

Ismael Casagrande Bellettini

**SÍNTESE DE POLIETILENOIMINAS RAMIFICADAS  
DECORADAS COM GRUPOS HIDROFÓBICOS E  
NUCLEOSÍDEOS E ESTUDOS DE SUA INTERAÇÃO COM  
DODECILSULFATO DE SÓDIO E DNA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edson Minatti

Co-orientador: Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado

Florianópolis

2012.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bellettini, Ismael Casagrande

Síntese de polietilenoiminas ramificadas decoradas com grupos hidrofóbicos e nucleosídeos e estudos de sua interação com dodecilsulfato de sódio e DNA [tese] / Ismael Casagrande Bellettini ; orientador, Edson Minatti ; co-orientador, Vanderlei Gageiro Machado. - Florianópolis, SC, 2012.

175 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Poli(etilenoimina) (PEI). 3. DNA. 4. Complexos DNA-PEI. 5. Interações polímero-surfactante. I. Minatti, Edson. II. Machado, Vanderlei Gageiro. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Ismael Casagrande Bellettini

**SÍNTESE DE POLIETILENOIMINAS RAMIFICADAS  
DECORADAS COM GRUPOS HIDROFÓBICOS E  
NUCLEOSÍDEOS E ESTUDOS DE SUA INTERAÇÃO COM  
DODECILSULFATO DE SÓDIO E DNA**

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de “Doutor” em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 23 de novembro de 2012.

---

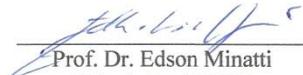
Prof. Dr. Almir Spinelli  
Coordenador do Programa

**Banca Examinadora:**



---

Prof. Dr. Fernando Carlos  
Giacomelli  
Relator (CCNH - UFABC)



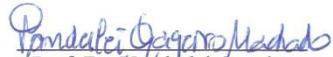
---

Prof. Dr. Edson Minatti  
Orientador (UFSC)



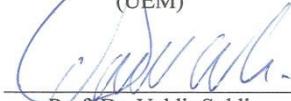
---

Prof. Dr. Edvani Muniz  
(UEM)



---

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro  
Machado  
Co-orientador (UFSC)



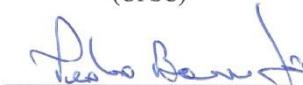
---

Prof. Dr. Valdir Soldi  
(UFSC)



---

Prof.ª Dr.ª Vera L.A. Frescura  
Bascañan  
(UFSC)



---

Prof. Dr. Pedro Luiz M. Barreto  
(UFSC)

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, professor Dr. Edson Minatti e ao meu co-orientador Dr. Vanderlei Gageiro Machado por terem me confiado este trabalho, por todos os conhecimentos transmitidos, e acima de tudo pela sincera amizade e apoio.

A banca examinadora formada pelos professores Dr. Fernando C. Giacomelli, Dr. Edvani Muniz, Dr. Valdir Soldi, Dr. Pedro L. M. Barreto e Dr<sup>a</sup>. Vera L. A. Frescura Bascuñan pelas sugestões expostas para a conclusão da presente tese.

A minha família, por todo amor, carinho e a confiança nesses anos.

A Fabiana, pelo amor, carinho, compreensão e muita paciência ao longo destes anos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádyá Pesce da Silveira por disponibilizar o aparelho de espalhamento de luz.

Ao Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos pelas discussões e disponibilizar o laboratório.

Aos amigos do Labbio.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), onde foram realizados os experimentos de SAXS.

Ao Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME), onde foram realizados os experimentos de difração de raios X.

Aos colegas e amigos dos laboratórios 205 e 305, por todos os auxílios prestados e pela amizade.

A Samira pela ajuda em algumas medidas de DLS.

Ao Marcelo Godoi pela ajuda com as reações com a uridina.

Aos colegas de Pós-Graduação.

A todos os professores, que de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado.

Ao Jadir, a Graça e a Rita pela amizade e serviços prestados.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A Universidade Federal de Santa Catarina.



## RESUMO

A poli(etilenoimina) (PEI) foi modificada por meio da alquilação com grupos *n*-alquila (*n* = 4, 6, 8 e 12 carbonos). O espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), tensão superficial, emissão de fluorescência do pireno, viscosidade e medidas de pH foram as técnicas usadas para investigar a conformação e agregação das PEIs hidrofobicamente modificadas em solução aquosa, na ausência e na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). Medidas de SAXS mostraram que o raio de giro diminui com o aumento do comprimento da cadeia alquílica, enquanto que os dados de viscosidade indicaram uma diminuição na viscosidade intrínseca. A PEI não modificada não apresentou atividade na superfície, enquanto as PEIs modificadas mostraram atividade pronunciada na superfície e presença de domínios hidrofóbicos. Na presença de SDS, o início da formação do complexo polímero-surfactante foi determinado, indicando uma diminuição na concentração de agregação crítica (*cac*) com o aumento no comprimento da cadeia alquílica substituída na PEI.

A PEI também foi decorada com o grupo uridina com dois graus de substituição (5% e 15%). A formação de complexos das PEIs, decoradas com uridina ou hidrofobicamente modificadas, com o DNA do timo de bezerro foi investigada através das técnicas de emissão de fluorescência do brometo de etídio, espectrofotometria de UV-Vis, dicróismo circular (CD), potencial zeta, viscosidade, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e SAXS, na ausência e na presença de SDS. Todas as PEIs apresentaram três etapas na formação de complexos com o DNA: a primeira, quando uma pequena quantidade de polieletrólito foi adicionada, as cadeias do DNA são parcialmente condensadas; a segunda, quando mais polieletrólito foi adicionado, apresenta complexos com densidade de carga nula, com tamanho micrométrico; a terceira, em concentrações mais altas da PEI, o DNA foi completamente condensado pelas cadeias das PEIs, formando complexos positivamente carregados com valores de  $R_{H,ap}$  na faixa de 51 a 88 nm. Análises de viscosidade e SAXS sugerem que o a PEI não modificada teve a interação mais forte e que melhor condensa o DNA.

**Palavras-chave:** PEI. DNA. Interação polímero-surfactante. Complexos DNA-PEI.



## ABSTRACT

The polyethylene imine (PEI) was modified by means of the alkylation with *n*-alkyl groups (*n* = 4, 6, 8 and 12 carbons). Small-angle X-ray scattering (SAXS), viscosity, surface tension, and pyrene fluorescence emission were then used as techniques to examine the conformation and aggregation of the hydrophobically modified PEIs in aqueous solution, in the absence and presence of sodium dodecylsulfate (SDS). Analysis of the SAXS data showed that the radius of gyration decreases with an increase in the alkyl chain length of the polymer, while the viscosity data indicated a decrease in the intrinsic viscosity under the same conditions. The nonmodified PEI was not surface active, while the hydrophobically modified samples showed pronounced surface activity and the presence of hydrophobic domains. On addition of SDS, the onset of the formation of polymer–surfactant complexes was determined, indicating a decrease in the critical aggregate concentration (*cac*) with an increase in the alkyl chain length of the polymer backbone.

The PEI also was decorated with uridine groups with two substitution degrees (5% and 15%). The complex formation of the decorated or hydrophobically modified PEI with calf thymus DNA was investigated through of the ethidium bromide fluorescence emission, UV-Vis spectrophotometry, circular dichroism (CD), potential zeta, viscosity, dynamic light scattering (DLS) and SAXS techniques, in the absence and presence of SDS. All versions of PEI showed three steps in complexes formation with DNA: first, when a small amount of polyelectrolyte was added, DNA chains were partially condensed; second, when more polyelectrolyte was added, the complexes had a null charge density and micrometric size; third, at higher concentration of PEI, the DNA was fully condensed by PEI chains, leading to positively charged complexes with  $R_{H,ap}$  values in the range of 51–88 nm. Viscosity and SAXS analyses suggested that the unmodified PEI had the stronger interaction and promoted the best DNA condensation.

**Keywords:** PEI. DNA. Polymer–surfactant interactions. DNA-PEI complexes.



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação estrutural da PEI em sua forma ramificada...	32
<b>Figura 2.</b> Estrutura em dupla hélice do DNA [23].	36
<b>Figura 3.</b> As conformações do DNA. Da direita para a esquerda: formas A, B e Z [23].	37
<b>Figura 4.</b> Ilustração da transfecção mediada por um polycation (Figura adaptada de <a href="http://www.nano-lifescience.com">www.nano-lifescience.com</a> ) [25].	39
<b>Figura 5.</b> Esquema da preparação de complexos poli-siRNA/PEI. A PEI catiônica condensa com a alta densidade de cargas negativas do poli-siRNA por interação iônica para formar complexos poli-siRNA/PEI em meio aquoso. Figura adaptada de Lee e colaboradores [35].	41
<b>Figura 6.</b> Etapas das associações polímero-surfactante.	44
<b>Figura 7.</b> Viscosidade reduzida vs. a concentração de polímero.	46
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do valor de $R_g$ para uma cadeia polimérica [48].	47
<b>Figura 9.</b> Regimes de concentrações para soluções de polímeros: solução diluída ( $c \ll c^*$ ); solução na concentração de sobreposição ( $c \cong c^*$ ); solução semidiluída ( $c \gg c^*$ ) [45].	48
<b>Figura 10.</b> Gráfico típico de tensão superficial à medida que a $c$ (surfactante) aumenta.	49
<b>Figura 11.</b> Representação das estruturas moleculares de duas sondas fluorescentes.	51
<b>Figura 12.</b> Espectros de emissão de fluorescência do pireno com o aumento da $c$ (surfactante).	52
<b>Figura 13.</b> Gráfico mostrando o perfil da curva $I_1/I_3$ versus $c$ (surfactante).	53

<b>Figura 14.</b> Um típico diagrama de Zimm. As linhas vermelhas são as extrapolações a ângulo zero e concentração zero.....	57
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática da dupla camada elétrica. Figura adaptada de <a href="http://www.malvern.com">www.malvern.com</a> [86]. .....	63
<b>Figura 16.</b> Estruturas da PEI e das PEIs hidrofobicamente modificadas. ....	69
<b>Figura 17.</b> Representação da estrutura molecular da uridina tosilada..	71
<b>Figura 18.</b> Estrutura da PEI decorada com a uridina. ....	72
<b>Figura 19.</b> Esquema da obtenção das PEIs alquiladas. ....	80
<b>Figura 20.</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da PEI (A) e PEI-C12 (B) (a, $\delta$ 0,85 ppm $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ; b, $\delta$ 1,23 ppm $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ; c, $\delta$ 1,45 ppm $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ; d, $\delta$ 2,38 ppm $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ).....	81
<b>Figura 21.</b> Tensão superficial em função da concentração da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●) a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .	83
<b>Figura 22.</b> Razão $I_1/I_3$ da emissão de fluorescência do pireno em função da concentração da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●). A concentração de pireno foi de $1,0 \times 10^{-6}$ mol $\text{L}^{-1}$ , a excitação ocorreu em 336,0 nm e as aberturas das fendas foram ajustadas para 2,5 nm a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .....	84
<b>Figura 23.</b> Influência da concentração dos polímeros na viscosidade específica a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ para soluções aquosas da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●). ....	85
<b>Figura 24.</b> Influência da adição de SDS no pH de soluções aquosas da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●), $c(\text{polímero}) = 2,0$ mg $\text{mL}^{-1}$ a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .....	87

**Figura 25.** Influência na razão  $I_1/I_3$  da emissão de fluorescência do pireno em soluções aquosas da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●), ( $c(\text{polímero}) = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em função da concentração de SDS a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ..... 88

**Figura 26.** Dependência angular da intensidade de SAXS para a PEI (A) e a PEI-C12 (B) na ausência (●) de SDS e na presença de 5,0 (○), 10,0 (■) e 20,0 (□)  $\text{mmol L}^{-1}$  de SDS. A concentração para cada polímero foi de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . As inserções mostram a região de Guinier. .... 91

**Figura 27.** Curvas de Kratky para a PEI (A) e a PEI-C12 (B) na ausência (●) e na presença de 5,0 (○), 10,0 (■) e 20,0 (□)  $\text{mmol L}^{-1}$  de SDS. A concentração para cada polímero foi de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . .... 94

**Figura 28.** Representação esquemática dos passos envolvidos na associação dos polímeros modificados com SDS. .... 95

**Figura 29.** (A) Espectros de emissão de fluorescência do BE em solução aquosa em diferentes concentrações de DNA e (B) influência da  $c(\text{DNA})$  sobre os valores da intensidade de emissão de fluorescência do BE em 594 nm. Manteve-se a concentração de BE constante em  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $25,0^\circ\text{C}$ ..... 98

**Figura 30.** Espectros de emissão de fluorescência do BE *versus* comprimento de onda em diferentes valores de  $c(\text{PEI})$  ( $0,0 - 35,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e  $c(\text{DNA})$  constante em  $25,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , que estão representados nas razões de N/P (DNA-PEI) (A). Gráfico de  $I_{594\text{nm}}$  *versus* razão N/P dos complexos DNA-PEI (B) (a linha foi traçada somente com o propósito de servir como orientação). Manteve-se a concentração de BE constante em  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $25,0^\circ\text{C}$ ..... 99

**Figura 31.** (A) Espectros de UV-Vis para DNA-PEI nas razões N/P 0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 conforme as legendas indicadas. (B) Espectros de UV-Vis para DNA-PEI nas razões N/P 1,8; 2,4 e 3,0 conforme as legendas indicadas. (C) Espectros de UV-Vis para DNA-PEI nas razões N/P 3,6; 4,2; 4,8; 5,4; 6,0; 7,5; 9,0 e 10,5, conforme as legendas indicadas. .... 101

- Figura 32.** Curva da absorção máxima ( $A_{260nm}$ ) em função de diferentes razões N/P para os complexos DNA-PEI..... 102
- Figura 33.** Curvas de desnaturação térmica para o DNA puro (■), e para o DNA-PEI nas razões N/P 0,3 (●) e 6,0 (▲)..... 103
- Figura 34.** Espectros de CD para o DNA e diferentes razões N/P para o sistema DNA-PEI conforme as legendas indicadas. .... 105
- Figura 35.** Valores de  $\zeta$  (mV) determinados em diferentes razões N/P para o sistema DNA-PEI. A linha pontilhada indica o valor para o potencial zeta igual a zero. A linha cheia serve apenas como guia para orientação..... 106
- Figura 36.** Curva de  $\eta_{rel}$  em função da razão N/P para o sistema DNA-PEI a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação..... 108
- Figura 37.** Curvas de função de autocorrelação normalizadas para diferentes razões N/P de DNA-PEI, 0,3 (■), 0,75 (●), 1,5 (▲), 3,0 (▼), 4,5 (▶) e 6,0 (◀) em um ângulo fixo de  $90^\circ$ . Foram feitos ajustes exponenciais a todos os conjuntos de pontos experimentais..... 109
- Figura 38.** (A) Curvas da função de correlação normalizadas para DNA-PEI na razão N/P = 6,0 para diferentes ângulos de espalhamento, a  $25,0^\circ\text{C}$ ; (B) Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de correlação do DLS para DNA-PEI na razão N/P = 6,0. .... 112
- Figura 39.** Compilação dos dados obtidos da interação DNA-PEI em função de diferentes razões N/P por meio das técnicas de DLS, viscosidade, potencial zeta, UV-Vis e fluorescência. As linhas pontilhadas na vertical foram acrescentadas à Figura para permitir uma melhor comparação entre os dados obtidos pelas diferentes técnicas. A linha pontilhada na horizontal aponta a faixa em que ocorre a inversão no valor de potencial zeta. As linhas cheias servem somente como guia para orientar a observação..... 114

- Figura 40.** Curvas de  $I_{594\text{nm}}$  versus razão N/P para a PEI-C4 (A), PEI-C6 (B), PEI-C8 (C) e PEI-C12 (D). Manteve-se a concentração de BE em  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação. .... 116
- Figura 41.** Curvas de  $A_{260\text{nm}}$  em função da razão N/P para os sistemas DNA-PEI-C4 (A), DNA-PEI-C6 (B), DNA-PEI-C8 (C) e DNA-PEI-C12 (D). .... 118
- Figura 42.** Espectros de CD para o DNA e diferentes razões N/P pela adição de PEI-C12 ao meio, conforme as legendas indicadas. .... 120
- Figura 43.** Valores de  $\zeta$  (mV) determinados em diferentes razões N/P para os sistemas de DNA-PEI-C4 (A), DNA-PEI-C6 (B), DNA-PEI-C8 (C) e DNA-PEI-C12 (D). A linha cheia serve apenas como guia para orientação. .... 121
- Figura 44.** Curvas de  $\eta_{\text{rel}}$  em função da razão N/P para os sistemas de DNA-PEI-C4 (A), DNA-PEI-C6 (B), DNA-PEI-C8 (C) e DNA-PEI-C12 (D) a  $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação. .... 123
- Figura 45.** Esquemas das sínteses do grupo uridinil com a PEI. .... 127
- Figura 46.** Curvas de  $I_{594\text{nm}}$  versus razão N/P para a PEI-Uri5% (A) e PEI-Uri15% (B). Manteve-se a concentração de BE em  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação. .... 129
- Figura 47.** Curvas de  $A_{260\text{nm}}$  em função de N/P para os complexos de DNA-PEI-Uri5% (A) e DNA-PEI-Uri15% (B). .... 130
- Figura 48.** Espectros de CD para o DNA e diferentes razões de N/P para o sistema DNA-PEI-Uri15% conforme legenda indicado no gráfico. .... 132
- Figura 49.** Valores de  $\zeta$  (mV) determinados em diferentes razões de N/P para os sistemas de DNA-PEI-Uri5% (A) e DNA-PEI-Uri15% (B). A linha cheia serve apenas como guia para orientação. .... 133

**Figura 50.** Curvas de  $\eta_{rel}$  em função da razão de N/P para os sistemas de DNA-PEI-Uri5% (A) e DNA-PEI-Uri15% (B) a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação..... 134

**Figura 51.** Curvas de função de autocorrelação normalizadas para DNA-PEI-Uri5% (A) nas razões N/P 0,3 (■), 3,0 (●), 6,0 (▲) e 7,5 (▼) e DNA-PEI-Uri15% (B) nas razões N/P 0,3 (■), 3,0 (●), 6,0 (▲), 7,5 (▼) e 9,0 (▶) em um ângulo fixo de  $90^\circ$ . Foram feitos ajustes exponenciais a todos os conjuntos de pontos experimentais..... 135

**Figura 52.** (A) Curvas da função de correlação normalizadas para DNA-PEI-Uri15% na razão N/P = 9,0 para diferentes ângulos de espalhamento. (B) Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de correlação do DLS para DNA-PEI-Uri15% na razão N/P = 9,0. .... 138

**Figura 53.** Dependência angular da intensidade de SAXS dos complexos DNA-PEI (A) e DNA-PEI-C12 (B) nas razões N/P: 0,3 (■), 1,2 (●), 3,0 (▲), 6,0 (▼) e 9,0 (▶). Medidas de SAXS dos complexos DNA-PEI-Uri15% (C) nas razões N/P: 0,3 (■), 1,8 (●), 4,5 (▲), 6,0 (▼) e 10,5 (▶)..... 140

**Figura 54.** Curvas de  $I_{594nm}$  versus razão N/P. (A) PEI (■) e PEI + SDS (●); (B) PEI-C12 (■) e PEI-C12 + SDS (●); e (C) PEI-Uri15% (■) e PEI-Uri15% + SDS (●). A  $c(\text{SDS})$  utilizada foi fixada em  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS. A linha cheia serve apenas como guia para orientação..... 142

**Figura 55.** Gráficos de  $A_{260nm}$  versus razão N/P para o DNA-PEI (A), DNA-PEI-C12 (B) e DNA-PEI-Uri15% (C), na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS..... 144

**Figura 56.** Valores de potencial zeta versus razão N/P para o DNA-PEI (A), DNA-PEI-C12 (B) e DNA-PEI-Uri15% (C), na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS. As linhas cheias servem apenas como guia para orientação..... 146

**Figura 57.** Valores de viscosidade relativa *versus* razão N/P para o DNA-PEI (A), DNA-PEI-C12 (B) e DNA-PEI-Uri15% (C), na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação..... 148

**Figura 58.** Modelo das etapas de interação da PEI com o DNA. .... 151



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores para a viscosidade intrínseca $[\eta]$ e concentração de sobreposição ( $c^*$ ) para os PEIs a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .....	86
<b>Tabela 2.</b> Valores de $cac$ para sistemas da PEI e PEIs modificadas com SDS, obtidos por fluorescência do pireno, para $c(\text{polímero}) = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .....	89
<b>Tabela 3.</b> Valores de raio de giro para a PEI e PEIs modificadas obtidos pela aproximação de Guinier.....	92
<b>Tabela 4.</b> Valores de $dn/dc$ para as PEIs a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .....	93
<b>Tabela 5.</b> Valores de $R_{H,ap}$ determinados para diferentes razões N/P de DNA-PEI.....	111
<b>Tabela 6.</b> Valores de $T_m$ determinados para o DNA puro e os sistemas DNA-PEIs alquiladas. ....	119
<b>Tabela 7.</b> Valores de $R_{H,ap}$ determinados para diferentes razões N/P de DNA-PEI-C4, DNA-PEI-C6, DNA-PEI-C8 e DNA-PEI-C12. As linhas sombreadas indicam a região da formação de complexos com tamanho micrométrico.....	125
<b>Tabela 8.</b> Valores de $T_m$ determinados para o DNA puro e os sistemas DNA-PEIs decoradas com uridina. ....	131
<b>Tabela 9.</b> Valores de $R_{H,ap}$ determinados para diferentes razões N/P de DNA-PEI-Uri5% e DNA-PEI-Uri15%. A região sombreada indica a formação de complexos com tamanho micrométrico.....	136
<b>Tabela 10.</b> Valores de $R_{H,ap}$ determinado para diferentes razões N/P de DNA-PEI-SDS, DNA-PEI-C12-SDS e DNA-PEI-Uri15%-SDS. A região sombreada indica a formação de complexos com tamanho micrométrico. ....	150



## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Absorbância
$A_2$	Segundo coeficiente virial
$A_3$	Terceiro coeficiente virial
BE	Brometo de etídio
$c$	Concentração
$c^*$	Concentração de sobreposição ( <i>overlap</i> )
$cac$	Concentração de agregação crítica
CD	Dicroísmo circular
$CH_2Cl_2$	Diclorometano
$CHCl_3$	Clorofórmio
$cmc$	Concentração micelar crítica
$D$	Coeficiente de difusão
$D_0$	Coeficiente de difusão a diluição infinita
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
$dn/dc$	Taxa de incremento do índice de refração com a concentração do soluto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
$Et_3N$	Trietilamina
EtBr	Brometo de etídio
$HC(OCH_3)_3$	<i>orto</i> -formiato de trimetila
$I(q)$	Intensidade de espalhamento
$I_1$	Intensidade de fluorescência do pireno obtido em 372,8 nm
$I_3$	Intensidade de fluorescência do pireno obtido em 384,0 nm
$K_2CO_3$	Carbonato de potássio
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
$M_w$	Massa molar média ponderal
$n$	Índice de refração
$N$	Número de partículas
N/P	Razão nitrogênio/fosfato
$N_A$	Constante de Avogadro
$P(\theta)$	Fator de forma
PEI	Poli(etilenoimina)
PEI-C12	Poli(etilenoimina) decorada com grupos dodecil

PEI-C4	Poli(etilenoimina) decorada com grupos butil
PEI-C6	Poli(etilenoimina) decorada com grupos hexil
PEI-C8	Poli(etilenoimina) decorada com grupos octil
PEI-Uri	Poli(etilenoimina) decorada com grupos uridina
PPTS	<i>p</i> -toluenossulfonato de piridínio
<i>p</i> <sub>sp</sub>	Ponto de saturação do polímero
Py	Pireno
<i>q</i>	Vetor de espalhamento
<i>r</i>	Distância entre a partícula e o detector
<i>R</i> <sub>g</sub>	Raio de giro
<i>R</i> <sub>H,ap</sub>	Raio hidrodinâmico aparente
<i>R</i> <sub>H,real</sub>	Raio hidrodinâmico real
RNA	Ácido ribonucléico
<i>R</i> <sub>θ</sub>	Razão de Rayleigh
<i>S</i> ( <i>q</i> )	Fator de estrutura
SAXS	Espalhamento de raios X a baixos ângulos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SLS	Espalhamento de luz estático
<i>T</i>	Temperatura termodinâmica
THF	Tetraidrofurano
<i>T</i> <sub>m</sub>	Temperatura de fusão
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TsCl	Cloreto de tosila
<i>t</i> <sub>solução</sub>	Tempo de escoamento da solução
<i>t</i> <sub>solvente</sub>	Tempo de escoamento do solvente
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
<i>α</i>	Constante de proporcionalidade ou polarizabilidade
<i>γ</i>	Tensão superficial
<i>δ</i>	Deslocamento químico
<i>ε</i>	Absortividade molar
<i>ζ</i>	Potencial zeta
<i>θ</i>	Ângulo
<i>λ</i>	Comprimento de onda
<i>τ</i>	Tempo de decaimento
<i>Γ</i>	Frequencia de relaxação
<i>η</i> <sub>esp</sub>	Viscosidade específica
<i>η</i> <sub>red</sub>	Viscosidade reduzida
<i>η</i> <sub>rel</sub>	Viscosidade relativa
<i>η</i> <sub>solução</sub>	Viscosidade da solução

$\eta_{\text{solvente}}$   
[ $\eta$ ]

Viscosidade do solvente  
Viscosidade intrínseca



## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	29
1. INTRODUÇÃO .....	29
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
1.1.1. Polieletrólitos .....	30
1.1.2. Poli(etilenoimina) (PEI).....	31
1.1.3. PEI modificada.....	33
1.1.4. A estrutura do DNA .....	36
1.1.5. Interação da PEI modificada com DNA e RNA.....	37
1.1.6. Surfactantes e Micelas.....	41
1.1.7. Interação polímero-surfactante.....	42
1.1.8. Caracterização e estudos do comportamento de sistemas poliméricos em solução.....	44
1.1.8.1. Viscosidade.....	44
1.1.8.2. Tensão superficial .....	48
1.1.8.3. Fluorescência .....	49
1.1.8.4. Espalhamento de luz .....	53
1.1.8.4.1. Espalhamento de luz estático (SLS) .....	54
1.1.8.4.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	57
1.1.8.4.3. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).....	59
1.1.8.5. Espectrofotometria de absorção Ultravioleta e Visível (UV-Vis) .....	60
1.1.8.6. Dicroísmo circular .....	61
1.1.8.7. Potencial zeta .....	62
1.2. OBJETIVOS .....	65
1.2.1. Objetivos Gerais.....	65

1.2.2.	Objetivos Específicos.....	65
CAPÍTULO II.....		67
2.	METODOLOGIA.....	67
2.1.	REAGENTES E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS .....	67
2.2.	MODIFICAÇÃO DA PEI .....	68
2.2.1.	Preparação das PEIs alquiladas.....	68
2.2.2.	Síntese da PEI decorada com o grupo uridinil.....	69
2.2.2.1.	Síntese da uridina tosilada .....	69
2.2.2.2.	Síntese da PEI decorada com o grupo uridinil.....	71
2.3.	CARACTERIZAÇÃO.....	72
2.3.1.	Viscosidade.....	72
2.3.2.	Tensiometria .....	73
2.3.3.	Fluorescência .....	73
2.3.4.	Medidas de pH.....	74
2.3.5.	Medidas de DLS .....	75
2.3.6.	Medidas de SAXS.....	75
2.3.7.	Espectrofotometria de UV-Vis.....	76
2.3.8.	Potencial zeta .....	76
2.3.9.	Medidas de CD .....	77
CAPÍTULO III.....		79
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	79
3.1.	PROPRIEDADES DAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE PEIS HIDROFOBICAMENTE MODIFICADAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE SDS.....	79
3.1.1.	Síntese e caracterização .....	80
3.1.2.	Tensão superficial e fluorescência das PEIs na ausência de SDS.....	82
3.1.3.	Viscosidade das PEIs na ausência de SDS.....	85

3.1.4.	Influência do SDS sobre o pH em soluções aquosas das PEIs.....	86
3.1.5.	Fluorescência das PEIs na presença de SDS .....	88
3.1.6.	SAXS das PEIs na ausência e na presença de SDS.....	90
3.2.	ESTUDO DAS PROPRIEDADES DAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE DNA NA PRESENÇA DE PEI .....	97
3.2.1.	Ensaio por meio da técnica de fluorescência.....	97
3.2.2.	Espectrofotometria de UV-Vis.....	100
3.2.3.	Estudos da interação da PEI com o DNA usando a técnica de dicroísmo circular.....	104
3.2.4.	Potencial zeta .....	105
3.2.5.	Viscosidade .....	107
3.2.6.	Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	108
3.2.7.	Comparação dos resultados obtidos com as diferentes técnicas utilizadas.....	113
3.3.	ESTUDO DAS PROPRIEDADES DAS SOLUÇÕES DE DNA NA PRESENÇA DE PEIS DECORADAS COM GRUPOS HIDROFÓBICOS OU COM URIDINA .....	115
3.3.1.	Interação em meio aquoso de DNA com PEIs hidrofobicamente modificadas .....	115
3.3.1.1.	Ensaio por meio da técnica de fluorescência....	115
3.3.1.2.	Espectrofotometria de UV-Vis.....	117
3.3.1.3.	Dicroísmo Circular.....	119
3.3.1.4.	Potencial zeta .....	120
3.3.1.5.	Viscosidade.....	122
3.3.1.6.	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	123
3.3.2.	Interação em meio aquoso de DNA com PEIs decoradas com uridina .....	127
3.3.2.1.	Síntese e Caracterização .....	127
3.3.2.2.	Fluorescência .....	128

3.3.2.3.	Espectrofotometria de UV-Vis .....	129
3.3.2.4.	Dicroísmo circular .....	131
3.3.2.5.	Potencial zeta.....	132
3.3.2.6.	Viscosidade.....	133
3.3.2.7.	Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	134
3.3.3.	Estudo de SAXS para os sistemas DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% .....	139
3.4.	INFLUÊNCIA DO SDS NA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE DNA COM A PEI, PEI-C12 E PEI-URI15% .....	141
3.4.1.	Fluorescência .....	141
3.4.2.	Espectrofotometria de UV-Vis.....	143
3.4.3.	Potencial zeta .....	144
3.4.4.	Viscosidade.....	147
3.4.5.	Espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	149
3.4.6.	Sobre o modelo de interação do DNA com as PEIs... ..	151
CAPÍTULO IV.....		153
4. CONCLUSÕES GERAIS .....		153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		155
ANEXOS .....		173

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, muita atenção tem-se dado ao estudo da chamada “matéria mole” (*soft matter*), devido à crescente demanda por vários setores industriais, sobretudo aqueles associados ao desenvolvimento de nanomateriais ou materiais com controle morfológico na escala nanométrica. As aplicações são muito amplas, indo desde a indústria médica farmacêutica, onde os agregados são utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos, à indústria eletrônica, onde os agregados nanometricamente espaçados são utilizados para o desenvolvimento de circuitos e dispositivos também em escala nanométrica. Além disso, sistemas coloidais poliméricos são largamente empregados nas indústrias de cosméticos e tintas, devido ao grande potencial de controle reológico nestes sistemas.

Nos últimos anos, o interesse no estudo de nanopartículas de polieletrólitos para utilização na terapia genética vem se intensificando. Muitos estudos vêm sendo feitos para que as nanopartículas tenham uma alta eficiência na transfecção de genes em células doentes e que tenham baixa citotoxicidade.

Neste trabalho, foram sintetizados e caracterizados derivados da poli(etilenoimina) ramificada (PEI), a qual foi decorada com grupos hidrofóbicos e nucleosídico. Estes polímeros são formados por repetições do grupo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NH-), sendo constituído por grupos amino primários, secundários e terciários. Quando em solução aquosa, tal polímero se comporta como um polímero de carga moderada, pois os grupos amino têm caráter básico. A morfologia dos agregados formados em água a partir dessas PEIs modificadas foi estudada com o emprego de técnicas como tensão superficial, fluorescência, medidas de pH e SAXS. A seguir, foi investigada a associação da PEI modificada hidrofobicamente com dodecilsulfato de sódio (SDS), tendo sido acompanhadas as concentrações críticas de agregação, o efeito reológico, as alterações morfológicas do polímero e a dinâmica desses agregados em solução. Foi ainda investigada a interação envolvendo os polímeros modificados e o DNA, através de técnicas como espectrofotometria de UV-Vis e de fluorescência, espalhamento de luz,

espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), difração circular, viscosidade e potencial zeta. Finalmente, as mesmas técnicas foram também empregadas para se estudar sistemas ternários tendo em sua composição os polímeros modificados, SDS e o DNA. Uma revisão bibliográfica sobre os assuntos a serem estudados é apresentada a seguir.

## **1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1.1. Polieletrólitos**

Os polieletrólitos são polímeros que contêm diversos grupos ionizáveis. Esses polímeros em solução aquosa apresentam propriedades bastante diferentes dos polímeros que não apresentam grupos ionizáveis [1]. Os polieletrólitos podem ser classificados em naturais [por exemplo, o ácido desoxirribonucléico (DNA), a carragena e a xantana], naturais modificados (por exemplo, derivados de celulose ou quitina) e polímeros sintéticos [por exemplo, a poli(etilenoimina) (PEI), a poli(acrilamida) e o poli(ácido acrílico)] [2]. Em termos de sua carga, eles podem ser divididos em poliânions, policátions e polianfóteros. Dependendo da densidade de carga e da acidez dos grupos funcionais, os polieletrólitos são conhecidos como fortes e fracos. Os polieletrólitos representam uma classe interessante de polímeros devido à ampla variedade de estruturas macromoleculares e do fato de que suas propriedades apresentam forte dependência do pH e da força iônica. Esses polímeros estão fortemente relacionados com processos vitais, desempenham um papel importante em muitos ramos da tecnologia moderna e são valiosas ferramentas na solução de problemas da água e do solo [3]. Esforços teóricos e experimentais têm sido feitos ao longo das últimas décadas para a compreensão da origem de domínios ou de agregados em soluções diluídas de polieletrólitos [2].

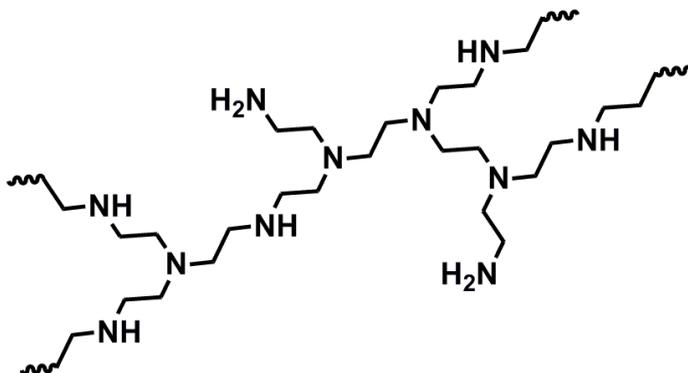
O amplo espectro de variabilidade de polieletrólitos possibilita aplicações em diferentes campos, como por exemplo, na medicina, na fabricação de papel, incluindo processos de revestimento de papel, no tratamento de água, na separação de minerais, nas indústrias de tintas, alimentos e cosméticos e em sistemas farmacêuticos. Na maioria dessas aplicações os polieletrólitos desempenham um papel crucial, mas os

processos são mais complexos. Para uma melhor visão sobre o seu funcionamento, é necessária a compreensão da natureza dos polieletrólitos [2].

Outra classe de polímeros com importância em diversas áreas são os polieletrólitos hidrofobicamente modificados (PHM). Estes vêm despertando interesse de pesquisa nos últimos anos, devido a sua semelhança com sistemas biológicos, bem como por sua forte tendência de auto-organização em meio aquoso devido às interações hidrofóbicas [3]. A síntese de PHMs pode ser feita por diferentes rotas, sendo uma delas a modificação hidrofóbica da PEI, utilizando-se haletos de alquila através de uma alquilação.

### **1.1.2. Poli(etilenoimina) (PEI)**

A PEI é um polímero orgânico hidrossolúvel neutro que possui uma alta densidade de grupos amino, os quais podem ser protonados em solução aquosa, o que os tornam polieletrólitos catiônicos [4; 5]. A PEI está disponível comercialmente nas formas ramificada (Figura 1) e linear. Em sua forma linear, o polímero possui apenas grupos amino secundários, e essa forma apresenta um maior número de estudos se comparado à forma ramificada. Já as propriedades apresentadas pela sua forma ramificada impulsionaram um interesse crescente pelo seu uso intenso na formulação de fármacos, produtos alimentícios e detergentes comerciais e industriais [6]. A forma ramificada da PEI possui grupos aminos primários, secundários e terciários (Figura 1) que são quimicamente reativos.



**Figura 1.** Representação estrutural da PEI em sua forma ramificada.

A PEI tornou-se um dos mais eficientes agentes não-virais de transfecção gênica. A PEI ramificada de massa molar  $25000 \text{ g mol}^{-1}$  por muitas vezes tem sido amplamente utilizada como um padrão para avaliação da eficiência de transfecção. A PEI, no entanto, tem um problema: o aumento da eficiência de transfecção é acompanhado pelo aumento da citotoxicidade. É conhecido que a eficiência e a citotoxicidade aumentam com o comprimento de cadeia. Este problema deve ser resolvido para a aplicação clínica da PEI, bem como de outros vetores não virais [7].

Uma abordagem para solucionar este problema foi o acoplamento da PEI de baixa massa molar com um ligante biodegradável. Essa abordagem em particular faz sentido, mas os resultados têm sido inconsistentes. Uma das razões é que os estudos anteriores não prestaram atenção suficiente para a caracterização das cadeias de polímero ligadas, tais como a sua massa molar e a estruturação do complexo DNA-PEI [7].

A vacina baseada no DNA dirigida a atingir um tumor específico é uma estratégia atrativa na prevenção e terapia do câncer. Ma e colaboradores [8] realizaram estudos para examinar o efeito adjuvante da PEI sobre a eficácia da estratégia da vacina contra o câncer. A imunização de camundongos com os complexos de DNA-PEI precedida ou após a inoculação das células tumorais suprimiu o crescimento do tumor e prolongou a sobrevivência dos animais. Os resultados obtidos nesse estudo ilustram o potencial do uso da PEI como

adjuvante na vacinação de base de DNA contra o câncer para a indução protetora e imunidade terapêutica.

### **1.1.3. PEI modificada**

Devido à presença de grupos amino, a PEI é facilmente derivatizada com a utilização de um grande número de grupos funcionais, o que lhe permite oferecer características variadas, dependendo da área de interesse. As PEIs hidrofobicamente modificadas podem dispor da propriedade dos polímeros puros tendo adicionalmente propriedades anfífilas [4]. O interesse pelo estudo das propriedades da PEI e seus derivados anfífilos está associado a sua importância prática [9]. Eles são empregados na recuperação de óleo, bem como em desemulsificantes e inibidores de corrosão [10], podendo ser considerados modelos convenientes de biopolímeros (poliaminas naturais). A presença de grupos polares lhes permite interagir com as biomoléculas das estruturas celulares (lipídios, proteínas da membrana), com a formação de complexos [9]. Atualmente, as estruturas e as propriedades de complexos solúveis em água, constituídos por biopolímeros e polieletrólitos sintéticos, têm sido extensivamente estudados. Por exemplo, os complexos DNA-PEI são usados para incorporar ácidos nucleicos em células [11]. Compostos biologicamente ativos pouco solúveis podem ser imobilizados na parte hidrofóbica da PEI modificada para formar complexos estáveis às mudanças de condições externas (pH, temperatura e força iônica) [12].

Nöding e Heitz [4] modificaram a PEI com longas cadeias de haletos de alquila e em diferentes graus de substituição, o que levou os produtos a apresentarem propriedades interessantes. Dependendo do grau de alquilação, o polímero modificado comportou-se desde como um produto altamente viscoso até um sólido, e para o mesmo grau de alquilação, mas com a cadeia alquilada maior, houve um aumento da fração hidrofóbica, demonstrando que o limite de solubilidade do polímero em água foi deslocado para menores graus de alquilação, devido ao aumento do comprimento da cadeia carbônica substituída [4].

A agregação em sistemas aquosos baseados na PEI hidrofobicamente modificada e suas misturas com surfactantes catiônicos, bem como a sua atividade catalítica, foi estudada por Lukashenko e colaboradores [9]. Os autores concluíram que as

estruturas dos complexos mistos PEI-surfactante catiônico podem diferir substancialmente, dependendo das estruturas do PEI modificado e do surfactante catiônico e todos os sistemas afetam a atividade catalítica.

As propriedades da PEI foram alteradas por uma modificação hidrofóbica a partir do 1,2-epoxidodecano com dois graus de substituição por Griffiths e colaboradores [13]. A presença do grupo hidrofóbico conduziu a uma menor carga efetiva do polímero em qualquer pH, em comparação com as amostras de PEI não modificada. O produto modificado mostrou propensão para formar agregados elípticos em altos valores de pH, refletindo nas mudanças no comportamento de protonação induzida pela modificação hidrofóbica. As amostras da PEI hidrofobicamente modificada apresentam atividade de superfície pronunciada e a presença de pequenos domínios hidrofóbicos. A atividade de superfície aumenta com o aumento do grau de substituição. Com a adição de SDS, o início da formação do complexo polímero-surfactante foi insensível ao grau de substituição. Griffiths e colaboradores [13] confirmaram que a modificação hidrofóbica é, portanto, uma opção viável para adequar propriedades dependentes do pH, cujos efeitos podem ser amenizados pela presença de surfactante.

As nanocápsulas derivadas da PEI, com grupos funcionais ativos no núcleo, tornaram possível a coordenação da estrutura do núcleo da nanocápsula, o que proporciona uma oportunidade para avaliar a relação entre propriedade e estrutura [14]. Wan e colaboradores [14] alquilaram os grupos amino da PEI com diferentes graus de substituição a partir de epóxidos de cadeias curtas e longas, formando macromoléculas anfifílicas com o núcleo estruturado. Eles concluíram que a natureza dos grupos funcionais no núcleo é crucial para a seleção e liberação de corantes. Foi percebido que a propriedade de reconhecimento da molécula a ser encapsulada é também dependente da natureza dos grupos funcionais do núcleo, mas independente da densidade e espessura da corona. Essas macromoléculas com um núcleo planejado podem selecionar, em uma mistura, a molécula a ser encapsulada.

Na indústria farmacêutica, compostos oralmente ativos são obrigados a ter suficiente solubilidade em água para permitir a dissolução no trato gastrointestinal antes da absorção. A dissolução limitada no trato gastrointestinal geralmente reduz a biodisponibilidade dos fármacos hidrofóbicos. Para melhorar a dissolução no trato

gastrointestinal, solventes não aquosos são frequentemente usados na forma de emulsões e microemulsões. Cheng e colaboradores [15] mostraram que o óleo livre de nanossistemas de polieletrólito (dispersões de partículas micelares), elaborado a partir da PEI modificada com cadeias cetílicas e grupos amônio quaternários foram capazes de encapsular altos níveis de fármacos hidrofóbicos, o que promoveu uma melhor absorção.

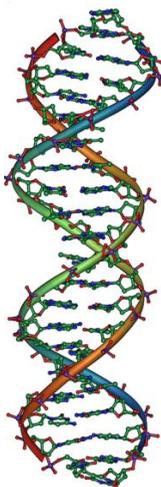
A PEI foi empregada com sucesso por Liu e colaboradores [16] como precursor para a preparação de polímeros modificados por meio da amidação com 1,10-carbonildiimidazol, os quais foram capazes de formar micelas invertidas unimoleculares. Os mesmos apresentaram alta eficiência de encapsulação de corantes aniônicos hidrofílicos e a sua eficiência pôde ser melhorada significativamente, pela diminuição do grau de amidação ou quaternarizando os grupos amino residuais.

Existe uma necessidade de fazer com que as superfícies de objetos comuns sejam letais para bactérias patogênicas, permanecendo não tóxicas para pessoas e animais. Daewon e colaboradores [17] descobriram que a aplicação de polications hidrofóbicos, por apresentarem longas cadeias alquiladas covalentemente ligadas a eles, torna superfícies de objetos sólidos bactericidas. Lâminas de vidro e de polietileno foram então mergulhadas em soluções orgânicas da PEI hidrofobicamente modificada com diferentes grupos alquila, seguido pela evaporação do solvente. O polication que revestiu as lâminas foi capaz de matar todas as bactérias *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* após em contato com esta superfície. Uma análise mais aprofundada do mecanismo da ação bactericida sugeriu que a PEI modificada, depositada na superfície, foi capaz de matar as bactérias pela ruptura de suas membranas celulares.

Appelhans e colaboradores [18] desenvolveram um método sintético e rápido para decorar a PEI com diferentes oligossacarídeos, para utilização em sistemas de liberação de fármacos ou de moléculas bioativas, em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Esses polications foram complexados com o 5-trifosfato de adenosina (ATP) e analisados por uma titulação calorimétrica para avaliar a energia de ligação do ATP com a PEI-oligossacarídeo em condições fisiológicas. Experimentos *in vitro* mostraram que oligossacarídeos ligados à superfície da PEI, apresentaram um grande potencial na liberação de medicamentos ou de outras moléculas bioativas com maior rapidez e maior captação celular.

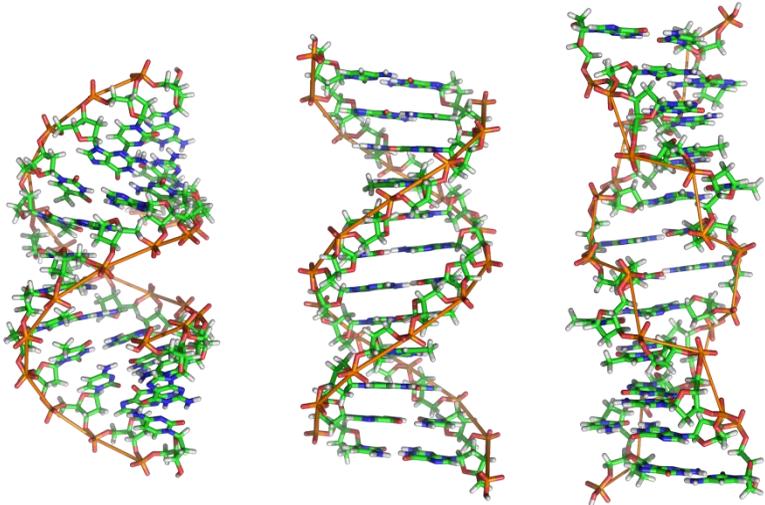
#### 1.1.4. A estrutura do DNA

Os ácidos nucléicos são as maiores macromoléculas na célula. Estes existem como polímeros lineares de cadeia longa, chamados de polinucleotídeos, que são compostos de monômeros de nucleotídeos, sendo que o DNA é o mais conhecido [19]. Watson e Crick [20] descobriram que o DNA apresenta uma estrutura tridimensional, que é composta por duas cadeias de polinucleotídeos que se enovelam formando uma dupla hélice (Figura 2). O DNA é formado por grupos fosfato e resíduos de açúcar (2-desoxirribose), que estão dispostos alternadamente. A dupla hélice é formada por ligações de hidrogênio entre as bases das duas cadeias. As bases nitrogenadas derivam de anéis de purinas (adenina e guanina) e de pirimidinas (citosina e timina). Existe ainda uma quinta base, a uracila, uma pirimidina que aparece no ácido ribonucléico (RNA) [21; 22].



**Figura 2.** Estrutura em dupla hélice do DNA [23].

O DNA pode apresentar várias conformações, as mais comuns são as formas A, B e Z (Figura 3), sendo a forma B a mais comum encontrada em células vivas [19; 24]. Há vários fatores que podem influenciar na forma do DNA, como a sequência do DNA, níveis de hidratação que dependem da concentração de sal na solução, etc.



**Figura 3.** As conformações do DNA. Da direita para a esquerda: formas A, B e Z [23].

Quando as cadeias em dupla hélice do DNA são submetidas a variação de temperaturas e/ou pH, as ligações de hidrogênio da dupla hélice são desfeitas e as duas cadeias não mais podem se manter unidas. Este processo é chamado de desnaturação. Quando o calor é utilizado para desnaturar o DNA, a temperatura na qual as cadeias se separam é chamada de temperatura de fusão ou de transição ( $T_m$ ). O valor da  $T_m$  do DNA é definido como a temperatura no ponto médio do aumento de absorção [19; 21].

### 1.1.5. Interação da PEI modificada com DNA e RNA

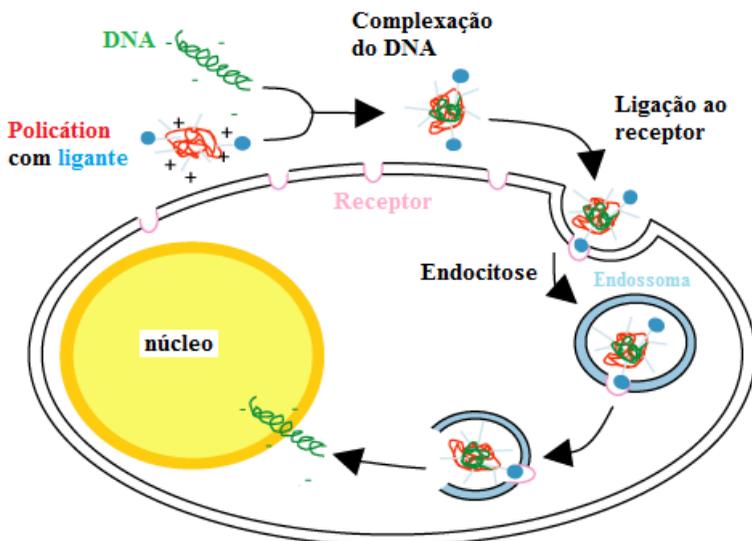
Nos últimos anos, a terapia genética tem tido a atenção da comunidade científica, uma vez que pode ser uma maneira nova e eficiente para curar várias das principais doenças humanas como câncer, AIDS, fibrose cística ou anemia. O conceito da terapia genética envolve a substituição ou inserção de um gene terapêutico no núcleo de células de genes anormais que causam doenças em sequências de DNA saudáveis. O principal desafio da terapia genética diz respeito à

concepção dos suportes específicos, que permitem a entrega eficiente dos genes saudáveis na célula (transfecção). Os transportadores devem ser capazes de transportar o DNA na corrente sanguínea, para atravessar efetivamente as membranas celulares e liberar o material genético perto do núcleo da célula [25; 26].

Normalmente, os sistemas virais são os portadores mais eficazes para a liberação do gene. Sistemas virais podem selecionar as células alvo e, geralmente, possuem uma eficiência de transfecção muito alta. Entretanto, os portadores virais também podem ser muito tóxicos para o corpo humano. Além disso, o seu isolamento a partir de fontes biológicas e seu tratamento têm um alto custo.

Assim, portadores do gene não virais, tais como polímeros sintéticos, proteínas ou lipossomas são cada vez mais investigados na terapia genética. Em particular, os polímeros sintéticos são muito atraentes, em comparação com biopolímeros, pois podem ser produzidos em grande quantidade com custos relativamente baixos. Além disso, sua estrutura química pode ser precisamente ajustada para as propriedades ideais [25]. O conceito de transferência de genes não virais é bastante simples: consiste na utilização de compostos sintéticos estruturalmente bem definidos e capazes de imitar os processos de infecção viral. Isso significa que um vetor não viral deve ser capaz de condensar o DNA, protegê-lo contra a degradação e favorecer a sua absorção celular e liberação nuclear. Embora seja aceitável que esses vírus artificiais sejam menos eficientes do que os biológicos, em contrapartida oferecem diversas vantagens. Por exemplo, a produção dos compostos é fácil e de baixo custo, porém devem ser não imunogênicos e não citotóxicos [27].

Os polímeros catiônicos formam complexos solúveis com o DNA em solução aquosa e, portanto, permitem a transferência de material genético dentro das células, como ilustrado na Figura 4. Os polímeros catiônicos representam uma classe de transportadores não virais que podem ser projetados para facilitar a entrega de genes em células-alvo e os polímeros anfífilos têm sido particularmente atraentes devido ao delicado equilíbrio de propriedades físico-químicas que possam aperfeiçoar o desempenho funcional. A modificação química do polímero (modificação com ligantes específicos de células alvo) permite uma melhor eficiência de transfecção, expressão gênica, bem como uma redução da citotoxicidade [25; 26; 28; 29; 30].



**Figura 4.** Ilustração da transfecção mediada por um policação (Figura adaptada de [www.nano-lifescience.com](http://www.nano-lifescience.com)) [25].

As PEIs ramificadas e lineares têm provado ser agentes eficientes e versáteis para a liberação de gene *in vitro* [27; 30]. Apesar da atividade de transferência considerável, as propriedades das PEIs precisam ser melhoradas. Assim, várias modificações têm sido exploradas nos últimos anos. Por exemplo, para aumentar a circulação de meia-vida dos complexos de DNA, a carga superficial das partículas foi protegida por polímeros hidrofílicos, como o polietileno glicol (PEG) em sua superfície [27].

Chen e colaboradores [31] sintetizaram um copolímero catiônico biodegradável conjugado com a PEI na sua cadeia principal, para ser um vetor não viral de liberação de genes. O copolímero apresentou uma boa capacidade de condensar o DNA, formando nanopartículas positivamente carregadas com cerca de 150 nm, as quais apresentaram formas esféricas e compactas, mostraram capacidade de tamponamento forte na faixa de pH 3-10 e protegeram bem o DNA condensado da degradação enzimática. Os resultados mostraram que a degradação do copolímero poderia liberar o DNA por mais de uma semana, foi superior ao PEI em capacidade de transfecção e que a

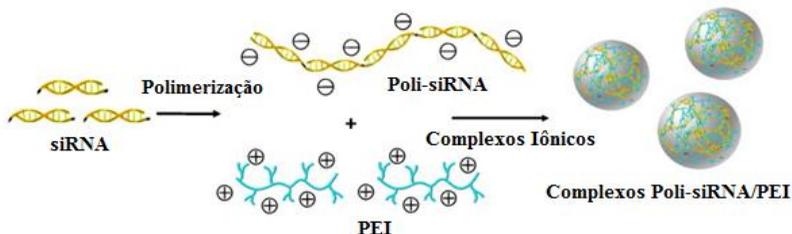
citotoxicidade apresentada foi muito inferior, mostrando um grande potencial como vetor de liberação de genes.

Uma série de derivados da PEI ramificada foi sintetizada através da modificação das aminas com acrilato de etila, acetilação de aminas primárias, ou introdução de carga negativa com o ácido propiônico ou de ácido succínico [32]. Os polímeros apresentaram alta eficiência na destruição do gene alvo, com a PEI succinilada apresentando uma toxicidade cerca de 10 vezes menor em comparação com a PEI não modificada. As formulações de RNA com essa PEI são estáveis em solução salina e induziram a destruição notável (80% em relação às células não tratadas) do gene da luciferase. Para atingir a destruição significativa dos genes alvo, a PEI modificada tem de ser aplicada em concentrações mais elevadas e em tais concentrações a PEI não modificada é altamente tóxica. Em contraste, os análogos modificados são muito menos tóxicos e podem ser aplicados em concentrações necessárias para a destruição de genes-alvo sem efeitos colaterais [32].

Uma série de derivados da PEI com alquil-oligoaminas de baixa toxicidade foi sintetizada para aumentar a hidrofobicidade da PEI [33; 34]. Dehshahri e colaboradores [33] modificaram a PEI com a utilização de uma série de ácidos  $\omega$ -bromo-alkilcarboxílicos de diferentes comprimentos de cadeia (ácidos 2-bromoacético, 6-bromo-hexanoico, 10-bromodecanoico e 16-bromo-hexadecanoico), seguida pelo acoplamento de vários oligoaminas (espermina, espermidina, etilenodiamina ou dietilenotriamina) para restaurar parcialmente a densidade dos grupos amino primários. Essas alterações foram feitas para influenciar no equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico, bem como criar um vetor eficiente, com baixa toxicidade. Os autores fizeram ensaios de exclusão do brometo de etídio e estudos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) que mostraram que as PEIs modificadas podem ligar-se ao DNA e formam nanopartículas na faixa de 100 nm. Os resultados indicaram que a modificação hidrofóbica da PEI, sem redução no teor de grupos amino primários, é uma estratégia eficaz para melhorar a eficiência de transfecção de vetores não virais baseados em polycations, mantendo a baixa toxicidade.

O desenvolvimento de vários sistemas de liberação de gene tem aumentado a eficiência na liberação de siRNA (são pequenos fragmentos de RNA que têm ~23 pares de nucleotídeos, a sigla vem do nome em inglês *small interfering RNA*), embora ainda existam muitos

problemas a serem resolvidos antes da aplicação clínica de siRNA. Lee e colaboradores [35] sugeriram a polimerização do siRNA (poli-siRNA) para uma possível solução da baixa eficiência de liberação. O poli-siRNA formou complexos mais condensados e nanométricos com a PEI (Figura 5), pela forte interação eletrostática baseada na alta densidade de carga do poli-siRNA e esses complexos impediram a perda e a degradação de siRNA no soro. Além disso, os complexos poli-siRNA/PEI apresentaram captação intracelular superior por células de melanoma, e teve uma eficiência de cerca de 80%, em comparação com células não tratadas.



**Figura 5.** Esquema da preparação de complexos poli-siRNA/PEI. A PEI catiônica condensa com a alta densidade de cargas negativas do poli-siRNA por interação iônica para formar complexos poli-siRNA/PEI em meio aquoso. Figura adaptada de Lee e colaboradores [35].

### 1.1.6. Surfactantes e Micelas

Os surfactantes são agentes de superfície ativa (tensoativos), conhecidos popularmente por sabões e detergentes. As soluções de moléculas altamente tensoativas mostram propriedades físicas incomuns. Em soluções diluídas, elas atuam como eletrólitos normais, mas em concentrações razoavelmente definidas ocorrem variações bruscas em diversas propriedades físicas, como pressão osmótica, condutância, turbidez e tensão superficial. A velocidade com que a pressão osmótica cresce com o aumento de concentração se torna anormalmente baixa, sugerindo a ocorrência de considerável associação entre partículas; mas a condutância de soluções de substâncias tensoativas iônicas continua relativamente elevada, mostrando que ainda existe dissociação iônica [36].

Os surfactantes encontram-se entre os produtos mais versáteis da indústria química, aparecendo em formulações diversas como os óleos para automóveis, nos fármacos e nos produtos domésticos, tais como xampus, suavizantes, condicionadores, detergentes e cosméticos. São usados nas perfurações de lamas na prospecção de petróleo, e nos agentes da flutuação usados no beneficiamento dos minérios [37; 38].

Os surfactantes têm uma estrutura molecular característica, anfífila, consistindo em um grupo hidrofílico e um grupo hidrofóbico [38].

As micelas são agregados moleculares, possuindo ambas as regiões estruturais, hidrofílica e hidrofóbica, que dinamicamente se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de certa concentração, conhecida como a *concentração micelar crítica (cmc)*, formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais, chamados micelas [37].

As micelas não são estáticas. Existem dentro de uma dinâmica de equilíbrio, simplesmente como um agregado dinâmico. São termodinamicamente estáveis e facilmente reprodutíveis, sendo destruídas pela diluição com água até que a concentração do tensoativo fique abaixo da *cmc*, onde o tensoativo encontra-se predominantemente na forma de monômeros. Quando a concentração está acima da *cmc* existe um equilíbrio termodinâmico, uma rápida troca entre a fase da solução (os monômeros) e os agregados (as micelas). As estruturas das micelas podem envolver agregados de 30-200 monômeros, com um raio aproximadamente igual ao comprimento da cadeia hidrocarbônica do surfactante [37; 39].

O processo de formação dos agregados ocorre em um intervalo pequeno de concentrações, e não em um ponto exato, e pode ser detectada pela mudança repentina nas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do surfactante, como na tensão superficial, condutividade molar, pressão osmótica, turbidez [37; 39].

### **1.1.7. Interação polímero-surfactante**

Sistemas aquosos formados por polímero-surfactante têm sido estudados intensamente nas últimas décadas tendo como interesse suas aplicações tecnológicas. As misturas aquosas utilizando polímero com surfactante são frequentemente utilizados na formulação de tintas,

fármacos, gêneros alimentícios, detergentes, cosméticos e recuperação terciária do petróleo, dentre outras aplicações industriais [40; 41].

Recentemente, polímeros hidrofobicamente modificados, em associação com surfactantes, tem sido objeto de muita atenção devido ao efeito sinérgico nas propriedades físico-químicas da solução resultante. De outro lado, o caráter anfifílico dos surfactantes causa mudanças interessantes nas soluções do polímero [42].

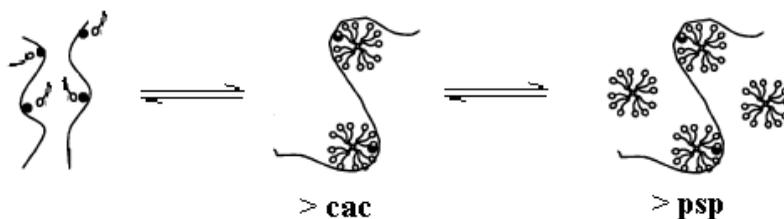
Em solução aquosa os polímeros e os surfactantes associam-se formando complexos termodinamicamente estáveis, com propriedades físico-químicas diferentes daquelas observadas em soluções micelares. A associação de um polieletrólito com um surfactante de carga oposta é aceita geralmente por ser um processo de troca de íons, em que a atração eletrostática é reforçada pela agregação cooperativa das moléculas de surfactante. Uma vez que todos os grupos ligados à cadeia do polímero sejam neutralizados, o efeito hidrofóbico começa a controlar as ligações, que induz uma reestruturação da cadeia do polímero devido à formação de agregados ligados ao longo da cadeia [6].

As forças que controlam as interações de surfactantes com polímeros são idênticas àquelas envolvidas em outras soluções ou propriedades interfaciais, isto é, de van der Waals ou forças de dispersão, o efeito hidrofóbico, as interações dipolares, do tipo ácido-base e as interações eletrostáticas. A relativa importância de cada tipo de interação varia com a natureza do polímero e do surfactante, de modo que a forma dos complexos possa ser quase tão variada quanto os tipos de materiais disponíveis para o estudo [41].

Os estudos de complexos formados entre polímero e surfactante mostram que os surfactantes interagem cooperativamente com o polímero a partir da *concentração de agregação crítica (cac)*, formando agregados micelares ao longo do polímero. Isso representa a base para quase todos os sistemas que consistem em polímeros e surfactantes iônicos. Os valores da *cac* são menores do que para a *concentração micelar crítica (cmc)* do surfactante. Nesses vários sistemas polímero-surfactante, a posição da *cac* depende de forças eletrostáticas, características estruturais dos grupos carregados e outros fatores como a flexibilidade da cadeia do polímero e dos tipos de contra-íons [41; 43].

A interação cooperativa polímero-surfactante é normalmente interpretada em termos de um modelo onde o surfactante e o polímero contribuem para formar micelas mistas [44].

A interação polímero-surfactante atinge a saturação ao chegar a uma determinada concentração denominada *ponto de saturação do polímero (psp)*, sendo tal concentração diretamente proporcional à concentração do polímero. Acima do *psp*, formam-se micelas regulares do surfactante em equilíbrio com os complexos polímero-surfactante [42].



**Figura 6.** Etapas das associações polímero-surfactante.

### 1.1.8. Caracterização e estudos do comportamento de sistemas poliméricos em solução

A caracterização de soluções aquosas de polímeros e agregados poliméricos tem grande importância devido à ampla aplicação em vários setores da indústria, desde a indústria farmacêutica, a de petróleo e a de tintas, um estudo bem detalhado no comportamento desses sistemas, pode ser de grande valia e ter uma utilização aplicada no controle morfológico e/ou reológico. Para isso, algumas técnicas são importantes na caracterização desses sistemas, tais como a viscosidade, a tensão superficial, a fluorescência, espalhamento de luz (SLS, DLS e SAXS), potencial zeta entre outros, as quais serão discutidas brevemente a seguir.

#### 1.1.8.1. Viscosidade

O estudo da viscosidade de soluções poliméricas tem grande importância prática pelo uso de polímeros em diversos produtos

justamente como controladores da viscosidade. Além disso, do ponto de vista molecular, o estudo viscosimétrico de soluções de polímeros permite avaliar informações importantes sobre o polímero: sua massa molar média, dimensões da cadeia polimérica em solução e, como consequência, da qualidade do solvente utilizado para esse polímero (medida pela intensidade de solvatação do polímero) [45].

Uma característica de soluções poliméricas diluídas é que a viscosidade é consideravelmente maior que a do solvente puro, ou de soluções diluídas de pequenas moléculas. Isso se deve à grande diferença em tamanho entre as moléculas de polímero e as de solvente. A viscosidade aumenta com o aumento das dimensões das moléculas poliméricas em solução.

A viscosidade de soluções de macromoléculas pode ser expressa em diferentes formas. Costuma-se definir a viscosidade relativa ( $\eta_{rel}$ ) pela equação (1), a viscosidade específica ( $\eta_{esp}$ ) pela equação (2) e a viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) usando-se a equação (3),

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{solução}}{\eta_{solvente}} = \frac{t_{solução}}{t_{solvente}} \quad (1)$$

$$\eta_{esp} = \left( \frac{\eta_{solução}}{\eta_{solvente}} \right) - 1 \quad (2)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{c} \quad (3)$$

onde  $c$  é a concentração em g/mL ou g/100mL,  $\eta_{solução}$  é a viscosidade da solução,  $\eta_{solvente}$  é a viscosidade do solvente,  $t_{solução}$  é o tempo de escoamento da solução,  $t_{solvente}$  é o tempo de escoamento do solvente.

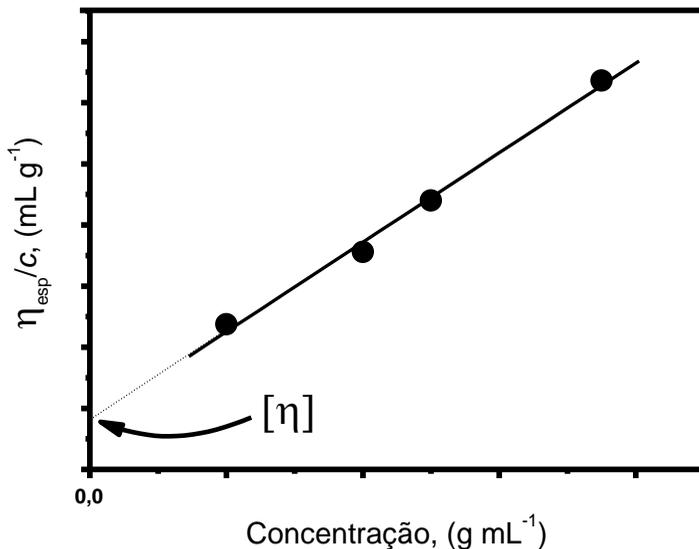
Para a determinação do valor da viscosidade intrínseca, considera-se que na prática a viscosidade de soluções diluídas aumenta com a concentração, sendo essa dependência expressa pela equação de Huggins (equação(4)):

$$\frac{\eta_{esp}}{c} = [\eta] + k_H [\eta]^2 c + \dots \quad (4)$$

onde o primeiro termo equivale a viscosidade reduzida ( $\eta_{especifica}/c$ ) da solução. O limite da função para soluções infinitamente diluídas é a viscosidade intrínseca da solução  $[\eta]$ , como visto abaixo:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left( \frac{\eta_{esp}}{c} \right) = [\eta] \quad (5)$$

A viscosidade intrínseca é obtida pela extrapolação gráfica da relação da viscosidade reduzida vs. a concentração, como mostra a Figura 7 [45; 46; 47].

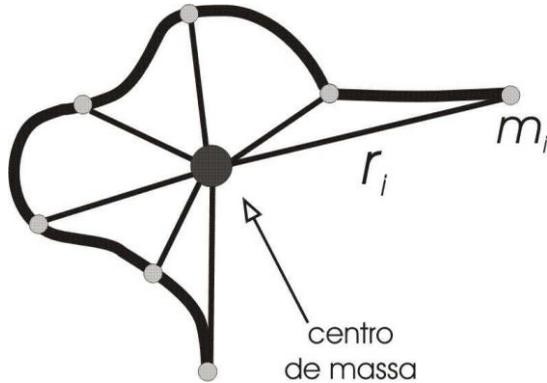


**Figura 7.** Viscosidade reduzida vs. a concentração de polímero.

Em solução a cadeia linear do polímero ocupa um espaço hipotético de uma esfera ou um cubo de dimensão linear de raio de giro ( $R_g$ ), sendo que o  $R_g$  descreve a distribuição geral da molécula, e é definido como a raiz quadrada da distância média do conjunto de átomos de seu centro de massa, a Figura 8 representa diferentes valores de raio  $r_i$ , que são utilizados para determinar o valor de  $R_g$  através da equação (6).

$$R_g^2 = \frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i} \quad (6)$$

onde  $m_i$  é a massa da  $i^{th}$  subunidade na partícula e  $r_i$  é distância desta subunidade até o centro de massa do objeto [48; 49].

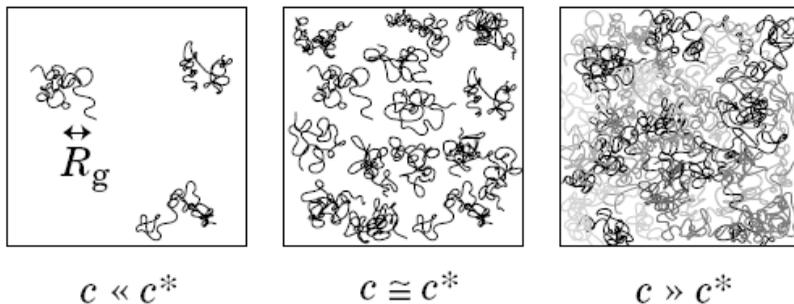


**Figura 8.** Representação esquemática do valor de  $R_g$  para uma cadeia polimérica [48].

Em concentrações baixas, essas esferas ou cubos estão separadas uma da outra. Com o aumento da concentração  $c$ , tornam-se congestionadas e eventualmente tocam-se, onde começa a sobreposição das cadeias de polímero. Esta concentração é chamada de concentração de sobreposição (*overlap*,  $c^*$ ), que é dependente da massa molar do polímero. Assim, o valor de  $c^*$  é definido quantitativamente de acordo com a equação (7), que mostra que  $c^*$  também pode ser determinado pela viscosidade intrínseca do polímero [45; 46].

$$c^* = \frac{1}{[\eta]} \quad (7)$$

A Figura 9 descreve três escalas de concentração  $c$ :  $c \ll c^*$ ,  $c \cong c^*$ , e  $c \gg c^*$ . Quando a concentração  $c$  está abaixo de  $c^*$ , a solução é chamada diluída. Em  $c \ll c^*$ , as cadeias de polímero são separadas e comportam-se mais ou menos independentemente. A cadeia do polímero interage primeiramente com as moléculas do solvente. A solução tem um comportamento próximo de uma solução ideal. A situação é diferente em concentrações acima de  $c^*$ . A solução nesse regime é chamada semidiluída. Em  $c \gg c^*$ , as cadeias são sobrepostas e se entrelaçam. Sua mobilidade é extremamente reduzida se comparada com as soluções diluídas [45].



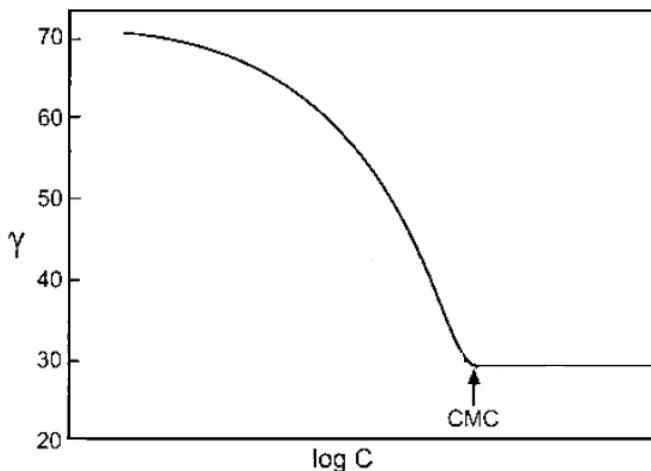
**Figura 9.** Regimes de concentrações para soluções de polímeros: solução diluída ( $c \ll c^*$ ); solução na concentração de sobreposição ( $c \cong c^*$ ); solução semidiluída ( $c \gg c^*$ ) [45].

### 1.1.8.2. Tensão superficial

A tensão superficial ( $\gamma$ ) surge nos líquidos como resultado do desequilíbrio entre as forças agindo sobre as moléculas da superfície em relação àquelas que se encontram no interior da solução. As moléculas de qualquer líquido localizadas na interface líquido-ar realizam um número menor de interações intermoleculares comparadas com as moléculas que se encontram no interior do líquido. A força resultante que atrai as moléculas da superfície de um líquido para o seu interior torna-se o principal obstáculo para a formação de bolhas, gotas e a nucleação de cristais em líquidos. Como estas forças de coesão tendem a diminuir a área superficial ocupada pelo líquido, observam-se frequentemente gotas adotando a forma esférica. Pela mesma razão, ocorre à formação dos meniscos, e a consequente diferença de pressões através de superfícies curvas ocasiona o efeito denominado capilaridade. A essa força que atua na superfície dos líquidos dá-se o nome de tensão superficial e, geralmente, quantifica-se a mesma determinando-se o trabalho necessário para aumentar a área superficial [50].

Pela baixa solubilidade dos surfactantes em água, suas moléculas tendem a minimizar a repulsão entre grupos hidrofóbicos e a água, arranjando-se na superfície, de tal forma que os grupos polares ficam na solução aquosa, bem próximo da superfície, e os grupos apolares do surfactante ficam na interface água-ar.

Com a adição gradual de surfactante em água, a tensão superficial diminui gradualmente, devido às moléculas de surfactante ficarem na interface líquido-ar, até a *cmc*, onde se apresenta uma inflexão na curva de tensão superficial *versus*  $c$ (surfactante), como pode ser visto na Figura 10. Nesta parte, a superfície da solução fica saturada e começa a formar micelas. Acima da *cmc*, as micelas, ao contrário dos monômeros, ficam dispersas em toda solução, sem efeito adicional sobre a tensão superficial da solução [36; 51].



**Figura 10.** Gráfico típico de tensão superficial à medida que a  $c$ (surfactante) aumenta.

### 1.1.8.3. Fluorescência

A luminescência consiste na emissão de luz a partir de moléculas que estão em estados eletronicamente excitados, e é formalmente dividida em duas categorias: a fluorescência e a fosforescência, que dependem da natureza do estado excitado.

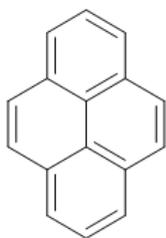
A fluorescência é o processo no qual as moléculas são excitadas por absorção de radiação eletromagnética. As moléculas absorvem um fóton de luz, passando do estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado excitado ( $S_1$ ). No estado singleto excitado, o elétron do orbital excitado é emparelhado (spin oposto) com o segundo elétron do estado

fundamental. O retorno ao estado fundamental ocorre rapidamente, de modo que o tempo de vida de fluorescência é próximo de  $10 \times 10^{-9}$  s [52].

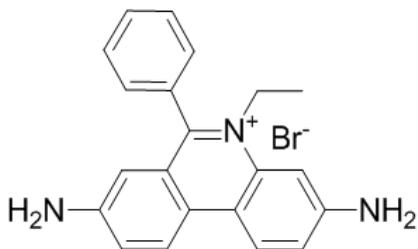
A fluorescência é medida excitando-se a amostra em um comprimento de onda de excitação e medindo-se a intensidade de emissão em um comprimento de onda mais alto, sendo essa medida feita em um ângulo reto em relação ao feixe incidente para evitar a interferência do mesmo [53].

Os estudos fotoquímicos sobre interações envolvendo moléculas de surfactantes, polímeros e do tipo polímero-surfactante requerem a presença de uma molécula luminescente, isto é, uma molécula fluorescente ou fosforescente. Isto pode ser feito adicionando-se uma sonda fluorescente à solução. As sondas fluorescentes podem ser usadas para determinar a *cmc* para surfactantes em água, a *cac* de complexos entre polímeros e surfactantes, o número de agregação *N* de micelas de surfactantes e de complexos de polímero-surfactante e o microambiente dentro dos complexos [54; 55; 56; 57; 58; 59].

O método fluorimétrico é um dos mais sensíveis e o pireno (Figura 11) é a sonda fluorescente mais usada. O espectro de emissão de fluorescência do estado estacionário de pireno exibe bandas de vibração finas cujas intensidades relativas são sensíveis à polaridade do meio [58; 60]. Enumerando as bandas de vibração de 1 a 5, que são observadas na temperatura ambiente, o modo vibrônico  $I_3$  em 384 nm corresponde à transição  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=1}$ , e o modo vibrônico  $I_1$  em 373 nm corresponde à transição  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=0}$  [58]. A dependência da polaridade do solvente sobre a emissão do pireno é expressa em termos da razão  $I_1/I_3$ , que permite o estabelecimento de uma escala de polaridade (designada de escala Py, de polaridade do pireno [61]), tendo valores bastante diferentes em meios polares, como a água, e apolares, como no interior de uma micela. Os valores desta razão  $I_1/I_3$  para solventes polares ficam em torno de 1,9 e para hidrocarbonetos em torno de 0,6 [58].



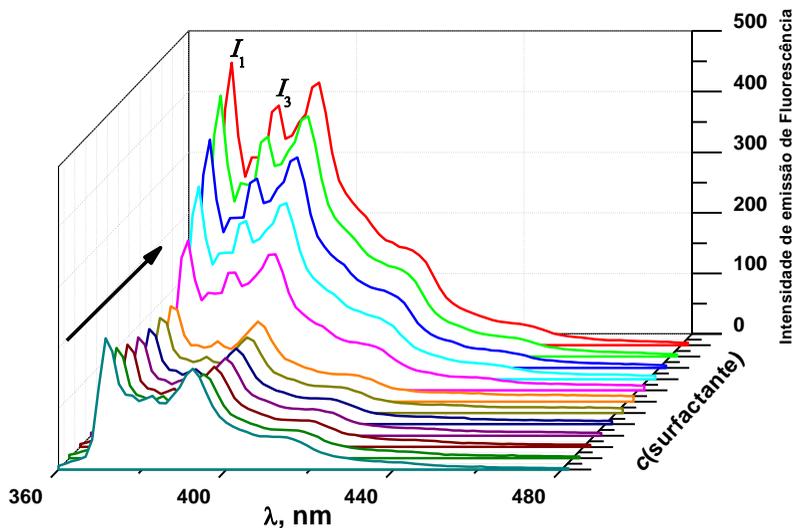
Pireno



Brometo de Etídio

**Figura 11.** Representação das estruturas moleculares de duas sondas fluorescentes.

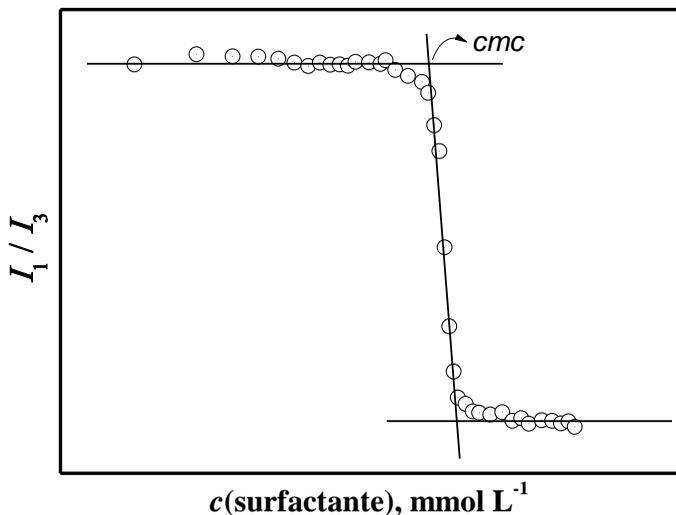
A Figura 11 apresenta os espectros de fluorescência do pireno obtidos com o aumento da concentração de SDS, sendo importante comparar as diferenças nas intensidades de emissão de fluorescência da banda  $I_3$  em relação à banda  $I_1$ . Observa-se que com a adição do surfactante ocorre um aumento relativo na intensidade da banda  $I_3$  em comparação com a banda  $I_1$ , devido ao fato de que o pireno está mudando de ambiente químico, ou seja, está migrando para um meio mais hidrofóbico no interior da micela. Dependendo do número de soluto dissolvido, pode-se ter mais de uma molécula de pireno dissolvida por agregado. Nesse caso, as moléculas associam-se e formam dímeros chamados de excímeros [55], levando a emissão de fluorescência a ocorrer em comprimentos de onda maiores do que para o monômero. Para evitar que isso aconteça, a concentração de pireno na solução deve ser da ordem de  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 11.** Espectros de emissão de fluorescência do pireno com o aumento da  $c(\text{surfactante})$ .

Usualmente, os valores de  $cmc$  obtidos por esta técnica são ligeiramente menores do que os valores determinados através de outros métodos. Essa diferença é normalmente esperada considerando que o pireno, por causa de sua baixa solubilidade em água, induz a formação de pré-agregados micelares [62].

A  $cmc$  e  $cac$  podem ser estimadas pela mudança de  $I_1/I_3$  em função da concentração de surfactante. A razão  $I_1/I_3$  diminui acentuadamente no início da formação da micela, o que reflete na solubilização do pireno em um ambiente hidrofóbico. Para essa técnica não existe um critério geral para definir a  $cmc$  no perfil obtido assim como existe para os perfis obtidos por técnicas como condutividade elétrica e tensão superficial. Em princípio, é razoável tomar a  $cmc$  como o início da associação do pireno quando  $I_1/I_3$  começa variar bruscamente. Em muitos casos o perfil  $I_1/I_3$  vs.  $c(\text{surfactante})$  necessita de maiores evidências para interpretar a  $cmc$ . A Figura 12 mostra o perfil clássico para um surfactante.



**Figura 12.** Gráfico mostrando o perfil da curva  $I_1/I_3$  versus  $c(\text{surfactante})$ .

O brometo de etídio (Figura 11) é um agente intercalante usado comumente como marcador de ácidos nucleicos [63; 64; 65] em laboratórios de biologia molecular para processos como a eletroforese em gel de agarose. Quando se adiciona a substância a uma solução contendo DNA, e o sistema é exposto à luz UV, ocorre emissão de luz vermelho-alaranjada devido ao fato da sonda intercalar nos pares de bases do DNA, o que intensifica a fluorescência cerca de 20 a 30 vezes [63]. Esse efeito é devido ao aumento da hidrofobicidade do ambiente em que a sonda se encontra, em comparação com o ambiente aquoso. Como o brometo de etídio se intercala no DNA, este apresenta um poderoso efeito mutagênico e, possivelmente, é cancerígeno ou teratogênico.

#### 1.1.8.4. Espalhamento de luz

As técnicas de espalhamento de luz dinâmico e estático têm sido usadas extensivamente para investigar propriedades de sistemas coloidais e macromoleculares, acompanhando a mudança de conformação, crescimento e agregação, entre outros [66; 67; 68; 69; 70;

71; 72]. Quando a luz (radiação eletromagnética) é direcionada para uma solução, os fótons são absorvidos, transmitidos (não interagem com a solução) como luz de baixa frequência (fluorescência, fosforescência) ou espalhados. A intensidade da luz espalhada depende do comprimento de onda da luz incidente, do tamanho e da forma das partículas, assim como de suas propriedades óticas e do ângulo da observação [70; 73; 74]. A dispersão de luz nas soluções origina-se das flutuações espaciais e temporais do índice de refração no espalhamento do meio.

O espalhamento de luz é um dos métodos mais utilizados na caracterização de polímeros. Essa técnica fornece informações a respeito de massa molecular ponderal média, da magnitude das interações polímero-solvente e do tamanho médio das cadeias [73].

#### 1.1.8.4.1. *Espalhamento de luz estático (SLS)*

No espalhamento de luz estático (SLS, do inglês *Static Light Scattering*), considera-se apenas a intensidade média da luz espalhada em uma dada direção, sem levar em conta as flutuações ou distribuições de frequência da luz. Nos experimentos de espalhamento de luz estático a intensidade da luz espalhada ( $I_\theta$ ) é medida em diferentes ângulos  $\theta$ . Se os centros de espalhamento são pequenos, como moléculas gasosas, comparados com o comprimento de onda da radiação (dimensões menores que  $\lambda/20$ ), a razão entre a luz incidente e a luz espalhada é conhecida como a razão de Rayleigh segundo a equação (8) [73; 75]:

$$R_\theta = \frac{I_\theta}{I_0} \cdot r^2 \quad (8)$$

onde  $R_\theta$  é a razão de Rayleigh,  $I_\theta$  é a luz espalhada,  $I_0$  é a luz incidente,  $r$  é a distância entre a partícula e o detector e  $\theta$  é o ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada.

Para sistemas diluídos, a razão de Rayleigh pode ser relacionada com a massa molar ( $M_w$ ) e a concentração ( $c$ ) pela equação (9):

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} \quad (9)$$

onde  $\Delta R_0$  é a diferença entre as razões de Rayleigh da solução e do solvente puro e  $K$  é a constante ótica, a qual é expressa por meio da equação (10):

$$K = \frac{4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2}{N_A \lambda^4} \quad (10)$$

onde  $n$  é o índice de refração do solvente,  $dn/dc$  é o incremento do índice de refração com a concentração do soluto,  $N_A$  é a constante de Avogadro e  $\lambda$  é o comprimento de onda [70; 73; 75; 76].

A razão de Rayleigh depende da polarizabilidade da macromolécula, que por sua vez é função do incremento do índice de refração,  $dn/dc$ . Para determinar esse parâmetro é utilizado um refratômetro diferencial, que tem um feixe de luz monocromática que atravessa uma célula que possui dois compartimentos, um dos compartimentos contém o solvente (referência) e o outro contém o soluto. A variação de  $n$  em função de  $c$  é dada pela equação (11):

$$\frac{\Delta n}{c} = \left( \frac{dn}{dc} \right) + \alpha_1 c + \dots \quad (11)$$

onde  $\alpha$  é a constante de proporcionalidade ou polarizabilidade. Colocando-se em gráfico os valores de  $\Delta n/c$  versus  $c$  e extrapolando-se para  $c = 0$ , obtém-se o incremento de  $n$  [73].

A equação (9) só é válida para soluções com concentrações diluídas, onde não existam interações intermoleculares. Em concentrações finitas ocorrem interações intermoleculares que devem ser levadas em consideração. As flutuações na polarizabilidade das moléculas dependem do potencial químico e, portanto, podem ser relacionadas à pressão osmótica. Dessa forma, a equação (9) pode ser expressa pela expansão virial (equação (12)):

$$\frac{Kc}{\Delta R_0} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots \quad (12)$$

onde  $A_2$  e  $A_3$  são o segundo e o terceiro coeficiente virial, respectivamente: eles descrevem as propriedades das interações intermoleculares a concentrações finitas. Valores de  $A_2$  positivos indicam boa interação polímero-solvente e valores negativos indicam que as interações polímero-polímero são maiores do que as interações

polímero-solvente. O terceiro coeficiente virial na maioria dos casos tem valores muito pequenos e é desprezado [73; 75].

Para macromoléculas nas quais o tamanho do novelo é maior do que  $\lambda/20$ , a luz espalhada varia com o ângulo de observação, isso porque o espalhamento poderá ocorrer a partir de vários centros da mesma partícula. Considerando essas diferenças de espalhamento, é necessário introduzir um fator de espalhamento ou fator de forma,  $P(\theta)$ , aos cálculos; assim, a equação (12) é transformada na equação (13) [77; 78]:

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{P(\theta)} \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots \right) \quad (13)$$

A equação (14) é empregada para a obtenção do fator de forma:

$$P(\theta) = 1 - \frac{1}{3} \left( \frac{4\pi n}{\lambda} \right)^2 R_g^2 \text{sen}^2 \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad (14)$$

onde  $R_g$  é o raio de giro da partícula. O fator de forma pode ser escrito em função do vetor de espalhamento  $q$ , levando à equação (15).

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \text{sen} \left( \frac{\theta}{2} \right) \quad (15)$$

A equação (14) pode ainda ser reescrita na forma da equação (15).

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \quad (16)$$

Nessa dedução, a expressão fator de forma é independente da forma da partícula, e pode ser aplicada contanto que  $R_g^2 q^2 < 1$ , isto é, para um pequeno valor de  $q$ , ou equivalentemente, um pequeno  $\theta$  [73; 75].

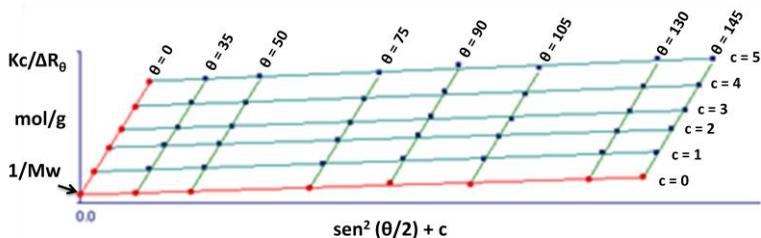
Incorporando as correlações impostas pelo fator de espalhamento na equação (12), chega-se á conhecida equação de Zimm (equação (17)) [77; 78]:

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \left( 1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) \cdot \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2C + \dots \right) \quad (17)$$

Para determinar a massa molecular, o raio de giro e o segundo coeficiente virial, a razão  $Kc/\Delta R_{\theta}$  versus  $[\text{sen}^2(\theta/2) + C]$ , a constante  $C$  é

escolhida arbitrariamente. A Figura 13 mostra um diagrama de espalhamento de Zimm, no qual duas extrapolações devem ser feitas:

- considerando o ângulo constante e extrapolando à concentração igual a zero, o coeficiente angular fornece o segundo coeficiente virial;
- considerando a concentração constante e extrapolando ao ângulo zero, obtém-se o coeficiente angular e a partir deste o raio de giro.



**Figura 13.** Um típico diagrama de Zimm. As linhas vermelhas são as extrapolações a ângulo zero e concentração zero.

#### 1.1.8.4.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico é descrito pela sigla DLS, a qual tem origem nas iniciais do nome em inglês “*Dynamic Light Scattering*”. As medidas de DLS permitem a rápida obtenção do coeficiente de difusão de macromoléculas em solução, considerando as flutuações na intensidade de luz espalhada em função do tempo, em uma dada direção, isto é, a detecção da intensidade de luz espalhada a um ângulo fixo. Essas flutuações se originam das variações no índice de refração dentro do volume de espalhamento, devido ao movimento browniano das partículas [73; 75].

O raio hidrodinâmico de partículas pode ser calculado por meio do método cumulativo e da análise de CONTIN para fornecer o coeficiente de difusão efetivo e o tamanho de partícula correspondente, e também através de dados de DLS em um procedimento que consiste

em ajustar a função de autocorrelação ( $G(\tau)$ ) por um decaimento exponencial de segunda ordem, conforme a equação 18:

$$G(\tau) = c[A_1 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_2}\right)]^2 \quad (18)$$

em que  $A_1$  e  $A_2$  são as contribuições relativas dos dois componentes (populações),  $\tau_1$  e  $\tau_2$  são os dois tempos de decaimento e  $c$  ( $0 < c < 1$ ) é o fator de coerência experimental [79]. O tempo de decaimento ( $\tau$ ) está relacionado com a frequência de relaxação ( $\Gamma$ ) conforme a equação 19.

$$\Gamma = \frac{1}{\tau} \quad (19)$$

As frequências de relaxação estão relacionadas com o coeficiente de difusão aparente e o vetor de onda do espalhamento, segundo a equação (20):

$$\Gamma = D \cdot q^2 \quad (20)$$

onde  $\Gamma$  é a frequência de relaxação,  $D$  é o coeficiente de difusão aparente e  $q$  é o vetor de espalhamento [72; 73].

Dentro do regime diluído,  $D$  varia linearmente com a concentração da amostra ( $c$ ), de acordo com a equação (21),

$$D = D_0(1 + k_D c + \dots) \quad (21)$$

onde  $D_0$  é o coeficiente de difusão à diluição infinita,  $k_D$  é o coeficiente “virial” hidrodinâmico relacionado com as interações soluto-soluto e de soluto-solvente. A equação de Stokes-Einstein (equação (22)) relaciona o coeficiente de difusão à diluição infinita e o raio hidrodinâmico ( $R_H$ ) [72]:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (22)$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura termodinâmica e  $\eta$  é a viscosidade do solvente [72; 73].

### 1.1.8.4.3. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

As medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) podem ser utilizadas para a caracterização estrutural interna e da conformação de cadeias no interior de micelas e cadeias poliméricas. A intensidade de espalhamento SAXS  $I(q)$  de uma solução isotrópica de partículas monodispersas incorporada em uma matriz com uma densidade eletrônica constante, após a normalização com o espalhamento do fundo do capilar preenchido com o solvente, é dada pela equação (23),

$$I(q) = N \cdot P(q) \cdot S(q) \quad (23)$$

onde  $N$  é o número de partículas por unidade de volume,  $P(q)$  é o fator de forma de uma partícula individual, e  $S(q)$  está relacionada ao fator de interferência das partículas, que surge a partir de correlações de longo alcance entre os centros de espalhamento. Para sistemas muito distantes, o que significa que a concentração de polímero é relativamente baixa,  $S(q) \sim 1$  e então  $I(q)$  é proporcional ao fator de forma  $P(q)$  dos objetos de dispersão, vinculado ao seu tamanho e forma.

Para a maioria das soluções diluídas onde não ocorre interação entre as partículas ( $S(q) = 1$ ), o espalhamento total resulta da soma dos espalhamentos de partículas individuais que não interagem. Pode-se então obter informações importantes sobre a forma e o tamanho das partículas espalhadoras. Porém, quando o sistema é composto por um número muito maior de partículas, a intensidade de espalhamento conterà contribuições dos fatores  $P(q)$  e  $S(q)$ . Neste caso, pode-se separar os fatores  $P(q)$  e  $S(q)$  de um mesmo espectro de espalhamento aplicando-se um tratamento matemático que inclua o perfil teórico de uma das contribuições [48].

Através das curvas de SAXS pode-se determinar o raio de giro ( $R_g$ ) de uma macromolécula. Assumindo que as partículas não interagem em solução pelo fato da concentração ser diluída, independentemente da forma, o valor de  $R_g$  pode ser obtido pela aproximação de *Guinier* a partir da equação (24), sendo essa aproximação somente válida para  $qR_g < 1$ .

$$I(q) = I(0) \exp\left(-\frac{R_g^2 q^2}{3}\right) \quad (24)$$

onde o  $R_g$  é o raio de giro. A partir de um gráfico de  $\ln(I(q))$  versus  $q^2$ , para a região dos ângulos próximos de zero ( $q \rightarrow 0$ ), espera-se um comportamento linear onde o coeficiente angular é igual a  $-R_g^2/3$ .

#### 1.1.8.5. Espectrofotometria de absorção Ultravioleta e Visível (UV-Vis)

Na espectrofotometria de absorção UV-Vis mede-se a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda. Nessa técnica, a amostra é estimulada pela aplicação de uma fonte de radiação eletromagnética na região do UV-Vis (faixa de comprimento de onda de 180 a 780 nm), onde uma parte da radiação pode ser absorvida em uma molécula para a excitação de elétrons para um estado de maior energia [53; 80].

As aplicações da espectroscopia de absorção de compostos orgânicos baseiam-se nas transições  $n$  ou  $\pi$  para um estado excitado  $\pi^*$ . Ambas as transições  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$  exigem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais  $\pi$ . Os grupos funcionais, nas moléculas, que são capazes de absorver radiação UV-Vis são chamados de *cromóforos* [53; 80], sendo que a intensidade da absorção e a posição da banda de absorção podem ser alteradas pela presença de substituintes ligados ao cromóforo, os quais são chamados de *auxócromos*.

A espectrofotometria de absorção é baseada na medida da transmitância ( $T$ ) ou da absorbância ( $A$ ) de soluções contidas em células transparentes com caminho óptico de  $b$  cm. De acordo com a lei de absorção, também conhecida por *lei de Beer-Lambert*, a concentração de um analito que absorve radiação está relacionada linearmente com a absorbância, como mostra a equação (25):

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (25)$$

onde  $I_0$  é a intensidade incidente,  $I$  é a intensidade transmitida,  $c$  é a concentração do absorvente e  $\epsilon$  é a absorvidade molar [53; 80].

Os espectros de UV de nucleotídeos e dos seus polímeros são indicadores valiosos para visualizar mudanças na composição química ou nas estruturas tridimensionais, assim como no acompanhamento das interações com outros compostos. As bases de um polinucleotídeo absorvem a luz em um comprimento de onda de 260 nm, mas na dupla hélice do DNA essa absorção é parcialmente suprimida. Isto porque o empilhamento das bases leva a um acoplamento entre a transição dos cromóforos vizinhos, isto é, os elétrons  $\pi$  das bases interagem entre si. A desnaturação térmica do DNA pode ser acompanhada por um aumento na absorção máxima (260 nm) no UV, pois quando o DNA funde, as ligações de hidrogênio, que antes uniam os pares de bases na dupla hélice, se rompem e a absorção aumenta em cerca de 20-30%. Isso é chamado de efeito hipercrômico [19; 22].

#### 1.1.8.6. Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (CD) é um método que utiliza a luz circularmente polarizada, que é produzida quando duas ondas eletromagnéticas linearmente polarizadas se propagam em planos perpendiculares com diferença de fase de 90°. A absorção, pelas moléculas quirais, da luz circularmente polarizada no sentido horário e anti-horário ocorre de maneira desigual. Essa diferença na absorbância pode ser medida por um espectropolarímetro de CD, pela diferença dos coeficientes de absorvidade molar, conforme a equação (26):

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad (26)$$

onde  $\varepsilon_L$  corresponde à absorvidade molar para a luz circularmente polarizada à esquerda e  $\varepsilon_R$  corresponde à absorvidade molar para a luz circularmente polarizada à direita [81].

A descrição teórica de espectros de CD de moléculas tão grande como o DNA é muito complexa, de modo que o método não é capaz de fornecer informação estrutural sobre as moléculas em nível atômico. Por essa razão, a espectroscopia de CD é principalmente usada empiricamente em estudos de DNA [81].

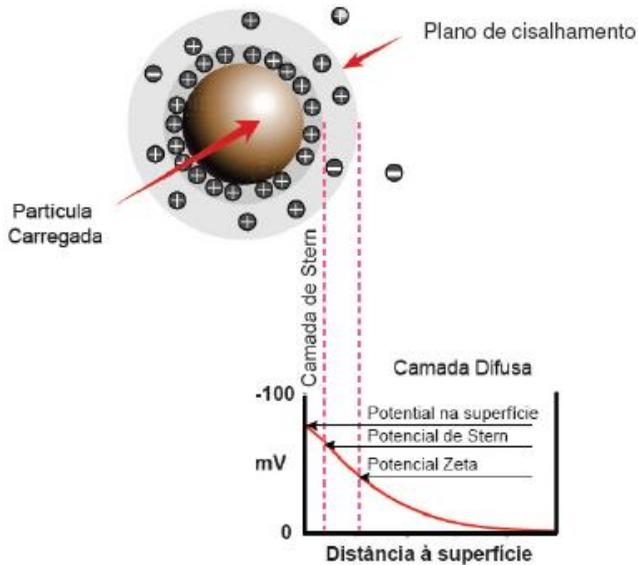
O CD é uma técnica muito utilizada para estudar mudanças conformacionais de proteínas [82] e DNA [81], além de auxiliar no acompanhamento de processos de desnaturação e renaturação de

proteínas, na investigação de interações do DNA com polímeros [83] e com nanopartículas [84].

#### 1.1.8.7. Potencial zeta

Quando uma partícula coloidal apresentando carga de superfície é dispersa em um líquido, os íons de carga oposta (chamados de contra-íons) na suspensão são atraídos para a partícula formando uma camada firmemente presa ao redor da superfície da partícula, chamada de camada de *Stern*. Os contra-íons adicionais são atraídos ainda pela partícula coloidal carregada, resultando em um aumento na concentração de contra-íons próximos à superfície. Isso resulta do equilíbrio dinâmico na formação de uma camada difusa de contra-íons, a fim de neutralizar a partícula carregada. Essa alta concentração de contra-íons próximos à superfície diminui gradualmente com a distância até que atinja potencial nulo [85].

Assim, existe uma dupla camada elétrica ao redor de cada partícula. A dupla camada elétrica é constituída por duas partes: uma região interna chamada de camada de *Stern*, onde os íons estão fortemente ligados, e outra denominada de camada difusa (ou camada de *Gouy-Chapman*) que se distribui em torno da primeira (Figura 14).



**Figura 14.** Representação esquemática da dupla camada elétrica. Figura adaptada de [www.malvern.com](http://www.malvern.com) [86].

O potencial zeta, é o efetivo potencial de superfície no plano de cisalhamento hidrodinâmico que está próximo da interface sólido-líquido, é um parâmetro importante que regula o comportamento eletrocinético de partículas em solução [87].

A medida do potencial zeta é realizada pela aplicação de um campo elétrico em toda a dispersão. As partículas com carga migram para o eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional ao potencial zeta e essa velocidade recebe a denominação de mobilidade eletroforética. Esta é medida utilizando a técnica de anemometria laser Doppler. Assim, obtém-se o potencial zeta pela aplicação da lei de Henry (equação (27)).

$$u_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (27)$$

Onde,  $u_E$  é a mobilidade eletroforética,  $\varepsilon$  a constante dielétrica do solvente,  $\zeta$  o potencial zeta,  $\eta$  a viscosidade do solvente e  $f(ka)$  as funções de Henry [88].



## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivos principais sintetizar e caracterizar a PEI com grupos *n*-alquila (com 4, 6, 8 e 12 carbonos) e com o nucleosídeo uridina, assim como investigar as propriedades físico-químicas, a auto-associação das PEIs modificadas hidrofobicamente e suas associações com o SDS em meio aquoso, além de investigar a interação das PEIs modificadas hidrofobicamente e da PEI-nucleosídeo com DNA, na ausência e na presença de SDS, avaliando o tamanho, morfologia e a intensidade da interação.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar derivados da PEI com a introdução de diferentes grupos hidrofóbicos, com 4, 6, 8 e 12 carbonos, a partir de brometos de alquila, tendo um grau de substituição de 10%;
- Sintetizar derivados da PEI com um nucleosídeo (uridina);
- Caracterizar os derivados preparados através de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$ );
- Determinar parâmetros como viscosidade intrínseca, raio de giro, raio hidrodinâmico, propriedades dinâmicas de auto-agregação, pelas técnicas DLS, SAXS, tensão superficial, viscosidade e fluorescência;
- Estudar o processo de interação das PEIs hidrofobicamente modificadas com SDS através das técnicas de SAXS, tensão superficial, pH e fluorescência;
- Estudar o processo de interação dos polímeros modificados com DNA, na ausência e na presença de SDS, através de análises de UV-Vis, fluorescência, viscosidade, dicróísmo circular, DLS, SAXS e potencial zeta.



## CAPÍTULO II

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. REAGENTES E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

O SDS foi obtido da Sigma-Aldrich, com pureza de 99%, e foi usado sem purificação prévia. O pireno (Sigma-Aldrich, 99%) foi recristalizado três vezes a partir de metanol e secou-se antes da utilização. O brometo de etídio foi procedente da Sigma-Aldrich, com pureza de 99%. A PEI ramificada com massa molar de  $25000 \text{ g mol}^{-1}$  foi obtida da Sigma-Aldrich. As razões de grupos amino primários/secundários/terciários para este polímero foram 1:2:1, o que corresponde a uma ramificação para cada 3-3,5 nitrogênios presentes. O 1-bromobutano, 1-bromo-hexano, 1-bromooctano e 1-bromododecano, todos com pureza de 99%, foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação. O sal de sódio do DNA do timo de bezerro foi obtido da Sigma-Aldrich. A uridina, a 4-dimetilaminopiridina (DMAP), o *p*-toluenossulfonato de piridínio (PPTS), o *orto*-formiato de trimetila e o cloreto de tosila, todos com 99% de pureza, foram procedentes da Sigma-Aldrich. Os solventes: álcool *tert*-butílico, etanol, diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), acetato de etila, hexano, piridina, clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), dimetilformamida (DMF), ácido clorídrico (HCl) e tetraidrofurano (THF), procedentes da Vetec, foram purificados conforme a literatura [89] e armazenados sobre peneira molecular ativada. O cloreto de tosila, carbonato de potássio, sulfato de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e tris(hidroximetil)aminometano (Tris) foram adquiridos da Merck, com pureza de 99% e foram utilizados sem purificação. A membrana de diálise utilizada foi da Spectra/Por<sup>®</sup> 6 (MWCO =  $3500 \text{ g mol}^{-1}$ ).

A água deionizada foi obtida por meio de destilação, seguido de purificação empregando um sistema Millipore Milli-Q, e foi utilizada em todas as medições. As soluções estoques da PEI e PEI alquilada foram preparadas em água sob agitação magnética durante pelo menos 12 horas, em seguida foram feitas as diluições conforme cada técnica utilizada.

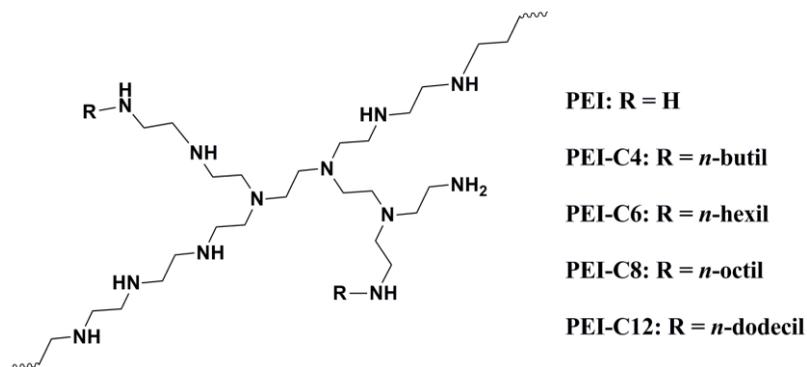
Todos os estudos realizados com o DNA foram realizados em solução tampão de 20,0 mmol L<sup>-1</sup> de Tris/HCl, pH 7,5 com 10,0 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl. Foram preparadas soluções estoques de DNA e das PEIs com concentração de 200,0 µg mL<sup>-1</sup>, de brometo de etídio com concentração de 1,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> e de SDS com concentração de 1,0×10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>. Nos estudos com DNA as concentrações foram expressas pela razão de nitrogênio (N) presente na PEI e por fósforo (P) presente no DNA. Considera-se que 43,1 g mol<sup>-1</sup> corresponde a cada monômero da PEI e contém um grupo amino, e que 330,0 g mol<sup>-1</sup> corresponde a cada unidade de repetição do DNA contendo um fosfato [90; 91]. As razões variaram de N/P 0,0 a 10,5, na ausência e na presença de 5,0 µmol L<sup>-1</sup> de SDS.

## 2.2. MODIFICAÇÃO DA PEI

### 2.2.1. Preparação das PEIs alquiladas

A metodologia utilizada para sintetizar os polímeros com os grupos *n*-alquila (*n* = 4, 6, 8 e 12) foi adaptada do trabalho realizado por Park e colaboradores [17]. O 1-bromoalcano (12,0 mmol) foi adicionado gota-a-gota em uma solução agitada vigorosamente de PEI (5,28g; 120,0 mmol por monômero) em 65,0 mL de álcool *tert*-butílico contendo excesso de carbonato de potássio (20,73g; 150,0 mmol). A mistura reacional foi agitada por 5 dias em temperatura ambiente. Após este período, a mistura reacional foi colocada em uma membrana de diálise (Spectra/Por<sup>®</sup> 6, MWCO = 3500 g mol<sup>-1</sup>). Foi feita a diálise por 3 dias para remover o 1-bromoalcano, o álcool *tert*-butílico e o carbonato de potássio. Após essa etapa, a solução foi liofilizada e o produto foi caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H. A ausência de sinais correspondentes aos hidrogênios de 1-bromoalcanos e do álcool *tert*-butílico nos espectros de RMN confirmaram a pureza dos produtos. RMN de <sup>1</sup>H para o PEI-C4 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,89 ppm (*t*, H<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), δ 1,30 ppm (*m*, H<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), δ 1,40 ppm (*m*, H<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), δ 2,39 ppm (*m*, H<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), δ 2,5–2,8 ppm (*m*, -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-), δ 4,00 ppm (*bs*, -NH-); RMN de <sup>1</sup>H para o PEI-C6 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,83 ppm (*t*, H<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), δ 1,23 ppm (*m*, H<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-), δ 1,41 ppm (*m*,

$\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  2,35 ppm (*m*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  2,5–2,8 ppm (*m*,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  4,00 ppm (*bs*,  $-\text{NH}-$ ); RMN de  $^1\text{H}$  para o PEI-C8 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,84 ppm (*t*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  1,23 ppm (*m*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  1,43 ppm (*m*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  2,37 ppm (*m*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  2,5–2,8 ppm (*m*,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  4,30 ppm (*bs*,  $-\text{NH}-$ ); RMN de  $^1\text{H}$  para o PEI-C12 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0,85 ppm (*t*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  1,23 ppm (*m*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  1,45 ppm (*m*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  2,38 ppm (*m*,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  2,5–2,8 ppm (*m*,  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  4,17 ppm (*bs*,  $-\text{NH}-$ ).



**Figura 15.** Estruturas da PEI e das PEIs hidrofobicamente modificadas.

### 2.2.2. Síntese da PEI decorada com o grupo uridinil

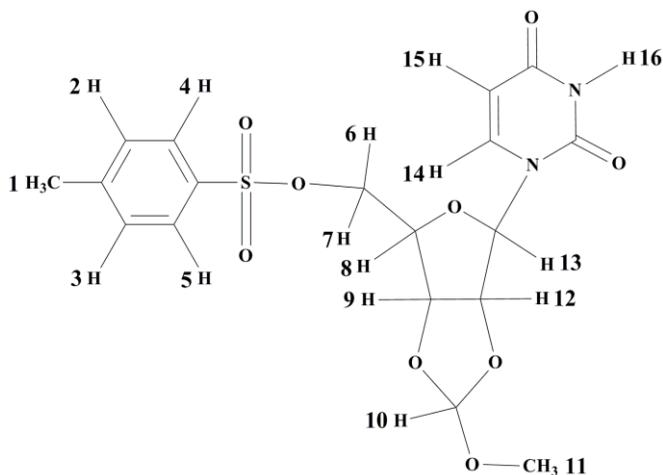
A síntese da PEI decorada com a uridina foi realizada em duas etapas, conforme mostrado abaixo. Na primeira etapa, foi utilizada a metodologia de Davisson e colaboradores [92] e na segunda etapa foi empregada a metodologia de Park e colaboradores [17] com algumas adaptações.

#### 2.2.2.1. Síntese da uridina tosilada

Foram dissolvidas a uridina (4,88 g; 20,0 mmol) e o PPTS (0,50 g; 2,0 mmol) em 25,0 mL de THF seco em um balão de duas bocas em

atmosfera de argônio. Em seguida, foi adicionado com uma seringa o *orto*-formiato de trimetila (10,6 g; 100,0 mmol) gota-a-gota, sob agitação constante, em um intervalo de 30 minutos. A mistura reacional foi então agitada por 3 horas. Água (0,5 mL) foi adicionada, a agitação foi continuada por mais 30 minutos e em seguida foi adicionado piridina (0,5 mL) para evitar a hidrólise, sendo que a seguir o solvente foi removido em bomba de vácuo. O sólido resultante foi purificado por coluna de sílica gel, utilizando mistura de acetato de etila/hexano nas proporções de 40/60; 50/50 e 60/40, o que resultou em um produto, uridina protegida, com um rendimento de 43,7% (2,50 g; 8,74 mmol).

O produto seco foi dissolvido em 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro em um balão de duas bocas, ao qual foram adicionados a seguir, gota-a-gota, o DMAP e o cloreto de tosila previamente dissolvidos em 10,0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anidro. A mistura reacional foi agitada por 24 horas e após esse tempo, foi adicionado THF e o precipitado resultante foi removido por filtração. A solução foi concentrada como uma espuma, dissolvida em 100,0 mL de  $\text{CHCl}_3$ , e lavada com 3 porções de 20,0 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio a 5%. A fase orgânica foi seca usando-se sulfato de sódio anidro. O produto foi purificado por meio de uma coluna de sílica gel, foi utilizado mistura de acetato de etila/hexano nas proporções de 40/60; 50/50 e 60/40, tendo resultado, após rotaevaporação do solvente, em 2,05 g de um sólido branco, a uridina tosilada (Figura 16) com rendimento de 53%. O produto foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ . O RMN de  $^1\text{H}$  para a uridina tosilada (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) apresentaram diastereoisômeros [92]:  $\delta$  2,42 ppm (*t*, H1),  $\delta$  3,29 e 3,36 ppm (*t*, H11),  $\delta$  4,28 ppm (*m*, H6 e H7),  $\delta$  4,50 ppm (*m*, H9),  $\delta$  4,83 ppm (*m*, H8),  $\delta$  5,01 ppm (*m*, H12),  $\delta$  5,69 ppm (*d*,  $J = 2,3$  Hz, H13),  $\delta$  5,73 ppm (*d*,  $J = 8,0$  Hz, H15),  $\delta$  5,88 e 5,94 ppm (*s*, H10),  $\delta$  7,22 ppm (*d*,  $J = 8,2$  Hz, H2 e H3),  $\delta$  7,32 ppm (*d*,  $J = 8,0$  Hz, H4 e H5),  $\delta$  7,77 ppm (*d*,  $J = 8,4$  Hz, H14),  $\delta$  9,19 ppm (*s*, H16). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a uridina tosilada está apresentado em anexo A.

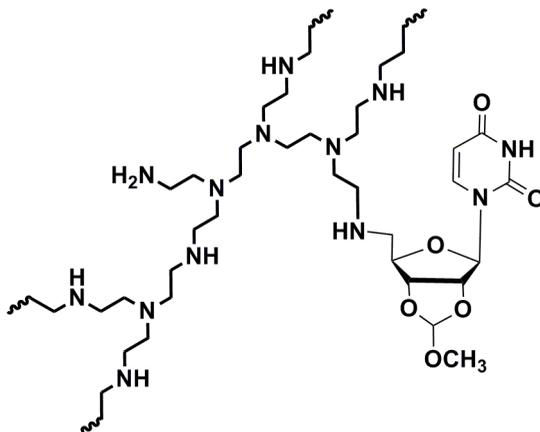


**Figura 16.** Representação da estrutura molecular da uridina tosilada.

#### 2.2.2.2. Síntese da PEI decorada com o grupo uridinil

A uridina tosilada (0,7 g; 1,6 mmol) foi dissolvida em DMF (5,0 mL) e adicionada gota-a-gota para uma solução agitada vigorosamente da PEI (0,23 g; 5,23 mmol por monômero) em 10,0 mL DMF, contendo excesso de carbonato de potássio (0,87 g; 6,30 mmol). A mistura reacional foi agitada por 5 dias em temperatura ambiente. Após esse período, a mistura reacional foi colocada em uma membrana de diálise (Spectra/Por<sup>®</sup> 6, MWCO = 3500 g mol<sup>-1</sup>). Foi feita a diálise por 3 dias para remover a uridina tosilada, o DMF e o carbonato de potássio que não reagiram. Após essa etapa, a solução foi liofilizada e o produto foi caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H. O mesmo procedimento foi realizado com 0,22 g (0,50 mmol) de uridina tosilada, 0,44 g (10,0 mmol por monômero) da PEI e 0,80 g (5,79 mmol) de carbonato de potássio. Foi feita uma tentativa de obtenção do espectro de RMN de <sup>1</sup>H. Os produtos foram solúveis somente em água deuterada, o que dificultou o aparecimento de alguns sinais. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) para PEI–Uri5% (anexo B) apresentou sinais característicos da PEI em  $\delta$  2,3–3,1 ppm, e do grupo uridinil, os –OCH<sub>3</sub> em  $\delta$  3,30 ppm e 3,38 ppm, os hidrogênios do acetal em  $\delta$  6,06 ppm e 6,14 ppm e o sinal do hidrogênio do anel em  $\delta$  7,59 ppm. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) para PEI–Uri15% (anexo C) apresentou

sinais característicos da PEI em  $\delta$  2,3-3,1 ppm, e do grupo uridil, os  $-\text{OCH}_3$  em  $\delta$  3,26 ppm e 3,34 ppm, os hidrogênios do acetal em  $\delta$  6,01 ppm e 6,09 ppm e o sinal do hidrogênio do anel em  $\delta$  7,55 ppm.



**Figura 17.** Estrutura da PEI decorada com a uridina.

## 2.3. CARACTERIZAÇÃO

### 2.3.1. Viscosidade

As medidas de viscosidade foram feitas em um viscosímetro SCHOTT AVS 350. Foi utilizado um viscosímetro capilar de *Cannon-Fenske*, de número 75, diâmetro de 0,54 mm, equipado com um sistema óptico de detecção de fluxo. Para as medições, soluções estoques de cada polímero com  $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foram preparadas em água deionizada e utilizadas para preparar  $10,0 \text{ mL}$  de cada solução mais diluída, entre  $2,0$  e  $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Após foram determinados os tempos de escoamento do solvente e das soluções preparadas de cada polímero.

As medidas de viscosidade para os sistemas com DNA e as PEIs foram feitas usando-se o mesmo aparelho e as soluções foram feitas a partir das soluções estoques do DNA e das PEIs (ver item 2.1.), mantendo a concentração do DNA constante ( $25,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e aumentando de cada PEI, as concentrações foram expressas em razão N/P e cada solução com volume total de  $6,0 \text{ mL}$ . A viscosidade relativa

foi calculada considerando o tempo de escoamento do DNA como  $t_0$ . Para todas as medidas a temperatura foi controlada com um banho termostatzado a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

### 2.3.2. Tensiometria

As medidas de tensão superficial foram feitas utilizando o método do anel *Du Nouy* e as medidas foram realizadas em um tensiômetro da KRUSS GMBH, modelo K 8, com escala de divisão de  $0,1 \text{ mN m}^{-1}$  equipado com um anel de Pt-Ir-20. O anel foi lavado com uma solução de ácido clorídrico ( $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) e enxaguado com água deionizada várias vezes antes de cada medição. Para as medições, soluções estoques de cada polímero com  $20,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foram preparadas em água deionizada e foram utilizadas para preparar  $10,0 \text{ mL}$  de cada solução mais diluída de  $0,1$  a  $20,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Todas as soluções de polímeros preparadas foram deixadas em repouso por pelo menos duas horas antes da utilização. A temperatura foi mantida a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  com o uso de um banho termostatzado.

### 2.3.3. Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência do pireno foram registrados num espectrofluorímetro F4500 Hitachi equipado com um suporte de célula termostatzado fixado em  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  e as amostras foram continuamente agitadas numa célula de quartzo com as quatro faces polidas e com caminho óptico de  $10,0 \text{ mm}$ . A concentração do pireno foi fixada em  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para evitar a formação de excímeros, a partir de uma solução estoque de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em etanol. As soluções das PEIs foram preparadas a partir desta solução estoque de pireno. Para certificar-se de que os dados experimentais foram obtidos em uma situação de equilíbrio do sistema, todas as soluções estoques foram preparadas rotineiramente com agitação magnética suave por 12 horas. Então, as soluções estoque de SDS foram preparadas usando-se as soluções contendo pireno e cada PEI e foram deixadas atingir o equilíbrio pelo menos por 4 horas antes de se registrar o espectro de emissão de fluorescência. Ambas as configurações de fenda de largura de excitação e de emissão dos monocromadores foram

ajustadas para 2,5 nm. As amostras foram excitadas a 336,0 nm, e os espectros de emissão foram registrados de 360,0 a 500,0 nm. O procedimento a seguir foi aplicado em todas as experiências realizadas com o pireno. O espectro de emissão de fluorescência foi registrado após a adição de cada volume de solução de polímero ou surfactante. A razão de  $I_1/I_3$  foi considerada como a razão entre as intensidades máximas para a primeira (372,8 nm) e para a terceira (384,0 nm) bandas de emissão da sonda (ver item 1.8.3. da Introdução).

Os espectros de emissão de fluorescência do brometo de etídio nos sistemas com DNA foram realizados no mesmo espectrofluorímetro. Para todos os sistemas DNA-PEIs a concentração de brometo de etídio foi fixada em  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> e a concentração de DNA em 25,0 µg mL<sup>-1</sup> e as concentrações de cada PEI foi de 1,0 a 70,0 µg mL<sup>-1</sup>, as misturas foram expressas em razão N/P e cada solução com volume total de 1,0 mL. Ambas as configurações de fenda de largura de excitação e de emissão dos monocromadores foram ajustados para 5,0 nm. As amostras foram excitadas em 518,0 nm, e os espectros de emissão de fluorescência foram registrados de 530,0 a 700,0 nm. O espectro foi realizado para cada solução preparada dos polímeros com DNA. A intensidade máxima de emissão ocorreu em 594,0 nm.

#### **2.3.4. Medidas de pH**

Os valores de pH foram obtidos do seguinte modo: uma solução aquosa da PEI (2,0 mg mL<sup>-1</sup>) foi preparada e utilizada para fazer uma solução estoque de SDS em uma concentração de  $4,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>. A solução da PEI foi mantida numa célula termostatizada a  $25,0 \pm 0,1$  °C e foi titulada adicionando-se pequenas quantidades da solução estoque de SDS com o auxílio de uma bureta semi-automática da Metrohm Herisau (tipo multi-bureta modelo E-485). Após cada adição da solução estoque do SDS o pH foi medido utilizando um peagâmetro Beckman modelo φ71, equipado com um eletrodo de vidro combinado. O peagâmetro foi calibrado previamente com soluções padrões de pH = 7,0 e pH = 10,0.

### 2.3.5. Medidas de DLS

As medidas de DLS foram feitas no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre no Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular (LINDIM). As soluções foram analisadas em um ângulo fixo de 90°, no espectrômetro de espalhamento de luz Brookhaven Instruments Corporation (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-9000), com laser de He-Ne (comprimento de onda de 632,8 nm) como fonte de radiação.

As medidas de DLS também foram analisadas em diferentes ângulos 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 e 140°, em um goniômetro ALV-7002 multicorrelator, com faixa de detecção de 32° a 150° operado com laser de 22 mV Ne/Ar ( $\lambda = 628,2$  nm).

As soluções contendo os sistemas com DNA e cada PEI foram feitas a partir das soluções estoques (ver item 2.1.), mantendo a concentração do DNA constante em 50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , as concentrações foram expressas em razão N/P e cada solução com volume total de 5,0 mL.

O incremento do índice de refração ( $dn/dc$ ) foi determinado em um refratômetro diferencial BI-DNDC da Brookhaven Instruments Corporation, com um *software* DNDCW Windows<sup>TM</sup>, com laser de 620,0 nm e as concentrações das soluções aquosas das PEIs variaram de 1,0 a 10,0  $\text{mg mL}^{-1}$ .

### 2.3.6. Medidas de SAXS

Os experimentos de SAXS foram realizados na linha D11A-SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP, Brasil. Foram executadas a temperatura ambiente (25,0 °C) e o comprimento de onda ( $\lambda$ ) do feixe incidente foi definido como 0,1488 nm. As amostras foram injetadas em um suporte de 1,0 mm de espessura, especialmente desenvolvidos para a linha de SAXS do LNLS [93]. A luz do feixe incidente cruzou as amostras através de um tubo evacuado ( $P < 0,1$  mbar) e foi espalhada para um detector 2D CCD marCCD com área ativa de 16,0  $\text{cm}^2$ . A distância entre a amostra e o detector foi ajustada em 1479,75 mm (o benoato de prata foi usado como padrão de calibração para a distância entre amostra e detector, pois possui uma estrutura lamelar bem conhecida, com  $d = 58,48$  Å).

Nestas condições, a faixa de cobertura do vetor de espalhamento  $q$  foi de 0,10 a 2,3 nm<sup>-1</sup>. Em todos os casos, as imagens 2D foram consideradas isotrópicas e foram normalizadas levando-se em consideração o decréscimo da intensidade do feixe incidente durante a medida experimental. O procedimento acima foi realizado utilizando o software FIT2D desenvolvido por A. Hammersley [94]. Além disso, os resultados das curvas  $I(q)$  vs.  $q$  foram corrigidos pela subtração do espalhamento da água ou tampão utilizados como solvente.

### **2.3.7. Espectrofotometria de UV-Vis**

As medidas de absorbância foram feitas utilizando um espectrofotômetro de UV-Vís da HP modelo 8452A com arranjo de diodo, usando-se cubeta de quartzo termostaticada à temperatura controlada de 25,0 ± 0,1 °C, por intermédio de um banho termostaticado acoplado ao sistema. Por esse método, foi possível acompanhar a formação de complexos formados pela PEI e suas derivadas com o DNA, em um comprimento de onda fixo de 260,0 nm. As soluções com diferentes razões N/P foram preparadas a partir das soluções estoque do DNA e das PEIs (ver item 2.1.), mantendo a concentração de DNA constante em 25,0 µg mL<sup>-1</sup> e as concentrações de cada PEI variou de 1,0 a 70,0 µg mL<sup>-1</sup> com volume total de 1,0 mL para cada solução.

A desnaturação térmica foi avaliada através de dados de UV-Vis. Os espectros foram coletados a cada aumento de 2,0 °C de temperatura, até 90,0 °C. A desnaturação foi observada e calculada através do ponto médio do aumento da curva de absorção no UV em 260,0 nm.

### **2.3.8. Potencial zeta**

As medidas para a determinação do potencial zeta dos sistemas DNA-polímero foram realizadas em temperatura de 25,0°C, utilizando o equipamento Zetasizer ZS, da Malvern. As amostras foram colocadas numa cubeta adequada para análise. O instrumento é equipado com um laser He-Ne e opera em comprimento de onda de 633,0 nm e com ângulo de detecção de 173°. As soluções dos sistemas DNA-PEIs foram

preparadas conforme a descrição feita para espectrofotometria de UV-Vis (item 2.3.7.).

### **2.3.9. Medidas de CD**

Os estudos de CD foram realizados em um espectropolarímetro Jasco (modelo J-815), em temperatura ambiente. Todas as medidas foram feitas em uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico. Cada espectro coletado representou a soma e a média de 5 varreduras na faixa de comprimento de onda de 220,0 nm a 370,0 nm. As soluções dos sistemas DNA-PEI foram preparadas a partir das soluções estoque do DNA e das PEIs (ver item 2.1.), manteve-se a concentração de DNA constante em  $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de DNA e concentrações crescentes de cada PEI, expressas em razões N/P com volume total de 1,0 mL para cada solução.



## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões serão apresentados em três partes: a primeira, mostrando o estudo das propriedades das soluções aquosas de DNA na presença de PEI; a segunda apresenta o estudo das propriedades das soluções de DNA na presença de PEIs decoradas com grupos hidrofóbicos ou com uridina; e a terceira, qual a influência do SDS na formação dos complexos de DNA com a PEI, PEI-C12 e PEI-Uri 15%.

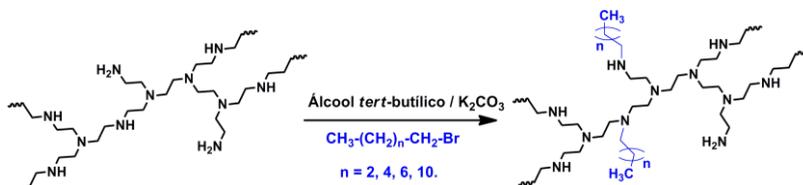
#### 3.1. PROPRIEDADES DAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE PEIS HIDROFOBICAMENTE MODIFICADAS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE SDS

Embora na literatura encontram-se a utilização de diferentes técnicas para investigar a interação da PEI com SDS em solução aquosa [41; 95; 96; 97; 98], poucos trabalhos são relacionados com as PEIs modificadas. A fim de compreender mais profundamente a função das PEIs hidrofobicamente modificadas nesses sistemas complexos, foi abordado um estudo do comportamento das PEIs em água na ausência e na presença de SDS. O entendimento dessas interações será fundamental para compreender o comportamento nas interações das PEIs modificadas em solução aquosa contendo DNA, na ausência e na presença de SDS.

Assim, neste capítulo, foi feita a síntese de quatro PEIs hidrofobicamente modificadas por alquilação parcial da PEI com 1-bromo-butano (PEI-C4), 1-bromo-hexano (PEI-C6), 1-bromooctano (PEI-C8) e 1-bromododecano (PEI-C12). As propriedades físico-químicas destas PEIs decoradas foram então estudadas em solução aquosa na ausência e na presença de SDS utilizando técnicas como a viscosidade, tensão superficial, fluorescência e SAXS.

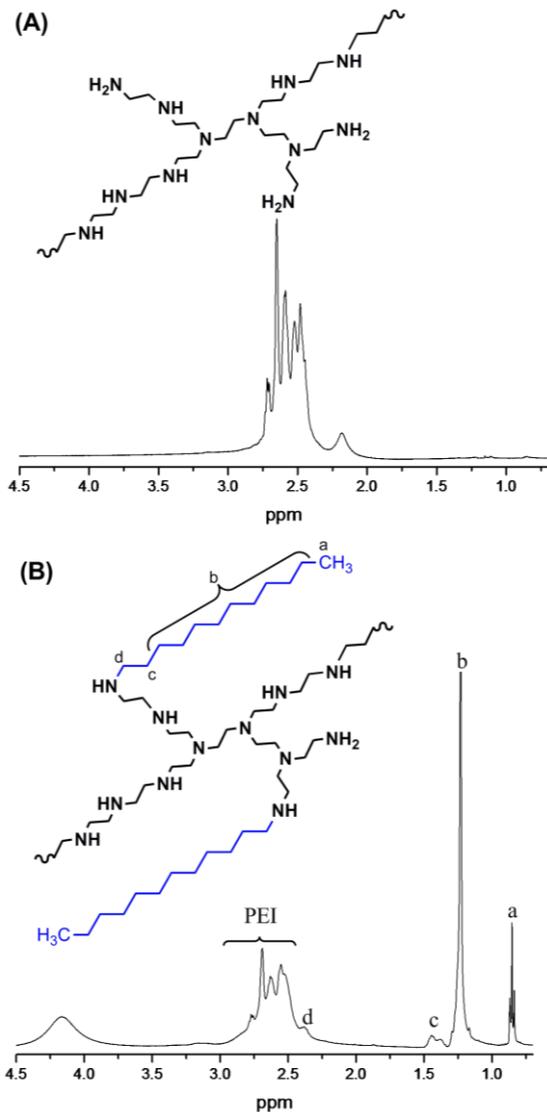
### 3.1.1. Síntese e caracterização

As PEIs modificadas, PEI-C4, PEI-C6, PEI-C8 e PEI-C12, foram preparadas por um método adaptado com base no que foi descrito por Daewon e colaboradores [17], por meio da alquilação dos grupos amino da PEI com os correspondentes bromo-alcenos (Figura 18).



**Figura 18.** Esquema da obtenção das PEIs alquiladas.

Os polímeros modificados foram caracterizados por RMN de  $^1H$ . A Figura 19A mostra o espectro de RMN de  $^1H$  para a PEI, exibindo o grupo  $-CH_2CH_2N-$  em  $\delta$  2,1–3,0 ppm.



**Figura 19.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da PEI (A) e PEI-C12 (B) (a,  $\delta$  0,85 ppm H<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-; b,  $\delta$  1,23 ppm H<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-; c,  $\delta$  1,45 ppm H<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-; d,  $\delta$  2,38 ppm H<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-).

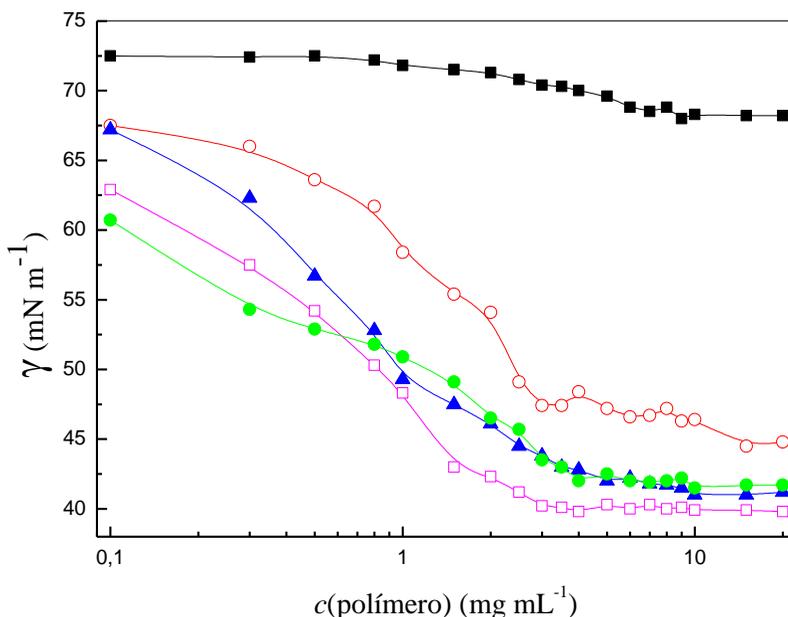
O sinal em  $\delta$  2,2 ppm foi atribuído aos hidrogênios dos grupos amino e desaparece com a adição de uma gota de água deuterada ao tubo de RMN. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da PEI-C12 na Figura 19B mostra três sinais entre  $\delta$  0,80 e 2,0 ppm (ausente no espectro da PEI), que relacionado com os grupos dodecilas ligadas aos grupos amino, especificamente em  $\delta$  0,85 ppm (a,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ),  $\delta$  1,23 ppm (b,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ) e  $\delta$  1,45 ppm (c,  $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ). Além disso, um sinal em  $\delta$  2,38 ppm (d) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos da cadeia alquílica ligada diretamente ao nitrogênio, sendo imediatamente adjacente à região dos grupos etileno da PEI ( $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-$ ) (e,  $\delta$  2,5-2,8 ppm). Isso foi confirmado através da análise de uma espectrometria de correlação homonuclear ( $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY), que revelou que os hidrogênios em  $\delta$  2,38 ppm e  $\delta$  1,45 ppm são spin-spin acoplados uns aos outros. Além disso, as nossas observações são muito semelhantes aos da descrição de uma PEI derivatizada por Cheng e colaboradores [15]. Com a alquilação, o sinal correspondente à presença dos grupos  $\text{NH}_2$  da PEI em  $\delta$  2,2 ppm desaparece, com o aparecimento de um novo sinal em  $\delta$  4,17 ppm, devido à presença dos grupos NH alquilados. Isso foi confirmado pelo fato de que a adição de água deuterada à solução da PEI alquilada provocou o desaparecimento completo do sinal em  $\delta$  4,17 ppm. Assim, embora em princípio a alquilação possa também ocorrer com os grupos amino secundários e terciários, estes dados mostram que os grupos amino primários foram preferencialmente alquilados.

O grau de substituição em cada PEI derivatizada foi estimado a partir da integração das áreas dos sinais correspondentes aos grupos  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$  e  $-\text{CH}_3$ . Os graus de substituição encontrados para PEI-C4, PEI-C6, PEI-C8 e PEI-C12 foram de 9,2%, 9,2%, 9,1% e 9,8%, respectivamente.

### **3.1.2. Tensão superficial e fluorescência das PEIs na ausência de SDS**

Foi analisada a atividade na superfície para as PEIs modificadas através de um tensiômetro de anel. A Figura 20 mostra os valores de tensão superficial para a PEI, PEI-C4, PEI-C6, PEI-C8 e PEI-C12 em função da concentração de polímero. Enquanto a PEI não apresentou atividade na superfície, as PEIs modificadas exibiram um

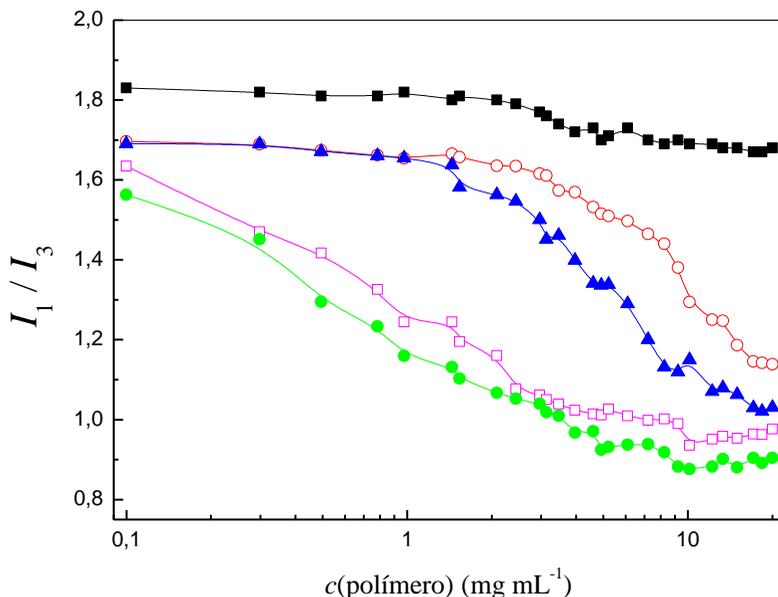
comportamento muito diferente, uma vez que a tensão superficial diminui com o aumento da concentração de polímero. Este comportamento é semelhante ao observado por surfactantes clássicos em que a tensão superficial mostra um decréscimo com o aumento da  $c(\text{surfactante})$  até um valor constante da tensão superficial. Um comportamento semelhante foi observado por Griffiths e colaboradores [13], que estudaram a PEI modificada com 1,2-epoxidodecano com 1% e 10% de substituição.



**Figura 20.** Tensão superficial em função da concentração da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●) a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

Os estudos de tensão superficial motivaram uma investigação semelhante através da técnica de fluorescência utilizando o pireno como sonda (ver seção 1.8.3 da Introdução). A Figura 21 mostra a razão  $I_1/I_3$  para a emissão de fluorescência do pireno em função da concentração da PEI e PEIs modificadas. Em primeiro lugar, é importante observar que para a PEI, a razão  $I_1/I_3$  exibe uma pequena alteração com o aumento da concentração da PEI, mantendo-se no intervalo de 1,68–1,80, o que é

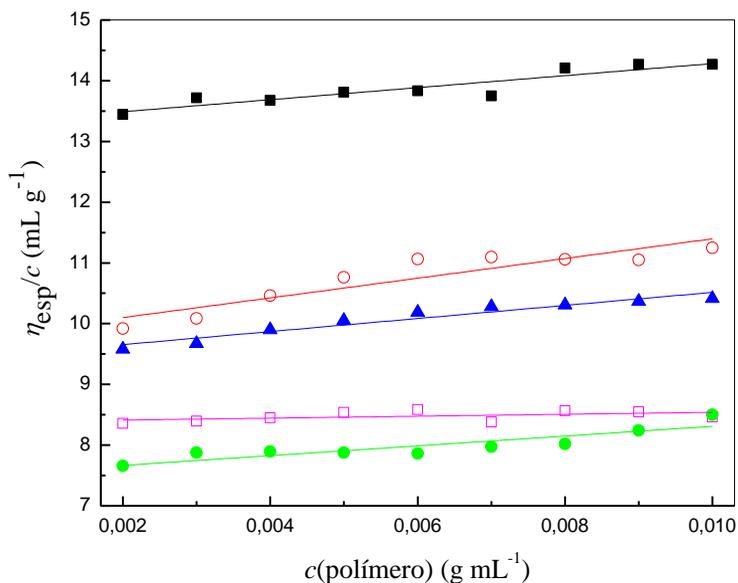
consistente com o valor reportado em água [54], sugerindo que a PEI não possui domínios hidrofóbicos. Porém, para as PEIs modificadas, os valores da razão  $I_1/I_3$  diminuem com o aumento da concentração de polímero de 1,80 em água pura para um valor mínimo, que é dependente do grupo alquil ligado a PEI. Em concentrações baixas de polímero, a maior diminuição é observada para a PEI-C8 e PEI-C12 em comparação com a PEI-C4 e PEI-C6. Os valores mínimos de  $I_1/I_3$  observados para cada sistema foram 1,14, 1,03, 0,95 e 0,88 para a PEI-C4, PEI-C6, PEI-C8 e PEI-C12, respectivamente, indicando que o pireno encontra-se em domínios hidrofóbicos diferentes, dependendo do comprimento da cadeia alquílica na PEI modificada. Além disso, uma comparação entre a tensão superficial e a fluorescência do pireno revela que a descontinuidade nos dados de tensão superficial coincide com a região em que a diminuição nos valores de  $I_1/I_3$  ocorre ( $\sim 3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), o que sugere que ambas medidas estão relacionadas ao mesmo processo físico-químico, isto é, com a formação dos agregados hidrofóbicos em solução aquosa.



**Figura 21.** Razão  $I_1/I_3$  da emissão de fluorescência do pireno em função da concentração da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (◻) e PEI-C12 (●). A concentração de pireno foi de  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , a excitação ocorreu em  $336,0 \text{ nm}$  e as aberturas das fendas foram ajustadas para  $2,5 \text{ nm}$  a  $25,0 \pm 0,1^\circ \text{C}$ .

### 3.1.3. Viscosidade das PEIs na ausência de SDS

A Figura 22 mostra as alterações na viscosidade específica para soluções da PEI e PEIs hidrofobicamente modificadas em função da concentração de polímero. A viscosidade específica foi calculada a partir das equações (1) e (2). É claramente observado que as viscosidades específicas diminuem com o aumento da cadeia alquílica da PEI. Estes dados também permitem determinar as viscosidades intrínsecas para a PEI e as PEIs modificadas, podendo ser observado que os valores diminuem com o aumento na cadeia alquílica substituída na PEI. Os valores de viscosidade intrínseca encontrados estão apresentados na Tabela 1. O valor da  $[\eta]$  para a PEI é  $13,30 \text{ mL g}^{-1}$ , e para as PEIs modificadas os valores diminuem na seguinte ordem: PEI-C4 > PEI-C6 > PEI-C8 > PEI-C12.



**Figura 22.** Influência da concentração dos polímeros na viscosidade específica a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$  para soluções aquosas da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●).

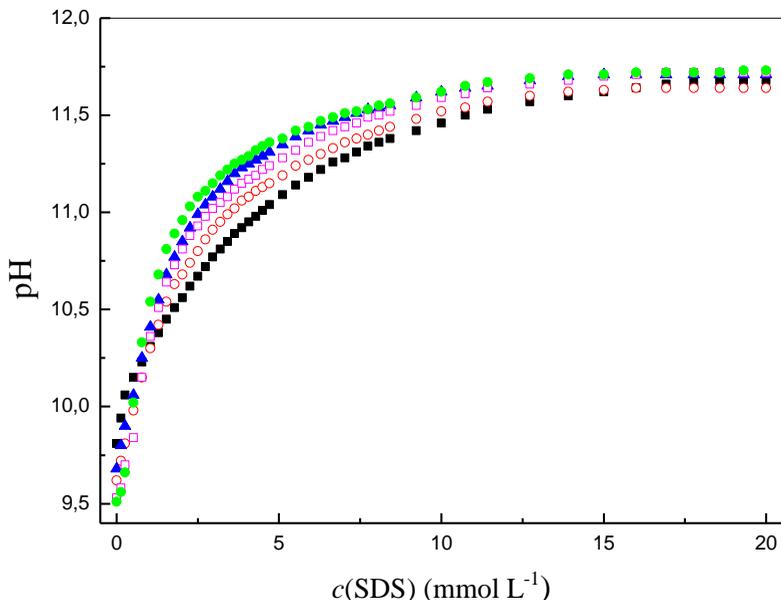
É importante mencionar que a água é um solvente eficiente para dissolver a PEI, uma vez que o polímero está na forma protonada em solução aquosa. Como resultado, a cadeia do polímero encontra-se estendida, o que aumenta o seu volume hidrodinâmico. Por outro lado, devido à hidrofobicidade que aumenta da PEI-C4 para a PEI-C12, a solubilidade em água dos polímeros alquilados é diminuída e as macromoléculas podem ser encontradas na forma enovelada, representando um fator responsável por uma diminuição na viscosidade intrínseca. Por consequência, as concentrações de sobreposição ( $c^*$ ) para os polímeros modificados (Tabela 1), calculadas como o recíproco de cada valor de  $[\eta]$ , aumentam com o tamanho das suas cadeias alquílicas substituídas, na seguinte ordem: PEI < PEI-C4 < PEI-C6 < PEI-C8 < PEI-C12.

**Tabela 1.** Valores para a viscosidade intrínseca  $[\eta]$  e concentração de sobreposição ( $c^*$ ) para os PEIs a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

Polímero	$[\eta]$ mL g <sup>-1</sup>	$c^*$ (mg mL <sup>-1</sup> )
PEI	13,30	75,20
PEI-C4	9,78	102,20
PEI-C6	9,44	105,95
PEI-C8	8,20	121,95
PEI-C12	7,50	133,30

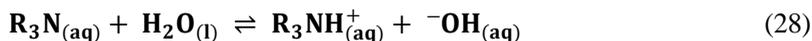
### 3.1.4. Influência do SDS sobre o pH em soluções aquosas das PEIs

A adição de SDS pode alterar o pH de soluções de polieletrólitos [41; 96; 99], por esse motivo foi monitorado o valor do pH das soluções aquosas da PEI e das PEIs modificadas em uma concentração de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , na ausência e na presença de quantidades crescentes de SDS (Figura 23). Todas as soluções aquosas contendo apenas a PEI ou as PEIs modificadas apresentaram valores de pH próximos de 9,5, o pH sendo aumentado para cerca de 11,5 quando a concentração de SDS é  $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .



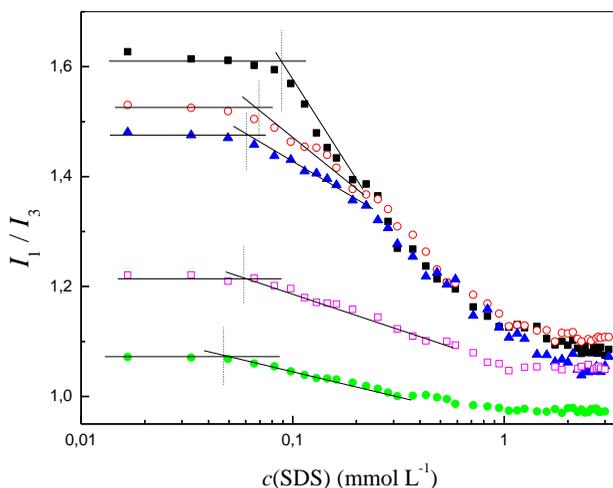
**Figura 23.** Influência da adição de SDS no pH de soluções aquosas da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●),  $c(\text{polímero}) = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

Nas soluções aquosas das PEIs, os grupos amino presentes no polímero atuam como uma base fraca (equação (28)). Uma vez que o SDS seja adicionado, há um aumento no valor do pH da solução, devido ao surfactante aniônico promover a estabilização do ácido fraco conjugado ( $\text{R}_3\text{NH}^+$ ). Isso ocorre por meio de uma ligação específica do ânion dodecilsulfato com os sítios de carga positiva nas cadeias poliméricas, o que desloca o equilíbrio ácido-base no sentido da formação do íon hidróxido. As curvas de titulação das soluções das PEIs modificadas apresentaram similaridade com a curva da PEI e também com os valores de pH, indicando que a modificação não influenciou no equilíbrio ácido-base.



### 3.1.5. Fluorescência das PEIs na presença de SDS

A utilização do pireno como sonda fluorescente para investigar a associação da PEI e das PEIs modificadas em soluções contendo SDS está apresentada na Figura 24, que mostra a razão  $I_1/I_3$  em função da concentração de SDS, sendo a concentração de cada polímero fixada em  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Observa-se que para cada polímero, em baixas concentrações, a razão  $I_1/I_3$  para a PEI é de  $\sim 1,60$ , mas uma diminuição gradual na razão ocorre com o aumento da cadeia do substituinte alquílico (para a PEI-C12 o valor da razão  $I_1/I_3$  é de  $\sim 1,07$ ). Um comportamento similar foi observado por Magny e colaboradores [100] que investigaram sistemas micelares mistos de cloreto de dodeciltrimetilamônio com uma série de poli(acrilato de sódio) hidrofobicamente modificado. Esse comportamento é devido ao fato de que a concentração de domínios hidrofóbicos aumenta com o aumento nas suas cadeias alquílicas. Esses domínios hidrofóbicos também ajudam a iniciar a associação polímero-surfactante. Assim, a ligeira diminuição na razão  $I_1/I_3$  observada, em concentrações baixas de SDS, indica o início da interação polímero-surfactante.



**Figura 24.** Influência na razão  $I_1/I_3$  da emissão de fluorescência do pireno em soluções aquosas da PEI (■), PEI-C4 (○), PEI-C6 (▲), PEI-C8 (□) e PEI-C12 (●), ( $c(\text{polímero}) = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em função da concentração de SDS a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

A descontinuidade observada na razão  $I_1/I_3$  é chamada de concentração de agregação crítica (*cac*) e começa com uma concentração mais baixa do que a *cmc* de uma solução de SDS puro ( $\sim 8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) [62]. A Tabela 2 mostra os valores de *cac* para cada PEI com SDS, sendo observado que os valores diminuíram gradualmente com o aumento na cadeia alquílica ligada ao polímero. Por exemplo, o valor da *cac* para o sistema da PEI/SDS foi de  $0,09 \text{ mmol L}^{-1}$ , diminuindo para  $0,045 \text{ mmol L}^{-1}$  para o sistema da PEI-C12/SDS. Portanto, os polímeros modificados, que apresentaram propriedades anfifílicas, proporcionam o início da associação entre polímero e surfactante em concentrações mais baixas de SDS. Resultados similares foram obtidos por Magny e colaboradores [100], que observaram que a cadeia alquílica mais longa levou ao menor valor de *cac*.

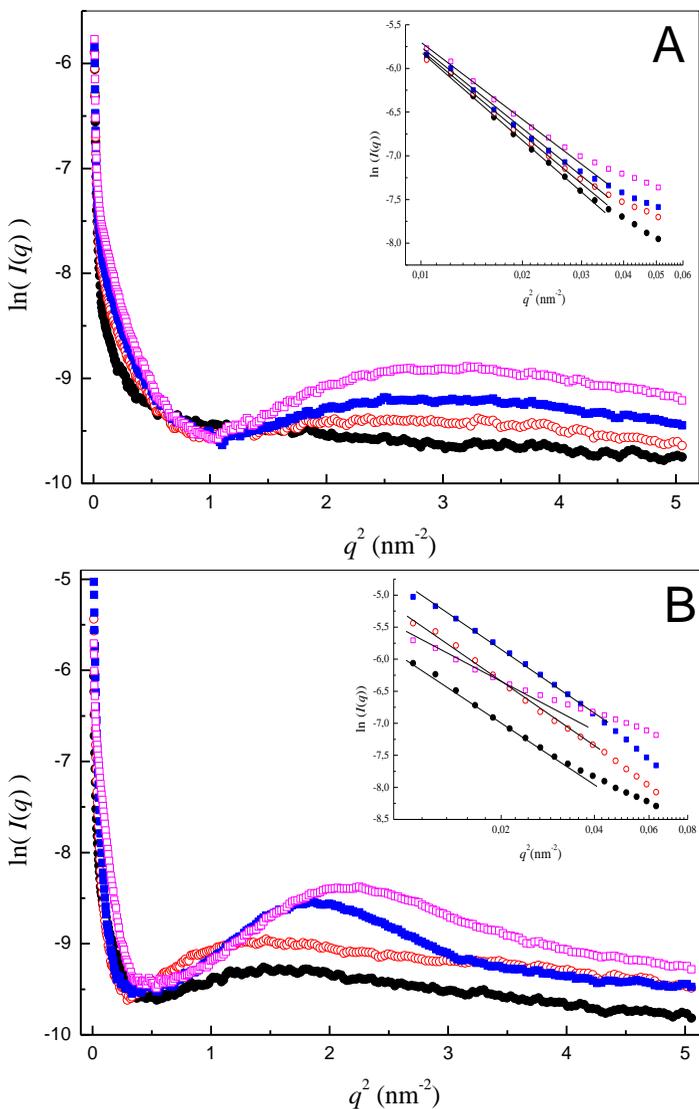
**Tabela 2.** Valores de *cac* para sistemas da PEI e PEIs modificadas com SDS, obtidos por fluorescência do pireno, para  $c(\text{polímero}) = 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Polímeros	<i>cac</i> ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
PEI	0,090
PEI-C4	0,070
PEI-C6	0,060
PEI-C8	0,055
PEI-C12	0,045

### 3.1.6. SAXS das PEIs na ausência e na presença de SDS

A PEI e PEIs alquiladas foram investigadas usando a técnica de SAXS, mantendo-se a concentração dos polímeros constante em  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Esses estudos foram realizados a fim de avaliar possíveis evoluções morfológicas nos polímeros modificados em comparação com o polímero não modificado.

A Figura 25 apresenta o comportamento da PEI (A) e da PEI-C12 (B) na ausência de SDS e com 5,0, 10,0 e 20,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de SDS. É observado um ombro largo na curva, que se desloca para regiões de altos valores de  $q$  com o aumento da  $c(\text{surfactante})$ . Isso fornece uma indicação qualitativa de que os complexos são menores em concentrações mais elevadas de SDS. Um comportamento semelhante foi observado por Felipe e colaboradores [99] em estudos sobre a formação de complexos supramoleculares apresentando PEI, colato de sódio e SDS em sua composição. Esses dados de SAXS sugerem que o tamanho dos agregados pode ser influenciado por um aumento dos contra-íons em solução promovido por um acréscimo na concentração do surfactante. O aumento na concentração de contra-íons poderia diminuir a repulsão eletrostática entre as cadeias dos polímeros iônicos, resultando numa conformação mais compacta.



**Figura 25.** Dependência angular da intensidade de SAXS para a PEI (A) e a PEI-C12 (B) na ausência (●) de SDS e na presença de 5,0 (○), 10,0 (■) e 20,0 (□) mmol L<sup>-1</sup> de SDS. A concentração para cada polímero foi de 2,0 mg mL<sup>-1</sup>. As inserções mostram a região de Guinier.

A aproximação de Guinier [101] foi utilizada para a determinação do raio de giro dos polímeros para cada sistema, a partir das curvas de  $\ln(I(q))$  em função de  $q^2$ , por meio de um ajuste linear dessas curvas para o limite de  $q \rightarrow 0$ , utilizando a equação 24. Os resultados são apresentados na Tabela 3, onde é observado que para a PEI há uma clara redução do raio de giro do polímero, de 16,30 nm quando na ausência de surfactante para 13,90 nm na presença de 20,0 mmol L<sup>-1</sup> de SDS. A diminuição no valor de  $R_g$  é também observada para todos os polímeros modificados, com os resultados indicando um decréscimo geral nos valores com o incremento no número de carbonos do substituinte alquílico na PEI. Esses dados sugerem que as cadeias poliméricas modificadas estão um pouco mais enoveladas em solução em comparação com a PEI não modificada. Esses valores de  $R_g$  são diferentes dos que são relatadas por Pfau e colaboradores [102], que mostraram por meio de experimentos de espalhamento de luz, que a PEI, de 37000 g mol<sup>-1</sup>, em pH 4,0 e adsorvida em superfície de mica, apresenta um diâmetro de 6,0 nm. Um efeito semelhante foi relatado por Griffiths e colaboradores [13], que utilizaram espalhamento de nêutrons a baixos ângulos (SANS) a pH 10. Em outro estudo utilizando SLS, Bastardo e colaboradores [103] encontraram um valor de  $R_g$  de 55,0 nm, para a PEI de 70000 g mol<sup>-1</sup> em soluções de D<sub>2</sub>O (pD 10,1). Esse valor é proporcionalmente semelhante aos nossos resultados, quando a massa molar dos polímeros é comparada.

**Tabela 3.** Valores de raio de giro para a PEI e PEIs modificadas obtidos pela aproximação de Guinier.

c(SDS) (mmol L <sup>-1</sup> )	$R_g$ (nm)				
	PEI	PEI-C4	PEI-C6	PEI-C8	PEI-C12
0,0	16,3	14,3	15,1	14,7	14,5
5,0	14,7	14,0	14,3	14,3	14,1
10,0	14,5	13,8	14,2	13,9	13,7
20,0	13,9	13,2	13,5	13,7	13,3

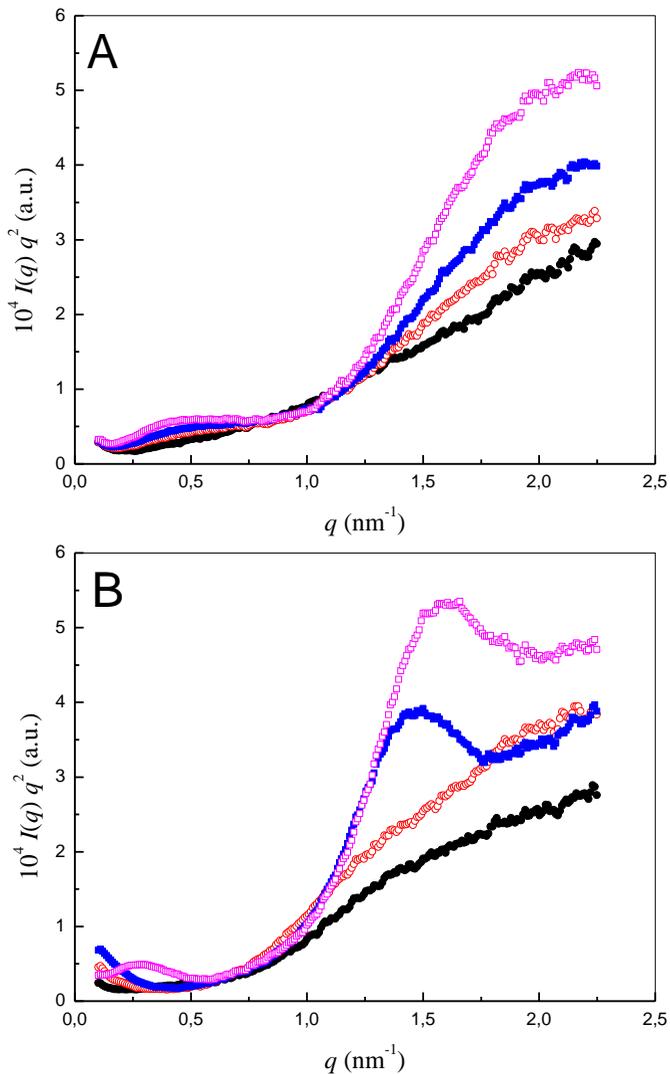
O incremento no índice de refração com a concentração ( $dn/dc$ ) de polieletrólitos em soluções aquosas é geralmente mais elevado (por exemplo o valor para o poli(estireno sulfonato de sódio) em água é  $dn/dc = 0,23 \text{ mL g}^{-1}$ ) do que para polímeros neutros ( $dn/dc \approx 0,15 \text{ mL g}^{-1}$ ) [104]. Foram então determinados os valores de  $dn/dc$  para as PEIs

alquiladas (Tabela 4). O valor de  $dn/dc$  para a PEI foi de  $0,2009 \pm 0,0010 \text{ mL g}^{-1}$  [105], enquanto para as PEIs aquiladas os valores encontrados variaram na faixa de  $0,1681$  a  $0,1756 \text{ mL g}^{-1}$ , valores ainda altos característicos de polieletrólitos.

**Tabela 4.** Valores de  $dn/dc$  para as PEIs a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

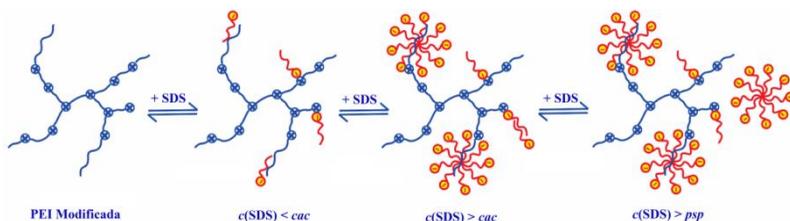
Polímero	$dn/dc \text{ (mL g}^{-1}\text{)}$
PEI	$0,2009 \pm 0,0010$
PEI-C4	$0,1688 \pm 0,0011$
PEI-C6	$0,1756 \pm 0,0024$
PEI-C8	$0,1681 \pm 0,0034$
PEI-C12	$0,1684 \pm 0,0018$

Os gráficos de Kratky ( $I(q) q^2$  versus  $q$ ) [104] das intensidades de SAXS para amostras com a PEI e PEI-C12 na ausência e na presença de 5,0, 10,0 e 20,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de SDS são mostrados na Figura 26, onde diferentes propriedades das amostras podem ser claramente observadas. As soluções dos polímeros puros e aqueles na presença de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de SDS exibem aproximadamente o mesmo comportamento: as curvas de Kratky para esses sistemas apresentam um aumento contínuo, indicando uma conformação aleatória flexível [106]. Quando a concentração de SDS é aumentada acima da  $cmc$  ( $> 8,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), a solução da PEI continua apresentando o mesmo comportamento de uma conformação aleatória (apenas um aumento na intensidade de espalhamento é observado). No entanto, um pico aparece nas soluções de PEI-C12 quando a  $c(\text{SDS})$  é maior do que a  $cmc$ . Este comportamento pode ser interpretado por analogia com soluções de proteínas: as proteínas globulares dobradas normalmente produzem um pico proeminente, enquanto com seu desenrolamento as proteínas mostram um aumento contínuo nas curvas de  $I(q)q^2$  versus  $q$  [107]. Assim, o pico pode indicar a formação de agregados compactos quando a PEI tem ramificações hidrofóbicas na presença de uma concentração de surfactante elevada. Nesses sistemas, as curvas mostram não somente o pico, mas também o aumento na  $I(q)q^2$  em função de  $q$ , indicando a presença de multi-domínios, exibindo uma mistura característica de micelas livres de SDS e juntamente de agregados e de cadeias poliméricas em conformação aleatória [108; 109].



**Figura 26.** Curvas de Kratky para a PEI (A) e a PEI-C12 (B) na ausência (●) e na presença de 5,0 (○), 10,0 (■) e 20,0 (□)  $\text{mmol L}^{-1}$  de SDS. A concentração para cada polímero foi de 2,0  $\text{mg mL}^{-1}$ .

As principais características relacionadas com o sistema aqui estudado, envolvendo a interação das PEIs alquiladas e SDS em solução aquosa, encontram-se resumidas na Figura 27. Em primeiro lugar, a adição de SDS para uma solução do polímero modificado leva à interação por meio de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos. Com um aumento na concentração de SDS para um valor maior do que o *cac*, agregados de SDS podem interagir com o polímero através de efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos combinados, sendo o grau dessa interação é dependente do tamanho da cadeia alquílica substituída. Após a saturação da superfície do polímero com os agregados de SDS, isto é, acima do ponto de saturação do polímero (*psp*), o aumento na concentração de SDS leva ao aparecimento de micelas de surfactante livres em equilíbrio com os agregados da PEI-modificada com SDS.



**Figura 27.** Representação esquemática dos passos envolvidos na associação dos polímeros modificados com SDS.



## **3.2. ESTUDO DAS PROPRIEDADES DAS SOLUÇÕES AQUOSAS DE DNA NA PRESENÇA DE PEI**

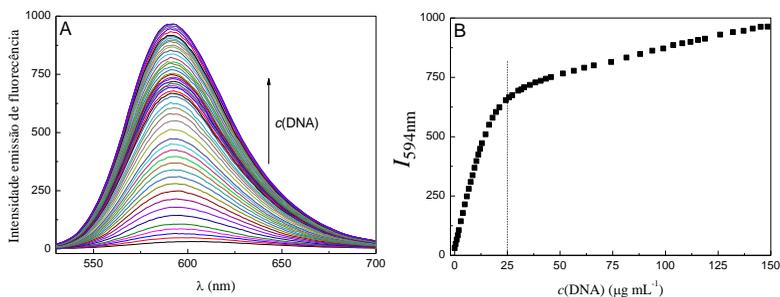
A PEI é usada para muitos fins, mas o que tem gerado mais atenção nos últimos anos é a sua utilização como agente não viral na terapia genética [110; 111], embora as suas aplicações relacionadas a essa linha de investigação sejam limitadas devido à sua citotoxicidade [112]. Essa última está principalmente associada com o fato de a PEI ser um polícatión fortemente carregado, o que leva à sua forte interação com superfícies celulares e, conseqüentemente, à sua danificação. Portanto, modificações na estrutura polimérica da PEI que atenuem sua carga positiva podem ser úteis na redução da toxicidade do polímero [32].

Embora muitos estudos sobre a interação da PEI com DNA possam ser encontrados na literatura [7; 112; 113; 114], verifica-se a necessidade de maior aprofundamento para a compreensão das propriedades do sistema formado, em especial sobre o que ocorre fisicamente com o sistema quando diferentes razões das duas cadeias poliméricas são empregadas. O estudo minucioso do sistema utilizando diferentes técnicas deve auxiliar para uma melhor compreensão do tipo de interações físico-químicas que ocorrem entre os dois polímeros. Ao mesmo tempo, os estudos efetuados servem como uma base para a comparação com os outros sistemas estudados no próximo capítulo, ou seja, do DNA com as PEIs modificadas. Assim, a seguir, serão utilizadas as técnicas de espectrofotometria de UV-Vis, fluorescência, dicróismo circular, potencial zeta, viscosidade e espalhamento de luz (DLS) visando estudar de forma sistemática e aprofundada a interação do DNA com a PEI em solução aquosa.

### **3.2.1. Ensaio por meio da técnica de fluorescência**

O brometo de etídio (BE) é muito utilizado como sonda fluorescente, pois atua como um agente intercalante, sendo usado frequentemente como marcador de ácidos nucléicos [63; 115]. Para determinar qual a concentração de DNA que seria utilizada para estudar as interações com os polímeros, foi feita uma titulação de BE com DNA. A Figura 28A mostra o efeito da adição de DNA sobre o espectro de emissão de fluorescência do BE. Observa-se que com a adição de

DNA ocorre um aumento na intensidade de emissão de fluorescência, apresentando um máximo em 594,0 nm. A partir dos espectros, fez-se um gráfico da intensidade máxima de emissão de fluorescência ( $I_{594\text{nm}}$ ) versus  $c(\text{DNA})$  (Figura 28B). Observa-se que o gráfico apresenta duas regiões com inclinação diferentes: a primeira região apresenta uma forte inclinação até aproximadamente  $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e a partir dessa  $c(\text{DNA})$  a inclinação é bem menor, onde praticamente todo o BE está intercalado ao DNA. A partir dessa curva, foi definida a intersecção das duas regiões ( $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) como sendo a  $c(\text{DNA})$  a ser utilizada nos estudos de interação com os polímeros, pois é nessa concentração de DNA que praticamente todo o BE está intercalado ao DNA.

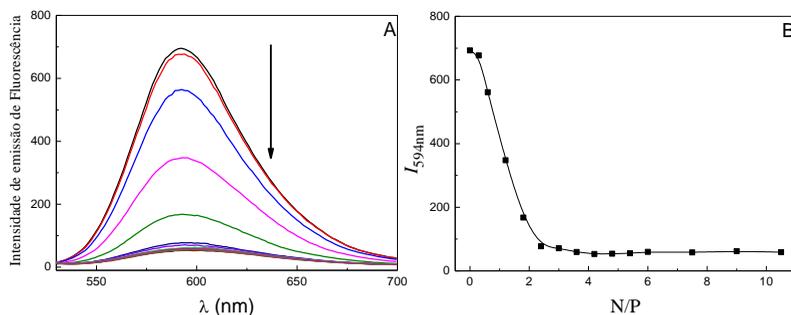


**Figura 28.** (A) Espectros de emissão de fluorescência do BE em solução aquosa em diferentes concentrações de DNA e (B) influência da  $c(\text{DNA})$  sobre os valores da intensidade de emissão de fluorescência do BE em 594 nm. Manteve-se a concentração de BE constante em  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A interação da PEI com o DNA tem sido estudada por muitos grupos de pesquisadores [90; 91], os quais expressam as concentrações pela razão de nitrogênio (N) presente no PEI e por fósforo (P) presente no DNA (N/P). Para isso, considera-se que  $43,1 \text{ g mol}^{-1}$  correspondente a cada monômero da PEI e contém um grupo amino, e que  $330,0 \text{ g mol}^{-1}$  corresponde a cada unidade de repetição do DNA contendo um fosfato. Dessa forma, será usado esse mesmo conceito para os resultados que serão mostrados a seguir.

A Figura 29A mostra os espectros de emissão de fluorescência do BE que foram obtidos em diferentes concentrações da PEI ( $c = 0,0 - 35,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mantendo a  $c(\text{DNA})$  constante em  $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,

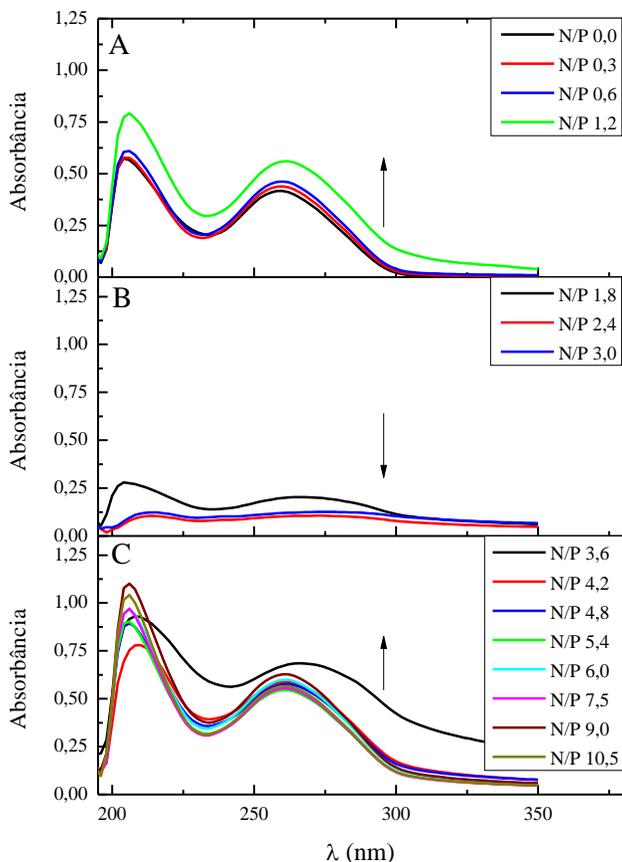
encontrando-se as diferentes concentrações expressas como razão N/P. Observou-se que com o aumento na razão N/P ocorre uma diminuição na intensidade da emissão de fluorescência até atingir um mínimo e ficar constante. Então plotou-se a intensidade máxima de emissão de fluorescência ( $I_{594\text{nm}}$ ) em função da razão N/P (Figura 29B). Observa-se a inibição gradativa da fluorescência com o aumento da razão N/P, até chegar a um mínimo. Quando a razão N/P fica igual a 2,4 a intensidade de emissão de fluorescência começa a ficar constante e aproxima-se da intensidade do BE livre em solução aquosa, quando não está intercalado ao DNA [113]. Acima dessa razão, não há DNA livre na solução, com todo o DNA estando complexado pela PEI [116]. Os dados sugerem que quando a PEI é adicionada à solução contendo DNA, a interação PEI-DNA é mais forte do que a interação DNA-BE, o que faz com que o BE volte a ficar livre em solução, conseqüentemente ocorre a diminuição na intensidade de emissão de fluorescência, o BE não volta a se ligar devido ao DNA estar inacessível conforme o complexo DNA-PEI vai sendo formado. Slita e colaboradores [117] constataram que polications com grupos amino primários e amônio quaternário são os melhores na interação com DNA.



**Figura 29.** Espectros de emissão de fluorescência do BE *versus* comprimento de onda em diferentes valores de  $c(\text{PEI})$  ( $0,0 - 35,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e  $c(\text{DNA})$  constante em  $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , que estão representados nas razões de N/P (DNA-PEI) (A). Gráfico de  $I_{594\text{nm}}$  *versus* razão N/P dos complexos DNA-PEI (B) (a linha foi traçada somente com o propósito de servir como orientação). Manteve-se a concentração de BE constante em  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2. Espectrofotometria de UV-Vis

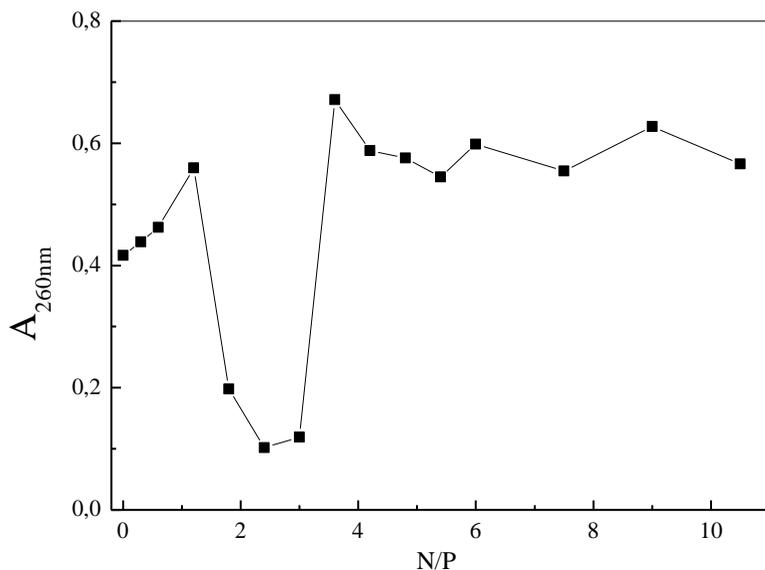
Os espectros de UV-Vis do DNA livre e dos complexos formados por DNA-PEI apresentam três regiões distintas como mostrado na Figura 30. A Figura 30A mostra os espectros do DNA livre e para três razões N/P (0,3; 0,6 e 1,2), essas razões baixas apresentam um pequeno aumento no valor da absorbância na região de 260,0 nm, porém os espectros são semelhantes ao de DNA livre, sugerindo que a presença da PEI nessas concentrações tem pouca influência na conformação do DNA. No entanto, com o aumento na razão N/P os espectros apresentam um aumento no valor da absorbância em comprimentos de onda acima de 300,0 nm, o qual se deve ao espalhamento da luz incidente pelos agregados formados pelos complexos DNA-PEI que estão dispersos em solução [113; 114; 118]. Um deslocamento no comprimento de absorção máxima para valores maiores (efeito batocrômico) foi observado, indicando a formação do complexo entre o DNA e a PEI. A Figura 30B mostra os espectros da segunda região com as razões N/P entre 1,8 a 3,0. Nessa região os espectros de UV-Vis têm uma diminuição na intensidade de absorbância e apresentam um deslocamento no máximo de absorção, de 260,0 nm para 274,0 nm, sugerindo a precipitação devido à condensação do DNA pela PEI. A Figura 30C mostra a última região, por meio dos espectros de UV-Vis nas razões N/P 3,6 a 10,5. Nessas razões, os espectros de UV-Vis apresentam um aumento na intensidade de absorbância e têm a absorção máxima novamente em 260,0 nm.



**Figura 30.** (A) Espectros de UV-Vis para DNA-PEI nas razões N/P 0,0; 0,3; 0,6 e 1,2 conforme as legendas indicadas. (B) Espectros de UV-Vis para DNA-PEI nas razões N/P 1,8; 2,4 e 3,0 conforme as legendas indicadas. (C) Espectros de UV-Vis para DNA-PEI nas razões N/P 3,6; 4,2; 4,8; 5,4; 6,0; 7,5; 9,0 e 10,5, conforme as legendas indicadas.

A partir dos espectros de UV-Vis mostrados na Figura 30, foi montada a Figura 31, onde a absorbância foi fixada em 260 nm ( $A_{260\text{nm}}$ ) em função da razão N/P dos complexos DNA-PEI, para melhor compreensão do fenômeno. Em baixas razões N/P, ocorre um hiper Cromismo, comparado ao DNA puro, nas razões N/P entre 1,8 e 3,0 um mínimo é observado. Nessa última faixa a PEI pode estar levando à

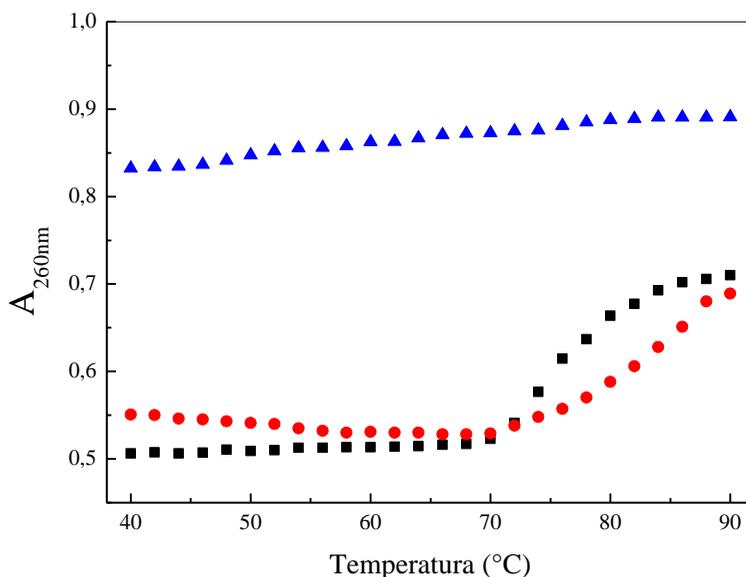
precipitação do complexo DNA-PEI formado. Em razões N/P maiores que 3,0 ocorre um hipercromismo em relação ao DNA puro, mantendo a absorbância em 260,0 nm praticamente constante em 0,6. Esse mesmo comportamento foi apresentado por Han e colaboradores [114], que encontraram um mínimo em uma razão N/P = 1,0 para o sistema DNA-PEI, porém em tampão e força iônica diferentes. A faixa da razão N/P que apresentou a possível condensação do DNA por UV-Vis foi a mesma em que ocorreu a inibição da emissão de fluorescência do BE.



**Figura 31.** Curva da absorção máxima ( $A_{260nm}$ ) em função de diferentes razões N/P para os complexos DNA-PEI.

É conhecido que quando a temperatura de uma solução contendo DNA é aumentada, a cadeia dupla gradualmente dissocia-se para cadeias simples, gerando um efeito hipercrômico sobre o espectro de absorção. Com isso, é possível identificar a temperatura de fusão ( $T_m$ ), que é definida como a temperatura na qual a metade dos pares de bases totais do DNA não está ligada [84]. A desnaturação térmica do DNA na presença de nanopartículas ou macromoléculas podem evidenciar mudanças conformacionais do DNA e oferecer informações sobre a força da interação.

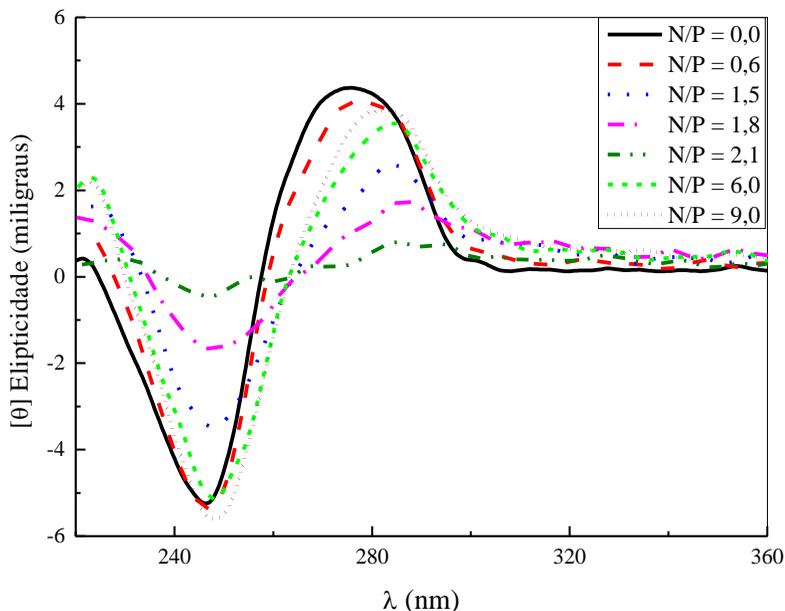
As curvas de desnaturação térmica para o DNA puro e DNA-PEI nas razões N/P de 0,3 e 6,0 estão apresentadas na Figura 32. A desnaturação térmica realizada para o DNA puro apresentou um valor de  $T_m$  de 74,4 °C, valor próximo ao encontrado por Rahban e colaboradores [84] que foi de 75,2 °C, enquanto que a temperatura de fusão observada para N/P = 0,3 aumentou em 7,5 °C ( $T_m = 81,9$  °C), já para a razão N/P 6,0 não foi possível determinar a temperatura de fusão devido às limitações do banho termostático utilizado (ver a Parte Experimental), provavelmente a  $T_m$  para esta razão encontra-se acima de 90,0 °C, no entanto, o alto valor de absorvância sugere que nessas condições é difícil observar a desnaturação térmica do DNA ou mesmo pode significar que o DNA já se encontra desnaturado. Porém, por essas medidas, não se pode afirmar que isso esteja ocorrendo. Essa questão foi solucionada usando-se a técnica de dicroísmo circular (ver item 3.2.3.), entretanto, os estudos efetuados indicam uma forte interação da PEI com o DNA e conseqüentemente a PEI atua na proteção do DNA.



**Figura 32.** Curvas de desnaturação térmica para o DNA puro (■), e para o DNA-PEI nas razões N/P 0,3 (●) e 6,0 (▲).

### 3.2.3. Estudos da interação da PEI com o DNA usando a técnica de dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular (CD) do DNA do timo de bezerro apresenta uma banda positiva em 275,0 nm e uma banda negativa em 245,0 nm, a primeira correspondendo ao empilhamento das bases e a última se referindo à elipticidade direita da conformação da dupla hélice, característico do DNA quando está na forma B [119; 120; 121]. As interações de espécies químicas com o DNA resultam em alterações de intensidade e deslocamento das duas bandas [119]. A formação de complexos entre a PEI e o DNA altera as duas bandas do espectro de CD. A Figura 33 mostra a diminuição da elipticidade da banda positiva, ao mesmo tempo em que ocorre um deslocamento para comprimentos de onda maiores ( $\lambda_{\max} = 285,0$  nm para N/P = 1,5), com o aumento na concentração de PEI. A banda negativa praticamente não desloca, porém observa-se uma diminuição na sua intensidade com o aumento da concentração de PEI, a qual, no entanto, volta a aumentar em altas razões N/P. Quando a razão N/P é igual a 2,1 a banda positiva e a negativa não aparecem, essa é a indicação de que o DNA está condensado, entretanto, em razões maiores as bandas reaparecem. Na razão N/P = 9,0 a banda negativa praticamente não muda comparada com o DNA puro. Isso nos informa que a conformação da dupla hélice do DNA praticamente não muda, o que descarta a possibilidade de o DNA estar desnaturado pela PEI como foi suspeitado nas medidas de desnaturação térmica na razão N/P = 6,0. No entanto, a banda positiva tem um deslocamento e uma pequena diminuição de intensidade, devido a uma mudança no empilhamento das bases do DNA que ocorre por exposição ao solvente [122] pela possível intercalação com a PEI. A razão N/P em que as bandas do CD não aparecem está na mesma faixa onde acontece a supressão da emissão de fluorescência do BE (Figura 29) e o mínimo na  $A_{260\text{nm}}$  (Figura 31).



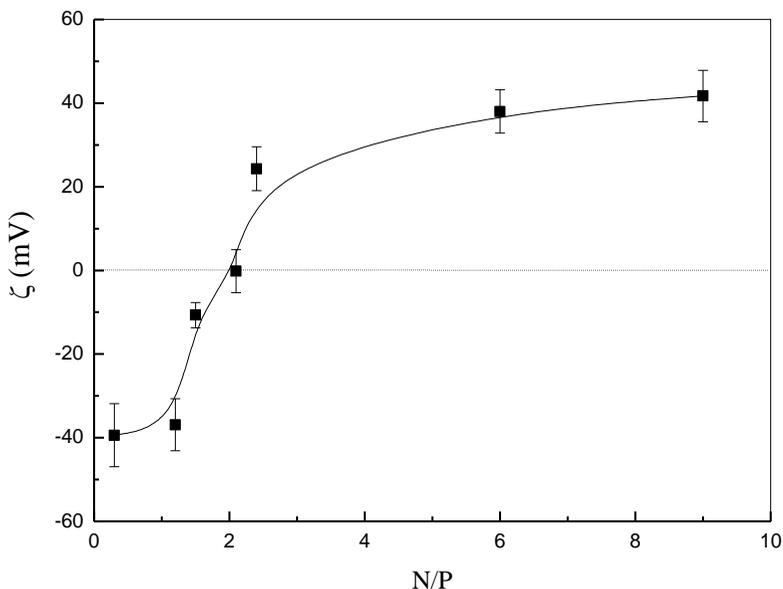
**Figura 33.** Espectros de CD para o DNA e diferentes razões N/P para o sistema DNA-PEI conforme as legendas indicadas.

### 3.2.4. Potencial zeta

Um parâmetro importante para o controle de agregação na teoria clássica de colóides é a carga na superfície da partícula [39]. Os valores do potencial zeta refletem a carga na superfície de agregados coloidais, sendo utilizado para avaliar a interação e a carga superficial de complexos formados por DNA e policátions [123]. A fim de acompanhar a carga superficial nas etapas da formação dos complexos formados entre o DNA e a PEI, medidas de potencial zeta foram feitas em diferentes razões N/P.

A Figura 34 mostra os valores de potencial zeta em diferentes razões N/P para o sistema DNA-PEI. Para as razões  $N/P \leq 1,2$  os valores de potencial zeta encontrados são próximos em torno de  $-39,0$  mV. Esse resultado mostra claramente que as cadeias aniônicas do DNA não são completamente condensadas pelas cadeias catiônicas da PEI. Para a razão  $N/P = 2,1$  o complexo formado tem a densidade de carga na

superfície praticamente neutra ( $-0,17 \pm 3,16$  mV), levando à condensação completa do DNA e ocasionando a precipitação do mesmo, como visto nos experimentos de UV-Vis. Acima da razão N/P = 2,1 o potencial zeta apresenta valores positivos devido às maiores proporções da PEI na superfície dos complexos, chegando a um valor de  $41,7 \pm 6,2$  mV para a razão N/P = 9,0. A mesma faixa de razão N/P em que ocorre a inversão no sinal do  $\zeta$  foi encontrada por Yue e colaboradores [116]. Estudos de complexação do DNA plasmídeo com PEIs de diferentes massas molares foram realizados por Choosakoonkriang e colaboradores [124] os quais observaram o mesmo comportamento dos valores de  $\zeta$  em diferentes razões N/P.



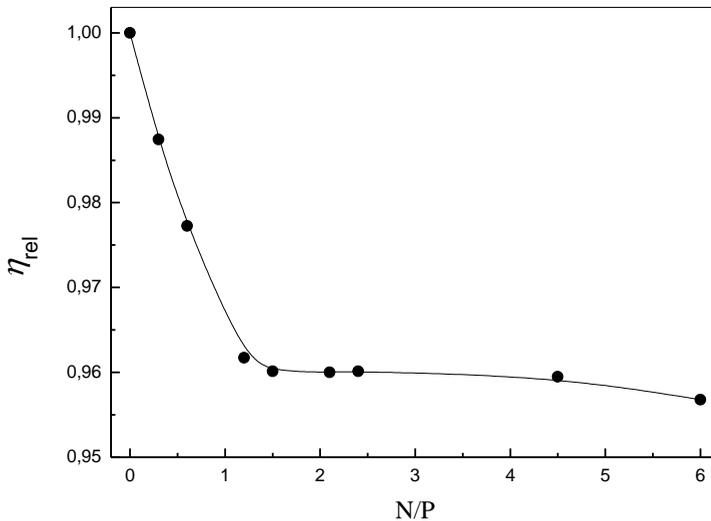
**Figura 34.** Valores de  $\zeta$  (mV) determinados em diferentes razões N/P para o sistema DNA-PEI. A linha pontilhada indica o valor para o potencial zeta igual a zero. A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.2.5. Viscosidade

Em termos gerais, a condensação do DNA é definida como uma diminuição no volume ocupado pelo DNA na transição da cadeia estendida para um estado compactado em que as frações de volume de DNA e de solventes são comparáveis. Uma vez que mais do que uma macromolécula de DNA é envolvida na estrutura condensada, o processo de condensação pode ser difícil de distinguir como sendo de agregação ou de precipitação [125]. A condensação do DNA pode ser causada pela diminuição da repulsão entre os segmentos de DNA ou por interações menos favoráveis do DNA com o solvente.

As medidas de viscosidade apresentam sensibilidade às alterações no comprimento da cadeia de DNA em solução. Um modelo de intercalação clássica é reconhecido por causar um aumento significativo na viscosidade de uma solução de DNA, devido a um aumento no alongamento na dupla hélice [126]. Algumas evidências de formação de complexos de polieletrólitos de cargas opostas podem ser obtidas usando medidas de viscosidade, uma vez que com a formação de agregados não carregados ou fracamente carregados é esperado que ocorra uma diminuição na viscosidade do sistema [127].

Para acompanhar a interação do DNA com a PEI, foram realizadas medidas de viscosidade relativa. A Figura 35 mostra a  $\eta_{rel}$  em função da razão N/P para o sistema DNA-PEI. Apesar do fato de que as alterações na viscosidade foram bastante moderadas, devido à baixa concentração utilizada, a Figura 35 demonstra claramente que a mistura de uma solução de DNA com uma solução de PEI leva a uma diminuição gradativa na  $\eta_{rel}$  com o aumento da  $c(\text{PEI})$  até a razão N/P = 1,5, onde a viscosidade relativa é mínima e fica constante, atingindo uma  $\eta_{rel} = 0,957$  na razão N/P = 6,0. Essa pequena diminuição é uma evidência de que as cadeias do DNA estão condensadas, pois as cadeias não estão mais alongadas, devido às interações eletrostáticas com as cadeias carregadas da PEI. A razão N/P em que ocorre a condensação das cadeias de DNA encontra-se na mesma faixa em que a mesma foi observada usando-se as outras técnicas, como a fluorescência, UV-Vis, CD e potencial zeta.



**Figura 35.** Curva de  $\eta_{rel}$  em função da razão N/P para o sistema DNA-PEI a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

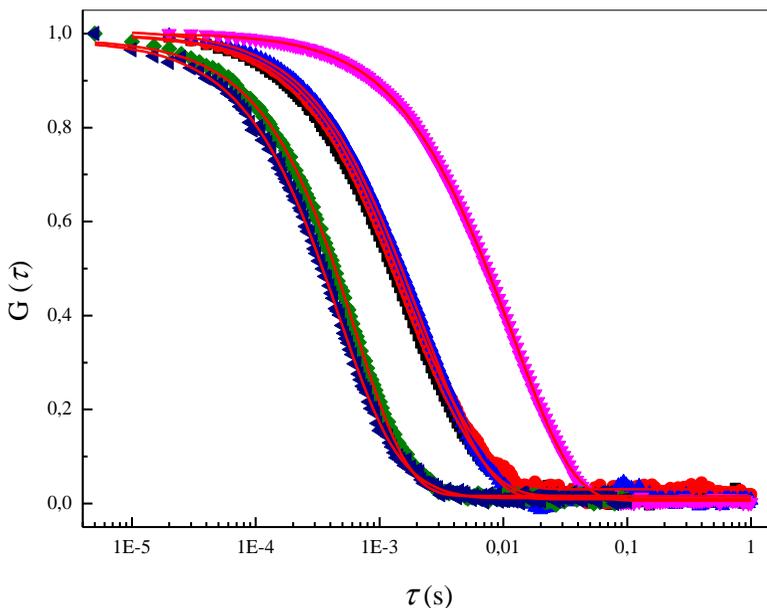
### 3.2.6. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Para investigar os tamanhos dos complexos formados de DNA com PEI, foi usada a técnica de DLS para monitorar as alterações do raio hidrodinâmico aparente ( $R_{H,ap}$ ), no entanto as concentrações utilizadas para preparar as razões N/P foram maiores devido ao baixo espalhamento. O tempo de decaimento ( $\tau$ ) dos complexos DNA-PEI é proporcional ao seu tamanho. Os tempos de decaimento do sistema DNA-PEI apresentam um aumento seguido de uma diminuição com o aumento na razão N/P.

A Figura 36 mostra curvas de função de autocorrelação normalizadas para diferentes razões N/P de DNA-PEI em um ângulo de espalhamento  $\theta = 90^\circ$ . Nota-se que nas razões  $N/P \leq 1,5$  apresentam curvas com  $\tau$  muito próximos, no entanto, a razão  $N/P = 3,0$  tem o  $\tau$  maior comparado às outras curvas, devido à formação de grandes complexos DNA-PEI nessa razão N/P. Para as razões  $N/P \geq 4,5$  observou-se que o  $\tau$  é menor quanto maior a concentração de PEI, e apresentam complexos DNA-PEI menores. Medidas na razão  $N/P =$

2,25 foram feitas, mas apresentaram precipitados impossibilitando a continuação das medidas.

A Figura 36 mostra que os complexos DNA-PEI têm diferentes tamanhos conforme a razão N/P. A função de correlação normalizada apresenta curva com um decaimento exponencial, à qual foi feito ajuste exponencial para determinar os valores de  $\tau$ , e conseqüentemente os valores de  $\Gamma$  e  $D_0$  para cada razão N/P do sistema DNA-PEI. Os valores de  $R_{H,ap}$  para cada razão N/P estudada foram determinados a partir da equação de Stokes-Einstein (equação (22)) e estão apresentados na Tabela 5.



**Figura 36.** Curvas de função de autocorrelação normalizadas para diferentes razões N/P de DNA-PEI, 0,3 (■), 0,75 (●), 1,5 (▲), 3,0 (▼), 4,5 (▶) e 6,0 (◀) em um ângulo fixo de 90°. Foram feitos ajustes exponenciais a todos os conjuntos de pontos experimentais.

Foram feitas medidas de DLS para o DNA livre, que apresentou três populações com 15%, 35% e 50%, com valores de  $R_{H,ap}$  de  $66,7 \pm 1,7$  nm,  $1158,1 \pm 13,2$  nm e  $364,4 \pm 11,8$  nm, respectivamente. Essas populações ocorrem devido à alta polidispersidade do DNA [128], sendo a população de tamanho maior constituída possivelmente por

agregados. A adição de uma pequena quantidade de PEI ( $N/P = 0,3$ ) conduz a duas populações com valores de  $R_{H,ap}$  diferentes ( $184,2 \pm 6,0$  nm e  $328,6 \pm 21,8$  nm), devido à forte interação eletrostática. A presença da PEI faz com que as cadeias do DNA tornem-se parcialmente condensadas [116; 129] desfazendo os agregados observados no DNA livre.

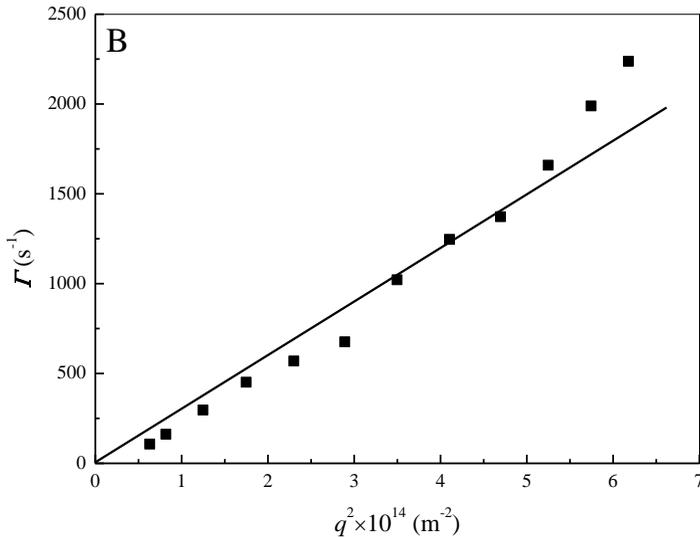
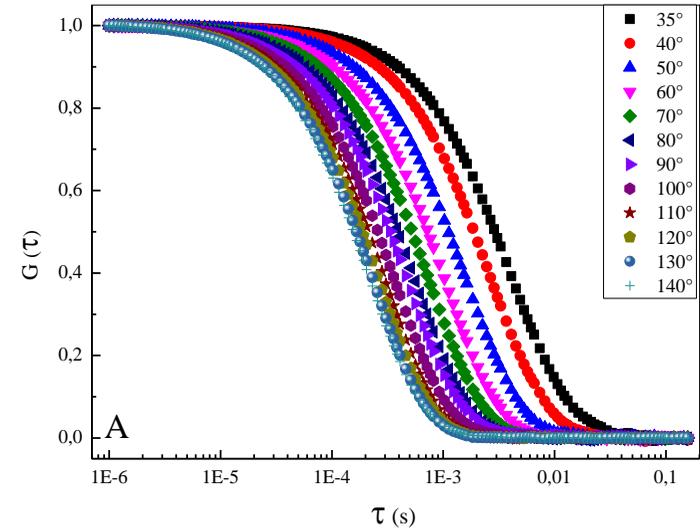
Quando é adicionado mais PEI, mais cadeias de DNA são complexadas e incorporadas em complexos individuais, diminuindo a quantidade da população com valores de  $R_{H,ap}$  maiores. Nas razões  $N/P = 2,25$  e  $3,0$  os complexos formados apresentam tamanhos na escala micrométrica. Na razão  $2,25$  não foi possível determinar o valor do  $R_{H,ap}$  devido à precipitação, ou a formação de um coacervado. Essa razão está na faixa em que o potencial zeta está próximo de zero. No entanto, na razão  $N/P = 3,0$  pode-se calcular o valor do  $R_{H,ap}$  de uma das populações, que apresentou a formação de grandes agregados com uma população de 95% e valores de  $R_{H,ap} = 1088,2 \pm 21,9$  nm. Esse tamanho dos agregados deve-se a razão  $N/P$  estar próxima a região onde  $\zeta$  é zero, mas com potencial de superfície positivo suficiente para ficar estável em solução. Sendo assim é possível determinar o valor do  $R_{H,ap}$ . Quando adiciona-se mais PEI, há formação de complexos positivamente carregados que, por ação de repulsões eletrostáticas, desfaz o agregado de tamanho micrométrico. Quando a razão  $N/P$  é maior ou igual a  $4,5$  existe praticamente uma população com valores de  $R_{H,ap}$  menores, o que sugere que todas as cadeias de DNA estão complexadas com a PEI. A pequena quantidade com tamanhos maiores pode corresponder a agregados de complexos de tamanhos menores.

Os tamanhos dos complexos formados por DNA e PEI diminuem com o aumento da razão  $N/P$ . Essa redução no tamanho pode ser explicada pelo fato de que inicialmente, com a adição de PEI, ocorre a neutralização das cargas negativas do DNA pelas cargas positivas da PEI. Em altas razões  $N/P$  os complexos apresentam uma superfície positivamente carregada, aumentando as forças de repulsão eletrostáticas, levando à diminuição no tamanho dos agregados DNA-PEI [130].

**Tabela 5.** Valores de  $R_{H,ap}$  determinados para diferentes razões N/P de DNA-PEI.

Razão N/P	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)
0,3	184,2 ± 6,0	54	328,6 ± 21,8	46
0,75	187,6 ± 5,0	54	317,4 ± 14,4	46
1,5	197,9 ± 5,0	60	335,8 ± 14,3	40
2,25	--	--	--	--
3,0	1088,2 ± 21,9	95	--	--
4,5	53,8 ± 1,5	98	110,5 ± 16,9	2
6,0	51,6 ± 0,8	99	114,8 ± 9,9	1

A Figura 37A mostra as funções de autocorrelação temporal medidas em diferentes ângulos de espalhamento para a razão N/P = 6,0 de DNA-PEI. Observa-se uma diminuição de  $\tau$  com o aumento no ângulo de espalhamento. Como o espalhamento de partículas maiores predomina em ângulos baixos o aumento de  $\theta$  faz com que porções menores dos agregados DNA-PEI sejam acessadas, que apresentam o tempo de relaxação menor que todo o agregado de DNA com PEI. A Figura 37B mostra a variação típica da frequência angular  $\Gamma = 1/\tau$  medida como uma função de  $q^2$ , indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas. Utilizando a equação de Stokes-Einstein calculou-se o  $R_{H,real}$  para o complexo formado por DNA e PEI na razão N/P = 6,0, sendo o valor encontrado igual a 69,3 nm.



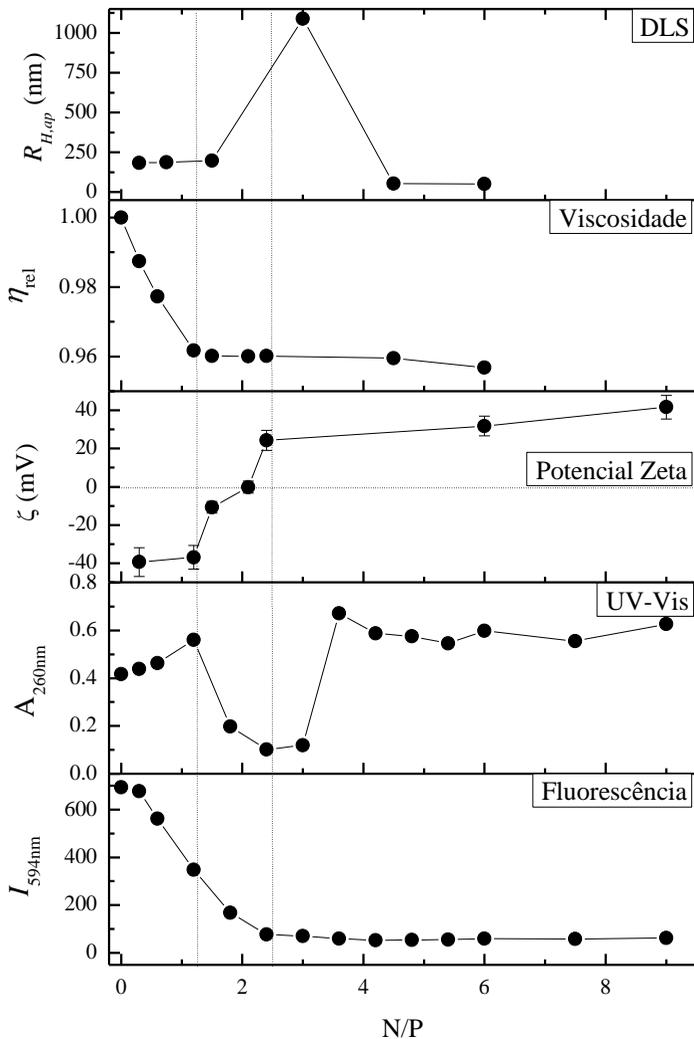
**Figura 37.** (A) Curvas da função de correlação normalizadas para DNA-PEI na razão N/P = 6,0 para diferentes ângulos de espalhamento, a 25,0 °C; (B) Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de correlação do DLS para DNA-PEI na razão N/P = 6,0.

### **3.2.7. Comparação dos resultados obtidos com as diferentes técnicas utilizadas**

Para a compreensão e visualização das etapas da interação do DNA com a PEI através das várias técnicas utilizadas, foi montada a Figura 38, que apresenta as curvas obtidas por DLS, viscosidade, potencial zeta, UV-Vis e fluorescência em diferentes razões N/P para o sistema DNA-PEI. Observou-se, para todas as técnicas estudadas, que as mudanças ocorrem em uma mesma região da razão N/P. Mais especificamente, verifica-se que a condensação das cadeias aniônicas do DNA pelas cadeias catiônicas da PEI ocorre pela neutralidade das cargas (potencial zeta igual a zero), com a formação de um coacervado.

Quando é adicionado mais PEI, ocorre uma inversão das cargas na superfície, e uma dissolução acontece em altas razões N/P, com as cadeias da PEI se associando à superfície dos complexos com o DNA condensado e deixando-os positivamente carregados, o que os tornam solúveis novamente. A repulsão das cargas positivas faz com que ocorra uma diminuição no tamanho dos complexos formados entre o DNA e a PEI.

Os estudos encontrados na literatura da interação do DNA com a PEI [7; 112; 113; 114] utilizam várias técnicas, mas em nenhum deles foi feito um estudo comparativo com a quantidade de técnicas combinadas que foram apresentadas neste trabalho. Os resultados apresentados aqui mostraram a importância da combinação de técnicas para complementar ou confirmar os dados obtidos pela outra, o que enriqueceu sobremaneira o entendimento do sistema estudado. Também foi mostrado ser possível acompanhar a interação DNA-PEI por medidas de viscosidade relativa. A técnica de CD foi empregada, podendo-se pelos resultados obtidos através dela afirmar que mesmo em altas razões N/P o DNA mantém a conformação da dupla hélice, porém com algumas bases sendo expostas ao solvente por uma possível intercalação com a PEI.



**Figura 38.** Compilação dos dados obtidos da interação DNA-PEI em função de diferentes razões N/P por meio das técnicas de DLS, viscosidade, potencial zeta, UV-Vis e fluorescência. As linhas pontilhadas na vertical foram acrescentadas à Figura para permitir uma melhor comparação entre os dados obtidos pelas diferentes técnicas. A linha pontilhada na horizontal aponta a faixa em que ocorre a inversão no valor de potencial zeta. As linhas cheias servem somente como guia para orientar a observação.

### **3.3. ESTUDO DAS PROPRIEDADES DAS SOLUÇÕES DE DNA NA PRESENÇA DE PEIS DECORADAS COM GRUPOS HIDROFÓBICOS OU COM URIDINA**

No capítulo anterior, a natureza das interações entre a PEI e o DNA foi mais bem compreendida, pelo uso de várias técnicas. Neste capítulo, será investigada a influência de modificações estruturais na estrutura da PEI na sua interação com o DNA. Foram feitos estudos da interação do DNA com as PEIs hidrofobicamente modificadas (PEI-C4, PEI-C6, PEI-C8 e PEI-C12) e as PEIs decoradas com uridina (PEI-Uri5% e PEI-Uri15%), através de técnicas de espectrofotometria de UV-Vis, fluorescência, CD, potencial zeta, viscosidade e espalhamento de luz dinâmico. No final deste capítulo apresenta-se o estudo de SAXS para o DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15%.

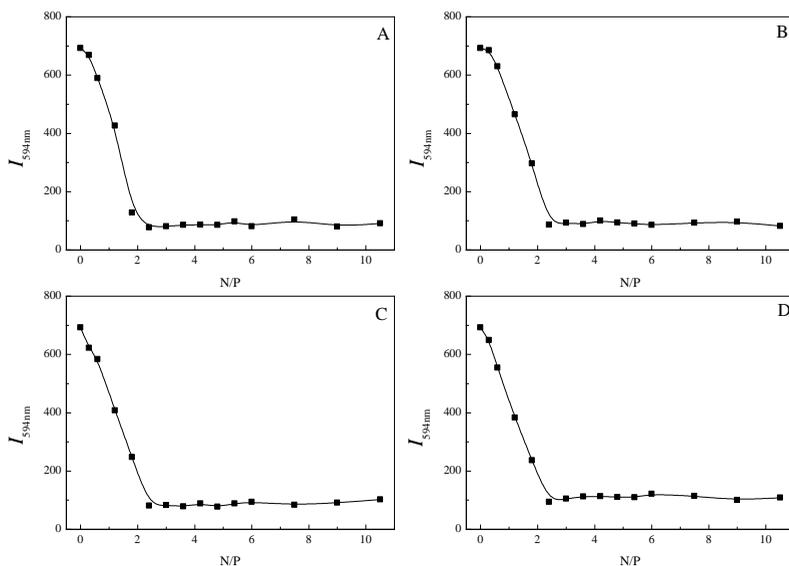
#### **3.3.1. Interação em meio aquoso de DNA com PEIs hidrofobicamente modificadas**

##### **3.3.1.1. Ensaios por meio da técnica de fluorescência**

Medidas de fluorescência foram feitas para verificar a interação do DNA com as PEIs alquiladas e comparar com os resultados obtidos para a PEI não modificada. O BE tem sua intensidade de emissão de fluorescência aumentada quando é intercalado ao DNA. No entanto, quando uma espécie carregada positivamente é adicionada ao meio, a mesma pode competir com o BE pelo DNA, deslocando a sonda para a solução, o que leva à supressão da fluorescência [113]. Isso foi observado quando foram adicionadas as PEIs alquiladas à solução contendo o complexo DNA-BE. Na Figura 39 são apresentadas as curvas de  $I_{594nm}$  em função da razão N/P para os sistemas de DNA com as PEIs alquiladas. Como esperado, a adição das PEIs alquiladas na solução contendo DNA-BE resultou na supressão de emissão de fluorescência do BE. Inicialmente, em razões N/P baixas apenas algumas moléculas das PEIs alquiladas se ligam ao DNA, o qual ainda tem moléculas de BE a ele intercaladas. Com o aumento da razão N/P

ocorre a supressão da fluorescência, devido às moléculas de BE migrarem do sítio de complexação no DNA para a forma livre em solução, onde a emissão de fluorescência é baixa.

As interações das PEIs alquiladas com o DNA investigadas por fluorescência apresentaram o mesmo comportamento e magnitude das interações comparadas com a PEI não modificada, apesar das modificações hidrofóbicas e da diminuição dos grupos amino primários. Bahadur e colaboradores [131] também não observaram mudanças significativas na condensação do DNA por PEIs de baixa massa molar modificadas hidrofobicamente. Através das curvas de fluorescência das PEIs alquiladas observa-se que a condensação do DNA ocorre na razão  $N/P = 2,4$  para todos os casos e essa razão é a mesma observada para a PEI não modificada. A técnica demonstra que aparentemente as alterações realizadas sobre a PEI não causaram efeito na interação com o DNA.



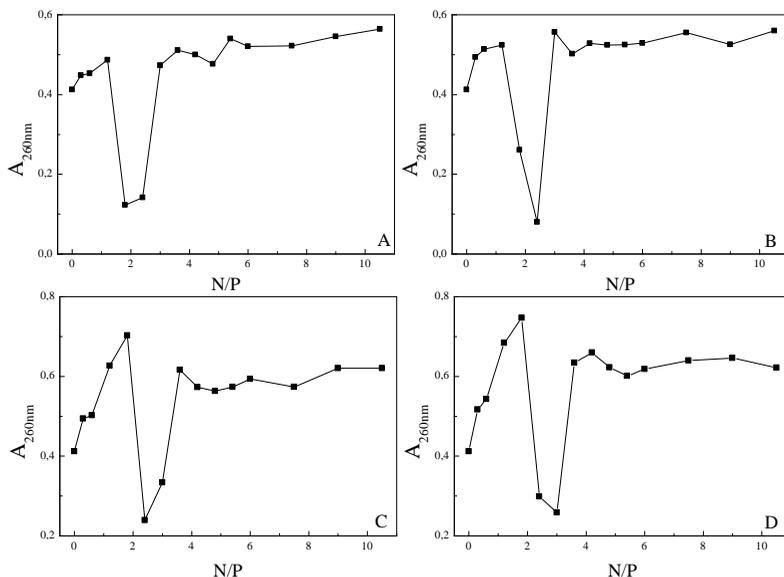
**Figura 39.** Curvas de  $I_{594nm}$  versus razão N/P para a PEI-C4 (A), PEI-C6 (B), PEI-C8 (C) e PEI-C12 (D). Manteve-se a concentração de BE em  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.3.1.2. Espectrofotometria de UV-Vis

As interações do DNA com as PEIs alquiladas também foram investigadas através de espectrofotometria de UV-Vis. Os espectros de absorvância do DNA com as PEIs alquiladas apresentaram um aumento na absorvância acima de 300,0 nm devido ao espalhamento da luz incidente pelos agregados formados [113; 114; 118], assim como foi observado para o sistema DNA-PEI. A absorção máxima para todos os sistemas de DNA-PEIs alquiladas apresentam um desvio para um comprimento de onda maior, em comparação com DNA livre, nas razões N/P onde os espectros apresentaram uma diminuição na absorvância. Esse deslocamento batocrômico (desvio para o vermelho) é também uma indicação da formação de complexos entre o DNA e as PEIs alquiladas [132].

A Figura 40 mostra as curvas de  $A_{260\text{nm}}$  em função da razão N/P para os sistemas DNA-PEI-C4, DNA-PEI-C6, DNA-PEI-C8 e DNA-PEI-C12. As curvas apresentam o mesmo comportamento observado para a PEI não modificada, entretanto, para a PEI-C8 e a PEI-C12 (Figura 40C e D) ocorre um hipercromismo maior em baixas razões N/P. Esse efeito hipercrômico pode estar relacionado com a possível intercalação com o DNA, que pode ocasionar uma extensão, desenrolamento e diminuição na rigidez da hélice do DNA [132]. Esse desenrolamento mostra o aumento da exposição das bases nitrogenadas que por sua vez causa um aumento na absorção máxima ( $A_{260\text{nm}}$ ) do DNA [132]. O tamanho da PEI-C8 e da PEI-C12 é grande o bastante para formar uma ligação de intercalação, o que sugere que as cadeias alquílicas mais longas estejam ocasionando pequenas modificações nas bases nitrogenadas, o que as deixa mais expostas, provocando o hipercromismo observado.

Para o sistema de DNA com a PEI-C8 e a PEI-C12 (Figura 40C e D) observou-se que o mínimo na  $A_{260\text{nm}}$  para esses sistemas encontra-se em uma faixa da razão N/P maior, comparado às outras PEIs, necessitando mais polímero para que ocorra a condensação do DNA.



**Figura 40.** Curvas de  $A_{260nm}$  em função da razão N/P para os sistemas DNA-PEI-C4 (A), DNA-PEI-C6 (B), DNA-PEI-C8 (C) e DNA-PEI-C12 (D).

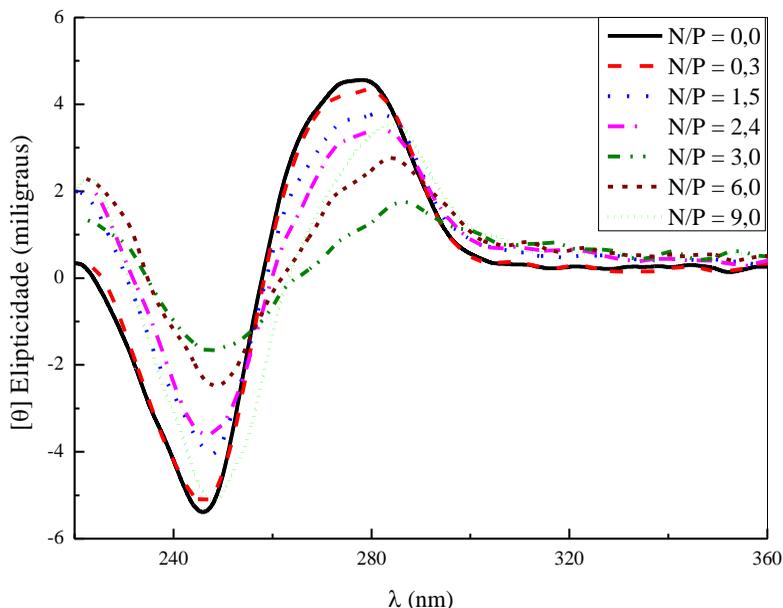
A temperatura de fusão ( $T_m$ ) foi determinada para as PEIs alquiladas na razão N/P = 0,3 e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 6. Observou-se que os valores das  $T_m$  para os sistemas DNA-PEIs alquiladas apresentaram um aumento na faixa de 2,6 a 3,8 °C quando comparados ao DNA puro. A diferença que foi observada nos valores de  $T_m$  entre o DNA com a PEI não modificada e o DNA com as PEIs alquiladas pode estar relacionada com a diminuição no número de grupos amino primários na cadeia do polímero, devido à substituição. Observou-se que a  $\Delta T_m$  para a PEI não modificada ficou em torno de duas vezes maior que para a PEI-C4, PEI-C6 e PEI-C8, e quase três vezes maior para a PEI-C12. Como todas as PEIs tiveram praticamente o mesmo grau de substituição, conseqüentemente a mesma diminuição no número de grupos aminos primários, isso sugere que a diminuição nos valores da  $T_m$  que são observados com o aumento da cadeia alquílica substituída deve-se ao impedimento estérico dos grupos substituídos.

**Tabela 6.** Valores de  $T_m$  determinados para o DNA puro e os sistemas DNA-PEIs alquiladas.

Amostra	$T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
	N/P = 0,0	N/P = 0,3	
DNA	74,4	--	--
DNA-PEI	--	81,9	7,5
DNA-PEI-C4	--	78,2	3,8
DNA-PEI-C6	--	78,1	3,7
DNA-PEI-C8	--	78,0	3,6
DNA-PEI-C12	--	77,0	2,6

### 3.3.1.3. Dicroísmo Circular

Medidas de CD foram apenas realizadas para o sistema DNA-PEI-C12, pelo fato dos resultados das técnicas anteriores apontarem para uma maior diferença quando comparados ao sistema DNA-PEI. A Figura 41 mostra os espectros de CD do DNA e dos complexos DNA-PEI-C12 em diferentes razões N/P. O espectro de CD do DNA apresentou os sinais característicos em 245,0 nm (negativo) e 275,0 nm (positivo) da forma B [119; 120; 121]. A razão N/P 0,3 não apresentou mudanças significativas no espectro de CD, mas acima dessa razão mudanças foram observadas. Os espectros de CD do sistema DNA-PEI-C12 mostraram o mesmo comportamento apresentado pelo DNA-PEI: com o aumento na razão N/P ocorre uma diminuição significativa na elipticidade e um desvio para  $\lambda$  maiores foi observado tanto nas bandas negativas como nas positivas. Esse comportamento começa a mudar a partir da razão N/P = 6,0 onde as bandas começam a aumentar sua elipticidade. Na razão N/P = 9,0 a banda negativa praticamente retorna à elipticidade original, o que indica que a conformação de dupla hélice se mantém, porém a banda positiva apresenta menor elipticidade e maior deslocamento. Isso sugere que a ligação da PEI-C12 ao DNA induz pequenas alterações no empilhamento das bases e, como visto na interação do DNA-PEI, sugere-se que algumas bases no DNA estão expostas ao solvente, pela possível intercalação com as cadeias da PEI-C12 [122].



**Figura 41.** Espectros de CD para o DNA e diferentes razões N/P pela adição de PEI-C12 ao meio, conforme as legendas indicadas.

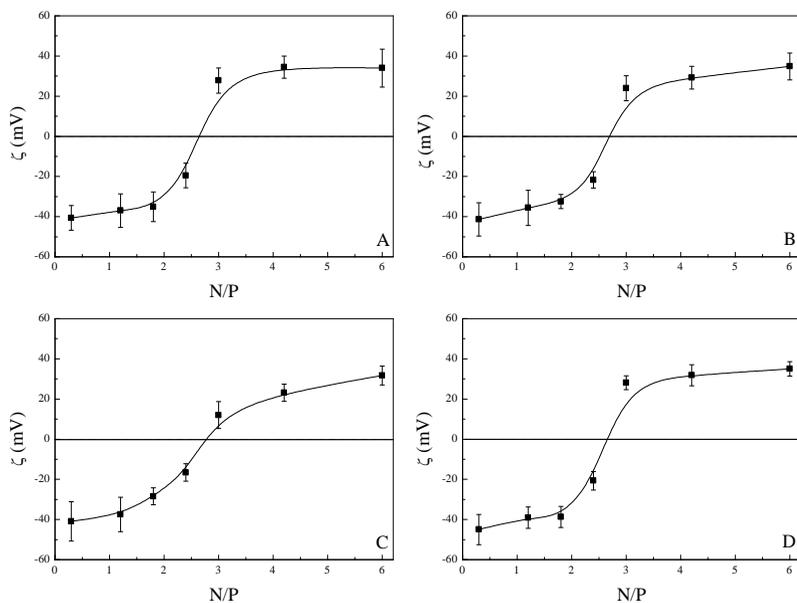
#### 3.3.1.4. Potencial zeta

Os valores de  $\zeta$  foram determinados para os sistemas de DNA com as PEIs alquiladas em diferentes razões N/P, como apresentado na

Figura 42. Todos os complexos de DNA com as PEIs alquiladas apresentaram um comportamento semelhante no que se refere aos valores de  $\zeta$ , com a inversão do sinal entre razões N/P de 2,4 e 3,0. Quando comparados com o sistema DNA-PEI, observou-se um aumento na razão N/P onde ocorre a inversão do sinal de negativo para positivo, ou seja, para que os complexos formados entre o DNA e as PEIs alquiladas se tornassem positivamente carregados. Essa inversão nos valores de  $\zeta$  para todos os sistemas acontece na mesma faixa da razão N/P em que foi observado um mínimo pela técnica de UV-Vis e onde a intensidade de emissão da fluorescência ficou constante. O mínimo observado nos ensaios de UV-Vis deve-se à equivalência das cargas do

complexo DNA-PEI alquilada, com formação de um coacervado. Nesse intervalo de razões N/P, o DNA está completamente condensado. Quando mais polímero é adicionado, os complexos ficam positivamente carregados, o que torna os complexos DNA-PEIs alquiladas solúveis novamente.

Comparando os valores de  $\zeta$  na razão N/P = 6,0 encontrados para todas as PEIs alquiladas ( $\zeta = 34,0 \pm 9,4$  mV;  $34,8 \pm 6,7$  mV;  $31,7 \pm 4,6$  mV e  $35,0 \pm 3,6$  mV, para a PEI-C4, PEI-C6, PEI-C8 e PEI-C12 respectivamente) observou-se que são ligeiramente menores do que os obtidos na mesma razão N/P para a PEI não modificada ( $\zeta = 38,0 \pm 5,2$  mV), devido à substituição nos grupos amino primários [34].

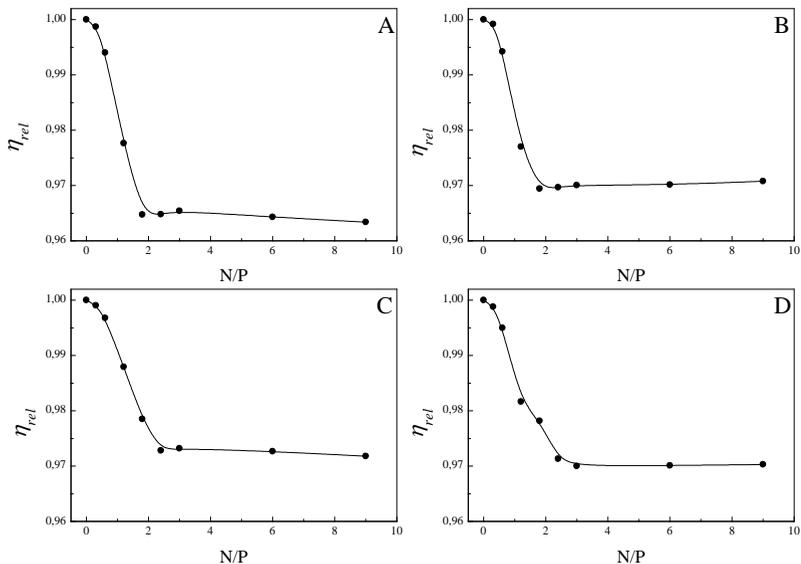


**Figura 42.** Valores de  $\zeta$  (mV) determinados em diferentes razões N/P para os sistemas de DNA-PEI-C4 (A), DNA-PEI-C6 (B), DNA-PEI-C8 (C) e DNA-PEI-C12 (D). A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.3.1.5. Viscosidade

Medidas de viscosidade de soluções de diferentes razões N/P de DNA com as PEIs alquiladas foram realizadas para investigar a interação e verificar alguma mudança na viscosidade relativa que tenha sido motivada pela presença das cadeias alquílicas substituídas. A Figura 43 apresenta a  $\eta_{rel}$  em função da razão N/P para o sistema DNA-PEIs alquiladas. Os valores de  $\eta_{rel}$  dos complexos de DNA com as PEIs alquiladas apresentam a mesma diminuição observada para a PEI, no entanto as razões N/P onde a viscosidade relativa atinge um mínimo são maiores, isto é, a quantidade de polímero necessário para a condensação do DNA é maior, sendo essa quantidade ainda maior para as PEIs substituídas com maiores cadeias (PEI-C8 e PEI-C12). Um fato interessante que se deve observar é que essa razão N/P onde a viscosidade relativa atinge um mínimo é a faixa onde é observado o mínimo na intensidade de emissão da fluorescência do BE, o mínimo de  $A_{260nm}$  por UV-Vis e onde ocorre a inversão do sinal do valor de potencial zeta.

Oskuee e colaboradores [34] observaram que o aumento no grau de substituição e o aumento no tamanho da cadeia de ácidos carboxílicos substituídos na PEI resultaram em uma diminuição na capacidade de condensar o DNA. Nos sistemas com as PEIs alquiladas pode-se observar esse efeito comparando os valores de  $\eta_{rel}$  para cada sistema com o DNA. O valor da  $\eta_{rel}$  é igual a 0,957 na razão N/P = 6,0 para a PEI não modificada, enquanto que para as PEIs alquiladas a  $\eta_{rel}$  é  $\geq 0,970$  na mesma razão N/P, com exceção da PEI-C4 que apresentou um valor de 0,965, mas ainda maior. Essas comparações são indícios que mostram uma pequena diminuição na eficiência de condensação do DNA.



**Figura 43.** Curvas de  $\eta_{rel}$  em função da razão N/P para os sistemas de DNA-PEI-C4 (A), DNA-PEI-C6 (B), DNA-PEI-C8 (C) e DNA-PEI-C12 (D) a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.3.1.6. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico foi utilizada para investigar os tamanhos dos complexos formados pelo DNA com as PEIs alquiladas, pelo monitoramento das alterações do raio hidrodinâmico aparente ( $R_{H,ap}$ ). A Tabela 7 mostra os valores de  $R_{H,ap}$  determinados a partir das curvas de função de correlação normalizadas para diferentes razões N/P dos sistemas DNA-PEIs alquiladas em um ângulo de espalhamento de  $\theta = 90^\circ$ . Observou-se que para todas as razões N/P ocorrem sempre duas populações com tamanhos diferentes, o mesmo comportamento que já havia sido observado para o sistema DNA-PEI (ver seção 3.2.6.). Nos sistemas DNA-PEI-C4 e DNA-PEI-C6 nota-se que as razões  $N/P \leq 2,25$  apresentam duas populações, que correspondem à parcial condensação das cadeias de DNA [116]. O

mesmo é observado para os sistemas DNA-PEI-C8 e DNA-PEI-C12, no entanto, ocorrendo nas razões  $N/P \leq 3,0$ . A formação de complexos com tamanho micrométrico é observada na razão  $N/P = 3,0$  para os sistemas DNA-PEI-C4 e DNA-PEI-C6 e na razão  $N/P = 4,5$  para os sistemas DNA-PEI-C8 e DNA-PEI-C12. Essas faixas de razão  $N/P$  têm proximidade da região onde ocorre a formação do coacervado, onde o potencial zeta está próximo de zero. Nessa faixa da razão  $N/P$  ocorreu um enorme aumento no valor do  $R_{H,ap}$ , que pode ser calculado para uma das populações, nos sistemas com a PEI-C4, PEI-C8 e PEI-C12.

Todos os sistemas na razão  $N/P = 6,0$  apresentaram praticamente uma única população com valores de  $R_{H,ap}$  menores, o que sugere que todas as cadeias de DNA estão complexadas com as PEIs alquiladas. Os valores de  $R_{H,ap}$  encontrados nessa razão para as PEIs alquiladas com cadeias maiores apresentaram valores maiores, condizentes com o que foi observado por medidas de viscosidade relativa, o que leva à sugestão de que o tamanho da cadeia alquílica substituída tem influência sobre a condensação do DNA [34].

Os complexos formados pelo DNA com as PEIs alquiladas diminuem de tamanho em altas razões  $N/P$ . Esse comportamento também foi observado no sistema com a PEI não modificada, ocorrendo devido aos complexos formados apresentarem uma superfície positivamente carregada, que leva a um aumento nas forças de repulsão eletrostáticas entre os complexos formados [130].

**Tabela 7.** Valores de  $R_{H,ap}$  determinados para diferentes razões N/P de DNA-PEI-C4, DNA-PEI-C6, DNA-PEI-C8 e DNA-PEI-C12. As linhas sombreadas indicam a região da formação de complexos com tamanho micrométrico.

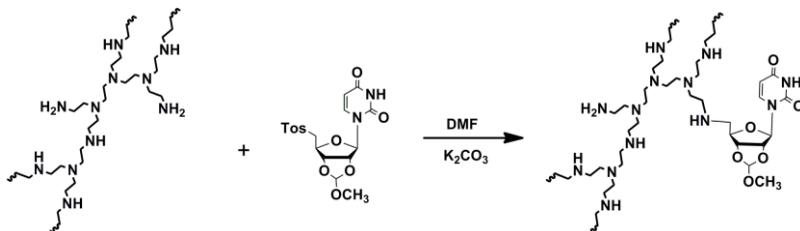
Razão	DNA-PEI-C4				DNA-PEI-C6			
	N/P	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)
0,3	112,7±1,6	47	233,0±29,0	53	143,1±1,5	43	243,2±3,9	67
0,75	114,8±1,5	48	191,9±10,6	52	133,6±1,6	46	585,1±59,2	44
1,5	126,8±1,2	45	208,2±10,2	55	128,4±1,2	58	233,0±14,0	42
2,25	157,6±1,8	56	298,9±24,2	44	149,1±1,3	62	215,6±14,2	38
3,0	1054,6±24,2	75	--	--	--	--	--	--
4,5	60,9±1,2	98	97,7±8,7	2	68,0±0,9	98	113,1±7,7	2
6,0	59,6±0,9	99	101,2±8,6	1	67,7±0,4	98	98,5±8,3	2
Razão	DNA-PEI-C8				DNA-PEI-C12			
	N/P	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)
0,3	113,9±2,7	48	251,0±31,9	52	138,8±1,8	39	232,2±4,1	61
0,75	83,0±1,0	46	129,4±10,5	54	130,2±1,6	40	215,9±3,3	60
1,5	80,1±0,7	67	173,9±12,9	33	126,8±1,9	53	205,6±3,3	47
2,25	98,5±0,8	65	153,3±5,7	35	125,9±1,1	54	223,6±12,6	46
3,0	134,5±1,2	74	245,0±11,5	26	125,9±1,1	84	386,4±36,9	16
4,5	1046,5±1,5	93	--	--	1098,7±32,7	92	--	--
6,0	85,9±0,6	98	164,5±7,4	2	80,2±0,4	98	177,3±4,4	2



### 3.3.2. Interação em meio aquoso de DNA com PEIs decoradas com uridina

#### 3.3.2.1. Síntese e Caracterização

A modificação da PEI decorada com a uridina foi motivada pela possível ligação de hidrogênio da uridina ao DNA. As PEIs decoradas com uridina (PEIs–Uri) foram preparadas por um método adaptado com base no que foi descrito por Park e colaboradores [17] (Figura 44). A uridina tosilada foi dissolvida em DMF e adicionada gota-a-gota em uma solução da PEI em DMF contendo excesso de carbonato de potássio. Foi agitada por 5 dias em temperatura ambiente e fez-se a diálise por 3 dias.



**Figura 44.** Esquemas das sínteses do grupo uridinil com a PEI.

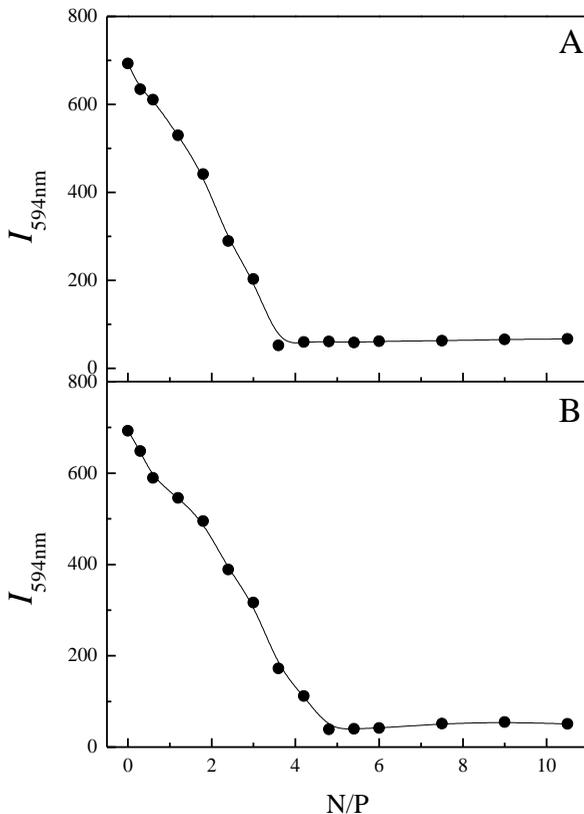
A solubilidade das PEIs decoradas com a uridina foi verificada em vários solventes, mas a água deuterada foi a que melhor solubilizou os polímeros decorados, o que dificultou o aparecimento de alguns sinais nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) para as PEIs–Uri apresentaram sinais característicos da PEI em  $\delta$  2,3-3,1 ppm, e sinais do grupo uridinil, como os dos grupos metoxi (–OCH<sub>3</sub>), e os hidrogênios do acetal (–CH(OR)<sub>3</sub>) e o sinal do hidrogênio do anel (os espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) para PEI–Uri5% e PEI–Uri15% estão apresentados no anexo B e C, respectivamente).

O grau de substituição em cada PEI decorada foi estimado a partir da integração das áreas dos sinais correspondentes aos grupos –CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N– e –OCH<sub>3</sub>. Os graus de substituição encontrados para PEI–Uri foram de ~5,0% e ~15,0%, e são representadas com as abreviaturas PEI–Uri5% e PEI–Uri15% respectivamente.

### 3.3.2.2. Fluorescência

As medidas de emissão de fluorescência do BE foram usadas para estudar a interação do DNA com as PEIs–Uri. A Figura 45 apresenta as curvas da intensidade de emissão máxima em 594 nm do BE ( $I_{594\text{nm}}$ ) em função da razão N/P para a PEI–Uri5% e PEI–Uri15%. Observou-se a diminuição na  $I_{594\text{nm}}$  com o aumento da razão N/P nos dois sistemas, atingindo um mínimo em 3,6 e 4,8 para a PEI–Uri5% e PEI–Uri15%, respectivamente. Quando se compara com os resultados obtidos para a PEI não modificada (N/P = 2,4), observa-se que a razão N/P necessária para inibir a fluorescência do BE foi 50% maior para a PEI–Uri5% (N/P = 3,6) e 100% maior para a PEI–Uri15% (N/P = 4,8).

A técnica de fluorescência utilizando o BE não informa de que forma ocorre a interação do DNA com o polímero, e sim a quantidade necessária de polímero para a inibição da emissão de fluorescência do BE que está intercalado ao DNA. Entretanto, pode ocorrer a interação entre o DNA e as PEIs–Uri por ligação de hidrogênio, simultaneamente com a interação eletrostática, pois o polímero modificado ainda apresenta em solução cargas positivas. Observa-se um aumento na concentração de polímero necessária para a completa inibição da emissão de fluorescência ou condensação do DNA, em comparação à PEI não modificada. Essa diferença está diretamente relacionada com o efeito de estereo impedimento devido ao “volume” do grupo uridinil, que dificulta a interação eletrostática, entre o DNA e as PEIs decoradas com a uridina, reduziu a capacidade eletrostática do sistema.

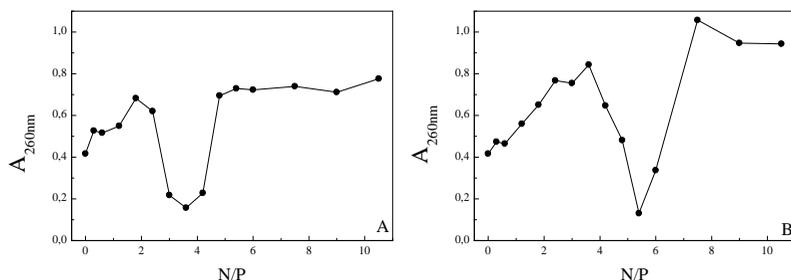


**Figura 45.** Curvas de  $I_{594nm}$  versus razão N/P para a PEI-Uri5% (A) e PEI-Uri15% (B). Manteve-se a concentração de BE em  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> a 25,0 °C. A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.3.2.3. Espectrofotometria de UV-Vis

A interação do DNA com as PEIs-Uri em diferentes razões N/P foi acompanhada por medidas de UV-Vis. Os espectros apresentam um aumento na absorvância em  $\lambda > 300,0$  nm que é uma evidência da formação de complexos DNA-PEIs-Uri [114; 118]. Acompanhou-se a absorção máxima em 260 nm ( $A_{260nm}$ ) em função da razão N/P para os sistemas DNA-PEI-Uri5% e DNA-PEI-Uri15% como apresentado na Figura 46. A curva é muito semelhante às observadas nos sistemas

DNA-PEI-C8 e DNA-PEI-C12 (Figura 40C e D), apresentando um hipercromismo mais acentuado com a PEI-Uri15%. As razões N/P entre 3,0 e 4,2 para o sistema DNA-PEI-Uri5% e entre 4,8 e 6,0 para o sistema DNA-PEI-Uri15% são as faixas onde ocorre a condensação do DNA, que são maiores comparadas aos outros sistemas, como também foi observado por fluorescência.



**Figura 46.** Curvas de  $A_{260nm}$  em função de N/P para os complexos de DNA-PEI-Uri5% (A) e DNA-PEI-Uri15% (B).

Foram determinados os valores de  $T_m$  para as PEIs-Uri na razão N/P = 0,6, os quais estão apresentados na Tabela 8. Os valores de  $T_m$  encontrados para DNA-PEI-Uri5% e DNA-PEI-Uri15% apresentaram um aumento de 2,2 °C e 1,7 °C, respectivamente, quando comparados ao valor encontrado para o DNA. Esses aumentos foram menores que os determinados para os outros sistemas, apesar de ter sido utilizado o dobro da concentração de polímero. A pequena  $\Delta T_m$  deve-se pelo fato de as PEIs-Uri protegem menos o DNA, devido aos grupos uridinil que dificultam a interação por estereoidimpedimento e reduzem a capacidade de interação eletrostática do sistema.

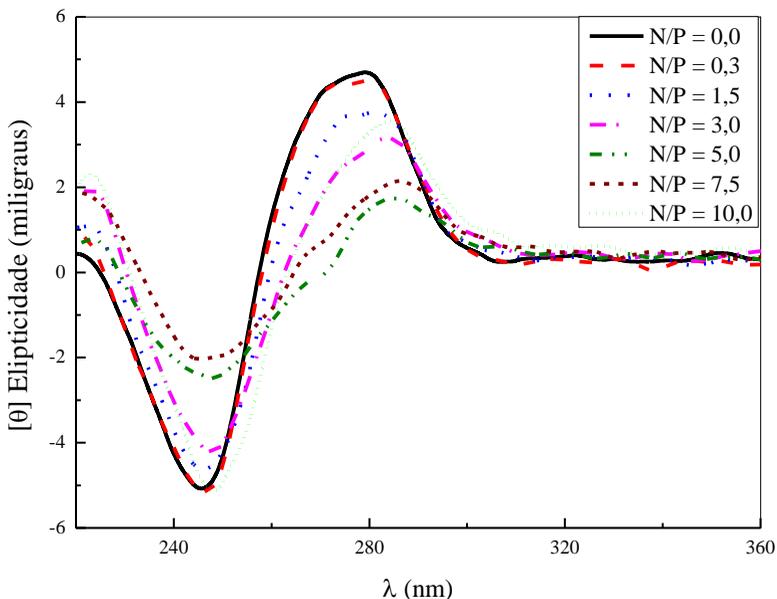
**Tabela 8.** Valores de  $T_m$  determinados para o DNA puro e os sistemas DNA-PEIs decoradas com uridina.

Amostra	$T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
	N/P = 0,0	N/P = 0,3	N/P = 0,6	
DNA	74,4	--	--	--
DNA-PEI	--	81,9	--	7,5
DNA-PEI- Uri5%	--	--	76,6	2,2
DNA-PEI- Uri15%	--	--	76,1	1,7

#### 3.3.2.4. Dicroísmo circular

Medidas de CD também foram utilizadas para monitorar a interação do DNA nos complexos formados com a PEI–Uri15% em diferentes razões N/P. A solução contendo a PEI–Uri15% apresentou um sinal no espectro de CD dentro da região monitorada. Portanto, os sinais observados para cada razão N/P do sistema DNA-PEI–Uri15% foram descontados em cada razão com a mesma concentração da PEI–Uri15%.

Os espectros do DNA e dos complexos formados pelo DNA-PEI–Uri15% em diferentes razões N/P são mostrados na Figura 47. O espectro de CD do DNA é típico da conformação B constituído por uma banda positiva em 275,0 nm e uma banda negativa em 245,0 nm. Após a formação do complexo do DNA-PEI–Uri15%, ambas as regiões do espectro de CD do DNA são alteradas, mostrando uma diminuição no valor da elipticidade de ambas as bandas positiva e negativa, juntamente com um deslocamento de  $\lambda$  maior quando a razão N/P é aumentada. As mudanças na banda positiva são mais pronunciadas do que na negativa, essa última confirma que a conformação da dupla hélice se mantém. Na razão N/P igual a 10,0 a banda positiva apresenta um deslocamento no  $\lambda$  para valores maiores e um decréscimo no valor na elipticidade significativo, indicando que algumas bases estão expostas ao solvente [122], como também foi observado para os outros sistemas, DNA-PEI e DNA-PEI–C12.

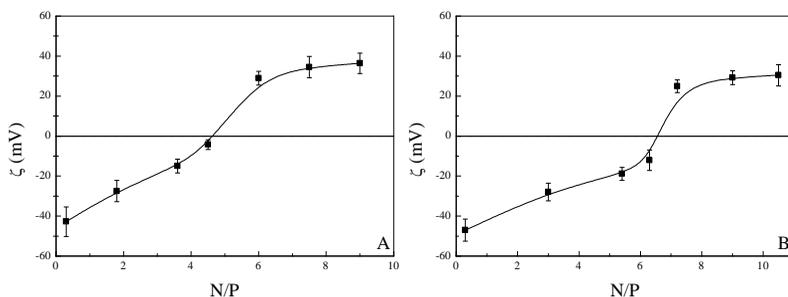


**Figura 47.** Espectros de CD para o DNA e diferentes razões de N/P para o sistema DNA-PEI-Uri15% conforme legenda indicado no gráfico.

### 3.3.2.5. Potencial zeta

Medidas de potencial zeta foram realizadas para os complexos formados por DNA-PEI-Uri5% e DNA-PEI-Uri15% em diferentes razões N/P e os valores estão apresentados na Figura 48. Os complexos formados pelo DNA e as PEIs-Uri apresentam valores de potencial zeta negativos em baixas razões N/P ( $\sim -42,0$  mV), enquanto que em razões N/P altas, o potencial zeta é positivo ( $\sim 37,0$  mV). A razão N/P em que acontece a inversão do sinal para a PEI-Uri5% está na faixa de 4,0 a 5,0 e para a PEI-Uri15% na faixa de 6,0 a 7,0. Quando comparados com o sistema DNA-PEI, observou-se um aumento na razão N/P onde ocorre a inversão do sinal de negativo para positivo, ou seja, para que os complexos formados entre o DNA e as PEIs-Uri se tornassem positivamente carregados. Observou-se que a inversão nos valores de  $\zeta$  para os dois sistemas ocorre na faixa da razão N/P em que foi observado um mínimo pela técnica de UV-Vis. É nessa faixa que se tem a

equivalência das cargas dos complexos DNA-PEIs–Uri, com formação de um coacervado, onde o DNA está completamente condensado. Quando mais polímero é adicionado, os complexos ficam positivamente carregados, o que torna os complexos DNA-PEIs–Uri solúveis novamente.



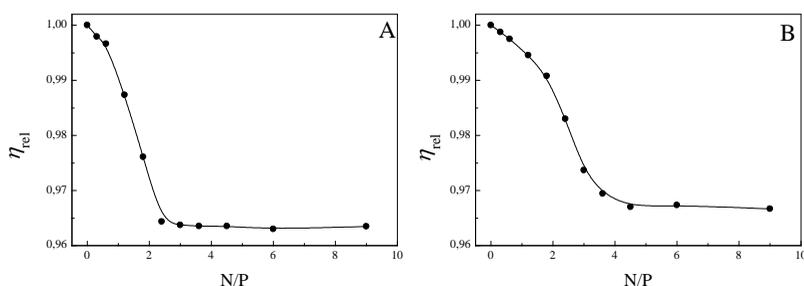
**Figura 48.** Valores de  $\zeta$  (mV) determinados em diferentes razões de N/P para os sistemas de DNA-PEI–Uri5% (A) e DNA-PEI–Uri15% (B). A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.3.2.6. Viscosidade

Medidas de viscosidade de soluções com diferentes razões N/P de DNA-PEI–Uri5% e DNA-PEI–Uri15% foram realizadas para investigar a interação e verificar alguma mudança na viscosidade relativa que tenha sido motivada pela presença do grupo uridilil substituído. A Figura 49 apresenta a  $\eta_{rel}$  em função da razão N/P para os sistemas DNA-PEI–Uri5% e DNA-PEI–Uri15%. As curvas de  $\eta_{rel}$  para os complexos formados apresentam o mesmo comportamento que foi observado para o sistema DNA-PEI, uma diminuição na viscosidade relativa com o aumento da razão N/P. No entanto, para os complexos DNA-PEI–Uri5% e DNA-PEI–Uri15% as razões N/P em que os valores de  $\eta_{rel}$  atingem um mínimo são maiores. É nesse mínimo de  $\eta_{rel}$  que se pode estimar a concentração das PEIs–Uri necessária para condensar as cadeias do DNA, que acontece na razão N/P entre 2,4 e 3,0 para DNA-PEI–Uri5% e na razão N/P entre 3,6 e 4,0 para DNA-PEI–Uri15%.

Essas faixas nas razões N/P são um pouco menores que a faixa observada por fluorescência, UV-Vis e potencial zeta.

Através das medidas de viscosidade relativa pode-se observar a força da interação ou qual PEI–Uri condensa melhor as cadeias do DNA, fazendo a comparação dos valores de  $\eta_{rel}$  em uma mesma razão N/P para todos os sistemas. Quando comparados os valores de  $\eta_{rel}$  na razão N/P = 6,0 para a PEI não modificada e as PEIs–Uri, observou-se que a PEI não modificada é a que apresentou o menor valor ( $\eta_{rel} = 0,957$ ), conseqüentemente a que melhor condensa o DNA, seguida pela PEI–Uri5% ( $\eta_{rel} = 0,963$ ) e PEI–Uri15% ( $\eta_{rel} = 0,967$ ).



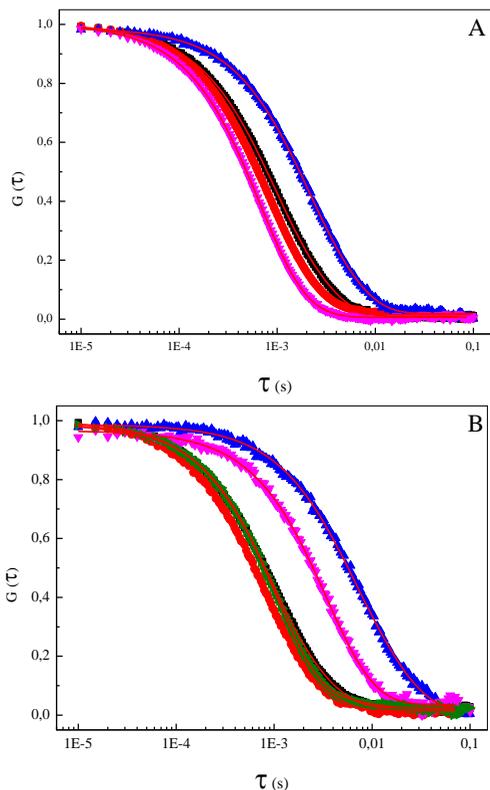
**Figura 49.** Curvas de  $\eta_{rel}$  em função da razão de N/P para os sistemas de DNA-PEI–Uri5% (A) e DNA-PEI–Uri15% (B) a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.3.2.7. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Assim como para os outros sistemas, também foi investigado o tamanho hidrodinâmico dos complexos formados pelo DNA com a DNA-PEI–Uri5% e DNA-PEI–Uri15% através de medidas de DLS. A Figura 50 mostra as curvas de função de autocorrelação normalizadas para DNA-PEI–Uri5% e DNA-PEI–Uri15% em diferentes razões N/P em um ângulo fixo de  $90^\circ$ . Observa-se que as curvas de função de correlação apresentam  $\tau$  diferentes, dependendo da razão N/P. Esse comportamento também foi observado nos sistemas de DNA com a PEI, estando relacionado com o tamanho dos complexos.

A partir dessas curvas foram feitos ajustes exponenciais para determinar os valores de  $\tau$ , e conseqüentemente os valores de  $\Gamma$  e  $D_0$

para cada razão N/P dos sistemas. Os valores de  $R_{H,ap}$  para cada razão N/P estudada foram determinados a partir da equação de Stokes-Einstein (equação (22)) e estão apresentados na Tabela 9.



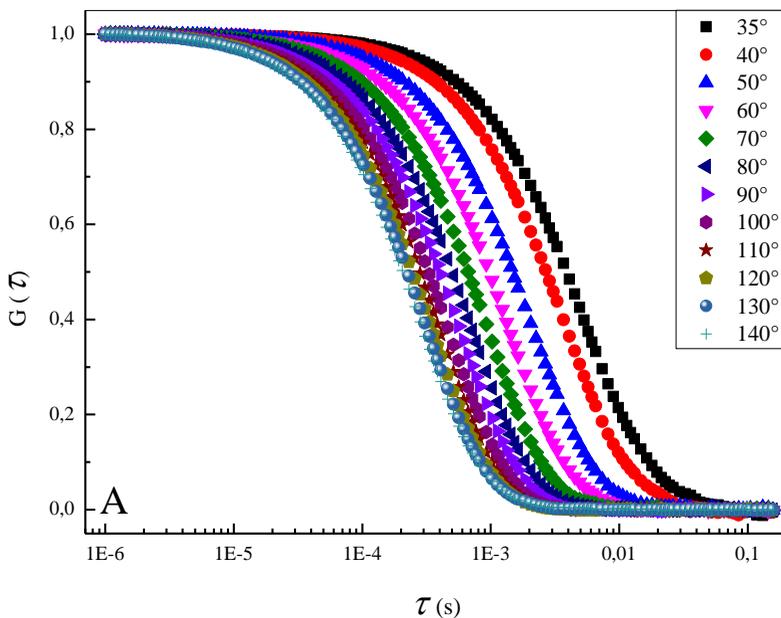
**Figura 50.** Curvas de função de autocorrelação normalizadas para DNA-PEI-Uri5% (A) nas razões N/P 0,3 (■), 3,0 (●), 6,0 (▲) e 7,5 (▼) e DNA-PEI-Uri15% (B) nas razões N/P 0,3 (■), 3,0 (●), 6,0 (▲), 7,5 (▼) e 9,0 (►) em um ângulo fixo de  $90^\circ$ . Foram feitos ajustes exponenciais a todos os conjuntos de pontos experimentais.

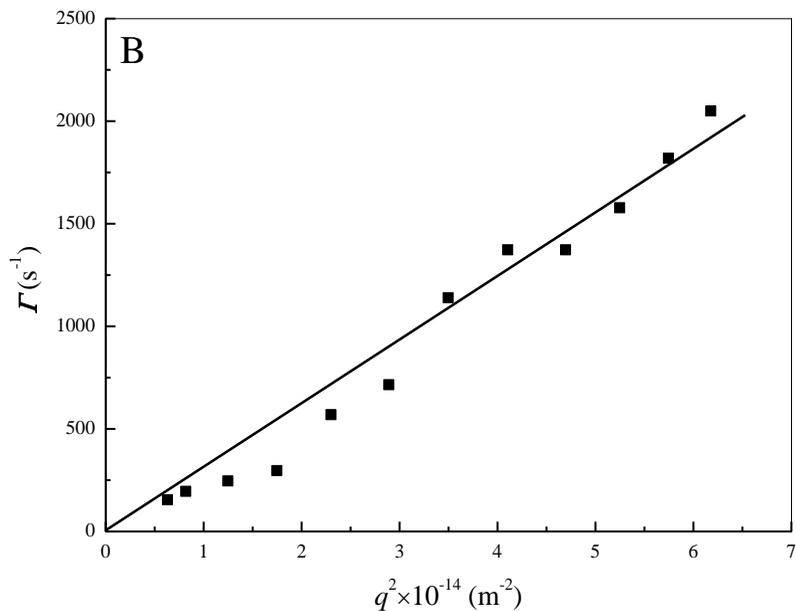
Os valores de  $R_{H,ap}$  encontrados para os dois sistemas apresentaram duas populações, com quantidades próximas em baixas razões N/P, e praticamente uma população em alta razão N/P, assim como os outros sistemas estudados. Os complexos formados pelo DNA e as PEIs decoradas com a uridina apresentam complexos de tamanhos micrométricos nas razões N/P 4,5 e 6,0 para o DNA-PEI-Uri5% e DNA-PEI-Uri15%, respectivamente. Isso acontece devido à equivalência das cargas entre DNA e polieletrólito, que leva à formação de complexos de tamanhos muito grandes. Em altas razões N/P, os complexos apresentam tamanhos menores, por estarem positivamente carregados, o que leva a uma forte repulsão eletrostática entre os complexos.

**Tabela 9.** Valores de  $R_{H,ap}$  determinados para diferentes razões N/P de DNA-PEI-Uri5% e DNA-PEI-Uri15%. A região sombreada indica a formação de complexos com tamanho micrométrico.

Razão N/P	DNA-PEI-Uri5%				DNA-PEI-Uri15%			
	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)
0,3	105,4±1,6	51	187,2±12,8	49	101,1 ± 2,0	53	333,7 ± 14,8	47
0,75	76,2±0,8	48	125,1±3,7	52	89,1 ± 1,1	52	145,6 ± 7,2	48
1,5	67,8±1,5	58	132,8±10,7	42	77,7 ± 0,9	60	163,2 ± 8,7	40
3,0	83,7±0,7	75	220,2±12,9	25	83,4 ± 0,8	62	204,8 ± 9,7	38
4,5	1896,7±33,5	80	--	--	125,8 ± 1,2	61	264,7±11,4	39
6,0	119,9±5,2	94	357,2±13,0	6	916,2±18,5	93	--	--
7,5	71,3±1,3	98	112,2±9,6	2	247,6±21,0	95	569,7±117,4	5
9,0	--	--	--	--	88,2 ± 1,1	98	153,7 ± 8,7	2

A Figura 51A mostra as funções de correlação temporal medida em diferentes ângulos de espalhamento para a razão  $N/P = 9,0$  do sistema DNA-PEI-Uri15%. Observa-se uma diminuição de  $\tau$  com o aumento do ângulo de espalhamento. Como o espalhamento de partículas maiores predomina em ângulos baixos o aumento de  $\theta$  faz com que porções menores dos agregados DNA-PEI-Uri15% sejam acessadas, que apresentam o tempo de relaxação menor que todo o agregado de DNA-PEI-Uri15%. A Figura 51B mostra a variação típica da frequência angular  $\Gamma = 1/\tau$  medida como uma função de  $q^2$  indicando um comportamento difusivo do espalhamento das partículas. Utilizando a equação de Stokes-Einstein calculou-se o  $R_{H,real}$  para o complexo formado pelo DNA-PEI-Uri15% na razão  $N/P = 9,0$ , sendo o valor encontrado igual a 79,9 nm.



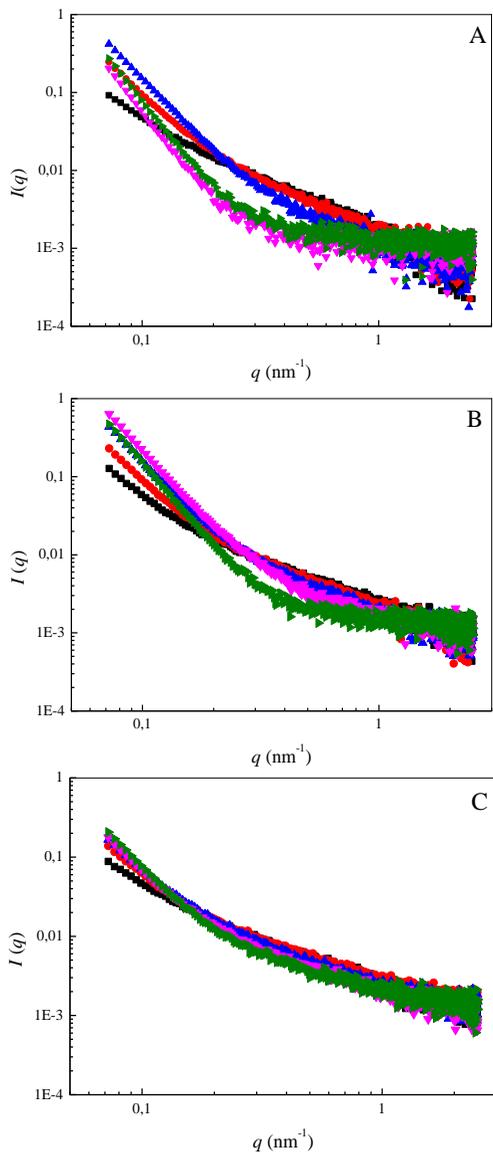


**Figura 51.** (A) Curvas da função de correlação normalizadas para DNA-PEI-Uri15% na razão N/P = 9,0 para diferentes ângulos de espalhamento. (B) Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de correlação do DLS para DNA-PEI-Uri15% na razão N/P = 9,0.

### 3.3.3. Estudo de SAXS para os sistemas DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15%

A interação do DNA com a PEI, PEI-C12 e PEI-Uri15% foi investigada através de medidas de SAXS em diferentes razões N/P para identificar uma possível mudança na morfologia dos complexos formados. Nos experimentos de SAXS foi utilizada uma concentração maior do DNA e dos polieletrólitos, comparado com as outras técnicas, devido à baixa intensidade de espalhamento. A Figura 52 mostra curvas de SAXS para diferentes razões N/P dos sistemas DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15%. A Figura 52A apresenta as curvas de SAXS para os complexos de DNA-PEI, o perfil da curva muda com o aumento da razão N/P, apresenta um aumento na intensidade e inclinações que mudam sistematicamente a baixos ângulos  $q < 0,1$ . Na região de ângulos maiores que  $q > 0,1 \text{ nm}^{-1}$  também ocorrem mudanças, principalmente para as razões N/P iguais a 6,0 e 9,0. Nessas razões a intensidade de espalhamento diminui até formar um patamar. No sistema DNA-PEI-C12 um perfil semelhante é apresentado, conforme mostra a Figura 52B, no entanto, a intensidade com que ocorrem essas mudanças, com o aumento da razão N/P, é menor. Ainda menos significativa é a mudança nas curvas de SAXS para os complexos de DNA-PEI-Uri15% (Figura 52C). Com a razão N/P = 10,5 a curva não apresentou o patamar observado nos outros dois sistemas.

As curvas de SAXS para os 3 sistemas estudados informam qualitativamente algumas mudanças na conformação do DNA. A PEI não modificada é a que apresenta a maior alteração, seguida da PEI-C12 e PEI-Uri15%, devido às interações eletrostáticas entre os grupos amino e os grupos fosfatos. Quando a PEI é alquilada, no caso a PEI-C12, diminui a quantidade de grupos aminos primários e ocorre um aumento na hidrofobicidade. Esses fatores proporcionam uma diminuição na intensidade em que ocorre a interação do DNA com a PEI-C12. Por outro lado, a PEI-Uri15% foi a que apresentou a menor mudança, indicando que a interação entre este polímero e o DNA é mais fraca. Nesse caso, existe a diminuição de grupos aminos primários pelo grupo uridinil, que estão presentes em maior grau de substituição. As medidas de SAXS para esse sistema sugerem que a condensação do DNA pela PEI-Uri15% ocorre com menor intensidade quando comparada aos outros dois sistemas, devido às pequenas mudanças na conformação do DNA com o aumento da concentração do polímero.



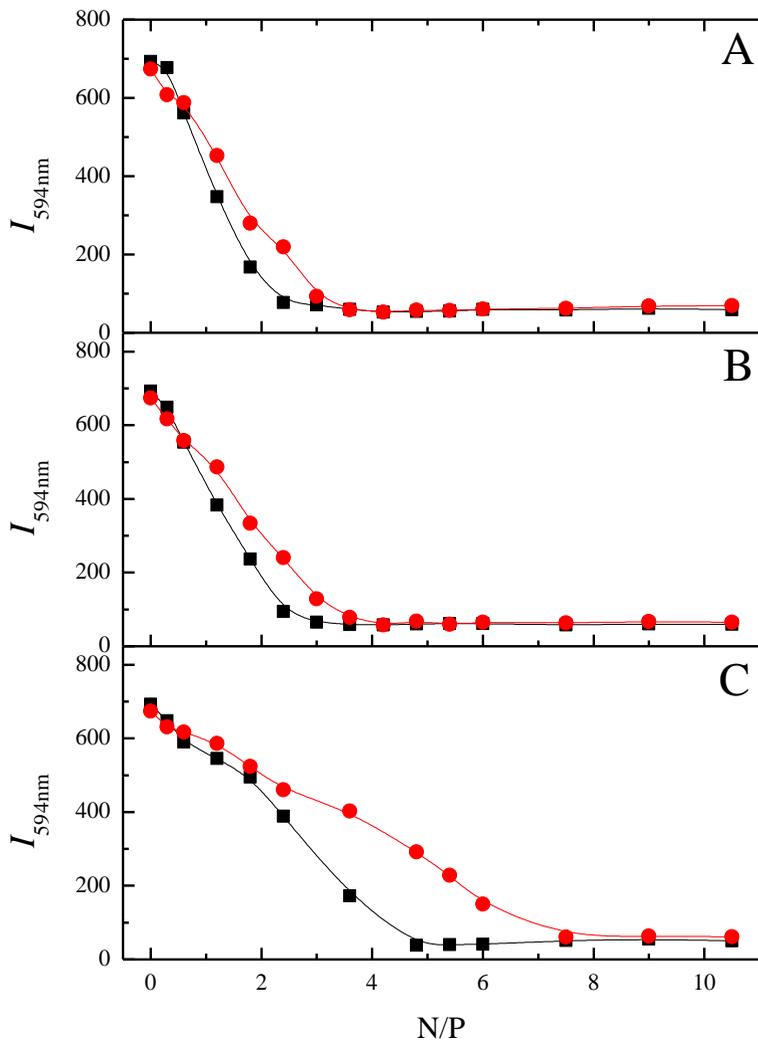
**Figura 52.** Dependência angular da intensidade de SAXS dos complexos DNA-PEI (A) e DNA-PEI-C12 (B) nas razões N/P: 0,3 (■), 1,2 (●), 3,0 (▲), 6,0 (▼) e 9,0 (►). Medidas de SAXS dos complexos DNA-PEI-Uri15% (C) nas razões N/P: 0,3 (■), 1,8 (●), 4,5 (▲), 6,0 (▼) e 10,5 (►).

### **3.4. INFLUÊNCIA DO SDS NA FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS DE DNA COM A PEI, PEI-C12 E PEI-URI15%**

Algumas medidas de fluorescência, UV-Vis, potencial zeta e viscosidade foram feitas para os sistemas DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS. Foi apresentado nos capítulos anteriores que a formação dos complexos de DNA com a PEI, PEI-C12 e PEI-Uri15% ocorre principalmente por interações eletrostáticas. Foi ainda mostrado que as PEIs são também capazes de interagir com o SDS. Assim, foi feito um estudo do comportamento de algumas PEIs (PEI, PEI-C12 e PEI-Uri15%) com DNA na presença de SDS, a fim de se verificar se um cenário de competição é criado e qual influência o mesmo teria sobre a formação dos complexos, devido à possível concorrência dos sítios negativamente carregados no DNA e no SDS pelos sítios positivamente carregados nas PEIs.

#### **3.4.1. Fluorescência**

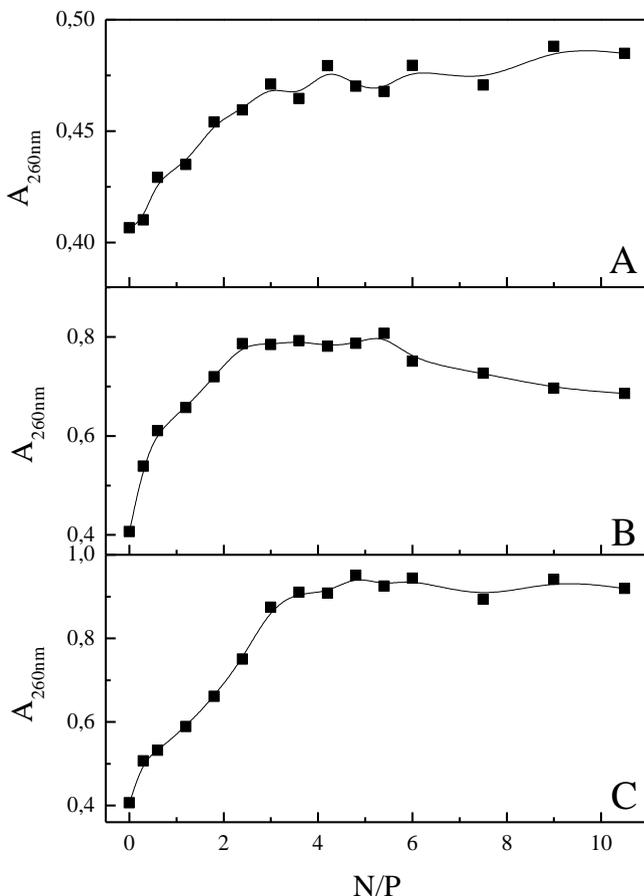
Medidas de fluorescência foram realizadas para verificar a influência do SDS na condensação do DNA pela PEI, PEI-C12 e PEI-Uri15%. A Figura 53 mostra a intensidade máxima de emissão de fluorescência do BE intercalado ao DNA em 594,0 nm em função da razão N/P para os 3 sistemas na ausência e na presença de SDS. Quando se comparam os sistemas na ausência e na presença de SDS, observa-se um aumento na razão N/P em que o mínimo de  $I_{594\text{nm}}$  é atingido para todos os sistemas em que o surfactante encontra-se adicionado. Esse aumento ocorre devido às moléculas de SDS se ligarem às PEIs por interação eletrostática, o que diminui as cargas positivas disponíveis dos grupos amino protonados. Assim, são necessárias quantidades maiores de PEIs para que a condensação do DNA ocorra.



**Figura 53.** Curvas de  $I_{594\text{nm}}$  versus razão N/P. (A) PEI (■) e PEI + SDS (●); (B) PEI-C12 (■) e PEI-C12 + SDS (●); e (C) PEI-Uri15% (■) e PEI-Uri15% + SDS (●). A  $c(\text{SDS})$  utilizada foi fixada em  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS. A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.4.2. Espectrofotometria de UV-Vis

Medidas de UV-Vis dos sistemas DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% na presença de SDS apresentaram espectros de UV-Vis parecidos com os espectros na ausência de SDS. No entanto, não foi verificado um mínimo na absorvância máxima ( $A_{260\text{nm}}$ ). A Figura 54 mostra os gráficos de  $A_{260\text{nm}}$  em função da razão N/P para os sistemas DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS. Observou-se em baixas razões N/P um hipercromismo até atingir um máximo e permanecer praticamente constante. Os gráficos mostram que os 3 sistemas atingem o máximo de absorvância em  $260,0 \text{ nm}$  na mesma razão N/P que foi observado o início do mínimo de  $A_{260\text{nm}}$  para os sistemas DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% na ausência de SDS. Sugere-se que o surfactante atua como um dispersante do complexo, evitando a precipitação do coacervado, e por esse motivo não ocorre um mínimo na  $A_{260\text{nm}}$ .



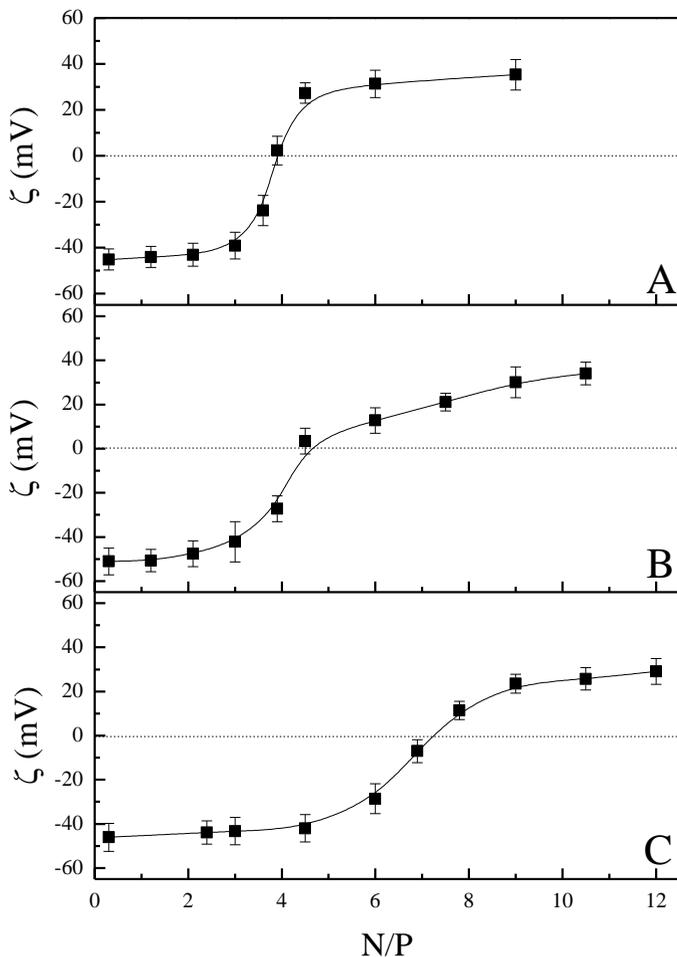
**Figura 54.** Gráficos de  $A_{260nm}$  versus razão N/P para o DNA-PEI (A), DNA-PEI-C12 (B) e DNA-PEI-Uri15% (C), na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS.

### 3.4.3. Potencial zeta

A carga na superfície de complexos DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% na presença de SDS foi estimada a partir de medidas de potencial zeta. A Figura 55 apresenta os valores de  $\zeta$  para os complexos formados por DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% em diferentes razões N/P com  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS. Os complexos formados apresentaram valores de potencial zeta fortemente

negativos para baixas razões N/P (entre -46,0 e -51,0 mV), enquanto que em razões N/P elevada, o  $\zeta$  é positivo (entre 25,0 e 35,0 mV).

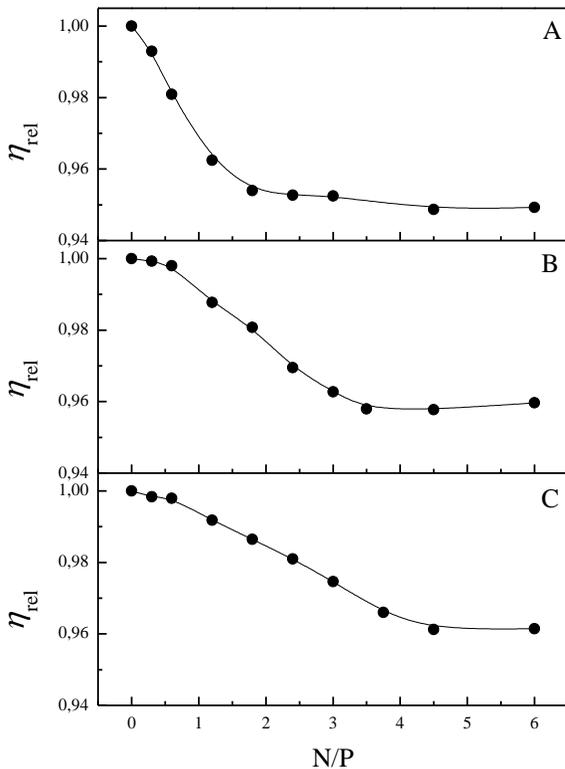
A presença de SDS nesses sistemas fez com que apresentassem valores de  $\zeta$  menores em todas as razões N/P, em comparação com os mesmos sistemas na ausência de SDS. Na ausência de SDS a inversão dos valores negativos para positivos do  $\zeta$  ocorre quando a razão de carga do polímero se iguala a do DNA. Na presença de SDS, a quantidade de polímero adicionado deve ser maior, para que ocorra a igualdade de cargas, devido às cargas negativas do SDS. O sistema DNA-PEI-SDS foi o que apresentou maior diferença na razão N/P onde se observa a inversão dos sinais nos valores de  $\zeta$ , comparando-se ao mesmo sistema na ausência de SDS. Isso ocorre devido à interação específica entre a PEI e o SDS (ver item 3.1.). Para o sistema DNA-PEI-C12-SDS também observou-se um aumento na razão N/P, menos pronunciado que o sistema com a PEI não modificada, devido à combinação de interações específicas e hidrofóbicas do SDS com a PEI-C12 (ver item 3.1.). O sistema DNA-PEI-Uri15%-SDS apresentou um pequeno aumento na razão N/P em que ocorre a inversão, quando comparado ao sistema na ausência de SDS, confirmando que o grau de substituição e o estereopimpimento do grupo uridinil influenciam na interação com o DNA.



**Figura 55.** Valores de potencial zeta *versus* razão N/P para o DNA-PEI (A), DNA-PEI-C12 (B) e DNA-PEI-Uri15% (C), na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS. As linhas cheias servem apenas como guia para orientação.

### 3.4.4. Viscosidade

O aumento nos valores da razão N/P em que ocorre a condensação do DNA e a inversão do sinal nos valores de  $\zeta$ , conforme observado por medidas de fluorescência e  $\zeta$ , também foi observado por medidas de viscosidade relativa para os 3 sistemas. A Figura 56 apresenta os gráficos de  $\eta_{rel}$  versus razão N/P para DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Observou-se o mesmo comportamento quando na ausência de SDS, com o aumento da razão N/P ocorre uma diminuição nos valores da  $\eta_{rel}$  até atingir um mínimo. A presença de SDS nesses 3 sistemas levou ao aumento na razão N/P em que se observou o mínimo, quando comparado aos mesmos sistemas na ausência do surfactante, conforme observado com as outras técnicas. Em altas razões N/P, os valores de  $\eta_{rel}$  são diferentes para cada sistema. Para o DNA-PEI-SDS na razão N/P = 6,0 o valor de  $\eta_{rel}$  é igual a 0,949, enquanto para o DNA-PEI-C12-SDS e DNA-PEI-Uri15%-SDS os valores são de 0,959 e 0,961 respectivamente, na mesma razão N/P. Mesmo na presença de SDS a PEI não modificada é a que melhor condensa o DNA em comparação aos outros dois sistemas.



**Figura 56.** Valores de viscosidade relativa *versus* razão N/P para o DNA-PEI (A), DNA-PEI-C12 (B) e DNA-PEI-Uri15% (C), na presença de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de SDS a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . A linha cheia serve apenas como guia para orientação.

### 3.4.5. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

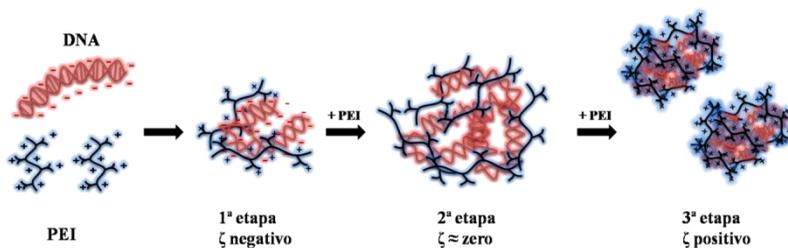
Utilizando o equipamento Zetasizer da Malvern determinou-se o tamanho dos complexos formados para o DNA-PEI, DNA-PEI-C12 e DNA-PEI-Uri15% na presença de SDS (Tabela 10), a um ângulo fixo de 173°. A concentração utilizada teve que ser maior devido à baixa intensidade de espalhamento. O comportamento observado pelas medidas de DLS na presença de SDS é semelhante aos apresentados na ausência de SDS. Em todas as razões N/P foram observadas duas populações com tamanhos diferentes, no entanto, os complexos com tamanho micrométrico são observados em uma larga faixa de razão N/P, onde não foi possível determinar o tamanho dos complexos. Essa larga faixa na razão N/P deve-se ao SDS estar dispersando os coacervados, pois compreende a faixa de  $\zeta$  próximo de zero para cada sistema. No entanto, em altas razões N/P observou-se que os valores do  $R_{H,ap}$  dos complexos foram menores comparados aos sistemas na ausência de SDS. Como foi observado com as outras técnicas, os sistemas necessitam de uma concentração maior de polieletrólito para a condensação das cadeias do DNA, quando na presença de SDS.

**Tabela 10.** Valores de  $R_{H,ap}$  determinado para diferentes razões N/P de DNA-PEI-SDS, DNA-PEI-C12-SDS e DNA-PEI-Uri15%-SDS. A região sombreada indica a formação de complexos com tamanho micrométrico.

DNA-PEI-SDS				
Razão N/P	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)
0,3	60,2 ± 2,1	47	212,1 ± 9,1	53
1,2	56,1 ± 1,9	39	179,6 ± 5,6	61
2,1	--	--	--	--
2,4	--	--	--	--
3,0	--	--	--	--
3,6	123,5 ± 6,6	37	499,5 ± 12,3	63
4,5	56,2 ± 6,1	66	128,4 ± 2,9	34
6,0	47,6 ± 5,3	84	123,5 ± 6,6	16
9,0	48,4 ± 7,2	92	102,2 ± 5,7	8
DNA-PEI-C12-SDS				
Razão N/P	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)
0,3	46,2 ± 1,2	41	189,9 ± 3,5	59
1,2	46,8 ± 1,3	45	179,6 ± 3,8	55
2,4	37,3 ± 1,1	35	106,5 ± 1,8	65
3,0	38,3 ± 1,6	36	109,1 ± 2,1	64
3,6	--	--	--	--
4,5	--	--	--	--
6,0	135,1 ± 3,5	60	406,2 ± 8,4	40
9,0	37,9 ± 1,1	75	136,7 ± 3,9	25
10,5	36,6 ± 1,0	90	113,1 ± 1,2	10
DNA-PEI-Uri15%-SDS				
Razão N/P	1 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)	2 $R_{H,ap}$ (nm)	(%)
0,3	188,2 ± 5,5	60	391,1 ± 27,7	40
1,2	46,2 ± 1,2	41	189,9 ± 3,5	59
2,4	46,8 ± 1,2	45	179,6 ± 3,8	55
3,0	42,4 ± 1,0	35	106,5 ± 2,4	65
3,6	135,1 ± 3,5	41	406,2 ± 8,4	59
4,5	--	--	--	--
6,0	--	--	--	--
7,5	--	--	--	--
9,0	37,9 ± 1,0	81	136,7 ± 3,9	19
10,5	36,3 ± 1,1	91	113,1 ± 1,6	9

### 3.4.6. Sobre o modelo de interação do DNA com as PEIs

Com base nos estudos feitos, pode-se apresentar um modelo da interação entre o DNA e as PEIs. Essa interação apresenta três etapas (Figura 57): a primeira, onde o DNA é parcialmente condensado, que ocorre em baixas razões N/P, pela agregação espontânea das cadeias de carga oposta, impulsionada por interações eletrostáticas. Na segunda etapa, os agregados formados se reorganizam para formar uma fase condensada macroscópica, um coacervado, em que os complexos estão com densidade de cargas iguais, potencial zeta igual a zero. A terceira, em altas razões N/P onde a concentração da PEI é maior, que leva a um excesso de carga positiva sobre os complexos, de modo que formam complexos positivamente carregados solúveis e de tamanhos menores, devido à repulsão de cargas entre os agregados formados.



**Figura 57.** Modelo das etapas de interação da PEI com o DNA.



## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSÕES GERAIS

A modificação da PEI com grupos alquilas, resultou em polímeros que exibem uma atividade pronunciada na superfície, semelhante aos valores relatados para os agentes tenso ativos típicos, que conduzem à formação de domínios hidrofóbicos em fase aquosa. Além disso, o estudo apresentado demonstra claramente que a hidrofobicidade da PEI pode ser ajustada através do aumento do comprimento dos grupos alquilas. As tendências observadas aqui são de interesse para aplicação no desenvolvimento de sistemas adaptados para serem solúveis em ambientes aquosos, mas também capazes de interagir com as espécies lipofílicas ou anfifílicas.

Isso foi verificado através da observação da interação das PEIs hidrofobicamente modificadas com SDS. A associação da PEI e PEIs modificadas em solução contendo SDS mostrou que um aumento na concentração de surfactante contribui para uma redução sistemática no valor de  $R_g$ . É interessante notar que para a PEI-C12, em solução aquosa, na presença de uma elevada concentração de SDS, ocorre a formação de agregados compactos, mostrando a presença de multidomínios entre agregados e as cadeias poliméricas em conformação aleatória. Observa-se que, considerando-se o mesmo grau de modificação na PEI, mas com o aumento do comprimento da cadeia alquílica substituída, um aumento na atividade na superfície foi obtido, e que o início da formação de agregados polímero-surfactante ocorre em concentrações de SDS menores. As diferentes técnicas empregadas foram consideradas ideais para se alcançar maior conhecimento sobre esses sistemas, e um modelo para a interação das PEIs com SDS em água foi proposto, baseado na combinação dos efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos.

A interação do DNA com as PEIs hidrofobicamente modificadas e decoradas com a uridina mostraram três etapas na formação de complexos: (a) em baixas razões N/P coexistem complexos DNA-PEIs e cadeias de DNA parcialmente condensadas; (b) com um aumento na razão de N/P ocorre a formação de um coacervado com tamanho micrométrico e densidade de carga nula ( $\zeta = 0$ ); e (c) com a

adição de mais polieletrólito (razões N/P altas) são formados complexos carregados positivamente com valores de  $R_{H,ap}$  de 51,0 a 88,0 nm.

Os complexos de DNA-PEIs decoradas com uridina apresentaram menor variação na temperatura de fusão, comparados aos outros sistemas. Por medidas de SAXS, esse sistema foi o que apresentou menor mudança na conformação do DNA, sugerindo que as interações eletrostáticas são prejudicadas pelo estereo impedimento do grupo uridinil, reduzindo a capacidade eletrostática do sistema.

A presença de SDS na formação de complexos DNA-PEIs proporcionou a concorrência pelas cargas positivas das PEIs entre o surfactante aniônico e o DNA, necessitando maior quantidade de polieletrólito maior para a completa condensação do DNA. O sistema apresentou uma faixa maior da razão N/P onde foram observados complexos micrométricos, além disso, em altas razões N/P os complexos apresentaram tamanhos menores, quando comparados aos dos complexos na ausência de SDS, o que sugeriu que na presença do surfactante os complexos estão sendo formados com uma quantidade de cadeias condensadas de DNA menor.

Com o conhecimento adquirido na interação das PEIs com o DNA por diferentes técnicas, tem como perspectiva para a continuidade nos estudos relacionados a essa linha de pesquisa, a modificação da PEI ramificada e linear com duas outras bases como a guanina e a citosina, para investigar a interação com um oligonucleotídeo através de ligações de hidrogênio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] RUBINSTEIN, M.; DOBRYNIN, A. *Physical Chemistry of Polyelectrolytes. Surfactant Science Series. Volume 99 Edited by Tsetska Radeva (Bulgarian Academy of Sciences). Marcel Dekker: New York, Basel. 2001. xvi + 882 pp. Journal of the American Chemical Society*, v. 123, n. 40, p. 9928, 2001.
- [2] KOETZ, J.; KOSMELLA, S. *Polyelectrolytes and Nanoparticles*. Berlin: Springer, 2007.
- [3] NOTE, C.; KOETZ, J.; WATTEBLED, L.; LASCHEWSKY, A. *Effect of a new hydrophobically modified polyampholyte on the formation of inverse microemulsions and the preparation of gold nanoparticles. Journal of Colloid and Interface Science*, v. 308, n. 1, p. 162, 2007.
- [4] NÖDING, G.; HEITZ, W. *Amphiphilic poly(ethyleneimine) based on long-chain alkyl bromides. Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 199, n. 8, p. 1637, 1998.
- [5] WINDSOR, R.; NEIVANDT, D. J.; DAVIES, P. B. *Adsorption of Sodium Dodecyl Sulfate in the Presence of Poly(ethylenimine) and Sodium Chloride Studied Using Sum Frequency Vibrational Spectroscopy. Langmuir*, v. 17, n. 23, p. 7306, 2001.
- [6] WANG, H.; WANG, Y.; YAN, H.; ZHANG, J.; THOMAS, R. K. *Binding of Sodium Dodecyl Sulfate with Linear and Branched Polyethyleneimines in Aqueous Solution at Different pH Values. Langmuir*, v. 22, n. 4, p. 1526, 2006.
- [7] PARK, K. *PEI-DNA complexes with higher transfection efficiency and lower cytotoxicity. Journal of Controlled Release*, v. 140, n. 1, p. 1, 2009.

- [8] MA, Y.-F.; YANG, Y.-W. *Delivery of DNA-based cancer vaccine with polyethylenimine*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 75, 2010.
- [9] LUKASHENKO, S.; YURINA, A.; PASHIROVA, T.; KUDRYAVTSEV, D.; KOSACHEVA, E.; KUDRYAVTSEVA, L.; KONOVALOV, A. *Systems based on the hydrophobically modified poly(ethylene imines) and surfactants: Aggregation and catalysis*. **Colloid Journal**, v. 70, n. 3, p. 317, 2008.
- [10] JIANGUO, Y.; LIN, W.; OTIENO-ALEGO, V.; SCHWEINSBERG, D. P. *Polyvinylpyrrolidone and polyethylenimine as inhibitors for the corrosion of a low carbon steel in phosphoric acid*. **Corrosion Science**, v. 37, n. 6, p. 975, 1995.
- [11] SLINKIN, M. A. S., A. YA. *Triple interpolyelectrolyte complexes DNA-polycation-polyanion: a new approach to optimization of mixtures for transfection in eukaryotic cells*. **Bioorg. Khim.**, v. 27, n. 4, p. 291-299, 2001.
- [12] BRONICH, T. K.; VINOGRADOV, S. V.; KABANOV, A. V. *Interaction of Nanosized Copolymer Networks with Oppositely Charged Amphiphilic Molecules*. **Nano Letters**, v. 1, n. 10, p. 535, 2001.
- [13] GRIFFITHS, P. C.; PAUL, A.; FALLIS, I. A.; WELLAPPILLI, C.; MURPHY, D. M.; JENKINS, R.; WATERS, S. J.; NILMINI, R.; HEENAN, R. K.; KING, S. M. *Derivatizing weak polyelectrolytes--Solution properties, self-aggregation, and association with anionic surfaces of hydrophobically modified poly(ethylene imine)*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 314, n. 2, p. 460, 2007.
- [14] WAN, D.; YUAN, J.; PU, H. *Macromolecular Nanocapsule Derived from Hyperbranched Polyethylenimine (HPEI): Mechanism of Guest Encapsulation versus Molecular Parameters*. **Macromolecules**, v. 42, n. 5, p. 1533, 2009.

- [15] CHENG, W. P.; GRAY, A. I.; TETLEY, L.; HANG, T. L. B.; SCHÄTZLEIN, A. G.; UCHEGBU, I. F. *Polyelectrolyte Nanoparticles with High Drug Loading Enhance the Oral Uptake of Hydrophobic Compounds*. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1509, 2006.
- [16] LIU, H.; CHEN, Y.; ZHU, D.; SHEN, Z.; STIRIBA, S.-E. *Hyperbranched polyethylenimines as versatile precursors for the preparation of different type of unimolecular micelles*. **Reactive and Functional Polymers**, v. 67, n. 5, p. 383, 2007.
- [17] PARK, D.; WANG, J.; KLIBANOV, A. M. *One-Step, Painting-Like Coating Procedures To Make Surfaces Highly and Permanently Bactericidal*. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 2, p. 584, 2006.
- [18] APPELHANS, D.; KOMBER, H.; QUADIR, M. A.; RICHTER, S.; SCHWARZ, S.; VAN DER VLIST, J.; AIGNER, A.; MÜLLER, M.; LOOS, K.; SEIDEL, J.; ARNDT, K.-F.; HAAG, R.; VOIT, B. *Hyperbranched PEI with Various Oligosaccharide Architectures: Synthesis, Characterization, ATP Complexation, and Cellular Uptake Properties*. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1114, 2009.
- [19] ZUBAY, G. **Biochemistry**. New York: Macmillan Publishing Company, 1989.
- [20] WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.
- [21] ADAMS, R. L. P.; KNOWLER, J. T.; LEADER, D. P. **The Biochemistry of the Nucleic Acids**. New York: Chapman and Hall, 1986.
- [22] SAENGER, W. **Principles of Nucleic Acid Structure**. New York: Springer, 1988.

- [23] <http://pt.wikipedia.org/wiki/dna>. *Ácido desoxirribonucleico*: secondary title, Acessado em 06/07/2012.
- [24] LESLIE, A. G. W.; ARNOTT, S.; CHANDRASEKARAN, R.; RATLIFF, R. L. *Polymorphism of DNA double helices*. **Journal of Molecular Biology**, v. 143, n. 1, p. 49-72, 1980.
- [25] [www.nano-lifescience.com](http://www.nano-lifescience.com). *Cationic copolymers for non-viral gene delivery*: secondary title, acessado em 15/07/2012.
- [26] INCANI, V.; LAVASANIFAR, A.; ULUDAG, H. *Lipid and hydrophobic modification of cationic carriers on route to superior gene vectors*. **Soft Matter**, v. 6, n. 10, p. 2124, 2010.
- [27] KICHLER, A. *Gene transfer with modified polyethylenimines*. **The Journal of Gene Medicine**, v. 6, n. S1, p. S3, 2004.
- [28] KIRCHEIS, R.; WIGHTMAN, L.; WAGNER, E. *Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, n. 3, p. 341, 2001.
- [29] MERDAN, T.; KOPECEK, J.; KISSEL, T. *Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 715, 2002.
- [30] LUNGWITZ, U.; BREUNIG, M.; BLUNK, T.; GÖPFERICH, A. *Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 2, p. 247, 2005.
- [31] CHEN, D.; PING, Y.; TANG, G.; LI, J. *Polyethyleneimine-grafted poly(N-3-hydroxypropyl)aspartamide as a biodegradable gene vector for efficient gene transfection*. **Soft Matter**, v. 6, n. 5, p. 955, 2010.

- [32] ZINTCHENKO, A.; PHILIPP, A.; DEHSHAHRI, A.; WAGNER, E. *Simple Modifications of Branched PEI Lead to Highly Efficient siRNA Carriers with Low Toxicity*. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 1448, 2008.
- [33] DEHSHAHRI, A.; OSKUEE, R. K.; SHIER, W. T.; HATEFI, A.; RAMEZANI, M. *Gene transfer efficiency of high primary amine content, hydrophobic, alkyl-oligoamine derivatives of polyethylenimine*. **Biomaterials**, v. 30, n. 25, p. 4187, 2009.
- [34] OSKUEE, R. K.; DEHSHAHRI, A.; SHIER, W. T.; RAMEZANI, M. *Alkylcarboxylate grafting to polyethylenimine: a simple approach to producing a DNA nanocarrier with low toxicity*. **The Journal of Gene Medicine**, v. 11, n. 10, p. 921-932, 2009.
- [35] LEE, S.-Y.; HUH, M. S.; LEE, S.; LEE, S. J.; CHUNG, H.; PARK, J. H.; OH, Y.-K.; CHOI, K.; KIM, K.; KWON, I. C. *Stability and cellular uptake of polymerized siRNA (poly-siRNA)/polyethylenimine (PEI) complexes for efficient gene silencing*. **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 3, p. 339, 2010.
- [36] SHAW, D. J. *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1975.
- [37] MANIASSO, N. *Ambientes micelares em química analítica*. **Química Nova**, v. 24, n., p. 87-93, 2001.
- [38] ROSEN, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*: John Wiley & Sons, 2004.
- [39] MYERS, D. *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*: John Wiley & Sons, 1999.

- [40] MÉSZÁROS, R.; THOMPSON, L.; BOS, M.; VARGA, I.; GILÁNYI, T. *Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Polyethyleneimine: Surfactant-Induced Polymer Solution Colloid Dispersion Transition*. **Langmuir**, v. 19, n. 3, p. 609, 2003.
- [41] WINNIK, M. A.; BYSTRYAK, S. M.; CHASSENIEUX, C.; STRASHKO, V.; MACDONALD, P. M.; SIDDIQUI, J. *Study of Interaction of Poly(ethylene imine) with Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution by Light Scattering, Conductometry, NMR, and Microcalorimetry*. **Langmuir**, v. 16, n. 10, p. 4495, 2000.
- [42] BÓ, A. D.; SCHWEITZER, B.; FELIPPE, A. C.; ZANETTE, D.; LINDMAN, B. *Ethyl(hydroxyethyl)cellulose-sodium dodecanoate interaction investigated by surface tension and electrical conductivity techniques*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 256, n. 2-3, p. 171, 2005.
- [43] WINNIK, M. A.; BYSTRYAK, S. M.; SIDDIQUI, J. *Interaction of Pyrene-Labeled Poly(ethylene imine) with Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution*. **Macromolecules**, v. 32, n. 3, p. 624, 1999.
- [44] HOLMBERG, C.; NILSSON, S.; SUNDELÖF, L.-O. *Thermodynamic Properties of Surfactant/Polymer/Water Systems with Respect to Clustering Adsorption and Intermolecular Interaction as a Function of Temperature and Polymer Concentration*. **Langmuir**, v. 13, n. 6, p. 1392, 1997.
- [45] TERAOKA, I. *Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties* New York: John Wiley & Sons, 2002.
- [46] HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.

- [47] DANIELS, F. *Experimental Physical*: McGraw-Hill Book 1962.
- [48] GIACOMELLI, F. C. *Estruturação e Comportamento Físico-Químico de Sistemas Coloidais sob Efeito de Campo Elétrico Externo como Perspectiva para a Ciência Macromolecular*. Instituto de Química, UFRGS, Porto Alegre, 2009.
- [49] STEIN, R. S.; POWERS, J. *Topics in Polymer Physics*. London: Imperial College Press, 2006.
- [50] BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. *Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química*. **Química Nova**, v. 27, n., p. 492-495, 2004.
- [51] BIKERMAN, J. J. *Physical Surfaces*. New York - London: Academic Press, 1970.
- [52] LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Springer, 2006.
- [53] SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Thomson, 2006.
- [54] KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J. K. *Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 7, p. 2039, 1977.
- [55] COSTA, M. D. F. C.; FROEHNER, S. J.; RUZZA, Â. A.; SANTOS, S. D. F.; ZANETTE, D. *Discrepancies over the onset of surfactant monomer aggregation interpreted by fluorescence, conductivity and surface tension methods*. **Química Nova**, v. 21, n., p. 272-277, 1998.

- [56] ZANETTE, D.; FRESCURA, V. L. A. *Ideal mixing of polymer-surfactant complexes of polyethylene oxide and sodium dodecyl sulfate plus sodium dodecanoate.* **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 213, n. 2, p. 379-385, 1999.
- [57] KOGEJ, K.; SKERJANC, J. *Fluorescence and conductivity studies of polyelectrolyte-induced aggregation of alkyltrimethylammonium bromides.* **Langmuir**, v. 15, n. 12, p. 4251-4258, 1999.
- [58] WINNIK, F. M.; REGISMOND, S. T. A. *Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers.* **Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects**, v. 118, n. 1-2, p. 1-39, 1996.
- [59] ALARGOVA, R. G.; KOCHIASHKY, II; SIERRA, M. L.; ZANA, R. *Micelle aggregation numbers of surfactants in aqueous solutions: A comparison between the results from steady-state and time-resolved fluorescence quenching.* **Langmuir**, v. 14, n. 19, p. 5412-5418, 1998.
- [60] TURRO, N. J.; BARETZ, B. H.; KUO, P. L. *Photoluminescence Probes For The Investigation Of Interactions Between Sodium Dodecyl-Sulfate And Water-Soluble Polymers.* **Macromolecules**, v. 17, n. 7, p. 1321-1324, 1984.
- [61] DONG, D. C.; WINNIK, M. A. *The Py scale of solvent polarities. Solvanet effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with ET and Y values.* **Photochemistry and Photobiology**, v. 35, n. 1, p. 17-21, 1982.

- [62] ZANETTE, D.; FELIPPE, A. C.; SCHWEITZER, B.; DAL BO, A.; LOPES, A. *The absence of cooperative binding in mixtures of sodium cholate and poly(ethylene oxide) as indicated by surface tension, steady-state fluorescence and electrical conductivity measurements.* **Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects**, v. 279, n. 1-3, p. 87-95, 2006.
- [63] WARING, M. J. *Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids.* **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 269-282, 1965.
- [64] LI, H.; PENG, X.; SEELA, F. *Fluorescence quenching of parallel-stranded DNA bound ethidium bromide: the effect of 7-deaza-2'-deoxyisoguanosine and 7-halogenated derivatives.* **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 24, p. 6031-6034, 2004.
- [65] VILLA, A. M.; DOGLIA, S. M. *Ethidium bromide as a vital probe of mitochondrial DNA in carcinoma cells.* **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 14, p. 2588-2597, 2009.
- [66] NORWOOD, D. P.; MINATTI, E.; REED, W. F. *Surfactant/polymer assemblies. 1. Surfactant binding properties.* **Macromolecules**, v. 31, n. 9, p. 2957-2965, 1998.
- [67] MINATTI, E.; NORWOOD, D. P.; REED, W. F. *Surfactant/polymer assemblies. 2. Polyelectrolyte properties.* **Macromolecules**, v. 31, n. 9, p. 2966-2971, 1998.
- [68] BORSALI, R.; MINATTI, E.; PUTAUX, J. L.; SCHAPPACHER, M.; DEFFIEUX, A.; VIVILLE, P.; LAZZARONI, R.; NARAYANAN, T. *From "sunflower-like" assemblies toward giant wormlike micelles.* **Langmuir**, v. 19, n. 1, p. 6-9, 2003.

- [69] PUTAUX, J. L.; MINATTI, E.; LEFEBVRE, C.; BORSALI, R.; SCHAPPACHER, M.; DEFFIEUX, A. *Vesicles made of PS-PI cyclic diblock copolymers: In situ freeze-drying cryo-TEM and dynamic light scattering experiments*. **Faraday Discussions**, v. 128, n., p. 163-178, 2005.
- [70] BASTARDO, L. A.; GARAMUS, V. M.; BERGSTROM, M.; CLAEISSON, P. M. *The structures of complexes between polyethylene imine and sodium dodecyl sulfate in D2O: A scattering study*. **Journal Of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 1, p. 167-174, 2005.
- [71] CHRISTOFF, M.; DA SILVEIRA, N. P.; SAMIOS, D. *Fluorescence and light scattering studies on the aggregation of sodium cholate in the presence of low molecular weight poly(ethylene oxide)*. **Langmuir**, v. 17, n. 9, p. 2885-2888, 2001.
- [72] ANDERSSON, M. M.; HATTI-KAUL, R.; BROWN, W. *Dynamic and static light scattering and fluorescence studies of the interactions between lactate dehydrogenase and poly(ethyleneimine)*. **Journal Of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 15, p. 3660-3667, 2000.
- [73] LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. *Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*. Rio de Janeiro: E-papers serviços Editoriais Ltda., 2001.
- [74] BASTARDO, L.; CLAEISSON, P.; BROWN, W. *Interactions between mucin and alkyl sodium sulfates in solution. A light scattering study*. **Langmuir**, v. 18, n. 10, p. 3848-3853, 2002.
- [75] VILLETTI, M. A. *Propriedades Estáticas e Dinâmicas dos Polímeros Naturais Xantana, Hialuronato de Sódio e Metilcelulose por Espalhamento de Luz e Raio-X a Baixos Ângulos*. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2001.

- [76] ZANTEN, J. H. V. *The Zimm plot and its analogs as indicators of vesicle and micelle size polydispersity*. **Journal Of Chemical Physics**, v. 102, n. 22, p. 9121-9128, 1995.
- [77] ZIMM, B. H. *The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions*. **Journal Of Chemical Physics**, v. 16, n. 12, p. 1093-1099, 1948.
- [78] ZIMM, B. H. *Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering - Preliminary Results on Polystyrene Solutions*. **Journal Of Chemical Physics**, v. 16, n. 12, p. 1099-1116, 1948.
- [79] HOU, S.; ZIEBACZ, N.; WIECZOREK, S. A.; KALWARCZYK, E.; SASHUK, V.; KALWARCZYK, T.; KAMINSKI, T. S.; HOLYST, R. *Formation and structure of PEI/DNA complexes: quantitative analysis*. **Soft Matter**, v. 7, n. 15, p. 6967-6972, 2011.
- [80] HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- [81] KYPR, J.; KEJNOVSKÁ, I.; RENČIUK, D.; VORLÍČKOVÁ, M. *Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. 1713-1725, 2009.
- [82] CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. *The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function*. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.
- [83] PITARD, B.; BELLO-ROUFAÏ, M.; LAMBERT, O.; RICHARD, P.; DESIGAUX, L.; FERNANDES, S.; LANCTIN, C.; POLLARD, H.; ZEGHAL, M.; RESCAN, P.-Y.; ESCANDE, D. *Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer*. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 20, p. e159, 2004.

- [84] RAHBAN, M.; DIVSALAR, A.; SABOURY, A. A.; GOLESTANI, A. *Nanotoxicity and Spectroscopy Studies of Silver Nanoparticle: Calf Thymus DNA and K562 as Targets. The Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, n. 13, p. 5798-5803, 2010.
- [85] XU, R. *Particle Characterization: Light Scattering Methods*. Miami: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [86] www.malvern.com. *Zeta potential measurement using laser Doppler electrophoresis (LDE)*: acessado em 25/09/2012.
- [87] DOUGHERTY, G. M.; ROSE, K. A.; TOK, J. B. H.; PANNU, S. S.; CHUANG, F. Y. S.; SHA, M. Y.; CHAKAROVA, G.; PENN, S. G. *The zeta potential of surface-functionalized metallic nanorod particles in aqueous solution. ELECTROPHORESIS*, v. 29, n. 5, p. 1131-1139, 2008.
- [88] SJÖBLOM, J. *Emulsions and Emulsion Stability*. New York: Taylor & Francis, 2006.
- [89] VOGEL, A. I. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1989.
- [90] MALEK, A.; CZUBAYKO, F.; AIGNER, A. *PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy. Journal of Drug Targeting*, v. 16, n. 2, p. 124 - 139, 2008.
- [91] KO, Y. T.; KALE, A.; HARTNER, W. C.; PAPAHDJOPOULOS-STERNBERG, B.; TORCHILIN, V. P. *Self-assembling micelle-like nanoparticles based on phospholipid-polyethyleneimine conjugates for systemic gene delivery. Journal of Controlled Release*, v. 133, n. 2, p. 132-138, 2009.

- [92] DAVISSON, V. J.; DAVIS, D. R.; DIXIT, V. M.; POULTER, C. D. *Synthesis of nucleotide 5'-diphosphates from 5'-O-tosyl nucleosides*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 1794, 1987.
- [93] CAVALCANTI, L. P.; TORRIANI, I. L.; PLIVELIC, T. S.; OLIVEIRA, C. L. P.; KELLERMANN, G.; NEUENSCHWANDER, R. *Two new sealed sample cells for small angle x-ray scattering from macromolecules in solution and complex fluids using synchrotron radiation*. **Review of Scientific Instruments**, v. 75, n. 11, p. 4541-4546, 2004.
- [94] HAMMERSLEY, A. P. *Scientific software FIT2D; European Synchrotron Research Facility*. Grenoble, 2009.
- [95] BYSTRYAK, S. M.; WINNIK, M. A.; SIDDIQUI, J. *Unusual Conductivity Changes for Sodium Dodecyl Sulfate Solutions in the Presence of Polyethyleneimine and Polyvinylamine*. **Langmuir**, v. 15, n. 11, p. 3748-3751, 1999.
- [96] MÉSZÁROS, R. *The thermodynamic stability of the mixtures of hyperbranched poly(ethyleneimine) and sodium dodecyl sulfate at low surfactant-to-polyelectrolyte ratios*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 2, p. 444, 2009.
- [97] SAKAR-DELIORMANH, A. *Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with Poly(ethyleneimine) in Bulk Solution and at the Air-Solution Interface*. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 23-30, 2009.
- [98] MEZEL, A.; ÁBRAHÁM, Á.; POJJÁK, K.; MÉSZÁROS, R. *The Impact of Electrolyte on the Aggregation of the Complexes of Hyperbranched Poly(ethyleneimine) and Sodium Dodecyl Sulfate*. **Langmuir**, v. 25, n. 13, p. 7304-7312, 2009.

- [99] FELIPPE, A. C.; BELLETTINI, I. C.; EISING, R.; MINATTI, E.; GIACOMELLI, F. C. *Supramolecular Complexes Formed by the Association of Poly(ethyleneimine) (PEI), Sodium Cholate (NaC) and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1539-1548, 2011.
- [100] MAGNY, B.; ILIOPOULOS, I.; ZANA, R.; AUDEBERT, R. *Mixed Micelles Formed by Cationic Surfactants and Anionic Hydrophobically Modified Polyelectrolytes*. **Langmuir**, v. 10, n. 9, p. 3180-3187, 1994.
- [101] STRIBECK, N. *X-ray scattering of soft matter*: Springer, 2007.
- [102] PFAU, A.; SCHREPP, W.; HORN, D. *Detection of a Single Molecule Adsorption Structure of Poly(ethylenimine) Macromolecules by AFM* **Langmuir**, v. 15, n. 9, p. 3219-3225, 1999.
- [103] BASTARDO, L. A.; GARAMUS, V. M.; BERGSTRÖM, M.; CLAEISSON, P. M. *The Structures of Complexes between Polyethylene Imine and Sodium Dodecyl Sulfate in D2O: A Scattering Study*. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 1, p. 167-174, 2004.
- [104] RADEVA, T. *Physical Chemistry of Polyelectrolites*. New York: Marcel Dekker, 2001, v.99.
- [105] PARK, I. I. H.; CHOI, E. J. *Characterization of branched polyethyleneimine by laser light scattering and viscometry*. **Polymer**, v. 37, n. 2, p. 313-319, 1996.
- [106] HAGIHARA, Y.; HOSHINO, M.; HAMADA, D.; KATAOKA, M.; GOTO, Y. *Chain-like conformation of heat-denatured ribonuclease A and cytochrome c as evidenced by solution X-ray scattering*. **Folding and Design**, v. 3, n. 3, p. 195-201, 1998.

- [107] UVERSKY, V. N.; SEGEL, D. J.; DONIACH, S.; FINK, A. L. *Association-induced folding of globular proteins*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 10, p. 5480-5483, 1998.
- [108] GARAMUS, V. M.; MAKSIMOVA, T. V.; KAUTZ, H.; BARRIAU, E.; FREY, H.; SCHLOTTERBECK, U.; MECKING, S.; RICHTERING, W. *Hyperbranched Polymers: Structure of Hyperbranched Polyglycerol and Amphiphilic Poly(glycerol ester)s in Dilute Aqueous and Nonaqueous Solution*. **Macromolecules**, v. 37, n. 22, p. 8394-8399, 2004.
- [109] MERTENS, H. D. T.; SVERGUN, D. I. *Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering*. **Journal of Structural Biology**, v. 172, n. 1, p. 128-141, 2010.
- [110] FORREST, M. L.; KOERBER, J. T.; PACK, D. W. *A Degradable Polyethylenimine Derivative with Low Toxicity for Highly Efficient Gene Delivery*. **Bioconjugate Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 934, 2003.
- [111] THOMAS, M.; KLIBANOV, A. M. *Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 27-34, 2003.
- [112] DENG, R.; YUE, Y.; JIN, F.; CHEN, Y.; KUNG, H.-F.; LIN, M. C. M.; WU, C. *Revisit the complexation of PEI and DNA -- How to make low cytotoxic and highly efficient PEI gene transfection non-viral vectors with a controllable chain length and structure?* **Journal of Controlled Release**, v. 140, n. 1, p. 40, 2009.
- [113] HAN, J.; KIM, S.; CHO, T.-S.; LEE, J.-C. *Effect of molecular weights of polyethyleneimine on the polyplex formation with calf thymus DNA*. **Macromolecular Research**, v. 12, n. 3, p. 276-281, 2004.

- [114] HAN, J.; KIM, S.; CHO, T.-S.; LEE, J.-C.; JOUNG, H. *Polyplex formation of calf thymus DNA with branched and linear polyethyleneimine*. **Macromolecular Research**, v. 12, n. 5, p. 501-506, 2004.
- [115] ARNDT-JOVIN, D. J.; JOVIN, T. M. *Chapter 16 Fluorescence Labeling and Microscopy of DNA*. In: Taylor, D. L. e Yu-Li, W. (Ed.). **Methods in Cell Biology**: Academic Press, 1989. v. 30, p.417-448.
- [116] YUE, Y.; JIN, F.; DENG, R.; CAI, J.; CHEN, Y.; LIN, M. C. M.; KUNG, H.-F.; WU, C. *Revisit complexation between DNA and polyethylenimine — Effect of uncomplexed chains free in the solution mixture on gene transfection*. **Journal of Controlled Release**, v. 155, n. 1, p. 67-76, 2011.
- [117] SLITA, A. V.; KASYANENKO, N. A.; NAZAROVA, O. V.; GAVRILOVA, I. I.; EROPKINA, E. M.; SIROTKIN, A. K.; SMIRNOVA, T. D.; KISELEV, O. I.; PANARIN, E. F. *DNA-polycation complexes effect of polycation structure on physico-chemical and biological properties*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 679-693, 2007.
- [118] ZHOU, Y.-L.; LI, Y.-Z. *The interaction of poly(ethylenimine) with nucleic acids and its use in determination of nucleic acids based on light scattering*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 60, n. 1-2, p. 377, 2004.
- [119] HUANG, F.; ZHAO, M.; ZHANG, X.; WANG, C.; QIAN, K.; KUO, R.-Y.; MORRIS-NATSCHKE, S.; LEE, K.-H.; PENG, S. *Synthesis, DNA intercalation and 3D QSAR analysis of cis-2,4,5-trisubstituted-1,3-dithiolanes as a novel class of antitumor agents*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 16, p. 6085-6095, 2009.

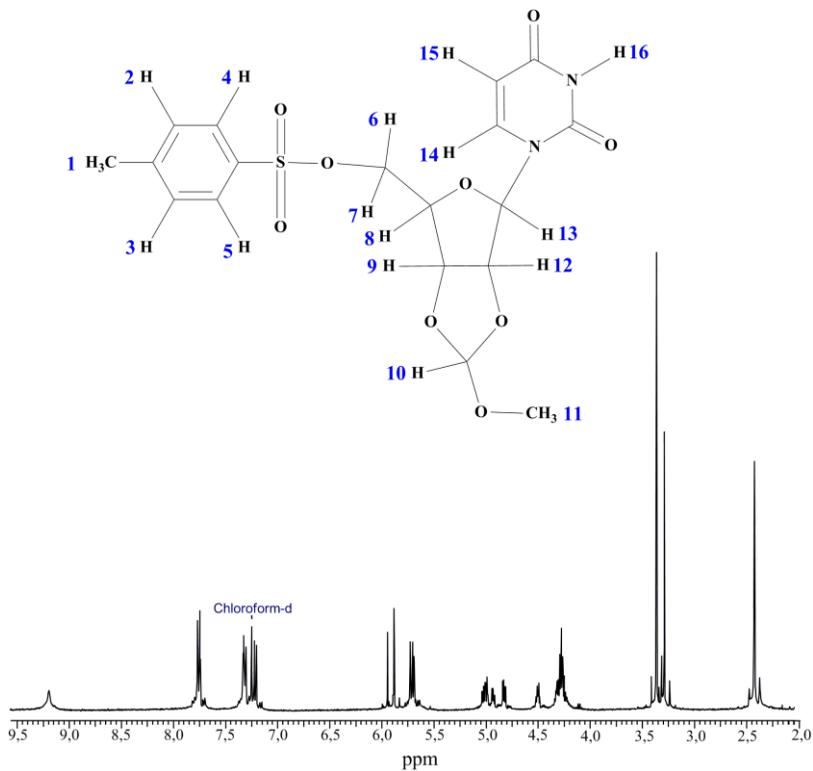
- [120] MARTY, R.; N'SOUKPOÉ-KOSSI, C. N.; CHARBONNEAU, D.; WEINERT, C. M.; KREPLAK, L.; TAJMIR-RIAHI, H.-A. *Structural analysis of DNA complexation with cationic lipids. Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 3, p. 849-857, 2009.
- [121] SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M.; MAHDAVI, M.; POURFOULAD, M. *Interaction of Calf Thymus DNA with the Antiviral Drug Lamivudine. DNA and Cell Biology*, v. 31, n. 1, p. 122-127, 2011.
- [122] BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. *Circular Dichroism: Principles and Applications*. New York: Wiley, 2000.
- [123] MADY, M. M.; MOHAMMED, W. A.; EL-GUENDY, N. M.; ELSAYED, A. A. *Effect of Polymer molecular Weight on the DNA/PEI Polyplexes Properties. Romanian J. Biophys.*, v. 21, n. 2, p. 151-165, 2011.
- [124] CHOOSAKOONKRIANG, S.; LOBO, B. A.; KOE, G. S.; KOE, J. G.; MIDDAGH, C. R. *Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, n. 8, p. 1710-1722, 2003.
- [125] BLOOMFIELD, V. A. *DNA condensation by multivalent cations. Biopolymers*, v. 44, n. 3, p. 269-282, 1997.
- [126] ZHANG, S.; SUN, X.; JING, Z.; QU, F. *Spectroscopic analysis on the resveratrol–DNA binding interactions at physiological pH. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 82, n. 1, p. 213-216, 2011.
- [127] SCHWARZ, S.; JAEGER, W.; BRATSKAYA, S.; BOHRISCH, J.; SCHIMMEL, T.; MENDE, M.; OELMANN, M.; BOYKO, V. *Formation of polyelectrolyte complexes in a polycarboxybetaine/weak polyanion system. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 276, n. 1–3, p. 65-71, 2006.

- [128] PORSCH, B. I.; LAGA, R.; HORSKÝ, J. I.; KOŇÁK, C. E. R.; ULBRICH, K. *Molecular Weight and Polydispersity of Calf-Thymus DNA: Static Light-Scattering and Size-Exclusion Chromatography with Dual Detection*. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 11, p. 3148-3150, 2009.
- [129] ERBACHER, P.; BETTINGER, T.; BELGUISE-VALLADIER, P.; ZOU, S.; COLL, J.-L.; BEHR, J.-P.; REMY, J.-S. *Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI)*. **The Journal of Gene Medicine**, v. 1, n. 3, p. 210-222, 1999.
- [130] TIAN, H.; XIONG, W.; WEI, J.; WANG, Y.; CHEN, X.; JING, X.; ZHU, Q. *Gene transfection of hyperbranched PEI grafted by hydrophobic amino acid segment PBLG*. **Biomaterials**, v. 28, n. 18, p. 2899-2907, 2007.
- [131] BAHADUR, K. C. R.; LANDRY, B.; ALIABADI, H. M.; LAVASANIFAR, A.; ULUDAĞ, H. *Lipid substitution on low molecular weight (0.6–2.0 kDa) polyethylenimine leads to a higher zeta potential of plasmid DNA and enhances transgene expression*. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 5, p. 2209-2217, 2011.
- [132] JANGIR, D. K.; CHARAK, S.; MEHROTRA, R.; KUNDU, S. *FTIR and circular dichroism spectroscopic study of interaction of 5-fluorouracil with DNA*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, n. 2, p. 143-148, 2011.

## ANEXOS

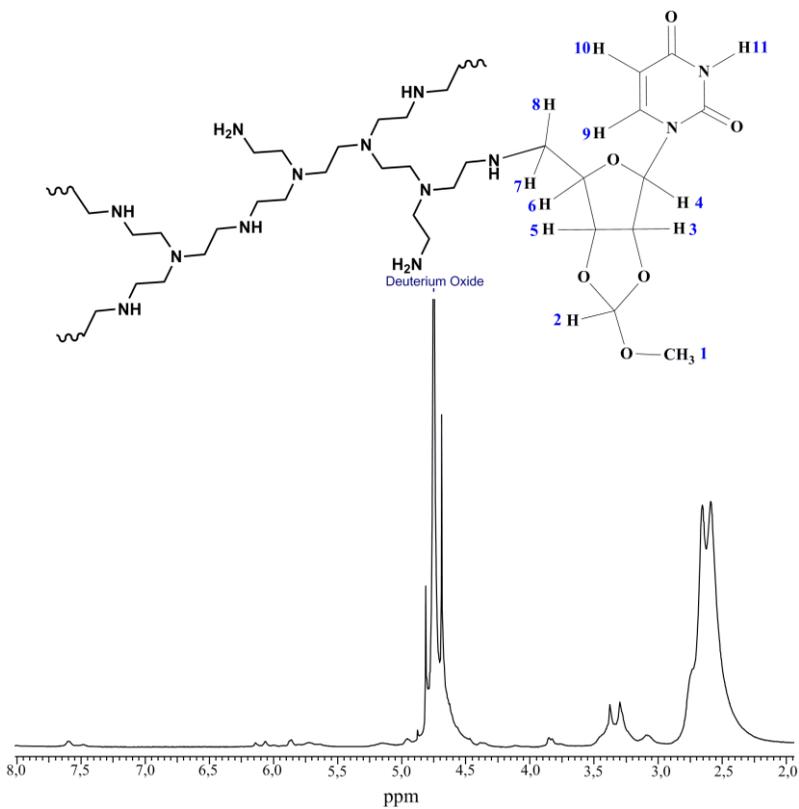
### Anexo A:

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a uridina tosilada em  $\text{CDCl}_3$ :



## Anexo B:

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a PEI-Uri5% em  $\text{D}_2\text{O}$ :



## Anexo C:

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para a PEI-Uri15% em  $\text{D}_2\text{O}$ :

