidas e as cavidades formadas por estas no hidrogel ficam potencialmente vazias. Em teoria, seria posteriormente possível o reconhecimento de moléculas de BSA semelhantes pelo hidrogel. Para tal, num novo frasco foi adicionado cerca de 100 mL de  $W_{DI}$  e o hidrogel previamente filtrado com o auxílio de vácuo (ver Anexos 58 e 59). Seguidamente a esta etapa, e após a conclusão do estudo da libertação de BSA, estes e os restantes hidrogéis foram colocados a secar, em estufa de vácuo a uma temperatura entre 40 a 50 °C durante aproximadamente 96 horas. A temperatura a utilizar na secagem dos hidrogéis nomeadamente quando contêm biomacromoléculas como a albumina de soro bovino (BSA) não deverá ser superior a 50 °C de modo a não promover a desnaturação das proteínas. Nos Anexos 64 a 66 deste documento pode-se visualizar a morfologia dos hidrogéis HG2, HG4, HG5 e HG6 após a respetiva secagem.

#### 4.5.1 Testes de Libertação de BSA a 25 e a 40 °C

Com o objetivo de se estudar a libertação de BSA numa temperatura próxima da temperatura corporal, ao volume de solução total dos polímeros HG4, HG5, HG6 foi retirado

aproximadamente 50 mL de solução contendo polímero para um novo frasco sendo colocado posteriormente em banho de água a 40 °C (Tabela 4-3). Esperou-se cerca de 1 hora até que o polímero colapsasse e retirou-se uma primeira amostra. Seguidamente, foram retiradas em tempos distintos novas amostras, tendo-se verificado que a libertação de BSA é efetivamente constante. Procedeu-se a uma filtração e posterior lavagem dos 50 mL iniciais de solução ao qual foi adicionado mais 50 mL de  $W_{DI}$ . Retiraram-se novas amostras, no mesmo intervalo de tempo inicial, até que a absorvância atingiu o valor de zero. A elevada sensibilidade dos hidrogéis à temperatura (numa gama compatível com a fisiologia do corpo humano) possibilita a sua consideração em aplicações biomédicas.

#### 4.5.2 Cálculo da Libertação de BSA Usando Análise UV em Modo Fechado

As expressões matemáticas são ferramentas importantes na compreensão das propriedades dos materiais, dos parâmetros de interação e dos comportamentos de transporte dentro do complexo sistema de hidrogel, esclarecendo-nos quais os parâmetros e mecanismos-chave que regulam a taxa e a extensão da libertação do agente bioativo [54]. Assim, foi desenvolvido um conjunto de equações para modelar a libertação de BSA a partir de matrizes poliméricas.

##### i. Relações de Base

A concentração de BSA existente em solução (expressa em mg de proteína por gramas de água) é obtida a partir da seguinte expressão:

$$C_{BSA} = \frac{D_F \times UV_{SOL}}{\alpha_{CALIB}} \quad (4.7)$$

Sendo,  $D_F$ , o fator de diluição usado para a medição em UV. Este fator pode ser calculado por meio da seguinte equação:

$$D_F = \frac{V_0 + V_W}{V_0} \quad (4.8)$$

Sabendo-se que  $V_0$  significa o volume de solução contendo BSA usado em análise e  $V_W$  o volume de água adicionado para realizar a diluição.

Na equação 4.7, o significado dos restantes parâmetros é o seguinte:  $UV_{SOL}$ , a absorção UV observada pela análise da solução com o recurso ao espectrofotómetro UV,  $\alpha_{CALIB}$ , o declive da reta de calibração que relaciona a absorção UV de soluções padrão contendo BSA com a

concentração de proteína nessas mesmas soluções (usando o mesmo comprimento de onda de análise das amostras consideradas na equação 4.7). Este declive deve estar expresso em unidades – UV/(mg de BSA/g de água). Assim sendo, a calibração deve relacionar a absorção UV com a concentração de BSA em água expressa nas unidades de mg de BSA/g de água. Deve notar-se, que para a água, a massa volúmica é de aproximadamente 1 g/mL. Considerando-se a proteína em estudo, BSA, o declive da sua reta de calibração foi determinada a partir dos seguintes cálculos efetuados, utilizando-se para isso o comprimento de onda  $\lambda=277$  nm:

$$\begin{aligned}\alpha_{CALIB} &= 0,0006398 \text{ Unidades - UV/(mg/L)} \\ \Leftrightarrow & 0,0006398 \times 1000 \text{ Unidades - UV/(mg/mL)} \\ \Leftrightarrow & 0,0006398 \times 1000 \text{ Unidades - UV/(mg/g)}\end{aligned}$$

O cálculo da concentração normalizada de BSA faz-se dividindo a concentração medida  $C_{BSA}$  pela concentração máxima que é possível observar para a proteína. Considerando que toda a massa de BSA e hidrogel gerada no processo de encapsulação é numa primeira fase colocado num determinado volume (massa) de água, a concentração máxima de BSA nessa solução será:

$$C_{BSA}^{MAX} = \frac{m_{BSA0}}{m_W} \quad (4.9)$$

Em que  $m_{BSA0}$  representa a massa de BSA usada no processo de encapsulação (expressa em mg) e  $m_W$  a massa total de água usada na primeira fase do processo de libertação, expressa em g. A massa de água usada na geração da rede de encapsulação é também aqui incluída. A concentração normalizada de BSA é então calculada da seguinte forma:

$$C_{BSA}^{NOR} = 100 \times \frac{C_{BSA}}{C_{BSA}^{MAX}} \quad (4.10)$$

É também útil o cálculo da massa de BSA libertada da rede expressa em mg. Esse cálculo é determinado diretamente a partir:

$$m_{BSA}^{LIB} = C_{BSA} \times m_W \quad (4.11)$$

A percentagem de BSA libertada pode então ser obtida da seguinte forma:

$$f_{BSA} = 100 \times \frac{m_{BSA}^{LIB}}{m_{BSA0}} \quad (4.12)$$

**ii. Correção da absorção UV devida à presença de impurezas**

No processo de medição da absorção UV das amostras de solução aquosa para estudo da libertação de BSA, é possível que haja o contributo de impurezas nos valores obtidos. Eventuais contributos de impurezas nessas medições são devidos à presença de partículas de hidrogel nas amostras de medição (o que se tentou evitar através de centrifugação) ou, por exemplo, presença de monómero por reagir no processo de imobilização. O teste deste último efeito foi analisado neste trabalho fazendo a medição UV de soluções contendo um hidrogel sintetizado na ausência de BSA mas considerando as mesmas condições do processo de imobilização. Usando estas medições como referência (“branco” a que corresponde a absorvância  $UV_0$ ), a correção das medições relativas à libertação de BSA foi feita da seguinte forma:

$$UV_{SOL}^{CORR} = UV_{SOL} - UV_0 \quad (4.13)$$

Substituindo esta absorvância corrigida na expressão 4.7, é possível gerar quantidades corrigidas devido à presença de impurezas correspondentes às fórmulas 4.10 e 4.12.

Nos sistemas em que se testou a correção da absorção devido à presença de monómero por reagir, caso tenham sido realizados diferentes passos de lavagem (substituição das fase aquosa como abaixo especificado), essa correção foi apenas realizada no primeiro passo. Considerou-se assim que no primeiro passo de lavagem foram removidas todas as impurezas eventualmente presentes na rede.

**iii. Adaptação dos cálculos para a realização de diferentes passos de lavagem da rede (substituição da fase aquosa que contém a rede por nova água DI)**

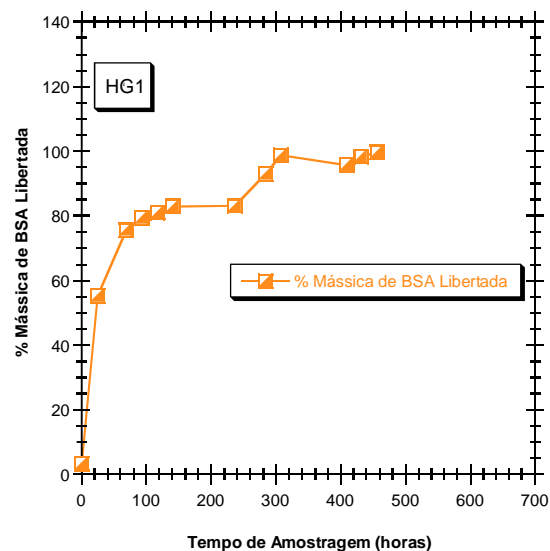
Nos casos em que se fez a substituição da fase aquosa que contém a rede por nova água DI (mais do que um passo de lavagem), é necessário fazer a adaptação dos cálculos de modo a contabilizar a proteína (BSA) já libertada nos passos anteriores. Este aspeto é especialmente importante no cálculo da quantidade de BSA libertada, tendo em consideração a quantidade inicial usada no processo de imobilização (ver equações 4.11 e 4.12). Assim, em cada processo de substituição da fase aquosa, deve ser somada a massa de proteína libertada nos passos anteriores:

$$m_{BSA}^{LIB-I} = C_{BSA-I} \times m_{W-I} + \sum_{J=1}^{I-1} C_{BSA-J} \times m_{W-J} \quad (4.14)$$

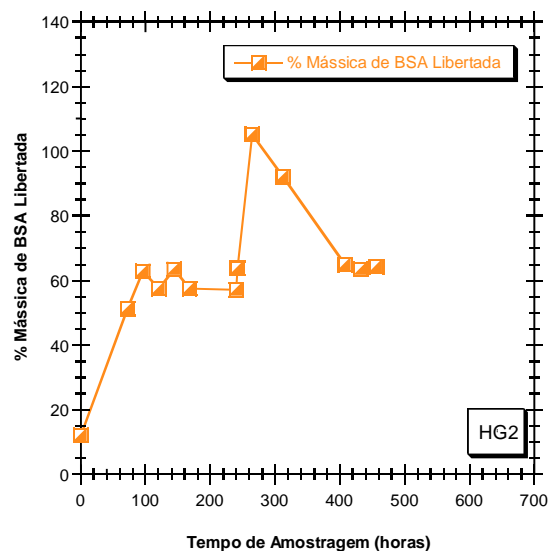
Sendo,  $m_{BSA}^{LIB-I}$  a massa de BSA libertada até ao passo I.

### 4.5.3 Resultados e Discussão

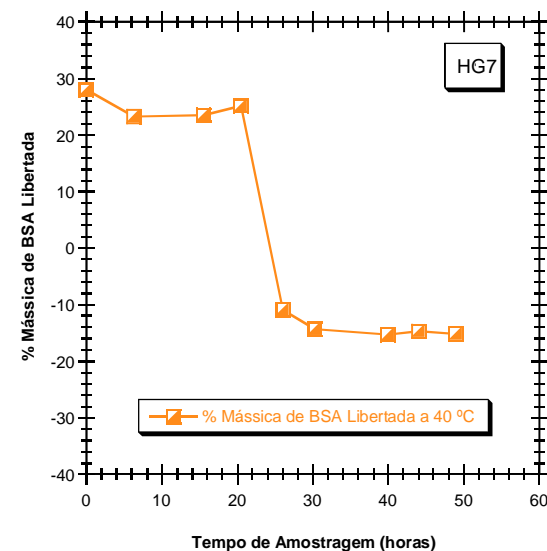
Após as reações de síntese, os hidrogéis contendo BSA imobilizada foram colocados em soluções aquosas em diferentes condições de temperatura e pH, conforme detalhado na Tabela 4-3. Tentou-se desta forma estudar a dinâmica de libertação estimulada (pela temperatura/pH) da BSA a partir das redes de NIPA produzidas. Todos os resultados obtidos neste contexto foram agrupados nos Anexos 1 a 9 deste trabalho. Foram identificadas algumas dificuldades experimentais importantes na medição precisa da quantidade de BSA libertada, nomeadamente devido ao potencial efeito da contribuição do monómero por reagir (ou outro tipo de impurezas) para a absorção UV das amostras analisadas (ver também discussão acerca das análises GPC realizadas). As observações efetuadas parecem indicar que, em todos os casos, uma parte substancial da libertação de BSA ocorre nas primeiras 24 a 48 horas (ver salto inicial brusco nas curvas de libertação). Por outro lado, na Figura 4.5, com o hidrogel HG1, mais de 80 % da proteína terá sido libertada a 25 °C ao fim de uma semana sem substituição da solução aquosa envolvente. Os resultados indicam que poderá haver lugar à libertação próxima do total caso se proceda à substituição da solução aquosa (uma ou duas vezes). Nas Figuras 4.6 e 4.8, observam-se para os hidrogéis HG2 e HG4 (sintetizados na presença de NaCl) quando colocados a 25 °C, uma taxa de libertação bastante favorável. As taxas finais de libertação de pelo menos 60 % de BSA parecem ser possíveis, estando de acordo com resultados apresentados noutros trabalhos [53]. No Anexo 4 deste documento, não foi possível observar o impacto significativo na tendência de libertação de BSA no hidrogel HG4 quando a temperatura foi alterada, durante o processo de libertação, de 25 para 40 °C. Na Figura 4.8, os resultados com HG5 a 25 °C indicam uma percentagem de libertação de BSA de pelo menos 40 % sendo de salientar a rápida dinâmica de libertação (perfil praticamente constante desde o início do processo). Também neste caso (ver Anexo 6), não foi observado o aumento da taxa de libertação quando a temperatura foi alterada, durante o processo de libertação, de 25 para 40 °C. O efeito do pH (nomeadamente o seu ajuste para pH=7) foi estudado considerando processos de libertação similares de BSA a partir de HG6 (T=25 °C e T=25 °C seguida de aquecimento para T=40 °C), tal como se mostra na Figura 4.8. Nos Anexos 7 e 8 deste documento, os resultados obtidos indicam um baixo efeito deste parâmetro, tendo sido registadas dinâmicas de libertação razoavelmente próximas daquelas observadas com HG5 (patamar mínimo de libertação de BSA de cerca de 40 % com máximo estimado de cerca de 80 %). Na Figura 4.7, o efeito da temperatura na libertação de BSA foi testada com o hidrogel HG7 que foi colocado diretamente a pH=7 e T=40 °C.



**Figura 4.5:** % Mássica de BSA para contabilizar toda a proteína libertada quando se efetuam lavagens ao hidrogel HG1.

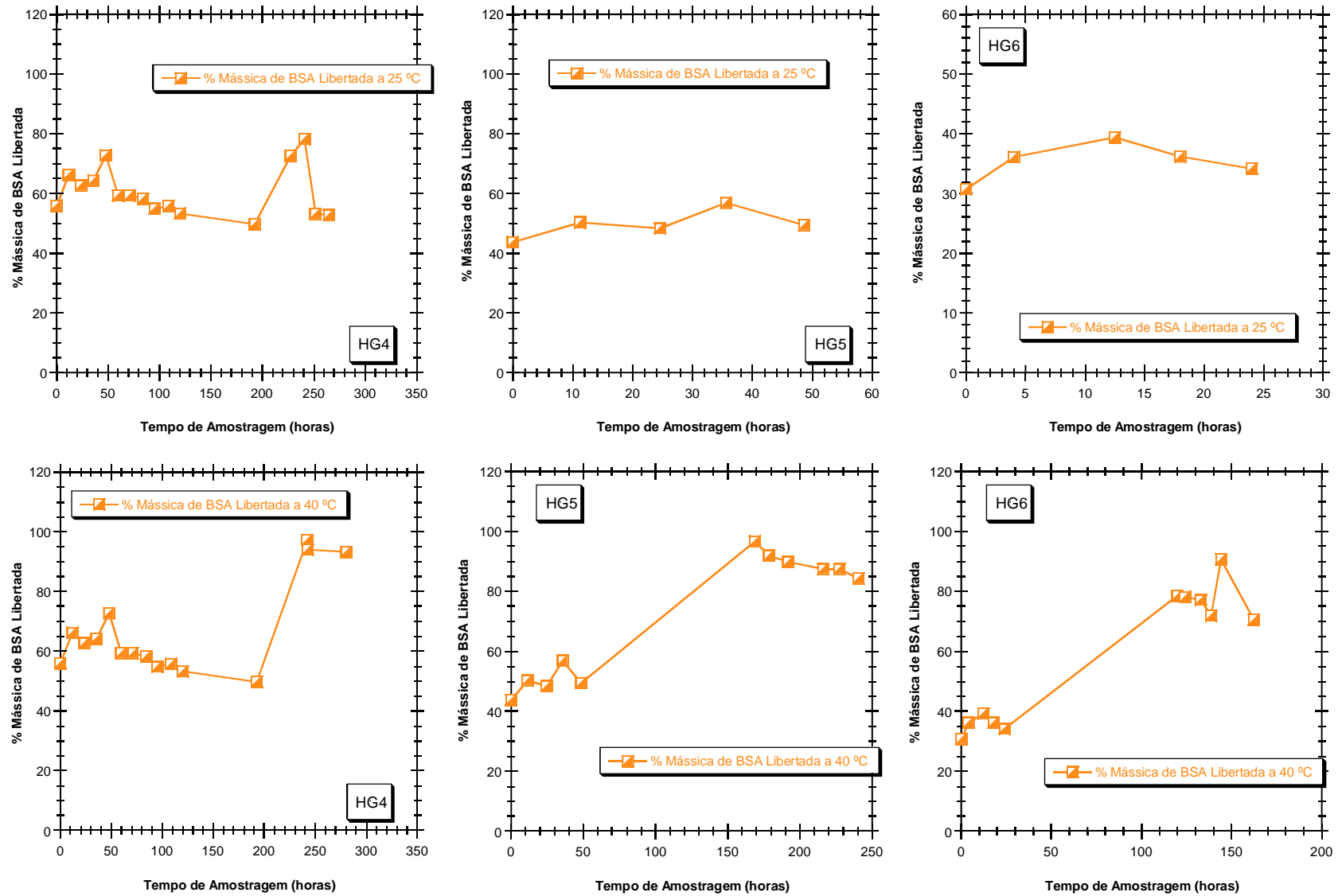


**Figura 4.6:** % Mássica de BSA para contabilizar toda a proteína libertada quando se efetuam lavagens ao hidrogel HG2.



**Figura 4.7:** % Mássica de BSA para contabilizar toda a proteína libertada quando se efetuam lavagens ao hidrogel HG7.

**Figura 4.8:** % Mássica de BSA para contabilizar toda a proteína libertada quando se efetuam lavagens aos hidrogéis HG4, HG5 e HG6 a 25 e a 40 °C, respetivamente.



Os resultados obtidos (ver Anexo 9) parecem indicar uma taxa de libertação mais baixa do que nos casos anteriores, inclusive com a diminuição da absorvância da solução a partir das 24 horas. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que também relatam uma diminuição da libertação de proteína quando a temperatura do sistema é aumentada acima do valor crítico de colapso do material ( $\sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Este facto é relatado como sendo consequência do fecho dos poros da rede do hidrogel, impedido a migração da macromolécula para o exterior [53]. Estas observações confirmam a possibilidade de usar a temperatura como parâmetro de controlo da libertação de proteínas a partir de hidrogéis termosensíveis.

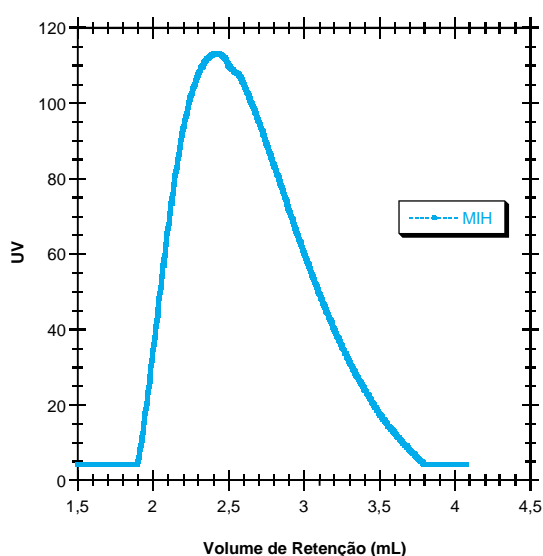
### 4.6 Análises por GPC

Como atrás mencionado, a quantificação da proteína presente em solução é uma das principais dificuldades a considerar no estudo da sua dinâmica de libertação a partir de hidrogéis nos quais foi imobilizada por polimerização. A cromatografia de exclusão de tamanhos (GPC/SEC) com deteção de diferentes sinais (ex. UV, RI, etc.) é uma técnica apropriada neste contexto pois permite fracionar e quantificar os diversos componentes presentes na amostra. Para a análise das amostras recolhidas ao longo deste estudo, utilizaram-se três colunas de separação igualmente utilizadas nos estudos posteriores a este capítulo. A temperatura das colunas foi de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o caudal da fase móvel foi de  $0,5\text{ mL/min}$  e a deteção UV foi regulada para  $277\text{ nm}$  de acordo com a macromolécula em estudo. Alternativamente foi também considerado o comprimento de onda de  $223\text{ nm}$ . Alguns dos resultados obtidos através desta técnica e com importância para este capítulo encontram-se apresentados nos Anexos 26 a 28 e 39. Essas análises GPC mostram que é possível separar e quantificar a BSA (zona de eluição próxima de  $15\text{ mL}$  de volume de retenção) e o monómero NIPA (zona de eluição próxima de  $40\text{ mL}$  de volume de retenção). A BSA pode ser monitorizada alternativamente pelos sinais de RI, UV (a  $223$  ou  $277\text{ nm}$ ), LS (nomeadamente RALS) ou mesmo viscosidade (IV-DP e IV-IP). Note-se que, também como anteriormente mencionado, foi considerada neste trabalho a análise das amostras com colunas contendo hidrogéis sintetizados por este grupo de investigação (ex. ver Figuras 4.9 e 4.10). Nesta análise pressupõe-se que as proteínas encontram-se dissolvidas na solução e que não houve interação de proteínas com a matriz polimérica [52]. É importante garantir a dissolução e a limpeza da amostra em análise de modo assegurar a longevidade das colunas analíticas e evitar constantes limpezas no sistema de injeção.

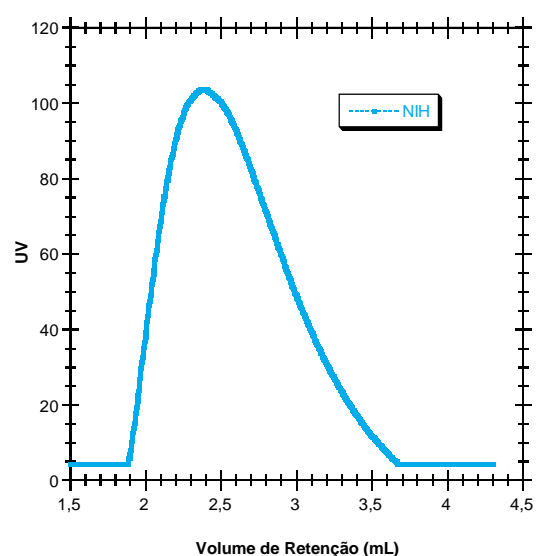
## 4.7 Adsorção de BSA por Inchamento de Hidrogéis Impressos (MIH) / Não-Impressos (NIH)

A libertação de BSA a partir de soluções aquosas foi estudada em hidrogéis impressos molecularmente (MIH- sintetizados na presença de BSA) (Figura 4.9) e não-impressos (NIH- sintetizados na ausência de BSA) (Figura 4.10). O reconhecimento molecular desempenha um papel importante na Natureza, em recetores, enzimas ou em transportadores humanos. O desenvolvimento de recetores artificiais, isto é, a construção molecular de locais de reconhecimento artificial, representa um dos mais fascinantes assuntos não resolvidos pelos químicos [59]. A chave para este campo de pesquisa é a projeção de materiais extremamente específicos, chamados de recetores funcionais sintéticos. A base subjacente na preparação destes recetores é mediada pela montagem ao nível molecular de grupos funcionais de geometria específica. O método de impressão molecular permite a obtenção desses recetores sólidos por meio de reações de polimerização na presença de substratos moleculares alvos (moldes) [56]. Sabe-se que o reconhecimento dos hidrogéis sensíveis a diferentes estímulos é muito semelhante ao reconhecimento em proteínas [56]. Essencialmente, a diferença reside na etapa de síntese em que a polimerização inclui a presença da molécula-alvo, do monómero funcional, monómero termossensível e do agente de reticulação. É importante notar que o objetivo não é obter a melhor afinidade e seletividade em relação às redes tradicionais, mas sim formar estruturas que podem ser memorizadas aquando do inchamento/colapso do hidrogel [60]. A primeira abordagem é com base em polímeros molecularmente impressos de forma a verificarmos a capacidade dos hidrogéis em reconhecerem uma molécula-alvo. Para isso, usa-se uma combinação de fracas interações fornecidas pelos monómeros capazes de formar interações hidrofóbicas ou pontes de hidrogénio com a proteína [60]. Por fim, pretendeu-se fazer o reconhecimento através da colocação de alguns grupos funcionais capazes de formar uma forte interação com a molécula-alvo. Neste trabalho, após as 96 horas da secagem do polímero resultante da solução BSA/NIPA (HG1), procedeu-se ao seu teste comparativo com um hidrogel análogo não impresso (HG3) (ver Anexo 63). Para esse efeito foi considerada uma amostra potencialmente limpa (isenta de BSA) de HG1 e uma amostra de HG3. Ambas foram colocadas em soluções aquosas contendo BSA para avaliar o seu potencial de absorção da proteína. O procedimento usado é descrito seguidamente. Retirou-se o polímero seco da estufa e procedeu-se à pesagem do mesmo com o auxílio de uma balança analítica. Seguidamente colocou-se o polímero seco num frasco e adicionou-se cerca de 10 mL de  $W_{DI}$  e 100 mg de proteína BSA de forma a avaliar-se a entrada da proteína dentro da rede já estruturada com o

decorrer do tempo (ver Anexo 60). Esperaram-se cerca de 48 horas de modo a ocorrer a absorção de toda a água desionizada (DI) bem como da proteína BSA pelo hidrogel. Segundo diversos estudos a máxima carga/entrada de proteínas no hidrogel verifica-se passado aproximadamente 4 dias [52]. Após esse espaço de tempo retirou-se o polímero colapsado do interior do frasco para uma placa de petri sendo levado à estufa de vácuo a 40 °C durante cerca de 5 dias (ver Anexo 61). Após esse intervalo de tempo, o polímero foi novamente pesado e adicionado a um frasco juntamente com 100 mL de  $W_{DI}$ . Posto isto, foram recolhidas várias amostras de 2 ml sempre com a reposição dessa mesma quantidade à solução e levadas a ler no espectrofotómetro UV-Vis. Todo este processo ocorreu de igual forma para o teste de absorção de BSA no hidrogel NIH.



**Figura 4.9:** Análise por GPC de BSA libertada a partir de um hidrogel MIH.

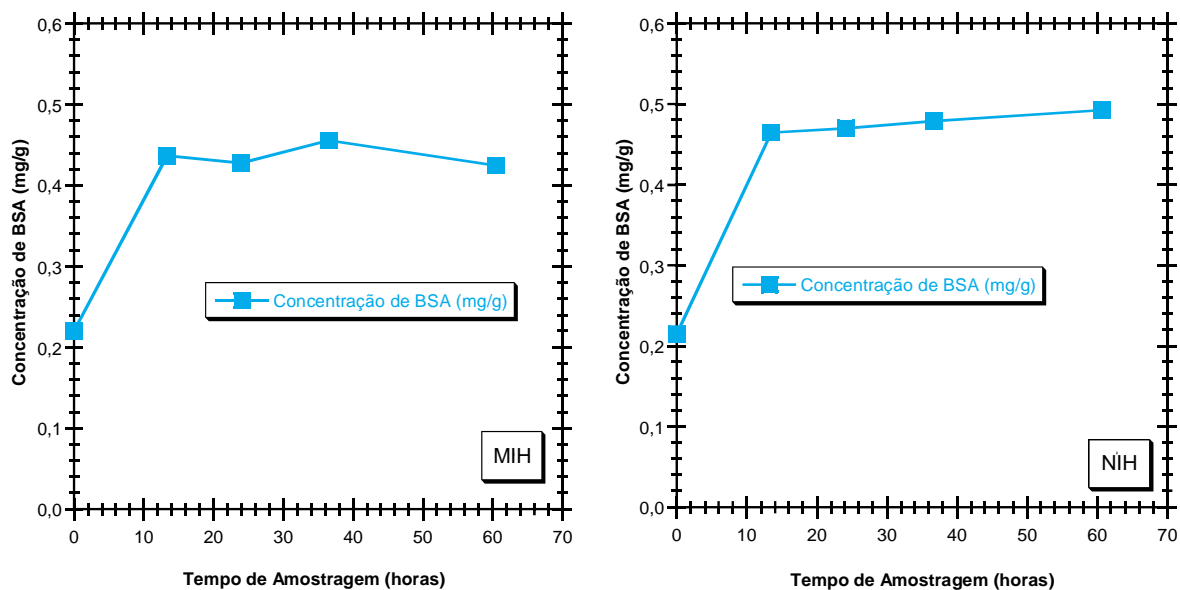


**Figura 4.10:** Análise por GPC de BSA libertada a partir de um hidrogel NIH.

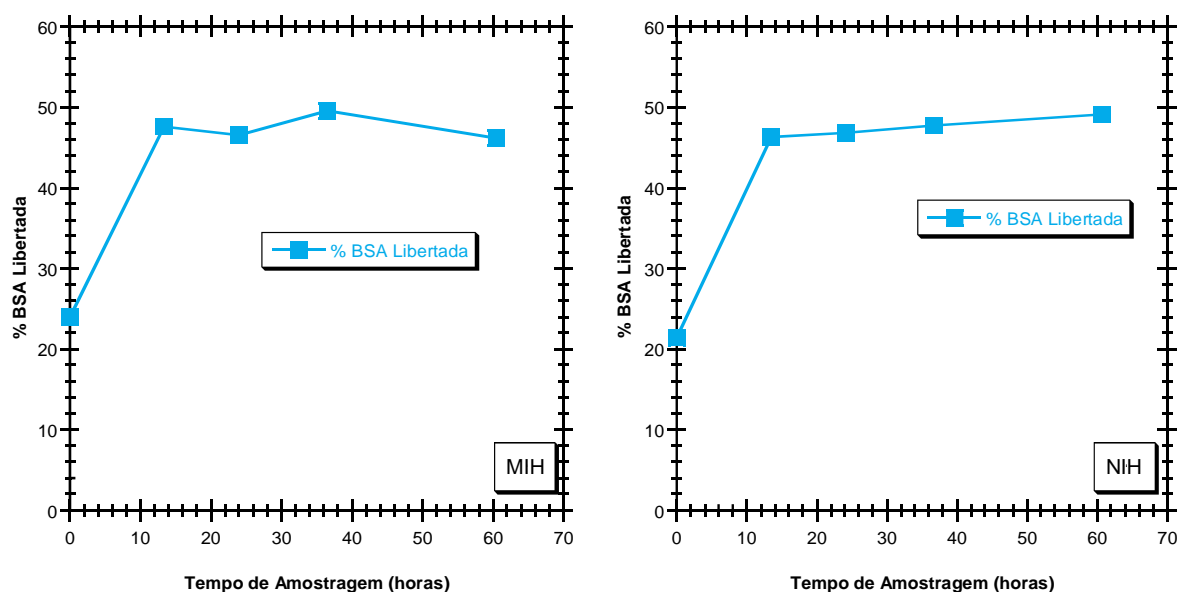
#### 4.7.1 Libertação da Proteína Imobilizada

Com o objetivo de avaliar um eventual efeito de impressão molecular de BSA em hidrogéis, os produtos HG1 (MIH) e HG3 (NIH) foram considerados em testes comparativos envolvendo a adsorção e posterior libertação desta proteína. Os testes de libertação de BSA realizaram-se em soluções aquosas, usando um processo idêntico ao considerado com BSA imobilizada durante a formação da rede. Os resultados obtidos (todo o processo ilustrado nas Figuras 4.9 a 4.12 e Anexos 60 a 62) indicam um comportamento muito semelhante entre os produtos MIH e NIH. Nas Figuras 4.9 e 4.10 e Anexos 60 a 62 estão representadas outras etapas deste estudo.

Pela análise dos gráficos referentes aos polímeros MIH e NIH (Figuras 4.11 e 4.12) pode-se concluir que ambos apresentam aproximadamente 50 % de proteína BSA libertada.



**Figura 4.11:** Concentração efetiva de BSA (mg/g) medida durante o processo de libertação de BSA a partir de hidrogéis MIH/NIH.



**Figura 4.12:** Percentagem de BSA libertada (razão entre a concentração de BSA efetiva e a concentração máxima observável), usando a absorvância UV global da mistura, num comprimento de  $\lambda=277$  nm. Comparação de hidrogéis MIH e NIH, respetivamente.

Os hidrogéis impressos com BSA apresentam em princípio maior capacidade de adsorção e especificidade quando preparados pelo procedimento habitual [56]. No entanto, os resultados aqui obtidos, conforme representados nas Figuras 4.11 e 4.12 mostram um comportamento muito semelhante entre os hidrogéis MIH e NIH. Não parece portanto haver ganhos substanciais

no uso de hidrogéis impressos molecularmente com proteínas (moléculas de grande dimensão provocando perda de afinidade/seletividade). O processo de impressão molecular de proteínas não é um processo simples devido ao elevado tamanho da molécula alvo (proteína) podendo existir perda de seletividade e afinidade. Desta forma, a imobilização de proteínas durante a síntese seguida de passo único de libertação é a alternativa simples ao uso de materiais impressos molecularmente.

#### 4.8 Considerações Finais

Neste capítulo foram apresentados resultados relativos à imobilização e libertação de BSA em hidrogéis sensíveis à temperatura. Foram sintetizados materiais baseados em NIPA contendo BSA imobilizada (um mecanismo similar à impressão molecular), considerando para esse efeito a presença da proteína na solução inicial que foi posteriormente sujeita a polimerização. O plano experimental incluiu a síntese de sete materiais diferentes (HG1 a HG7, conforme descrito nas Tabelas 4-1 e 4-2), todos à temperatura de polimerização de 25 °C (temperatura compatível com sistemas biológicos). As proporções BSA/NIPA/MBAm/água foram mantidas constantes em todas as experiências mas foram variadas as quantidades de iniciador (APS) e catalisador (TEMED) de forma a condicionar (maximizar) a conversão de monómero. Note-se que para aplicações biológicas/biomédicas é importante garantir uma conversão de monómero próximo do total de modo a minimizar o efeito das impurezas. É também importante assinalar que no caso em estudo (imobilização de proteínas), a purificação dos materiais após a síntese é à partida indesejável pois pode provocar a libertação antecipada da proteína. No plano experimental realizado foi incluída a síntese de um hidrogel sem proteína imobilizada (HG3, também referido como produto NIH – Non Imprinted Hydrogel). Este material foi usado como referência para avaliação do processo de imobilização e para a estimativa da absorvância UV que é provocada pelo monómero por converter. Dois dos seis produtos contendo BSA imobilizada (produtos também designados por MIH – Molecularly Imprinted Hydrogel) foram sintetizados na presença de cloreto de sódio (NaCl), usado para tentar aumentar a porosidade do hidrogel e, em consequência, potenciar a libertação de proteína [53]. Após as reações de síntese, os hidrogéis contendo BSA imobilizada foram colocados em soluções aquosas em diferentes condições de temperatura e pH, conforme detalhado na Tabela 4-3. Tentou-se desta forma, estudar a dinâmica de libertação estimulada (pela temperatura/pH) da BSA a partir das redes de NIPA produzidas. Em geral, toda a massa de material produzido foi transferida para 100 mL de solução aquosa nas condições pretendidas, tendo sido feita posteriormente a amostragem da fase líquida (em

diferentes instantes de tempo) para determinação da quantidade de BSA através de espectroscopia UV-Vis. Foram identificadas algumas dificuldades experimentais importantes na medição precisa da quantidade de BSA libertada, nomeadamente devido ao potencial efeito da contribuição do monómero por reagir (ou outro tipo de impurezas) para a absorção UV das amostras analisadas. A presença de partículas de hidrogel sólido nas amostras líquidas (que se tentou minimizar por centrifugação) constitui outra fonte de contribuição para absorção UV que pode diminuir a exatidão das medições realizadas. De modo a tentar avaliar esses efeitos, foram feitos cálculos em dois cenários distintos:

- (i) Considerando que toda a absorção UV medida se deve à BSA;
- (ii) Subtraindo aos valores de UV medidos uma contribuição devida ao efeito de impurezas (monómero por reagir) e/ou partículas de hidrogel. Para esse efeito, a absorção de uma amostra correspondente ao hidrogel HG3 (ausência de BSA) foi usada como padrão (branco).

Desta forma, os resultados apresentados tentam indicar limites superiores e inferiores de libertação de proteína, não podendo ser interpretados como uma quantificação exata deste processo.

As observações efetuadas parecem indicar que, em todos os casos, uma parte substancial da libertação de BSA ocorre nas primeiras 24 a 48 horas (ver salto inicial brusco nas curvas de libertação). Por outro lado, com HG1, mais de 80 % da proteína terá sido libertada a 25 °C ao fim de uma semana sem substituição da solução aquosa envolvente. Os resultados indicam que poderá haver lugar à libertação próxima do total caso se proceda à substituição da solução aquosa (uma ou duas vezes). Este facto poderá estar relacionado com a acumulação de proteína na superfície do hidrogel que impede a saída da restante (limitação da difusão/convecção). Boas taxas de libertação foram também observadas para HG2 e HG4 (sintetizados na presença de NaCl) quando colocados a 25 °C. Taxas finais de libertação de pelo menos 60 % de BSA parecem ser possíveis, o que está em linha com resultados apresentados noutros trabalhos [53]. Não foi observado impacto significativo na tendência de libertação de BSA quando a temperatura foi alterada, durante o processo de libertação, de 25 para 40 °C (ver teste com HG4 no Anexo 4). Os resultados com HG5 indicam uma percentagem de libertação de BSA de pelo menos 40 % sendo de salientar a rápida dinâmica de libertação (perfil praticamente constante desde o início do processo). Também neste caso (ver Anexo 6), não foi observado o aumento

da taxa de libertação quando a temperatura foi alterada, durante o processo de libertação, de 25 para 40 °C. De facto, foi neste caso observado uma ligeira diminuição da proteína em solução que poderá estar relacionada com um eventual aumento das interações entre o hidrogel (nomeadamente à sua superfície) e a BSA, por efeito da temperatura [52]. O efeito do pH (nomeadamente o seu ajuste para pH=7) foi estudado considerando processos de libertação similares de BSA a partir de HG6 (T=25 °C e T=25 °C seguida de aquecimento para T=40 °C). Os resultados obtidos (ver Anexos 7 e 8) indicam um baixo efeito deste parâmetro, tendo sido registadas dinâmicas de libertação razoavelmente próximas daquelas observadas com HG5 (patamar mínimo de libertação de BSA de cerca de 40 % com máximo estimado de cerca de 80 %). O efeito da temperatura na libertação de BSA foi testado com o hidrogel HG7 que foi colocado diretamente a pH=7 e T=40 °C. Os resultados obtidos (ver Anexo 9) parecem indicar uma taxa de libertação mais baixa do que nos casos anteriores, inclusive com a diminuição da absorvância da solução a partir das 24 horas. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que também relatam uma diminuição da libertação de proteína quando a temperatura do sistema é aumentada acima do valor crítico de colapso do material (~ 37 °C). Este facto é relatado como sendo consequência do fecho dos poros da rede do hidrogel, impedido a migração da macromolécula para o exterior [53]. Como atrás mencionado, a quantificação da proteína presente em solução é uma das principais dificuldades a considerar no estudo da sua dinâmica de libertação a partir de hidrogéis nos quais foi imobilizada por polimerização. A possível presença de impurezas (ex. monómero não convertido e/ou polímero) que contribuem para a absorvância global das amostras está na base dessas dificuldades. Este problema pode ser contornado através do uso de um método analítico que separe os diversos componentes presentes na mistura (proteína, monómero/outras impurezas e polímero) e quantifique as suas concentrações. A cromatografia de exclusão de tamanhos (GPC/SEC) com deteção de diferentes sinais (ex. UV, RI, etc.) é uma técnica apropriada neste contexto pois permite fracionar e quantificar os diversos componentes presentes na amostra. Neste trabalho, o sistema de GPC Viscotek GPCmax VE 2001 integrando quatro detetores (RI+LS+IV-DP+UV) foi preliminarmente explorado com este objetivo. Alguns dos resultados obtidos através desta técnica e com importância para este capítulo encontram-se apresentados nos Anexos 26 a 28 e 39. Essas análises GPC mostram que é possível separar e quantificar a BSA (zona de eluição próxima de 15 mL de volume de retenção) e o monómero NIPA (zona de eluição próxima de 40 mL de volume de retenção). A BSA pode ser monitorizada alternativamente pelos sinais de RI, UV (a 223 ou 277 nm), LS ou mesmo viscosidade. No entanto, o sinal de UV é o que apresenta menor ruído. Por outro lado, o monómero NIPA pode ser quantificado através dos

sinais de RI e de UV, mas também com vantagem na utilização do último (melhor resposta). Os resultados aí apresentados confirmam a presença dos dois componentes (BSA e NIPA) nas amostras recolhidas no processo de libertação e a necessidade de corrigir a absorvância UV global medida. Infelizmente não foi possível alargar a todas as amostras retiradas esta análise por GPC dado que se trata de uma técnica economicamente dispendiosa e com um impacto negativo importante na operação do equipamento (entupimento de capilares pela macromolécula, aumento de pressão nas colunas devido a entupimento dos poros, etc.) Apesar de economicamente mais viável, esta análise SEC não garante a separação apropriada entre a proteína e o monómero. Em conclusão, a realização de análises SEC com um número significativo de amostras referentes ao processo de libertação da proteína é uma das sugestões importantes a considerar em trabalhos futuros nesta linha de investigação, visando a quantificação exata da quantidade de macromolécula em solução aquosa. Nos Capítulos 5 e 6 deste trabalho serão apresentados mais resultados preliminares baseados nesta técnica que justificam esta sugestão para investigações futuras. Com o objetivo de avaliar um eventual efeito de impressão molecular de BSA em hidrogéis, os produtos HG1 (MIH) e HG3 (NIH) foram considerados em testes comparativos envolvendo a adsorção e posterior libertação desta proteína. Após purificação e secagem, processos importantes para remoção de proteína (em HG1) e eventual monómero por reagir (em ambos), os materiais foram secos em estufa de vácuo. Posteriormente foram colocados em soluções aquosas contendo BSA. A relação entre massa de hidrogel e quantidade de solução proteica foi ajustada de modo a que o inchamento dos hidrogéis provocasse a entrada de todo líquido na rede de polímero. Desta forma, tentou-se garantir a adsorção no hidrogel de toda a BSA colocada na solução. Os produtos foram posteriormente secos em estufa de vácuo para remoção da água e obtenção de materiais com proteína imobilizada. Procedeu-se depois a testes de libertação da BSA para soluções aquosas, usando um processo similar ao considerado com BSA imobilizada durante a formação da rede. Os resultados obtidos (todo o processo ilustrado nas Figuras 4.9 a 4.12 e Anexos 60 a 62) indicam um comportamento muito semelhante entre os produtos MIH e NIH, com libertação de cerca de 50 % da proteína imobilizada. Não parece portanto haver ganhos substanciais no uso de hidrogéis impressos molecularmente com proteínas. Novas técnicas de impressão molecular, nomeadamente impressão à superfície dos polímeros (facilitando o transporte de proteínas mas com perda da sua proteção pela rede), deverão ser consideradas para obtenção de materiais inteligentes com aplicações na imobilização reversível de macromoléculas biológicas.



## Capítulo 5. Imobilização e Liberação de BSA em Hidrogéis Aniônicos Sensíveis ao pH

### 5.1 Introdução

Neste capítulo apresenta-se a componente experimental envolvida no estudo da imobilização e liberação de BSA em hidrogéis aniônicos sensíveis ao pH, nomeadamente, o hidrogel baseado em ácido acrílico (AA) obtido por FRP. Serão descritos os passos efetuados ao longo do desenvolvimento experimental como a síntese dos hidrogéis, o processo de liberação de BSA, entre outros. Apresentam-se ainda os resultados obtidos. O principal objetivo é estudar o potencial uso de hidrogéis AA na liberação da proteína ao longo do tempo e obter conhecimentos básicos acerca das interações proteína-hidrogel em diferentes soluções de pH. Inúmeros sistemas à base de albumina processados na forma de hidrogéis têm sido preparados e investigados enquanto sistemas de liberação controlada de baixo peso molecular. Estes polímeros, para além de serem biocompatíveis e biodegradáveis por hidrólise química ou ação enzimática, apresentam muitas vezes uma arquitetura e propriedades químicas, físicas e mecânicas semelhantes à matriz extracelular, podendo até conter resíduos químicos reconhecidos pelas células e aos quais elas respondem [52]. Estas características fazem com que estes materiais exibam propriedades bioativas únicas e com grande interesse na ciência dos biomateriais, especialmente na área da engenharia de tecidos e liberação de fármacos [52]. Contudo, e devido à origem animal da maioria destes materiais, estes têm sempre associados a si o risco de imunogenicidade e de transmissão de vetores patogénicos [52]. Uma estratégia para superar estes riscos consiste no desenvolvimento de tecnologias que permitam a obtenção destas proteínas através de fontes não animais, tal como a tecnologia recombinante de proteínas [51]. Algumas dessas formulações, como comprimidos revestidos, cápsulas e matrizes poliméricas revestidas apresentam a desvantagem de, devido às suas dimensões, o seu tempo de residência no intestino grosso não ser suficiente para se dar uma desintegração completa e, portanto, a formulação é eliminada com parte do agente ativo [2]. Então, é necessário aumentar o tempo de retenção destes sistemas no cólon, de modo a poder haver uma liberação completa. Uma diminuição no tamanho das formulações poderá ser uma solução para contornar este inconveniente e, então, as micropartículas são uma boa alternativa a estes sistemas, uma vez que apresentam pequenas dimensões, entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$  [2].

## 5.2 Materiais

Ao longo do trabalho descrito neste capítulo foram usados os seguintes reagentes, BSA de peso molecular de 66 000 Da e raio de cerca de 34,8 angstroms, hidróxido de sódio (NaOH), N,N,N,N'-tetrametilenodiamina (TEMED) e ácido acrílico (AA) a 99 % e de massa molecular 72,06 g/mol, obtidos na empresa fornecedora Sigma-Aldrich [54] (ver Anexos 67 e 68). Utilizou-se como iniciador, APS e como reticulante MBAm. Foram preparadas previamente soluções-tampão com pH a variar entre 2 a 10, sendo o valor de pH ajustado com recurso a um eléctrodo de pH (Anexo 69). Os reagentes incluídos na preparação das soluções aquosas foram ácido clorídrico (HCl) a 37 % e massa molecular 36,46 g/mol, potássio hidrogénio ftalato (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOHCOOK) de massa molecular de 204,23 g/mol e moléculas de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Na análise das amostras recolhidas utilizaram-se células de quartzo e como referência o solvente água desionizada (DI) na leitura das mesmas em espectrofotómetro UV-Vis. Todo o procedimento experimental seguiu uma abordagem baseada em protocolos publicados.

## 5.3 Preparação de Soluções-Tampão

As soluções-tampão (ST) são soluções que resistem a mudanças de pH quando lhes são adicionados ácidos ou bases ou quando uma diluição ocorre [61]. Essa resistência é o resultado do equilíbrio entre as espécies participantes do tampão. Um tampão é constituído a partir de uma mistura de um ácido fraco com a sua base conjugada ou de uma base fraca e o seu respetivo ácido conjugado. Os tampões têm um papel importante em processos químicos e bioquímicos, nos quais é essencial a manutenção do pH. Assim, muitos processos industriais e fisiológicos requerem um pH fixo para que determinada função seja desempenhada. Por exemplo, o sistema tampão HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> é importante fisiologicamente, uma vez que controla o transporte de CO<sub>2</sub> no sangue e o seu pH [57, 62]. As ST foram preparadas utilizando-se um medidor de pH. Este indicador permite identificar se a solução tem um carácter ácido em que predominam os iões H<sup>+</sup>, um carácter alcalino em que os iões predominantes são OH<sup>-</sup> ou, por último, um carácter neutro. O pH varia de ~0 a 14 para qualquer tipo de solução e é determinado pela equação:

$$pH = -\log[H^+] \quad (5.1)$$

A temperatura pode ser um fator que influencia os resultados, devendo a solução em estudo estar à mesma temperatura da solução da calibração. Se tal não acontecer, o eléctrodo que mede o pH possui um sensor de temperatura que permite a compensação automática desta, transmitindo assim resultados mais fiáveis.

## 5.4 Síntese de Hidrogéis Aniônicos por FRP

Existem diversas formas de imobilizar um agente bioativo, neste caso, essa imobilização realizou-se pela incorporação da proteína aquando da síntese dos hidrogéis aniônicos. A escolha do método específico a utilizar é normalmente feita considerando as características de solubilidade do composto bioativo, sendo geralmente o critério subjacente a esta escolha a maximização da eficiência de imobilização. No processo de Síntese de Hidrogéis por FRP, inicialmente pesaram-se as quantidades de cada um dos elementos que se encontram descritos nas Tabelas 5-1 e 5-2. Posteriormente, dilui-se cada elemento separadamente. Primeiramente, começou-se a juntar o ácido acrílico (~2 mL) com W<sub>DI</sub> (usou-se apenas 6 dos 10 mL totais) e seguidamente adicionou-se o hidróxido de sódio (NaOH) (~0,94 g) até se obter uma solução. Verificou-se, no final desta etapa, o aquecimento da solução devido a reações entre o monómero base (AA) e o neutralizador (NaOH). Posto isto, usaram-se os restantes 4 mL de água DI para se dissolver o reticulante, MBAm (~50 mg), BSA (~100 mg) e o TEMED (~100 mg). Foram feitas passagens sucessivas das soluções anteriores até se obter uma solução final com todos os reagentes diluídos. Mediu-se com recurso a um elétrodo, o pH da solução final, sendo esses valores registados na Tabela 5-3. Colocou-se num banho de água termostatado a 25 °C a solução do monómero com o reticulante, sem o iniciador, cerca de 15 minutos a borbulhar e a agitar com árgon. Ao fim desse tempo, adicionou-se a solução de APS previamente preparada (~2 ml de solução com concentração de 33,9 mg/mL), dando-se início à polimerização. Esperou-se aproximadamente 24 a 25 horas para finalizar a formação da rede e consequente imobilização de BSA.

**Tabela 5-1.** Descrição e quantidades dos reagentes usados na imobilização de BSA em hidrogéis aniônicos, utilizando o monómero Ácido Acrílico.

Hidrogel	Monómero [g] AA	Solvente [g] W <sub>DI</sub>	Reticulante [mg] MBAm	Iniciador [mL/mg] APS*/TEMED	Grau de Neutralização NaOH [g]	Proteína [mg] BSA	T [°C]
<b>HG8</b>	2,3317	10,0729	50,6	2,0853/100,2	0,9534	100,8	25
<b>HG9</b>	2,2145	10,0822	50,5	2,0202/100,5	0,9460	-	25
<b>HG10</b>	2,0168	10,0393	50,3	2,0035/103,3	0,9481	100,6	25
<b>HG11</b>	2,0229	10,3157	50,2	2,0563/104,0	0,9401	100,4	25

\* Usou-se uma solução aquosa de APS em água de concentração ~33,9 mg/mL.

**Tabela 5-2.** Condições experimentais na imobilização de BSA em hidrogéis inteligentes sensíveis ao pH (Parâmetros Relativos).

<b>HG</b>	<b>M1</b>	<b>CR</b>	<b>I</b>	<b>CAT</b>	<b>PT</b>	<b>S</b>	<b>C<sub>NaCl</sub></b> (mol/L)	<b>C<sub>M</sub></b> (%)	<b><math>\alpha_N</math></b> (%)	<b><math>\alpha_{CR}</math></b> (%)	<b><math>\alpha_I</math></b> (%)	<b>T</b> (°C)	<b>r<sub>CAT</sub></b> (%)	<b>r<sub>MPT</sub></b> (%)	<b>r<sub>CRPT</sub></b> (%)
HG8	AA	MBAm	APS	TEMED	BSA	Água	-	19,9	70,1	1	0,9	25	70,8	0,004	0,5
HG9	AA	MBAm	APS	TEMED	-	Água	-	19,1	73,2	1	0,9	25	68,4	-	-
HG10	AA	MBAm	APS	TEMED	BSA	Água	-	17,8	80,6	1,1	1	25	65,6	0,005	0,5
HG11	AA	MBAm	APS	TEMED	BSA	Água	-	17,4	79,7	1,1	1	25	67,1	0,005	0,5

De acordo com a Secção 4.3 do Capítulo anterior, Imobilização e Libertação de BSA em Hidrogéis Sensíveis à Temperatura é importante determinar especificamente o conjunto de polimerizações a efetuar qualquer que seja o monómero base a ser utilizado. Assim, os cálculos dessa secção aplicam-se no estudo de hidrogéis sensíveis ao pH. A neutralização de monómeros iónicos (particularmente AA, gerador de hidrogéis aniónicos) é um aspeto importante na sua polimerização dado que a velocidade de reação é fortemente afetada por este parâmetro [21]. Nos casos especificados na Tabela 5-2, realizou-se a neutralização prévia dos monómeros, utilizando a quantidade de NaOH necessária para atingir o valor de  $\alpha_N$  pretendido. Nos casos em que o TEMED foi usado como catalisador (sistema de iniciação aquoso APS/TEMED), o valor foi adotado seguindo estudos prévios na literatura [21].

Assim, a neutralização expressa a fração molar de grupos ácido do monómero que são neutralizados com a base, de acordo com a seguinte expressão:

$$\alpha_N = \frac{n_N}{n_A + n_N} \times 100 \quad (5.2)$$

## 5.5 Ensaios de Libertação de BSA

Os ensaios de libertação dos hidrogéis aniónicos realizaram-se em sequência de três meios distintos que tentam simular as várias condições de pH encontradas ao longo do trato gastrointestinal. Meio ácido (simulação do meio no estômago), meio ligeiramente alcalino (simulação do meio no cólon) e meio básico, como meio de comparação (Tabela 5-3).

**Tabela 5-3.** pH da solução final antes da polimerização, pH da solução-tampão e pH de W<sub>DI</sub> preparada para os diferentes hidrogéis aniónicos.

Hidrogel	pH da solução final	pH da solução-tampão	pH da água desionizada
HG8	5,46	7,46	
HG9	5,55	7,45	
HG10	6,60	2,04	5,2 – 5,4
HG11	6,62	10,1	

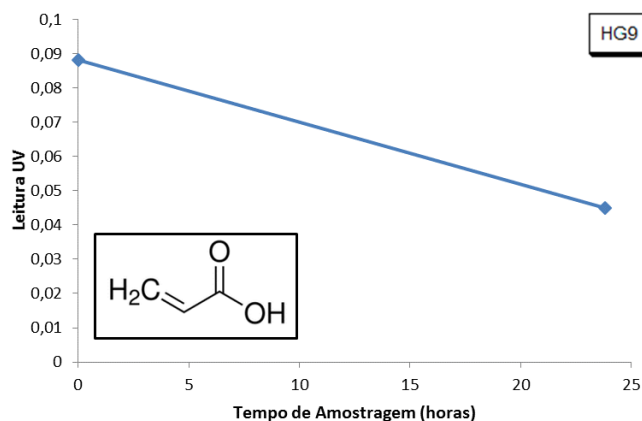
Assim, para os hidrogéis HG8 e HG9 foram preparadas soluções-tampão de pH~7,4. Para esta ST utilizou-se 100 mL de W<sub>DI</sub> em 1, 3625 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> adicionado a 200 mL de W<sub>DI</sub> com 2,8363 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. A diferença entre estes hidrogéis reside no processo de formação da rede

à qual não foi incluída proteína ao hidrogel HG9 (Tabela 5-1). A ideia, após a formação da rede polimérica deste último hidrogel foi estudar a libertação, colocando igualmente o polímero em solução aquosa e obter pelo menos duas leituras em UV durante 24 horas. Estas funcionarão como branco para descontar nas leituras das redes poliméricas contendo BSA em hidrogéis aniônicos. Para o hidrogel HG10 colocado em solução ácida, foi preparada uma solução-tampão de pH~2. Para isso, pesou-se 0,1 M de  $C_8H_5KO_4$  (hidrogeno ftalato de potássio) em 200 mL de  $W_{DI}$  que foi adicionada a uma solução de 1 M de HCl em 50 mL de  $W_{DI}$ . Por fim, na preparação da solução básica (pH~10), adicionou-se cerca de 4 gotas de solução de NaOH previamente preparada (3 g de soluto/100 mL de solvente) a aproximadamente 200 mL de  $W_{DI}$ . Cada um dos hidrogéis sintetizados foi colocado no interior de um frasco juntamente com 100 mL de cada solução correspondente, iniciando-se a libertação de BSA (ver Anexo 70). Ao fim de 48 horas e da recolha de 9 amostras aos hidrogéis HG8, HG10 e HG11 fez-se a reposição/adição de mais 100 mL de solução a pH 7, 2 e 10, respetivamente, de forma a obter-se um polímero menos viscoso pois com o decorrer do tempo uma quantidade significativa de água era absorvida pelo hidrogel tornando a recolha das amostras um processo bastante difícil. Ao hidrogel HG9 também foram adicionados 100 mL de solução aquosa a pH=7, pelo que essa quantidade foi refletida na recolha da segunda amostra. Durante a amostragem foram recolhidas amostras ao meio de libertação em intervalos fixos de tempo, retirando-se 2 mL de solução e preenchendo o volume em falta com o respetivo meio limpo à mesma temperatura. Estas amostras foram centrifugadas para que as partículas maiores e mais densas sedimentassem primeiro, ficando no sobrenadante as partículas pequenas e menos densas. Fez-se a leitura das mesmas (comprimento de onda de 277 nm determinado a partir da curva de calibração usando soluções de proteína padrão) e determinou-se a concentração de BSA libertada por espectroscopia UV-Vis, usando água como referência. Os ensaios de libertação do meio ácido demoraram 54 horas e os do meio ligeiramente alcalino 49 horas. As amostras foram então guardadas no frigorífico ao abrigo da luz, para uma posterior quantificação do princípio ativo por GPC. A recolha de amostras realizou-se sempre em ambiente de laboratório com a temperatura média a variar entre 18 e 22 °C.

### 5.6 Resultados e Discussão

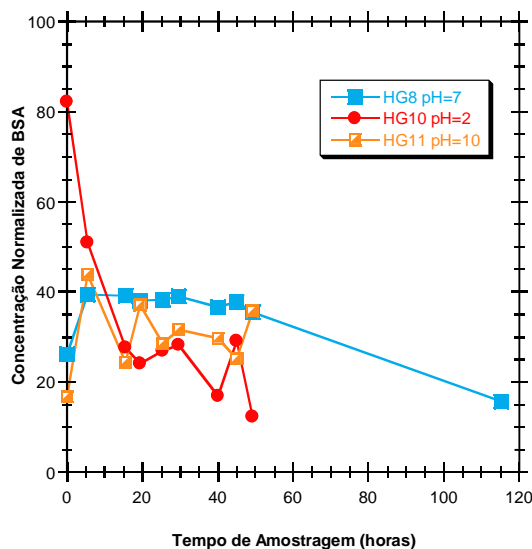
O pH do meio é um dos parâmetros mais importantes no processo de libertação. Isto deve-se ao facto de as proteínas apresentarem diferentes estruturas tridimensionais de acordo com o pH da solução. Portanto, o efeito do pH em hidrogéis impressos foi estudado na gama de soluções-

tampão de pH 2, 7 e 10 (Tabela 5-3). Na Figura 5.1, observa-se a curva característica obtida com o hidrogel HG9 para o monômero AA. Esses valores são usados como referência aquando do estudo da libertação da proteína no sentido de tentar eliminar a contribuição do monômero na absorção de UV medida.



**Figura 5.1:** Curva modelo para o estudo da libertação de BSA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH =7) considerando o hidrogel HG9. Esse hidrogel foi usado como referência para avaliação da absorção UV relativa ao monômero AA (branco).

Na Figura 5.2 apresentam-se os valores observados para a libertação de BSA (% BSA Libertada) em hidrogéis baseados em AA (Tabela 5-2) quando colocados em soluções aquosas com diferentes valores de pH.

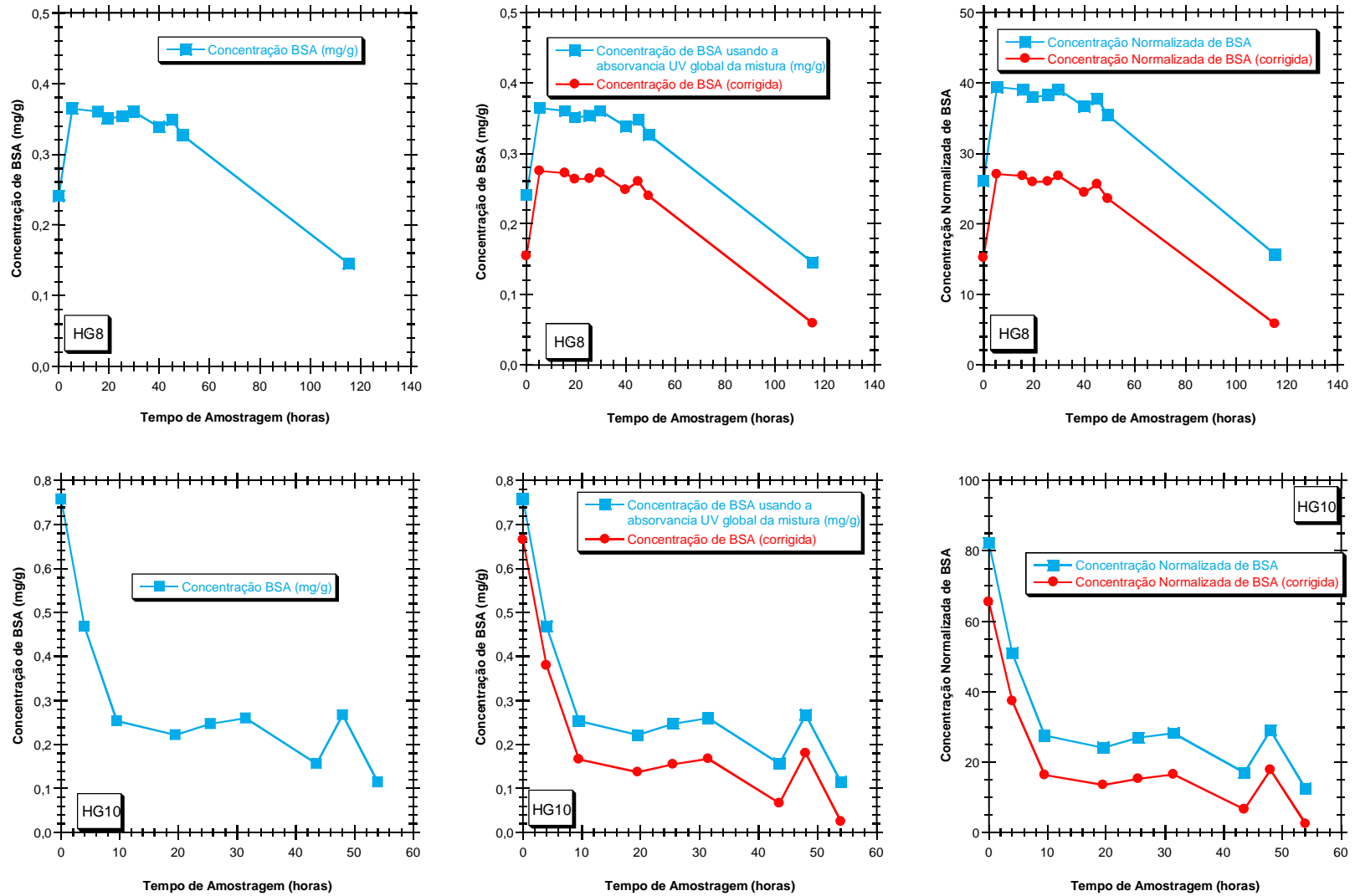


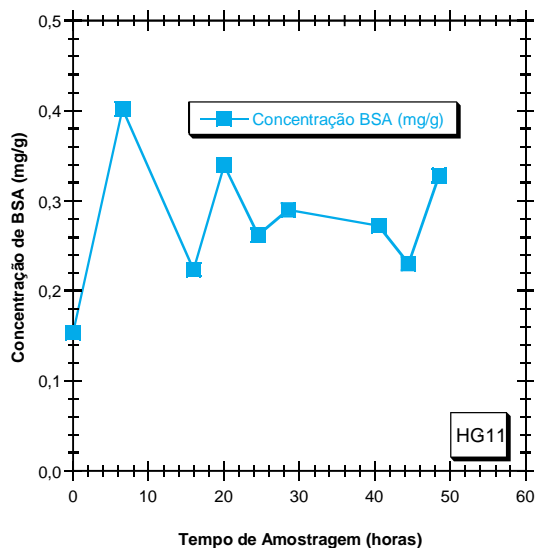
**Figura 5.2:** Efeito do pH no processo de libertação de BSA a partir de hidrogéis aniônicos para a temperatura de 25 °C.

Estes resultados foram obtidos mergulhando uma quantidade conhecida de polímero pré-sintetizado numa solução aquosa de aproximadamente 100 mL com um valor de pH

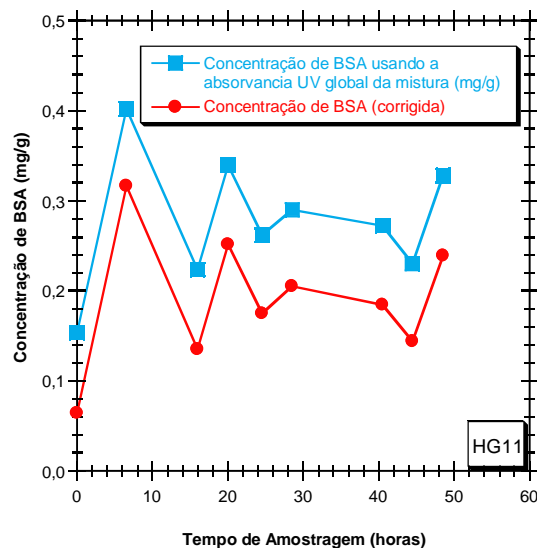
previamente fixado. Estes materiais encontram-se contraídos quando colocados em soluções ácidas (ex. pH~2) e aumentam significativamente o seu volume com o aumento do pH (ex. pH~10). Este comportamento é típico de um hidrogel aniônico (como é o caso dos hidrogéis baseados em AA). Assim, o inchamento/colapso destes hidrogéis deve-se aos grupos funcionais presentes nas cadeias de polímero (ex. grupos ácidos) que sofrem diferentes graus de ionização em função do pH do meio envolvente com reflexo no estado macroscópico da rede de polímero (colapso a meio ácido e inchado em meio alcalino) [63]. Verificou-se que a máxima libertação inicial foi observada a pH=2, contudo, as capacidades de absorção ao longo do tempo são significativamente mais baixas para hidrogéis em meios ácido e básico. A máxima libertação da BSA ao longo do tempo observou-se para a solução de pH=7, eventualmente pelo facto de se encontrar perto do ponto isoelétrico da BSA de 4.8 [56]. A sensibilidade destes materiais à variação do pH pode ser explorada em aplicações biomédicas, nomeadamente no controlo de libertação de proteínas com estímulo pelo pH. Note-se, por exemplo, que no trato gastrointestinal, o estômago apresenta um pH próximo de 1 (meio ácido) enquanto no intestino se observam valores de pH próximos de 8 (meio ligeiramente alcalino) [21]. O processo de libertação da BSA pode eventualmente ser afetado pelo facto de as proteínas serem macromoléculas, podendo assemelhar-se a cadeiras de polímero. Portanto, quando as moléculas de proteína interagem com as redes de polímeros, pode ocorrer a formação de ligações cruzadas físicas que dificultam a difusão das proteínas livres para fora da matriz de gel [52]. Na Figura 5.3, observa-se o estudo da libertação da BSA estimulada pelo pH (hidrogéis colocados numa solução aquosa de pH=7 e pH=2). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g de solução aquosa). Na determinação da concentração da BSA é descontada a concentração de AA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também o cálculo da concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. Nas Figuras 5.4 a 5.6 são apresentados resultados da libertação de BSA a pH=10. A pH=10 (HG11) e a pH=7 (HG8) foram medidos perfis mais estáveis de libertação, especialmente no último caso em que a fração da BSA libertada é praticamente constante ao longo das diversas amostragens na gama de 30 a 40 %. Todos os resultados apresentados nas Figuras 5.2 a 5.6 mostram que o pH tem um efeito importante na libertação da proteína, sendo de assinalar um comportamento peculiar do sistema em meio ácido (pH=2). Neste caso, parece observar-se uma taxa de libertação inicial que poderá rondar os 80 % seguidos da diminuição muito significativa da quantidade da BSA em solução.

Figura 5.3: Libertação da BSA estimulada pelo pH nos hidrogéis HG8 (pH=7,4) e HG10 (pH=2).

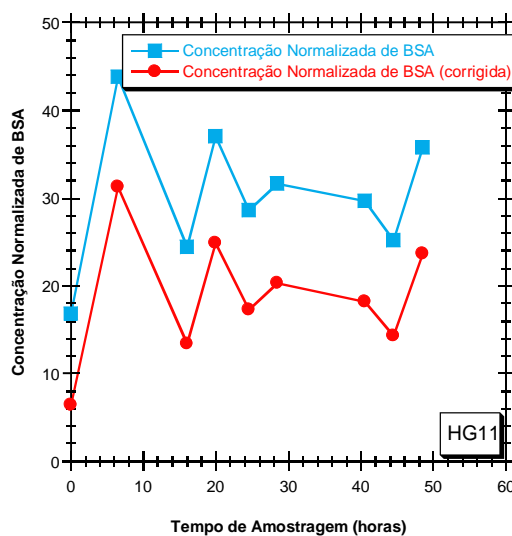




**Figura 5.4:** Concentração efetiva de BSA (mg/g) medida na solução aquosa.



**Figura 5.5:** Valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g de hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de AA por reagir (Concentração de BSA corrigida).



**Figura 5.6:** Concentração normalizada de BSA libertada, usando como referência o máximo que seria possível observar.

## 5.7 Análises por GPC

Para análise por GPC de amostras referentes à libertação da BSA foram usadas as três colunas em série A7 Guard, A3000 e A6000 da marca *Viscotek*, tal como anteriormente descrito. A temperatura das colunas foi fixada em 25 °C, sendo o caudal da fase móvel de 0,5 mL/min e a

deteção por UV fixada a 277 nm. Após a dissolução das amostras em água desionizada (DI), a análise em GPC foi iniciada. Primeiro os frascos são preenchidos com todas as soluções a analisar sendo posteriormente colocados no interior do instrumento (Figura 5.7).



**Figura 5.7:** Frascos de análise cromatográfica (~2 mL) colocados no interior do GPC. Esta análise foi usada de forma preliminar para quantificar a BSA em solução.

Em seguida, a injeção é feita de forma automática e a solução flui a 0,5 mL/min por meio de detetores sendo recolhida posteriormente num reservatório de saída. Nos Anexos 29 a 38 deste documento estão resumidos alguns resultados obtidos por esta técnica no âmbito da libertação da BSA a partir de hidrogéis aniônicos. O Anexo 40 é também importante neste contexto pois mostra a caracterização por GPC de uma solução contendo apenas ácido acrílico (monómero).

### 5.8 Considerações Finais

Em conclusão, neste capítulo são apresentados os resultados relativos à imobilização da BSA em hidrogéis aniônicos sensíveis ao pH. Foram sintetizados quatro materiais diferentes baseados em ácido acrílico (AA), três deles incorporando BSA (HG8, HG10 e HG11) e um na ausência de proteína imobilizada (HG9). Este último hidrogel foi sintetizado para tentar avaliar a presença de monómero por converter nas amostras recolhidas durante o processo de libertação da BSA, de forma análoga ao discutido no Capítulo 4 para o monómero NIPA. As reações de síntese foram realizadas em solução aquosa a baixa temperatura ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), usando o sistema APS/TEMED como iniciador/catalisador. Foi usado MBAm como reticulante (crosslinker) e procedeu-se à neutralização do ácido acrílico (entre 70 e 80 %) com NaOH de forma a ionizar os grupos carboxilo (rede final de acrilato de sódio).

Os produtos sintetizados foram usados para realizar testes de libertação da BSA em meios aquosos com diferentes valores de pH. O hidrogel HG8 foi usado para estudar a libertação de

proteína a pH=7, HG10 a pH=2 e HG11 a pH=10. De forma análoga ao realizado no Capítulo 4, realizou-se a amostragem, em diferentes instantes de tempo, da fase aquosa onde os hidrogéis foram colocados e fez-se a medição da respetiva absorvância UV para tentar quantificar a BSA presente em solução (libertada do hidrogel). Os resultados obtidos parecem indicar que também com hidrogéis aniônicos devem ocorrer interações importantes entre a proteína e o hidrogel que originam a retenção de uma parte importante da macromolécula na rede. Por outro lado, o pH do meio de libertação tem também um grande impacto neste processo que pode resultar da combinação de dois efeitos:

- (i) A sensibilidade da rede de polímero ao pH circundante. Neste caso, o hidrogel colapsa a pH ácido (fechando os poros e impedindo a saída da proteína, de forma análoga ao discutido no Capítulo 4 para hidrogéis termosensíveis) e incha a pH alcalino.
- (ii) Assim como a eventual ocorrência de reações de degradação/associação da proteína por efeito do pH. Este facto poderá contribuir de forma parcial para a explicação da diminuição da absorvância medida ao longo do tempo em meio ácido.

Como discutido no Capítulo 4, a análise por GPC das amostras retiradas ao longo do processo de libertação da proteína, poderão contribuir de forma importante para a elucidação de algumas questões em aberto, nomeadamente a eventual presença de impurezas cooperando para a absorvância global medida por UV. Os resultados nos Anexos 29 a 38 e 40 mostram de forma clara a presença de várias espécies (para além da BSA) nas amostras recolhidas (ex. ver Anexo 31). Adicionalmente, mostram também que o conjunto de espécies detetado varia com o tempo de amostragem dentro de um meio com o mesmo pH (ex. comparar Anexos 33 e 36 ou 37 e 38) e com o valor do pH para o mesmo tempo de amostragem (ex. comparar Anexos 29, 33 e 37). Assim, estes resultados reforçam a necessidade de considerar de forma sistemática a análise por GPC do processo de amostragem de forma a elucidar todos os fenómenos complexos associados com a libertação de proteínas imobilizadas em hidrogéis.

Em geral, os resultados apresentados neste capítulo mostram que o pH pode também ser considerado como parâmetro de controlo de libertação de proteínas imobilizadas em hidrogéis aniônicos (colapsados a pH ácido e inchados a pH alcalino).

# Capítulo 6. Imobilização e Libertação Comparativa de BSA em Hidrogéis Aniônicos, Catiônicos e Termosensíveis

## 6.1 Introdução

Neste capítulo apresenta-se o trabalho desenvolvido na síntese de hidrogéis por polimerização FRP a partir de monómeros sensíveis a diferentes estímulos. Um dos objetivos deste estudo consiste na demonstração da viabilidade experimental de sínteses de diferentes tipos de hidrogéis, nomeadamente aniônicos, catiónicos e termosensíveis quando interagem com proteínas modelo como a BSA. Atendendo às diferentes classes de monómeros envolvidos, as condições de síntese (concentrações, pH, temperatura, iniciador, etc.) foram ajustadas de acordo com cada caso específico. Estes hidrogéis passam por transições reversíveis de volume e de fases quando o ambiente à sua volta sofre alterações específicas, tendo a capacidade de libertar o agente bioativo encapsulado apenas quando ocorre uma mudança específica do ambiente que o rodeia [51]. Estes hidrogéis têm sido extensivamente utilizados na formulação de sistemas de libertação capazes de, quando administrados por via oral, atuarem numa zona específica do trato gastrointestinal – o cólon [51]. As suas propriedades têm sido exploradas para ultrapassar uma série de desafios que o desenvolvimento destes sistemas apresenta: por um lado, estes sistemas têm de permanecer intactos no seu trânsito pelo trato gastrointestinal superior, de forma a proteger os compostos bioativos da degradação química e enzimática e, por outro lado, devem ter a capacidade de libertar os compostos incorporados logo que atinjam o seu alvo [51]. Assim, o rápido desenvolvimento nos últimos anos de proteínas baseadas em sistemas de libertação de fármacos têm estimulado uma grande procura por dispositivos de distribuição adequados [51]. Estes são capazes de proteger as proteínas de ambientes adversos (enzimas proteolíticas e baixo pH) de forma a controlar a reação do corpo à presença da proteína e manipular a libertação da mesma por estímulos ambientais [51]. Muitos investigadores têm analisado o potencial de polímeros à base de hidrogéis de forma a encapsular e libertar proteínas. Todo o processo de libertação é controlado não só pela carga das proteínas mas também pela fração de volume e dimensão dos poros, tamanho das moléculas de proteína e as interações entre as cadeias de proteína e do polímero [52].

## 6.2 Materiais

As estruturas químicas bem como as respectivas propriedades dos diferentes materiais usados neste trabalho encontram-se descritas detalhadamente nos Anexos 79 a 81 deste documento. Os reagentes foram usados conforme recebidos de forma a tentar reproduzir a prática industrial na síntese dos polímeros. Os produtos químicos fundamentais na síntese, caracterização e teste de hidrogéis tais como os monómeros NIPA e AA foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O monómero DMAEMA utilizado neste estudo foi obtido na mesma empresa fornecedora, exibindo uma massa molecular de 157,21 g/mol. Utilizaram-se soluções tampão (pH=2,2 e 10,3) para a realização de dois testes de sensibilidade ao pH a temperatura constante e em estado de equilíbrio. Estas soluções aquosas foram previamente preparadas e os seus valores efetivos de pH foram medidos usando um eletrodo pH (marca *Schott*). Para injeção no sistema de GPC de amostras das soluções aquosas analisadas foram usados filtros de membrana de celulose com porosidade de 0,45 micron (filtros da marca *Whatman*), especialmente apropriados para sistemas aquosos (ver Anexo 71).

## 6.3 Procedimento Experimental

O procedimento experimental adotado para os diferentes hidrogéis (aniônicos, catiónicos e termosensíveis) foi muito semelhante. Note-se que foi sintetizado um quarto hidrogel de monómero DMAEMA nas mesmas condições de síntese dos hidrogéis anteriores, que será utilizado em estudos posteriores não tendo incorporado na sua rede estrutural a proteína BSA (Tabelas 6-1 e 6-2). Preparou-se o banho de água necessário à temperatura requerida, 40 °C, com auxílio de placas de aquecimento e respetivos termopares. Esperou-se até que a temperatura estabilizasse no valor desejado.

**Tabela 6-1.** Descrição e quantidades referentes aos reagentes usados na imobilização de BSA em hidrogéis termosensíveis, aniônicos e catiónicos.

Hidrogel	Monómero [mg] NIPA	Monómero [g] AA	Monómero [g] DMAEMA	Solvente [g] W <sub>DI</sub>	Reticulante [mg] MBAm	Iniciador [mg] VA044	Proteína [mg] BSA	T [°C]
HG12	682,4	-	-	10,1384	10,9	20,2	100,6	40
HG13	-	2,0425	-	10,4552	50,4	100,1	100,9	40
HG14	-	-	5,0043	10,0133	50,6	100,8	100,6	40
HG15	-	-	5,1719	10,6497	50,4	100,4	-	40

**Tabela 6-2.** Condições experimentais na imobilização de BSA em hidrogéis inteligentes sensíveis à temperatura e ao pH (Parâmetros Relativos).

<b>HG</b>	<b>M1</b>	<b>CR</b>	<b>I</b>	<b>PT</b>	<b>S</b>	<b>C<sub>M</sub></b> (%)	<b><math>\alpha_{CR}</math></b> (%)	<b><math>\alpha_I</math></b> (%)	<b>T</b> (°C)	<b><math>\Gamma_{MPT}</math></b> (%)	<b><math>\Gamma_{CRPT}</math></b> (%)
HG12	NIPA	MBAm	VA044	BSA	Água	6,4	1,2	1,0	40	0,025	2,2
HG13	AA	MBAm	VA044	BSA	Água	17,4	1,1	1,0	40	0,005	0,5
HG14	DMAEMA	MBAm	VA044	BSA	Água	32,0	1,1	1,0	40	0,005	0,5
HG15	DMAEMA	MBAm	VA044	-	Água	31,4	1,1	1,0	40	-	-

Posto isto, pesaram-se os diferentes monómeros, NIPA, AA e DMAEMA e o reticulante (MBAm) em diferentes quantidades, recorrendo-se a uma balança analítica, sendo colocados em frascos individualmente (Figura 6.1).



**Figura 6.1:** Ilustração fotográfica dos diversos reagentes usados nas diferentes sínteses dos hidrogéis HG12, HG13, HG14 e HG15.

O frasco que continha o monómero e reticulante foi borbulhado com argon para remoção do  $O_2$ , uma vez que este pode reagir com o iniciador (VA044), diminuindo a taxa de conversão de monómero em polímero. Adicionalmente, e de forma a avaliar o desempenho dos hidrogéis na libertação de biomoléculas terapêuticas, procedeu-se à incorporação da proteína – albumina – comumente utilizada na literatura enquanto proteína modelo (à exceção do hidrogel HG15). Imediatamente antes de se iniciar a reação adicionou-se à solução aquosa de monómeros o sistema de iniciação VA044. A duração típica de cada experiência foi de 106 horas. O prolongamento do tempo de polimerização para além das 24 horas deverá conduzir a um maior grau de conversão na reação de polimerização, e consequentemente à diminuição das impurezas. Após a polimerização de cada um dos hidrogéis, estes foram colocados individualmente no interior de frascos contendo cerca de 100 mL de  $W_{DI}$  (Figura 6.2). Esperou-se 30 minutos até que os hidrogéis se estabilizassem na solução e foram retiradas amostras. Em cada instante de amostragem, foram retirados 6 mL de solução aquosa para análise e repostos 6 mL limpos da mesma solução de modo a garantir que o volume de líquido do meio de libertação se mantivesse constante. As amostras foram centrifugadas (ver Anexo 72), para a remoção de polímero, durante 30 minutos a uma agitação orbital de 6.500 rpm e lidas em espectrofotómetro UV-Vis. Para esse efeito, usou-se um comprimento de onda a 277 nm de modo a tentar maximizar a resposta da proteína. Considerou-se a calibração previamente obtida para a relação efetiva deste composto na solução aquosa analisada com a absorvância UV medida.



**Figura 6.2:** Ilustração fotográfica dos hidrogéis HG12, HG13, HG14 e HG15, respetivamente.

O hidrogel HG15 (ver condições de síntese na Tabela 6-2), que contém exclusivamente monómero DMAEMA, foi sintetizado com o propósito de funcionar como branco na libertação da BSA e ser aplicado posteriormente no estudo da imobilização e libertação de DNA (Capítulo seguinte). Após a recolha das amostras, este hidrogel foi filtrado de modo manual (com recurso a um filtro). Posto isto, e para se obter uma rede bastante purificada colocou-se todo o polímero filtrado novamente num frasco e deixou-se o mesmo embebido em aproximadamente 150 mL de metanol durante 120 horas (purificação por precipitação) (ver Anexo 73). Seguidamente, filtrou-se novamente o hidrogel de modo a obter-se este apenas purificado sendo levado à estufa de vácuo (volume constante) a 50 °C durante 5 dias a secar (ver Anexo 74). O tempo de secagem foi prolongado uma vez que o hidrogel encontrava-se bastante húmido. O processo de libertação dos hidrogéis HG12 a HG14 sob as condições descritas anteriormente demorou aproximadamente 13 dias, num total de 3 amostras recolhidas. Ao fim desse tempo, colocaram-se os hidrogéis sob novas condições de libertação de acordo com as suas propriedades (Figura 6.3).



**Figura 6.3:** Ilustração fotográfica do processo de libertação dos hidrogéis HG12 (termossensível), HG13 (aniónico) e HG14 (catiónico) quando colocados a 40 °C, numa solução aquosa a pH=10 e pH=2, respetivamente.

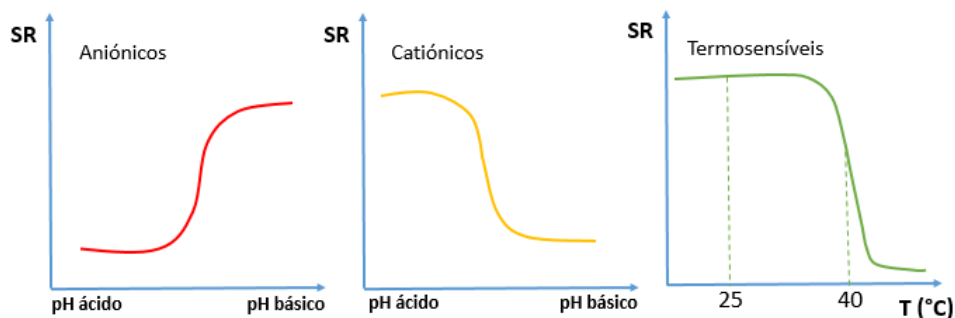
Em qualquer estudo semelhante, na utilização de um hidrogel termosensível, a solução aquosa é água desionizada (DI) sendo aquecida em banho de água a 25 °C ou a 37 °C. Por outro lado, na utilização de um hidrogel sensível ao pH, a solução aquosa deverá ser ácida ou básica. O hidrogel HG12 por se tratar de um polímero termosensível foi colocado em banho de água previamente preparada e a 40 °C. Os restantes hidrogéis, HG13 e HG14, foram filtrados e por se tratarem de hidrogéis aniônicos (sensível a pH alcalino) e catiónicos (sensível a pH ácido) foram colocados em soluções aquosas pré-preparadas de 100 mL de pH 10,38 e 2,29, respetivamente. Na preparação da solução de pH=2,29 usaram-se 300 mL de W<sub>DI</sub> à qual se foi adicionando algumas gotas de HCl de modo a promover a diminuição do valor de pH, medido com o recurso a um elétrico de pH. De modo idêntico, fez-se a preparação da solução de pH=10,38, na qual foi usada uma solução pré-preparada de NaOH na concentração de 300 mg em 100 mL de W<sub>DI</sub>. Esperaram-se 2 horas até à recolha de uma nova amostra de 6 mL de solução de cada um dos hidrogéis. Estas amostras foram analisadas no espectrofotómetro UV-Vis de modo a obter-se os resultados do processo de libertação para os diversos hidrogéis colocados em diferentes condições. A Tabela 6-3 ilustra as condições de libertação da BSA imobilizada em hidrogéis inteligentes quando colocados em diferentes condições de libertação.

**Tabela 6-3.** Condições de libertação da BSA imobilizada em hidrogéis termosensíveis, aniônicos e catiónicos.

<b>Hidrogel</b>	<b>T [°C]</b>	<b>pH da água desionizada</b>	<b>pH da solução-tampão</b>
<b>HG12</b>	25	5,2	-
<b>HG12</b>	40	5,2	-
<b>HG13</b>	25	5,2	-
<b>HG13</b>	25	-	10,38
<b>HG14</b>	25	5,2	-
<b>HG14</b>	25	-	2,29
<b>HG15</b>	25	5,2	-

Na Figura 6.4 faz-se a representação esquemática da razão de inchamento (SR) de hidrogéis aniônicos, catiónicos e termosensíveis quando colocados em diferentes soluções. Sabe-se que os hidrogéis aniônicos (AA) e catiónicos (DMAEMA) respondem ao pH do meio circundante devido à repulsão eletrostática entre os grupos que os constituem [64]. Os hidrogéis aniônicos, carregados negativamente ligam-se ao H<sup>+</sup> da solução aquosa, pelo que permanecem colapsados em meio ácido e inchados em meio básico. Por outro lado, os hidrogéis catiónicos como

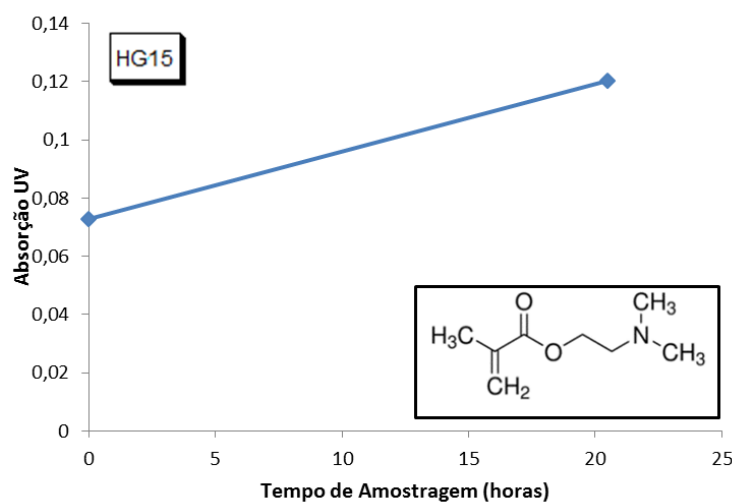
apresentam grupos carregados positivamente, estabelecem ligações com o grupo  $\text{OH}^-$  da solução permanecendo inchados em pH ácido.



**Figura 6.4:** Representação esquemática idealizada para a variação da razão de inchamento de hidrogéis aniônicos e catiónicos em soluções aquosas com diferentes valores de pH e a representação de hidrogéis termosensíveis em soluções aquosas com diferentes valores de temperatura, respetivamente.

De modo semelhante, os hidrogéis termosensíveis (contendo NIPA na sua constituição) respondem a variações da temperatura do meio circundante, pelo que permanecem inchados à temperatura ambiente, entre 20 a 25 °C, e colapsados a 40 °C. Este comportamento é explicado pela existência de pontes de hidrogénio na sua constituição. Estas ligações são quebradas com o aumento da temperatura levando ao colapso do hidrogel e consequentemente à eventual diminuição da libertação do princípio ativo. Os desvios aos valores normais destes parâmetros (pH e temperatura), no corpo humano, podem funcionar como estímulo para transições de fases reversíveis, em hidrogéis.

Na Figura 6.5 observa-se a curva característica para absorção UV do hidrogel HG15.



**Figura 6.5:** Curva modelo para o estudo da libertação da BSA a partir de hidrogéis DMAEMA. O hidrogel HG15 foi usado como referência para a determinação do efeito do monómero na absorção UV (branco).

## 6.4 Resultados e Discussão

Nesta secção apresentam-se os resultados experimentais relativos aos hidrogéis aniónicos, catiónicos e sensíveis à temperatura, mostrando-se a sensibilidade destes à variação do pH do meio envolvente (solução aquosa onde se encontravam colocados) bem como à temperatura. A variação dos parâmetros de síntese permitiu avaliar a influência destes nas propriedades da matriz dos hidrogéis a fim de se obter materiais com resistência suficiente para posterior libertação de agentes bioativos. Hidrogéis sensíveis à temperatura são provavelmente a classe de sistemas poliméricos mais comumente estudada, podendo colapsar ou inchar em volume centenas de vezes num curto espaço de tempo. Hidrogéis baseados em NIPA têm a capacidade de responder à mudança de temperatura passando por uma transição de fase reversível à escala microscópica [55]. A percentagem de libertação de proteína no hidrogel depende principalmente do tamanho dos poros incluídos neste, da estrutura e composição da matriz polimérica assim como do tamanho da proteína [17]. A albumina de soro bovino (BSA) é geralmente escolhida como modelo na libertação cinética de hidrogéis [17]. Nas Figuras 6.6 a 6.8 apresentam-se os resultados obtidos na libertação da BSA imobilizada a partir dos hidrogéis sintetizados. Estes mostram que em todos os casos, a conversão de monómero deverá ter sido substancialmente maior do que aquela observada nos Capítulos 4 e 5. Na Figura 6.6, verifica-se que a taxa de libertação da BSA a partir de hidrogéis NIPA sintetizados a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (colapsados) parece ser muito mais baixa (apenas cerca de 20 % de libertação de proteína) do que aquela observada para materiais produzidos a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para o hidrogel aniónico HG13 (Figura 6.7), a taxa de libertação de BSA é consideravelmente baixa (cerca de 4 %), mesmo quando comparada com os sistemas de imobilização análogos estudados no Capítulo 5. Verificou-se que o hidrogel catiónico (HG14) (Figura 6.8) apresentou o melhor desempenho como sistema de libertação. No entanto, o valor final (cerca de 25 % de BSA libertada) é muito inferior ao conseguido com hidrogéis NIPA sintetizados a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , conforme descrito no Capítulo 4. Normalmente nas curvas cinéticas de BSA são observados dois comportamentos distintos de libertação, uma fase inicial rápida e uma segunda fase lenta, onde o tamanho das proteínas torna-se o principal fator bem como as interações proteína-hidrogel dominam a taxa de libertação. O grau de inchamento diminui sistematicamente com concentrações crescentes de agente reticulante (MBAm). Uma maior densidade de reticulação conduz a um tamanho de rede mais pequeno e conseqüentemente a um grau de imobilização mais baixo. Note-se que neste caso todos os hidrogéis têm uma densidade de reticulação próxima (ver na Tabela 6-2).

Figura 6.6: Libertação da BSA estimulada pela temperatura no hidrogel HG12.

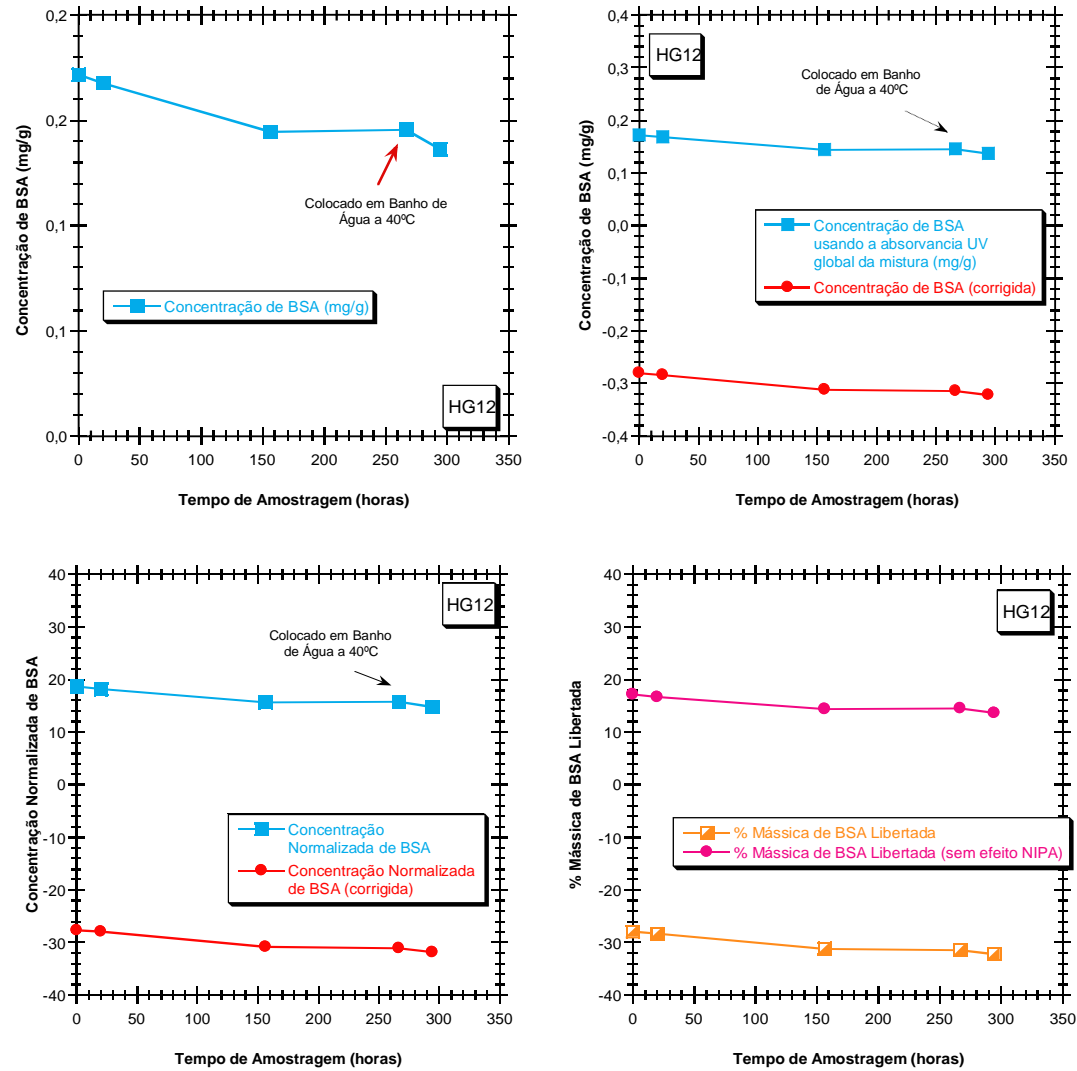


Figura 6.7: Libertação da BSA estimulada pelo pH no hidrogel HG13.

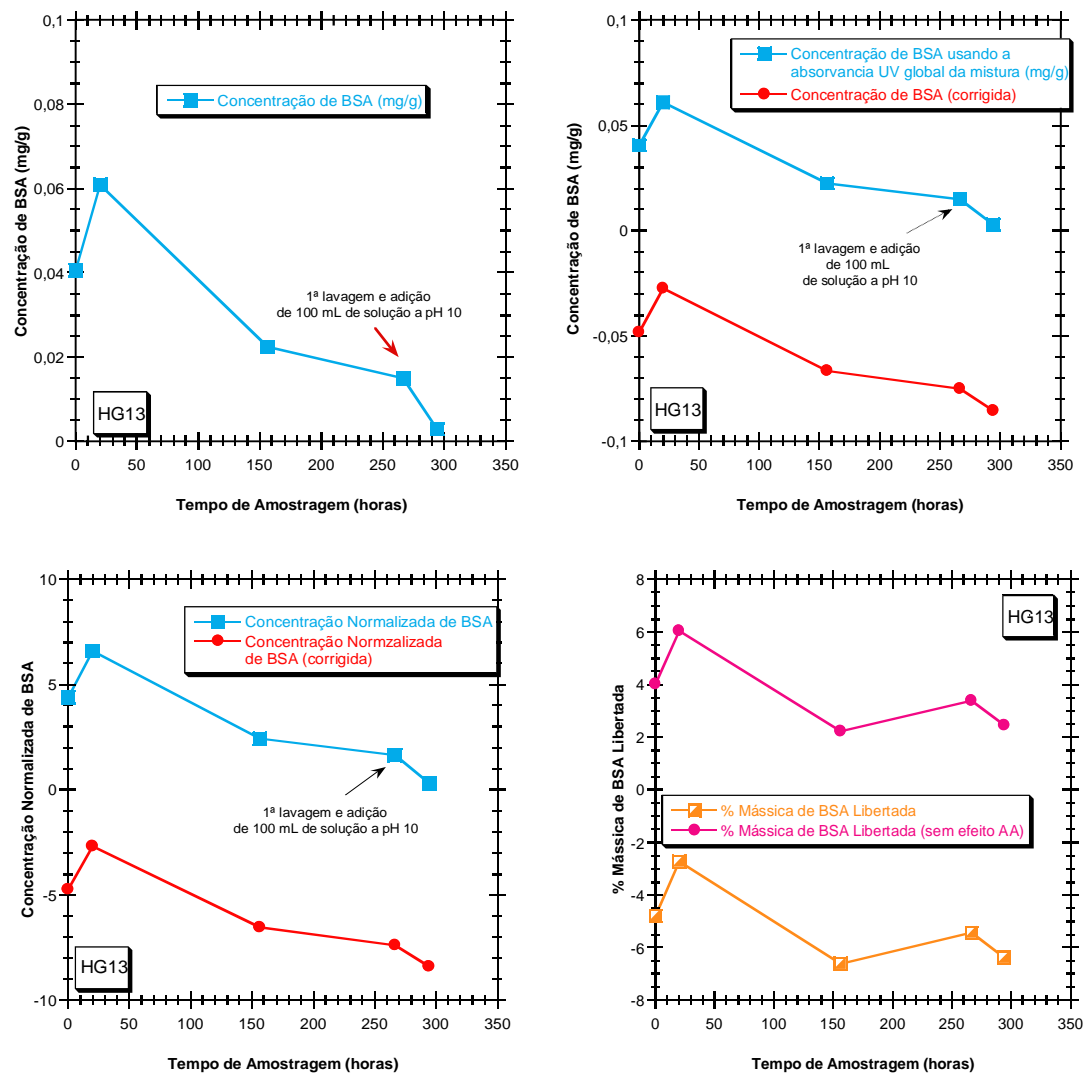
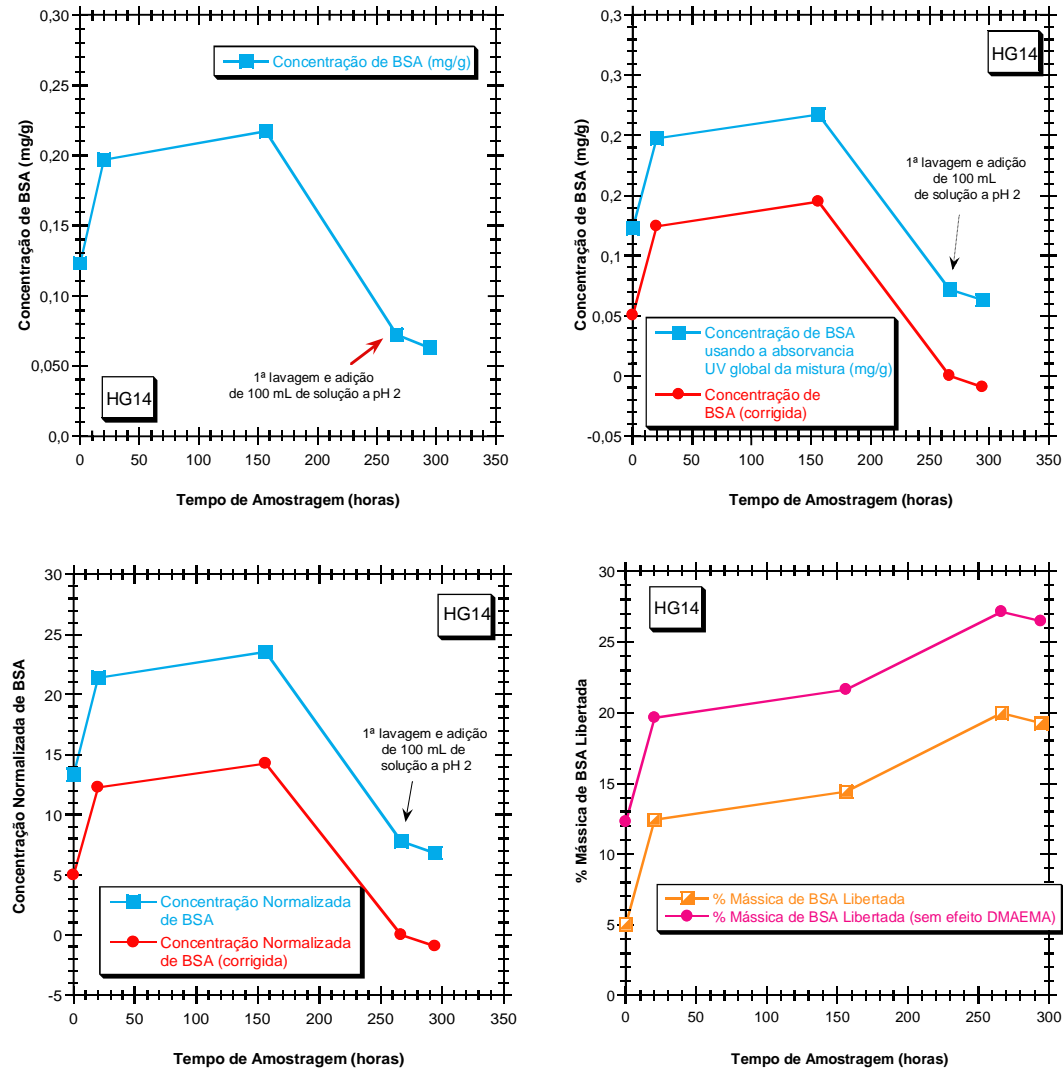


Figura 6.8: Libertação da BSA estimulada pelo pH no hidrogel HG14.



## 6.5 Análises por GPC

As soluções padrão (NIPA, AA e DMAEMA) foram preparadas a uma concentração de cerca de 10 mg/mL. Estes padrões funcionam como um modelo comparativo com as amostras recolhidas dos hidrogéis em estudo (BSA incluída em cada monómero). Antes de injetadas as amostras foram filtradas com um filtro de teflon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Para a análise da BSA, foram utilizadas três colunas de separação, A7 Guard + A3000 + A6000 da marca *Viscotek*. A temperatura da coluna foi fixada em 30 °C, sendo o caudal da fase móvel de 0,5 mL/min, pressão na ordem de 7,4 MPa e a deteção por UV fixada a 277 nm. Os tempos médios para a obtenção da resposta final foram de 50 minutos para o monómero AA, 60 minutos para DMAEMA e cerca de 90 minutos para o monómero termosensível, NIPA. De forma análoga, foram analisadas amostras referentes ao processo de libertação da BSA.

## 6.6 Considerações Finais

Em resumo, neste Capítulo foi comparada a imobilização e libertação de BSA em hidrogéis aniônicos, catiónicos e termosensíveis. Foi realizada a imobilização da proteína através de polimerização com NIPA (gerando um hidrogel termosensível – HG12), com AA (gerando um hidrogel aniônico – HG13) e com DMAEMA (gerando um hidrogel catiónico – HG14). Foi também sintetizada uma rede de DMAEMA não contendo BSA imobilizada (HG15) para uso como referência no estudo do processo de libertação da proteína (processo em tudo semelhante ao descrito nos Capítulos 4 e 5 para os hidrogéis baseados em NIPA e AA). Todas as reações de síntese foram realizadas a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , usando VA044 como iniciador (sistema de decomposição térmica apropriado nesta gama de temperatura de polimerização). Assim, para os hidrogéis NIPA e AA, os processos de imobilização agora considerados são distintos daqueles descritos nos Capítulos 4 e 5, respetivamente. Note-se que a temperatura de polimerização tem um impacto importante no processo de formação das redes baseadas em NIPA: o processo de imobilização agora descrito ( $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ocorre com a formação do hidrogel no estado colapsado, enquanto o sistema de imobilização de proteína gerado no Capítulo 4 ocorreu com formação do hidrogel no estado de inchamento ( $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). O hidrogel baseado em AA sintetizado neste capítulo foi também obtido a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (parâmetro aqui com baixo efeito no inchamento do material) e sem neutralização dos grupos ácido (no Capítulo 5 a imobilização foi realizada a cerca de 80 % de neutralização). Assim, o programa experimental agora descrito tenta avaliar o efeito das condições de imobilização no desempenho dos produtos, nomeadamente o tipo de rede considerada (aniônica/catiônica/termosensível), servindo também

para comparar materiais da mesma família gerados em condições diferentes (ex. de temperatura ou neutralização). Os resultados obtidos na libertação da BSA imobilizada a partir dos hidrogéis sintetizados (ver Figuras 6.6 a 6.8) parecem mostrar o seguinte:

A conversão de monómero deverá ter sido substancialmente maior do que aquela observada nos Capítulos 4 e 5. De facto, os perfis de libertação com/sem subtração da absorção UV correspondente a monómero por reagir são muito próximos ou geram valores negativos, indicando o menor efeito da presença de impurezas. A taxa de libertação da BSA a partir de hidrogéis NIPA sintetizados a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (colapsados) parece ser muito mais baixa (apenas cerca de 20 % de libertação de proteína) do que aquela observada para materiais produzidos a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O aprisionamento irreversível da macromolécula na estrutura da rede devido às interações polímero/proteína e ao menor tamanho dos poros poderá estar na origem dessa observação. A taxa de libertação de BSA a partir do hidrogel aniónico HG13 é substancialmente baixa (cerca de 4 %). O aumento da temperatura de polimerização e a não neutralização dos grupos ácido deverá ter provocado a imobilização quase irreversível da proteína na estrutura do hidrogel. No contexto aqui explorado, o hidrogel catiónico HG14 (baseado em DMAEMA) apresentou o melhor desempenho como sistema de libertação, nomeadamente em comparação com os produtos NIPA e AA. No entanto, o valor final (cerca de 25 % de BSA libertada) é muito inferior ao conseguido com hidrogéis NIPA sintetizados a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , conforme descrito no Capítulo 4. Parece portanto ser evidente que as condições de imobilização afetam de forma crítica o processo posterior de libertação da proteína, nomeadamente a estrutura química do hidrogel (devido às interações com a proteína) e também alguns parâmetros críticos da polimerização, como por exemplo, a temperatura ou neutralização de grupos funcionais (ex. grupos ácido). Os resultados aqui apresentados podem ser usados como ponto de referência para trabalhos futuros que visem a otimização da imobilização de proteínas em hidrogéis inteligentes (sensíveis a estímulos como a temperatura e/ou pH). À semelhança da descrição feita nos Capítulos 4 e 5, a técnica GPC foi também aqui considerada de forma preliminar para tentar elucidar alguns aspetos da libertação da BSA a partir dos hidrogéis sintetizados. Alguns resultados importantes no contexto deste Capítulo encontram-se apresentados nos Anexos 39 a 45 deste documento. Essas observações confirmam a utilidade desta técnica e mostram que é assim possível obter alguns detalhes (ex. presença de monómero por reagir no processo de libertação da proteína) que não ficam claros da absorção UV global das amostras. Também como anteriormente mencionado, em trabalhos futuros, sugere-se a utilização desta técnica de forma sistemática de modo a obter desenvolvimentos adicionais no processo de imobilização e libertação de proteínas em hidrogéis inteligentes.



# Capítulo 7. Imobilização e Libertação de DNA em Hidrogéis Catiônicos

## 7.1 Introdução

Uma série de doenças humanas têm origens genéticas, tal como o cancro ou a fibrose cística [65]. Na área biomédica, existe uma procura cada vez maior de sistemas de entrega de genes adequados, onde o objetivo principal consiste no fornecimento de um gene ou do substituto funcional de um gene defeituoso [66]. A inserção de um gene em células alvo de forma a substituir genes defeituosos denomina-se “Terapia Genética”, sendo uma forma rápida e promissora da abordagem terapêutica em desenvolvimento. Contudo, a injeção direta do DNA é inviável não só devido à degradação enzimática mas também devido à má transferência de informação. Vetores virais e não virais têm vindo a ser desenvolvidos para ajudar na introdução de DNA funcional nas células [65]. Embora os vetores virais (vírus) sejam agentes de entrega bastante eficazes, existem diversas desvantagens que comprometem a sua eficácia, tal como a resistência repetida a infeções [65]. Materiais sintéticos como os lípidos catiônicos, lipossomas, quitosanos, polímeros de aminoácidos e nanopartículas inorgânicas têm sido sugeridos como vetores não virais a fim de evitar todas as limitações dos vetores virais [65]. Polímeros catiônicos são o grande interesse na investigação de vetores não virais, pois têm funcionalidades importantes no complexo carregado negativamente do DNA, gerando grupos neutros e positivos com a capacidade de atravessar a membrana celular negativa. Como resultado, uma grande área de investigação emergiu na tentativa de traduzir o potencial dos polímeros catiônicos em vetores confiáveis e seguros [65]. Segundo alguns investigadores, é importante que seja possível a libertação controlada de DNA de plasmídeo e fármacos simultaneamente. O conhecimento adquirido a partir desta transportadora dupla é crucial para avanços na conceção de sistemas de libertação de medicamentos e genes anticancerígenos, combinando a química e terapias génicas no tratamento de cancro [54].

## 7.2 Materiais

Para a realização do estudo da imobilização e libertação de DNA assim como na preparação de soluções, utilizou-se água desionizada (DI), recolhida a partir do aparelho *Barnstead-Easy pure LF*. A resistividade da água desionizada (DI) é de 18,3 M $\Omega$ -cm. Utilizaram-se soluções tampão (nos valores de pH 2,2; 7,4 e 10,3) para a realização dos testes de libertação de DNA com

variação do pH em estado de equilíbrio. Estas soluções tampão foram previamente preparadas, recorrendo-se a protocolos existentes. Os valores efetivos do pH das soluções aquosas foram medidos usando um eletrodo pH da marca *Schott*. Os químicos fundamentais para a síntese, caracterização e teste foram adquiridos na mesma empresa fornecedora, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os reagentes foram usados conforme recebidos de forma a tentar reproduzir a prática industrial na síntese de polímeros. O ácido desoxirribonucleico (DNA), utilizado em todos os ensaios, foi obtido a partir de testículos de salmão da espécie *Oncorhynchus keta*. A percentagem (%) de teor de guanina-citosina (G-C) para o DNA de salmão é indicado como sendo de 41,2 % [67]. A temperatura de fusão ( $T_m$ ) encontra-se na ordem dos 87,5 °C em 0,15 M de cloreto de sódio e 0,015 M de citrato de sódio [68]. A sua massa molecular é de  $1,3 \times 10^6$  Da, ou seja, contem aproximadamente 2000 bp (pares de bases) (ver Anexos 75 e 81) [43]. Para a iniciação da polimerização utilizou-se o VA044, um iniciador térmico para temperaturas elevadas na ordem dos 40 °C (ver Anexos 76 e 80).

### 7.3 Imobilização Interna de DNA em redes de PDMAEMA

Numa primeira fase deste capítulo, pretendeu-se estudar o processo de libertação de moléculas de DNA ao longo do tempo (a partir de hidrogéis onde foi imobilizado internamente), para isso, é necessário sintetizar o hidrogel contendo DNA em condições experimentais adequadas, tais como o pH ou a temperatura de síntese. O monómero utilizado para esta finalidade é o DMAEMA, gerando um hidrogel biodegradável e catiónico. Sabe-se que o aumento da carga positiva num polímero melhora a absorção celular mas apresenta um efeito prejudicial em termos de toxicidade proveniente da desestabilização e da perda de integridade das membranas celulares. Assim, para superar esta desvantagem, torna-se apropriado conceber e utilizar polímeros catiónicos biodegradáveis de baixo peso molecular (baixa toxicidade) operado também como vetores não virais [65]. Inicialmente, preparou-se o banho de água necessário à temperatura de 40 °C e prepararam-se 3 soluções (HG16, HG17 e HG18) de forma idêntica, sendo cada um dos elementos pesados de acordo com as Tabelas 7-1 e 7-2. Cada um dos elementos foi diluído separadamente e colocado no interior de um frasco de 20 mL, onde se inseriu primeiramente a solução do monómero com o reticulante e após a agitação com argon adicionou-se o iniciador (VA044). Esperou-se aproximadamente 96 horas até que toda a solução fosse polimerizada, não existindo monómero por reagir. Contudo, estas soluções, sem iniciador, foram deixadas em repouso num longo período de tempo, acabando por solidificar e adquirindo uma elevada viscosidade mesmo antes de serem colocadas a 40 °C. Esta observação

deve-se ao facto de se utilizar a água como solvente, sendo esta absorvida pela macromolécula de DNA acabando por aumentar de volume. Assim, e de forma a não se influenciarem os resultados esperados, voltou-se a preparar 3 novas soluções (HG19, HG20 e HG21) nas mesmas condições de síntese (Tabelas 7-1 e 7-2).

**Tabela 7-1.** Descrição e quantidades referentes aos reagentes usados na imobilização de DNA em hidrogéis catiónicos (baseados em monómeros DMAEMA).

Hidrogel	Monómero [g] DMAEMA	Solvente [g] W <sub>DI</sub>	Reticulante [mg] MBAm	Iniciador [mg] VA044	[mg] DNA	T [°C]
<b>HG16</b>	5,0160	10,0326	50,6	100,1	100,4	40
<b>HG17</b>	5,0063	10,5756	51	101,0	100,3	40
<b>HG18</b>	5,0431	10,0295	50,3	101,2	100,6	40
<b>HG19</b>	5,0475	10,2384	50,5	100,9	101,9	40
<b>HG20</b>	5,0671	10,0314	50,5	100,2	100,9	40
<b>HG21</b>	5,0102	10,0294	50,8	101,3	101,3	40

#### 7.4 Libertação de DNA Imobilizado Internamente em redes de PDMAEMA

Após o período estipulado de polimerização, foram preparadas 3 soluções tampão de pH 2, 7 e 10. Pretende-se assim, estudar a libertação de DNA em soluções aquosas com diferentes valores de pH. Na preparação da solução de pH=2,29 pesou-se uma quantidade de 300 mL de W<sub>DI</sub> à qual se foi adicionando algumas gotas de HCl de modo a promover a diminuição do valor de pH, medido com o recurso a um eléctrodo de pH. De modo idêntico, fez-se a preparação da solução de pH=10,38, na qual foi usada uma solução pré-preparada de NaOH numa concentração de 300 mg em 100 mL de W<sub>DI</sub>. Na obtenção da solução neutra (pH=7,46) preparou-se uma solução-tampão recorrendo-se a uma solução ácida de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e uma solução básica de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (ver Anexo 77). Após a preparação de cada solução individualmente, adicionou-se cerca de 100 mL de solução a pH=2 aos hidrogéis HG16 e HG19, aos hidrogéis HG17 e HG20 adicionou-se solução a pH=7 e aos restantes hidrogéis, HG18 e HG21, solução a pH=10 (Figura 7.1). Ao fim de 10 minutos, foram retiradas amostras (~4 mL de solução com a reposição da mesma quantidade de solução limpa de acordo com o pH da solução aquosa) em 2 diferentes tempos para posterior leitura em espectrofotómetro UV-Vis.

**Tabela 7-2.** Condições experimentais na imobilização interna de DNA em hidrogéis inteligentes (catiônicos).

<b>HG</b>	<b>M1</b>	<b>CR</b>	<b>I</b>	<b>PT</b>	<b>S</b>	<b>C<sub>M</sub></b> (%)	<b><math>\alpha_{CR}</math></b> (%)	<b><math>\alpha_I</math></b> (%)	<b>T</b> (°C)	<b><math>\Gamma_{MPT}</math></b> (%)	<b><math>\Gamma_{CRPT}</math></b> (%)
HG16	DMAEMA	MBAm	VA044	DNA	Água	32	1,1	1,0	40	0,0003	0,024
HG17	DMAEMA	MBAm	VA044	DNA	Água	30,9	1,1	1,1	40	0,0003	0,023
HG18	DMAEMA	MBAm	VA044	DNA	Água	32,2	1,1	1,0	40	0,0003	0,024
HG19	DMAEMA	MBAm	VA044	DNA	Água	31,7	1,1	1,0	40	0,0003	0,024
HG20	DMAEMA	MBAm	VA044	DNA	Água	32,3	1,1	1,0	40	0,0003	0,024
HG21	DMAEMA	MBAm	VA044	DNA	Água	32,0	1,1	1,1	40	0,0003	0,024

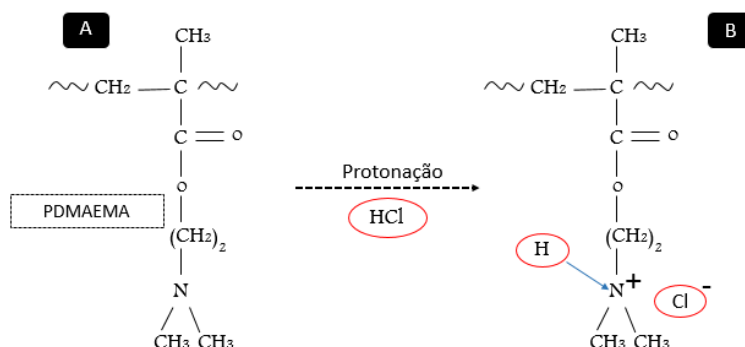


**Figura 7.1:** Ilustração fotográfica do processo de libertação de DNA imobilizado internamente a partir dos hidrogéis HG16 a HG21, respetivamente. A comparação visual dos frascos permite avaliar de forma simples a estrutura (colapso/inchamento) dos hidrogéis quando colocados em meios com diferente pH.

## 7.5 Imobilização Externa de DNA em redes de PDMAEMA (DNA *Binding*)

Numa segunda etapa deste capítulo, realizou-se o estudo da imobilização externa de DNA em redes de PDMAEMA pré-sintetizadas, de forma a estudarmos a sua imobilização num processo designado por “DNA *Binding*”. Na primeira fase fez-se a protonação do hidrogel PDMAEMA [65]. Para isso, preparou-se inicialmente uma solução de HCl na concentração de 0,01 M (~0,36 g) em 100 mL de  $W_{DI}$ , sendo medido o seu valor de pH com recurso a um eletrodo pH. A esta solução ácida (pH=1,24), retirou-se cerca de 50 mL que foram usados na protonação de aproximadamente 300 mg de polímero seco de DMAEMA pré-sintetizado (ver condições de síntese do hidrogel HG15 na Tabela 6-1) (ver Anexo 78). Considerou-se o período de tempo de cerca de 24 horas como sendo suficiente para que fosse atingido o estado de equilíbrio (máxima absorção do polímero) e protonação. Após este período, o polímero protonado foi levado a filtrar para remoção do excesso de solução de HCl e posteriormente a secar na estufa de vácuo durante 48 horas. Sabe-se que o polímero de DMAEMA ( $M=157,21$  g/mol) é constituído por espécies que, por via da reação de polimerização, se convertem em unidades repetitivas da sequência polimérica, os monómeros, que se encontram ligados entre si. Na sua extremidade encontra-se um grupo alcalino, constituído por um azoto e dois grupos metil (etapa A da Figura 7.2) que sofrem protonação por efeito do ácido clorídrico HCl (etapa B da Figura 7.2). Este, por sua vez, é constituído por um átomo de hidrogénio ( $H^+$ ) de carga positiva e um átomo de cloro (Cl) de carga negativa. A ligação de um protão à superfície do átomo de azoto (N) é influenciada pela heterogeneidade química e pelo comportamento da carga na sua superfície.

Assim, a ligação deste determina o estado dos grupos funcionais, em baixo valor de pH ficando estes protonados.



**Figura 7.2:** Efeito do processo de protonação nos grupos funcionais do polímero PDMAEMA.

Após o período crucial ao processo de protonação, é necessário promover a ligação do polímero DMAEMA com as moléculas de DNA. Contudo, este processo não é imediato pelo que é necessário estimar a quantidade de cargas positivas existentes no hidrogel de modo a ter uma referência quando se utiliza o mesmo na ligação com as cargas negativas da molécula de DNA. Assim, para uma determinada massa de hidrogel (polímero seco de DMAEMA) é possível determinar o número de cargas positivas que existem nessa mesma massa pela expressão:

$$P = \frac{mHG}{157,21} \quad (7.1)$$

Sendo,

P - O número de cargas positivas existentes no hidrogel.

mHG - A massa de hidrogel usada no processo de protonação.

M= 157,21 Da - A massa molecular do monómero DMAEMA [69].

Sabe-se que o ácido desoxirribonucleico é uma longa molécula em dupla hélice formada por um esqueleto de grupos fosfato e açúcar localizados na parte externa da molécula, estando as duas cadeias ligadas entre si por pontes de hidrogénio estabelecidas entre bases azotadas complementares e localizadas na parte interna da molécula. O emparelhamento faz-se sempre entre uma base purina e uma pirimidina, de tal modo que a adenina emparelha-se sempre com a timina e a guanina com a citosina num conjunto de aproximadamente 2000 pares de bases/unidades [32, 43]. Num processo semelhante ao descrito anteriormente é importante estimar o número de cargas negativas existentes numa determinada massa de DNA de salmão, pela seguinte expressão:

$$N = \frac{m_{DNA}}{1,3 \times 10^6} \times 2000 \times 2 \quad (7.2)$$

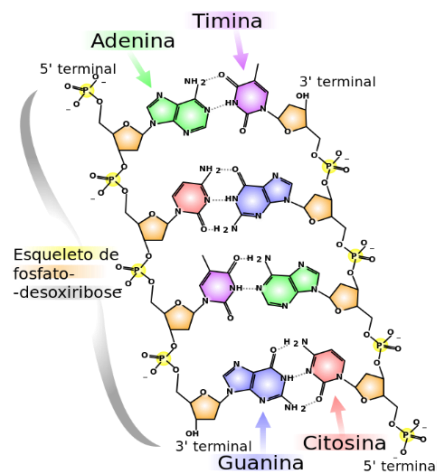
$$\Leftrightarrow N = \frac{m_{DNA}}{1,3 \times 10^6} \times 4000$$

Sendo as novas variáveis definidas da seguinte forma:

N - O número de cargas negativas existentes na massa de DNA de salmão.

mDNA - A massa de DNA usada.

M=  $1,3 \times 10^6$  Da - A massa molecular da molécula de DNA [43].



**Figura 7.3:** Esquema representativo da cadeia de DNA em hélice dupla. Regras de emparelhamento das bases A=T (duas ligações hidrogênio) e G=C (três ligações hidrogênio) [70].

Uma vez que por cada par de bases/unidades de Guanina-Citosina e Adenina-Timina encontra-se dois grupos de carga negativa (Figura 7.3), é importante considerar a existência desses mesmos grupos no cálculo das cargas negativas da quantidade de DNA utilizada (Equação 7.2). É importante estabelecer antecipadamente a relação de 1:1 entre as cargas positivas e negativas aquando da ligação do polímero com as moléculas de DNA [65]. Nesse caso, a relação entre as massas de hidrogel e DNA a considerar é dada pelas seguintes relações:

$$P = N \quad (7.3)$$

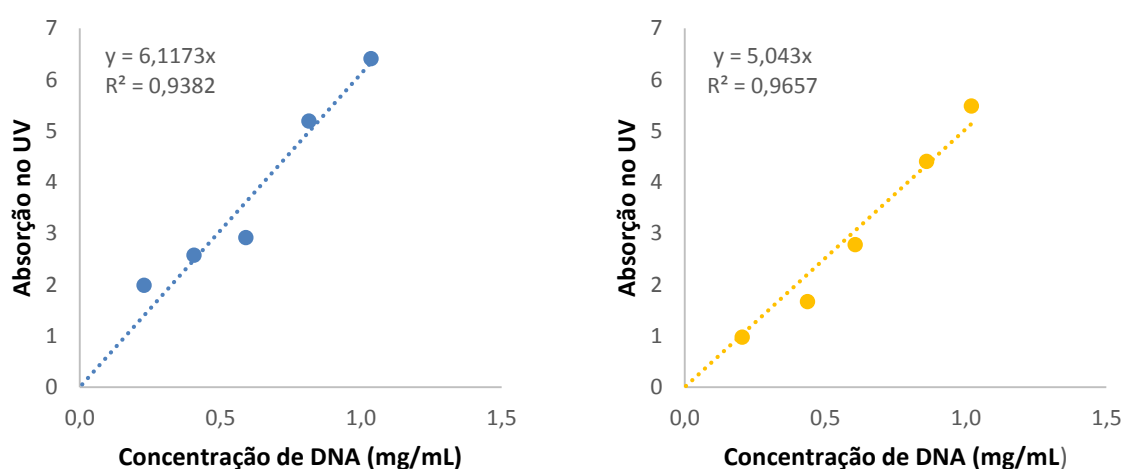
Por isso, a partir das expressões anteriores determinou-se a seguinte relação:

$$mHG = \frac{4000 \times 157,21}{1,3 \times 10^6} \times m_{DNA} \quad (7.4)$$

$$\Leftrightarrow mHG = 0,48 \times m_{DNA}$$

### 7.5.1 DNA Binding em modo Fechado (*batch*)

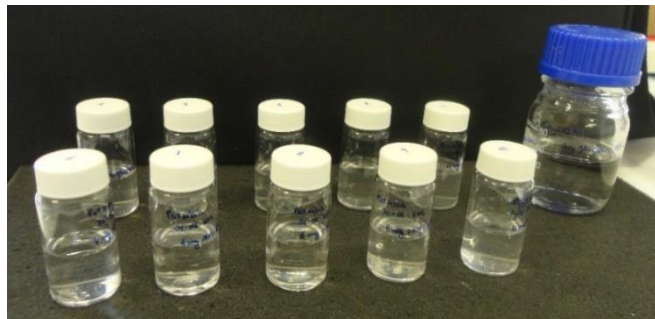
Nesta etapa, preparou-se um conjunto de soluções padrão de DNA de concentrações entre 0,2-1,0  $\mu\text{g/mL}$  de acordo com vários artigos disponíveis na literatura [65]. Estas, foram utilizadas para construir a curva de calibração de DNA quando colocado em soluções de glucose e água desionizada (DI) (Figura 7.4). As curvas de calibração foi feitas a partir das referências de modo a ser possível relacionar a absorvância UV com a concentração das soluções. A fim de se manter a absorvância com valores na região linear, foi necessário diluir as soluções padrão. É importante que se efetue a mesma diluição em cada solução.



**Figura 7.4:** Curva de calibração de DNA em soluções contendo glucose (esquerda) e  $W_{DI}$  (direita) obtida por espectroscopia de ultravioleta (UV) em modo fechado usando o comprimento de onda  $\lambda=260$  nm.

A solução de glucose foi preparada numa concentração de 5 % (massa/volume), ou seja, pesou-se aproximadamente 5 g de glucose que foram dissolvidas em 100 mL de  $W_{DI}$ . Esta solução foi levada ao ultrassons (~10 minutos) a fim de se promover a sua total dissolução. Seguidamente, prepararam-se 10 frascos fechados de 20 mL, 5 frascos contendo DNA em glucose e os restantes contendo DNA em  $W_{DI}$  (Figura 7.5). Usou-se uma balança analítica para efetuar todas as pesagens de DNA, glucose e  $W_{DI}$  a incluir em cada frasco. Essas quantidades variam entre 2 mg a 10 mg de DNA, mantendo-se constante a quantidade de glucose e  $W_{DI}$  (~10 mL). Com o objetivo de se promover a dissolução total das moléculas de DNA, colocou-se cada um dos frascos individualmente num sistema de ultrassons. Seguidamente, uma pequena quantidade dessas soluções (~1 mL) foi então retirada, convenientemente diluída com  $W_{DI}$  (~9 mL). A suspensão de polímero resultante foi depois centrifugada. Essas amostras servem como valores de referência antes da adição do hidrogel e de se iniciar o processo de ligação/imobilização. A

quantidade de DNA presente nas amostras recolhidas foi determinada por espectroscopia UV-Vis. Cada amostra foi lida na absorvância de 260 nm, correspondente ao pico de absorção do DNA. Verificou-se que a diluição (em 10 vezes) das amostras é bastante importante, pois estas, sem diluição apresentavam valores de absorvância superior a 1.



**Figura 7.5:** Ilustração fotográfica das soluções de DNA em  $W_{DI}$  (frente) e em Glucose (atrás) bem como a solução contendo 5 % de glucose (direita).

Nesta fase, os agentes ativos (DNA) são incorporados no hidrogel depois deste se encontrar formado. Sendo que é necessário primeiramente pesarem-se as quantidades de hidrogel seco de DMAEMA a incluir a cada frasco de acordo com a concentração de DNA dos mesmos. Essas mesmas quantidades foram determinadas a partir da relação entre a massa de hidrogel e a massa de DNA a partir da expressão anterior (Equação 7.4). Na Tabela 7-3 podem-se observar essas mesmas quantidades de hidrogel já calculadas.

**Tabela 7-3.** Quantidades de hidrogel de DMAEMA, massa de DNA e massa de solução (glucose ou  $W_{DI}$ ) incluídas em cada frasco no processo de DNA *Binding* em modo *batch*.

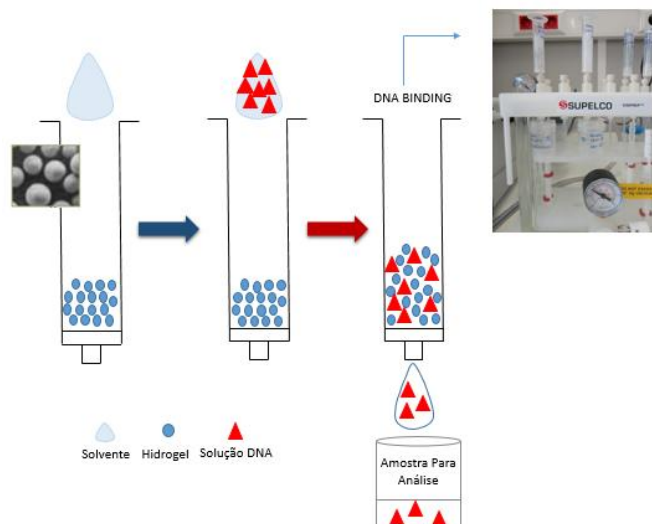
	Teste	Massa	Massa de	Massa	Teste	Massa	Massa	Massa	
		DNA	Solução de	Hidrogel		DNA	$W_{DI}$ [mL]	Hidrogel	
DNA em Glucose		[mg]	Glucose [mL]	[mg]		[mg]			DNA em $W_{DI}$
	1	2,3	10,0565	1,1	6	2,1	10,2809	1,1	
	2	4,3	10,5773	2,1	7	4,4	10,0890	2,2	
	3	6	10,1603	2,9	8	6,1	10,0718	2,9	
	4	8,2	10,0612	4	9	8,6	10,0080	4,2	
	5	10,4	10,0373	5	10	10,3	10,1058	4,9	

Após a incorporação do hidrogel seco em cada uma das soluções anteriores de DNA, estas foram deixadas agitar, num agitador magnético, ao longo de aproximadamente 74 horas de forma a permitir que o solvente impregnasse e inchasse as partículas de polímero. Ao longo

desse período de imobilização foram recolhidas amostras nos tempos 0 (após 30 minutos), 1 (após 18 horas) e 2 (após 74 horas). Estas amostras são o resultado da imobilização do DNA num processo designado por “DNA *Binding*”, que permite determinar a percentagem de DNA que efetivamente se ligou ao hidrogel (Figuras 7.9 a 7.11).

### 7.5.2 DNA *Binding* em modo Contínuo (SPE)

Avaliando-se os resultados obtidos para as diferentes amostras de DNA de salmão em soluções de glucose e de  $W_{DI}$  em modo *batch*, verificou-se que para as concentrações de DNA (mg/mL) de 0,8150 (Teste 4) usando glucose e 0,8593 (Teste 9) usando  $W_{DI}$  no tempo 0 (após 30 minutos) obtiveram-se valores de % DNA *Binding* mais elevados (Figura 7.9). Assim, e com bases nesses resultados, voltou-se a preparar novas soluções com as mesmas quantidades (8 mg de DNA em 10 mL solvente) e iniciou-se um novo estudo em modo contínuo com recurso ao método de SPE (Extração em Fase Sólida). Este método de extração usa uma fase sólida e uma fase líquida de forma a isolar uma delas ou algum género de soluto que se encontre em solução, sendo usada de forma a purificar as amostras antes de estas sofrerem análise cromatográfica. A fase estacionária é contida numa coluna de plástico (normalmente de 1-10 mL de capacidade). A coluna pode conter um filtro na sua base de modo a não deixar passar a fase estacionária e controlar o fluxo de solvente que o atravessa [5, 71]. Neste caso particular, o SPE foi usado para avaliar o modo como alguns materiais podem absorver num processo contínuo. Inicialmente, preparou-se uma nova solução protonada, através da adição de hidrogel seco DMAEMA (~300 mg) a uma solução de HCl (~50 mL a pH=1,24) previamente preparada (ver Secção 7.5), durante sensivelmente 48 horas. Após este tempo, levou-se a solução a filtrar e a secar de modo a obter-se apenas o hidrogel seco e protonado (~340 mg), este, por sua vez, foi dividido em duas partes iguais (~170 mg). Neste estudo, pretende-se avaliar a ligação das cargas negativas das moléculas de DNA com as cargas positivas do hidrogel em questão, ou seja, avaliar a quantidade de agente ativo que ficou retido no hidrogel. Primeiramente, inseriu-se um filtro na base de uma seringa de 10 mL à qual adicionou-se o hidrogel protonado (~170 mg) e 1 mL de  $W_{DI}$  durante 24 horas para que o hidrogel inchasse e adquirisse uma estrutura bastante compacta e organizada, tal como se exemplifica na primeira etapa da Figura 7.6.

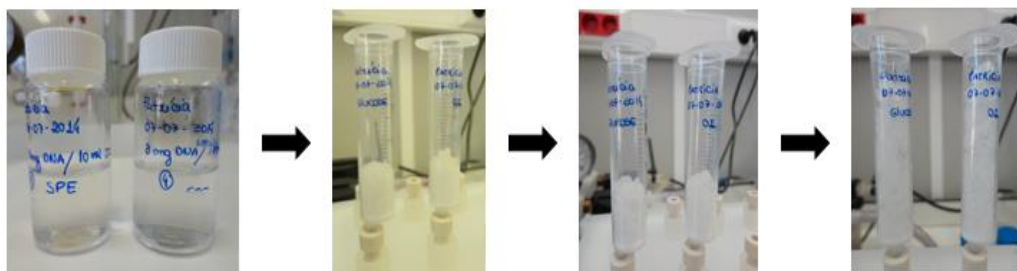


**Figura 7.6:** Etapas envolvidas na separação líquido-sólido da solução contendo DNA em glucose e  $W_{DI}$ .

Após esse tempo, adicionou-se a solução de DNA e pela abertura da coluna, essa mesma solução aquosa foi obrigada atravessar as partículas do hidrogel gota a gota. As amostras são recolhidas em frascos de 20 mL que são colocados na parte inferior da saída da coluna. O instrumento está conectado a uma bomba de vácuo para obrigar a solução a passar através do sólido. As amostras recolhidas sofrem diluição (em 10 vezes) de forma a não se obterem valores superiores a 1 quando da sua leitura. No final deste processo, recolheu-se uma amostra “DNA Binding” que contém alguma parte da solução que efetivamente não se ligou ao hidrogel, pois neste caso, não se fez o estudo no sentido de se promover a total ligação de ambos os componentes, ou seja, não foi determinada a quantidade exata de hidrogel e de solução de DNA de modo a que o número de cargas negativa se igualasse ao número de cargas positivas. Assim, na solução recolhida e após a sua análise através do espectrofotómetro UV-Vis é possível averiguar a % DNA Binding. Este procedimento descrito resumidamente na Figura 7.6 é análogo para ambas as soluções de DNA em estudo, contendo glucose ou  $W_{DI}$ . Independentemente da solução em análise, todo o processo desde a adição da solução de DNA até à sua recolha na amostra final demora aproximadamente 60 minutos (Figura 7.7).

De forma a obterem-se resultados comparativos referentes à influência da protonação do hidrogel quando colocado em solução ácida de HCl, fez-se um novo estudo, de procedimento semelhante, a única diferença reside no facto de se utilizar o hidrogel DMAEMA simples. Assim, voltou-se a preparar novas soluções de DNA nas mesmas condições e pesaram-se novas quantidades de hidrogel seco (~170 mg para cada solução de glucose e de  $W_{DI}$ ), sem alteração

das propriedades finais de síntese e repetiu-se todo o processo descrito anteriormente com recurso ao exemplo da Figura 7.6.



**Figura 7.7:** Ilustração fotográfica das soluções de DNA, do hidrogel após a adição de 1 mL de água desionizada (DI), hidrogel ao fim de 24 horas de absorção e inchamento dos hidrogéis no final de todo o processo após 60 minutos, respetivamente.

Avaliando-se novamente os resultados obtidos para as diferentes amostras de DNA em soluções de glucose e de  $W_{DI}$  em modo *batch*, verificou-se que para as concentrações mais baixas de DNA (mg/mL) de 0,2287 (Teste 1) usando glucose e 0,2043 (Teste 6) usando  $W_{DI}$  no tempo 2 (após 74 horas) obtiveram-se valores de % DNA *Binding* mais baixos (Figura 7.11). Assim, voltou-se a repetir todo o processo anterior utilizando-se o hidrogel protonado mas considerando-se novas soluções de DNA (2 mg de DNA em 10 mL de solvente) (Figura 7.8).



**Figura 7.8:** Ilustração fotográfica das diferentes etapas do estudo em SPE. Primeiramente observa-se as soluções de baixa concentração (Teste 1 e 6) com o hidrogel protonado, seguidamente as soluções de elevada concentração (Teste 4 e 9) com hidrogel não protonado e protonado, respetivamente.

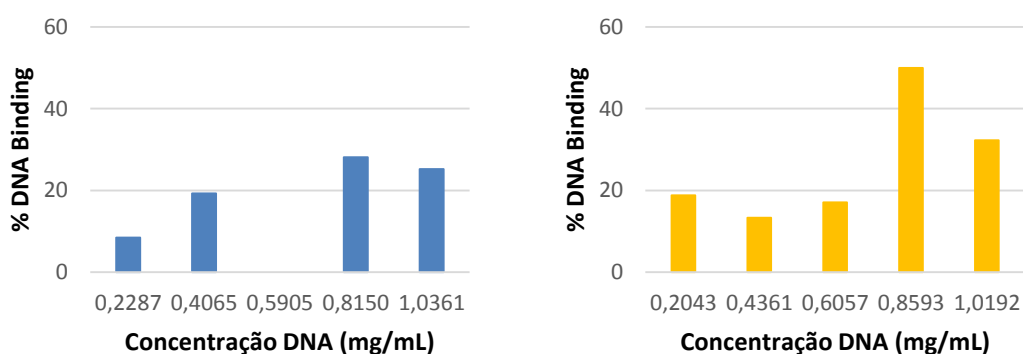
## 7.6 Análises UV em modo Fechado e por GPC

As soluções padrão de DNA para o estudo em GPC foram preparadas a uma concentração de cerca de 10 mg/mL. Antes de injetadas as amostras foram filtradas com um filtro de teflon de 0.45  $\mu$ m. A análise de DNA efetuou-se sob as mesmas condições da proteína BSA, alterando-se unicamente a deteção por UV que se realizou a 260 nm. Os resultados para a solução filtrada

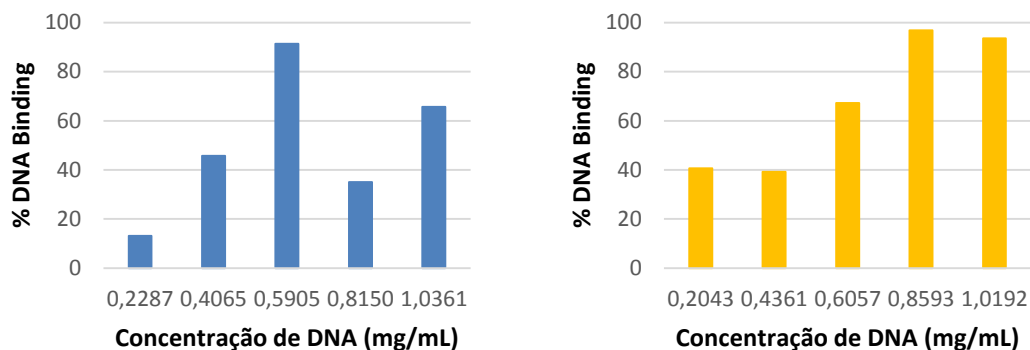
e não filtrada de DNA encontram-se nos Anexos 46 e 47 deste documento. Também é possível visualizar o processo de libertação de DNA nos hidrogéis HG16 a HG21 nos Anexos 10 a 15. Estes resultados foram obtidos por análise UV em modo fechado.

## 7.7 Resultados e Discussão

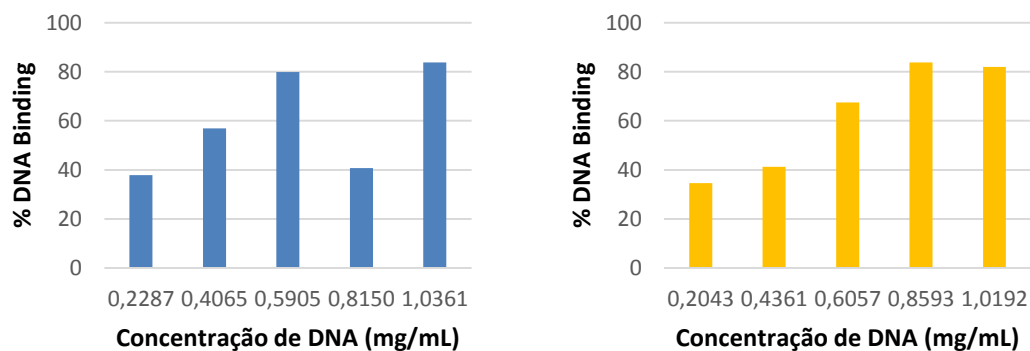
Para o processo de DNA *Binding* em modo fechado (modo *batch*) (Figuras 7.9 a 7.11) e Anexos 16 a 25, foi determinado que a percentagem de imobilização da macromolécula depende da concentração de DNA na solução aquosa, mesmo garantindo em todos os casos uma relação entre cargas positivas e negativas P/N=1. Os resultados mostram que é efetivamente possível obter taxas de DNA *Binding* muito elevadas (superiores a 80% em alguns casos). Não foi claro o efeito da adição de glucose à solução aquosa [52] parecendo ser possível obter bons resultados de DNA *Binding* na presença e na ausência de glucose. Em geral, verificou-se que pelo menos 18 horas são necessárias para maximização do processo de DNA *Binding* em modo fechado. Nos Anexos 16 a 25 são apresentadas as comparações da quantidade de DNA retida no hidrogel. Como esperado, os hidrogéis conseguiram reter maioritariamente as moléculas de DNA à sua superfície. Isto deve-se ao facto dos hidrogéis apresentarem características especiais como o grau de inchamento, cinética de absorção, permeabilidade ao soluto e desempenhos “*in vivo*” favoráveis [72].



**Figura 7.9:** Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA em modo *batch*. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e  $W_{DI}$  (direita), para as amostras recolhidas nas diferentes concentrações no tempo 0 (após 30 minutos). Testes 1 a 10 descritos na Tabela 7-3.

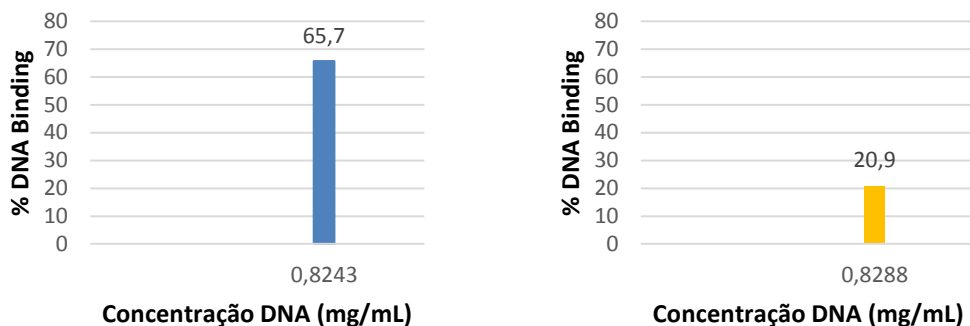


**Figura 7.10:** Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA em modo *batch*. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e W<sub>DI</sub> (direita), para as amostras recolhidas nas diferentes concentrações no tempo 1 (após 18 horas). Testes 1 a 10 descritos na Tabela 7-3.

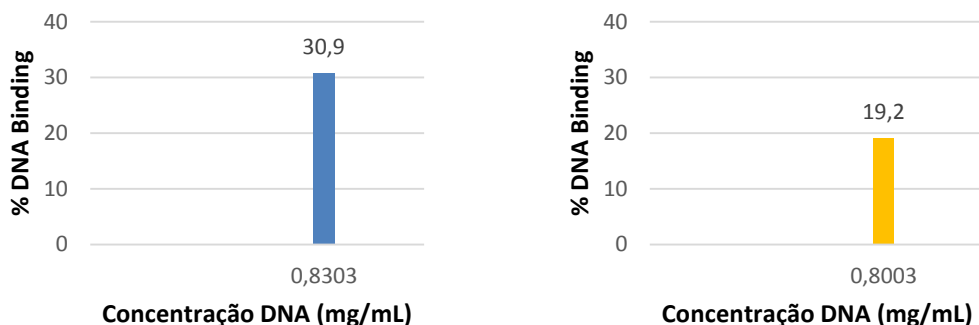


**Figura 7.11:** Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA em modo *batch*. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e W<sub>DI</sub> (direita), para as amostras recolhidas nas diferentes concentrações no tempo 2 (após 74 horas). Testes 1 a 10 descritos na Tabela 7-3.

Seguidamente, apresentam-se os resultados (Figuras 7.12 e 7.13) do estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA protonada e não protonada das amostras recolhidas dos frascos 4 e 9 em modo contínuo (SPE). Deve-se ter em conta que o resultado obtido para a concentração de 0,8288 (mg/mL) de DNA em hidrogel protonado poderá eventualmente não corresponder ao valor real devido à passagem demasiado rápida da solução pelo hidrogel. O processo de DNA *Binding* em SPE foi explorado na tentativa de otimização deste mecanismo, nomeadamente a potenciação das taxas de imobilização com um tempo de contacto mais curto. Os resultados mostram que é possível obter desta forma taxas elevadas de DNA *Binding* (superiores a 60 % em alguns casos) em cerca de 1 hora.

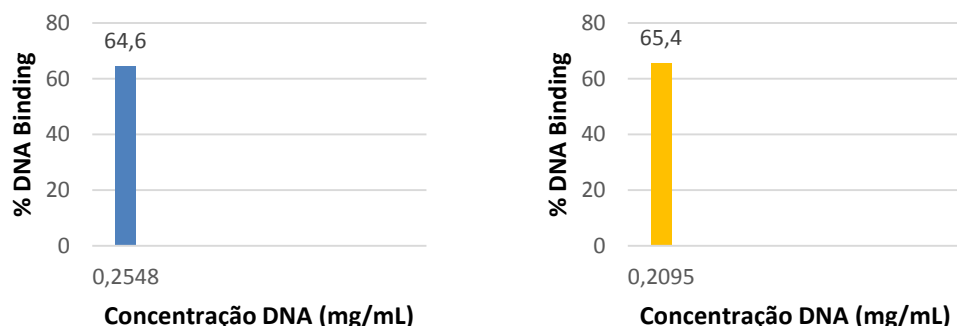


**Figura 7.12:** Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA protonadas em modo SPE. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e W<sub>DI</sub> (direita). Condições de imobilização semelhantes às descritas nos testes 4 e 9 da Tabela 7-3.



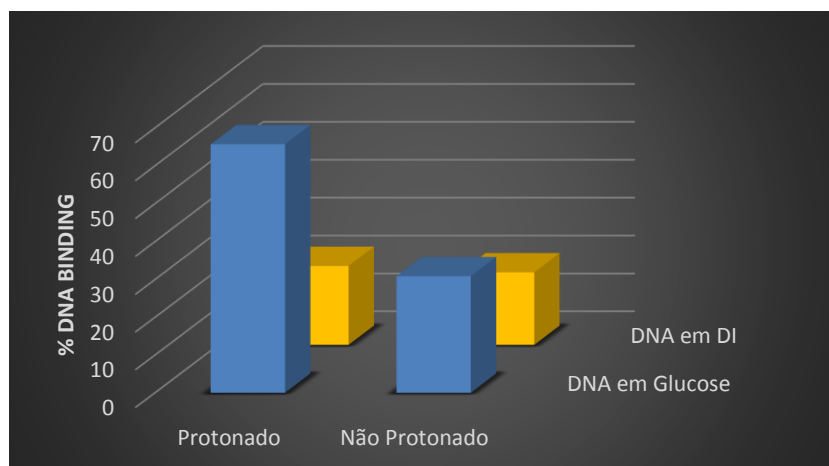
**Figura 7.13:** Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA não protonadas em modo SPE. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e W<sub>DI</sub> (direita). Condições de imobilização semelhantes às descritas nos testes 4 e 9 da Tabela 7-3.

Seguidamente apresenta-se os resultados do estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA protonada das amostras recolhidas dos testes 1 e 6 em modo contínuo (SPE).

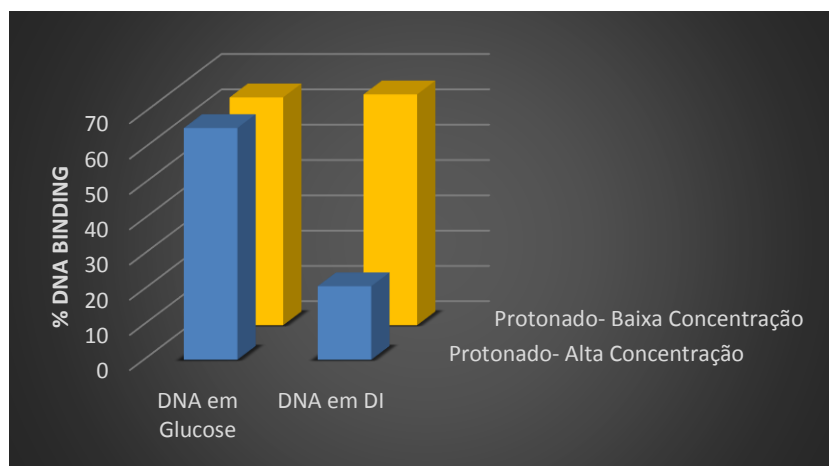


**Figura 7.14:** Resultados referentes ao estudo da imobilização de DNA em redes de PDMAEMA protonadas em modo SPE. Apresentam-se os resultados da quantidade de DNA (% DNA *Binding*) que efetivamente se ligou ao hidrogel DMAEMA quando colocado em soluções contendo Glucose (esquerda) e W<sub>DI</sub> (direita). Condições de imobilização semelhantes às descritas nos testes 1 e 6 da Tabela 7-3.

Nas Figuras 7.15 e 7.16 faz-se a análise comparativa do processo de DNA *Binding* em SPE. Pela análise dos gráficos conclui-se que efetivamente é possível imobilizar em redes de hidrogéis catiônicos biomacromoléculas como o DNA. Esta imobilização é mais eficiente em soluções protonadas e na presença de glucose. Em termos de concentrações de DNA, a imobilização apresenta valores mais elevados quando são estudadas soluções de baixa concentração (~ 0,2 mg/mL de DNA).



**Figura 7.15:** % DNA *Binding* em soluções protonadas e não protonadas de DNA na concentração de 0,8 mg/mL em glucose e em W<sub>DI</sub>



**Figura 7.16:** % DNA *Binding* na solução protonada de baixa concentração (Teste 1 e 6) e na solução de elevada concentração (Teste 4 e 9).

A análise da sensibilidade do processo de DNA *Binding* às condições de operação em SPE (hidrogel protonado/não-protonado e na presença/ausência de glucose) mostram que o mecanismo é potenciado pela protonação do hidrogel (como seria de esperar) e pela presença de glucose em solução, especialmente quando a concentração de DNA é elevada (ex. 0,8 mg/mL).

## 7.8 Considerações Finais

Em resumo, neste Capítulo foram estudados diferentes processos de imobilização e libertação de DNA de salmão em hidrogéis catiônicos. Para esse efeito, foram consideradas redes de polímero baseado no monômero DMAEMA. Foi feita a imobilização interna de DNA (no interior da rede) em seis hidrogéis (HG16 a HG21), considerando para isso a polimerização radicalar em fase aquosa de DMAEMA com iniciação por VA044 à temperatura de 40 °C e usando MBAm como reticulante. Este processo é conceitualmente idêntico à imobilização de BSA descrita nos capítulos anteriores deste trabalho. Esses seis hidrogéis contendo DNA imobilizado internamente foram posteriormente usados para estudar o processo de libertação da macromolécula para soluções aquosas com diferentes valores de pH, nomeadamente pH=2, 7 e 10. Em complemento, foi também investigado o processo de imobilização externa de DNA (*DNA Binding*) em hidrogéis catiônicos, considerando para este efeito redes de DMAEMA também sintetizadas neste trabalho na ausência de DNA (hidrogel HG15 descrito no Capítulo 6). Para potenciação deste processo, procedeu-se à protonação dos grupos dimetilamino do polímero com HCl. Foram assim criadas redes de polímero carregado positivamente ao longo da sua estrutura. Tentou-se desta forma promover as interações electroestáticas com os grupos fosfato do DNA que apresentam carga negativa. O processo de *DNA Binding* foi estudado em modo fechado (através da mistura em solução aquosa com agitação de DNA com hidrogel) e também em modo contínuo (fazendo passar soluções aquosas contendo DNA através do hidrogel previamente condicionado em água, num processo em tudo semelhante à extração de fase sólida – SPE). No processo *batch* (modo fechado) foram realizadas experiências, considerando diferentes concentrações de DNA na solução aquosa (entre 0,2 e 1 mg/mL) e na presença (5 % g/g) ou ausência de glucose dissolvida [65]. A massa de hidrogel usada em cada experiência foi nestes casos ajustada de modo a garantir uma relação de 1:1 entre cargas positivas e negativas [65]. O processo *DNA Binding* foi realizado durante cerca de 74 horas, tendo sido realizada a amostragem intercalar da fase aquosa (aos 30 min e às 18 horas) para medição da fração de macromolécula ligada ao hidrogel (por espectroscopia UV-Vis). Nos testes de *DNA Binding* em SPE (modo contínuo) foram consideradas apenas duas concentrações de DNA em solução aquosa (0,2 e 0,8 mg/mL), tendo sido avaliado o efeito da presença/ausência de glucose na solução e o uso de hidrogel protonado/não-protonado. Em todos os testes foram usados cerca de 170 mg de hidrogel seco (cujo inchamento foi posteriormente promovido com água) e fizeram-se eluir 10 mL de solução contendo DNA. Verificou-se por isso, em todas as experiências de SPE, um excesso de cargas positivas

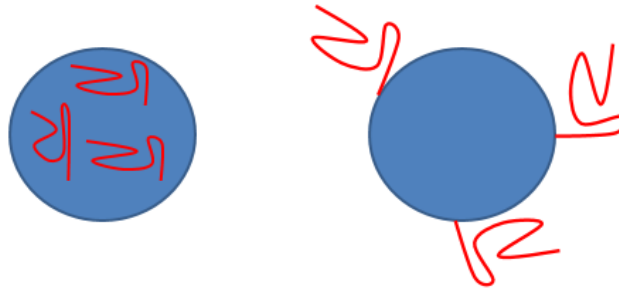
relativamente às negativas. Os resultados obtidos na libertação de DNA imobilizado internamente no hidrogel parecem mostrar uma taxa de transferência de macromolécula para a solução muito baixa (ver Anexos 10 a 15). De facto, quando se considera a subtração do efeito na absorção UV do monómero por reagir, os valores de DNA libertado são muito próximos de zero. Apesar das unidades de polímero neste caso não estarem protonadas, é muito provável que existam fortes interações entre o polímero e o DNA que o tornem imobilizado de forma quase irreversível. Esta provável baixa taxa de libertação foi observada com todos os valores de pH considerados para a solução aquosa circundante (pH=2, 7 e 10). À semelhança do discutido anteriormente com o processo de libertação da BSA, também aqui parece ser indispensável a utilização de métodos analíticos mais exatos para elucidação das quantidades efetivamente transferidas para a fase aquosa. Note-se que a tentativa de quantificação da presença de DNA nas soluções aquosas através de GPC (ver anexos 45 e 46) foi inviabilizada neste trabalho pela alta pressão gerada no sistema de bombagem (próxima do limite máximo de 10 MPa). O uso de colunas de separação alternativas deverá possibilitar a descida da pressão e a obtenção de dados analíticos. Para o processo de *DNA Binding* em modo fechado, foi determinado que a percentagem de imobilização da macromolécula depende da concentração de DNA na solução aquosa, mesmo garantindo em todos os casos uma relação entre cargas positivas e negativas P/N=1. O processo de *DNA Binding* em modo contínuo foi explorado na tentativa de otimização deste mecanismo, nomeadamente a potenciação das taxas de imobilização com um tempo de contacto mais curto.

Em geral, os resultados aqui apresentados mostram as potencialidades dos hidrogéis catónicos na imobilização de DNA (processo com possível utilidade em terapias genéticas), especialmente quando se promove a sua ligação externa no material (*DNA Binding*). A procura de materiais deste tipo com elevada biocompatibilidade e que possam ser degradados de forma não tóxica no interior das células é uma linha de investigação atual nesta área [65].

## Capítulo 8. Conclusões e Trabalhos Futuros

Devido à disponibilidade de numerosos grupos funcionais, a modificação química e a reticulação química dos polímeros têm sido extensivamente exploradas como forma de obter derivados destes com novas características e propriedades favoráveis para a sua utilização na preparação de sistemas de libertação controlada de moléculas bioativas [51]. Neste trabalho foram realizados estudos sobre a libertação controlada de uma proteína, BSA e de DNA de salmão a partir de hidrogéis inteligentes com capacidade para serem estimulados por variações provocadas no pH e/ou temperatura das suas redondezas. Nesses estudos de imobilização/libertação, foram considerados estes dois modelos de biomacromoléculas uma vez que podem ser utilizados em diversas aplicações biomédicas, incluindo na libertação controlada de fármacos, na imobilização enzimática e na reciclagem de absorventes [53]. Considerando que o objetivo final do processo de imobilização do composto bioativo é a obtenção de um perfil de libertação controlada com as características mais favoráveis para a aplicação que se tem em vista, é necessário assim considerar não só os fatores que determinam diretamente as propriedades das partículas como também as propriedades de biodegradação do polímero que, embora não afetem diretamente o processo de produção das partículas, podem ter um impacto significativo no perfil de libertação. O tempo de polimerização também é de extrema importância pelo que os polímeros com um maior tempo de polimerização são mais rígidos e conseqüentemente contêm cavidades com uma forma mais definida, originando polímeros com maior especificidade. Para além dos monómeros utilizados ao longo do estudo, poder-se-iam substituir estes pelo quitosano, um polissacarídeo natural bastante abundante. Na sua forma cristalina, o quitosano é insolúvel em soluções aquosas com  $\text{pH} > 7$ , entretanto, em ácidos diluídos ( $\text{pH} < 6$ ) como o ácido clorídrico e o ácido acético, onde os grupos amina livres das moléculas estão protonados é mais solúvel. No domínio dos biomateriais, para além de ser usado em sistemas de libertação controlada (não tóxico, tolerado biologicamente), este polímero pode ser utilizado também como agente anticoagulante, agente hemostático, ser aplicado em películas de revestimento e no tratamento de queimaduras [72]. Para além deste monómero sugerido, poder-se-iam utilizar outros monómeros como N, N-dimetilacrilamida (DMA) (monómero que confere aos hidrogéis sensibilidade à temperatura), ácido metacrílico (introduz grupos iónicos para sensibilidade ao pH) e N, N'-metilenobisacrilamida (reticulante para formação de redes tridimensionais). Um aspeto importante no uso de hidrogéis como dispositivos de administração de proteínas, é a capacidade de carregamento de diferentes doses de proteínas. Assim, é revelante variar as concentrações de BSA na solução. Sabe-se por

estudos analisados que a encapsulação de proteínas dentro da matriz de gel é tanto maior quanto maior for a concentração desta na solução. Como trabalhos futuros, a administração de agentes terapêuticos por via nasal, tradicionalmente utilizados apenas no tratamento de patologias locais, como o congestionamento e alergias, é presentemente vista com grande interesse enquanto via na libertação de agentes ativos a nível sistémico e a nível do sistema nervoso central. De facto, esta via apresenta várias vantagens, como uma rápida atuação dos agentes terapêuticos, a ausência da primeira passagem a nível hepático e uma administração fácil e com elevada aceitação por parte dos pacientes [51]. Por outro lado, a produção de micropartículas apresentam diversas vantagens, pois podem proteger os princípios ativos do ambiente adverso do trato gastrointestinal e têm um maior interesse para sistemas de libertação por administração oral pelo seu pequeno tamanho e elevada área superficial, que favorece a sua absorção, comparativamente a partículas de maiores dimensões. Além disto, partículas de menores dimensões terão um maior tempo de residência no cólon, contornado o problema da desintegração incompleta de partículas de maiores dimensões [2]. O desenvolvimento de sistemas capazes de libertar um fármaco de modo controlado, prolongado e acionado por estímulos, surge como uma tecnologia capaz e com bastante potencial. A utilização de sistemas nanocompósitos para este fim, baseados em polímeros de origem natural e nanoestruturas de ouro, é ainda uma área na nanomedicina com muito para explorar [1]. Os estudos aqui apresentados mostram que é possível usar hidrogéis inteligentes (sensíveis ao pH e/ou temperatura) para imobilizar reversivelmente proteínas (ex. BSA). Estes sistemas de imobilização podem ser potenciados para fazer a libertação das macromoléculas em condições apropriadas do seu meio envolvente (em geral meios aquosos). Por exemplo, foi mostrado neste trabalho que a libertação da BSA a partir de hidrogéis NIPA é potenciada a 25 °C e dificultada a 40 °C em resultado do inchamento/colapso do hidrogel por efeito da temperatura. No entanto, na realização deste trabalho, foram também identificadas dificuldades importantes na libertação de proteínas (macromoléculas de grande dimensão) após a sua imobilização em algumas classes de hidrogéis, o que compromete a reversibilidade do processo e a sua utilidade em biomedicina. O aprisionamento da macromolécula na estrutura interna do hidrogel devido a interações entre grupos químicos e o lento processo de difusão deverão estar na origem dessas observações. Parece assim ser importante continuar a desenvolver novos materiais que promovam processos de imobilização/libertação mais precisos e eficazes. O desenvolvimento de técnicas de impressão molecular superficiais, em detrimento da impressão molecular interna (Figura 8.1) é uma linha de investigação atual nesta área e que poderá ser explorada em trabalhos futuros [73-78].



**Figura 8.1:** Representação esquemática do processo de impressão molecular interna (esquerda) e impressão molecular superficial (direita). Embora com alguma perda de proteção das macromoléculas imobilizadas, a impressão molecular superficial poderá conduzir a processos mais precisos e específicos de libertação de macromoléculas como as proteínas.

Um dos principais desafios nesta área será manter a possibilidade de estimular as partículas de impressão molecular (esferas a azul na Figura 8.1) através da alteração das condições envolventes (ex. pH/temperatura) e garantir um eficaz processo de impressão molecular (em geral baseia-se em materiais rígidos e pouco estimuláveis). Por outro lado, o sucesso da imobilização, transporte e libertação de DNA ou proteínas está diretamente dependente da arquitetura molecular dos polímeros usados, nomeadamente da sua massa molecular, tipo e densidade de grupos com carga iónica e do seu grau de ramificação/reticulação. O projeto da arquitetura molecular dos polímeros lineares, polímeros hiper-ramificados [65] ou hidrogéis usados neste tipo de aplicações biomédicas reveste-se de especial importância. Nos anos mais recentes, as técnicas de polimerização radical controlada (CRP), nomeadamente por Reversible Addition- Fragmentation Chain Transfer (RAFT), permitiram aumentar o controlo sobre o processo de formação deste tipo de materiais contribuindo assim para a síntese de estruturas de polímero com propriedades por medida. A introdução do mecanismo RAFT na produção de materiais avançados com aplicações biomédicas, nomeadamente na imobilização, transporte e libertação de biomacromoléculas é desta forma um assunto importante na comunidade científica desta área. A síntese de materiais degradáveis com elevada biocompatibilidade que possam ser quebrados nas células e eliminados pelo organismo constitui um objetivo atual no desenvolvimento de mecanismos de Terapia Gteraterenética não tóxicos. Para contornar a baixa solubilidade de certos agentes em água, seria importante que algumas polimerizações fossem realizadas em solventes orgânicos (ex. DMF) e em gamas de temperatura distintas (entre 20 e 70 °C). Assim, tenta-se avaliar o impacto entre a técnica de polimerização em estudo (FRP) e RAFT e das condições iniciais (ex. composição e temperatura) na estrutura e nas propriedades dos hidrogéis.



## Capítulo 9. Referências Bibliográficas

1. Salgueiro; Ana Margarida Martins, *Hidrogéis Nanocompósitos de Ouro para a Libertação de Fármacos*, in *Dissertação de Mestrado em Engenharia Química*, 2011 Universidade de Aveiro.
2. Figueiredo; Ana Margarida Dias, *Preparação e caracterização de micropartículas de polissacáridos para libertação controlada de fármacos anticancerígenos no cólon*, in *Dissertação de Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica*, 2011 Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa
3. Villanova; Janaina C. O, Oréfica; Rodrigo L, Cunha; Armando S, *Aplicações Farmacêuticas de Polímeros*. Polímeros: Ciência e Tecnologia 2010 **20** (1): p. 51-64
4. Menck; Carlos Frederico Martins, Ventura; Armando Morais, *Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia genética*. Revista USP - Superintendência de Comunicação Social da Universidade de São Paulo 2007 **75** p. 50-61
5. Machado; Carla Alexandra Lopes, *Synthesis and Characterization of Smart Hydrogels for Controlled Drug Release considering RAFT Polymerization and SEC Tetra-Detection*, in *Dissertação de Mestrado em Engenharia Química*, 2014 Escola Superior de Tecnologia e de Gestão do Instituto Politécnico de Bragança
6. Fanger; Christian, Wack; Holger, Ulbricht; Mathias, *Macroporous Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogels with Adjustable Size "Cut-off" for the Efficient and Reversible Immobilization of Biomacromolecules*. Macromolecular Bioscience, 2006. **6**(6): p. 393-402.
7. Langer; R. S, Peppas; N. A., *Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems*. Biomaterials, Elsevier sci ltd 1981 **2** (4): p. 201-2014
8. Costa; Diana, Queiroz; João, Miguel; M Graça, Lindman; Bjorn, *Swelling behavior of a new biocompatible plasmid DNA hydrogel*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 2012 **92** p. 106-112
9. Almeida; José Filipe da Silva Lapas, *Preparação e Caracterizaçã de Hidrogéis para Aplicações Biomédicas*, in *Tese de Doutoramento em Engenharia Química, especialidade em Processos Químicos*, 2010 Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
10. Brant; António Jedson Caldeira, *Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana e poli (N-vinil-2-pirrolidona)*, in *Tese de Doutoramento em Química*, 2008 Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
11. Bajpai; Anil, Shukla; Sandeep, Saini; Rajesh, Tiwari; Atul, *Stimuli Responsive Drug Delivery Systems - From Introduction to Application*. 1 ed. 2010 Smithers Rapra Technology 370
12. Galaev; Igor, Mattiasson; Bo, *Smart Polymers: Applications in Biotechnology and Biomedicine*. 2ª ed. 2007, CRC Press 496.
13. Gemeinhart; R.A, Chen; J, Park; H, Park; K, *pH-sensitivity of fast responsive superporous hydrogels*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition 2000 **11** (12): p. 1371-1380
14. Reitor; Patrícia, Oliveira; Tânia,, *Bio-hidrogéis sensíveis à temperatura e ao pH com aplicações em libertação controlada de fármacos*, in *Obtenção de Licenciatura em Engenharia Biomédica*, 2012 Escola Superior de Tecnologia e de Gestão do Instituto Politécnico de Bragança
15. Hoffman; A. S, *Hydrogels for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews 2002 **54** (1): p. 3-12

16. Costa; Maria Carolina Morando, *Caracterização de Polímeros Inteligentes para Aplicações Biomédicas*, in *Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica*, 2012 Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
17. Naddaf; A A, Tsibranska; I, Bart; H, J, *Kinetics of BSA release from poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, Elsevier science sa 2010 **49** (6 ): p. 581-588
18. Peppas; N. A, Bures; P, Leobandung; W, Ichikawa; H, *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2000 **50** (1): p. 27-46
19. Oliveira; Tânia, Reitor; Patrícia, Oliveira, Daniela, Kadhivel; Porkodi, Dias; Rolando, Costa; Mário, *Development of stimuli-responsive smart hydrogels using molecular imprinting and interpenetrating polymer networks*. Chempor 2014, FEUP Edições, 2014
20. Machado; Carla, Oliveira; Tânia, Reitor; Patrícia, Oliveira; Daniela, Freitas; Filipa, Kadhivel; Porkodi, Dias; Rolando, Costa; Mário, *Development of tailored hydrogels using RAFT polymerization in continuous flow microreactor*. In 8th ECNP International Conference on Nanostructured Polymers and Nanocomposites. Dresden, Germany, 2014
21. Costa; Rita Alexandra Santos da, *Síntese e Teste de Hidrogéis Inteligentes para a Libertação Controlada de Fármacos*, in *Dissertação de Mestrado em Tecnologia Biomédica*, 2013 Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança
22. Das; R.R, Samal; S, Choi; S. J, Geckeler; K. E, *A new macroporous luminescent hydrogel from poly(allylamine)*. Macromolecular Rapid Communications 2001 **22** (11): p. 850-854
23. Soppimath; K. S, Aminabhavi; T. M, Dave; A. M, Kumbar; S. G, Rudzinski; W. E, *Stimulus-responsive "smart" hydrogels as novel drug delivery systems*. Drug Development and Industrial Pharmacy 2002 **28** (8): p. 957-974
24. Kurisawa; M, Yokoyama; M, Okano; T, *Transfection efficiency increases by incorporation hydrophobic monomer units into polymeric gene carriers*. Journal of Controlled Release 2000 **68** p. 1-8
25. Malonne; H, Eeckman; F, Fontaine; D, Otto; A, De Vos; L, Moes; A, Fonatine; J, Amighi; K, *Preparation of poly (N-isopropylacrylamide) copolymers and preliminary assessment of their acute and subacute toxicity in mice*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2005 **61** (3): p. 188-194
26. Vihola; H, Laukkanen; A, Valtola; L, Tenhu; H, Hirvonen; J, *Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam)*. Biomaterials 2005 **26** (16): p. 3055-3064
27. Lee; W. F, Chiu; R. J, *Investigation of charge effects on drug release behavior for ionic thermosensitive hydrogels*. Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems 2002 **20** (1-2): p. 161-166
28. Sahahira; Carolina Mieko, *Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação "in vitro" de hidrogéis do álcool polivinílico ph sensitivos processados por métodos físico-químico*, in *Dissertação de Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas*, 2007 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
29. Ramos; Rui Miguel Castro, *Determinação computacional dos efeitos da mutagénese em interfaces proteína-DNA* in *Dissertação de Mestrado em Química*, 2012 Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

30. Schweitzer; Bianca, *Efeito salino na saturação da Albumina do Soro Bovino (BSA) por Dodecilsulfato de Sódio (SDS)*, in *Dissertação de Mestrado em Química*, 2002 Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina.
31. Moraes; Caroline S, Junior; Francisco O. R. Oliveira, Masson; Gustavo, Rebello; Karina M, Santos; Lívia O, Bastos; Narayana F. P, Faria; Rozana C. R, *Série em Biologia Celular e Molecular - Métodos Experimentais no Estudo de Proteínas*. 2013 Rio de Janeiro, IOC - Instituto Oswaldo Cruz 84.
32. Azevedo; Carlos, *Biologia Celular e Molecular*. 4<sup>a</sup> ed. 2005 LIDEL-Edições Técnicas.
33. Cabral; Joaquim M. S, Barros; Maria Raquel Aires, Gama; Miguel, *Engenharia Enzimática*. LIDEL- Edições Técnicas
34. Carter; D. C, Ho; J. X, *Structure of Serum-Albumin*. *Advances in Protein Chemistry* 1994 **45** (45): p. 153-203
35. Goodsell; David. *Molecular Artwork based on the crystal structure of Bovine Serum Albumin (PDB ID 3v03) showing the 6 color-coded helical subdomains assembled to form the heart-shaped quaternary structure of the BSA protein molecule*. 2013 [cited 2014 Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2153?lang=pt&region=PT>.
36. Peters; T. Jr, *Serum Albumin*. *Advances in Protein Chemistry* 1985 **37** p. 161-245
37. Ferreira; Ernando Silva, *Interação da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos*, in *Tese de Doutorado em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia*, 2009 Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
38. Figgie; J, Rossing; T. H, Fencel; V, *The Role of Serum-Proteins in Acid-Base Equilibria*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1991 **117** (6): p. 453-467
39. Costa; Sérgio Mendes, *Processamento de Dados Biológicos Utilizando Tecnologias Grid*, in *Dissertação de Mestrado em Engenharia Informática e de Computadores*, 2008 Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa
40. Topuz; Fuat, Okay; Oguz, *Formation of Hydrogels by Simultaneous Denaturation and Cross-Linking of DNA*. *Biomacromolecules* 2009 **10** (9): p. 2652-2661
41. Videira; Arnaldo, *Engenharia Genética - Princípios e Aplicações*. LIDEL-Edições Técnicas
42. Watson; James D, Baker; Tania A, Bell; Stephen P, Gann; Alexander, Levine; Michael, Losick; Richard,, *Biologia Molecular do Gene*. 2004 New Book Editoração, Ltda. .
43. Aldrich, S.-. *Deoxyribonucleic Acid (DNA), Sodium Salt from Salmom Testes*. [cited 2014 Available from: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/d1626pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d1626pis.pdf)
44. Barbosa; Paula Cristina Vieira, *Desenvolvimento de novos eletrólitos poliméricos sólidos*, in *Tese de Doutorado em Ciências, Especialização em Química*, 2010 Escola de Ciências da Universidade do Minho
45. Malvern. *Complete Guide for GPC/SEC/GFC Instrumentation and Detection Technologies*. 2014 Available from: <http://www.malvern.com/en/products/product-range/viscotek-range/viscotek-systems/viscotek-tdamax/accessories/viscotek-uv-pda-detector/default.aspx>.
46. Orlando; Ricardo M, Cordeiro; Diogo Dias, Mathias; Ana Elisa Barreto, Rezende; Kênnia R, Gil; Eric de S, *Pré-Tratamento de Amostras Vita et Sanitas*, Trindade-Go 2009 **3**.
47. Caldas; Segiane Souza, Gonçalves; Fábio Ferreira, Primel; Ednei Gilberto, *Principais Técnicas de Preparo de Amostras para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em*

- água por Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodo e por Espectrometria de Massas. *Química Nova* 2011 **34** (9): p. 1604-1617
48. Grossi; Paula, *Desenvolvimento e aplicação de técnicas miniaturizadas de preparo de amostras para análises ambientais via GC-MS*, in *Tese de Doutorado em Ciências (Química Analítica)*, 2009 Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo
  49. Granado; Vera Lúcia Veiga, *Polímeros Molecularmente Impressos para a Determinação da Difenilamina*, in *Dissertação de Mestrado em Química Analítica e Qualidade*, 2011 Departamento de Química, Universidade de Aveiro
  50. Marques; Sónia do Carmo Couceiro, *Libertação de Ibuprofeno de Hidrogéis de PVA contendo Porfirinas*, in *Dissertação de Mestrado em Química, ramo de Química Avançada*, 2011 Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
  51. Coimbra; Patrícia Manuela Almeida, *Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural*, in *Tese de Doutorado em Engenharia Química*, 2010 Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
  52. Wu; Jing-Yi, Liu; Shao-Qiong, Heng; Paul Wan-Sia, Yang; Yi-Yan, *Evaluating proteins release from, and their interactions with, thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels*. *Journal of Controlled Release*, Elsevier science bv 2005 **102** (2): p. 361-372
  53. Cheng; Si-Xue, Zhang; Jian-Tao, Zhuo; Ren-Xi, *Macroporous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels with fast response rates and improved protein release properties*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2003. **67A** (1): p. 96-103
  54. Costa; Diana, Valente; Artur J M, Miguel; M Graça, Queiroz; João, *Gel Network Photodisruption: A New Strategy for the Codelivery of Plasmid DNA and Drugs*. *Langmuir*, American Chemical Society 2011 **27** (22): p. 13780-13789
  55. Zhang; R, Bowyer; A, Eissenthal; R, Hubble; J, *Temperature Responsive Pore-Filled Membranes Based on a BSA/Poly (N-isopropylacrylamide) Hydrogel*. *Advances in Polymer Technology* 2008. **27** (1): p. 27-34.
  56. Demirel; Gokhan, Ozçetin; Gokçen, Turan; Eylem, Çaykara; Tuncer, *pH/Temperature - Sensitive Imprinted Ionic Poly (N-tert-butylacrylamide-co-acrylamide/maleic acid) Hydrogels for Bovine Serum Albumin*. *Macromolecular Bioscience*, 2005. **5**(10): p. 1032-1037.
  57. Marconato; José Carlos, Franchetti; Sandra Mara M, Pedro; Roberto José, *Solução-Tampão: Uma Proposta Experimental Usando Materiais de Baixo Custo* *Química Nova na Escola* 2004 **20**
  58. Lu; Xiuling, Xu; Yuhong, Zheng; Chunyang, Zhang; Guifeng, Su; Zhiguo, *Ethylene glycol diglycidyl ether as a protein cross-linker: a case study for cross-linking of hemoglobin*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006 **81** (5): p. 767-775
  59. Chen; Zhiyong, Hua; Zhendong, Xu; Li, Huang; Yong, Zhao; Meiping, Li; Yuanzong, *Protein-responsive imprinted polymers with specific shrinking and rebinding*. *Journal of Molecular Recognition* 2008 **21** (1): p. 71-77
  60. Duracher; David, Elaissari; Abdelhamid, Mallet; François, Pichot; Christian, *Adsorption of Modified HIV-1 Capsid p24 Protein onto Thermosensitive and Cationic Core-Shell Poly(styrene)-Poly(N-isopropylacrylamide) Particles*. *Langmuir* 2000 **16** (23): p. 9002-9008

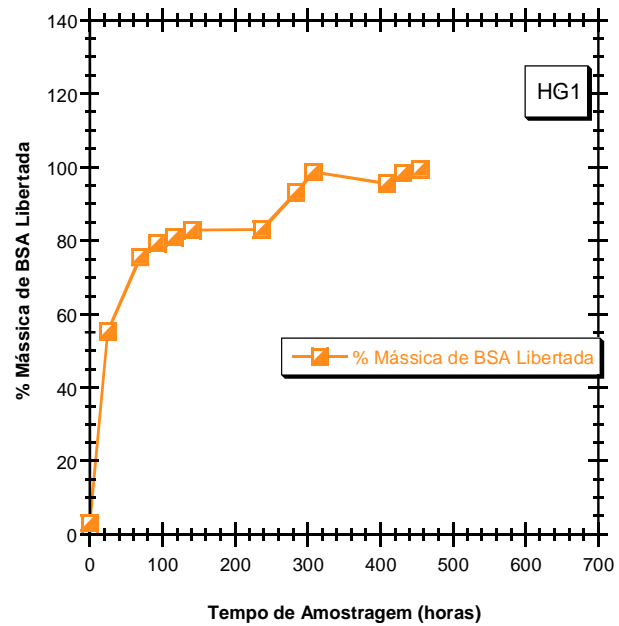
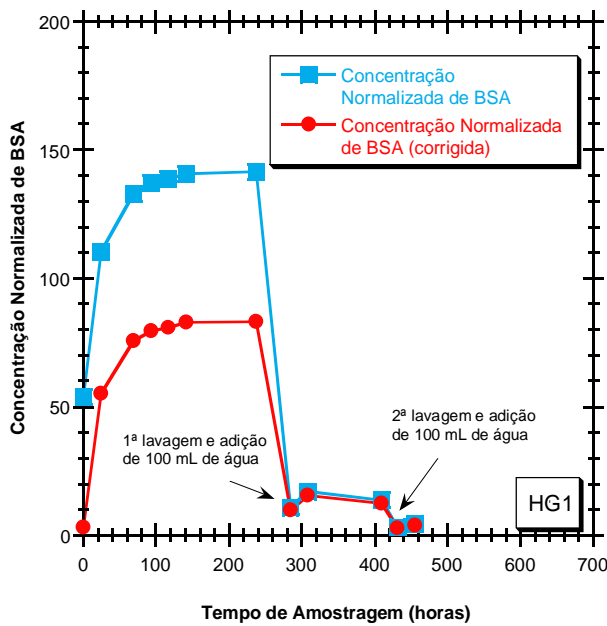
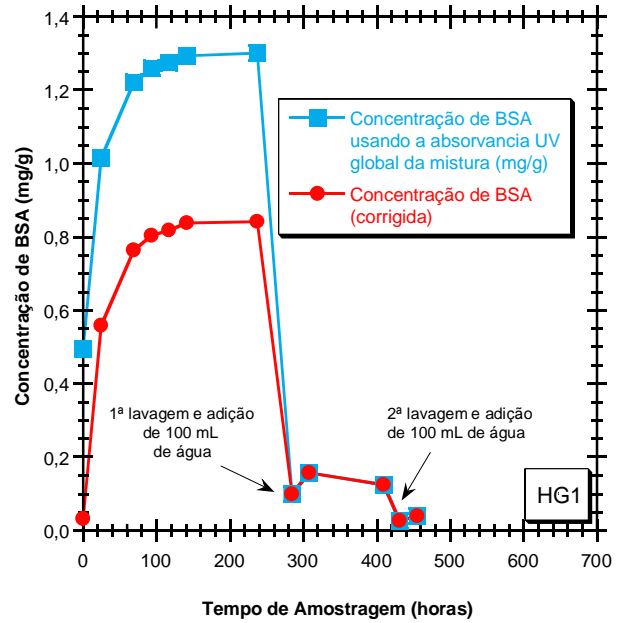
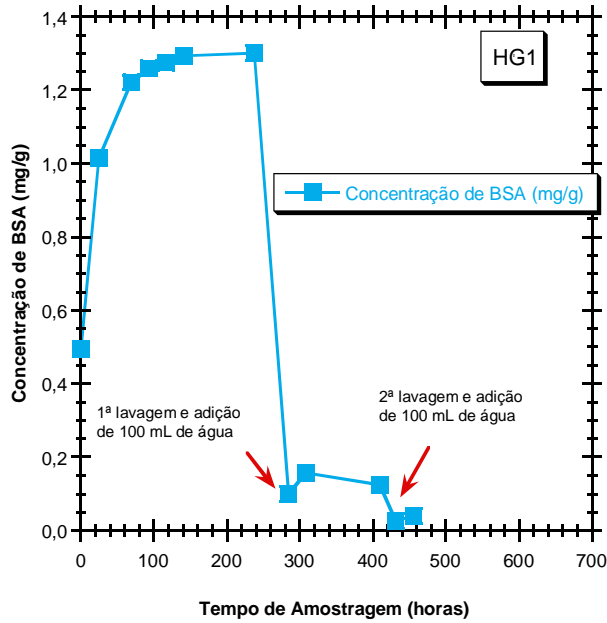
61. Pertusatti; Jonas, *Aspectos físico-químicos da protonação e desprotonação da superfície do ácido húmico*, in *Dissertação de Mestrado em Química*, 2007 Instituto de Química da Universidade de Brasília
62. Fiorucci; A. R, Soares; M. H. F. B, Cavalheiro; E. T. G, *O conceito de solução-tampão*. *Química Nova na Escola*, 2001 **13** p. 18-21
63. Freitas; Ana Filipa Fernandes Lobo de, *Libertação Controlada de 5-Fluorouracil e Ibuprofeno a partir de Hidrogéis Inteligentes*, in *Obtenção de Licenciatura em Engenharia Biomédica*, 2013 Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança
64. Murakami; Yoshihiko, Maeda; Mizuo, *Dna-Responsive Hydrogels That Can Shrink or Swell*. *Biomacromolecules* 2005 (6): p. 2927-2929
65. Tao; Lei, Liu; Jingquan, Tan; B. H, Davis; Thomas P, *RAFT Synthesis and DNA Binding of Biodegradable, Hyperbranched Poly(2-(dimethylamino)ethyl Methacrylate*. *Macromolecules* 2009 **42** (14): p. 4960-4962.
66. Costa; Diana, Valente; Artur J M, Pais; Alberto A. C. C, Miguel; M. Graça, Lindman; Bjorn, *Cross-linked DNA gels: Disruption and release properties*. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 2010 **354** (1-3): p. 28-33
67. Horkay; Ferenc, *Ion Polymer Interations in DNA Solutions and Gels*. *Macromol. Symp* 2013 (329): p. 19-26
68. Horkay; Ferenc, Basser; Peter J, *Osmotic Observations on Chemically Cross-Linked DNA Gels in Physiological Salt Solutions*. *Biomacromolecules* 2004 **5** (1): p. 232-237
69. Sigma-Aldrich. *2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate*. [cited 2014 Available from: [http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/23/234907/234907-BULK\\_ALDRICH.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/23/234907/234907-BULK_ALDRICH.pdf).
70. Wikipedia. *Estrutura Química do DNA*. [cited 2014 Available from: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/DNA\\_chemical\\_structure.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e4/DNA_chemical_structure.svg).
71. Simpson; Nigel J.K, *Solid-Phase Extraction: Properties, Techniques and Applications*. CRC Press 2000 528
72. Monteiro; Nelson dos Santos, *Caracterização de matrizes de Quitosano para a regeneração de tecidos produzidos pela técnica de TIPS*, in *Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica*, 2008 Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
73. Du; X, Hlady; V, Britt; D., *Langmuir monolayer approaches to protein recognition through molecular imprinting* *Biosensors and Bioelectronics* 2005 **20** (10): p. 2053-2060
74. Hart; B.R, Shea; K.J., *Synthetic Peptide Receptors: Molecularly Imprinted Polymers for the Recognition of Peptides-Metal Interactions* *Jornal of the American Chemical Society* 2001 **123** (9): p. 2072-2073.
75. Hoshino; Y, Koide; H, Urakami; T, Kanazawa; H, Kodama; T, Oku; N, Shea; K. J, *Recognition, Neutralization, and Clearance of Target Peptides in the Bloodstream of Living Mice by Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody*. *Journal of the American Chemical Society* 2010 **132** (19 ): p. 6644-6645
76. Janiak; D, Kofinas; P., *Molecular imprinting of peptides and proteins in aqueous media* *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007 **389** (2): p. 399-404
77. Vasapollo; G, Sole; R. D, Mergola; L, Lazzoi; M. R, Scardino; A, Scorrano; S, Mele; G, *Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective*. *International Journal of Molecular Sciences* 2011 **12** (9): p. 5908-5945
78. Zheng; H, Du; X., *Enhanced Binding and Biosensing of Carbohydrate-Functionalized Monolayers to Target Proteins by Surface Molecular Imprinting* *The Journal of Physical Chemistry B* 2009 **113** (32): p. 11330-11337



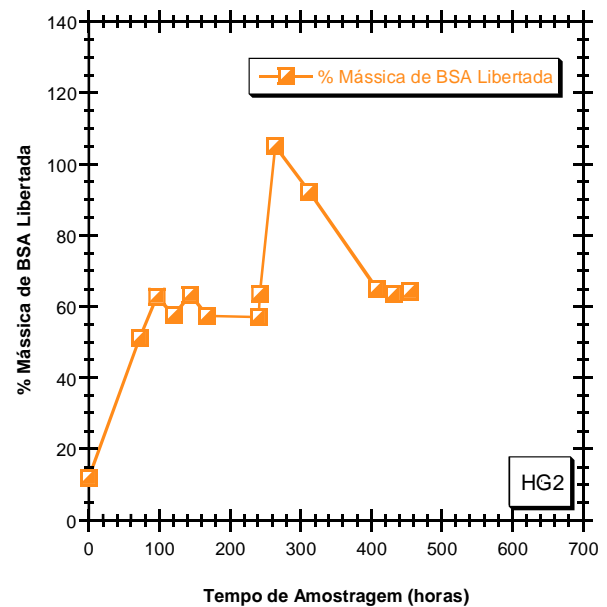
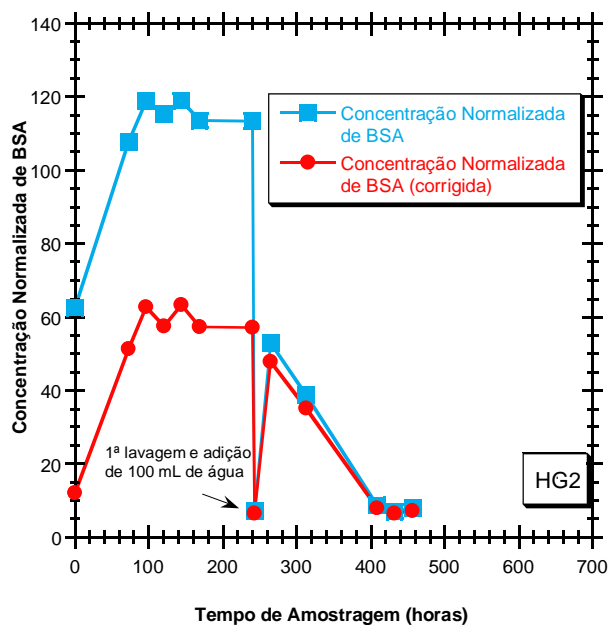
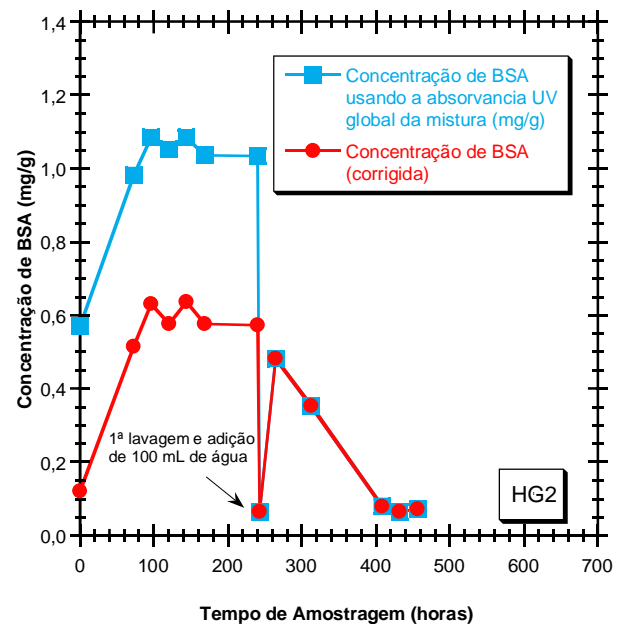
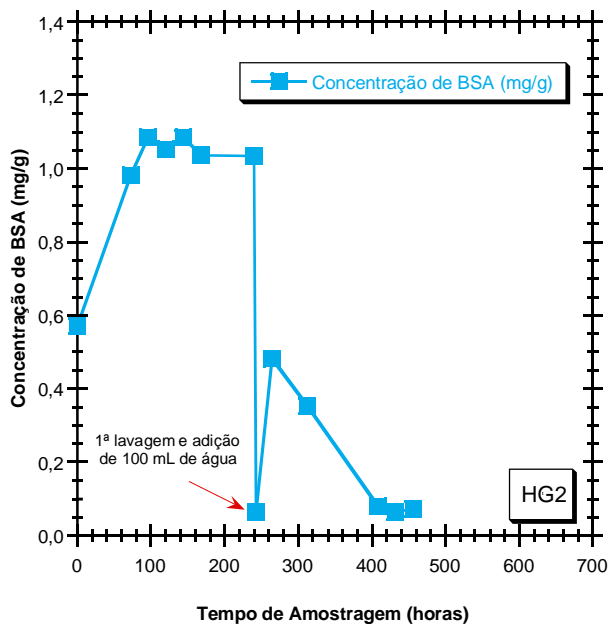
# **Anexos**



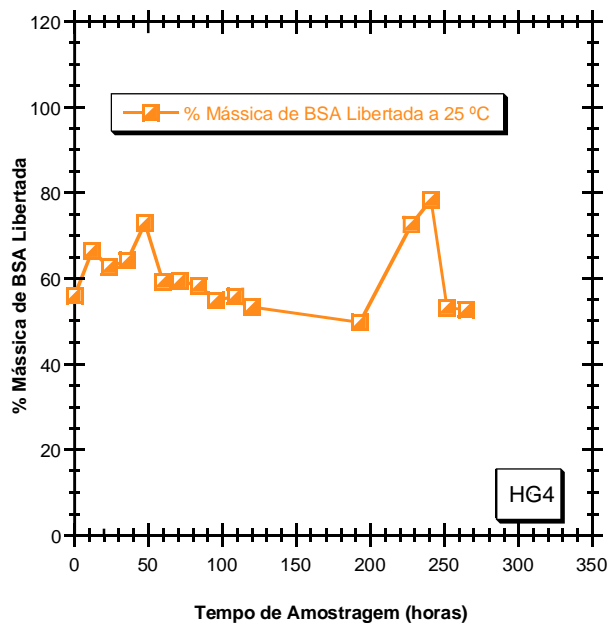
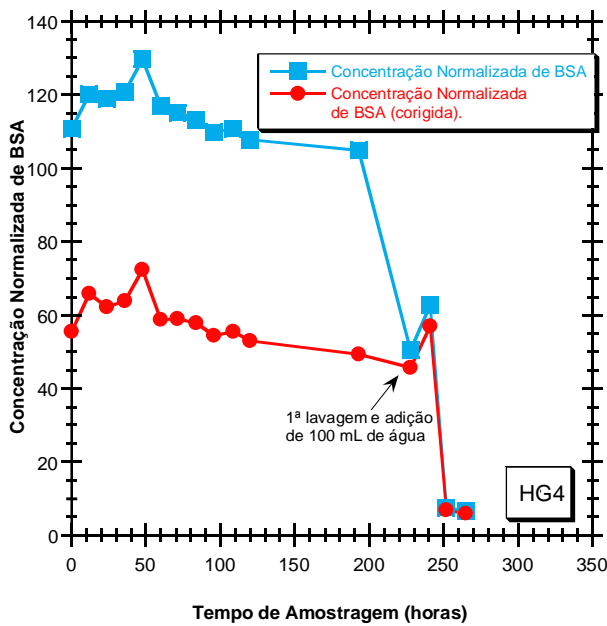
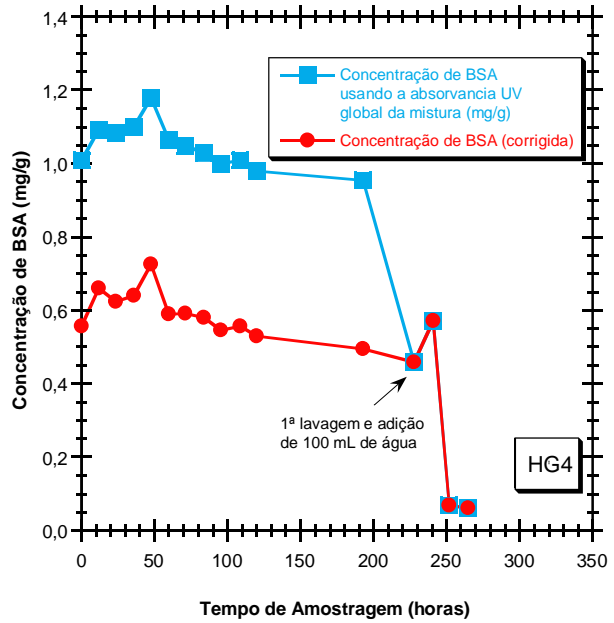
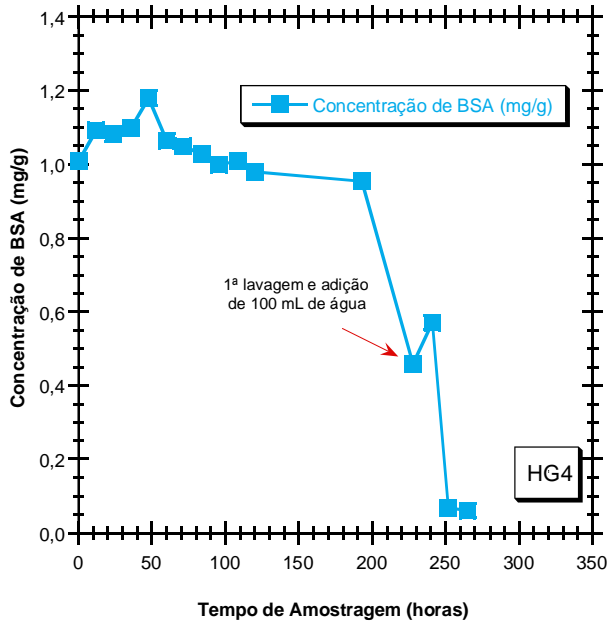
**Anexo 1:** Libertação de BSA estimulada pela temperatura (hidrogel colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG1**.



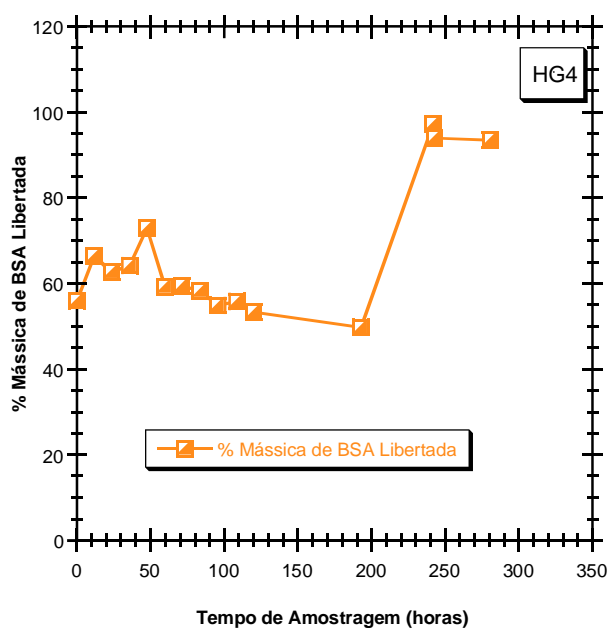
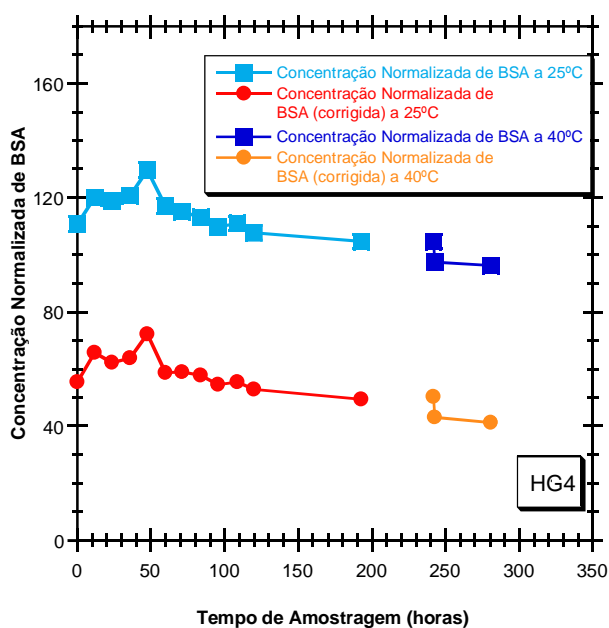
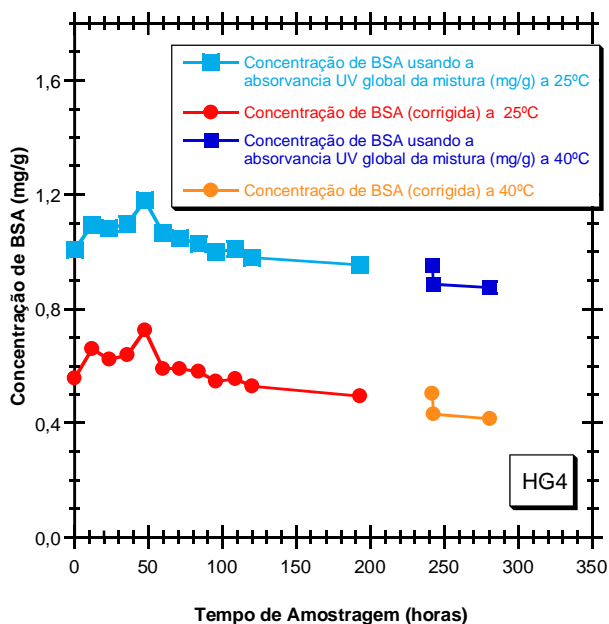
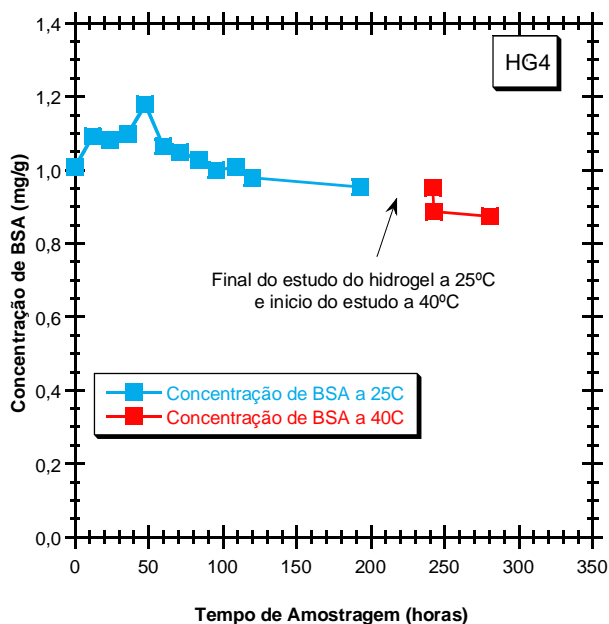
**Anexo 2:** Libertação de BSA estimulada pela temperatura (hidrogel colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$  com incorporação de NaCl aquando da sua polimerização). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG2**.



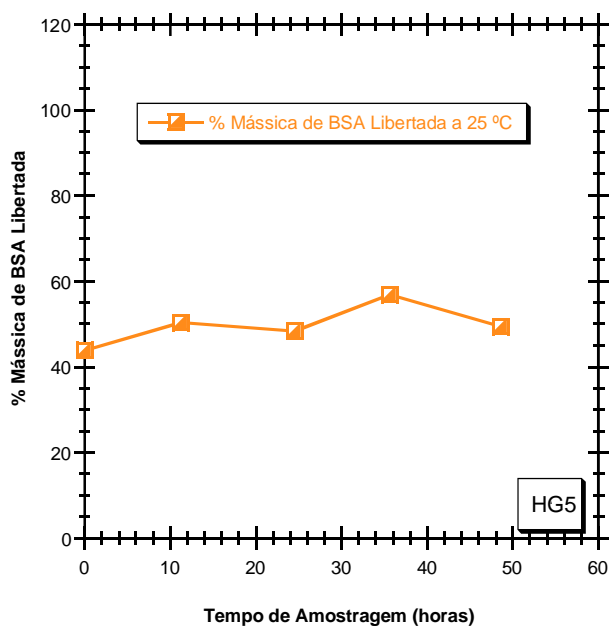
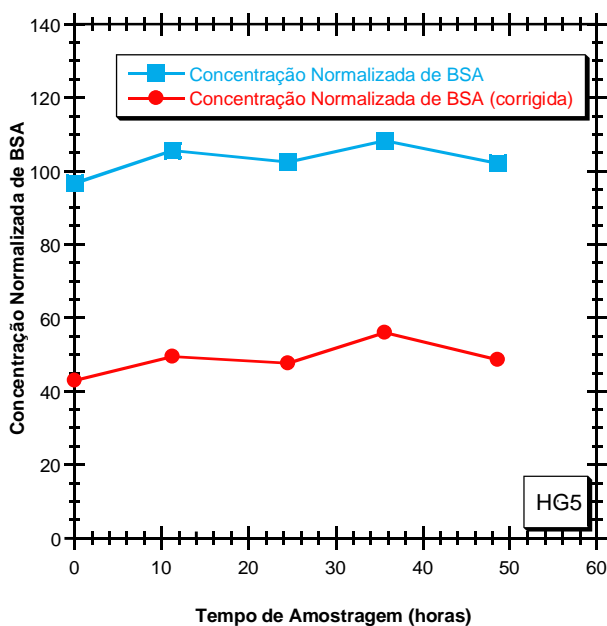
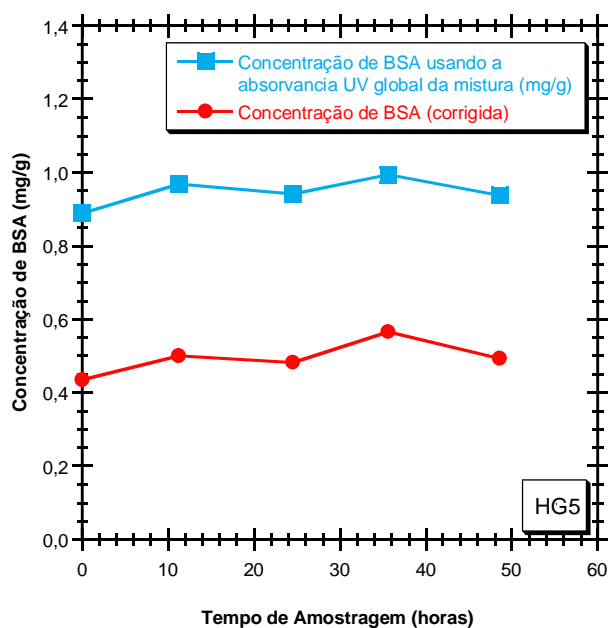
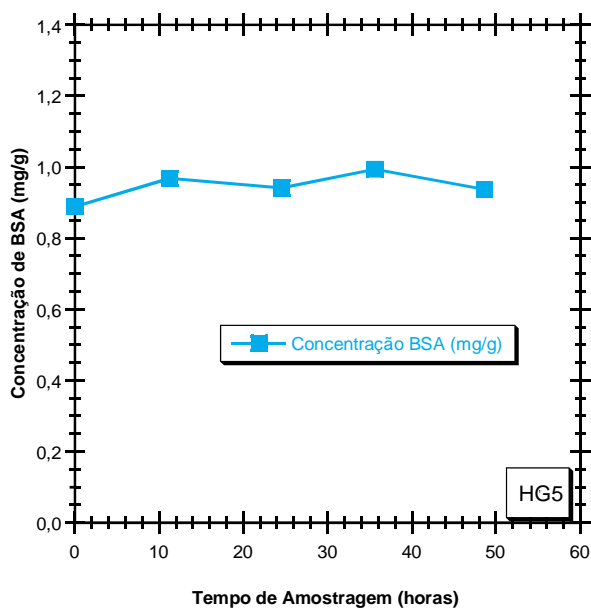
**Anexo 3:** Libertação de BSA estimulada pela temperatura (hidrogel colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$  com incorporação de NaCl aquando da sua polimerização). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG4**.



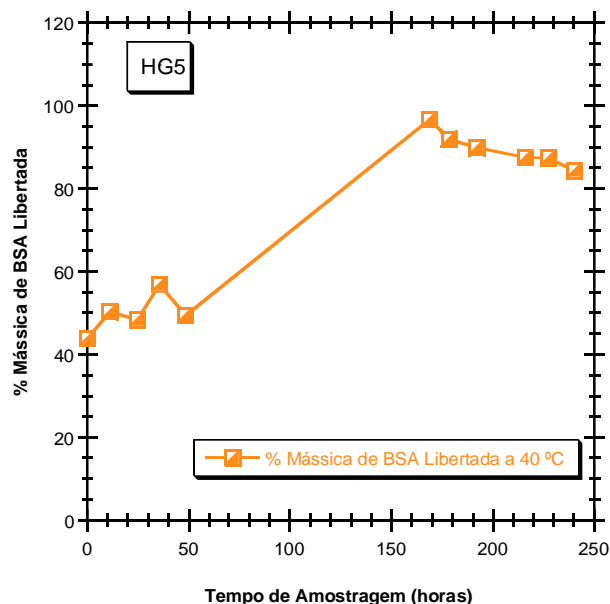
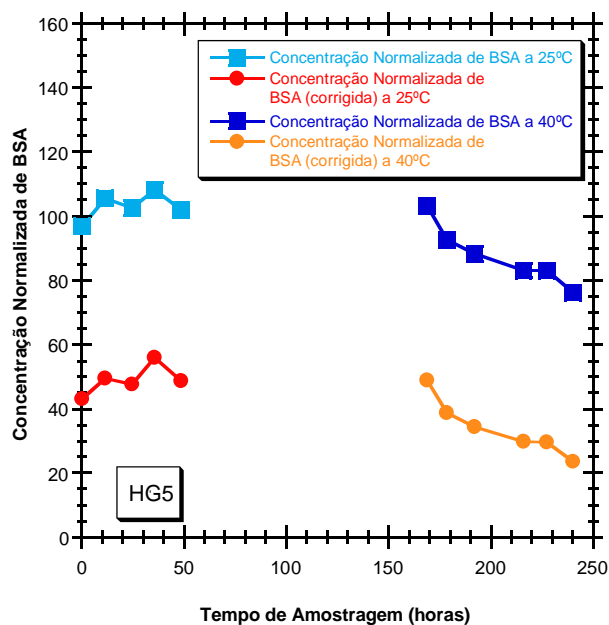
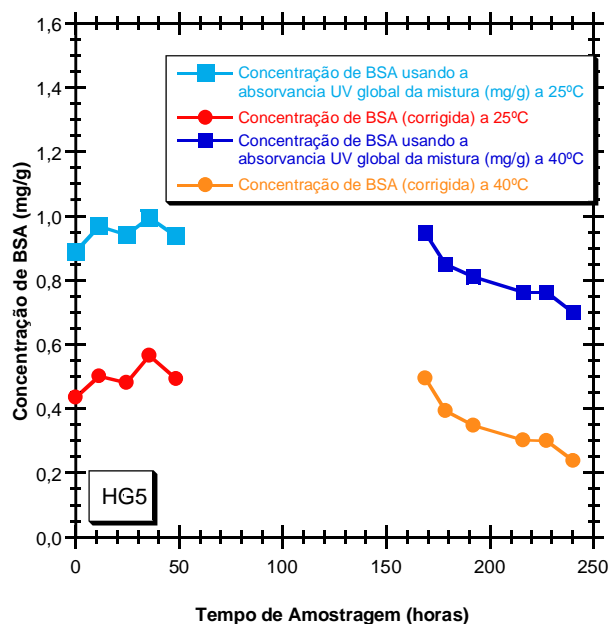
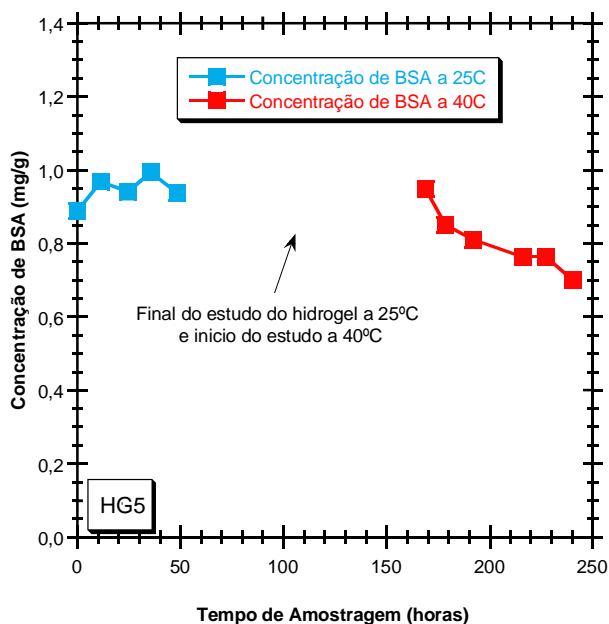
**Anexo 4:** Libertação de BSA estimulada por meio de duas temperaturas distintas (inicialmente o hidrogel foi colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguidamente a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  com incorporação de NaCl aquando da sua polimerização). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel) do hidrogel colocado em ambas as temperaturas. Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG4**.



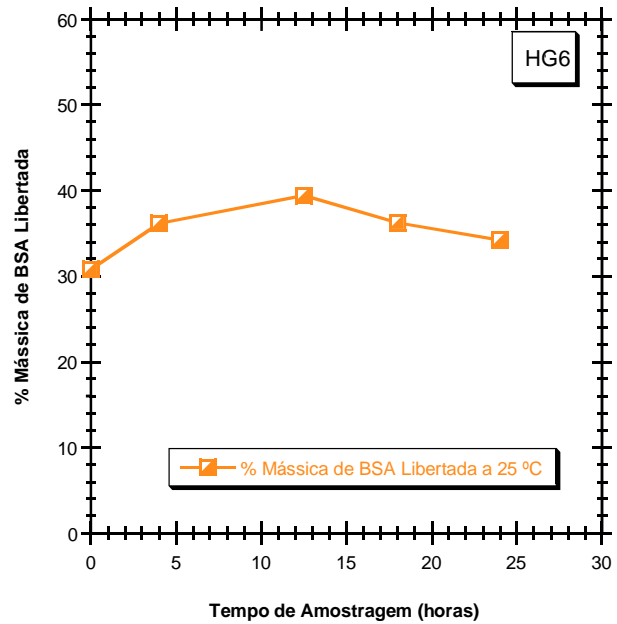
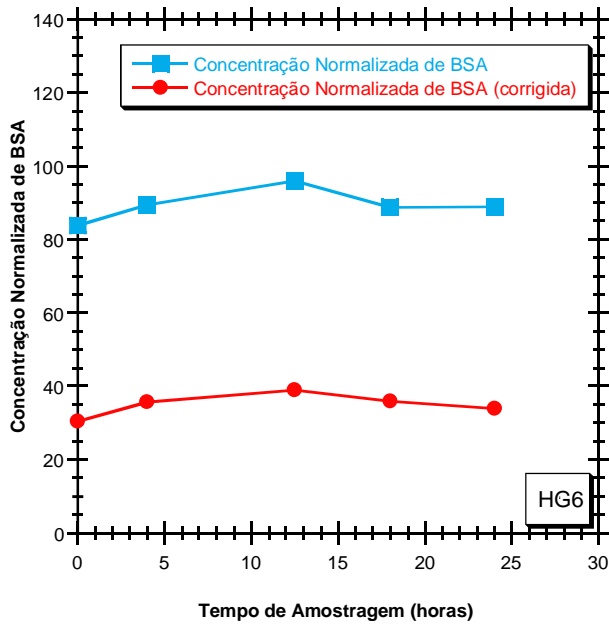
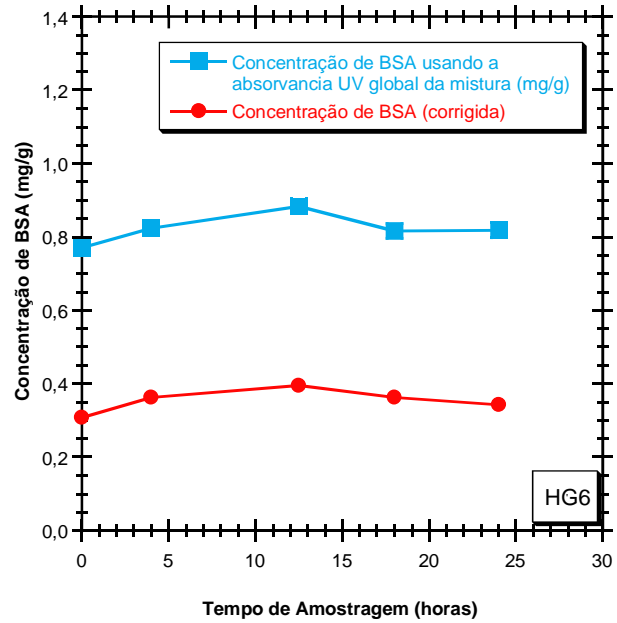
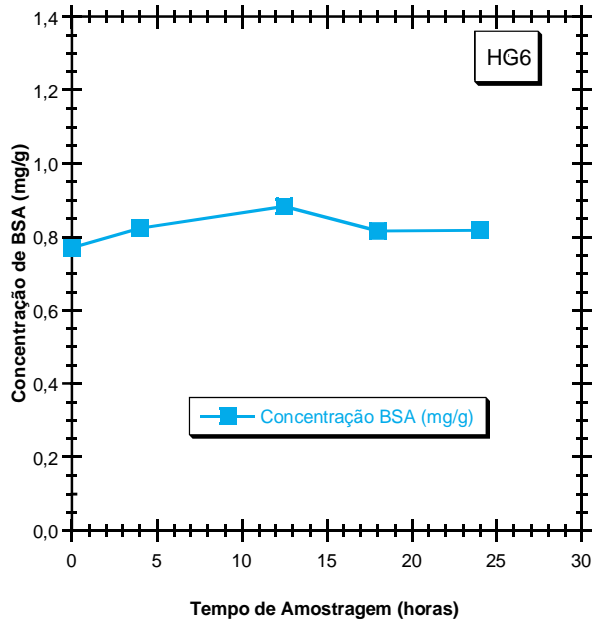
**Anexo 5:** Libertação de BSA estimulada pela temperatura (hidrogel colocado numa solução aquosa a T=25 °C). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG5**.



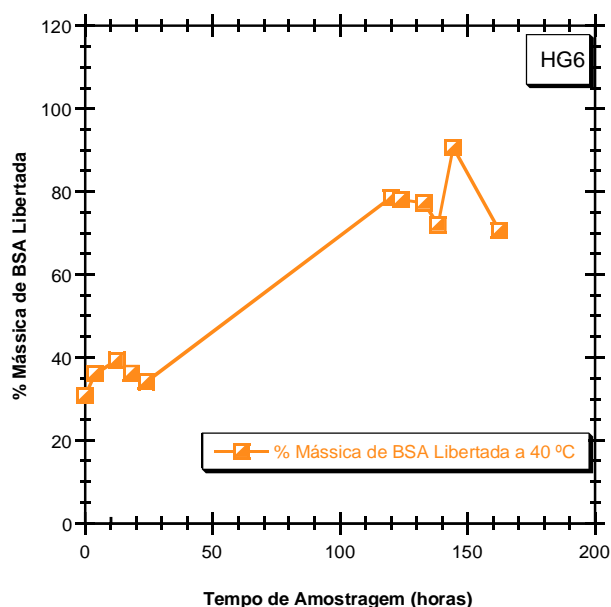
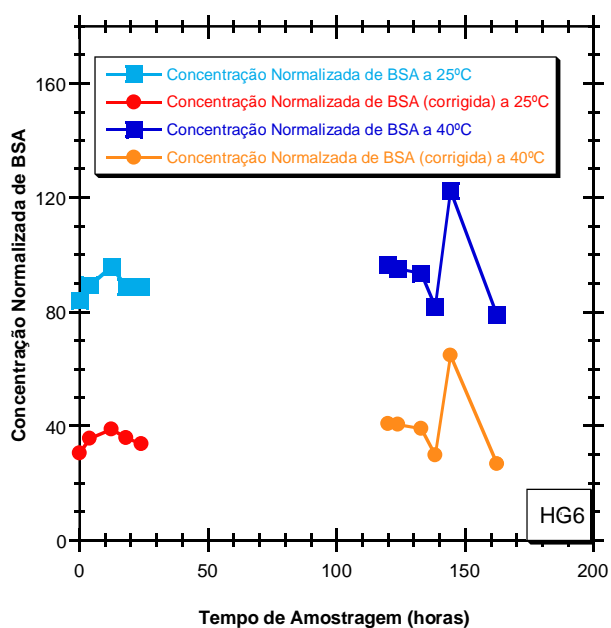
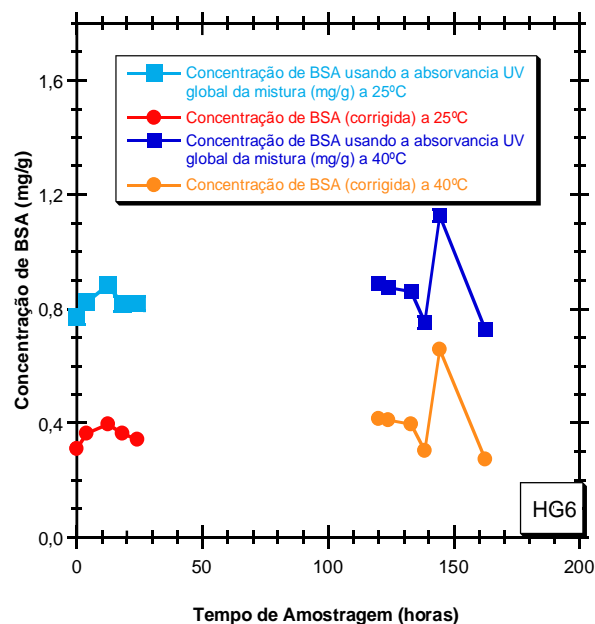
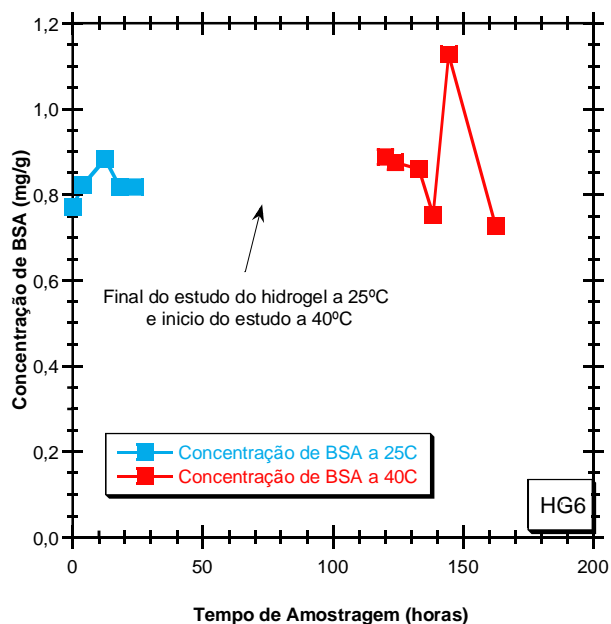
**Anexo 6:** Libertação de BSA estimulada por meio de duas temperaturas distintas (inicialmente o hidrogel foi colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguidamente a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel) do hidrogel colocado em ambas as temperaturas. Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG5**.



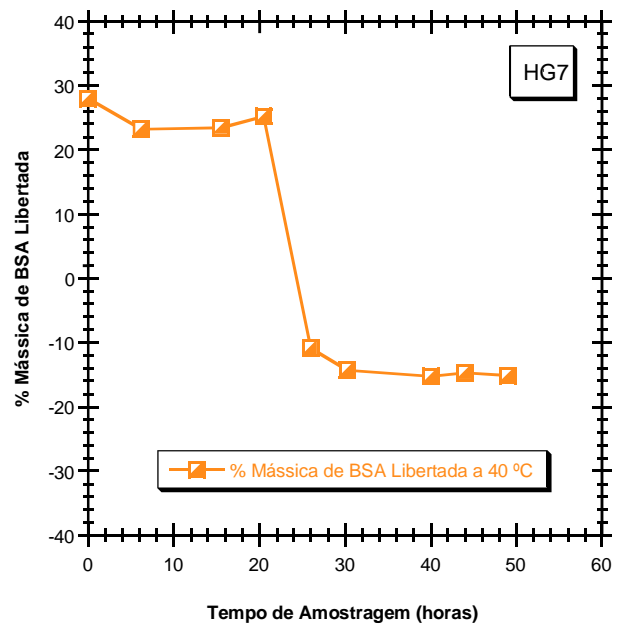
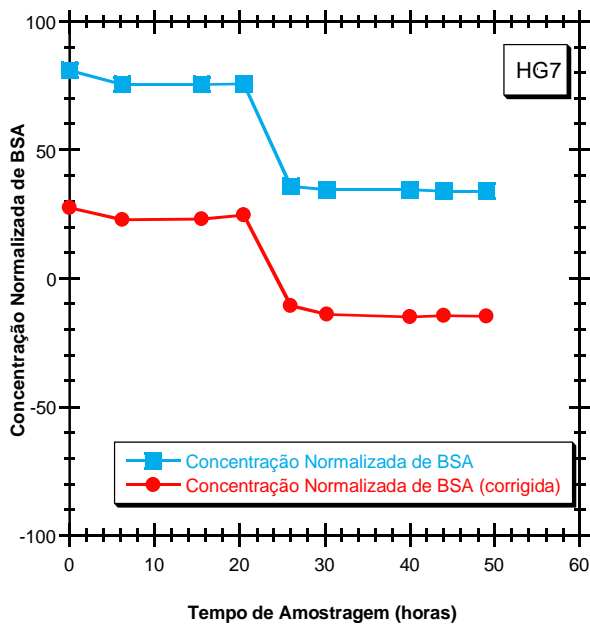
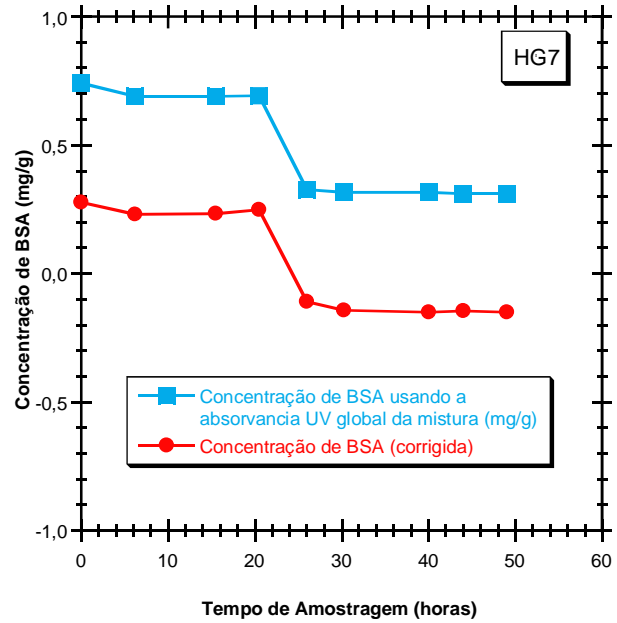
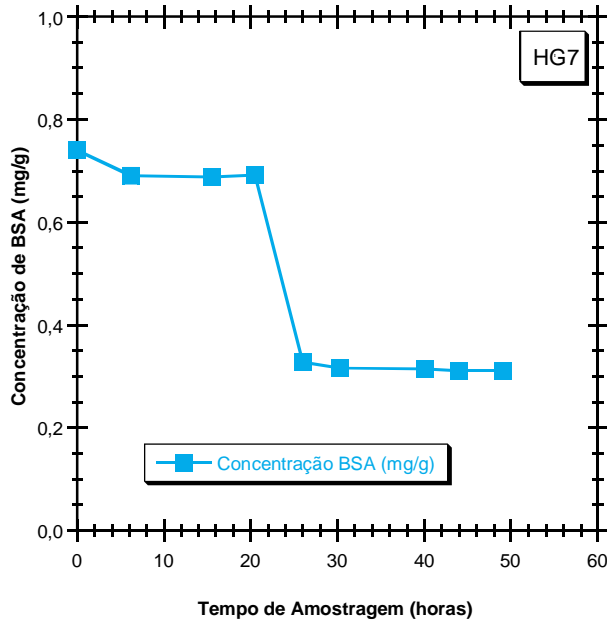
**Anexo 7:** Libertação de BSA estimulada pela temperatura e pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 7 a T=25 °C). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG6**.



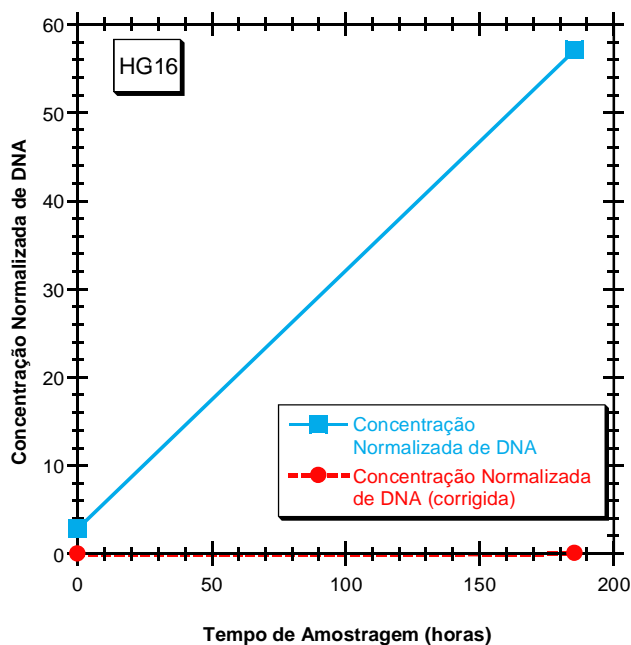
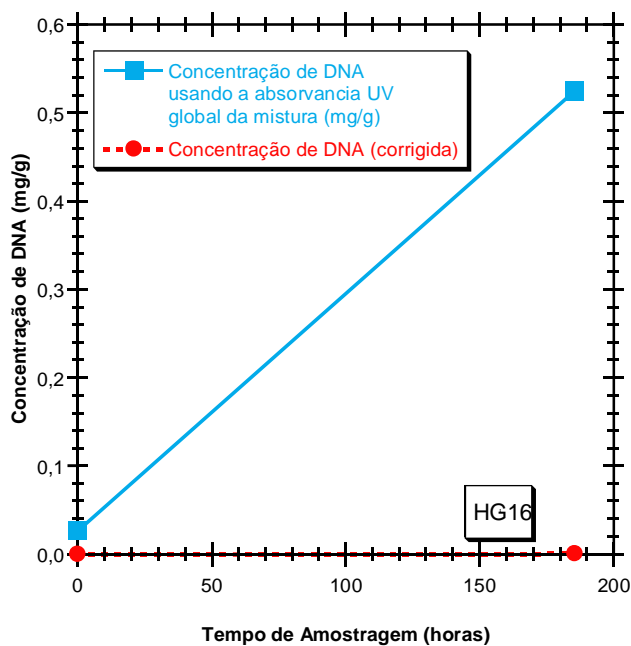
**Anexo 8:** Libertação de BSA estimulada por meio de duas temperaturas distintas e pelo pH (inicialmente o hidrogel foi colocado numa solução aquosa a  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguidamente a  $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$  em solução de pH 7). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel) do hidrogel colocado em ambas as temperaturas. Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG6**.



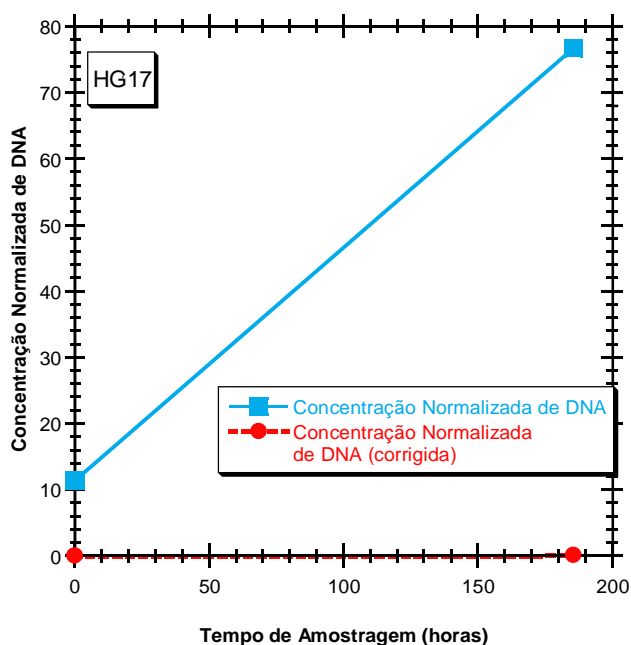
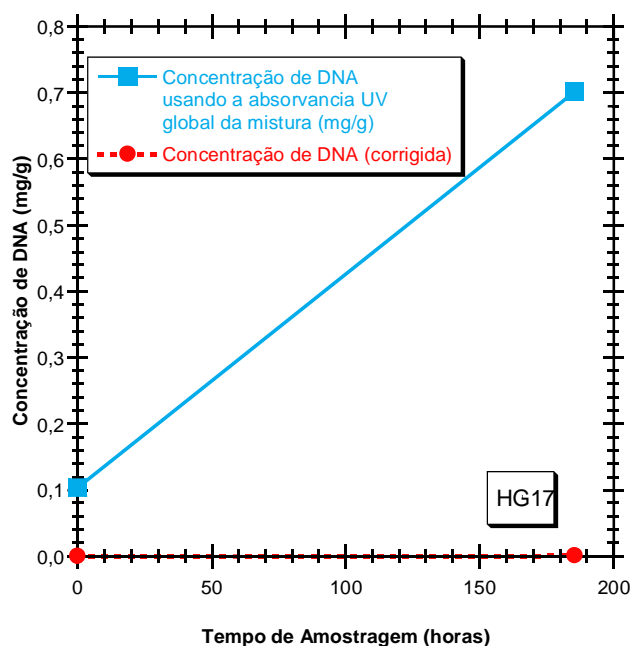
**Anexo 9:** Libertação de BSA estimulada pela temperatura e pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 7 a T=40 °C). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de proteína libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g hidrogel). Na determinação da concentração de BSA é descontada a concentração de NIPA por reagir (Concentração de BSA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado e a % Mássica de BSA libertada. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG7**.



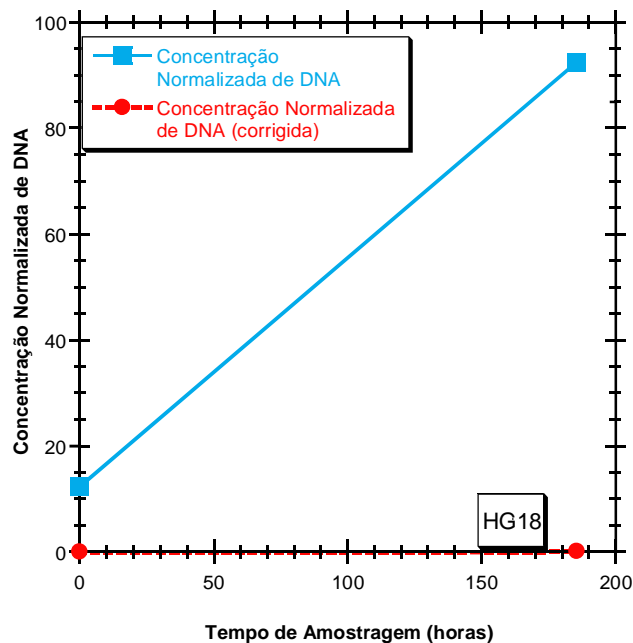
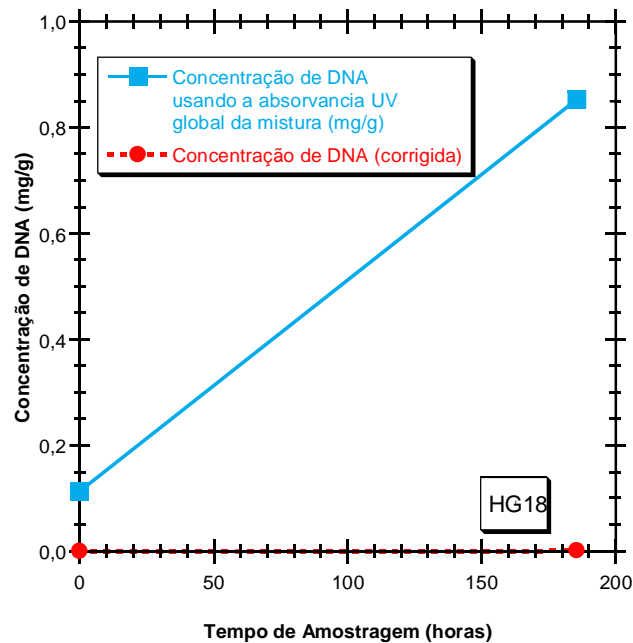
**Anexo 10:** Liberação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 2). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG16**.



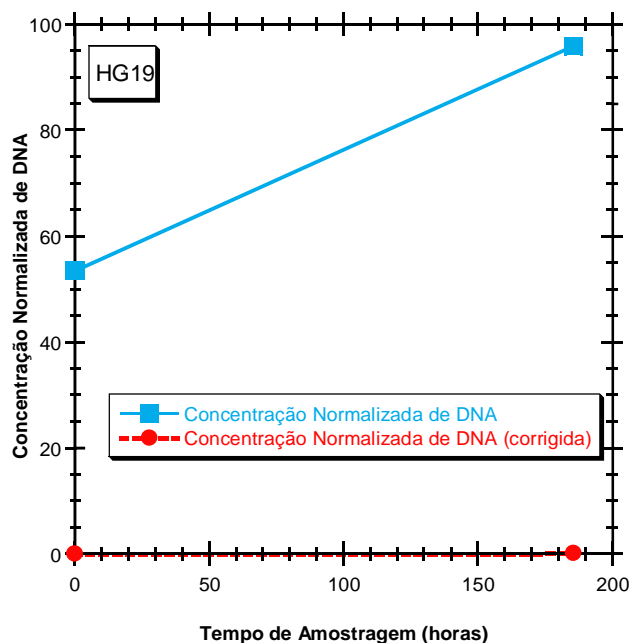
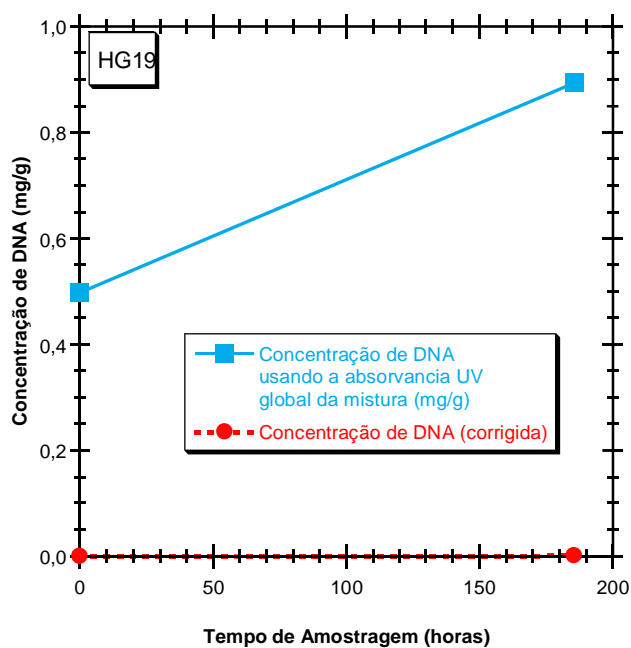
**Anexo 11:** Liberação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 7). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de liberação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG17**.



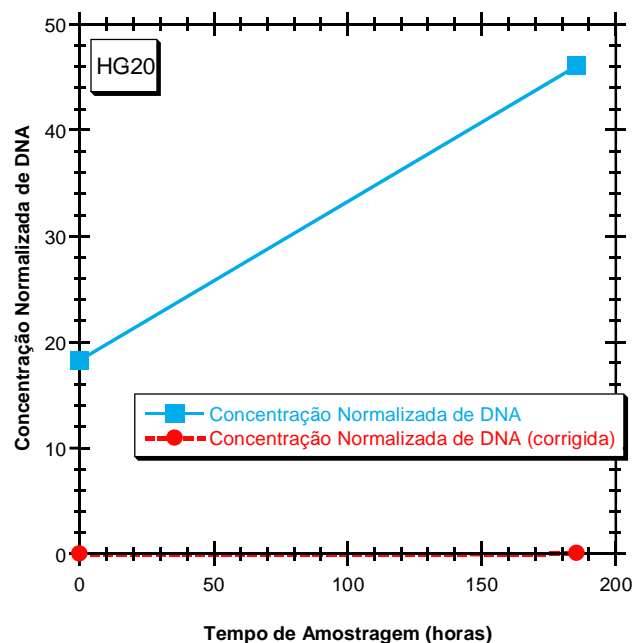
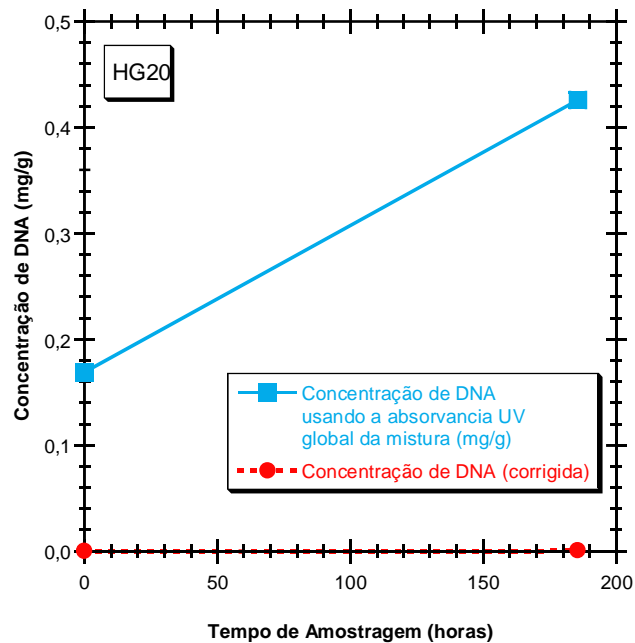
**Anexo 12:** Liberação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 10). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG18**.



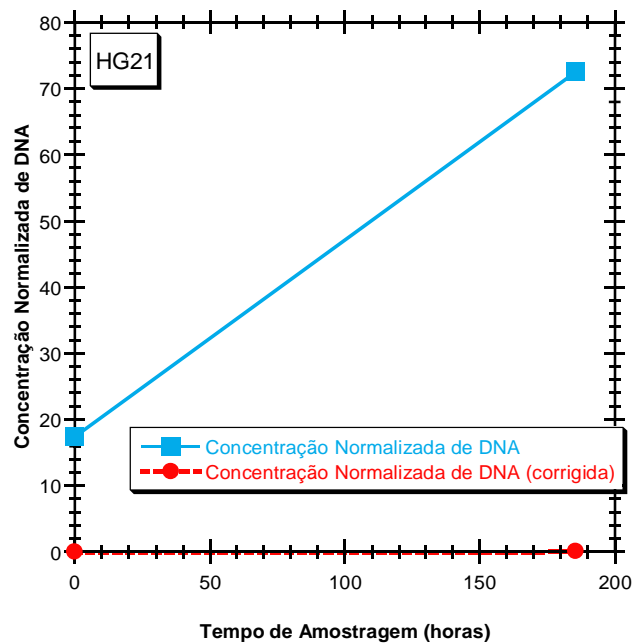
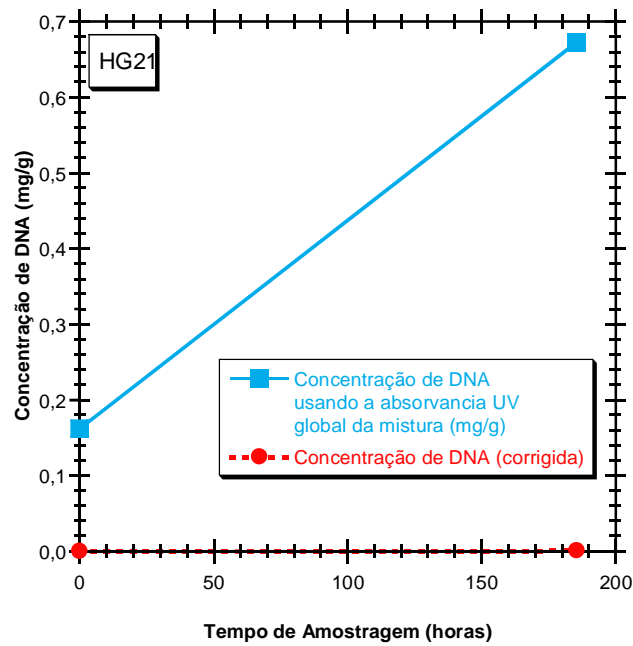
**Anexo 13:** Liberação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 2). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG19**.



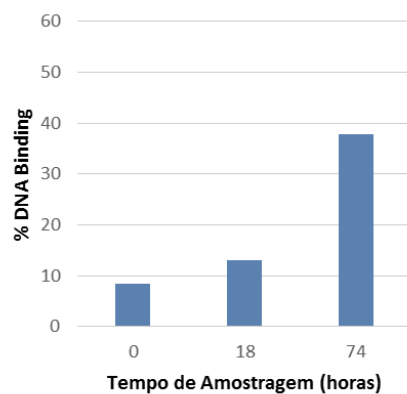
**Anexo 14:** Liberação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 7). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG20**.



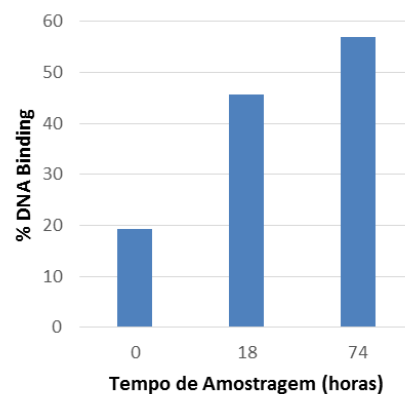
**Anexo 15:** Libertação de DNA estimulada pelo pH (hidrogel colocado numa solução aquosa de pH 10). Nas figuras são apresentados os valores medidos para a quantidade de DNA libertada usando a absorvância UV global da mistura (expressa em mg/g solução). Na determinação da concentração de DNA é descontada a concentração de DMAEMA por reagir (Concentração de DNA corrigida). Faz-se também a referência à concentração normalizada, usando como referência o máximo observado. Os dados experimentais da dinâmica de libertação foram obtidos através de espectroscopia UV-Vis. São aqui apresentados os testes realizados ao hidrogel **HG21**.



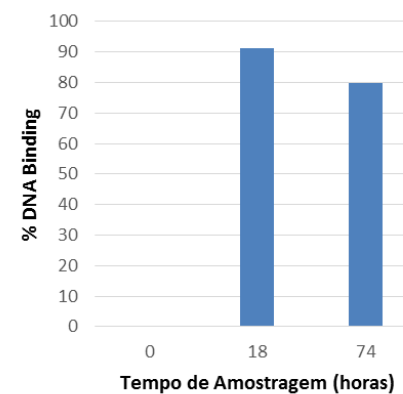
**Anexo 16:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em glucose de 0,2287 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 1 da Tabela 7-3.



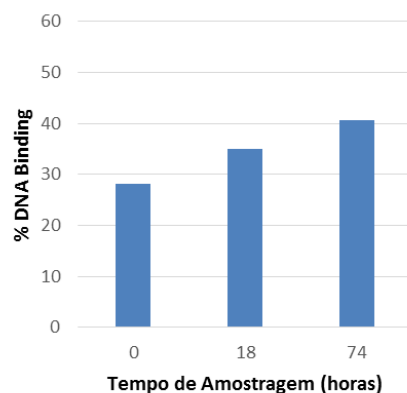
**Anexo 17:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em glucose de 0,4065 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 2 da Tabela 7-3.



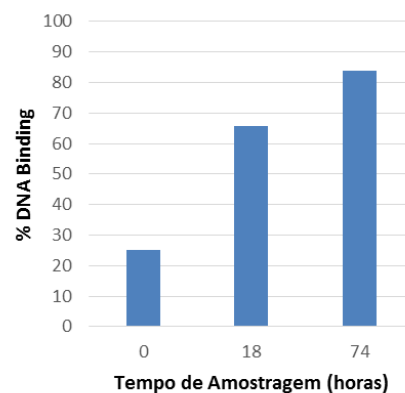
**Anexo 18:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em glucose de 0,5905 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 3 da Tabela 7-3.



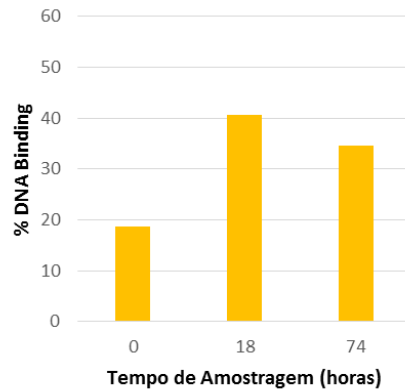
**Anexo 19:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em glucose de 0,8150 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 4 da Tabela 7-3.



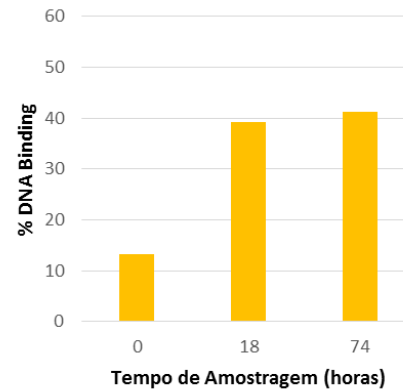
**Anexo 20:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em glucose de 1,0361 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 5 da Tabela 7-3.



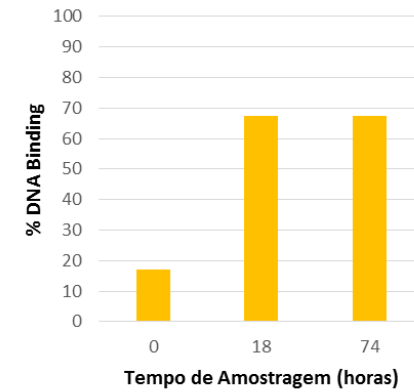
**Anexo 21:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em  $W_{DI}$  de 0,2043 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 6 da Tabela 7-3.



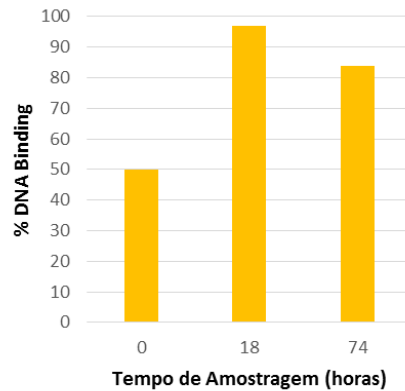
**Anexo 22:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em  $W_{DI}$  de 0,4361 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 7 da Tabela 7-3.



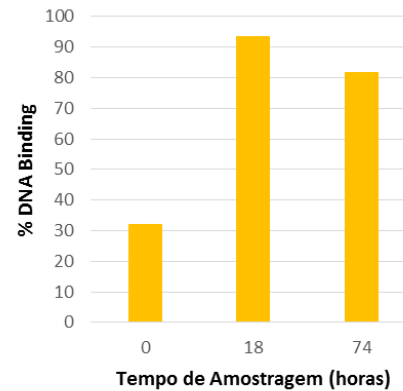
**Anexo 23:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em  $W_{DI}$  de 0,6057 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 8 da Tabela 7-3.



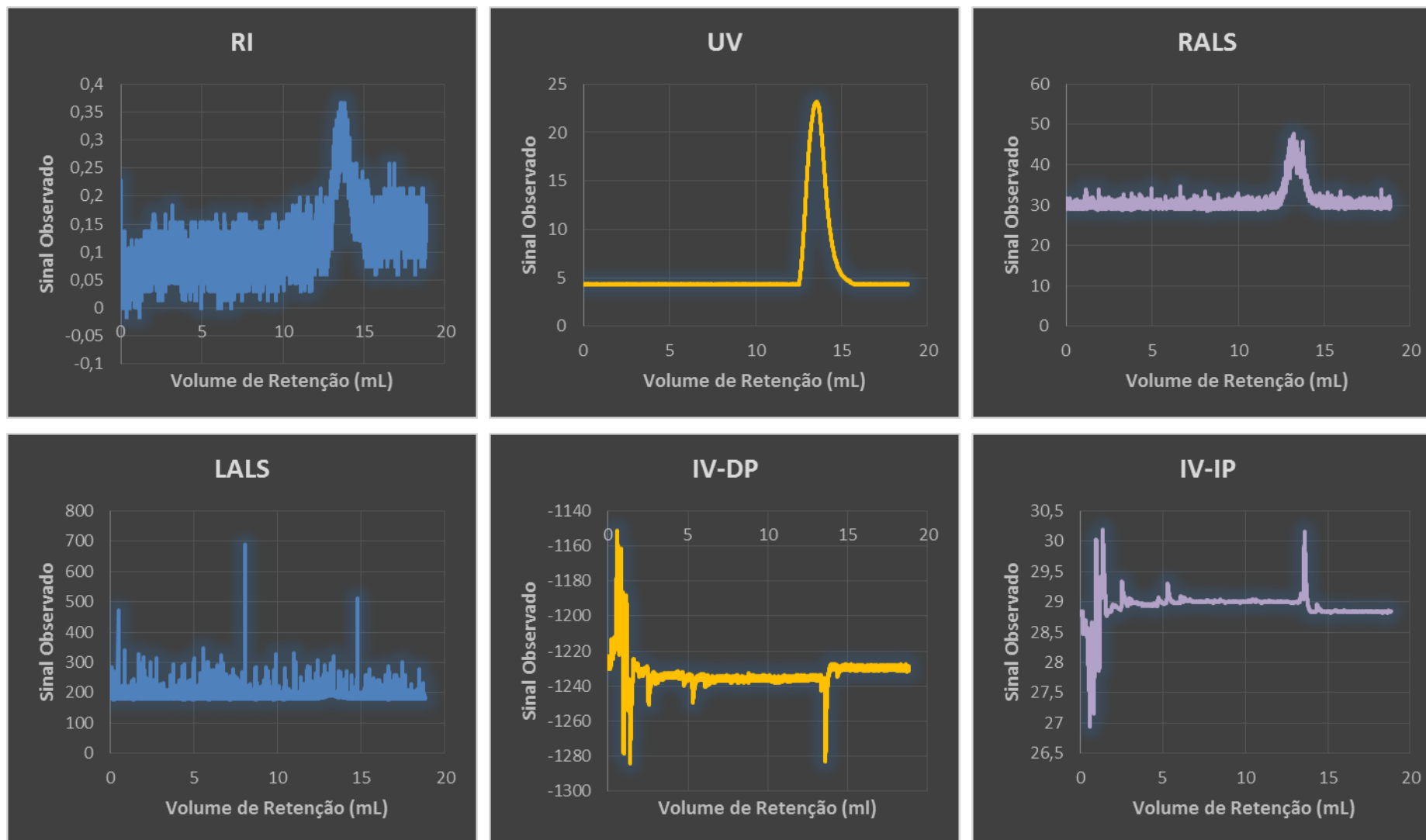
**Anexo 24:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em  $W_{DI}$  de 0,8593 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 9 da Tabela 7-3.



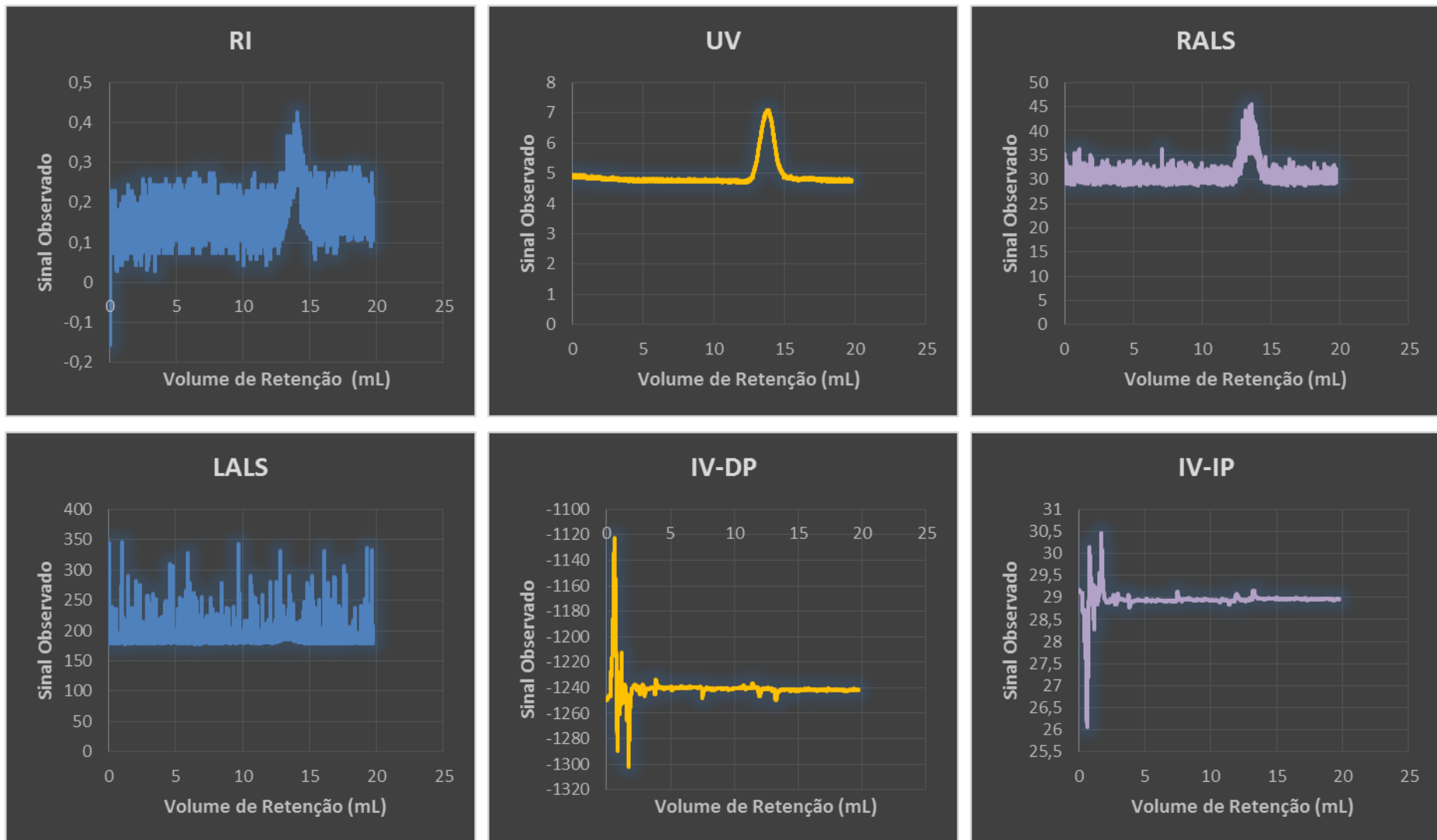
**Anexo 25:** % DNA *Binding* para a concentração de DNA em  $W_{DI}$  de 1,0192 (mg/mL) em diferentes tempos de amostragem (horas). Teste 10 da Tabela 7-3.



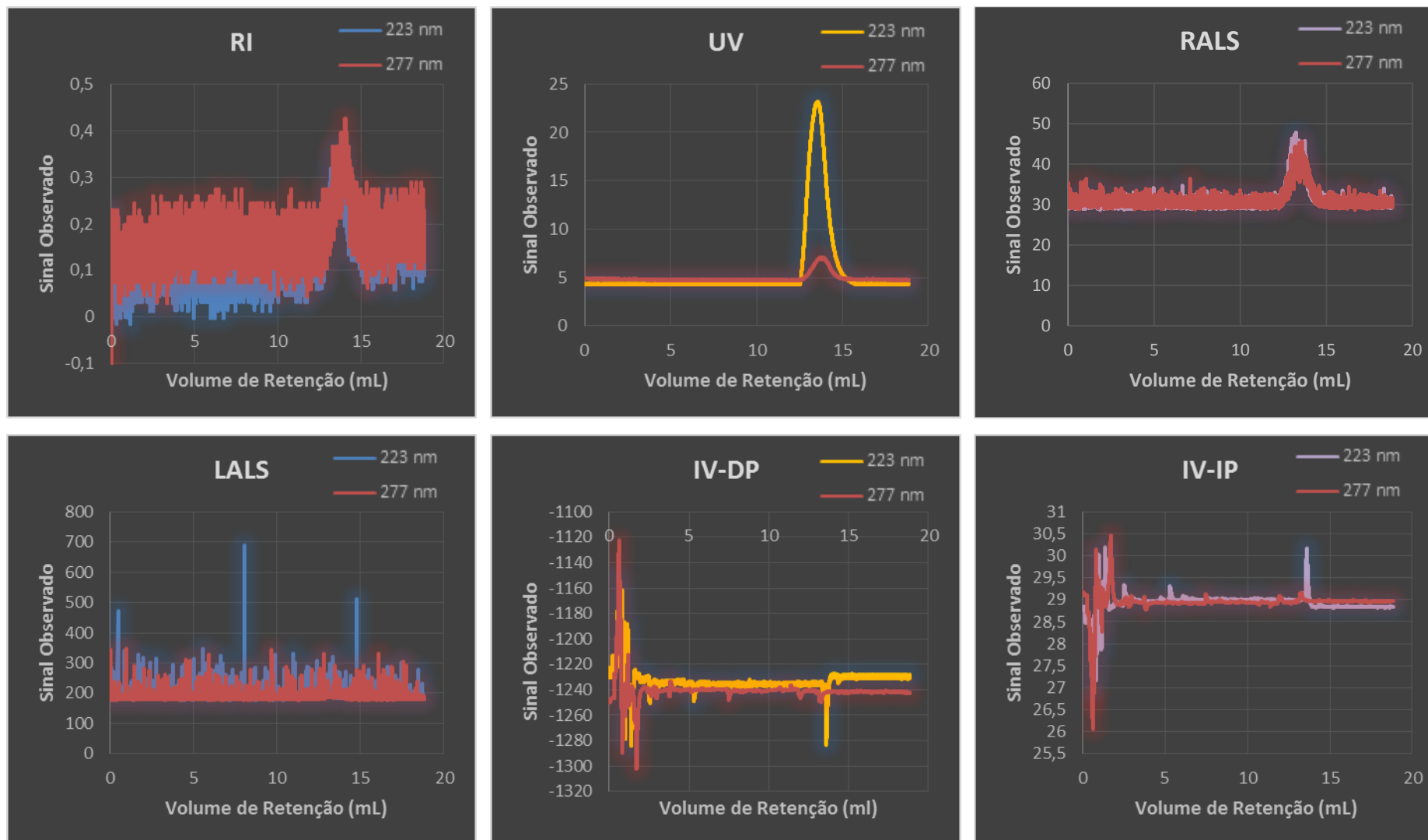
**Anexo 26:** Caracterização por GPC de uma solução contendo proteína BSA com detecção UV a 223 nm.



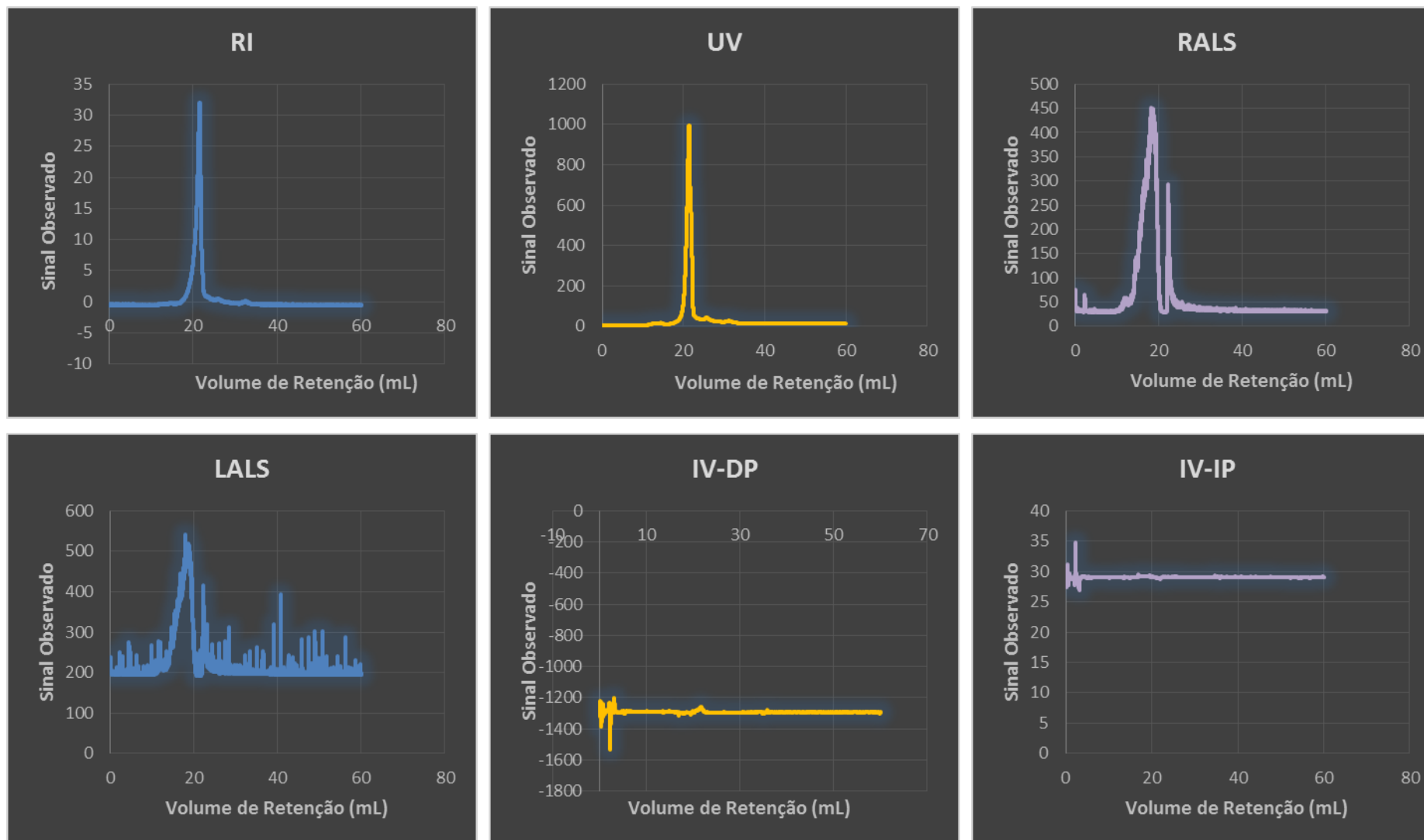
**Anexo 27:** Caracterização por GPC de uma solução contendo proteína BSA com detecção UV a 277 nm.



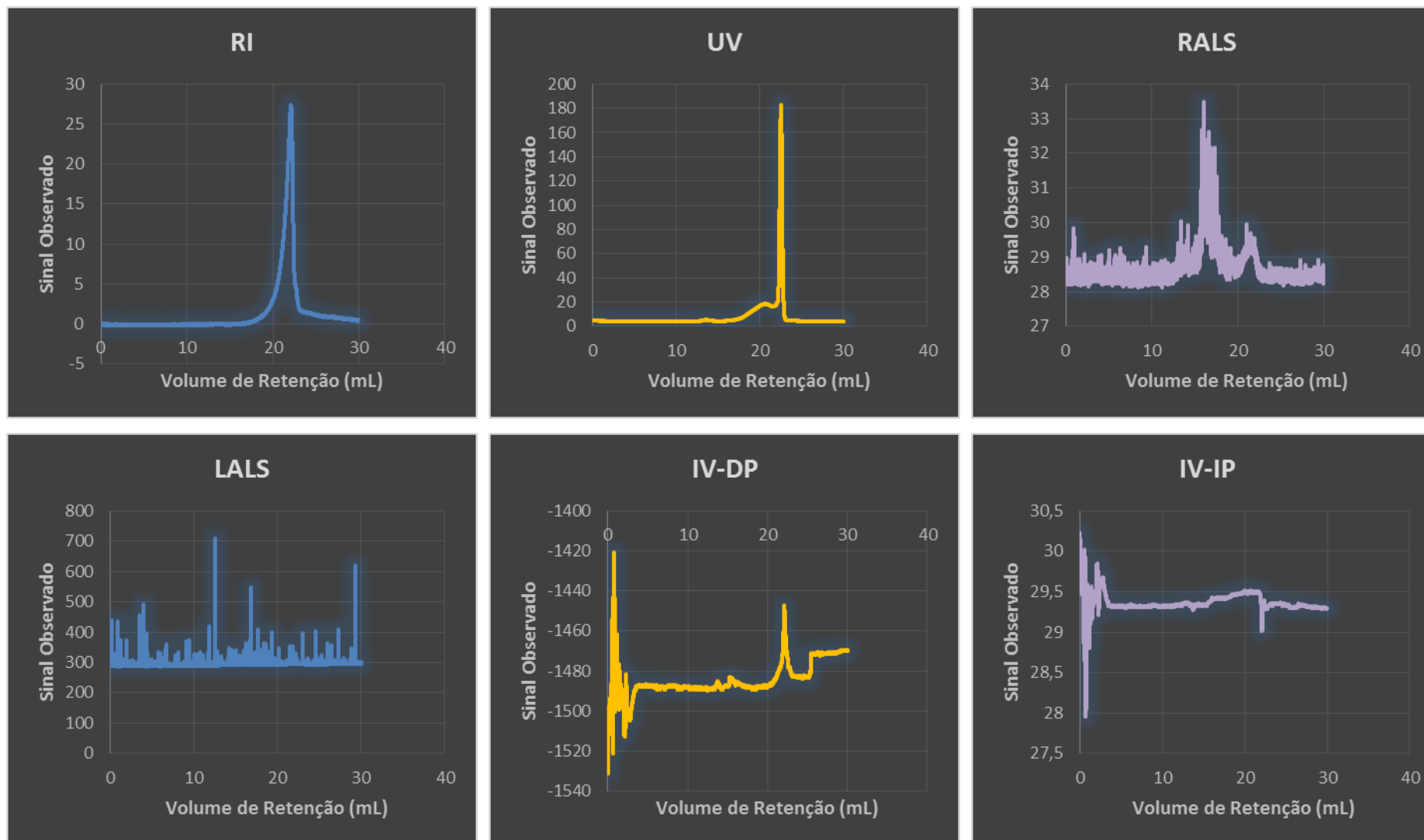
**Anexo 28:** Análise comparativa da caracterização por GPC de uma solução contendo proteína BSA com detecção UV a 223 e 277 nm.



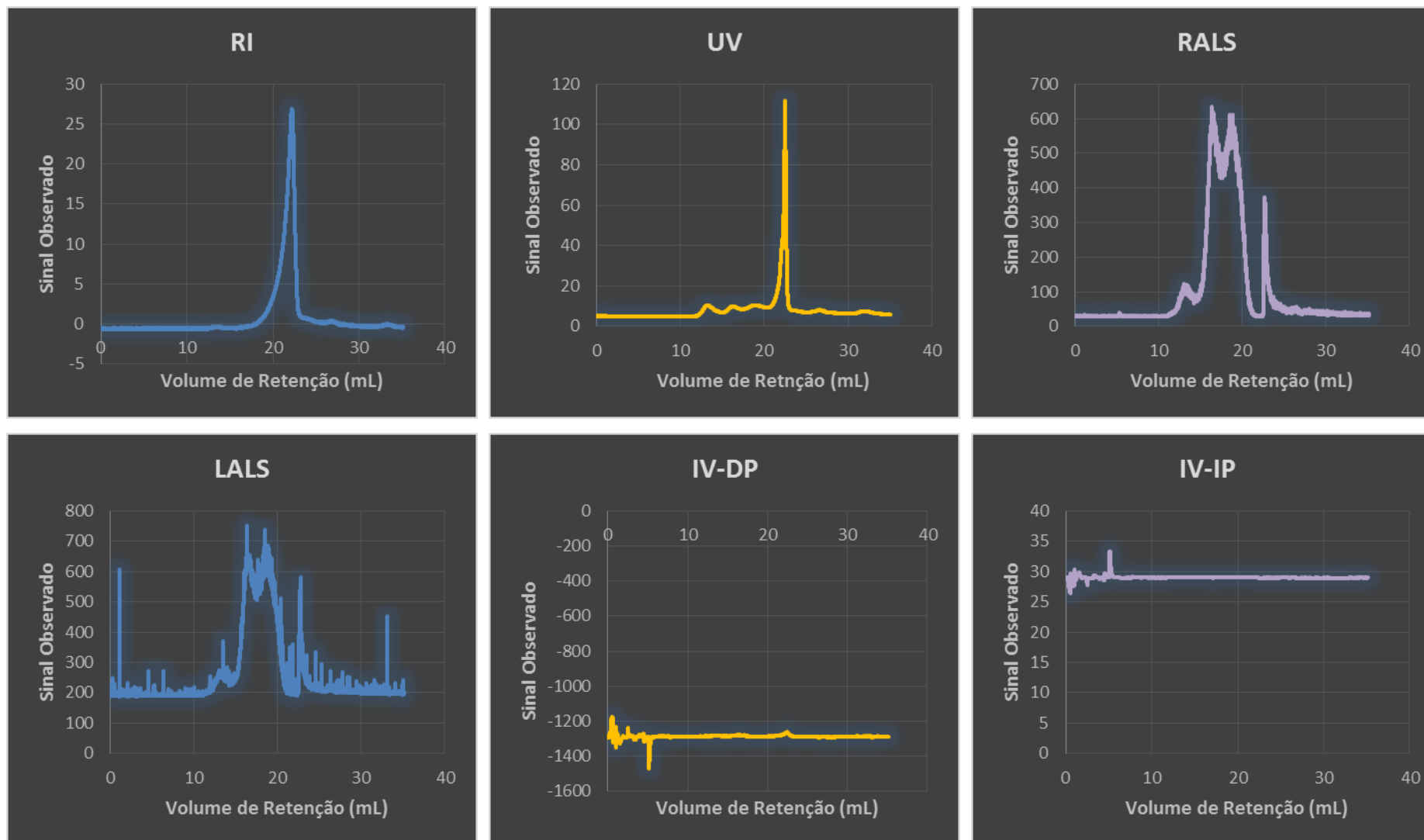
**Anexo 29:** Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=7 do hidrogel HG8.



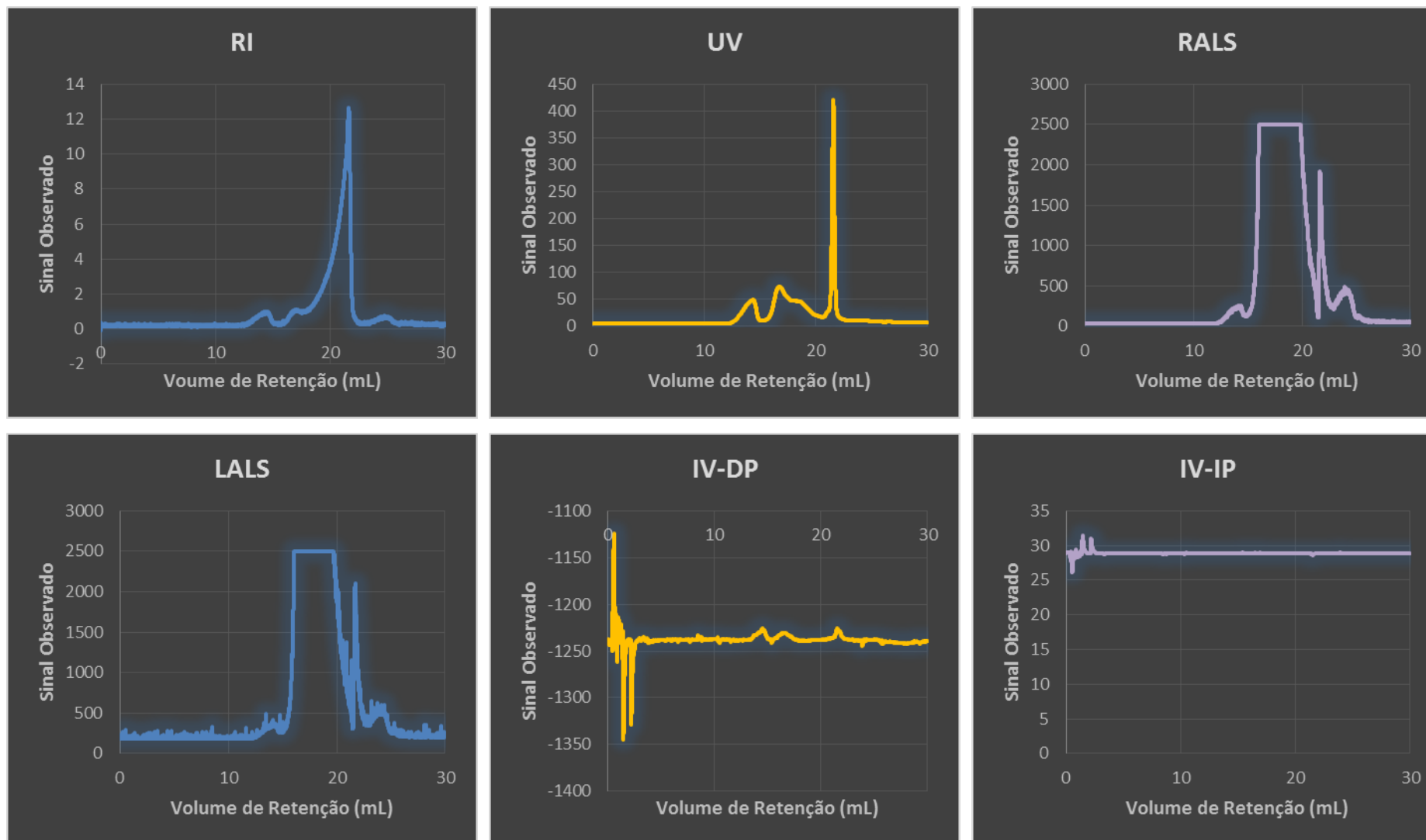
**Anexo 30:** Caracterização por GPC da 9ª amostra recolhida da solução a pH=7 do hidrogel HG8.



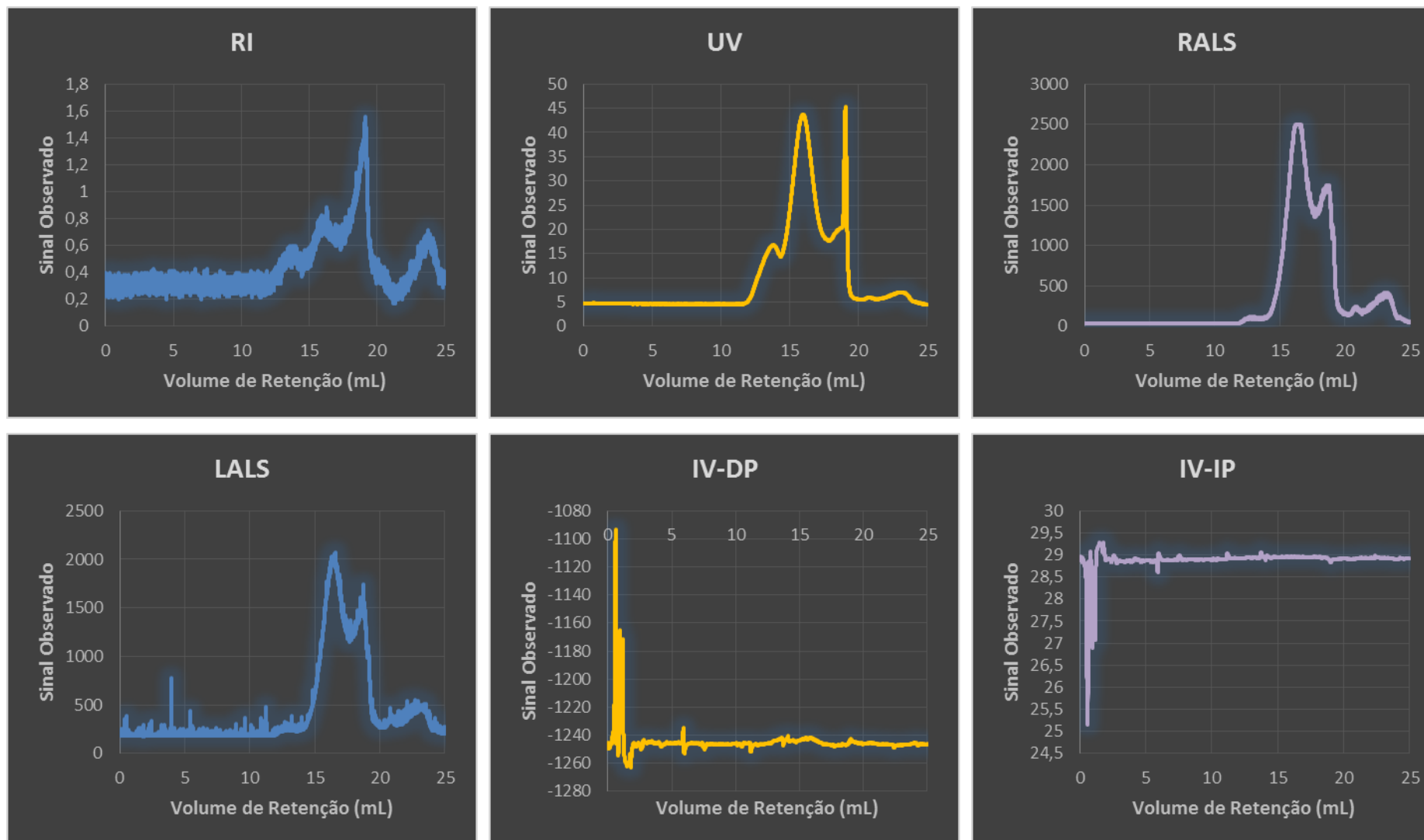
**Anexo 31:** Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=7 do hidrogel HG9 (sem inclusão de BSA).



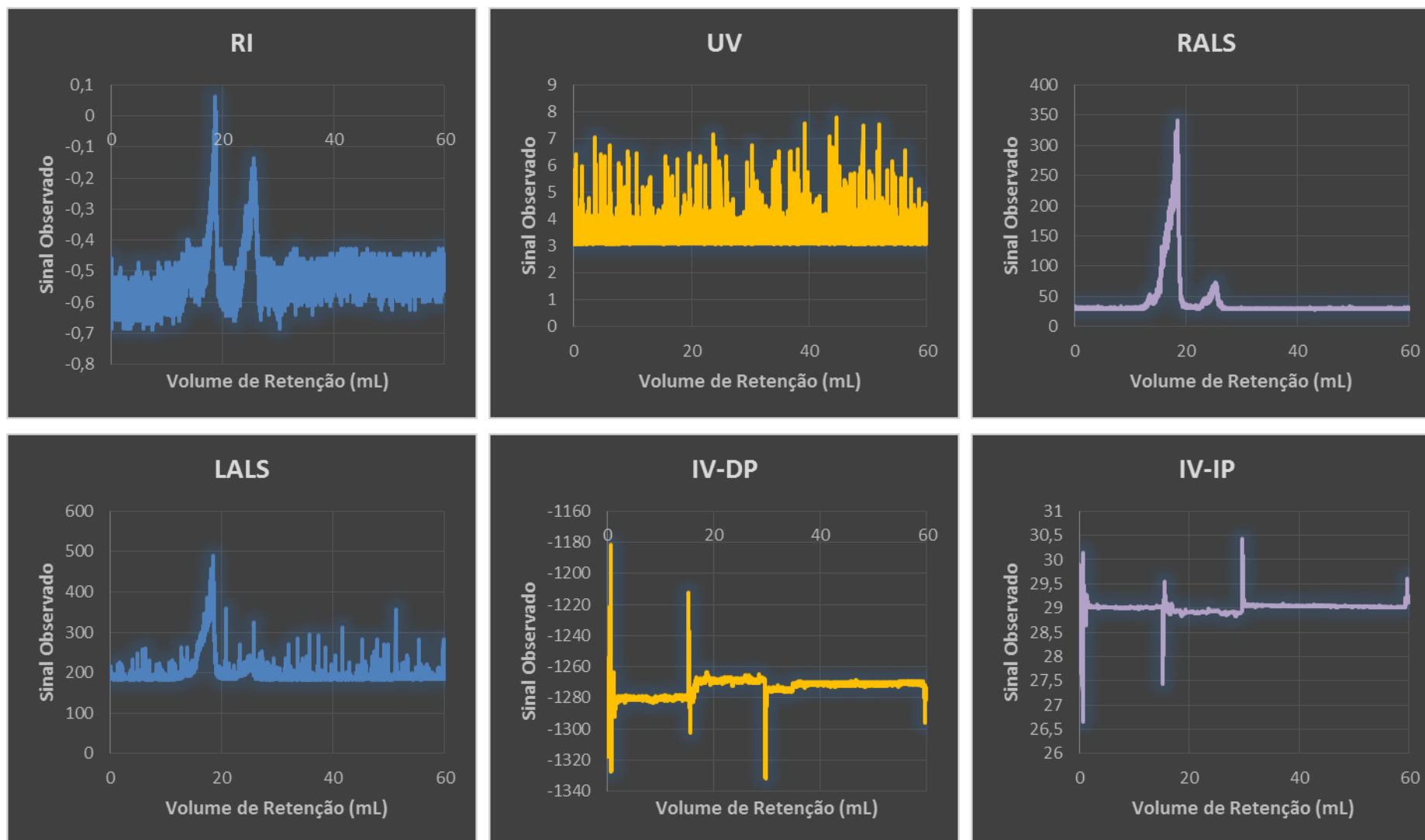
**Anexo 32:** Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10.



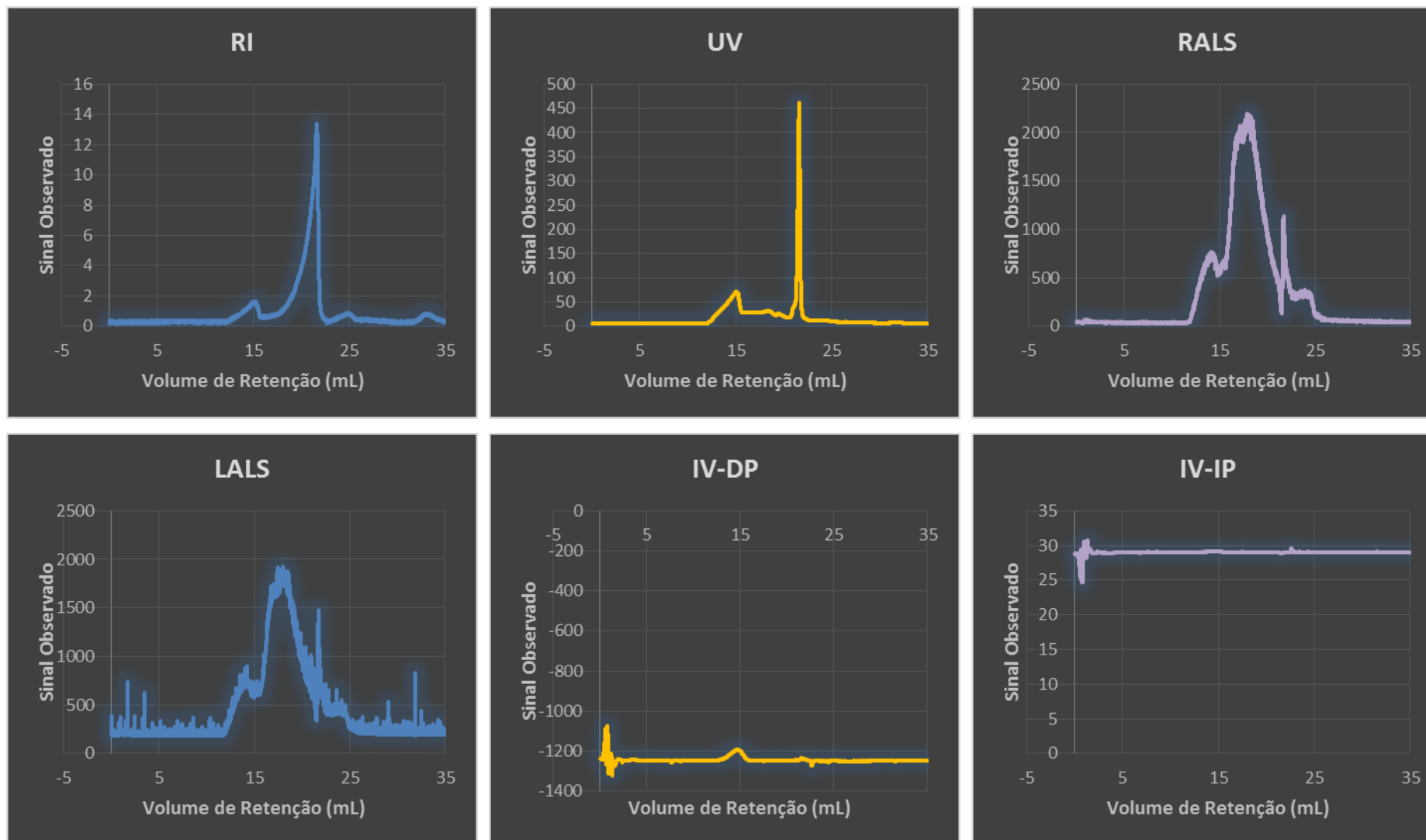
**Anexo 33:** Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10 (hidrogel sujeito a diluição em 10 vezes).



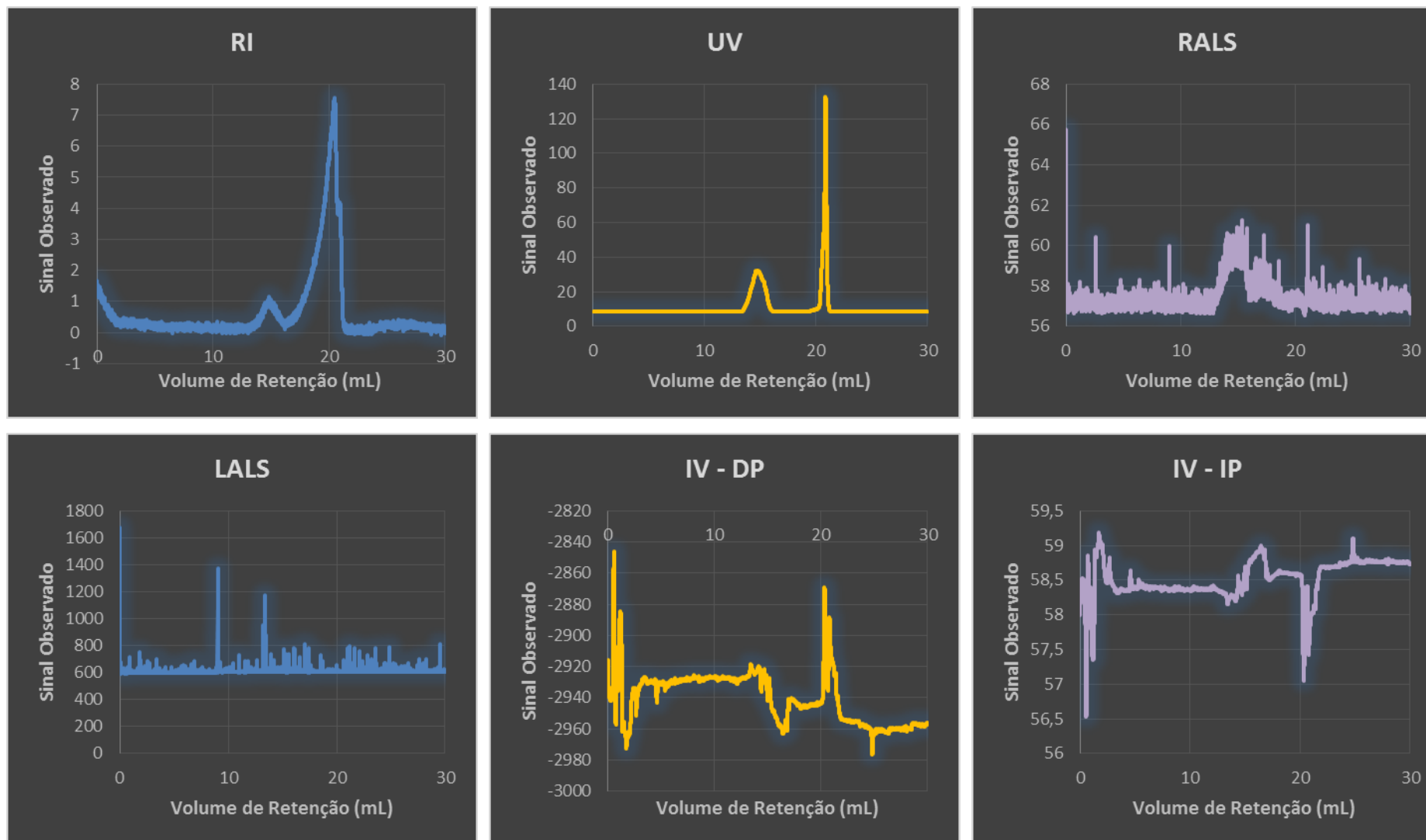
**Anexo 34:** Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10 (hidrogel sujeito a diluição em 20 vezes).



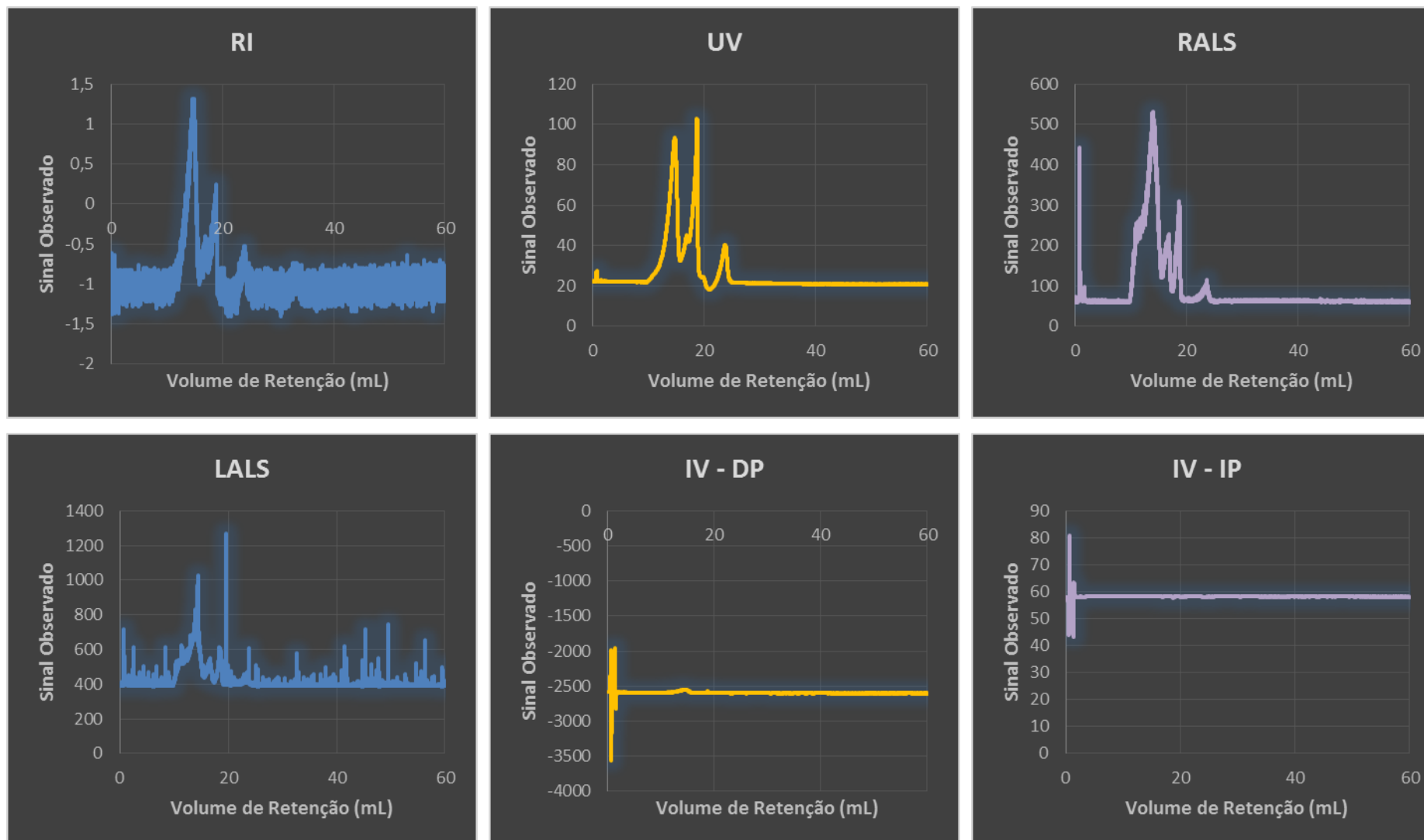
**Anexo 35:** Caracterização por GPC da 1ª amostra recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10.



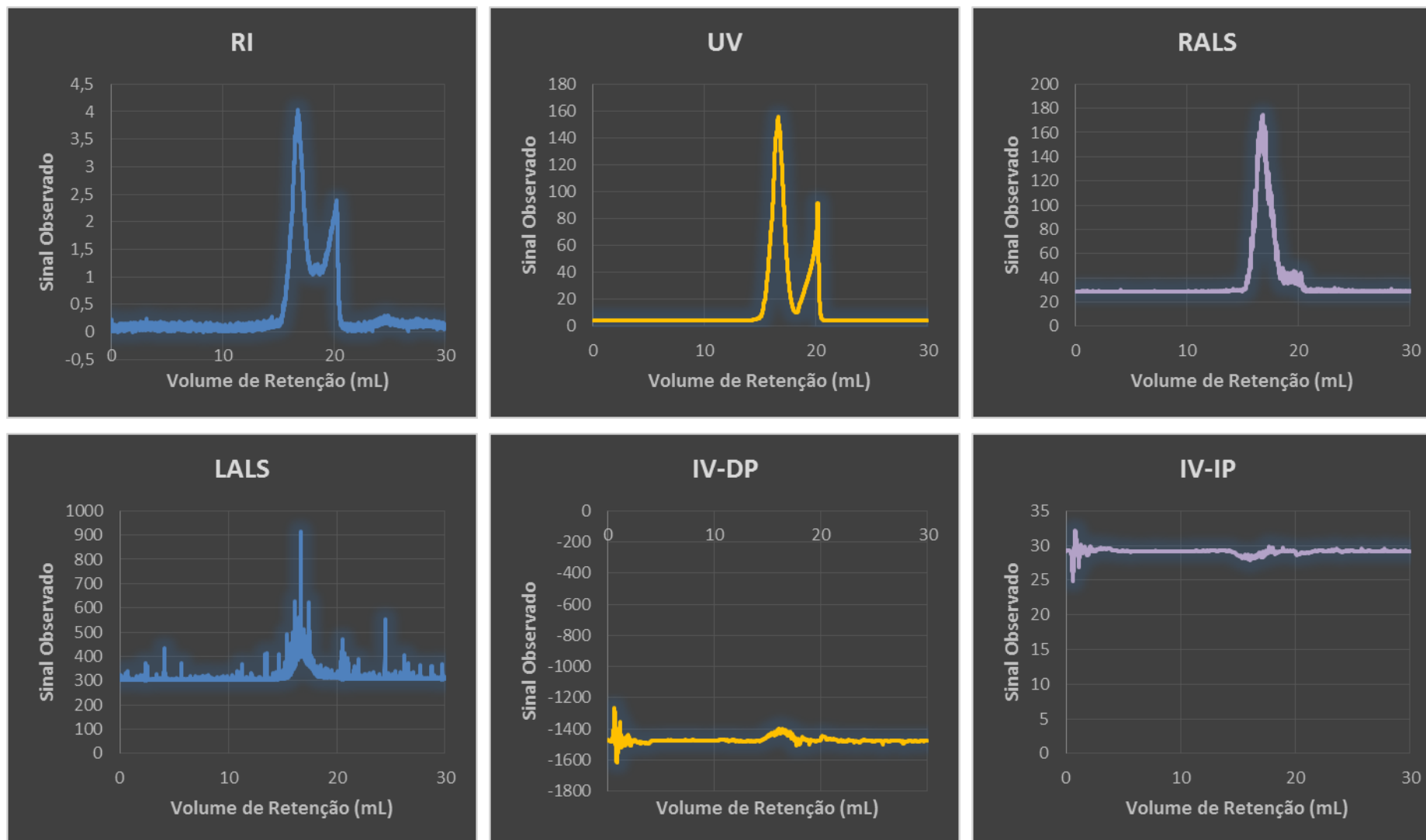
**Anexo 36:** Caracterização por GPC da 8ª amostra recolhida da solução a pH=2 do hidrogel HG10 (hidrogel sujeito a diluição em 10 vezes).



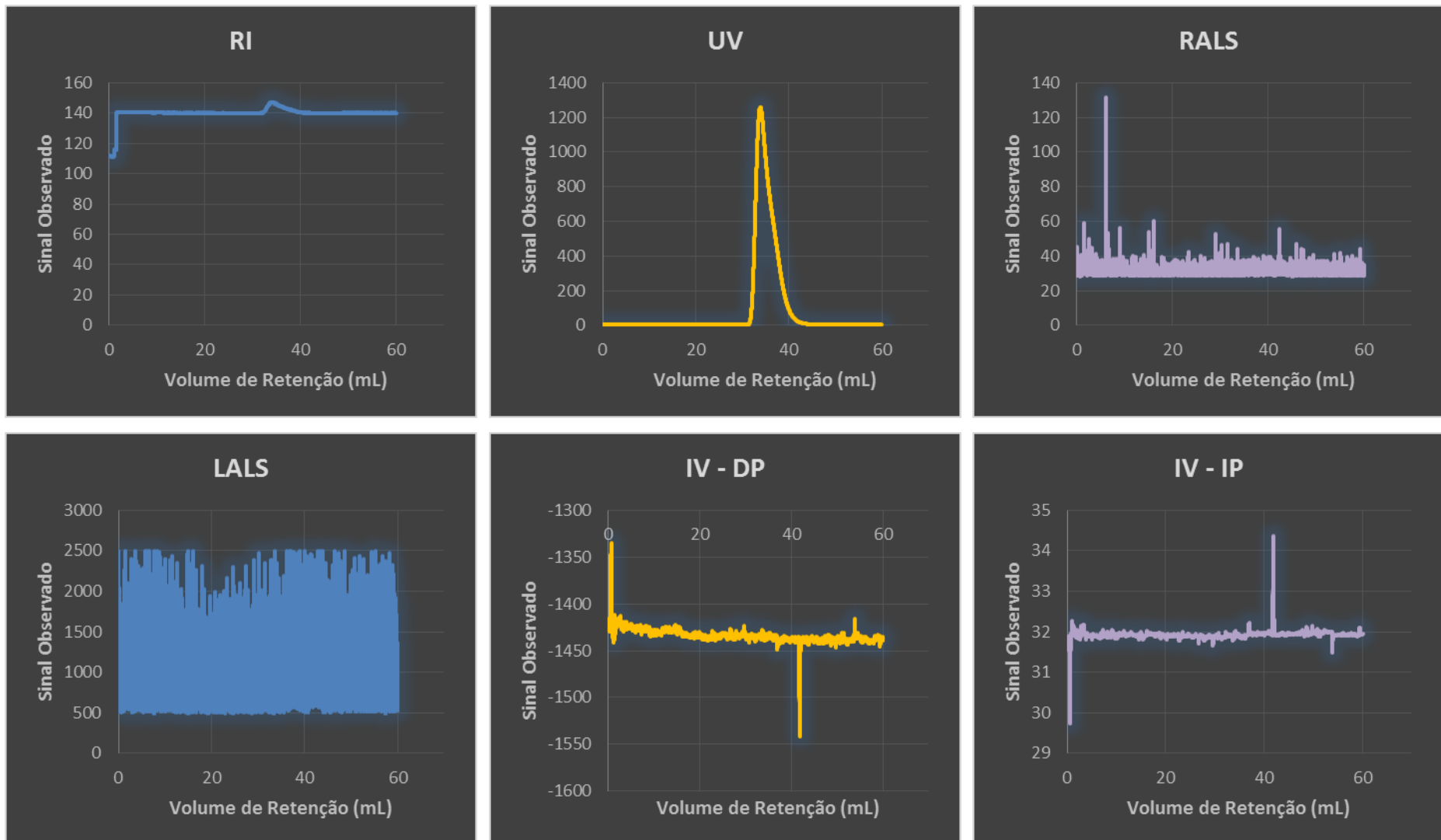
**Anexo 37:** Caracterização por GPC da amostra 0 recolhida da solução a pH=10 do hidrogel HG11 (hidrogel sujeito a diluição em 10 vezes).



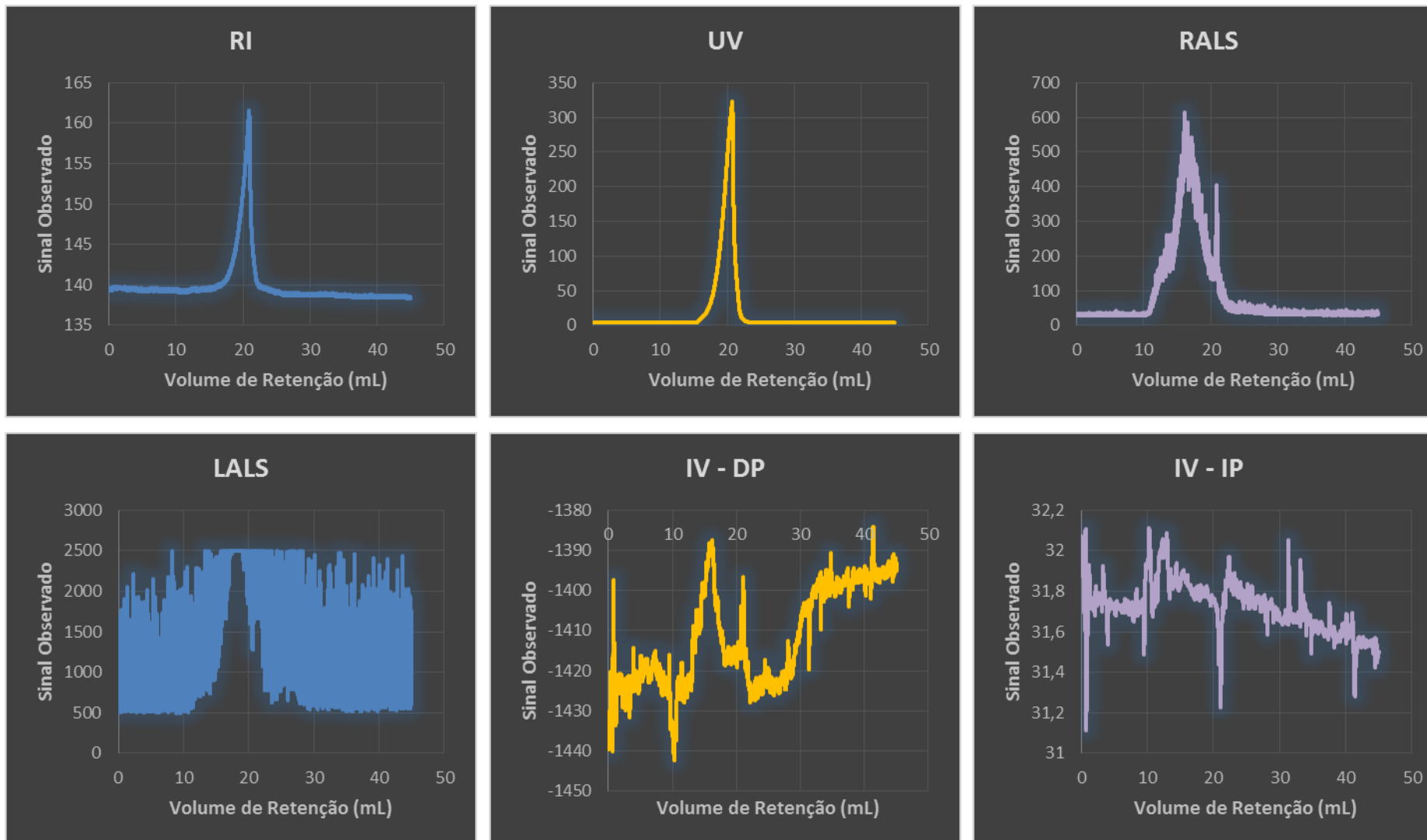
**Anexo 38:** Caracterização por GPC da 8ª amostra recolhida da solução a pH=10 do hidrogel HG11.



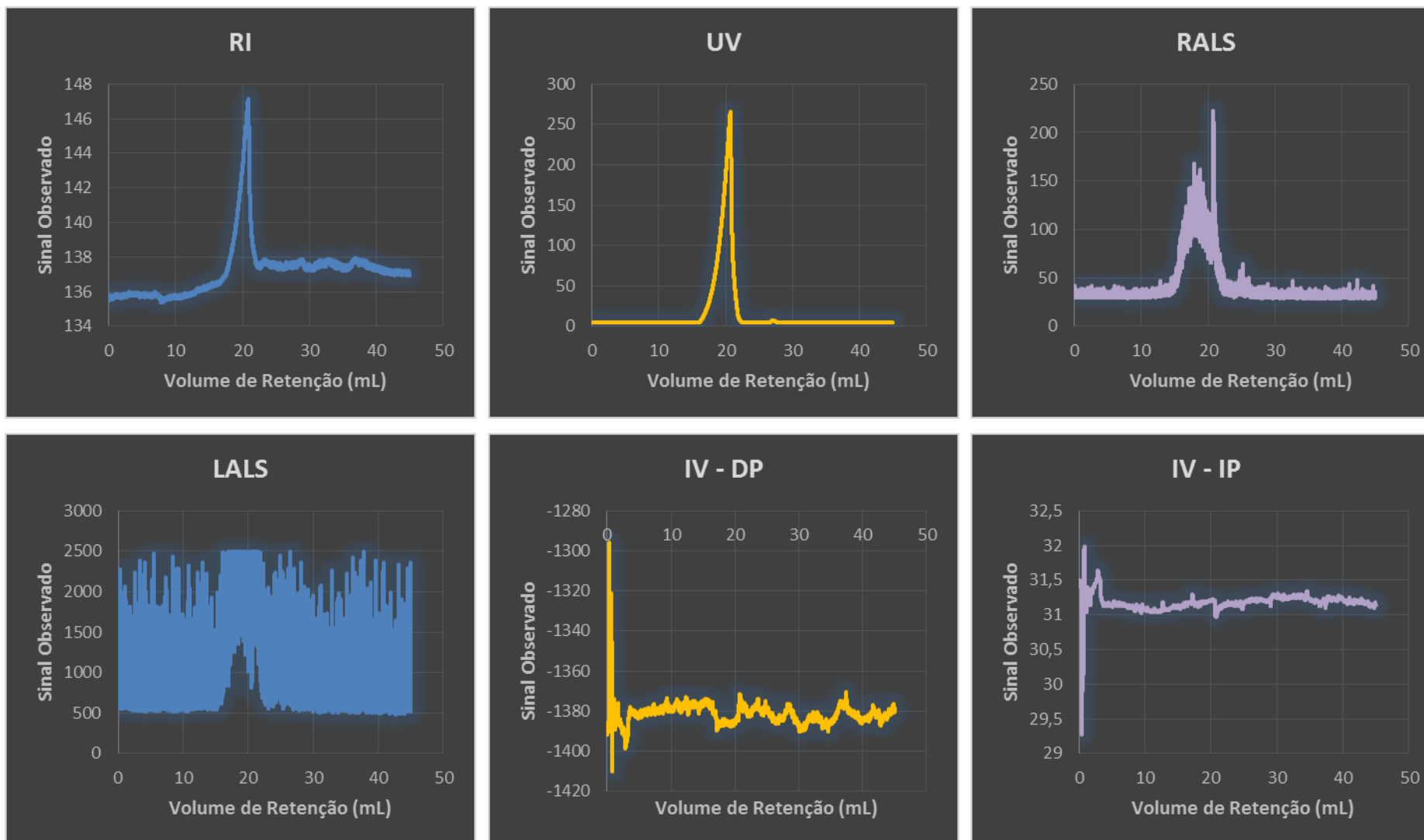
**Anexo 39:** Caracterização por GPC de uma solução contendo monômero NIPA.



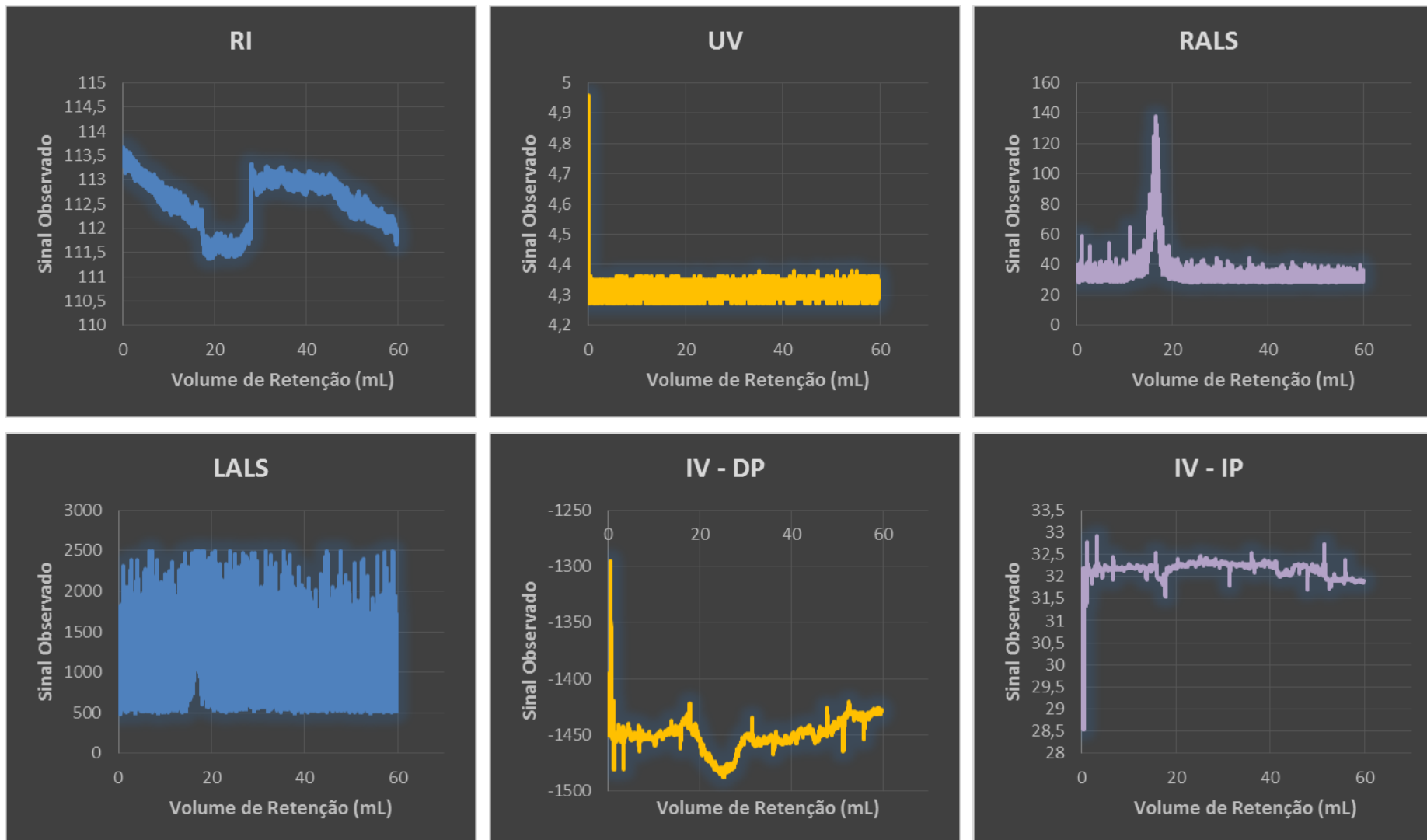
Anexo 40: Caracterização por GPC de uma solução contendo monômero AA.



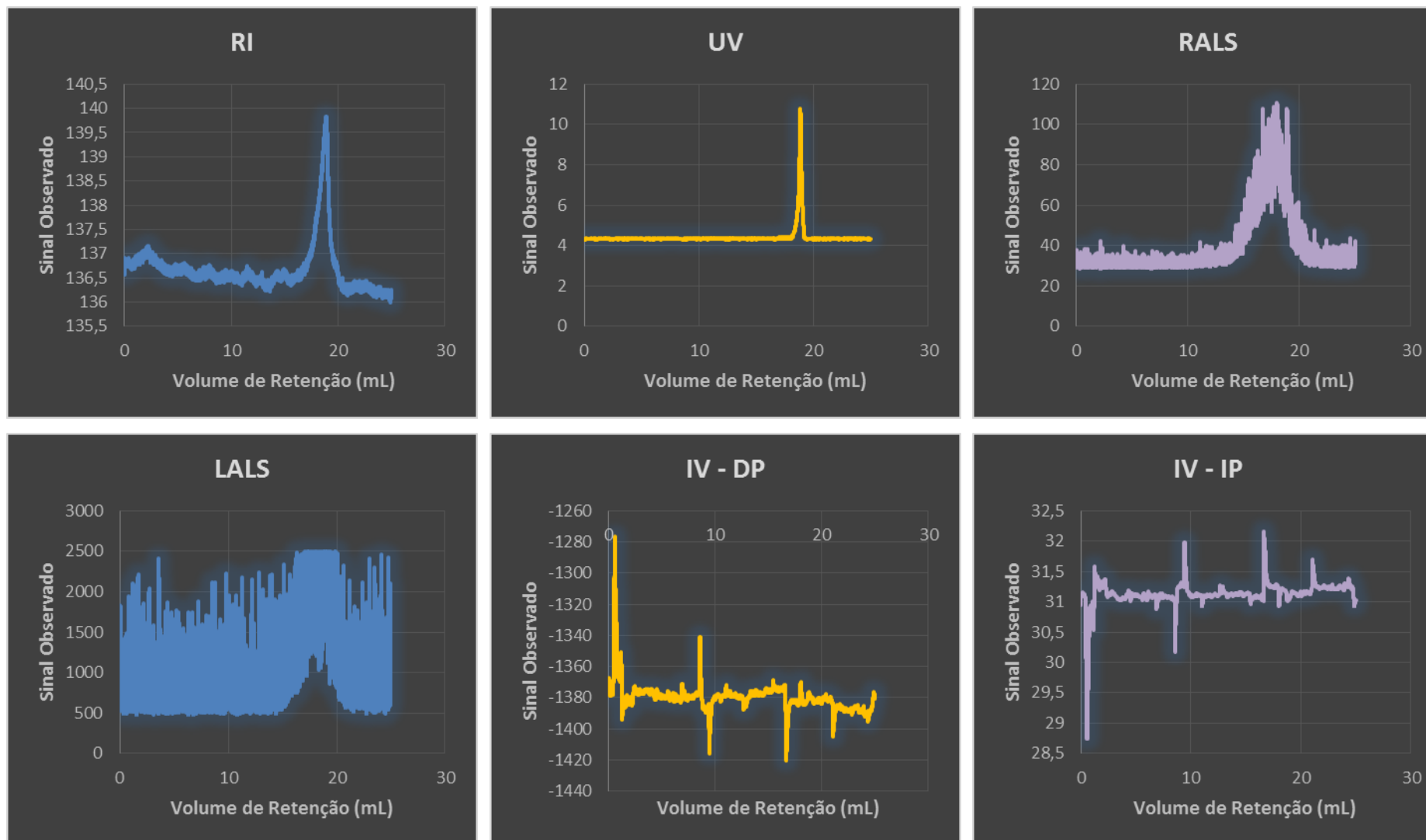
**Anexo 41:** Caracterização por GPC de uma solução contendo monômero DMAEMA.



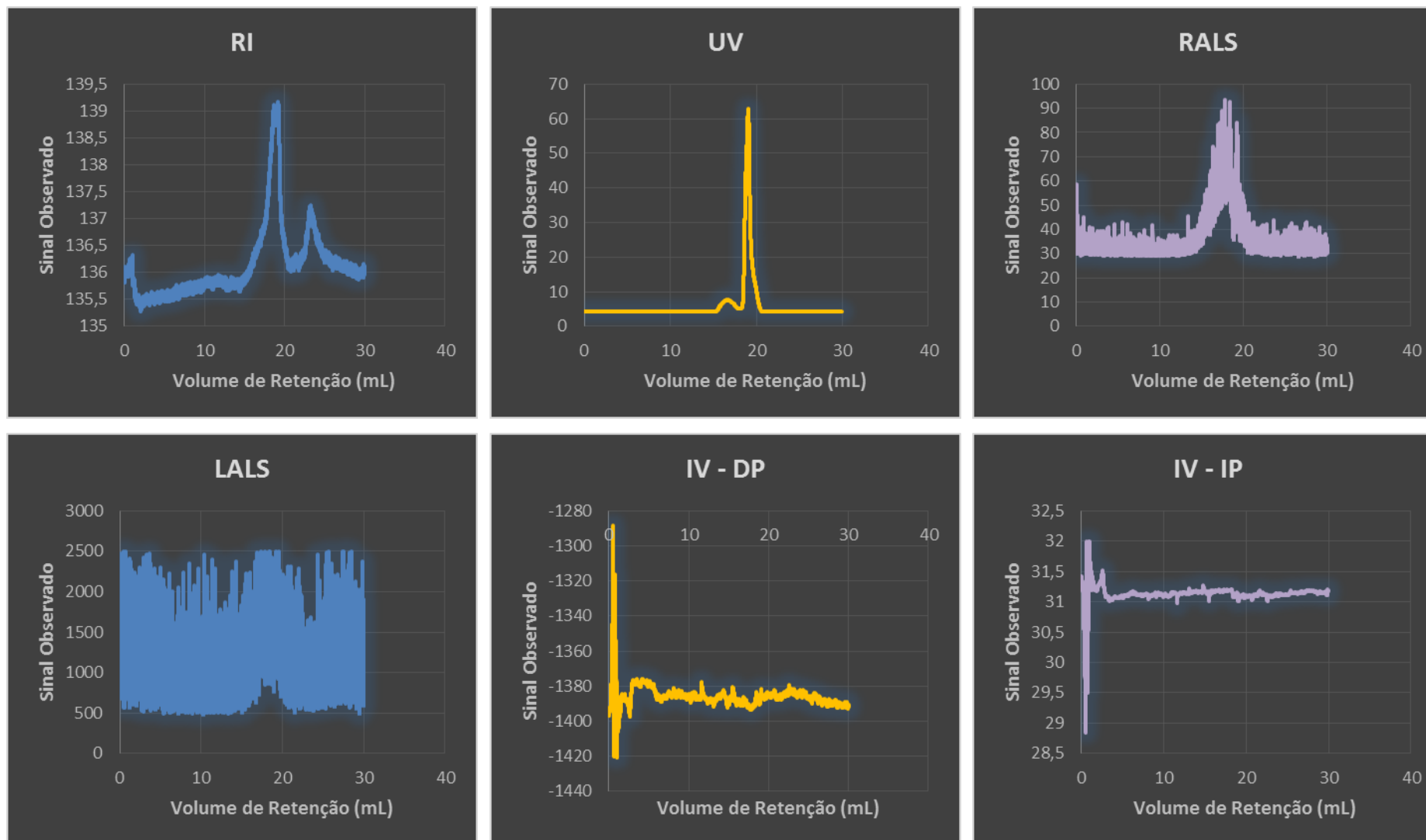
Anexo 42: Caracterização por GPC de uma amostra referente à libertação de BSA em HG12.



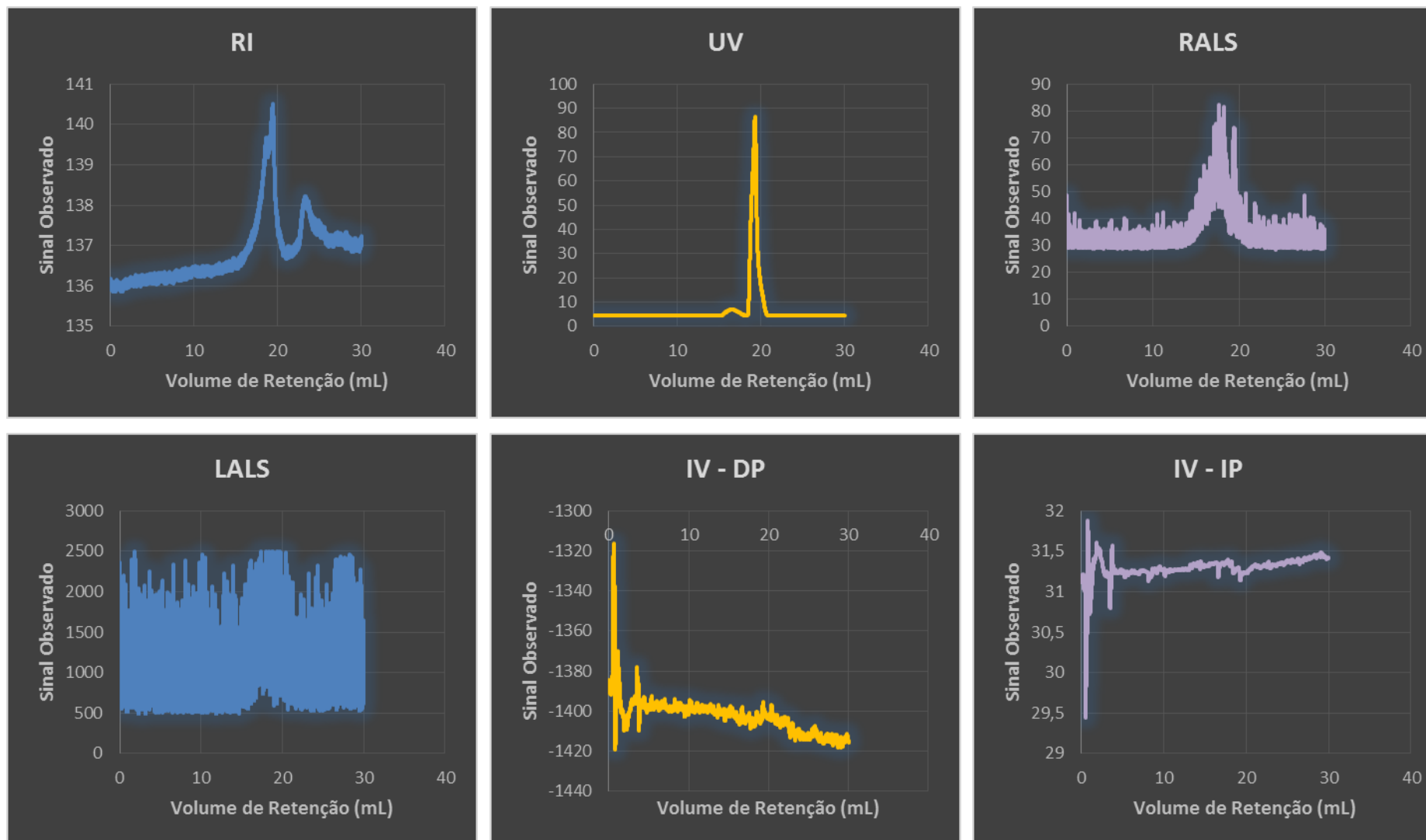
**Anexo 43:** Caracterização por GPC de uma amostra referente à libertação de BSA em HG13.



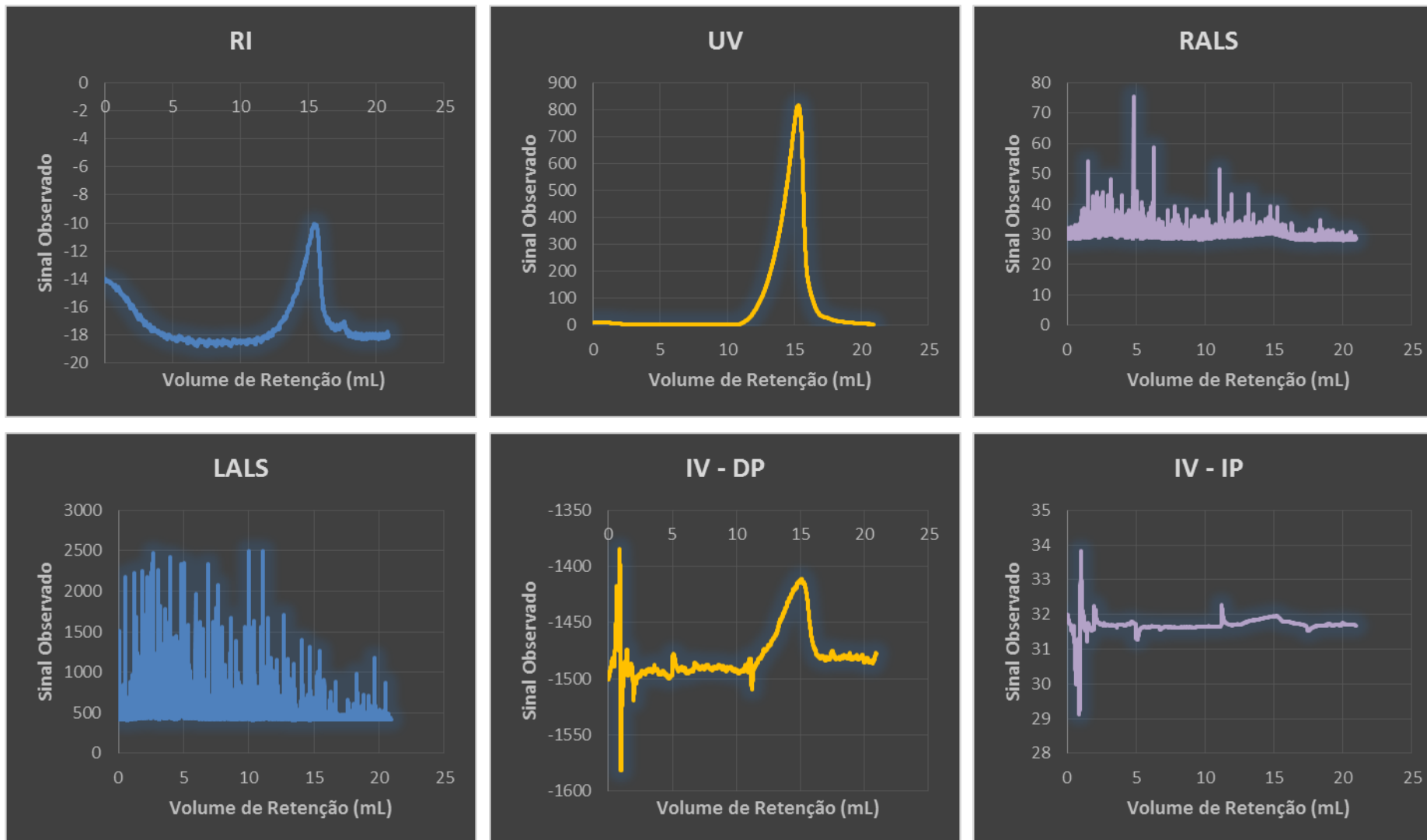
Anexo 44: Caracterização por GPC de uma amostra referente à libertação de BSA em HG14.



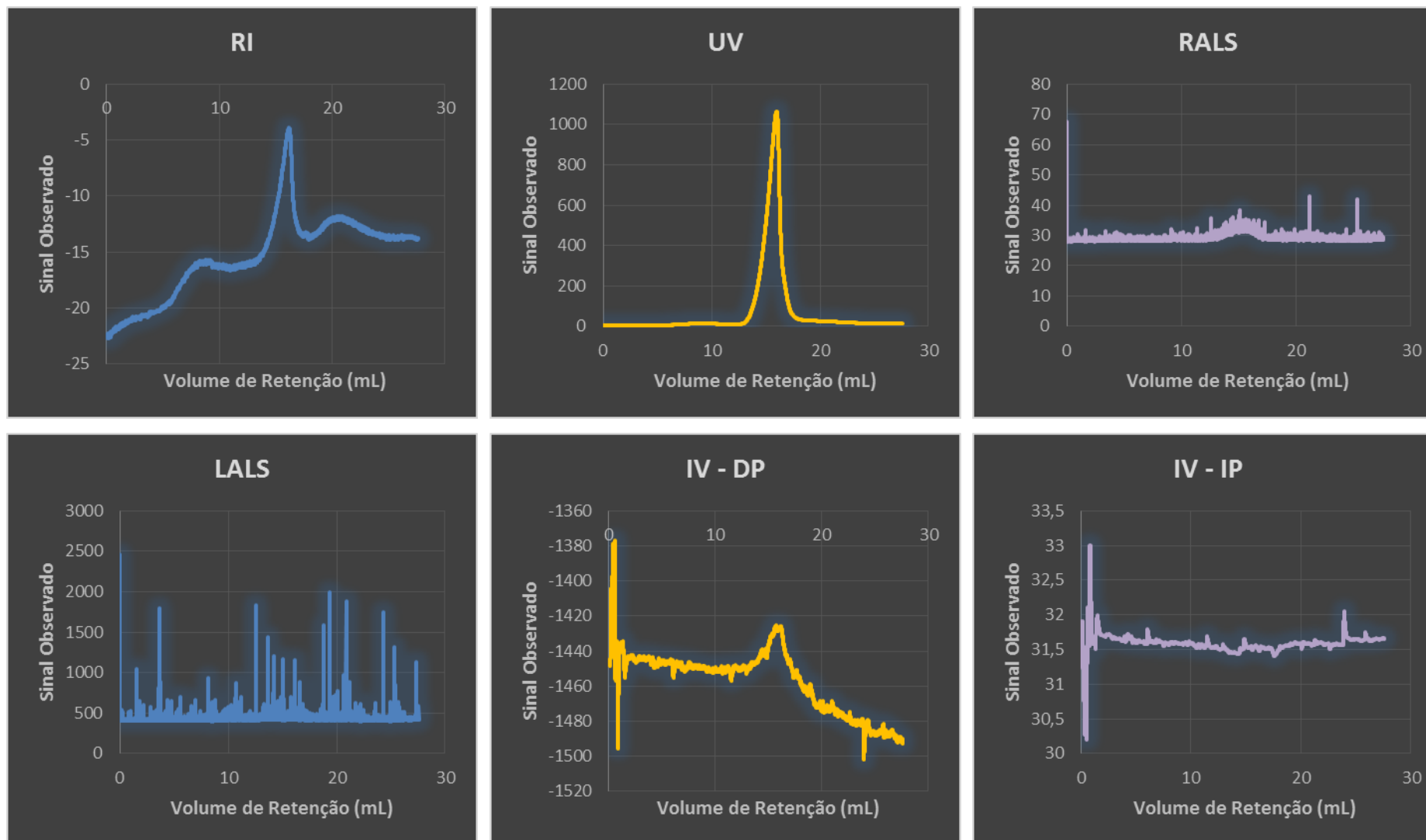
**Anexo 45:** Caracterização por GPC de uma amostra referente ao processo de purificação de HG15.



Anexo 46: Caracterização por GPC de uma solução aquosa de DNA (com filtração).



**Anexo 47:** Caracterização por GPC de uma solução aquosa de DNA (sem filtração).



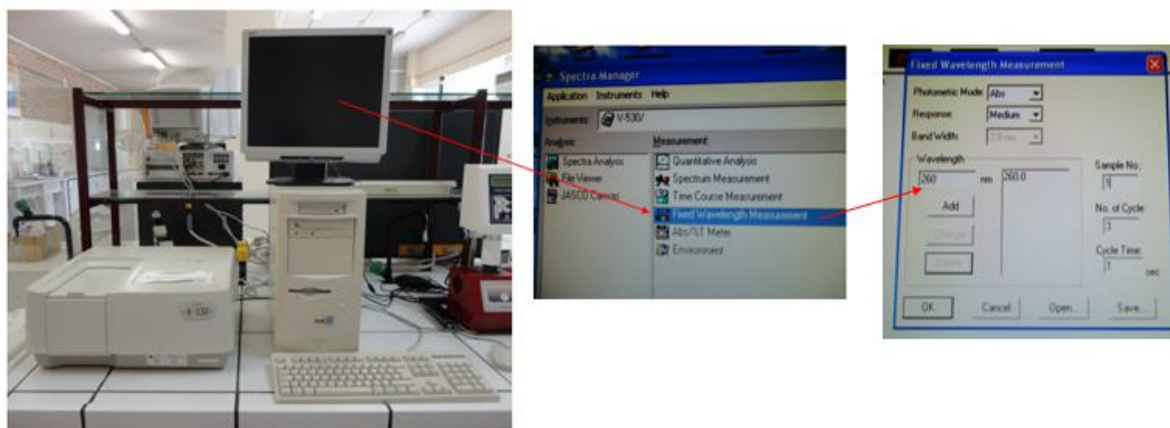
**Anexo 48:** Ilustração fotográfica do equipamento de GPC (detecção simultânea de quatro sinais) utilizado na análise de amostras.



**Anexo 49:** Ilustração fotográfica da coluna de fracionamento A2000 (opcional).



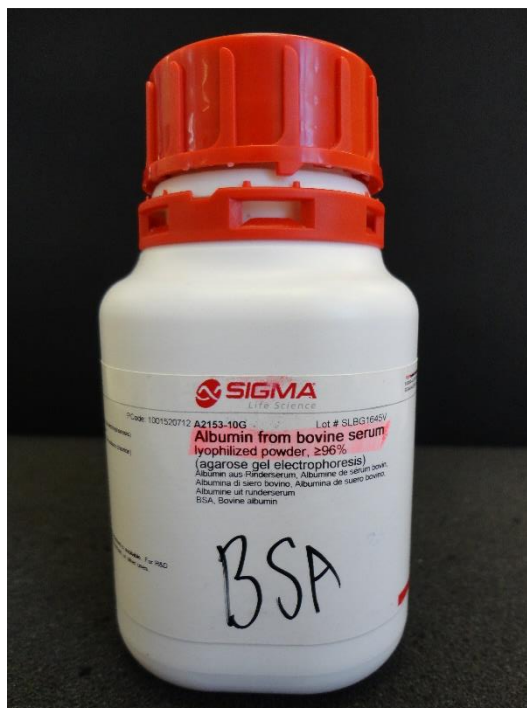
**Anexo 50:** Ilustração fotográfica do espectrofotômetro (UV-VIS V-530) da marca *JASCO* usado ao longo de todo o estudo na análise das amostras recolhidas bem como do software *SPECTRA MANAGER*.



**Anexo 51:** Ilustração fotográfica da balança analítica utilizada ao longo dos procedimentos experimentais. A pesagem rigorosa de todos os componentes utilizados na síntese dos hidrogéis é de extrema importância na obtenção de bons resultados. Também se pode visualizar as várias soluções de BSA utilizadas para a determinação da curva de calibração de BSA.



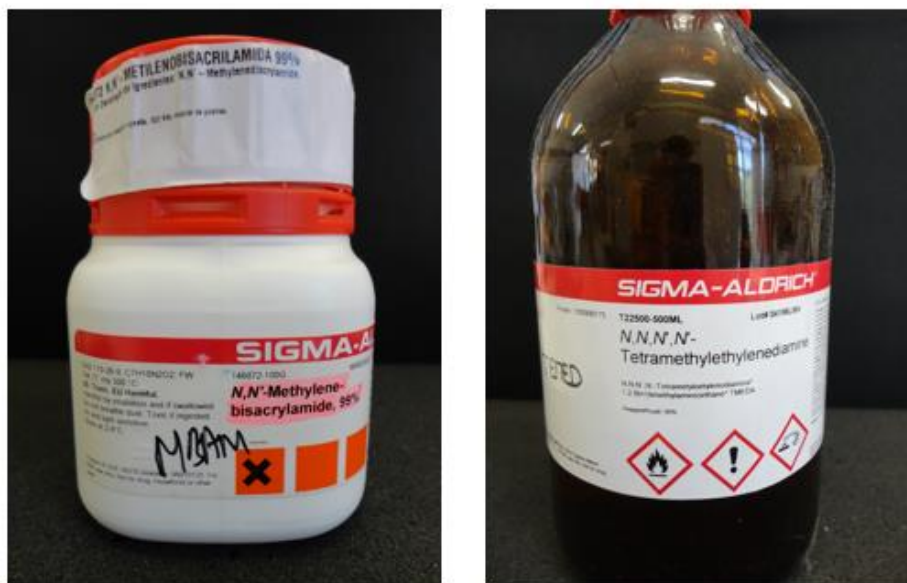
**Anexo 52:** Ilustração fotográfica da Albumina de Soro Bovino (BSA). Produto adquirido à Sigma Aldrich.



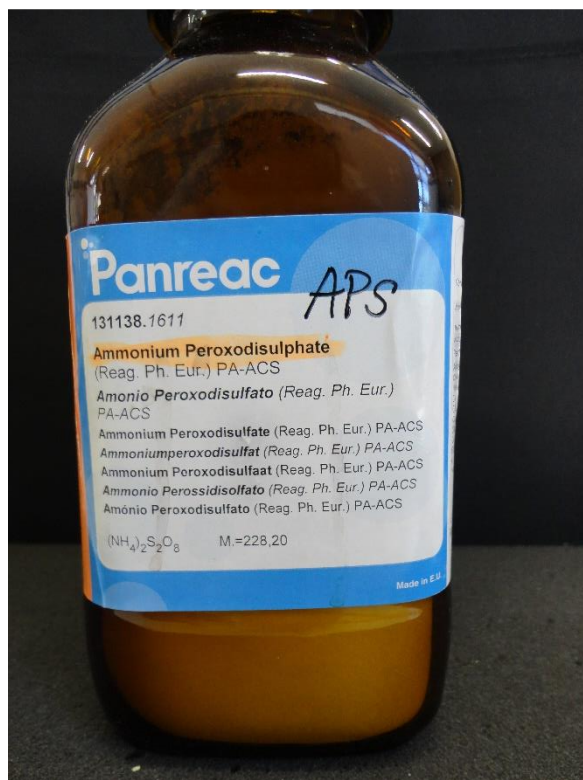
**Anexo 53:** Ilustração fotográfica do monómero NIPA. Monómero utilizado na síntese de hidrogéis sensíveis à temperatura. Produto adquirido à Sigma Aldrich.



**Anexo 54:** Ilustração fotográfica do reticulante (MBAm) e catalisador (TEMED), respectivamente, necessários na síntese de hidrogéis. Produtos adquiridos à Sigma Aldrich.

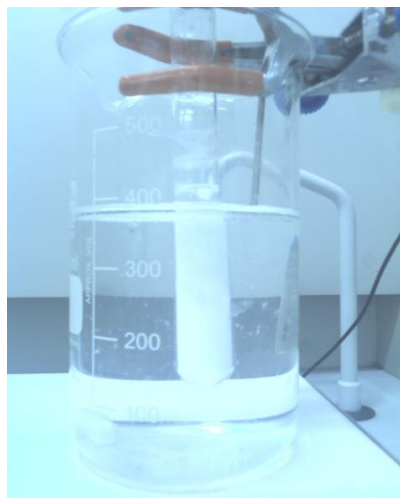


**Anexo 55:** Ilustração fotográfica do iniciador (APS) utilizado no processo de síntese de hidrogéis.





**Anexo 56:** Ilustração fotográfica do processo de borbulhamento do monômero com argônio durante a polimerização. Desta forma, realiza-se a remoção de  $O_2$  (que funciona como inibidor) de modo a manter o meio reacional desgasificado.



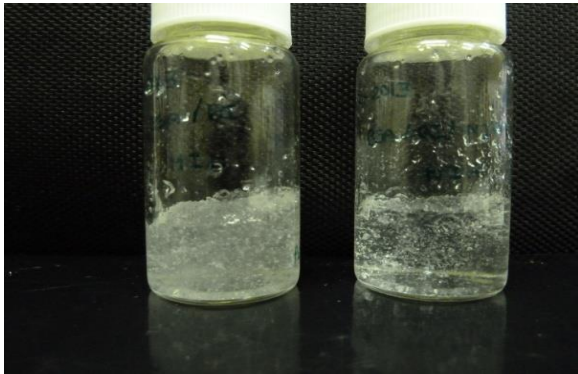
**Anexo 57:** Ilustração fotográfica do processo de síntese do hidrogel HG1 (BSA/NIPA) por FRP à temperatura de 25 °C.



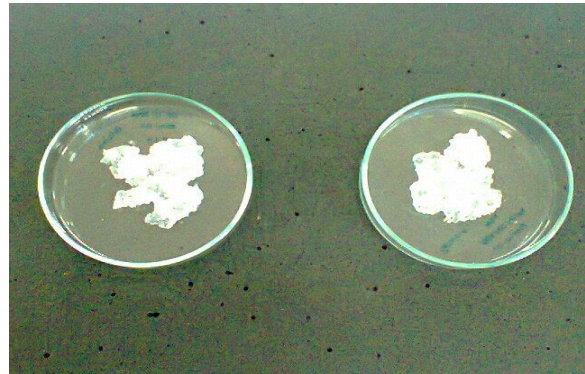
**Anexo 58:** Ilustração fotográfica de um material contendo BSA após a sua polimerização a 25 °C e com a adição de 100 mL de  $W_{DI}$ .



**Anexo 59:** Ilustração fotográfica do instrumento de vácuo no processo de filtragem do polímero.

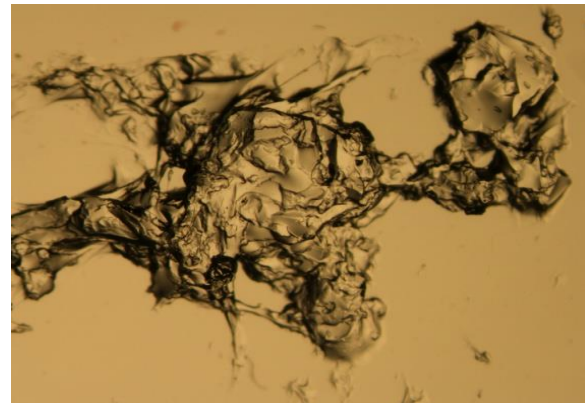
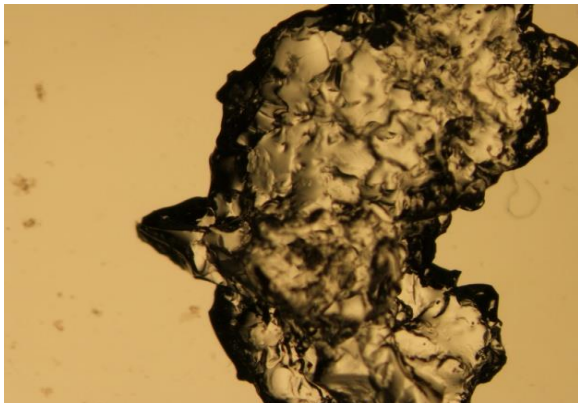


**Anexo 60:** Ilustração fotográfica dos polímeros MIH e NIH, respectivamente. Após inchamento em 10 mL de  $W_{DI}$  contendo BSA.



**Anexo 61:** Ilustração fotográfica dos polímeros MIH e NIH, respectivamente, após secagem depois de absorção de BSA.

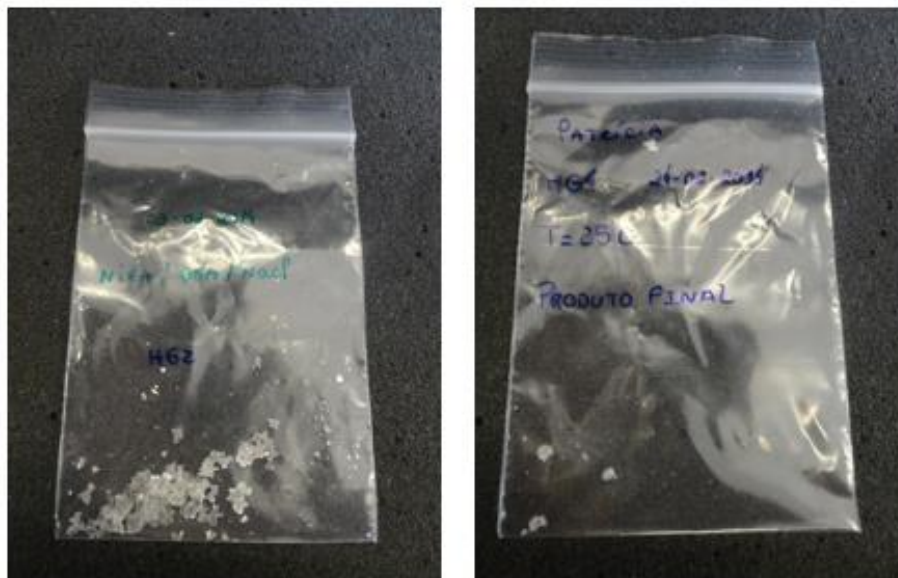
**Anexo 62:** Ilustração fotográfica dos polímeros MIH e NIH, respectivamente, obtidas por microscópio eletrônico antes de secagem para posterior libertação de BSA.



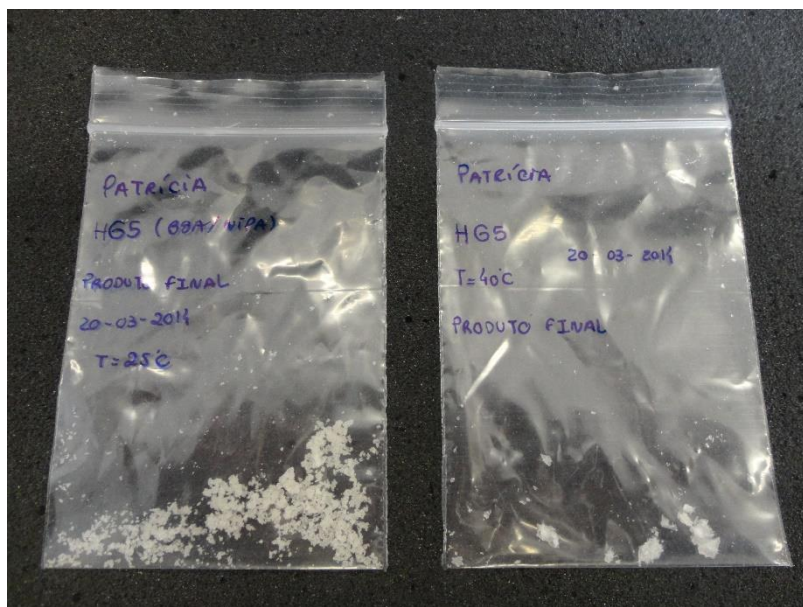
**Anexo 63:** Ilustração fotográfica do aspeto morfológico dos hidrogéis MIH (HG1) e NIH (HG3) sintetizados neste trabalho.



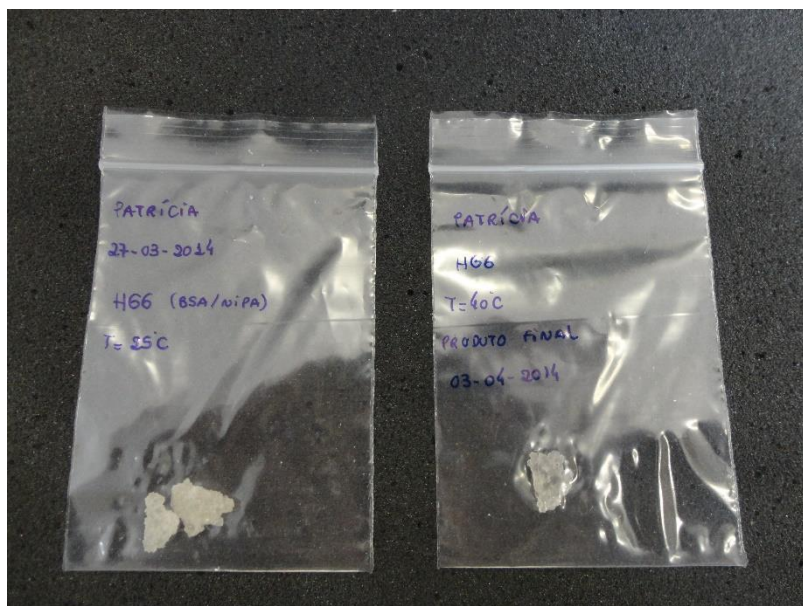
**Anexo 64:** Ilustração fotográfica do aspeto morfológico dos hidrogéis HG2 e HG4 sintetizados neste trabalho.



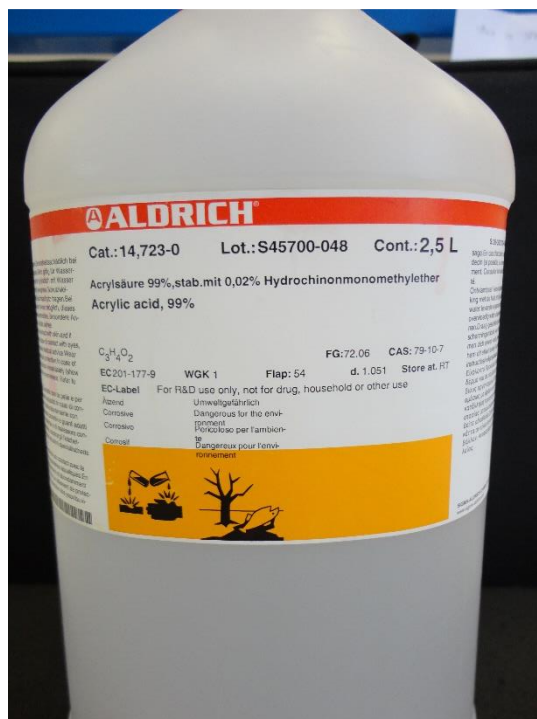
**Anexo 65:** Ilustração fotográfica do aspeto morfológico do hidrogel HG5 sintetizado neste trabalho. (Amostras após libertação a 25 e 40 °C, respetivamente).



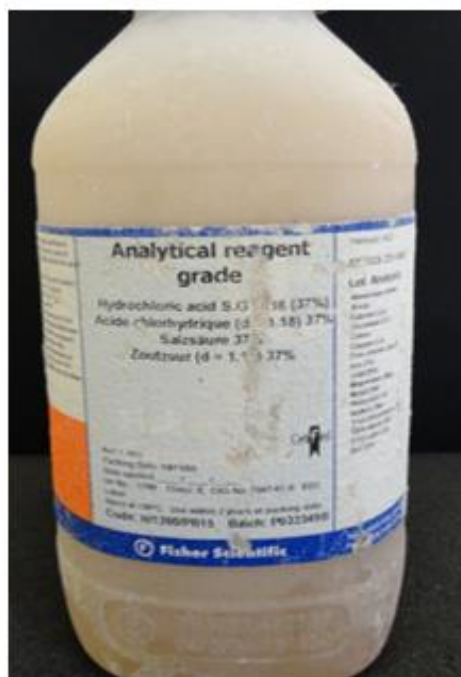
**Anexo 66:** Ilustração fotográfica do aspeto morfológico do hidrogel HG6 sintetizado neste trabalho. (Amostras após libertação a 25 e 40 °C, respetivamente).



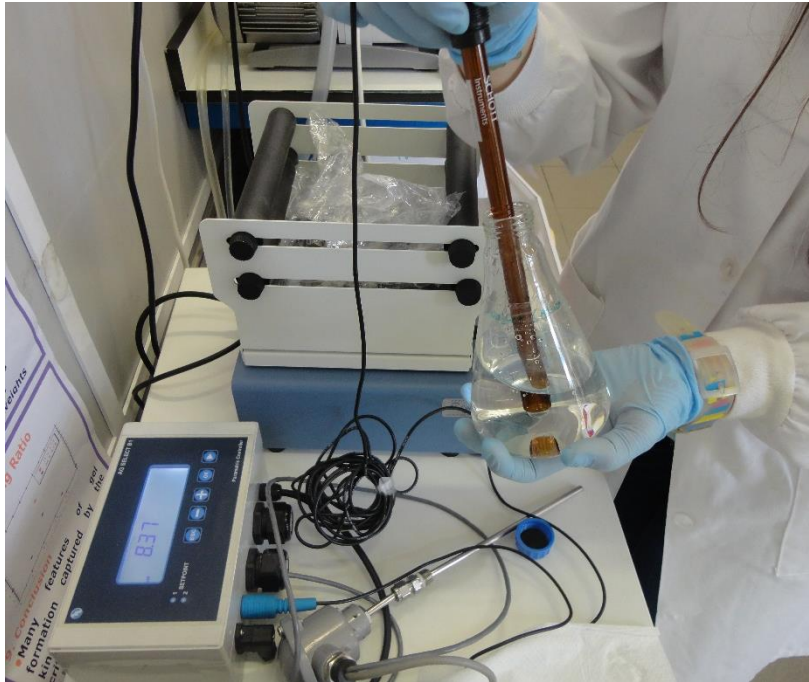
**Anexo 67:** Ilustração fotográfica do monômero AA. Monômero utilizado na síntese de hidrogéis sensíveis ao pH. Produto adquirido à Sigma Aldrich.



**Anexo 68:** Ilustração fotográfica do reagente ácido clorídrico (HCl) e soda caustica (NaOH), respectivamente, utilizados na síntese de hidrogéis aniônicos e na preparação de soluções-tampão ácidas e básicas.



**Anexo 69:** Ilustração fotográfica do processo de medição de pH das soluções com recurso a um elétrico de pH.



**Anexo 70:** Ilustração fotográfica do processo de libertação da BSA a partir de hidrogéis aniônicos quando colocados em soluções aquosas com diferentes valores de pH.



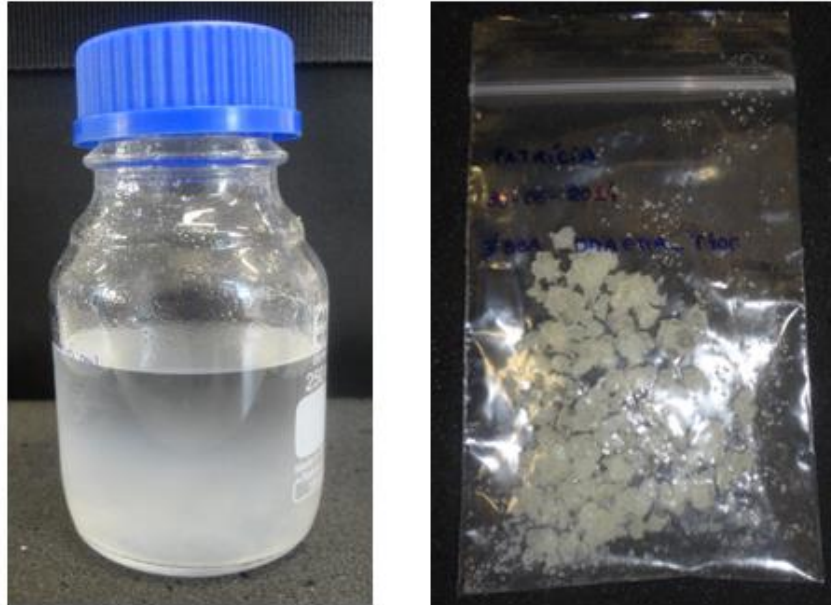
**Anexo 71:** Filtros utilizados nos testes de liberação controlada de agentes bioativos. São da marca *Whatman* com membrana de celulose, específicos para sistemas aquosos, e com porosidade de 0,45 micron.



**Anexo 72:** Ilustração fotográfica da centrífugadora utilizada na preparação de amostras.



**Anexo 73:** Aspeto morfológico do hidrogel HG15 (sem inclusão de BSA) quando colocado em metanol para purificação da rede (lado esquerdo) e aspeto do hidrogel depois de ser levado à estufa de vácuo a secar (lado direito).



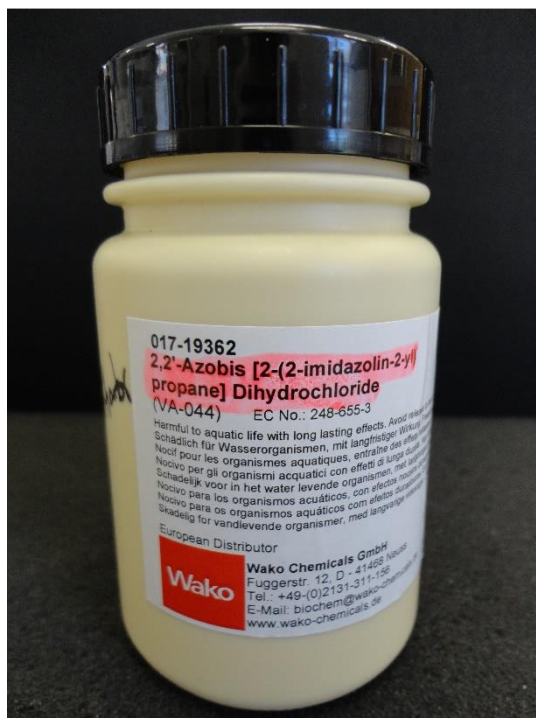
**Anexo 74:** Estufa de vácuo usada no processo de secagem de hidrogéis.



**Anexo 75:** Ilustração fotográfica do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) de salmão. Produto adquirido à Sigma Aldrich.



**Anexo 76:** Ilustração fotográfica do iniciador (VA044) utilizado no processo de síntese de hidrogéis.



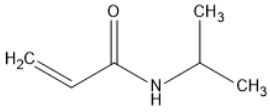
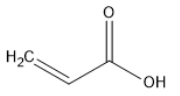
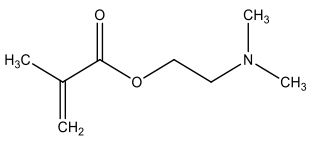
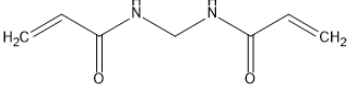
**Anexo 77:** Ilustração fotográfica dos reagentes utilizados na preparação de soluções-tampão.



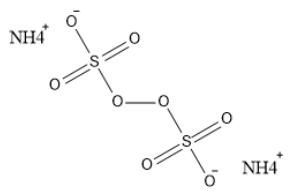
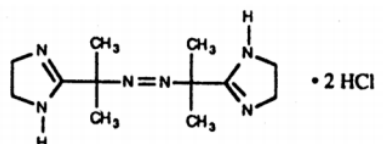
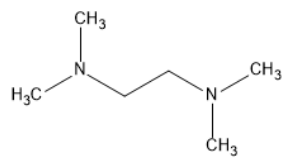
**Anexo 78:** Ilustração fotográfica da solução de HCl, solução de PDMAEMA protonada e do polímero pré-sintetizado seco, respetivamente.



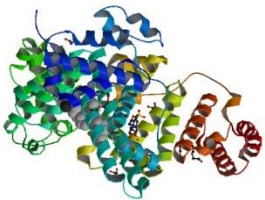
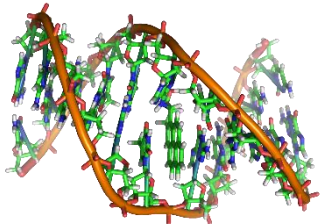
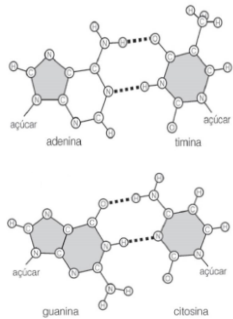
**Anexo 79:** Estruturas químicas e propriedades de monómeros e reticulantes usados na síntese de hidrogéis.

Monómeros e Reticulantes	Fórmula Química	Estrutura Química	Ponto de Ebulição (°C)	Ponto de Fusão (°C)	Massa Molecular (g/mol)	Densidade Relativa (a 25 °C)
NIPA	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO		89 - 92	60 - 63	113,16	-
AA	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		139	-	72,06	1,05
DMAEMA	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>		182 - 192	-	157,21	0,93
MBAm	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		-	> 300	154,17	-

**Anexo 80:** Estruturas químicas e propriedades dos iniciadores e catalisadores usados na síntese de hidrogéis.

Iniciadores e Catalisadores	Fórmula Química	Estrutura Química	Ponto de Ebulição (°C)	Ponto de Fusão (°C)	Massa Molecular (g/mol)	Densidade Relativa (a 25 °C)
APS	$H_8N_2O_8S_2$		-	-	228,20	1,980
VA044	$C_{12}H_{24}Cl_2N_6$		-	188-193	323,33	-
TEMED	$C_6H_{16}N_2$		120 - 122	-55	116,2	0,775

**Anexo 81:** Estruturas tridimensionais e propriedades das moléculas alvo utilizadas neste trabalho.

Moléculas Alvo	Estrutura Tridimensional	Bases Complementares	Massa Molecular (g/mol)	pH	Temperatura Fusão (°C)	Ponto Isoelétrico
BSA		-	66462	6,5-7,5	-	4,7-5,6
DNA de salmão		 <p>Diagram illustrating the complementary base pairing in DNA:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Adenina (top) pairs with Timina (top).</li> <li>Guanina (bottom) pairs with Citosina (bottom).</li> </ul>	$1,3 \times 10^6$	8,0	87,5	-

