



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

THAYS FRANÇA NAVES

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM PEPTÍDEOS VIA
TECNOLOGIA MICROFLUÍDICA**

***SYNTHESIS OF PEPTIDE-BASED NANOPARTICLES VIA
MICROFLUIDIC TECHNOLOGY***

Campinas
2018

THAYS FRANÇA NAVES

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM PEPTÍDEOS VIA
TECNOLOGIA MICROFLUÍDICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Thays França Naves e orientada pela Profa. Dra. Lucimara Gaziola de la Torre.


Assinatura da orientadora

Campinas
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 161235/2015-8

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

N229s Naves, Thays França, 1993-
Síntese de nanopartículas baseadas em peptídeos via tecnologia
microfluídica / Thays França Naves. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Lucimara Gaziola de la Torre.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Engenharia Química.

1. Peptídeos. 2. Microfluídica. 3. Nanopartículas. I. Torre, Lucimara Gaziola
de la, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Synthesis of peptide-based nanoparticles via microfluidic
technology

Palavras-chave em inglês:

Peptide

Microfluidics

Nanoparticles

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Lucimara Gaziola de la Torre [Orientador]

Tiago Albertini Balbino

Ângela Albuquerque Teixeira Neto

Data de defesa: 23-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de Mestrado defendida por Thays França Naves e aprovada em 23 de Fevereiro de 2018 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof^ª. Dr^ª. Lucimara Gaziola de la Torre – Orientadora

Prof. Dr. Tiago Albertini Balbino (titular)

Dr^ª. Ângela Albuquerque Teixeira Neto (titular)

* A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica da aluna.

*Aos meus pais, fonte
de amor e inspiração, por me
incentivarem a seguir os
meus sonhos e tornarem esta
caminhada mais leve e feliz.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar para seguir em frente. Por sempre me levantar frente às dificuldades e me fazer acreditar que os sonhos são possíveis de se alcançar.

Aos meus pais, Marli e José, por encherem a minha vida de amor e alegria. Agradeço imensamente por estarem sempre presentes e por me guiarem na melhor direção. Obrigada por acreditarem que eu seria capaz de realizar todos os meus sonhos e por me lembrarem disso todos os dias. Vocês são essenciais na minha vida. Ao meu irmão Thiago, por dividir comigo os meus sonhos e sempre me dizer que eu conseguiria alcançar meus objetivos e principalmente, por me reerguer sempre que os obstáculos surgiam. Murilo, obrigada por ser tão parceiro nessa vida, por me dar forças e confiar que tudo daria certo, mesmo quando eu duvidava. Obrigada por serem quem são e por toda palavra amiga, amo vocês.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lucimara, por acreditar que eu seria capaz e sempre me inspirar ao melhor, acrescentando positivamente na minha vida pessoal e profissional. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, pelas inúmeras discussões e orientações que tornaram possível a concretização deste trabalho. Serei eternamente grata!

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Tiago, pelas inúmeras contribuições no decorrer deste trabalho e por ter me apresentado ao mundo da pós-graduação de uma forma tão doce e gentil. E claro, por me introduzir ao mundo dos peptídeos, você sem dúvida é uma grande inspiração na minha vida. Obrigada por estar sempre presente durante esses anos, não só como um parceiro de trabalho, mas como um amigo incrível. A Prof^a. Dr^a. Caroline, por toda contribuição que deu ao meu trabalho, por todo o conhecimento compartilhado e também por todas as conversas jogadas fora, que me faziam voltar com força total ao trabalho. Obrigada por todo esforço que fez para estar presente no exame de qualificação, jamais me esquecerei, a amizade e admiração serão para sempre.

À Dr^a. Ângela Albuquerque Teixeira Neto e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela contribuição nas análises de XPS e pela participação como membro da banca avaliadora. Agradeço gentilmente pelas excelentes discussões e sugestões que contribuíram para a

concretização deste trabalho. Ao Prof. Dr. José César Rosa e ao Centro de Química de Proteínas (CPQ) pela colaboração com as análises de espectrometria de massa, que foram extremamente importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bispo e seu aluno Allan Radaic, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela imensa colaboração e ajuda com os ensaios biológicos, pela disponibilidade e por todo conhecimento compartilhado.

Ao Angelo Gobbi e Maria Helena Piazzetta do Laboratório de Microfabricação/LNNano do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pelo auxílio técnico na construção dos dispositivos microfluídicos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro nesse período de Mestrado.

Gostaria de agradecer a todos meus amigos de Campinas e do laboratório LaNBDA: Aline, Amanda, Bruna, Franciele, Ismail, Maria Fernanda, Priscilla e Thiago. Em especial ao Gilson, pelas inúmeras conversas e apoio que foram fundamentais para que chegasse até aqui. A você Gabriel, que sem dúvidas foi parte fundamental deste trabalho, suas contribuições foram valiosas e serei eternamente grata.

À minha amiga Joyce, por sempre me mostrar palavras que acalmam e aliviam, as quais sempre me faziam retornar ao meu caminho. Você me apresentou um novo mundo e pelo qual me apaixonei, a palavra de Deus e para sempre vou carregar você comigo. Obrigada por tudo. À minha Daisy, que me acompanha desde a graduação e esteve presente nas dificuldades e vitórias, com quem compartilho todas as minhas tristezas e alegrias. Você vai estar comigo até o final.

E, em especial, gostaria de agradecer ao meu companheiro Caio, pela imensidão da sua importância sobre a minha vida. Obrigada por estar sempre presente e por me reerguer sempre que é necessário. Você me mostrou o lado doce e belo da vida, de uma vida a dois. O seu amor me faz seguir a vida sempre sorrindo.

A todos vocês, agradeço por estarem presentes e contribuírem de alguma forma durante esta etapa da minha vida.

RESUMO

Este trabalho teve como foco o desenvolvimento de nanopartículas baseadas em peptídeos e a avaliação de sua complexação com DNA modelo em sistemas microfluídicos. A primeira fase deste trabalho teve como objetivo averiguar a viabilidade tecnológica de sistemas microfluídicos baseados em dispositivo de focalização hidrodinâmica para a polimerização em fluxo contínuo de arginina (Arg) na presença do agente de acoplamento diisopropilcarbodiimida (DIC) e o catalisador hidroxisuccinimida (NHS), para aplicação em nanotecnologia. Para determinar a melhor configuração do processo de síntese, avaliou-se a influência de diferentes razões molares Arg/DIC ($R_{Arg/DIC}$), temperatura, pH e tempo de residência. A reação mostrou-se viável para $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 em pH de 9,55, tempo de residência de 1,8s e processadas a 70°C. Análises qualitativas de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x (XPS) e espectrometria do infravermelho com transformada de fourier (FT-IR) indicaram a presença de ligações na região Amida II que são responsáveis pela síntese de peptídeos. Na segunda fase do trabalho investigou-se a síntese de nanopartículas baseadas em polipeptídeos, formando complexos polilisina (PLL)/DNA e PLL/ácido poliglutâmico (PGA). Desta forma, este trabalho demonstra a potencialidade de síntese de peptídeos, a formação de suas respectivas nanopartículas e a formação de complexos com DNA em sistemas microfluídicos, com possibilidade de aplicações no campo da nanomedicina.

Palavras chaves: Peptídeos, Polipeptídeos, Nanopartículas, Microfluídica.

ABSTRACT

This work focused on the development of peptide-based nanoparticles and the evaluation of their complexation with a model DNA in microfluidic systems. The first step of this work consisted on the technological development of microfluidic systems based on the hydrodynamic flow focusing technique for the synthesis of peptide-based nanoparticles through the continuous flow polymerization of arginine (Arg) in the presence of diisopropylcarbodiimide (DIC) cross-linking agent and hydroxysuccinimide (NHS) catalyst, aiming applications in nanotechnology. In order to determine the best configuration of the synthesis process, the effects of different Arg/DIC molar ratios ($R_{\text{Arg/DIC}}$), temperature, pH and residence time. Feasible reactions were observed under the process conditions of $R_{\text{Arg/DIC}}$ of 0.25, pH of 9.55, 1.8s of residence time and process temperature of 70 °C. Qualitative analyses of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR) indicated the presence of amide II bonds that are responsible for the synthesis of peptides. In the second phase of this work, we investigated the synthesis of nanoparticles based on polypeptides, more precisely forming complexes between polylysine (PLL)/DNA and PLL/ poly glutamic acid (PGA). Thus, this work demonstrates the potentiality of peptide synthesis, peptide-based nanoparticles formation and formation of complexes with DNA in microfluidic systems, for applications in the field of nanomedicine.

Key words: Peptide, Polypeptide, Nanoparticles, Microfluidics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura comum aos aminoácidos. O grupamento R ou cadeia lateral em vermelho ligado ao carbono central (carbono alfa) é diferente em cada um dos aminoácidos. Fonte: Adaptado de Nelson, Cox (2002).	24
Figura 2: Classificação dos aminoácidos em relação ao grupo R. Fonte: Adaptado de Ulijn, Smith (2008).	25
Figura 3: Formação da ligação peptídica. Adaptado de AL-Warhi <i>et al.</i> (2012).	26
Figura 4: Grupos protetores Boc e Fmoc. Fonte: Deming, (2012).....	27
Figura 5: Carbodiimidas comumente utilizadas. Fonte: (Deming, (2012).....	27
Figura 6: Síntese peptídica em fase sólida. Fonte: Maude <i>et. al.</i> , (2012).	28
Figura 7: Medicamentos aprovados pelo FDA no período de 2009-2011 por espécies químicas. Fonte: Albericio, Kruger, (2012).....	30
Figura 8: Representação esquemática das principais estruturas secundárias. (A) α - hélice e (B) conformação paralela e antiparalela da folha- β . Fonte: Lowik <i>et al.</i> , (2010).	32
Figura 9: Exemplos de estruturas formadas por autoagregação. Fonte: Panda; Chauhan (2014).	34
Figura 10: Síntese peptídica utilizando carbodiimida como agente de acoplamento. Fonte: Do autor.....	35
Figura 11: Mecanismo de síntese peptídica na presença de NHS. Fonte: Do autor.....	36
Figura 12: Processo de formação de complexos por meio de interações eletrostáticas entre um polímero carregado positivamente e o ácido nucléico carregado negativamente. Adaptado de Pack <i>et al.</i> , (2005).	44
Figura 13: Representação esquemática do princípio de focalização hidrodinâmica no microcanal. Fonte: Lu <i>et al.</i> , (2016).....	48
Figura 14: Etapas do processo de Litografia macia para a produção de dispositivos microfluídicos. Fonte: De la Torre <i>et al.</i> , (2014).....	53
Figura 15: Dispositivos microfluídicos PDMS/vidro construídos e utilizados na pesquisa. (A) Dispositivo de focalização hidrodinâmica (T simples) e (B) Dispositivo de focalização hidrodinâmica (T longo). Fonte: Do autor.....	54
Figura 16: Diagrama esquemático das correntes empregadas em processo microfluídico em Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica no formato T	

simples (DFHT) com altura de 50 μ m e Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica no formato T longo (DFHTL) com altura de 90 μ m, para produção de nanopartículas peptídicas. O esquema apresenta a nomenclatura utilizada para referenciar a vazão das correntes laterais de arginina (Q_{ARG}) de 150 μ L/min e a vazão da corrente central de agente de acoplamento (Q_{DIC}) de 30 μ L/min. Fonte: Do autor..... 60

Figura 17: Ensaios de fluorescência para investigar o índice de mistura de uma corrente central com 0,1 mM de sulforodamina B focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais aquosas. Foram explorados dois microdispositivos: T – Simples e T – longo e as imagens de microscopia foram tiradas nos lugares indicados pelas linhas tracejadas e foram tratadas em ImageJ. A barra de escala é de 100 μ m. Fonte: Do autor..... 62

Figura 18: Sistema microfluídico de focalização hidrodinâmica para a síntese de nanopartículas peptídicas. A corrente central (Q_{DIC}) é preenchida com o agente de acoplamento DIC a 30 μ L/min e as correntes laterais (Q_{Arg}) são preenchidas com o aminoácido Arg em um total de 150 μ L/min. O processo de síntese é realizado em microdispositivo DFHTL. Fonte: Do autor..... 65

Figura 19: Reagentes e subprodutos utilizados no processo de síntese de nanopartículas peptídicas. Arginina, DIC e NHS participam ativamente do processo de síntese. O derivado de ureia é um subproduto da reação. Fonte: Do autor 66

Figura 20: Espectros de absorção na região do infravermelho dos controles: reagente de síntese e ureia. (A) Espectros referentes a Arg e NHS e (B) Espectros referentes ao DIC e ureia. 67

Figura 21: Espectros de absorção na região do infravermelho nanopartículas peptídicas para ($R_{Arg/DIC}$) de 0,25 e 5 produzidas a 15 $^{\circ}$ C em DFHTL. A corrente central foi processada a uma (Q_C) de 30 μ L/min enquanto a soma das correntes laterais (Q_L) de 150 μ L/min. 69

Figura 22: Espectro de absorbância na região do infravermelho para a nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25. (A) Nanopartículas produzidas em processo bulk a 37 e 70 $^{\circ}$ C e (B) Nanopartículas sintetizadas em sistemas microfluídicos a 70 $^{\circ}$ C. 71

Figura 23: Espectro de absorção da região do infravermelho das nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5. (A) Nanopartículas produzidas em processo bulk a 70 $^{\circ}$ C e (B) Nanopartículas produzidas em sistemas microfluídicos na

temperatura de 70°C. A área destacada diz respeito a região de Amida II com vibração da ligação (-CONH-).	72
Figura 24: Espectro de absorção na região do infravermelho para as nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 variando o pH e as condições de vazão volumétrica do processo de síntese via sistemas microfluídicos. A área destacada diz respeito a região de Amida II com vibração da ligação (-CONH-).	74
Figura 25: Espectros de XPS em alta resolução das nanopartículas peptídicas em duas razões ($R_{Arg/DIC}$) de 5 e 0,25 para: (a) C1s e (b) N1s.	76
Figura 26: Espectros de XPS em alta resolução de nanopartículas produzidas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 a 37 e 70°C em processo convencional bulk e 70°C em sistemas microfluídicos. (A) C1s e (B)N1s.	78
Figura 27: Espectros de XPS em alta resolução das nanopartículas produzidas na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 à 70°C em sistemas convencionais bulk e microfluídica. (A) C1s e (B) N1s.	79
Figura 28: Espectros de alta resolução das nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 à 70°C em sistemas microfluídicos. (A) C1s e (B) N1s.	80
Figura 29: Estrutura química referente à Polilisina (PLL). Adaptado de Krikorian et al., (2002).	88
Figura 30: Políplexos PLL/DNA sintetizados em processo bulk em diferentes razões mássicas ($R_{PLL/DNA}$). (a) Diâmetro médio ponderado em número, (b) Índice de polidispersidade e (c) Potencial zeta. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.	90
Figura 31: Condições de processamento em DFHTL para a formação de políplexos PLL/DNA em $R_{PLL/DNA}$ de 5. (A) Corrente central preenchida com DNA e focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de PLL e (B) A corrente central de PLL foi focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de DNA. Ambas as condições foram processadas a uma (Q_T) = 30 μ L/min, com uma vazão volumétrica da corrente central de (Q_C) = 15 μ L/min e vazão volumétrica da soma das correntes laterais de (Q_L) = 15 μ L/min. Em ambas configurações (w_f) equivale a largura da corrente focalizada. Barras de escala correspondem a 100 μ m.	95
Figura 32: Efeito da corrente central aquosa em DFHTL para a formação de políplexos PLL/DNA em $R_{PLL/DNA}$ de 5. (A) Corrente central preenchida com água e focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de PLL e	

DNA e (B) DFHTL após tratamento de superfície no qual a corrente central aquosa é focalizada hidrodinamicamente por correntes laterais de PLL e DNA. Ambas as condições foram processadas a uma $(Q_T) = 30 \mu\text{L}/\text{min}$, com uma vazão volumétrica da corrente central de $(Q_C) = 15 \mu\text{L}/\text{min}$ e vazão volumétrica da soma das correntes laterais de $(Q_L) = 15 \mu\text{L}/\text{min}$. Barras de escala correspondem a $100 \mu\text{m}$	97
Figura 33: Esquema representativo do processo de formação das nanopartículas PLL/DNA em sistemas microfluídicos. Fonte: Do autor.....	100
Figura 34: Distribuição de diâmetro em termos de intensidade e número das nanopartículas PLL/DNA formadas em sistemas microfluídicos na presença de corrente central aquosa. (A) Nanopartículas produzidas em 25°C e (B) nanopartículas produzidas a 4°C . As nanopartículas foram processadas a uma $Q_T = 30 \mu\text{L}/\text{min}$, com uma vazão volumétrica da corrente central de $Q_C = 15 \mu\text{L}/\text{min}$ e vazão volumétrica da soma das correntes laterais de $(Q_L) = 15 \mu\text{L}/\text{min}$. Os perfis apresentam triplicata da mesma análise.....	101
Figura 35: Estrutura química referente ao poliácido glutâmico (PGA). Fonte: Hamman, (2010).	105
Figura 36: Políplexos PLL/PGA produzidos em processo bulk nas diferentes razões mássicas $(R_{\text{PLL}/\text{PGA}})$. (a) Diâmetro médio ponderado em número, (b) Índice de polidispersidade e (c) Potencial zeta. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.	106
Figura 37: Esquema representativo do processo de formação das nanopartículas PLL/PGA em sistemas microfluídicos	108
Figura 38: Complexos PLL/PGA produzidos em sistemas microfluídicos nas diferentes razões mássicas $(R_{\text{PLL}/\text{PGA}})$. (a) Diâmetro médio ponderado em número, (b) Índice de polidispersidade e (c) Potencial zeta. Os complexos foram processados a uma $(Q_T) = 30 \mu\text{L}/\text{min}$, com uma vazão volumétrica da corrente central de $(Q_C) = 15 \mu\text{L}/\text{min}$ e vazão volumétrica da soma das correntes laterais de $(Q_L) = 15 \mu\text{L}/\text{min}$. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.....	109
Figura 39: Avaliação da influência da água e dos agentes tamponantes no processo de produção de nanopartículas peptídicas e caracterização em termos de diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersidade com base no desvio padrão de triplicatas independentes. O ensaio avaliou o uso de água ultra purificada, HEPES (100 mM) em pH 7 e PBS (diluído uma vez) para	

solubilizar ARG. O processo microfluídico ocorreu no DFHTL, a 25°C, com a corrente central de DIC a uma vazão volumétrica (Q_{DIC}) de 30 μ L/min, focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de Arg a uma vazão volumétrica total (Q_{Arg}) de 150 μ L/min.....	129
Figura 40: Imagem representativa dos componentes dos agentes tamponantes: (a) tampão HEPES e (b) tampão PBS. Fonte do autor.	130
Figura 41: Caracterização das nanopartículas peptídicas em termos de: (a) diâmetro hidrodinâmico médio e (b) índice de polidispersidade. As nanopartículas foram avaliadas quanto à proporção de Arg/DIC através da variação da ($R_{Arg/DIC}$) à 25°C. Arg foi preparada a 0,5 mM enquanto DIC variou de 0,1 a 10 mM e as correntes foram bombeadas a uma vazão volumétrica de 30 μ L/min (central) e 150 μ L/min (duas correntes laterais). Os resultados apresentam desvio padrão de triplicatas independentes.	133
Figura 42: Distribuição de tamanho por intensidade e número da ($R_{Arg/DIC}$) de 5. Esta razão molar apresentou as melhores características físico-químicas. Resultados obtidos através da técnica de (Dynamic Light Scattering – DLS).	134
Figura 43: Distribuição de diâmetro médio em termos de intensidade e número de um processo microfluídico de apenas reagentes: (a) Arg a uma concentração inicial de 0,5 mM e (b) DIC a uma concentração inicial de 0,5mM. O ensaio ocorreu em microdispositivo DFHTL a uma vazão volumétrica da corrente central de 30 μ L/min e a soma das correntes laterais a 150 μ L/min.	135
Figura 44: Efeito da concentração total do sistema, avaliado a partir da variação da concentração inicial de ARG e DIC, mantendo-se $R_{ARG/DIC}$ igual a 5. Nanopartículas foram produzidas variando a concentração de 0,1 a 10 mM em microdispositivo DFHTL, a 25°C. A vazão volumétrica (Q_{DIC}) na corrente central foi de 30 μ L/min e a vazão volumétrica (Q_{Arg}) da soma das correntes laterais foram de 150 μ L/min.	138
Figura 45: Produção de nanopartículas peptídicas avaliando a influência do catalisador NHS: (a) Sem presença de NHS e (b) Com a presença de NHS. As nanopartículas também foram produzidas a fim de investigar os efeitos causados pela variação de temperatura. Os ensaios foram conduzidos em microdispositivos DFHTL, com uma corrente central de DIC (0,5 mM) a (Q_{DIC}) de 30 μ L/min, focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de Arg (0,5 mM) a (Q_{Arg}) total de 150 μ L/min.....	140

Figura 46: Espectros de massas referentes às nanopartículas produzidas em ($R_{\text{Arg/DIC}}$) = 0,25 para: (a) 15°C e (b) 37°C.	146
Figura 47: Espectros de massas referentes às nanopartículas produzidas em ($R_{\text{Arg/DIC}}$) = 5 para: (a) 15°C e (b) 37°C.	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índice de Mistura em diferentes microdispositivos.	63
Tabela 2: Comprimento de onda das bandas do infravermelho e suas respectivas atribuições.....	69
Tabela 3: Valores de pka referentes ao aminoácido ARG. Fonte: Adaptado de Nelson, Cox (2002).	128
Tabela 4: Massa molecular de todos os compostos envolvidos no processo de síntese peptídica.	144
Tabela 5: Simulação da fragmentação de um peptídeo com uma sequência primária de 10 argininas.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg:	Arginina
<i>Bulk</i> :	Método convencional de produção de nanopartículas
Boc:	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Ca:	Número capilar
CPP:	<i>Cell Penetrating Peptide</i> , Peptídeo penetrante na célula
DFHT:	Dispositivo de focalização hidrodinâmica T simples
DFHTL:	Dispositivo de focalização hidrodinâmica T longo
DIC:	Diisopropilcarbodiimida
DLS:	<i>Dynamic Light Scattering</i> , Espalhamento de luz dinâmica
DNAp:	Ácido desoxirribonucleico plasmidial
Fmoc:	9-fluorenilmetoxicarbonilo
FT-IR:	Espectrometria do infravermelho com transformada de Fourier
Glu:	Glutamina
Lys:	Lisina
NCA:	α -amino ácido N-carboxianidrido
NHS:	N-Hidroxisucciminida
PDMS:	Polidimetilsiloxano
Pe:	Número de Peclet
PGA:	Poliácido glutâmico
Phe:	Fenilalanina
PLL:	Polilisina
Re:	Número de Reynolds
siRNA:	<i>Small interfering RNA</i> ,
SPPS:	<i>Solid phase peptide synthesis</i> , Síntese peptídica em fase sólida
XPS:	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	20
1 Introdução.....	20
2 Objetivos.....	22
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
1 Dos aminoácidos aos peptídeos.....	24
2 Síntese Peptídica.....	25
3 Peptídeos como agentes terapêuticos.....	29
4 Materiais à base de peptídeos.....	30
5 Síntese de nanomateriais à base de peptídeos.....	33
6 Nanoestruturas à base de Peptídeos	36
6.1 Nanopartículas	37
6.2 Nanotubos e Nanovesículas:.....	39
6.3 Nanofibras	40
6.4 Hidrogel	41
7 Nanoestruturas à base de Polipeptídeos.....	42
8 Microfluídica.....	45
8.1 Sistemas Microfluídicos para a Produção de Nanopartículas.....	47
CAPÍTULO 3 – SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM PEPTÍDEOS VIA ROTA DE SÍNTESE QUÍMICA.....	50
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 Materiais.....	52
2.2 Métodos.....	52
2.2.1 Produção de microdispositivos.....	52
2.2.2 Ensaios de Fluorescência	54
2.2.3 Produção de Nanopartículas de Peptídeos via Rota de Síntese Química	55
2.2.4 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Peptídeos.....	56
2.2.4.1 Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	56
2.2.4.2 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS).....	57

2.2.4.3	Espectrometria de massa	57
3	RESULTADOS	58
3.1	Avaliação do Dispositivo Microfluídico	58
3.1.1	Velocidade de Escoamento	60
3.1.2	Caracterização da Mistura	61
3.2	Síntese de nanopartículas peptídicas via sistemas microfluídicos	64
3.2.1	Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	65
3.2.2	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS)	75
4	CONCLUSÃO	81

CAPÍTULO 4 – SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM PEPTÍDEOS VIA ROTA ELETROSTÁTICA..... 83

1	INTRODUÇÃO.....	83
2	MATERIAIS E MÉTODOS	84
2.1	Materiais	84
2.2	Métodos.....	85
2.2.1	Amplificação do Plasmídeo	85
2.2.2	Formação das Nanopartículas PLL/pDNA e PLL/PGA em processo Bulk	85
2.2.3	Formação das Nanopartículas PLL/pDNA em sistemas microfluídicos	85
2.2.4	Produção de Nanopartículas PLL/PGA em Sistemas Microfluídicos	86
2.2.5	Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de PLL/DNA e PLL/PGA.....	87
2.2.5.1	Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Índice de Polidispersidade.....	87
2.2.5.2	Potencial Zeta	87
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1	Formação de nanopartículas PLL/DNA em processo “Bulk”	87
3.2	Complexação PLL/DNA em sistemas microfluídicos	93
3.2.1	Influência da configuração de processo	94
3.2.2	Avaliação do efeito da temperatura na síntese de nanopartículas PLL/DNA em sistemas microfluídicos	99
3.3	Formação de nanopartículas PLL/PGA em processo “Bulk”	103
3.4	Formação de nanopartículas PLL/PGA em sistemas microfluídicos	107
4	CONCLUSÃO	111

CONCLUSÕES GERAIS	113
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	114
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXOS	127

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência e tecnologia que possui grande possibilidade para o desenvolvimento, manipulação e aperfeiçoamento de estruturas ordenadas em escala nanométrica, as quais apresentam propriedades funcionais únicas. A expansão no campo da nanotecnologia tem permitido uma aplicação potencial na nanomedicina, isso é, em terapias médicas e biomédicas. Dentre estas, se destacam o tratamento de doenças e o desenvolvimento de técnicas que promovam a liberação sustentada de biomoléculas ao local-alvo (FARAJI; WIPF, 2009; SAFARI; ZARNEGAR, 2014).

Para tal, sistemas de entrega de compostos bioativos estão sendo desenvolvidos. Neste contexto, nanopartículas são produzidas como uma estratégia importante a fim de auxiliar na proteção, no transporte e entrega sustentada de diferentes moléculas. Devido a sua dimensão, as nanopartículas são capazes de encapsular e proteger biomoléculas contra a degradação do meio e assim, aumentar o tempo de meia-vida, melhorar a biodisponibilidade e promover a liberação específica em local-alvo (ALAM et al., 2016; ISCHAKOV et al., 2013).

Diferentes materiais entre naturais e sintéticos são utilizados para construção de nanopartículas e uma classe de materiais que se destacam, são os peptídeos. Estes consistem de uma curta sequência de aminoácidos, os quais são moléculas orgânicas com diferentes propriedades e funções bioquímicas devido à variedade de grupos presentes em suas cadeias laterais (WU, 2009). Os peptídeos apresentam variabilidade estrutural, elevada atividade biológica e baixa toxicidade. São capazes de se auto-organizarem e facilitam o reconhecimento por receptores biológicos, potencializando a sua utilização para a formação de nanoestruturas (GAZIT, 2007; RENUKUNTLA et al., 2013; ULIJN; SMITH, 2008).

Os peptídeos são conhecidos como blocos de construção, ou seja, são a base para a produção de nanoestruturas complexas e altamente ordenadas em virtude de sua capacidade em se autoagregar. Em razão da configuração estereoquímica da sua sequência primária de aminoácidos, os peptídeos podem

adotar diferentes conformações conduzindo a formação de estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, razão esta, que os tornam materiais promissores em relação aos convencionais (CHEN; ROSI, 2010; CHOW et al., 2008).

Apesar dos estudos relacionados à formação de nanopartículas baseadas em peptídeos, estudos tecnológicos visando a produção dessas nanopartículas são escassos. Nesse contexto, a microfluídica emerge como uma alternativa tecnológica para superar tais desafios. Esta é uma ciência e tecnologia que envolve o escoamento de fluidos em dispositivos que possuem canais com tamanhos micrométricos. Algumas das vantagens em utilizar tais dispositivos é a redução de volume de amostra, redução do custo de reagentes e possibilidade de aquisição de grande número de informações obtidas das amostras (SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014), além de apresentar escoamento em regime laminar, onde processos difusivos podem ser explorados. Logo, as nanopartículas obtidas em microcanais, apresentam-se como um método promissor quando comparado ao convencional. Na microfluídica há possibilidade de desenvolvimento de processos reprodutíveis e passíveis de amplificação de escala, o que permite a produção de nanopartículas com baixo índice de polidispersidade e diâmetro.

Neste contexto, o desenvolvimento de nanopartículas baseadas em peptídeos obtidas através de plataformas microfluídicas contribuirá para futuras investigações na área farmacêutica.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo contribuir com a área da nanotecnologia, no que diz respeito ao desenvolvimento tecnológico de sistemas microfluídicos para a formação de nanopartículas baseadas em peptídeos, com potencial aplicação nas áreas médicas, biomédicas e farmacêuticas.

Na primeira etapa desta pesquisa, o objetivo consistiu na avaliação da tecnologia microfluídica para a formação de nanopartículas baseadas em peptídeos, a partir de aminoácidos, através de sua síntese química, utilizando o agente de acoplamento diisopropilcarbodiimida (DIC) na presença do catalisador hidroxisuccinimida (NHS). Como prova de conceito, em primeira instância foi estudado o aminoácido arginina (Arg) e (DIC), em variadas proporções para a produção de nanopartículas. Para isso, avaliou-se a influência do catalisador *N*-Hidroxisuccinimida (NHS) no processo de síntese para aumentar a eficiência de reação.

Em seguida, na segunda fase do trabalho, investigou-se a potencialidade dos sistemas microfluídicos para a produção de nanopartículas baseadas em polipeptídeos via ligação eletrostática e, por conseguinte, a formação de políplexos pela incorporação de *p*DNA em sistemas microfluídicos.

Para alcançar estes objetivos, as seguintes etapas de pesquisa foram estabelecidas:

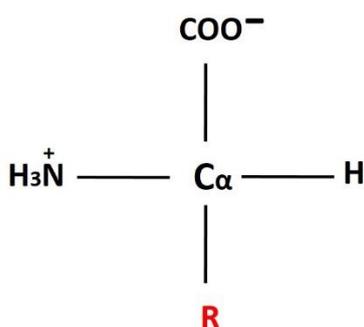
(i) Rota de síntese química: Para avaliação e definição do processo de síntese em microfluídica, o dispositivo de focalização hidrodinâmica foi estabelecido para definição das condições operacionais do sistema, que estão relacionadas ao (I) efeito do tampão, (II) proporção aminoácido/agente de acoplamento, (III) concentração total do sistema, (IV) efeito do catalisador e (V) influência da temperatura. Neste estudo, foi avaliado o aminoácido arginina, o agente de acoplamento DIC e o catalisador NHS. A reticulação química foi caracterizada a partir de espectrometria do infravermelho com transformada de Fourier (FT – IR) e de massas, além da espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x (XPS).

(ii) Rota de síntese eletrostática: Neste caso, a complexação eletrostática foi inicialmente realizada em processo *bulk* (escala laboratorial), explorando-se a complexação eletrostática entre polilisina e DNA e polilisina e ácido poliglutâmico. As melhores condições foram investigadas em sistemas microfluídicos avaliando diferentes condições operacionais e efeito da barreira difusiva na formação das nanoestruturas. Os complexos eletrostáticos foram caracterizadas de acordo com diâmetro médio, distribuição de tamanhos (índice de polidispersidade) e potencial zeta.

1 Dos aminoácidos aos peptídeos

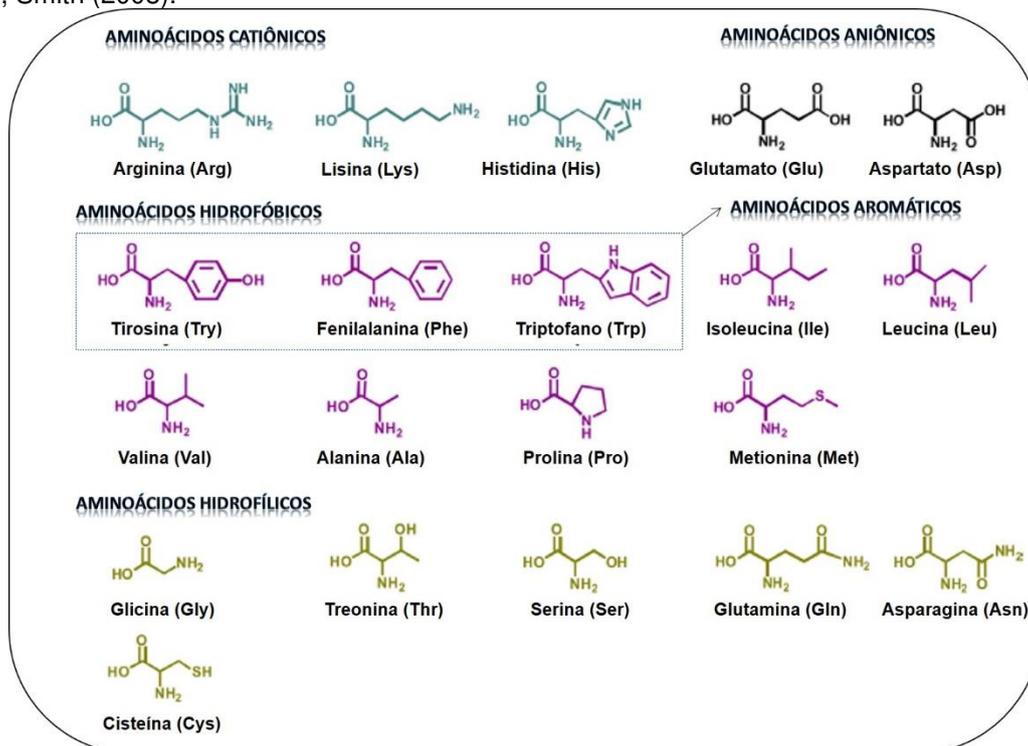
Os aminoácidos são monômeros estruturais constituídos de ambos os grupos, amino e ácidos e são moléculas orgânicas constituintes dos peptídeos e proteínas. Para tal síntese, existem 20 aminoácidos naturais que são conhecidos por aminoácidos do tipo alfa, no qual, um carbono alfa está ligado a um grupamento amina, um grupamento de ácido carboxílico, um hidrogênio e um grupo lateral denominado R. Em relação ao grupo R, este possui uma cadeia lateral que varia em relação à estrutura, tamanho e carga elétrica, e estas são razões que podem influenciar na solubilidade dos aminoácidos em meios aquosos (NELSON; COX, 2002; ULIJN; SMITH, 2008) ou conferir características aniônicas e catiônicas. A estrutura geral dos aminoácidos é apresentada conforme Figura 1.

Figura 1: Estrutura comum aos aminoácidos. O grupamento R ou cadeia lateral em vermelho ligado ao carbono central (carbono alfa) é diferente em cada um dos aminoácidos. Fonte: Adaptado de Nelson, Cox (2002).



O carbono alfa de um aminoácido, por ser um centro quiral, permite a ligação de quatro diferentes grupos substituintes, porém, este fato não pode ser atribuído a glicina, visto que ela apresenta como cadeia lateral outro átomo de hidrogênio (MORAES et al., 2013). Os diferentes aminoácidos são classificados de acordo com a cadeia lateral do grupo R, principalmente em relação à polaridade e a carga, podendo se dividir em cinco grupos, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2: Classificação dos aminoácidos em relação ao grupo R. Fonte: Adaptado de Ulijn, Smith (2008).



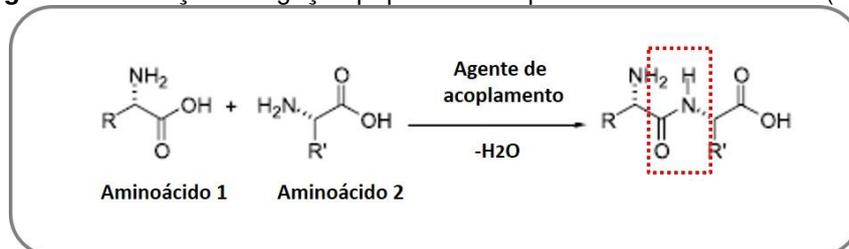
Os aminoácidos atuam como base para a síntese de peptídeos por meio de ligações peptídicas. Os peptídeos variam muito em tamanho, com dois ou mais aminoácidos até atingir níveis macromoleculares, e devido à presença de diferentes resíduos destes aminoácidos, os peptídeos apresentam uma diversidade de estruturas (ULIJN; SMITH, 2008). Em relação ao número de aminoácidos unidos, estes podem ser classificados em oligopeptídeos e polipeptídeos, no qual o primeiro consiste em poucas unidades, cerca de 10 ou menos resíduos, enquanto o último é representado pela união de muitos resíduos de aminoácidos, sendo aproximadamente 50 resíduos (MORAES et al., 2013; UHLIG et al., 2014).

2 Síntese Peptídica

A síntese de peptídeos está associada à união covalente entre duas moléculas de aminoácidos por meio de uma ligação amida, conhecida também por ligação peptídica. A ligação peptídica ocorre entre o grupo α - carboxílico de um aminoácido e o grupo α - amina de outro aminoácido, conforme é apresentado

na Figura 3. Um ponto característico desta ligação é perda de uma molécula de água, proveniente dos grupos que se ligaram (NELSON; COX, 2002).

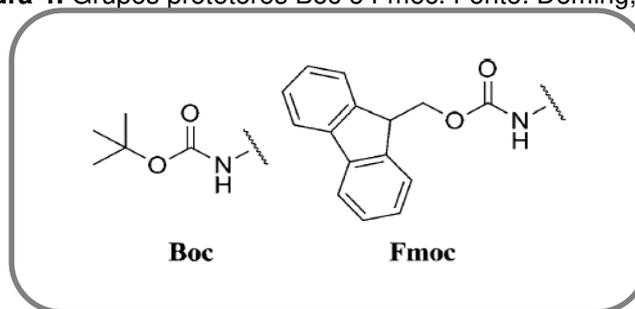
Figura 3: Formação da ligação peptídica. Adaptado de AL-Warhi et al. (2012).



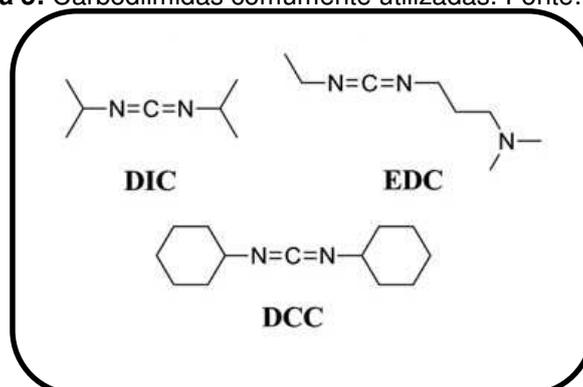
Para a construção de peptídeos, algumas técnicas são comumente utilizadas, nas quais destacam-se duas principais abordagens, sendo estas a técnica de síntese peptídica em fase sólida (do inglês, solid phase peptide synthesis, SPPS) e a polimerização NCA (α-amino ácido-N-carboxianidrido) (RAMAKERS; VAN HEST; LÖWIK, 2014).

Síntese peptídica em fase sólida (SPPS): A técnica realiza a construção da sequência primária de aminoácidos por meio de uma resina polimérica, na qual o primeiro resíduo de aminoácido é ligado covalentemente através do seu grupo carboxílico. Na sequência, por meio de ciclos repetitivos, a síntese continua a partir do grupo N-terminal do aminoácido desprotegido (fixo a resina) e pelo acoplamento do aminoácido seguinte com grupo carboxílico ativado. Esse processo continua até atingir uma média de 35-50 aminoácidos e então o peptídeo é clivado da resina (RAMAKERS; VAN HEST; LÖWIK, 2014).

Para um melhor resultado em SPPS, grupos protetores são adicionados a fim de proteger e garantir que reações secundárias durante o processo não ocorram como, por exemplo, reações com os grupos funcionais das cadeias laterais, além de fornecer a diferenciação das funcionalidades dessas cadeias e melhorar o rendimento de síntese. Esses grupos são usados comumente na proteção do grupamento α-amino, já que o grupo carboxílico está ligado covalentemente à resina. Os dois principais grupos protetores utilizados são o tert-butoxicarbonilo (Boc) e 9-fluorenilmethoxycarbonilo (Fmoc), os quais são mostrados na Figura 4.

Figura 4: Grupos protetores Boc e Fmoc. Fonte: Deming, (2012).

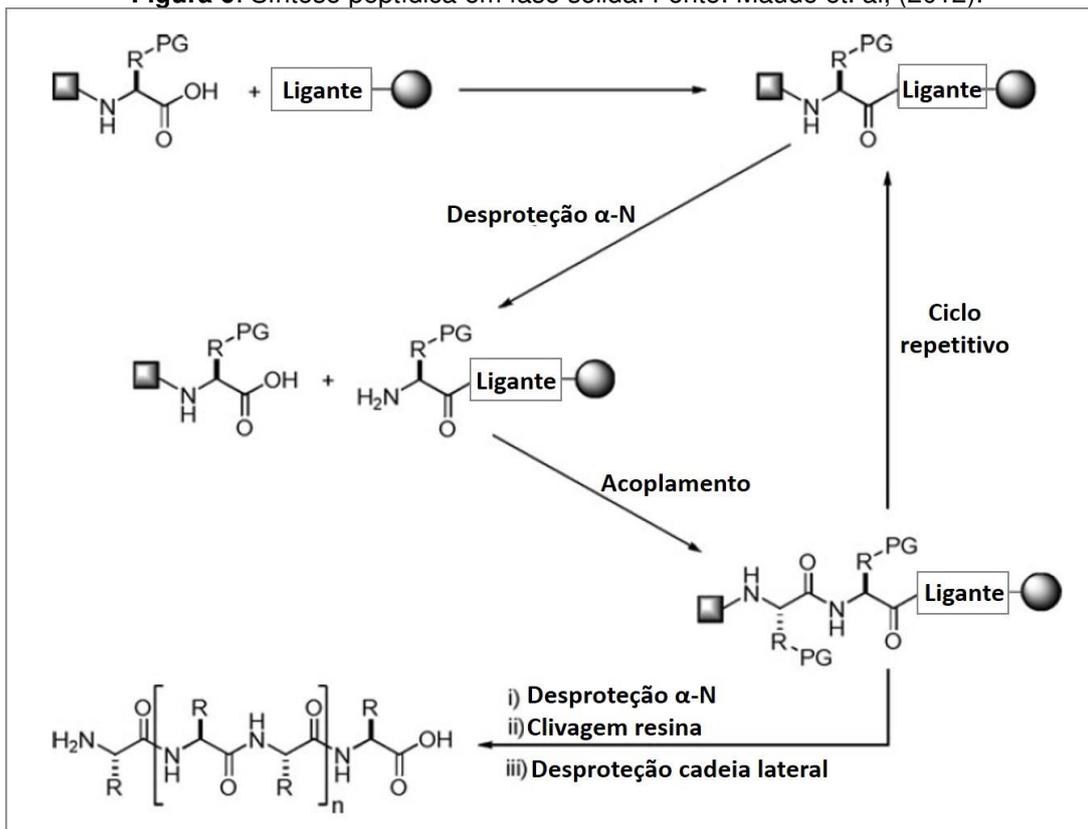
Vale ressaltar o uso de agentes de acoplamento são utilizados para obter uma ligação química eficiente e alcançar uma sequência primária ordenada sem a presença de reações secundárias (DAWSON; KENT, 2000; DEMING, 2012). Eles são aplicados no processo de síntese peptídica a fim de promover a ativação do grupo carboxílico que participará da ligação amida, e assim, aumentar sua eletrofilicidade e facilitar a ligação ao grupamento N-terminal (MÄDE; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2014). Diferentes modelos de agente de acoplamento são estudados, porém, o mais utilizado na síntese peptídica é a classe referente às carbodiimidias (ALBERICIO, 2004). As principais carbodiimidias utilizadas são N, N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), N, N'-Disopropilcarbodiimida (DIC) and N-(3-Dimethylaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (MONTALBETTI; FALQUE, 2005), as quais são apresentadas na Figura 5..

Figura 5: Carbodiimidias comumente utilizadas. Fonte: (Deming, (2012).

O processo de síntese peptídica em fase sólida na presença de agentes de acoplamento, consiste, sobretudo, em uma resina polimérica na qual o grupo carboxílico de um aminoácido é ligado covalentemente através de um ligante. Este ligante é utilizado a fim de promover uma clivagem entre a resina e o peptídeo ao final do processo de síntese de forma branda, além de garantir a

funcionalidade do grupo C-terminal do peptídeo. Em seguida, ocorre o acoplamento sucessivo dos demais resíduos de aminoácidos da sequência e assim, a construção do peptídeo dá-se com a proteção do grupamento N-terminal, com o propósito de evitar reações laterais indesejáveis (MAUDE et al., 2012; STAWIKOWSKI; FIELDS, 2002). O processo de síntese peptídica em fase sólida é apresentado de acordo com a Figura 6.

Figura 6: Síntese peptídica em fase sólida. Fonte: Maude et. al, (2012).



Polimerização NCA: Quando o comprimento da cadeia aumenta em número de aminoácidos acoplados em SPPS, esta passa a apresentar defeitos conforme essa concentração de peptídeos aumenta. Esses defeitos podem estar associados a falhas na remoção dos grupos protetores e reações de acoplamento incompletas, por exemplo. Para evitar tal problema, a técnica de polimerização NCA surge como alternativa quando se trata de uma sequência maior de aminoácidos (AL-WARHI; AL-HAZIMI; EL-FAHAM, 2012; CHOE et al., 2012; MAUDE et al., 2012). Neste processo, o primeiro peptídeo é um iniciador e então a polimerização ocorre com o segundo peptídeo e assim sucessivamente. Esta técnica não apresenta o mesmo nível de controle na sequência primária como é alcançado na técnica de SPPS, porém, a construção

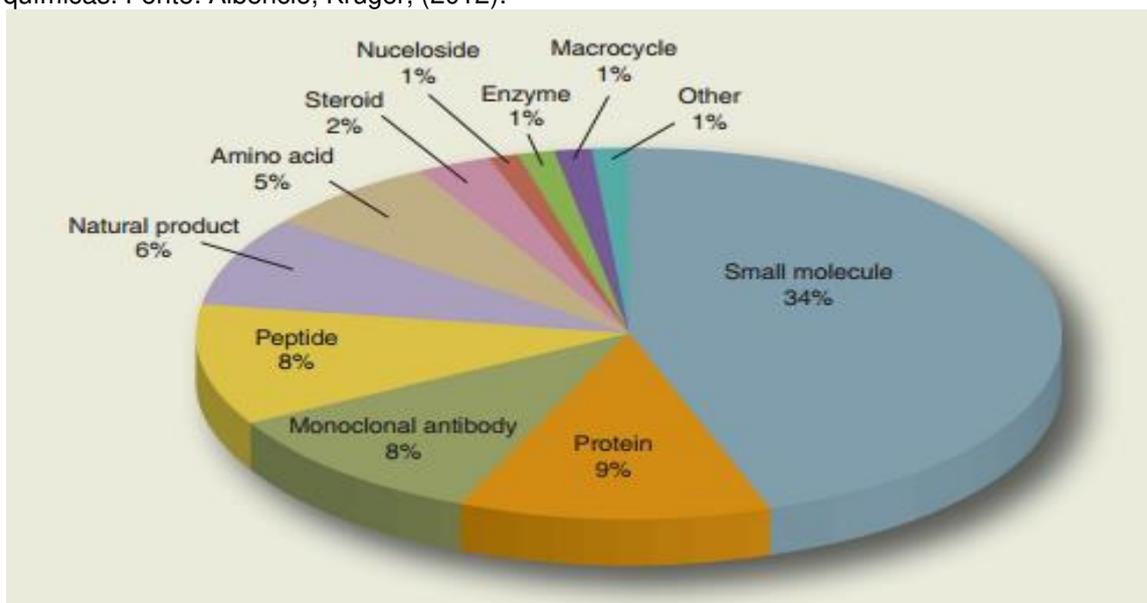
dos polipeptídios apresenta um bom rendimento, o que torna esta, uma boa escolha para a síntese de peptídeos (CHOE et al., 2012; RAMAKERS; VAN HEST; LÖWIK, 2014).

3 Peptídeos como agentes terapêuticos

Existe uma quantidade expressiva de peptídeos biologicamente ativos presentes na natureza e que agem no organismo exercendo diversas funções biológicas, tais como sinalização, no qual se ligam aos receptores de superfície de células específicas, regulação da função celular, hormônios, fatores de crescimento, entre outras (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015). Além das funções biológicas, os peptídeos apresentam diferentes atividades biológicas e, dentre estas, pode-se destacar as atividades antimicrobianas e antioxidantes (BARBOSA; MARTINS; GOMES, 2015; PADHI et al., 2014).

Nos últimos anos, os peptídeos têm despertado o interesse da indústria farmacêutica como potenciais agentes terapêuticos para aplicação nas diversas áreas que envolvem os setores médicos, biomédicos e farmacêuticos. Eles são investigados a fim de explorar toda sua capacidade terapêutica, no que diz respeito à formulação de medicamentos, liberação controlada de fármacos e tratamento de diferentes doenças (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; PANDA; CHAUHAN, 2014; TORCHILIN; LUKYANOV, 2003). A promissora utilização de peptídeos e aminoácidos no desenvolvimento de medicamentos pode ser vista de acordo com a Figura 7.

Figura 7: Medicamentos aprovados pelo FDA no período de 2009-2011 por espécies químicas. Fonte: Albericio, Kruger, (2012).



A razão dos peptídeos se tornarem agentes terapêuticos promissores está vinculada à presença de características específicas que favorecem a sua aplicação e lhes conferem vantagens em relação a outras moléculas pequenas. Dentre estas, podemos destacar a alta especificidade e afinidade com os locais-alvo, elevada atividade biológica, baixa toxicidade, imunogenicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Além dessas, os peptídeos são também passíveis de modificações específicas e sua aplicação apresenta um menor risco de efeitos colaterais, quando em baixas doses. (ALBERICIO; KRUGER, 2012; UHLIG et al., 2014).

4 Materiais à base de peptídeos

Apesar dos peptídeos apresentarem significativa atividade biológica, sua aplicação direta como agente terapêutico é dificultada em razão da presença de alguns obstáculos, os quais conduzem a uma entrega ineficiente ao local-alvo. Os peptídeos são susceptíveis a uma rápida eliminação da circulação devido à filtração renal, a degradação enzimática e a captação por órgãos e tecidos não-alvo, o que favorece a presença de efeitos secundários indesejáveis. No intuito de superar tais desafios, sistemas de administração são desenvolvidos, ou seja, são fabricadas diferentes nanoestruturas, as quais auxiliam na entrega ao local-alvo por meio de uma liberação sustentada e evitam a degradação enzimática e

a consequente presença dos efeitos colaterais (TAN; CHOONG; DASS, 2010; TORCHILIN; LUKYANOV, 2003).

Com o desenvolvimento desses sistemas de administração como, por exemplo, lipossomas, micelas, micropartículas poliméricas, nanotubos e hidrogeis é possível a proteção dos peptídeos e de diferentes compostos bioativos contra o meio, promovendo uma entrega efetiva no local-alvo (TORCHILIN; LUKYANOV, 2003). Porém, além dos peptídeos se beneficiarem com o desenvolvimento dos veículos de entrega, estes são também empregados como material base na construção de nanoestruturas. Isso é possível em razão dos peptídeos serem provenientes de uma sequência primária de aminoácidos, a qual pode ser modulada em relação ao comprimento, carga e polaridade, o que permite a formação de diferentes nanoestruturas (BARBOSA; MARTINS; GOMES, 2015; MANDAL; NASROLAHI SHIRAZI; PARANG, 2014).

Dessa forma, os peptídeos são conhecidos como blocos de construção que potencializam a formação de nanoestruturas complexas, por exemplo, nanotubos, nanovesículas, hidrogeis, entre outras. Isso se deve a sua capacidade de se autoagregar de forma a atingir conformações estáveis e altamente ordenadas, conferindo ampla vantagem em relação aos materiais sintéticos convencionais (PANDA; CHAUHAN, 2014). O processo de auto-organização dá-se através do reconhecimento entre os peptídeos, os quais então se associam por meio de interações não-covalentes e dessa forma, tornam-se potenciais plataformas para a construção das nanoestruturas (CHEN; ROSI, 2010; MANDAL; NASROLAHI SHIRAZI; PARANG, 2014). Os peptídeos apresentam também outra característica positiva para a sua aplicação, a qual está relacionada à sua capacidade de fornecer estabilidade química e térmica, principalmente em altas temperaturas, pHs extremos e quanto aos solventes orgânicos (GAZIT, 2007).

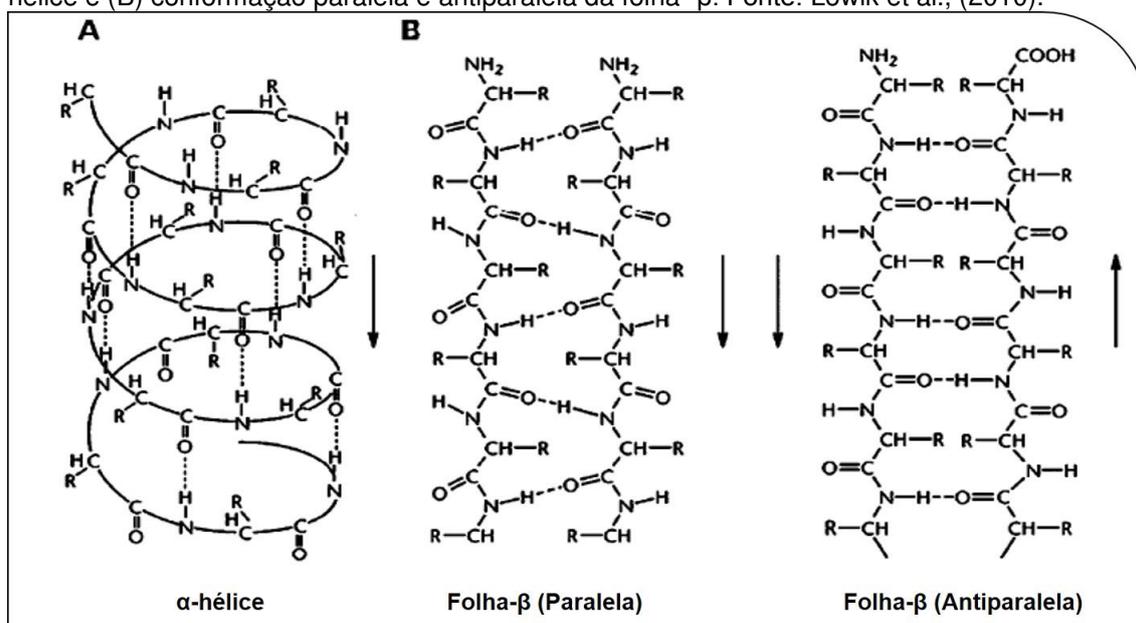
Sabe-se que os aminoácidos apresentam diferentes cadeias laterais e, a partir destas é possível a formação de um número quase infinito de estruturas, ou seja, a forma da estrutura está inteiramente relacionada à sequência primária dos aminoácidos (ULIJN; SMITH, 2008). De acordo com o grupo presente na cadeia lateral é possível a adoção de diferentes conformações, podendo atingir a formação de estruturas secundárias, terciárias e quaternárias. Além disso, as inúmeras funcionalidades químicas em associação com a capacidade dos

aminoácidos em construir sequências primárias, permite a produção de estruturas com a função química desejável (DASGUPTA; MONDAL; DAS, 2013).

As estruturas secundárias dos peptídeos são representadas principalmente pela α -hélice e folha- β e não tão comum, apresentam também as estruturas 3_{10} hélice, a qual apresenta cerca de 3 a 5 resíduos de peptídeos quando comparada a α -hélice, que apresenta uma média de 10 a 12 resíduos e π -hélice (ARMEN; ALONSO; DAGGETT, 2003; LOWIK et al., 2010). Quando a α -hélice assume a conformação em espiral, uma estrutura secundária é formada, e a mesma é estabilizada por meio de ligações de hidrogênio. Outra estrutura secundária que ocorre naturalmente em peptídeos é a folha- β , a qual ocorre entre duas cadeias peptídicas que podem ser paralelas ou antiparalelas, que se unem por meio de ligações de hidrogênio atingindo a conformação de uma folha fracamente curvada (LOWIK et al., 2010).

Quando se trata de estrutura secundária, estímulos externos podem ser aplicados conduzindo alterações na estrutura dos peptídeos, tornando possível a adoção de diferentes conformações através da redistribuição espacial dos resíduos e, por conseguinte, das suas interações. Esses estímulos são representados por aplicações relacionadas ao pH, temperatura, enzimas, íons metálicos, entre outras (MART et al., 2006). A representação esquemática das diferentes estruturas secundárias peptídicas é apresentada conforme a Figura 8.

Figura 8: Representação esquemática das principais estruturas secundárias. (A) α -hélice e (B) conformação paralela e antiparalela da folha- β . Fonte: Lowik et al., (2010).



Além de estruturas terciárias, as estruturas quaternárias também são formadas a partir da α -hélice e são conhecidas por “coiled-coil”. A formação desta ocorre a partir de duas ou mais α -hélices que se unem de forma a alcançar estruturas estáveis. Essas estruturas possuem organização baseada na repetição de sete resíduos, consistindo em uma sequência (abcdefg), no qual as posições a e d são constituídas basicamente de resíduos hidrofóbicos, formando assim, um núcleo hidrofóbico. Estes resíduos fornecem também a estabilidade à estrutura, através da formação de uma interface hidrofóbica entre os peptídeos (LOWIK et al., 2010). A estrutura pode se tornar ainda mais estável com a adição de resíduos carregados, positivamente ou negativamente, pois, os mesmos, proporcionam tal estabilidade e são capazes de promover uma melhor direção (paralela ou antiparalela) (LITOWSKI; HODGES, 2002). Dessa forma, a partir das diferentes estruturas que os peptídeos possam adotar, materiais em escala nanométrica podem ser formados principalmente por meio de auto agregação, permitindo a construção de nanoestruturas complexas.

5 Síntese de nanomateriais à base de peptídeos

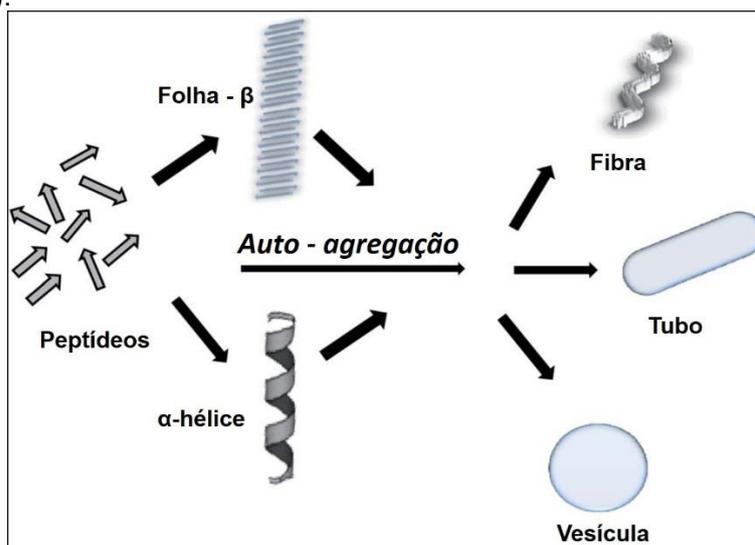
Para a construção de nanoestruturas baseadas em peptídeos, a principal abordagem utilizada é a autoagregação. Porém, outra metodologia que também é utilizada para a produção dessas, é a síntese química (HUA et al., 2016; MANDAL; NASROLAHI SHIRAZI; PARANG, 2014). Ambas abordagens são apresentadas a seguir.

Autoagregação: A síntese de materiais em nanoescala por autoagregação se destaca como uma abordagem útil e prática para tal finalidade, principalmente devido a sua simplicidade de aplicação. Como foi apresentada, sua execução consiste em organizar os peptídeos de forma que se agreguem uns aos outros, e assim, permitir alcançar estruturas completamente ordenadas e com capacidade de atingir conformações tridimensionais (CUI; WEBBER; STUPP, 2010).

A auto agregação fornece materiais biocompatíveis com o tamanho e funções desejáveis conforme se faz o manuseio dos blocos de construção. Os peptídeos são unidos por meio de diferentes interações não-covalentes, as quais englobam van der Waals, eletrostáticas, “ π stacking” e ligações de hidrogênio.

Essas interações quando analisadas individualmente, são consideradas como frágeis, porém, quando unidas se tornam fortes a ponto de construir nanoestruturas estáveis (MART et al., 2006). O processo de auto agregação para a formação de diferentes estruturas, as quais atingem conformações de vesículas, tubos e fibras, podem ser vistas na Figura 9.

Figura 9: Exemplos de estruturas formadas por autoagregação. Fonte: Panda; Chauhan (2014).

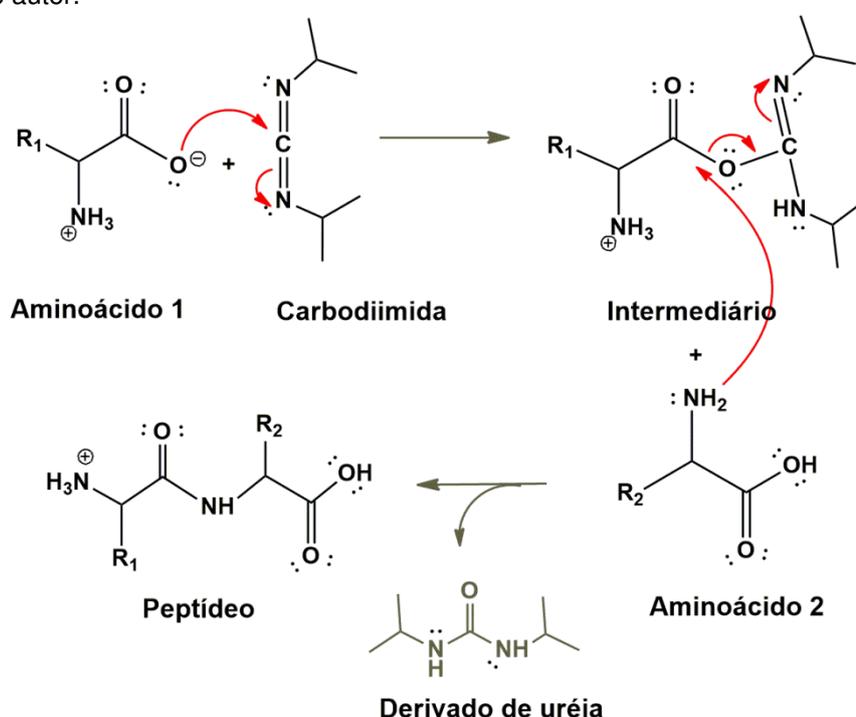


Síntese química: A construção de nanoestruturas por meio da síntese química consiste na união entre aminoácidos ou peptídeos, conforme mencionado anteriormente, através da formação da ligação peptídica entre um grupo carboxílico e um grupo amina, a fim de alcançar a adoção de diferentes conformações estáveis. Para que o processo ocorra eficientemente é necessária a ativação do ácido carboxílico para que o grupo hidroxila seja eliminado mais facilmente, sendo este um ponto crucial para que ocorra a ligação. Em sequência, o grupo amino de outro aminoácido ou peptídeo sofre um ataque nucleofílico, o qual ocasiona o deslocamento do grupo hidroxila e como resultado, a formação da ligação peptídica (AL-WARHI; AL-HAZIMI; EL-FAHAM, 2012). A ativação do grupo carboxílico acontece devido à presença de um agente de acoplamento, como por exemplo, o uso de carbodiimidas. (ALBERICIO, 2004).

Além da importância do uso do agente de acoplamento para ativação do ácido carboxílico conduzindo à formação de uma ligação peptídica, ele é também aplicado por outras razões. A síntese peptídica sem a sua presença exhibe algumas dificuldades relacionadas ao baixo rendimento e degradação do

material de partida, por meio da hidrólise das ligações peptídicas. Nesse sentido, quando presente, o agente de acoplamento eleva a eficiência de síntese e evita o surgimento de reações secundárias indesejáveis (MAUDE et al., 2012). O processo para formação da ligação peptídica em aminoácidos envolvendo o uso de carbodiimidas é apresentado na Figura 10. Esta se inicia com o ácido carboxílico reagindo com a carbodiimida formando O-acilisoureia e então, este intermediário reage com o grupamento amino de um segundo aminoácido através de uma adição nucleofílica, promovendo a formação da ligação amida e o derivado de ureia como subproduto (MONTALBETTI; FALQUE, 2005).

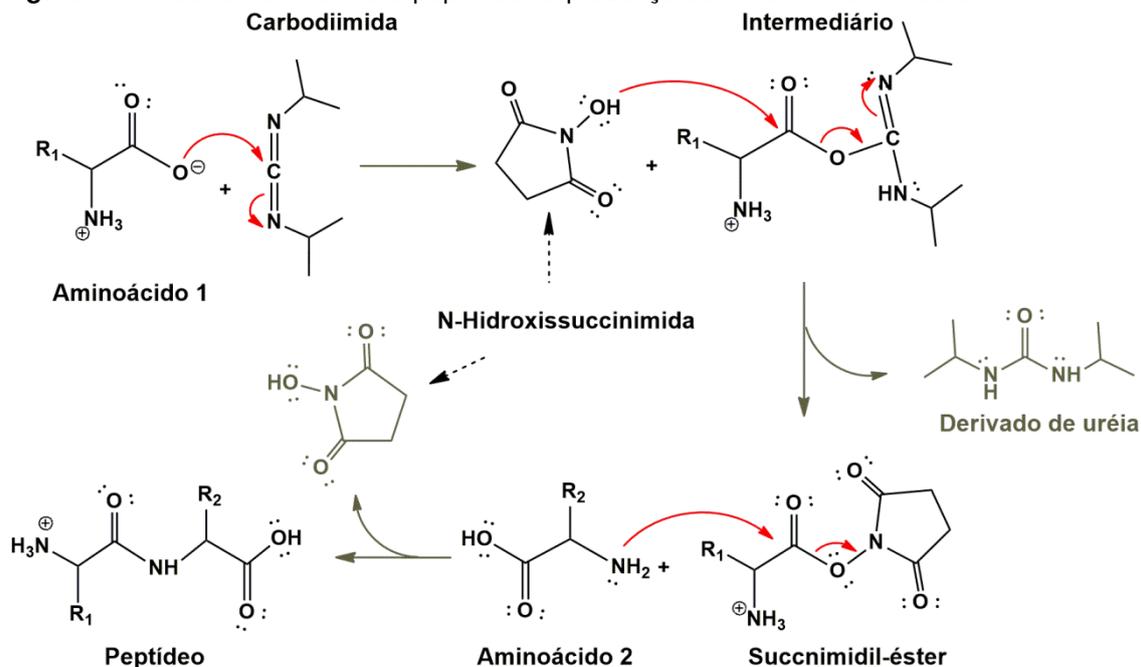
Figura 10: Síntese peptídica utilizando carbodiimida como agente de acoplamento. Fonte: Do autor.



Com o objetivo de aumentar a eficiência da síntese peptídica, N-hidróxi-succinimidil ésteres são produzidos *in situ*, a partir da adição de N-Hidroxisuccinimida (NHS) no meio reacional contendo aminoácidos ou peptídeos, juntamente com o agente de acoplamento. A molécula de NHS adiciona-se nucleofílicamente à carbonila do intermediário (O-acilisoureia), a fim de formar um N-hidróxi-succinimidil éster, sendo esse composto muito reativo frente a grupo amina, razão esta que favorece a sua aplicação na síntese de peptídeos e nanoestruturas (BARRÉ et al., 2016). Além disso, o NHS apresenta

como característica principal a aceleração das taxas de reação, o qual permite alcançar melhor rendimento na formação da ligação amida (DEMING, 2012). Dessa forma, a reação de síntese peptídica com maior eficiência devido à presença do agente de acoplamento e do NHS é apresentada na Figura 12.

Figura 11: Mecanismo de síntese peptídica na presença de NHS. Fonte: Do autor.



6 Nanoestruturas à base de Peptídeos

A partir de estruturas tridimensionais formadas por peptídeos, diferentes arquiteturas são desenvolvidas e, para a construção dessas, uma classe de peptídeos que se destacam são os anfifílicos (CUI; WEBBER; STUPP, 2010). Como estes apresentam duas regiões distintas (uma hidrofílica e outra hidrofóbica), eles se organizam de forma muito semelhante à tensoativos anfifílicos, apresentando, porém, as funções dos peptídeos bioativos. Essa anfifilicidade é uma das características fundamentais para a auto agregação, pois durante o processo, a região hidrofílica fica exposta ao meio aquoso enquanto a região hidrofóbica fica protegida no interior, por essa razão, as interações desfavoráveis com o ambiente tendem a se tornar mínimas (CUI; WEBBER; STUPP, 2010; ULIJN; SMITH, 2008).

Tanto os peptídeos quanto a classe dos anfifílicos são capazes de formar nanoestruturas tais como nanopartículas, nanotubos, nanofibras, nanoesferas, hidrogeis, entre outras, que os destacam como potenciais biomateriais para aplicação em diferentes abordagens dentro da biotecnologia, como, por exemplo, na encapsulação e liberação de moléculas terapêuticas (CUI; WEBBER; STUPP, 2010).

6.1 Nanopartículas

São materiais com dimensões em nanoescala que se destacam, entre diversas áreas de aplicação, no emprego de nanopartículas como sistemas de entrega de moléculas terapêuticas, promovendo uma liberação sustentada e efetiva ao local-alvo. A entrega destas moléculas na sua forma livre é sempre um grande desafio, pois estes apresentam fraca solubilidade, necessidade de dosagem elevada, devem ser entregues em local sítio-específico, podem sofrer degradação enzimática, possuem baixo tempo de meia-vida, entre outras (REKHA; SHARMA, 2013). É frente a essas dificuldades que o uso de nanopartículas emerge como alternativa para superar tais obstáculos e promover uma entrega efetiva com aumento da biodisponibilidade. Assim, evitar que ocorra a degradação e a presença de efeitos secundários, o que fazem desta, um sistema de liberação sustentada com potencial aplicação nas áreas médicas, biomédicas e farmacêuticas (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012; YUN; CHO; PARK, 2013).

Quando se trata de nanopartículas, deve-se levar em consideração o seu tamanho e a química de superfície, pois estes são uma das principais razões que as tornam eficientes quando aplicadas como sistemas de liberação (BAWA et al., 2012). O controle preciso do tamanho é extremamente importante para alcançar uma boa distribuição por meio de uma circulação prolongada, além de melhorar a permeabilidade e o efeito de retenção, os quais tornam possível o seu acúmulo próximas às regiões tumorais, por exemplo (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012). Acoplar ligantes, ou seja, sistema de direcionamento na superfície de nanopartículas permite ainda uma melhor absorção devido à uma melhor interação entre o ligante e o local-alvo (BAWA et al., 2012; ISCHAKOV et al., 2013).

Segundo Ma et al., (2016), nanopartículas baseadas no peptídeo catiônico difenilalanina foram produzidas por auto agregação a fim de proporcionar uma efetiva terapia fotodinâmica *in vivo*, a qual é uma terapia eficaz como agente antitumoral. Para tal, o modelo de fármaco fotossensível Chlorine e6 (Ce6) foi incorporado à nanopartícula, e esta, foi acoplada com polímeros de heparina na sua superfície por meio de ligação eletrostática. A presença da heparina permitiu a mudança da carga superficial (potencial zeta) das nanopartículas de positiva para negativa, além de ser uma substância natural que auxilia no tratamento antitumoral. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio de 100nm e potencial zeta de -25mv, as quais permitiram a liberação do fármaco, por via intravenosa e alcançaram efeito antitumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tornando transportadores promissores no tratamento de doenças.

De acordo com Panda (2013) e seus colaboradores, dipeptídeos catiônicos (Arg-Phe) e (Lys-Phe) foram formados por meio de síntese peptídica em fase de solução e as nanopartículas por auto agregação. Estas foram produzidas como sistemas de administração para proporcionar a entrega de genes no núcleo das células-alvo e, assim, garantir o sucesso da terapia gênica. Estas nanopartículas não apresentaram citotoxicidade, transportaram o DNA com sucesso evitando a degradação enzimática e uma positiva transfecção do gene. Devido à biocompatibilidade e facilidade de síntese, estas nanopartículas a base de peptídeos são veículos promissores de entrega de ácidos nucleicos para terapia gênica (PANDA; VARSHNEY; CHAUHAN, 2013).

Nanopartículas foram formadas através do peptídeo anfipático CADY. Este é um peptídeo penetrante de célula (do Inglês, *cell penetrating peptide* - CPP), mas quando em contato com siRNA formam nanoestruturas estáveis. CADY é um peptídeo anfipático secundário de 20 resíduos (Ac-GLWRALWRLLRSLWRLWKA-cya) produzido através de síntese peptídica em fase sólida, utilizando Fmoc como grupo protetor. As nanopartículas foram formadas por auto agregação através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas e assim, foram capazes de entrar nas células e entregar de maneira efetiva o siRNA (DESHAYES et al., 2012). Outros estudos envolvendo a formação de complexos entre CPPs/siRNA são encontrados na literatura, os quais são utilizados CADY (RYDSTRÖM et al., 2011), transportan 10 (TP10) (LEHTO et al., 2011) e PepFect 6 (PF6) (EL ANDALOUSSI et al., 2011).

6.2 Nanotubos e Nanovesículas:

Nanotubos são estruturas produzidas em escala nanométrica na forma de tubos e um fator característico, é a presença de um orifício interno em sentido longitudinal. O tamanho deste orifício varia de acordo com os peptídeos utilizados. Já as nanovesículas são também nanoestruturas na forma de vesículas e, para sintetizá-las, uma classe de peptídeos que se destacam são os anfifílicos, pois apresentam ambas as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas e, assim, se autoagregar em vesículas (MANDAL; NASROLAHI SHIRAZI; PARANG, 2014).

Nanotubos foram produzidos a partir do dipeptídeo (Fenilalanina-dehidrofenilalanina) por meio de síntese peptídica em fase de solução, utilizando Boc como grupo protetor. Foram fabricados com o objetivo de transportar e liberar curcumina, como carga terapêutica, para tratamento da malária, visto que esta apresenta propriedades ativas contra esta doença. A nanoestrutura apresentou-se monodispersa, não-citotóxico a 50 μ M, além de ser biocompatível para aplicações biológicas, tais como liberação controlada de fármacos (ALAM et al., 2016).

Segundo Santoso et al. (2002), nanotubos e nanovesículas foram produzidas a partir da autoagregação de peptídeos que se assemelham a surfactantes. A autoagregação se dá por meio de pelo menos um aminoácido com a “cabeça” polar e outro com a “cauda” apolar, sendo o ácido aspártico e a glicina respectivamente. Além da formação das nanoestruturas, foi também avaliada a influência da quantidade presente do aminoácido glicina para a formação de estruturas supramoleculares, variando de 4-10 resíduos de glicina. Foi observado que à medida que a quantidade de glicina no meio aumentava, as nanoestruturas formadas se tornavam mais polidispersas.

Nanotubos foram também produzidos por autoagregação a partir de peptídeos como difenilalanina (RECHES; GAZIT, 2003). Já no caso da difenilglicina que apresenta características semelhantes ao peptídeo difenilalanina, seu processo de produção nas mesmas condições de auto agregação, apresentou a formação de nanoestruturas na forma esférica (RECHES; GAZIT, 2004). Através de peptídeos cíclicos, nanotubos e nanopartículas foram produzidos por automontagem, os quais foram sintetizados através de várias condições e parâmetros. Estes parâmetros estão associados

a concentração de peptídeo, valores de pH, tempo de reação, agitação, entre outros. Quando as nanoestruturas atingem diâmetro e morfologia ideais, conseqüentemente apresentam potencial aplicação na área biomédica (SUN et al., 2015).

De acordo com Mishra et al., (2008), peptosomas são nanovesículas formadas por auto agregação de peptídeos, os quais oferecem maior estabilidade e biocompatibilidade à nanoestrutura. As nanovesículas foram produzidas por dipeptídeos anfifílicos (Glu-Phe) e (Lis-Phe), as quais apresentaram resistência à degradação proteolítica, estabilidade a altas temperaturas, não-citotoxicidade e potencial liberação de moléculas bioativas em células-alvo.

6.3 Nanofibras

Por meio de automontagem, nanofibras foram construídas a partir de múltiplos peptídeos (do inglês, peptide-based nanofiber – NFP), os quais apresentavam alternativamente na sua sequência primária os aminoácidos, ácido aspártico e lisina, os quais são hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente. A auto agregação se dá em ambiente aquoso por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Na estrutura das nanofibras contém polietilenoglicol (PEG), o qual é usado no intuito de evitar a agregação e impedir a formação de hidrogel por inibição de possíveis interações entre fibrilas. As nanofibras foram produzidas como sistemas de entrega e sua biocompatibilidade e aplicação *in vivo* foram investigadas. Como resultado, são não-tóxicas, biocompatíveis e apresentam uma acumulação próxima ao tumor maior que algumas nanopartículas esféricas do mesmo tamanho, tornando esta, um seguro e eficiente sistema de entrega (WAGH et al., 2013).

Segundo Le et al., (2013), polipeptídeos de elastina foram produzidos por meio de dois segmentos peptídicos, compreendendo uma sequência rica em glicina e uma sequência rica em prolina, as quais se baseiam na estrutura de domínio único da tropoelastina. Os polipeptídeos adotam conformações secundárias e se autoagregam em nanofibras que apresentaram ser bem dispersas em água e ter atividades termoresponsivas, além de serem materiais promissores para funcionar como sistemas de entrega.

6.4 Hidrogel

Uma das principais nanoestruturas são os hidrogéis que consistem de redes porosas tridimensionais que podem ser formados a partir de peptídeos, principalmente os anfifílicos, que adotam conformação de nanofibras. Com o alongamento dessas fibras em um espaço tridimensional é possível formar uma rede fibrilar mais espessa e comprida, conduzindo a produção de um hidrogel. Apresentam boa permeabilidade e suporte mecânico, o que permite a encapsulação de diferentes moléculas e estas, são razões que favorecem, por exemplo, a sua aplicação na liberação sustentada e cultura de células (BARBOSA; MARTINS; GOMES, 2015).

Os hidrogéis tornaram-se biomateriais promissores em razão de suas propriedades físico-químicas, incluindo a capacidade de absorver líquido e de intumescimento, além de recriar ambientes e estruturas semelhantes à matriz extracelular. Vale ressaltar a sua combinação com elementos químicos e biológicos, inclusive em relação à capacidade de incorporar grupos funcionais, os quais permitem a construção de diferentes sequências de hidrogéis e assim, potencializa a sua aplicação em diversas áreas médicas (BARBOSA; MARTINS; GOMES, 2015; CHENG et al., 2015).

De acordo com Zhou et al., (2009), hidrogéis foram formados no intuito de mimetizar certas características da matriz extracelular e permitir o cultivo de células dependentes de suporte. O processo se baseou na automontagem de dois peptídeos derivatizados, Fmoc-FF (Fluorenilmetoxicarbonil-difenilalanina) e Fmoc-RGD (Arginina-glicina-aspartato). O hidrogel apresentou uma estrutura nanofibrosa tridimensional e o RGD agiu como um componente estrutural e fornecedor de ligantes na superfície da fibra. O hidrogel obtido é um biomaterial promissor para a cultura 3D de diferentes células.

Segundo Cheng et al. (2015), hidrogéis baseados em peptídeos contendo cisteína (NapFFC) foram produzidos via interação eletrostática e reticulação química. Os mesmos são integrados às nanopartículas de ouro e íons de cálcio, visto que a presença destes conduz a formação de uma densa rede fibrosa, a qual melhora a estabilidade mecânica dos hidrogéis. Apresentam alta biocompatibilidade e potencial aplicação em liberação controlada de fármacos e aplicações biomédicas.

Souza, Silva e Alves (2017), produziram hidrogéis através de difenilalanina (FF) utilizando grupos protetores Fmoc. Os hidrogéis foram utilizados para encapsular *L. i. chagasi*, um antígeno para tratamento da Leishmaniose. Os hidrogéis formados na presença de água apresentaram diâmetro de 15nm, a partir da incorporação do antígeno, o diâmetro aumentou para 34nm. Assim, os hidrogéis foram adequados para encapsulação e ensaios de SAXS mostraram que o antígeno não modifica a estrutura original do hidrogel.

Conforme apresentado, muitos são os trabalhos relacionados à produção de diferentes nanoestruturas baseadas em peptídeos, os quais conferem ampla vantagem em relação aos materiais convencionais, principalmente em se tratando da sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. O uso de peptídeos como blocos de construção potencializa a formação de estruturas complexas e estáveis, além de apresentar potencial aplicação como sistemas de liberação de agentes terapêuticos ao local-alvo, evitando a presença de efeitos secundários.

7 Nanoestruturas à base de Polipeptídeos

Os polipeptídeos, assim como apresentado para os peptídeos, são também uma classe de materiais biodegradáveis que vêm atraindo a atenção das indústrias médicas e biomédicas, como potenciais carreadores para liberação controlada de fármacos e genes (HE et al., 2012). Podem adotar diferentes arquiteturas, dentre estas, destacam-se as micelas, vesículas e hidrogéis. Estas serão produzidas de acordo com a composição da sua sequência primária de aminoácidos e as cadeias laterais que apresentam em sua estrutura química. Os polipeptídeos frente aos peptídeos, podem formar nanoestruturas bem mais estáveis em razão da forte interação entre as cadeias de peptídeos e por apresentarem um grande número de resíduos de aminoácidos (DEMING, 2007).

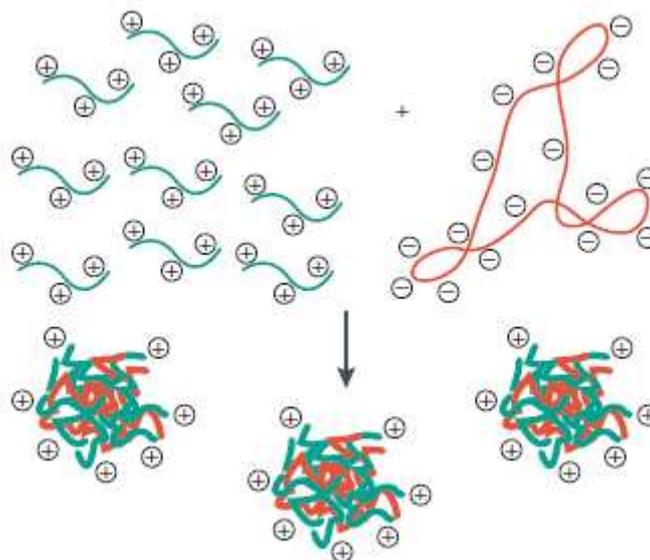
Os polipeptídeos, podem assumir diferentes conformações e uma das principais, são os hidrogéis. Estudos recentes, reportam a formação de hidrogel a partir de polipeptídeos presentes na natureza. O hidrogel foi preparado a partir de ácido poli glutâmico e polilisina, via polimerização EDC/NHS. O processo de gelificação ocorreu em banho de gelo e o tempo de duração foi menor que 5 minutos. Técnicas como espectroscopia na região do infravermelho e

espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X confirmaram a formação de ligação amida via polimerização. O hidrogel formado apresentou sensibilidade ao pH, clareza óptica e boa biocompatibilidade, o que o torna uma potencial aplicação biomédica como, por exemplo, liberação de fármacos (HUA et al., 2016).

Os polipeptídeos também se destacam quanto a sua aplicação na terapia gênica, esta que atua no tratamento de uma gama de doenças, tais como câncer e imunodeficiência (JEONG; KIM; PARK, 2007). Sabe-se que para entrega eficiente de genes é necessário o desenvolvimento de sistemas capazes de transferirem de forma segura o DNA terapêutico para os tecidos e células. Os vetores virais são amplamente utilizados no transporte de genes devido à sua alta eficiência de transfecção, entretanto a busca por vetores não-virais que apresentem baixa toxicidade e que sejam seguros e eficientes na entrega do material genético é ainda um desafio para a terapia gênica (WU et al., 2017; ZHU et al., 2017).

É neste contexto que emerge a utilização de polipeptídeos como vetores não-virais, com destaque para os os polipeptídeos catiônicos, por exemplo, a polilisina (PLL), a qual apresenta grande quantidade de grupos aminos em sua estrutura. Devido a sua carga positiva, elas podem condensar o DNA, o qual é carregado negativamente e, assim, por meio de interações eletrostáticas, formar complexos condensados, também conhecidos por poliplexos (JEONG; KIM; PARK, 2007). Além de formar estas nanopartículas, os poliplexos (denominação formada aos complexos formados por polímeros e material genético), a natureza catiônica destas estruturas também favorece a interação com a membrana celular e por conseguinte, a entrega intracelular (OPANASOPIT et al., 2011). O processo de formação dos complexos é apresentado conforme a Figura 12.

Figura 12: Processo de formação de complexos por meio de interações eletrostáticas entre um polímero carregado positivamente e o ácido nucléico carregado negativamente. Adaptado de Pack et al., (2005).



Um problema acerca do uso de polilisina é a sua toxicidade, a qual está relacionada ao grau de polimerização da sua cadeia de aminoácido, ou seja, quanto maior a cadeia maior é a toxicidade. Uma vantagem, é que essa característica pode ser modulada quanto ao número de resíduos de lisina que se deseja ter na cadeia (ZHANG et al., 2010).

Diversos trabalhos referentes a complexação PLL/DNA são reportados na literatura. Estudos envolvendo a formação de um novo polipeptídeo (PEG-PLL-PCys), o qual foi conjugado com cadeia de fluorocarbonetos, apresentam a formação de um núcleo proveniente da complexação entre PLL e DNA por meio de interações eletrostáticas e os segmentos de PEG são adicionados na superfície do complexo como uma barreira de proteção. A presença da Cys junto as cadeias de fluorocarbonetos auxilia no aumento da solubilidade dos complexos e estes apresentaram baixa toxicidade e boa eficiência de transfecção (WU et al., 2017).

No intuito de alcançar a síntese de diferentes tipos de nanopartículas baseadas em polipeptídeos, faz-se necessário o desenvolvimento de processos que garanta a formação de nanoestruturas com características físico-químicas ideais e reprodutibilidade. Neste contexto, a microfluídica surge como uma

técnica que apresenta condições operacionais que tornam possível a produção de nanopartículas com menor diâmetro e índice de polidispersidade.

8 Microfluídica

A microfluídica emerge como uma plataforma tecnológica poderosa para ensaios biológicos, os quais englobam aplicações nas mais diversas áreas da biotecnologia (SUN et al., 2016). Seu conceito é baseado na miniaturização de canais, semelhantes a um chip, e a conseguinte integração e automação de elementos funcionais, tais como sistemas de bombeamento, o qual permite o processamento e manipulação de pequenas quantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} litros) (MARK et al., 2010; PIHL; KARLSSON; CHIU, 2005). Em certas situações, a miniaturização confere características que permitem a realização de tarefas que não são acessíveis aos seus análogos em macroescala (PIHL; KARLSSON; CHIU, 2005).

A microfluídica atribui inúmeras vantagens em relação aos sistemas fluídicos convencionais, tais como capacidade de trabalhar com menor consumo de amostra e reagentes, tempo de reação mais curtos, controle preciso dos fenômenos de transferência térmico e mássico, possibilidade de paralelização de operações, custos operacionais reduzidos, simplicidade e facilidade de uso. Além disso, permite a construção de microambiente que mimetizam organismos vivos. Essas características intensificam a aplicação da microfluídica no campo da nanotecnologia (CHEN et al., 2016; MARK et al., 2010; ZHANG; GE; YU, 2016).

São diversas as técnicas aplicadas para a fabricação de dispositivos microfluídicos, as quais dependem dos materiais a serem empregados e que melhores se adéquem, levando em consideração as características físicas e químicas desses materiais. Propriedades tais como flexibilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade e transparência óptica, são extremamente relevantes na escolha dos materiais a serem utilizados. Dentre eles, se destacam o uso de vidro e polímeros, tais como polidimetilsiloxano (PDMS) e polimetilmetacrilato (PMMA) para fabricação de microdispositivos (PIHL; KARLSSON; CHIU, 2005; SUN et al., 2016; WHITESIDES, 2006). Em relação às tecnologias, diversas são utilizadas na construção de tais dispositivos microfluídicos: litografia macia, ablação a laser, moldagem por injeção,

impressão e estampagem a quente, impressão 3D, dentre outros (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; SUN et al., 2016).

Para um melhor entendimento do processo em microescala é essencial o conhecimento dos fenômenos físicos que ocorrem nos sistemas microfluídicos, bem como os materiais utilizados e as diferentes geometrias adotadas (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002). Não menos importante, é necessária a compreensão da dinâmica dos fluídos e o seu comportamento em microcanais. Para tal, algumas forças são responsáveis pelo controle e operação desses, tais como inercial, viscosa e interfacial (SQUIRES; QUAKE, 2005). Os fenômenos da difusão e convecção também exercem grande influência nos processos de mistura e reação química.

Em se tratando de dinâmica de fluídos, existem números adimensionais que caracterizam o comportamento hidrodinâmico na microfluídica. Entre os principais, podemos destacar o número de Reynolds (Re), o qual relaciona forças viscosas e inerciais no sistema, o número de Péclet (Pe), que está associado ao processo de mistura, por meio da razão entre a convecção e difusão e o número de Capilar (Ca), que proporciona uma correlação entre forças viscosas e tensão superficial (utilizado para duas fases imiscíveis). Esses, e os demais números adimensionais existentes, são importantes ferramentas para compreender e avaliar o movimento de fluídos dentro dos microcanais (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; SQUIRES; QUAKE, 2005).

Duas são as abordagens relacionadas ao escoamento de fluidos: a presença de fluxo laminar ou turbulento. Na microfluídica predomina o regime laminar, pois o mesmo está relacionado à velocidade do fluxo e às dimensões do canal, as quais são reduzidas na ordem de micrômetros. Nele, as correntes fluem de forma ordenada e em paralelo, já a mistura entre elas ocorre pela força de difusão. O parâmetro que indica se o fluxo é laminar ou turbulento é o número de Reynolds (Re) (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; CAPRETTO et al., 2013; SCHULTE; BARDELL; WEIGL, 2002; SIA; WHITESIDES, 2003; WHITESIDES, 2006).

Na microfluídica, com os canais em pequenas dimensões e o fluxo em baixa velocidade, o Re tende a ser sempre baixo, predominando fluxo laminar e difusão molecular entre os fluidos como o fenômeno mais significativo de transferência de massa. Quando esse valor atinge (> 2000), o fluxo se torna turbulento, e esse, é um comportamento de fluídos difícil de aplicar quando se

trabalha em microescala. A presença do escoamento laminar é que permite a microfluídica ser uma plataforma ideal e implica a sua relevância para o desenvolvimento de projetos que envolvam a biotecnologia (PIHL; KARLSSON; CHIU, 2005; SCHULTE; BARDELL; WEIGL, 2002; WEIBEL; WHITESIDES, 2006).

8.1 Sistemas Microfluídicos para a Produção de Nanopartículas

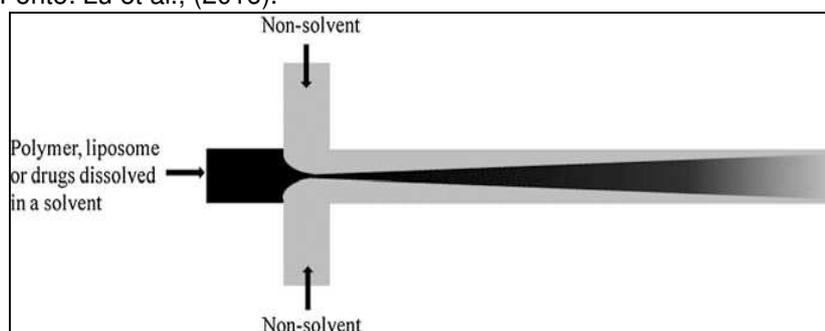
Estudos visando à produção de nanopartículas vêm ganhando grandes proporções, visto que estas apresentam uma ampla gama de aplicações. As partículas exibem dimensões que variam de dezenas a centenas de nanômetros favorecendo assim, a biodisponibilidade, além de apresentarem um alto potencial de utilização compreendendo as áreas médicas e farmacêuticas, principalmente em se tratando de liberação controlada de cargas terapêuticas (CAPRETTO et al., 2013).

A microfluídica, a qual apresenta uma abordagem “*bottom-up*” para a produção de nanoestruturas, emerge como uma alternativa promissora em relação aos sistemas convencionais para a síntese de nanopartículas. O uso da microfluídica para tal finalidade permite que se tenha um bom controle das propriedades físico-químicas das nanopartículas. Logo, o controle sobre os parâmetros do processo conduz à formação de nanopartículas com as características desejáveis, reduzindo assim, a necessidade de etapas subsequentes de produção (KRISHNADASAN et al., 2007; ZHAO; MIDDELBERG, 2016). Os sistemas microfluídicos que agem como microrreatores, são capazes de operar com uma variedade de materiais, o que torna possível a síntese de diferentes nanopartículas. Entre elas, podemos destacar a produção de nanopartículas poliméricas (HUNG et al., 2010; MAJEDI et al., 2012), nanopartículas inorgânicas (CABEZA et al., 2012; HASSAN; CABUIL; ABOU-HASSAN, 2013) e nanopartículas lipídicas (CHEN et al., 2012; KENNEDY et al., 2012). Os microreatores apresentam algumas características que afetam diretamente no processo de mistura e na consequente produção de nanopartículas. Entre estas, podemos destacar a taxa de fluxo, o tempo de residência e a geometria do canal. As melhores configurações devem ser exploradas a fim de maximizar o processo de produção e garantir que a síntese das nanopartículas alcance as características ideais. Para tal, uma abordagem

de fluxo contínuo que se destaca potencializando o efeito de mistura no microcanal é conhecida por princípio de focalização hidrodinâmica (CAPRETTO et al., 2013).

Diferentes nanopartículas são sintetizadas utilizando o conceito de focalização hidrodinâmica, o qual consiste no contato entre duas fases de fluidos solúveis entre si, ou melhor, dizendo, na qual uma corrente central é focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais, conforme apresentado na Figura 13. O comportamento do fluxo é um dos principais parâmetros no processo de síntese de nanoapartículas e esta técnica permite aplicação de altas taxas de fluxo e um alto controle sobre as condições de operação (LU et al., 2016).

Figura 13: Representação esquemática do princípio de focalização hidrodinâmica no microcanal. Fonte: Lu et al., (2016).



A síntese de nanopartículas poliméricas de PLGA-PEG por meio de nanoprecipitação (KARNIK et al., 2008), de niossomas através de uma mistura de surfactantes (LO et al., 2010) e a formação de lipoplexos devido às interações espontâneas entre DNA/lipossoma catiônico (BALBINO et al., 2016), são todas produzidas em sistemas microfluídicos com base no princípio da focalização hidrodinâmica, o qual permite o controle dos parâmetros do processo e conduz a obtenção de nanoestruturas com as características desejáveis.

Apesar dos avanços significativos no campo da microfluídica já alcançados e das vantagens que esta técnica apresenta em relação aos sistemas convencionais, inúmeros são os trabalhos encontrados na literatura referentes à produção de diferentes nanopartículas (CAPRETTO et al., 2013). Porém, trabalhos referentes à síntese de nanopartículas à base de aminoácidos ainda são escassos, o que potencializa a busca por mais informações e exploração dos sistemas microfluídicos, a fim de produzir uma nova

nanoestrutura com uma possibilidade infinita de aplicações, compreendendo diversas áreas da biotecnologia.

CAPÍTULO 3 – SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS BASEADAS EM PEPTÍDEOS VIA ROTA DE SÍNTESE QUÍMICA

1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas apresentam potencial aplicação no campo da nanomedicina como sistemas carreadores a fim de promover uma entrega sustentada de compostos bioativos em locais-alvo. Para a síntese de nanopartículas, o desenvolvimento de processos microfluídicos em regime contínuo emerge como uma nova abordagem que pode conduzir a uma síntese de forma rápida e controlada quando comparada aos sistemas convencionais.

Neste projeto, investigou-se a viabilidade da produção de nanopartículas baseadas em peptídeos através da reação de polimerização de aminoácidos, utilizando o agente de acoplamento DIC e arginina, na presença do catalisador NHS. Desta forma, a principal ideia nesta etapa é a formação de estruturas randômicas que podem variar de acordo com a composição dos aminoácidos, formando estruturas do tipo *star shaped polymers*.

Para isso, em primeira instância, e como proposta nesta dissertação de mestrado, foi averiguar as condições reacionais para ocorrer a reação de polimerização. Desta forma, optou-se por avaliar a Arg, pois esta realiza preferencialmente ligação peptídica do tipo α , a qual representa a ligação amida entre dois aminoácidos. Esta característica da Arg é devida à reatividade do seu grupo guanidino da cadeia lateral, o qual não tende a realizar estas ligações.

Para o caso da Arg, a tendência é a formação de polímeros preferencialmente lineares, os quais podem se enovelar em uma conformação coloidal devido à presença de forças intermoleculares, gerando nanopartículas. O contrário pode ser observado em relação a outros aminoácidos, os quais podem realizar ligações entre aminoácidos sem ser do tipo alfa, o que leva a formação de nanopartículas ramificadas (*star shaped*), mas sem funcionalidade biológica. Sendo assim, as configurações de síntese de nanopartículas poderiam hipoteticamente ser moduladas de acordo com a composição dos aminoácidos, de forma que sejam empregados na veiculação de fármacos, os quais podem apresentar cargas ou natureza hidrofóbica.

Trabalhos recentes não reportam a síntese de nanopartículas peptídicas via tecnologia microfluídica, logo, o desenvolvimento deste projeto se baseia em análises exploratórias a fim de viabilizar a produção das nanopartículas em

condições ótimas. A ideia do projeto de pesquisa advém do Professor Dr. Tiago Abertini Balbino, o qual realizou doutorado sanduíche junto ao grupo do *National Institute of Standards and Technology (NIST)*, sob supervisão do Dr. Wyatt Vreeland (Processo FAPESP – BEPE - 2013/14925-6), onde iniciou experimentos exploratórios desta síntese via microfluídica. Assim, as condições iniciais de investigação partiram dos resultados obtidos pelo Dr. Balbino durante seu intercâmbio, visando à síntese de nanopartículas peptídicas.

Para que o processo de síntese de nanopartículas peptídicas ocorra, é necessário que aconteça primeiramente, a síntese de peptídeos. Quanto a este assunto, inúmeros trabalhos são reportados na literatura. A síntese peptídica em metodologia convencional ocorre em fase sólida (do inglês, *Solid-phase peptide synthesis – SPPS*) (Subitem 2.1.1) (ABDELMOTY, F. *et al.* 1994; STAWIKOWSKI, FIELDS, 2002). Uma adaptação desta metodologia convencional para operação em regime de escoamento contínuo foi realizada por (SIMON *et al.*, 2014). Estes, realizaram a construção de um reator em escala milimétrica, capaz de realizar a reação química para a formação de dipeptídeos na presença de grupos protetores dos aminoácidos à 60°C em 1,8 minutos.

Outra versão desta metodologia, utilizou um reator de 78mL, em escoamento contínuo, operando a 90°C e 3 minutos de tempo espacial. Quando a temperatura foi elevada para 120°C, em 1,5 minutos a reação foi completada para a formação de dipeptídeos também, na presença de grupos protetores dos aminoácidos (FLÖGEL *et al.*, 2006).

Neste contexto, a microfluídica oferece vantagens quando comparada a reatores. Esta tecnologia, que também opera em fluxo contínuo, minimiza os efeitos de transferência de massa e calor potencializando o processo de mistura dentro dos microdispositivos. Se no uso de reatores para o processo de síntese de peptídeos é necessária uma média de 1,7 minutos para produzir um dipeptídeo, na microfluídica este processo tende a ocorrer em menor tempo em razão de sua escala micrométrica, o que leva a processos com resultados mais próximos da cinética intrínseca.

Para a primeira fase deste projeto de pesquisa (Anexo I), buscou-se avaliar as condições iniciais para o desenvolvimento de um sistema microfluídico que seja capaz de sintetizar nanopartículas peptídicas. Para a produção de um sistema eficiente, estudos que vão desde a escolha da melhor geometria microfluídica à avaliação da melhor temperatura para produção de

nanopartículas foram aplicados.

Em seguida, na seção 3.2, a partir da escolha das melhores condições iniciais, deu-se início o processo de síntese de nanopartículas peptídicas e estas foram então caracterizadas por diferentes técnicas de espectroscopia, espectrometria e microscopia, a fim de confirmar a formação das nanopartículas via processo microfluídico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Nanopartículas foram preparadas utilizando L-Arginina monohydrochloride (ARG) e tampão HEPES, ambos adquiridos da empresa (Sigma-Aldrich, EUA). O agente de acoplamento N,N'- Diisopropilcarbodiimida (DIC) e o catalisador N-Hidroxisuccinimida (NHS) foram também adquiridos da (Sigma-Aldrich, EUA). Álcool isopropílico foi adquirido da (Labsynth, Brasil). Para a construção dos dispositivos microfluídicos em PDMS, utilizou-se o Sylgard 184 Elastomer Kit da (Dow Corning, EUA).

2.2 Métodos

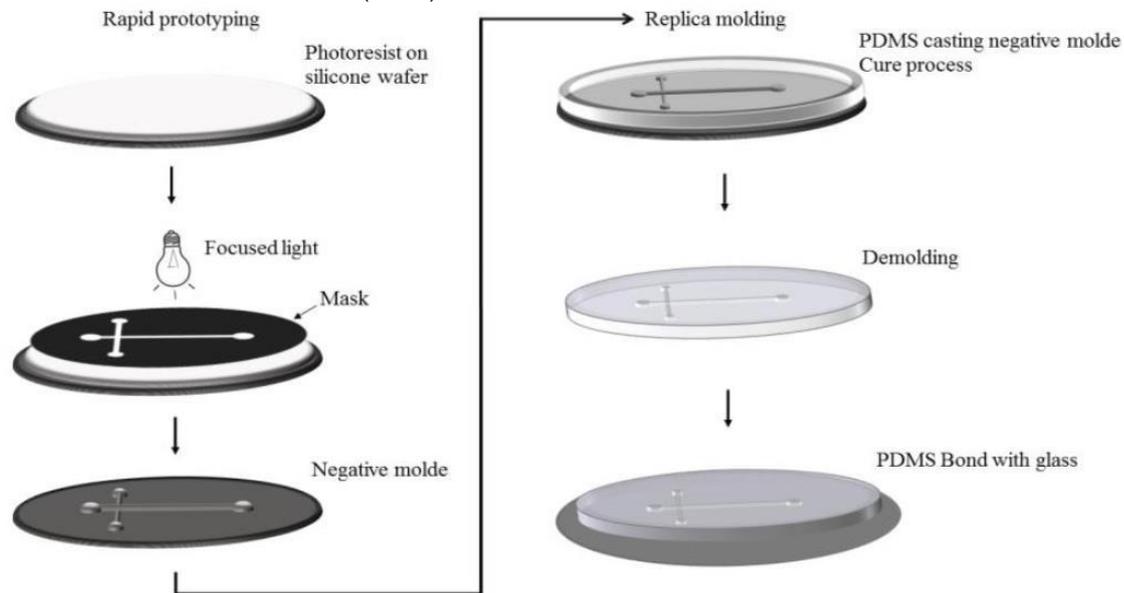
2.2.1 Produção de microdispositivos

Os dispositivos microfluídicos de PDMS/vidro foram construídos baseados na técnica de litografia macia (XIA; WHITESIDES, 1998). O processo se inicia com o desenho das geometrias dos canais no programa AutoCAD (Autodesk), de forma que cada dispositivo apresente suas determinadas dimensões. Foram estudadas duas diferentes geometrias dos canais para a produção de nanopartículas peptídicas, entre os quais dispositivos de focalização hidrodinâmica: T simples e T longo.

Na sequência, os desenhos das geometrias foram impressos em fotolito e então, a conseguinte aplicação de uma fina camada de fotoresiste SU-8, a qual foi exposta a luz UV, para a formação de uma máscara. A construção da máscara permite a produção de moldes de PDMS e então, uma mistura contendo PDMS e agente de cura é colocada sobre o molde. Após o processo de cura, o PDMS é retirado do molde formando uma réplica final com as geometrias projetadas. O

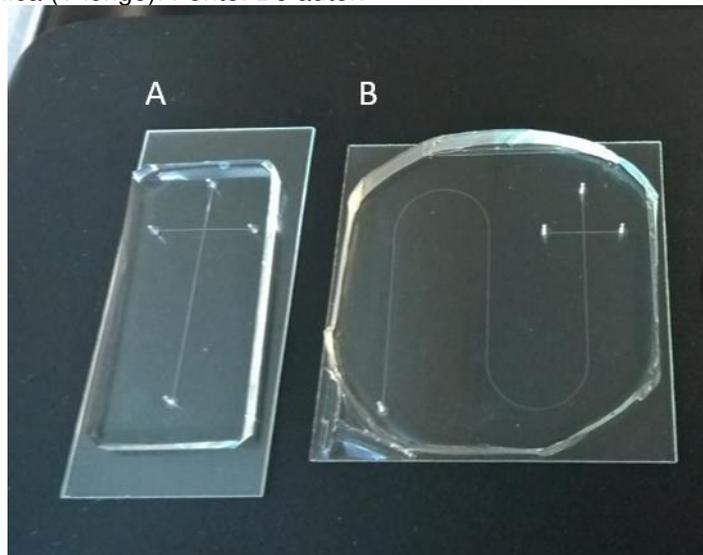
processo de construção de dispositivos baseados na técnica de litografia macia é apresentado na Figura 14.

Figura 14: Etapas do processo de Litografia macia para a produção de dispositivos microfluídicos. Fonte: De la Torre et al., (2014).



A réplica final de PDMS com os microcanais é então, juntamente com uma lâmina de vidro, colocadas à oxidação em câmara de plasma de oxigênio. Essa exposição permite que ocorra uma selagem irreversível entre a superfície do PDMS e do vidro, resultando nos dispositivos microfluídicos PDMS/vidro. Os microdispositivos de PDMS/vidro utilizados neste estudo (Figura 17) foram construídos com canais de dimensões de 140 μm de largura para ambas as geometrias e aproximadamente 50 μm de altura para a geometria T simples e cerca de 90 μm de altura para o T longo. A imagem de ambos microdispositivos PDMS/vidro é apresentada na Figura 15.

Figura 15: Dispositivos microfluídicos PDMS/vidro construídos e utilizados na pesquisa. (A) Dispositivo de focalização hidrodinâmica (T simples) e (B) Dispositivo de focalização hidrodinâmica (T longo). Fonte: Do autor.



2.2.2 Ensaios de Fluorescência

Os microdispositivos foram também avaliados quanto à sua extensão de mistura, através de ensaios de fluorescência. Para esta análise, o canal de entrada central foi preenchido com sulforodamina B a 0,1 mM e focalizado hidrodinamicamente por água ultra purificada nos canais de entrada laterais. As vazões volumétricas aplicadas foram de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ na corrente central ($Q_{\text{rodaminab}}$) e 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ na soma das correntes laterais ($Q_{\text{água}}$).

O índice de mistura é calculado com base na intensidade de pixels através da secção transversal de uma imagem que apresente o efeito da mistura. Esta imagem foi capturada de um microdispositivo através de um microscópio invertido e analisada por ImageJ, a qual é transformada em escala de cinza para a obtenção dos pixels, estes que serão proporcionais a concentração do corante (ANSARI, 2009;PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017). Para dar início, é realizado o cálculo da variância (Equação 1), o qual é determinado em uma secção transversal do canal e perpendicular à direção do fluxo e está baseado na intensidade de fluorescência.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(ci - \bar{c}m)^2}{N}} \quad (1)$$

Para cálculo da variância, c_i é a intensidade de fluorescência em um ponto i , \bar{c}_m é a intensidade de fluorescência média e N é o número de pontos da amostragem dentro da secção transversal do microcanal. Na sequência, a eficiência de mistura foi avaliada através do índice de mistura (M) (Equação 2).

$$M = 1 - \sqrt{\frac{\sigma^2}{\sigma_{max}^2}} \quad (2)$$

Para cálculo do índice de mistura, como já sabemos σ é a variância e σ_{max} é a variância máxima em relação ao intervalo de dados. Quando o resultado do índice de mistura é $M=0$, isso indica uma situação completamente não misturada e para $M=1$ têm-se uma mistura completa. Dessa forma, os dois microdispositivos estudados, foram avaliados quanto ao índice de mistura e os cálculos foram feitos em duas regiões distintas do microcanal, na entrada do microdispositivo (região de focalização hidrodinâmica) e no final do canal de saída, para melhor compreensão dos efeitos de mistura.

2.2.3 Produção de Nanopartículas de Peptídeos via Rota de Síntese Química

O processo de formação de nanopartículas baseadas em peptídeos foi conduzido, em diferentes temperaturas, via DIC/NHS polimerização em fluxo contínuo de aminoácidos, por meio da utilização de dispositivos microfluídicos. Para tal, a obtenção das nanopartículas peptídicas em sistema microfluídico foi baseada em regime contínuo de focalização hidrodinâmica, a qual consiste em uma corrente central composta por um agente de acoplamento à base de carbodimida (DIC) em álcool isopropílico que é focalizado hidrodinamicamente por duas correntes laterais de solução de aminoácido (Arg) e (NHS) em tampão HEPES. O NHS é solubilizado junto a Arg e ambos são preparados na mesma concentração. O processo para a formação de nanopartículas foi monitorado em microscópio invertido Nikon, modelo ECLIPSE Ti-U, com o emprego de bombas seringas, modelo PHD2000 (Infuse/Withdraw), da Harvard Apparatus

Para a produção das nanopartículas peptídicas foi avaliado o efeito da relação molar entre Arg e DIC ($R_{Arg/DIC}$). Primeiramente, estudos foram feitos com

base na variação de ($R_{\text{Arg/DIC}}$) entre 0,25 e 25 e na sequência, avaliou-se a concentração total de Arg/DIC no sistema. Estes experimentos foram realizados na ausência de NHS, visto que a influência deste no processo de síntese é avaliada em outro ensaio (Anexo I). A partir dos melhores resultados encontrados em relação às propriedades físico-químicas, novos estudos foram realizados a fim de otimizar o processo de produção de nanopartículas peptídicas.

Para a caracterização das nanopartículas, foram produzidas nas $R_{\text{Arg/DIC}}$ de 0,25, 5 e 2,5 nas temperaturas de 15, 37 e 70°C a fim de avaliar a influência que o excesso de DIC e maiores temperaturas exercem sobre o processo de síntese. Estes ensaios foram processados na presença de NHS. Estas nanopartículas foram então comparadas ao processo de síntese convencional bulk, nas mesmas condições.

No processo *bulk* as nanopartículas foram sintetizadas em um balão de fundo redondo durante 24 horas, nas mesmas condições de concentração utilizadas em microfluídica. O processo ocorreu em um tanque de agitação com aquecimento. Tanto para o sistema em *bulk* quanto microfluídica, as nanopartículas formadas foram armazenadas à -80°C em um ultra freezer e então foram liofilizadas. Na sequência, diferentes técnicas de caracterização foram empregadas para validar o processo de formação de nanopartículas.

2.2.4 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de Peptídeos

2.2.4.1 Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As nanopartículas de peptídeos foram caracterizadas pela técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier utilizando o equipamento Nicolet 6700 (Thermo Fisher Scientific, USA), na faixa de 4000 – 675 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Para a análise, primeiramente as amostras foram congeladas em ultra-freezer a -80°C, em seguida foram liofilizadas. A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica baseada na variação do momento de dipolo de transição de uma ligação química durante a incidência de luz. Cada banda do espectro de infravermelho corresponde a um modo de vibração diferente, oriundo da variação do momento de dipolo de uma

ligação específica. Como as bandas de cada espectro são características para cada ligação química, é possível, a partir do número de onda e formato da banda, identificar a ligação química que deu origem ao sinal. Desse modo, a espectroscopia na região do infravermelho permite que seja feita uma análise qualitativa a partir da determinação das principais ligações química e conseqüentemente os principais grupos funcionais do analito.

2.2.4.2 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS)

Análises de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x foram realizadas no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) sob supervisão da Dr. Ângela de Albuquerque Teixeira Neto. Os experimentos em XPS foram realizados em um equipamento K-Alpha (Thermo Scientific) com uma fonte de raios-X Al-K α (1486,6 eV). A área investigada era aproximadamente circular (aproximadamente 300 μ m de diâmetro) e três áreas diferentes de cada amostra foram examinadas. Foram acumuladas 10 varreduras para cada elemento. Os picos foram então deconvoluídos usando o software Advantage (Thermo Scientific). Para análise, as amostras foram preparadas na forma de um fino filme sob vácuo e então, permaneceram 24h no nitrogênio.

O XPS é uma técnica aplicada na caracterização de superfícies, utilizada em uma ampla gama de materiais, fornecendo informações sobre o estado químico da superfície do material. A análise é realizada em alto vácuo, através da excitação da superfície da amostra por raios-x de baixa energia, resultando na emissão de fotoelétrons. Na sequência, um analisador de energia de elétrons é usado para medir a energia desses fotoelétrons emitidos e, então, a energia dos elétrons é característica dos elementos que se encontram na amostra, o que torna possível a identificação da composição química da superfície (BAER; ENGELHARD, 2010; VENEZIA, 2003).

2.2.4.3 Espectrometria de massa

Nanopartículas peptídicas foram analisadas por espectrometria de massa no Centro de Química de Proteínas (CPQ) da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto sob supervisão do Prof. Dr. José César Rosa. Os ensaios foram conduzidos em electrospray Q-TOF Ultima (Waters, Manchester, UK). As amostras foram infundidas via bomba tipo seringa (Harvard Apparatus) na razão de 500 nL/min através de uma fonte de ionização contendo um capilar de sílica de 20µm diâmetro interno sob 3.5 kVolts, 100 °C cone voltagem em um solvente contendo 5% formic, 60% metanol. Após tratamento com os solventes, a amostra passou por uma resina POROS R2 em pH ácido. Os espectros de massa foram coletados por 1 min (1 scan/s) na faixa de 50 a 2000 u.m.a.

A espectrometria de massa (do inglês, *mass spectrometry* - MS) é uma técnica analítica, na qual moléculas orgânicas de uma amostra são convertidas em espécies iônicas na fase gasosa, que são subsequentemente detectadas de acordo com sua razão, massa (m) sobre carga (z), m/z.

Entre as estratégias utilizadas para conversão de moléculas orgânicas em íons na fase gasosa, destaca-se a ionização por electrospray. Após a ionização, os íons são acelerados por um campo elétrico conhecido até o analisador. Entre os analisadores utilizados em espectrometria de massa destaca-se aquele que avalia o tempo de voo (do inglês, *time of flight* - TOF). A aceleração promovida pelo campo elétrico é responsável por equalizar a energia cinética dos íons de diferentes razões m/z. Em seguida, mede-se o tempo que os íons levam para percorrer uma distância conhecida até colidir com o detector. As velocidades dos íons dependem da razão m/z, de modo que os íons de maiores massas molares são mais lentos.

3 RESULTADOS

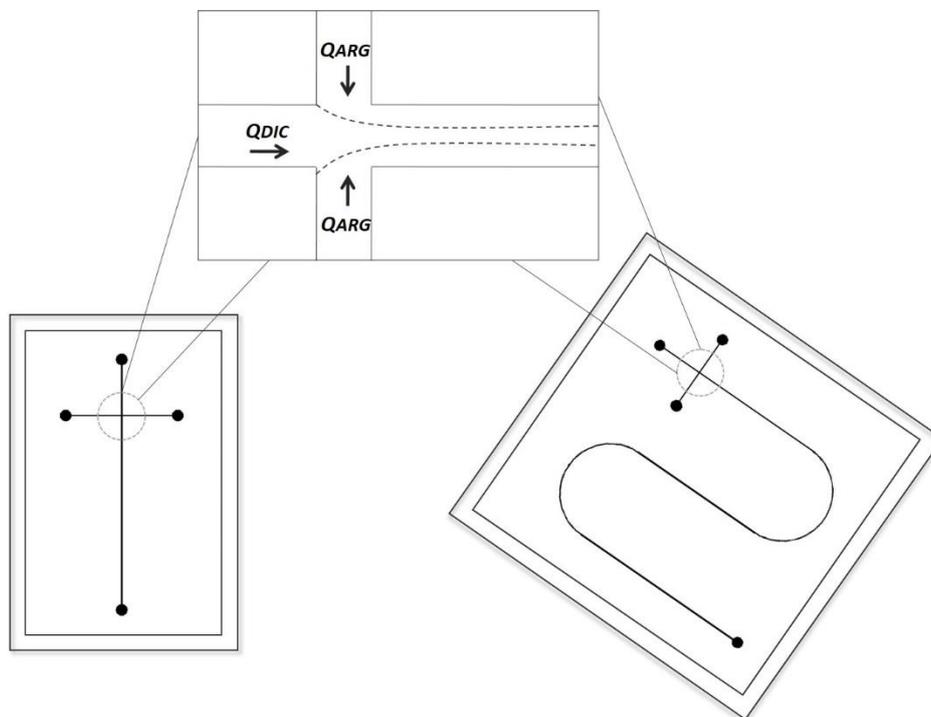
3.1 Avaliação do Dispositivo Microfluídico

O processo de formação de nanopartículas em microfluídica foi bastante explorado em sistemas de focalização hidrodinâmica, já que essa é uma das geometrias comumente utilizadas em processos de síntese. Por essa razão, visto se tratar de um dos primeiros trabalhos que visam à investigação do processo de síntese de nanopartículas peptídicas por meio de sistemas microfluídicos, optou-se por utilizar a mesma geometria de focalização hidrodinâmica e assim, avaliar seus efeitos na produção das nanopartículas.

Para tal, dois diferentes dispositivos microfluídicos de PDMS/vidro foram estudados, o Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica no formato T simples (DFHT) com 34 mm de comprimento e o Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica no formato T longo (DFHTL) com 145 mm de comprimento (Figura 16). Como os microdispositivos foram construídos baseados na mesma geometria, se diferem apenas em relação à altura e o comprimento total do microcanal. A investigação foi conduzida com base na influência que essa diferença entre os microdispositivos oferece sobre o processo de síntese e, assim, escolher a melhor configuração para a produção das nanopartículas.

Para os estudos envolvendo a síntese de nanopartículas peptídicas, optou-se por utilizar N, N'- Diisopropilcarbodiimida (DIC) como agente de acoplamento, já que o mesmo é frequentemente reportado na literatura e eficaz quando se trata de síntese peptídica (MONTALBETTI; FALQUE, 2005). Por essa razão, o sistema consiste em uma corrente central de agente de acoplamento (DIC) a qual é focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais do aminoácido (Arg). As condições de processamento consistem em uma vazão volumétrica na corrente central (Q_{DIC}) de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ e nas correntes laterais uma vazão volumétrica total (Q_{Arg}) de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, resultando em uma vazão total do sistema (Q_T) de 180 $\mu\text{L}/\text{min}$. A imagem representativa dos microdispositivos e a composição das correntes aplicadas para a produção de nanopartículas peptídicas é apresentada na Figura 16.

Figura 16: Diagrama esquemático das correntes empregadas em processo microfluídico em Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica no formato T simples (DFHT) com altura de $50\mu\text{m}$ e Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica no formato T longo (DFHTL) com altura de $90\mu\text{m}$, para produção de nanopartículas peptídicas. O esquema apresenta a nomenclatura utilizada para referenciar a vazão das correntes laterais de arginina (Q_{ARG}) de $150\mu\text{L}/\text{min}$ e a vazão da corrente central de agente de acoplamento (Q_{DIC}) de $30\mu\text{L}/\text{min}$. Fonte: Do autor.



A diferença existente entre os microdispositivos em relação à altura pode influenciar de forma considerável no processo de síntese das nanopartículas. Isso ocorre devido ao fato que essa diferença de altura proporciona diferentes velocidades de escoamento nos microdispositivos e estas podem influir nas características físico-químicas das nanopartículas.

3.1.1 Velocidade de Escoamento

Para calcular a velocidade de escoamento, levou-se em consideração que a vazão volumétrica total do sistema pode ser dada por (ILIESCU et al., 2014).

$$Q_T = v_0 w_0 h \quad (3)$$

onde, Q_T é a vazão volumétrica total do sistema, v_0 é a velocidade de escoamento e w_0 e h são, respectivamente, a largura e altura do microdispositivo.

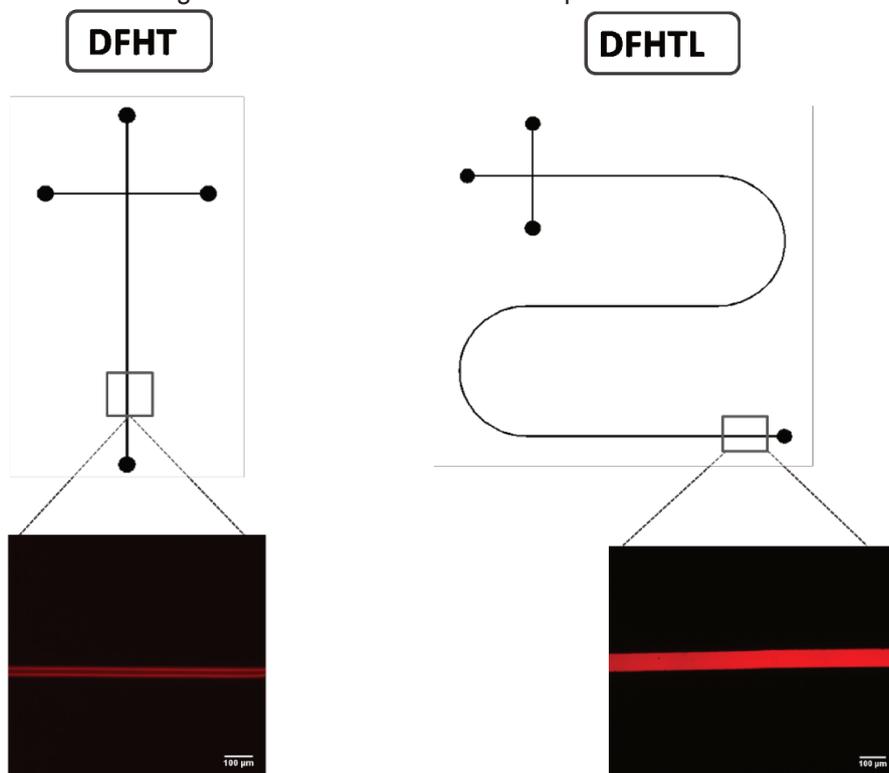
Logo, sabe-se que em ambos os microdispositivos a largura do canal (w_0) é 140 μm (0,14 mm) e a vazão volumétrica total (Q_T) é 180 $\mu\text{L}/\text{min}$ (3 mm^3/s). Para o DFHT, a altura do microcanal (h) é 50 μm (0,05 mm), o que leva a uma velocidade de escoamento de aproximadamente $v_0 = 428 \text{ mm/s}$. Já para o microdispositivo DFHTL, a altura do microcanal (h) equivale a 90 μm (0,09 mm), assim, apresenta uma velocidade de escoamento de aproximadamente $v_0 = 238 \text{ mm/s}$.

A diferença apresentada entre ambos os microdispositivos em relação à velocidade de escoamento leva diretamente a uma variação do tempo de residência, o qual está relacionado ao comprimento do microcanal pela velocidade de escoamento. Para o DFHT, o tempo de residência é aproximadamente 80 ms e o DFHTL é aproximadamente 600 ms. Dessa forma, a velocidade de escoamento passa a ser um fator importante quando se trata da escolha do microdispositivo a ser utilizado. Pode-se perceber que uma menor velocidade de escoamento conduz a um maior tempo de residência, ou seja, maior será o tempo de contato entre os fluxos de fluidos, o que contribui para um processo de mistura mais eficiente e potencializa o processo de síntese de nanopartículas.

3.1.2 Caracterização da Mistura

Simultaneamente a estas análises, ensaios de fluorescência foram conduzidos a fim de se obter o índice de mistura, avaliar a extensão do processo de mistura e auxiliar na validação do microdispositivo que melhor contribuiu para a produção de nanopartículas peptídicas. Este ensaio consiste em uma análise do índice de mistura (M) dos respectivos microdispositivos e a sua metodologia está descrita no (Subitem 3.2.1.1). Os cálculos para determinação do índice de mistura foram realizados em uma região específica do microcanal, no final do canal de saída. Ensaios de fluorescência para determinar o índice de mistura são apresentados na Figura 17.

Figura 17: Ensaios de fluorescência para investigar o índice de mistura de uma corrente central com 0,1 mM de sulforodamina B focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais aquosas. Foram explorados dois microdispositivos: T – Simples e T – longo e as imagens de microscopia foram tiradas nos lugares indicados pelas linhas tracejadas e foram tratadas em ImageJ. A barra de escala é de 100 μm . Fonte: Do autor.



As questões levantadas acerca do escoamento de fluidos em microcanais são também aplicadas aos ensaios de fluorescência. Isso ocorre porque ambas as análises envolvem a mistura de fluidos durante o escoamento. Sabe-se que o principal responsável pela mistura é o processo de difusão molecular, visto que as condições de processamento para a produção de nanopartículas peptídicas envolvem o regime laminar e baixo número de Peclet (ATENCIA; BEEBE, 2005; CAPRETTO et al., 2013).

O processo de difusão se dá pelo contato dos fluidos entre si, permitindo que a concentração dos solutos difunda-se no meio, através do movimento browniano, alcançando uma concentração média constante no microcanal. Para que o processo seja eficiente, um tempo considerável e um maior comprimento do canal são fatores que contribuem positivamente (ALAM; AFZAL; KIM, 2013; BEEBE; MENSING; WALKER, 2002).

De acordo com a Figura 17, observa-se que o DFHTL apresenta maior intensidade de fluorescência quando comparado ao DFHT, o que está associada a um maior efeito de mistura entre os fluidos. Isto ocorre quando as moléculas

de corante se difundem nas correntes de água, proporcionando a mistura e assim, a intensidade de fluorescência se torna uniforme no microcanal. Isto pode estar relacionado ao comprimento do microcanal, pois o maior comprimento contribui para um efetivo processo de difusão, devido a um aumento do tempo de residência.

Para melhor entender o processo de mistura, deve-se levar em consideração o comportamento de fluidos. Quando estes são colocados em contato, o processo de difusão está apenas começando, ou seja, os fluxos de fluidos estão em contato, porém a mistura entre eles ainda não se deu por completa. Quando se está nessa condição, mesmo no final do microcanal, que é o caso do DFHT, observa-se que o corante está próximo apenas das paredes do microcanal, deixando assim, o meio livre. Porém, o contrário é observado no DFHTL, o qual não apresenta essa divisão de correntes no microcanal, presumindo que houve um melhor processo de mistura. Para melhor compreendermos os resultados, o cálculo do índice de mistura é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Índice de Mistura em diferentes microdispositivos.

Microdispositivo	Comprimento microcanal (nm)	Índice de mistura (M) - Saída microcanal
T – Simples (DFHT)	34	0,41
T – Longo (DFHTL)	145	0,72

Os resultados apresentados do índice de mistura (Tabela 1) confirmam o que foi apresentado nas imagens de microscopia. Para o DFHT, a presença de uma divisão de correntes entre os fluxos de fluidos, conduz a uma mistura incompleta e assim, com o (M) de 0,41, confirmando que o microdispositivo não é eficiente para a produção de nanopartículas. O contrário é observado no DFHTL, o qual pelas imagens de microscopia não apresenta essa divisão e o (M) encontrado é de 0,72.

Os ensaios de avaliação dos microdispositivos se deram em torno da influência das suas dimensões e da capacidade de mistura de fluidos. Sendo assim, os resultados encontrados de índice de mistura confirmam o que já era esperado pela análise de velocidade de escoamento. Para ser utilizado como microdispositivo para o processo de síntese de nanopartículas peptídicas, o

DFHTL apresentou um melhor desempenho e possui uma configuração que auxilia e potencializa a produção de nanopartículas.

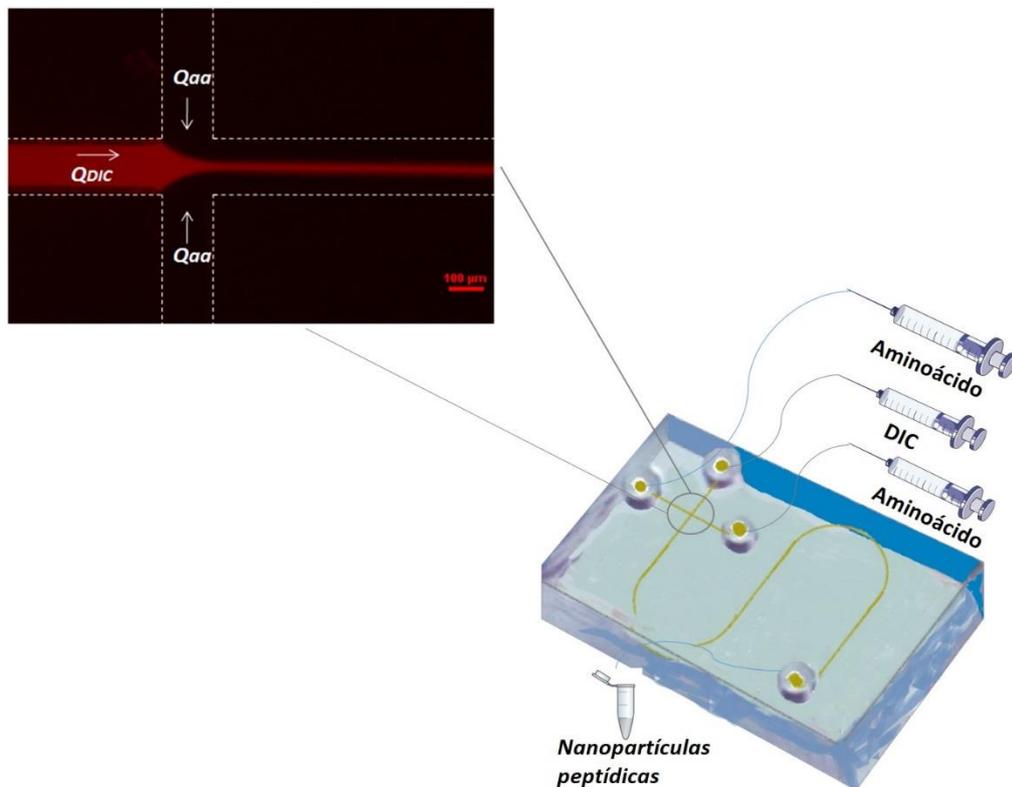
Isso se deve principalmente em razão da sua configuração, pois o DFHTL possui uma altura maior, o que leva diretamente a uma menor velocidade de escoamento quando comparado ao DFHT. Além desse fator, o DFHTL tem um maior comprimento, permitindo que se tenha um maior tempo de residência. Essas características permitem que o processo de mistura seja mais eficiente, pois uma menor velocidade de escoamento indica que o processo de mistura ocorrerá predominantemente por difusão molecular.

Sabe-se que quanto maior o tempo de contato entre os fluxos de fluidos, mais eficiente se torna o processo de mistura entre esses. Isso pode ser visto claramente no DFHTL, pois a diferença de tempo de residência entre ambos é visível. E esse maior tempo de contato é que determina o resultado do ensaio de fluorescência, pois ter um maior comprimento de microcanal faz com que o processo de mistura seja eficiente e assim, proporciona um ambiente ideal para a síntese de nanopartículas peptídicas através do processo de reticulação química entre Arg/DIC.

3.2 Síntese de nanopartículas peptídicas via sistemas microfluídicos

A síntese de nanopartículas baseadas em peptídeos por meio de sistemas microfluídicos, ocorreu com base nas melhores condições de processo avaliadas (Anexo I). A síntese das nanopartículas ocorreu através da reação de polimerização da Arg via DIC/NHS em fluxo contínuo, a qual foi solubilizada em tampão HEPES e pH 7 em DFHTL. A configuração do processo opera com uma corrente central a uma vazão volumétrica (Q_{DIC}) de $30\mu\text{L}/\text{min}$ focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais, em uma soma das vazões volumétricas (Q_{Arg}) de $150\mu\text{L}/\text{min}$. O processo de síntese no microdispositivo DFHTL é apresentado na Figura 18.

Figura 18: Sistema microfluídico de focalização hidrodinâmica para a síntese de nanopartículas peptídicas. A corrente central (Q_{DIC}) é preenchida com o agente de acoplamento DIC a 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ e as correntes laterais (Q_{Arg}) são preenchidas com o aminoácido Arg em um total de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. O processo de síntese é realizado em microdispositivo DFHTL. Fonte: Do autor.



Dentre as análises iniciais realizadas, as melhores condições de produção de nanopartículas peptídicas encontradas, em termos de propriedades físico-químicas, foi para ($R_{\text{Arg}/\text{DIC}}$) de 5. Mesmo para os menores valores de ($R_{\text{Arg}/\text{DIC}}$), os quais apresentam maiores valores de diâmetro e PDI, apenas a técnica do DLS não é suficiente para afirmar se o processo de reticulação química está ocorrendo em maior intensidade e conseqüentemente, potencializando a síntese de nanopartículas peptídicas. Dessa forma, as nanopartículas foram produzidas nas $R_{\text{Arg}/\text{DIC}}$ de 0,25, 5 e 2,5 em 15, 37 e 70°C por meio de processo convencional *bulk* e sistemas microfluídicos e então, caracterizadas por técnicas de espectrometria e espectroscopia.

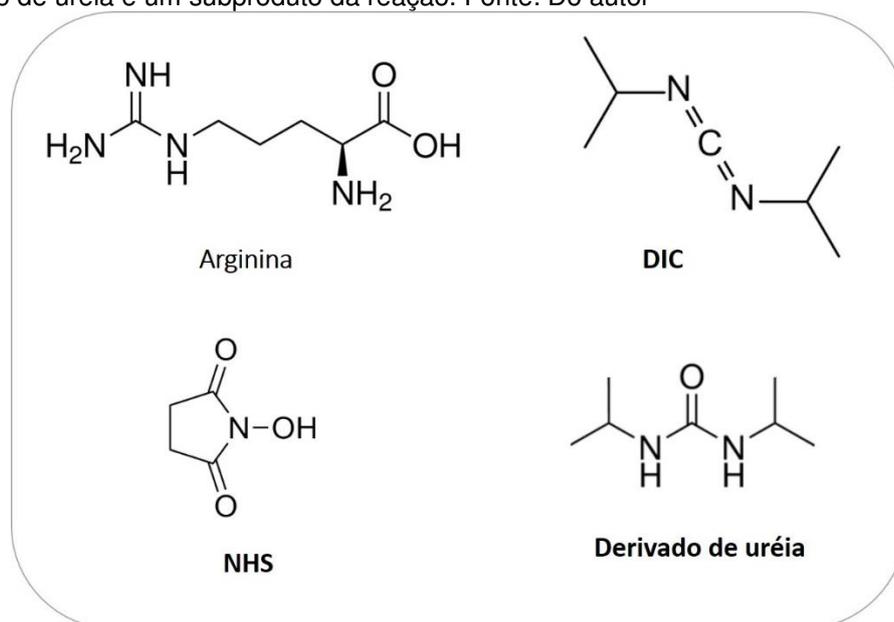
3.2.1 Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As nanopartículas peptídicas foram analisadas por espectrometria do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Esta técnica consiste em uma medida do comprimento de onda e intensidade de absorção da radiação

eletromagnética na região do infravermelho, sendo comumente aplicada para polipeptídeos e proteínas. A realização desta medida ocorre devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em razão de um processo de vibração molecular e através deste, é possível identificar os grupos funcionais, os tipos de vibração e as conformações moleculares (KONG; YU, 2007; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008).

A técnica de FT-IR foi empregada com intuito de validar o processo de síntese de nanopartículas peptídicas. Trata-se da realização de uma análise qualitativa, capaz de identificar as ligações químicas presentes na amostra. Para realizar esta análise, deve-se primeiramente identificar a composição química dos materiais que constituem as nanopartículas e também, o subproduto da reação. Os componentes do processo de síntese de nanopartículas peptídicas são apresentados na Figura 19.

Figura 19: Reagentes e subprodutos utilizados no processo de síntese de nanopartículas peptídicas. Arginina, DIC e NHS participam ativamente do processo de síntese. O derivado de ureia é um subproduto da reação. Fonte: Do autor

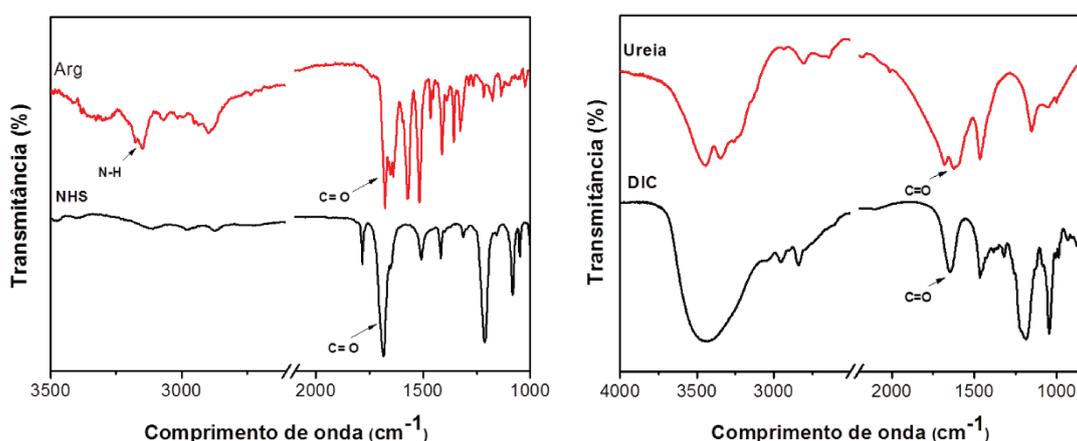


Conhecer a composição química de cada reagente utilizado no processo de síntese auxilia de forma positiva na análise de FT-IR. Através desta técnica é possível identificar os estiramentos que correspondem as respectivas ligações químicas. Neste caso, a ligação química que confirma o processo de síntese de nanopartículas peptídicas é a (-CONH-), referente à ligação amida. Esta ligação está presente na estrutura caso ocorra à formação de um peptídeo ou pela presença do derivado de ureia, já que ambos apresentam a ligação amida em

sua estrutura. O subproduto desta reação é o próprio derivado de ureia, o qual está presente no produto final a ser analisado, pois não foi possível removê-lo.

Dessa forma, realizou-se análises de FT-IR para os reagentes do processo de síntese e para ureia, na forma de um ensaio controle. Foram caracterizados a Arg e NHS em sua forma livre, já em pó. O DIC foi processado em sistemas microfluídicos junto ao NHS (solubilizado em HEPES), sem a presença de Arg. Quanto ao subproduto da reação de síntese, o derivado de ureia, também conhecido por O-acilisourea, não foi analisado, pois não foi possível separá-lo da amostra final de nanopartículas. Porém, uma análise da ureia, a qual apresenta uma estrutura semelhante ao intermediário O-acilisourea, foi realizada. Os componentes do processo de síntese de nanopartículas e ureia são apresentados na Figura 20.

Figura 20: Espectros de absorção na região do infravermelho dos controles: reagente de síntese e ureia. (A) Espectros referentes a Arg e NHS e (B) Espectros referentes ao DIC e ureia.



Os espectros de absorção da região do infravermelho mostram comprimentos de onda característicos de ligações químicas que estão presentes nas estruturas dos reagentes utilizados na síntese de nanopartículas. O espectro referente a Arg apresenta comprimento de onda em torno de $3350 - 3150 \text{ cm}^{-1}$ que é característico do estiramento N-H. Ambos os reagentes e a ureia apresentaram vibrações na região equivalente ao estiramento C=O, que corresponde a uma região conhecida por Amida I. Esta região equivale ao comprimento de onda de $1680 - 1630 \text{ cm}^{-1}$ (KONG; YU, 2007).

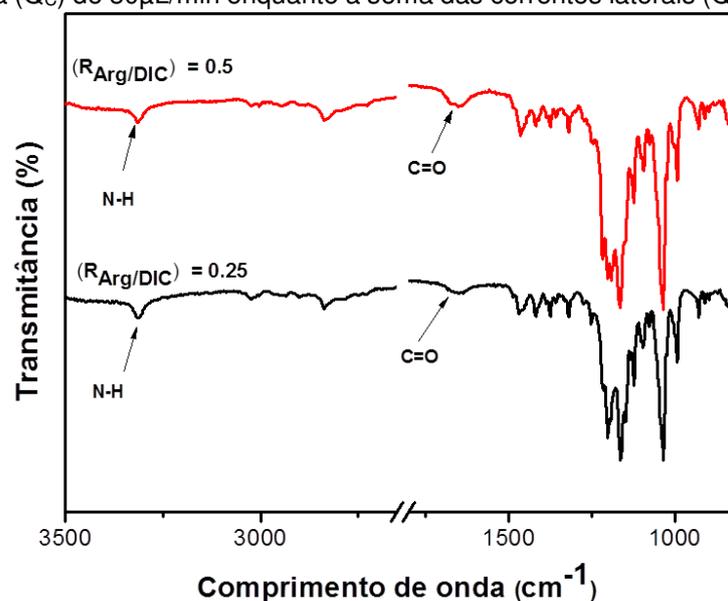
Trabalhos reportados na literatura relatam a presença de ligação amida característica da união entre dois aminoácidos quando esta apresenta

comprimento de onda na região de 1570-1480 cm^{-1} (HUA et al., 2016; KONG; YU, 2007; MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008). Esta região é conhecida por Amida II, ou seja, a sua vibração é referente ao estiramento N-H, do nitrogênio da ligação amida ligado diretamente a um hidrogênio. De acordo com a estrutura dos reagentes e da ureia, observa-se que somente o NHS e a ureia apresentam ligação amida na estrutura. Porém, no caso do NHS, o nitrogênio da amida se liga diretamente em um grupamento hidroxila e assim, este não apresenta vibração na região de amida II. A ureia caracterizada nesta análise apresenta em sua estrutura uma amida primária, na qual o nitrogênio se liga diretamente a dois hidrogênios e assim, esta irá apresentar vibração somente na região de amida I. Essas condições podem ser vistas nos espectros (Figura 20).

Com relação ao subproduto desta reação, o derivado de ureia (Figura 19), o qual apresenta uma amida secundária em sua estrutura, ou seja, ligada diretamente a um hidrogênio, irá apresentar vibrações na região de Amida II. Já em relação a região de Amida I, a vibração está relacionada ao estiramento C=O da carbonila (GALLAGHER, 1997). Assim, os reagentes de síntese e a ureia apresentam vibrações na região Amida I, porque apresentam estas ligações em suas estruturas, exceto o DIC. Como este não apresenta essa ligação amida na estrutura e foi processado junto ao NHS, este pode ser responsável pela presença da ligação. Sabe-se que o DIC quando em contato com a água pode-se degradar e levar a formação do derivado de ureia, o qual apresenta vibração na região de Amida II. Como essa vibração não é visível no espectro (Figura 20), considera-se que nas condições de processamento controle do DIC, a degradação ocorra em quantidade irrisória, assim a vibração do espectro equivale principalmente a carbonila do NHS.

Na sequência, após uma melhor compreensão da estrutura química dos reagentes de síntese, são apresentados os espectros referentes a duas condições distintas de $R_{\text{Arg/DIC}}$ de 0,25 e 5 à 15°C. O processo de síntese ocorreu a essa temperatura visto que o trabalho reportado na literatura referente à polimerização via EDC/NHS de poliácido glutâmico (PGA) e polilisina (PLL) a 25°C ocorria de forma tão rápida e descontrolada, que aderiram à síntese em um banho de gelo (HUA et al., 2016). Os respectivos espectros das nanopartículas para $R_{\text{Arg/DIC}}$ de 0,25 e 5 são apresentados na Figura 21.

Figura 21: Espectros de absorção na região do infravermelho nanopartículas peptídicas para ($R_{Arg/DIC}$) de 0,25 e 5 produzidas a 15°C em DFHTL. A corrente central foi processada a uma (Q_C) de 30 μ L/min enquanto a soma das correntes laterais (Q_L) de 150 μ L/min.



Os espectros da Figura 21 mostram a presença de ligações químicas importantes quando se trata da análise das diferentes $R_{Arg/DIC}$. Em ambos os espectros, se destaca a presença da ligação N-H para o comprimento de onda em aproximadamente 3312 cm^{-1} e a ligação C=O que se encontra em 1648 cm^{-1} (MOVASAGHI; REHMAN; REHMAN, 2008). As outras bandas presentes no infravermelho são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2: Comprimento de onda das bandas do infravermelho e suas respectivas atribuições.

Frequência Aprox. cm^{-1}	($R_{Arg/DIC}$) = 5	($R_{Arg/DIC}$) = 0.25	Ureia	DIC	Atribuição
3500 - 3400	-	-	3442,2	3436,1	N-H/OH
3400-3300	3313,9	3311,3	-	-	N-H
2900-2800	2836,2	2836,6	-	-	NH_3^+
2400-2100	-	-	2472,2	2106,2	N-H/OH
1700-1600	1651,6	1647,5	1678,3	1647,2	C=O
1500-1400	1420,6	1419,3	1465,0	-	$\text{COO}^- / \text{CH}_2$
1400-1300	1319,9	1320,0	-	1319,6	C-N

De acordo com os espectros apresentados na Figura 21 e as ligações identificadas na Tabela 3 para as diferentes $R_{Arg/DIC}$ é possível observar a presença do estiramento equivalente a região de Amida I em todos os espectros. Além desta, as vibrações N-H também foram identificadas e estão associados a presença desta ligação nos demais produtos da síntese (DIC, NHS e Arg). Ainda sobre os espectros das $R_{Arg/DIC}$, a ligação referente a 2836 cm^{-1} indica a presença do grupamento NH_3^+ , o qual está associado a presença de arginina livre no produto final, de forma que a reação não foi favorecida.

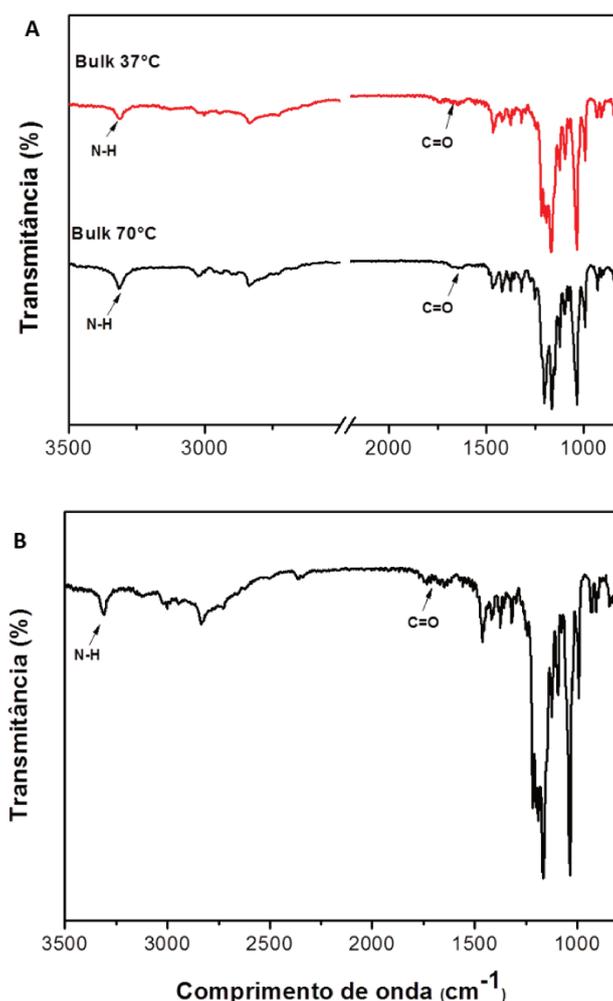
Observa-se que, comparativamente, os espectros das $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 e 5 processados a 15°C não apresentam diferença significativa em termos de vibrações das bandas (Figura 21). Por se tratar de nanopartículas produzidas em diferentes $R_{Arg/DIC}$, as quais se diferem em relação a concentração de DIC, é visto que o excesso empregado deste agente de reticulação ainda não é suficiente para influir nas propriedades das nanopartículas formadas.

Os espectros de absorção na região do infravermelho das $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 e 5 também apresentam os mesmos comprimentos de onda dos espectros referentes aos reagentes de síntese e da ureia. Assim, a região de Amida I mostra que há a presença de ligação amida, embora possa estar associada aos reagentes em suas formas livres. Como não há vibrações na região da Amida II, ainda não pode ser confirmada a formação da ligação peptídica. Além da presença de amina livre (NH_3^+ , vibração entre 2900-2800, Tabela 3) que não participa da reação de síntese.

Assim, para aprimorar o processo de síntese, as nanopartículas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25, por apresentarem maior concentração de DIC, foram produzidas por meio de processo convencional *bulk* a uma temperatura de 37°C . Como nesta metodologia a síntese das nanopartículas permanecem em aquecimento por 24 horas, é esperado, caso as condições de $R_{Arg/DIC}$ sejam ideais, que ocorra a síntese de nanopartículas peptídicas. O sistema foi aquecido em razão da influência da temperatura sobre a cinética de reação (Arrhenius) no processo de síntese (Figura 22).

Seguindo a mesma teoria da influência da temperatura, na sequência, investigou-se a síntese nas mesmas condições de $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 a 70°C em processo *bulk* e em sistemas microfluídicos. Os espectros em diferentes temperaturas são apresentados na Figura 22.

Figura 22: Espectro de absorvância na região do infravermelho para a nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25. (A) Nanopartículas produzidas em processo bulk a 37 e 70°C e (B) Nanopartículas sintetizadas em sistemas microfluídicos a 70°C.



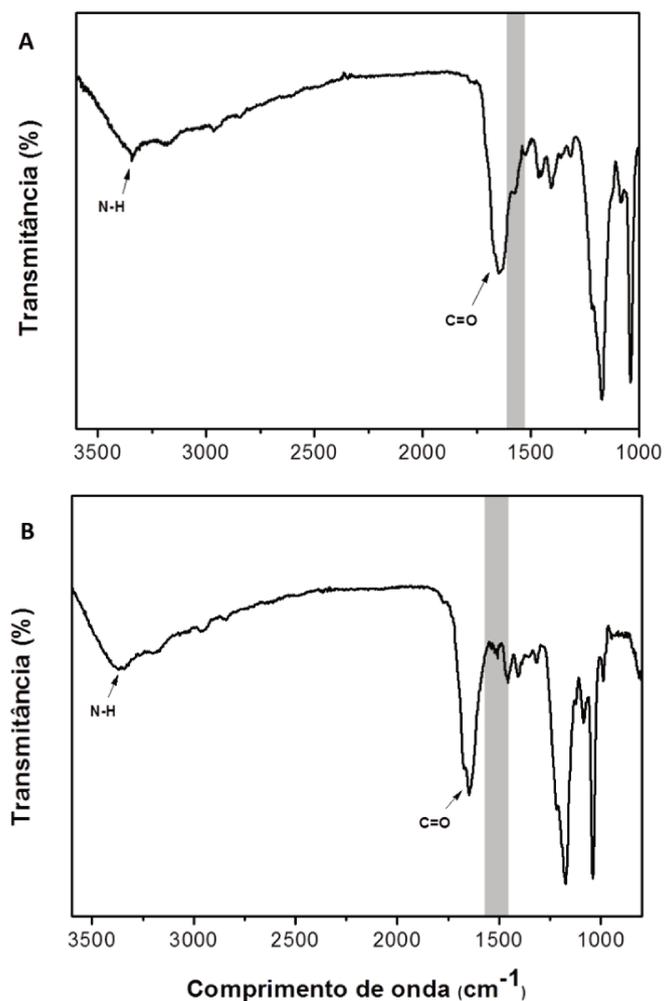
De acordo a Figura 22, observa-se que o processamento em bulk a 37 e 70°C apresentaram espectros similares, com vibrações nos mesmos comprimentos de onda. Em aproximadamente 3315 cm^{-1} há a presença do estiramento N-H e no comprimento de onda em torno de 1650 a 1630 cm^{-1} está presente a região de Amida I. Ambos os espectros apresentaram vibrações relacionadas a presença de arginina livre, referente ao comprimento de onda de $2850 - 2700\text{ cm}^{-1}$. Os espectros dos processamentos realizados em sistemas microfluídicos a 70°C, também apresentam vibrações nos mesmos comprimentos de onda.

Dessa forma, como não há a presença de bandas características da região Amida II nos espectros, isso indica que mesmo elevando a temperatura, e com excesso de DIC na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25, a reação não foi favorecida, confirmando pela presença de arginina livre. Vale ainda ressaltar, que nestas condições de processamento, sem ocorrer a reação química, se houvesse

degradação do DIC, seria identificada a presença da vibração referente a Amida II. Assim, como na Figura 23 não foi identificada a presença da vibração na região de Amida II, conclui-se que o DIC não se degrada de forma significativa.

No intuito de investigar melhores condições reacionais para o processo, ensaios exploratórios foram conduzidos na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 com concentração inicial de DIC a 100mM. Esta nova condição elevou a concentração total do sistema, mantendo as mesmas vazões volumétricas no sistema microfluídico. Estes experimentos foram conduzidos em processo convencional bulk e sistemas microfluídicos, ambos a 70°C. Investigou-se assim, a influência que maiores concentrações de reagentes exercem sobre a síntese. Os espectros de absorção da região do infravermelho para esta reação são apresentados na Figura 23.

Figura 23: Espectro de absorção da região do infravermelho das nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5. (A) Nanopartículas produzidas em processo bulk a 70°C e (B) Nanopartículas produzidas em sistemas microfluídicos na temperatura de 70°C. A área destacada diz respeito a região de Amida II com vibração da ligação (-CONH-).



Os espectros da Figura 23, mostram que na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 há uma maior intensidade das bandas e, este comportamento está inteiramente associado a uma maior concentração dos reagentes utilizados no processo de síntese. No comprimento de onda de aproximadamente 3315 cm^{-1} tem-se a presença do estiramento N-H, em torno de 1645 cm^{-1} há o estiramento C=O da região Amida I e no comprimento de onda de $1570\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ há presença da vibração da ligação (-CONH-) equivalente a região de Amida II.

Nestas condições, há então a presença de ligação amida (-CONH-) e conforme visto anteriormente, a região de Amida II equivale tanto para a ligação peptídica quanto para o derivado de ureia. Sabe-se que em maiores concentrações de DIC, a degradação deste, pode conduzir a uma maior quantidade de derivado de ureia presente ou pode estar presente na forma de um subproduto da reação. Estes espectros diferem dos espectros dos reagentes da síntese e da ureia, o que indica que ligações amidas do tipo (-CONH) estão sendo formadas.

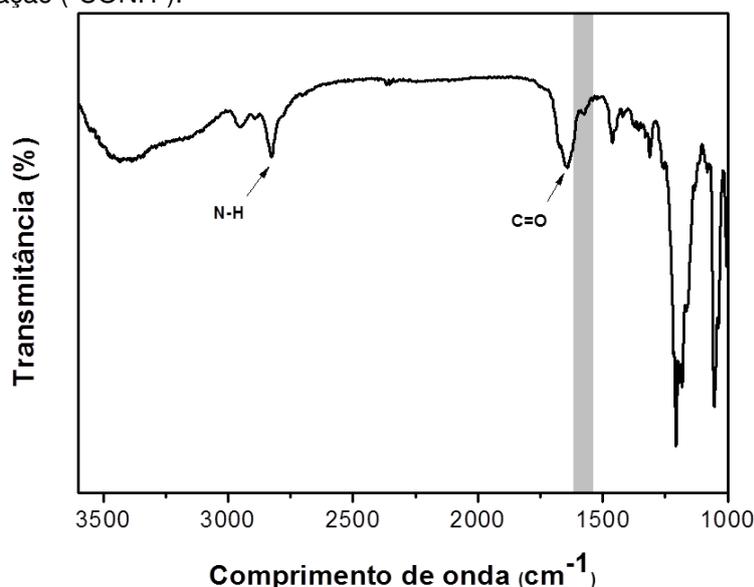
Dessa forma, na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 há a presença de ureia seja pela degradação do DIC ou como subproduto da reação de síntese, mas também pela formação da reação química entre os aminoácidos. Estas condições permitem sintetizar nanopartículas, porém não se sabe o grau de extensão destas, o que torna necessária a caracterização por demais técnicas.

Como as nanopartículas produzidas na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 apresentam maior concentração de reagentes, estas podem apresentar alto diâmetro e polidispersidade. Assim, novas condições de síntese foram moduladas a partir da $R_{Arg/DIC}$ de 0,25, visto que esta apresenta diâmetro médio em torno de 400 nm (Anexo I). Buscou-se promover a síntese de nanopartículas em melhores propriedades físico-químicas, apesar desta $R_{Arg/DIC}$ não apresentar vibração na região de Amida II (Figura 21), novos ensaios foram conduzidos variando as condições de processamento.

As novas condições de síntese foram moduladas a partir da $R_{Arg/DIC}$ de 0,25. Primeiramente, o pH do meio passou de 7 para 9,55, pois nesta situação evita-se que tenha a presença de grupamento amino protonados, assim a Arg presente tende a participar da reação. Quanto ao sistema microfluídico, a corrente central foi processada a uma vazão volumétrica (Q_C) de $10\mu\text{L}/\text{min}$ e a soma das vazões volumétricas das correntes laterais (Q_L) de $50\mu/\text{min}$. Esta nova

condição leva a uma velocidade de escoamento (V_0) de 79,3 mm/s e tempo de residência de 1,82 s (elevado em 3 vezes), para favorecer o processo de síntese. O espectro de absorção das nanopartículas sintetizadas em novas condições de processamento é apresentado na Figura 24.

Figura 24: Espectro de absorção na região do infravermelho para as nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 variando o pH e as condições de vazão volumétrica do processo de síntese via sistemas microfluídicos. A área destacada diz respeito a região de Amida II com vibração da ligação (-CONH-).



De acordo com a Figura 24, observa-se que utilizando $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 alterando apenas o pH do meio e as condições de processamento do sistema microfluídico, o espectro mostra a presença de vibrações que indicam que reação química ocorreu. Estão presentes a região Amida I equivalente ao comprimento de onda de 1640 cm^{-1} e a região de Amida II no comprimento de onda de 1570 cm^{-1} .

O espectro apresenta menor intensidade de bandas, que pode estar relacionada a uma menor concentração dos reagentes de síntese. Nestas condições, há uma maior quantidade de arginina que participa da reação em razão da mudança do pH e as ligações amidas presentes podem estar associadas a síntese das nanopartículas peptídicas e também pela presença de derivado de ureia como subproduto do processo de síntese das nanopartículas ou, a partir da degradação do DIC, apesar que no espectro controle do DIC (Figura 20), o qual foi processado também na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25, e nos espectros da $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 processadas a 70° em microfluídica (Figura 22b), não há sinais de região Amida II, a qual se refere a presença de ureia.

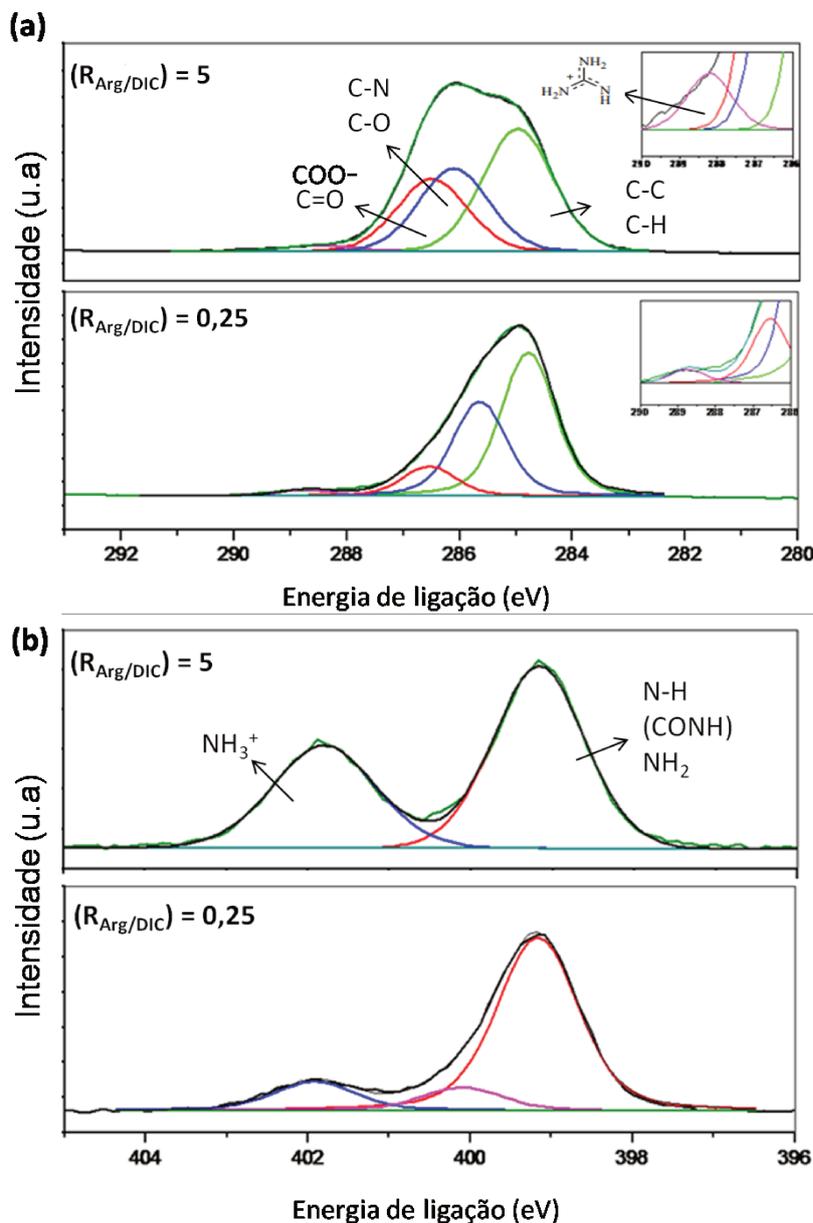
Dessa forma, as novas condições de processamento são viáveis para o processo de síntese, ou seja, uma menor velocidade de escoamento permite um maior tempo de residência do microcanal e, associada a alta temperatura, conduz a síntese de nanopartículas peptídicas. Para confirmar a síntese destas, as nanopartículas devem ser caracterizadas por outras técnicas. Assim, a técnica de XPS foi aplicada a fim de analisar a superfície das nanopartículas e validar a ocorrência da síntese via sistemas microfluídicos.

3.2.2 *Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS)*

As propriedades químicas da superfície das nanopartículas produzidas foram analisadas por XPS em uma análise qualitativa. Esta técnica pode fornecer informações sobre a real composição e estado químico da superfície de materiais em escala nanométrica (BAER; ENGELHARD, 2010). A ligação química que confirma a síntese de peptídeos, conforme mencionado anteriormente é a (-CONH-), a qual pode estar presente no meio representando a síntese em si ou, apenas na forma do derivado de ureia.

Primeiramente, caracterizou-se as nanopartículas nas $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 e 5 a fim de investigar a ocorrência de síntese. Vale ressaltar, que na $R_{Arg/DIC}$ de 5 a concentração de DIC é proporcional a Arg e em $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 a concentração de DIC 20 vezes maior que a concentração de Arg e estas foram sintetizadas a 15°C e processadas nas mesmas condições para análises de FT-IR. Os espectros de XPS referente às nanopartículas peptídicas são apresentados na Figura 25.

Figura 25: Espectros de XPS em alta resolução das nanopartículas peptídicas em duas razões ($R_{Arg/DIC}$) de 5 e 0,25 para: (a) C1s e (b) N1s.



Os espectros de alta resolução apresentam uma caracterização qualitativa da composição química das $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 e 5. Os espectros de C1s (Figura 25a) apresentam a energia de ligação referente ao carbono. Quanto à identificação dos picos referentes às ligações químicas, estes foram baseados na literatura. Os picos em ambos os espectros com energia de ligação 284,8 correspondente aos átomos de C-C/C-H, de 285,9 para C-N/C-O, de 286,4 para C=O/COO⁻ e energia de ligação em 288,5, a qual corresponde ao grupamento guanidino da Arg (HUA et al., 2016; SREENATH et al., 2017; STEVENS et al.,

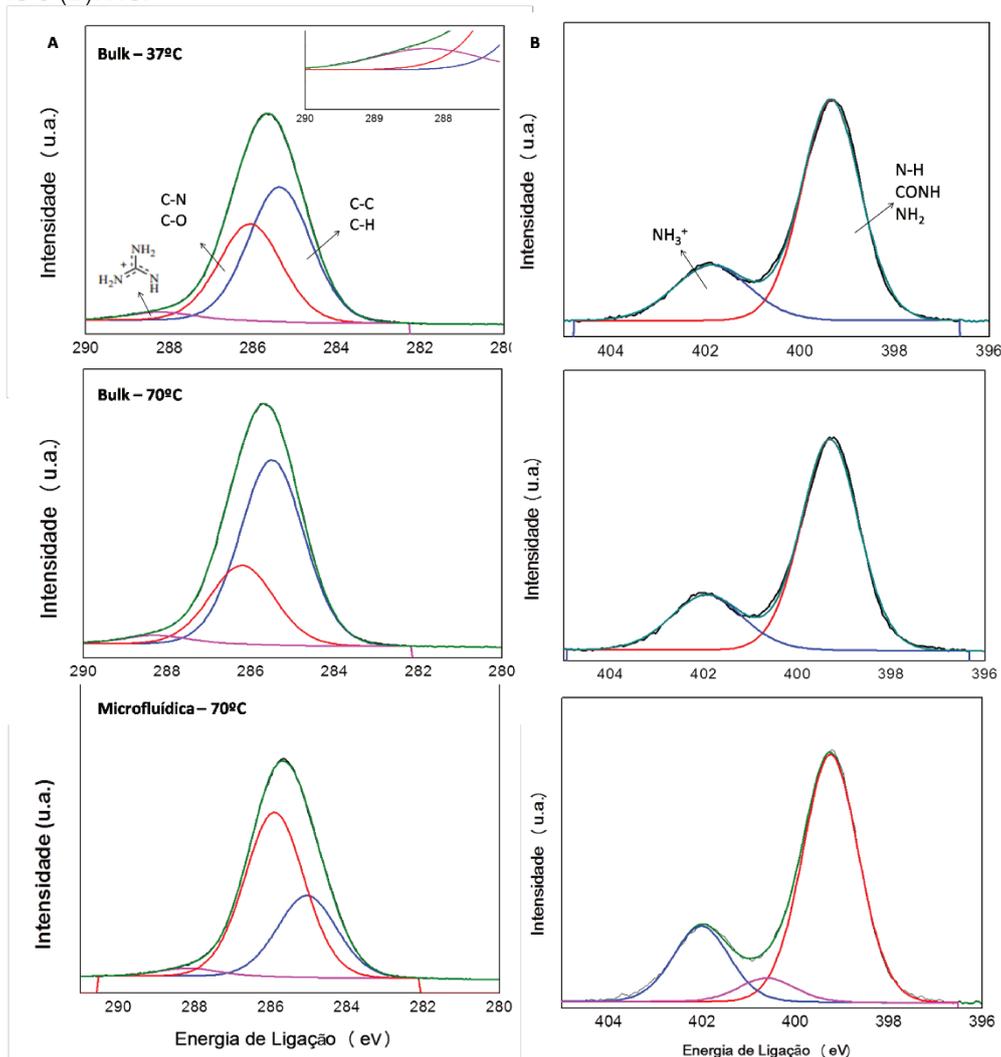
2013). Porém, a ligação referente à ligação peptídica entre os aminoácidos (-CONH-) não é apresentada no espectro. Observa-se que há a presença do átomo C=O que indica a presença dos reagentes NHS e Arg, a qual pode estar em sua forma livre.

Os espectros referentes à N1s (Figura 25b), os quais são referentes ao átomo de nitrogênio, mostram a presença dos grupamentos N-N e NH₂ que estão relacionadas a todos os reagentes do processo de síntese. A energia de ligação em torno de 400 eV pode estar associada há a presença de imina (-N=), a qual se refere a estrutura do DIC (IM et al., 2010; WANG et al., 2013) e está presente devido ao excesso de DIC na R_{Arg/DIC} de 0,25 quando comparado a R_{Arg/DIC} de 5.

Como nos espectros de C1s não há a presença do grupamento -CONH (resultante da reação de polimerização da Arg), esta provavelmente não está influenciando a energia de ligação de 399 eV. Porém, neste mesmo espectro, observa-se que há o grupamento NH₃⁺, isto implica que aminoácidos de arginina livres podem estar presentes no produto final sem participar do processo de síntese.

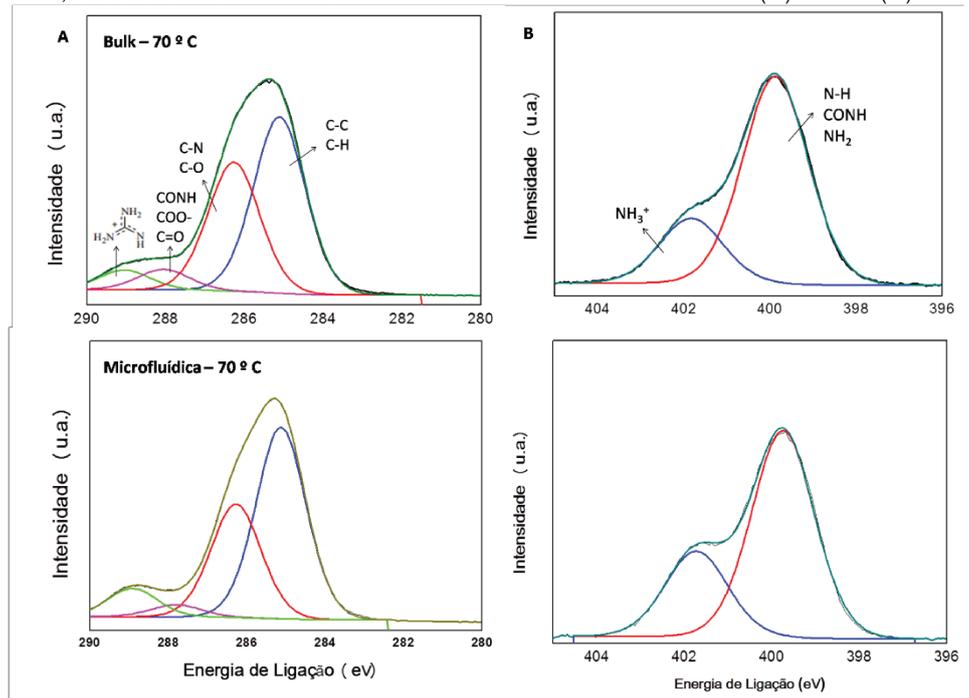
Os resultados apresentados nos espectros C1s e N1s confirmam o que foi apresentado pela caracterização de FT-IR nas mesmas R_{Arg/DIC} investigadas. A ausência de energia de ligação referente a ligação (-CONH-) indica que as condições de R_{Arg/DIC} avaliadas não foram ideais para o processo de síntese de nanopartículas, visto que ambas as técnicas de caracterização mostram a presença de grupamentos NH₃⁺ que indicam que há Arg que não participa do processo de reação. No intuito de promover a síntese de nanopartículas peptídicas, a R_{Arg/DIC} de 0,25, por apresentar maior concentração de DIC, foi sintetizada a 37 e 70°C em processo convencional *bulk* e a 70°C em sistemas microfluídicos afim de avaliar a relação entre temperatura e processo de síntese. Os espectros das nanopartículas sintetizadas na R_{Arg/DIC} de 0,25 a 37 e 70°C são apresentados na Figura 26.

Figura 26: Espectros de XPS em alta resolução de nanopartículas produzidas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 a 37 e 70°C em processo convencional bulk e 70°C em sistemas microfluídicos. (A) C1s e (B) N1s.



Os espectros de alta resolução mostram que tanto para a temperatura de 37°C quanto 70°C, não há presença do grupamento (-CONH-) que confirma que o processo de síntese não ocorreu. Sendo assim, a razão para que a síntese não ocorra de forma expressiva está relacionada as concentrações dos reagentes avaliados, visto que estas não foram ideais para que a síntese ocorra. Dessa forma, ensaios exploratórios foram conduzidos na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 com uma concentração inicial de DIC de 100mM à 70°C, por meio de síntese em *bulk* e microfluídica. Os espectros de C1s e N1s das nanopartículas produzidas na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 à 70°C são apresentados na Figura 27.

Figura 27: Espectros de XPS em alta resolução das nanopartículas produzidas na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 à 70°C em sistemas convencionais bulk e microfluídica. (A) C1s e (B) N1s.



Os espectros das nanopartículas produzidas na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5 em ambas as formas de síntese, bulk e microfluídica, apresentam maiores intensidades dos átomos de C-C/C-H e C-N/C-O em razão da maior concentração de reagentes Arg, DIC e NHS, quando comparadas a Figura 26. Este comportamento é visto também na energia de ligação de 289 eV, referente ao grupo guanidino, visto que nesta situação há uma maior concentração de arginina que na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25, assim, a intensidade da presença dos grupos de sua cadeia lateral aumentam.

As nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 2,5, com excesso de DIC, apresentam uma banda em 288 eV, a qual não estava presente nas outras condições e está relacionada ao grupamento (-CONH). Dessa forma, em associação a temperatura que favorece o processo de síntese, maiores concentrações de reagente também influenciam significativamente.

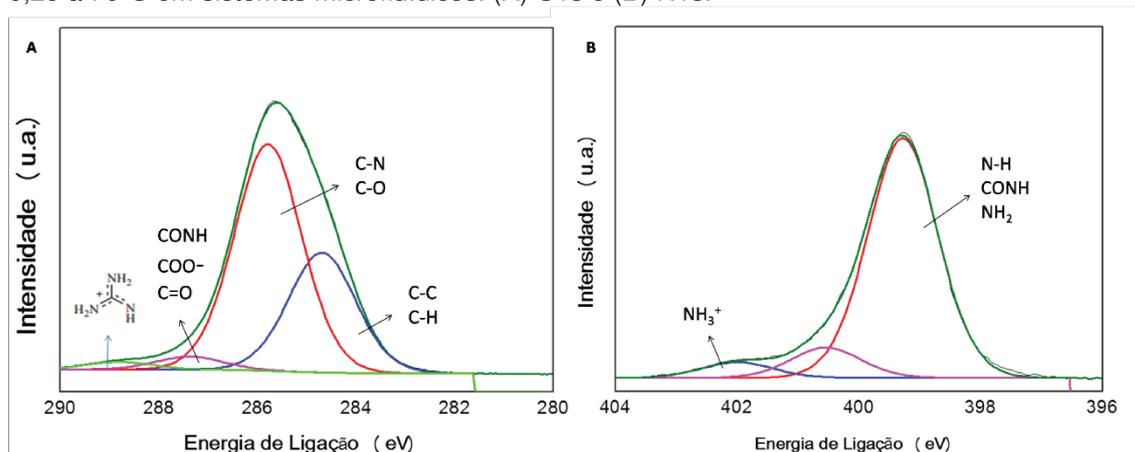
Sabe-se que a ligação amida pode ser proveniente da ligação peptídica entre dois aminoácidos ou do derivado de ureia o qual está presente na amostra na forma de um subproduto da reação ou através da degradação do DIC. Conforme visto na (Figura 26), a $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 a 70° C não apresentou o grupamento (-CONH-), ou seja, nesta condição não houve degradação do DIC

em derivado de ureia, mas agora em se tratando de uma alta concentração de DIC, pode ser que esta degradação ocorra.

Quanto aos espectros de N1s, estes ainda indicam que há presença de Arg livre em sua forma protonada, ou seja, uma parte desta ainda não participa da reação e também que há a presença do grupamento (-CONH-). A energia de ligação de 400,7 eV, equivalente ao DIC não é vista nessa condição por conta da razão entre Arg/DIC que é 2,5, a qual é menor quando comparada a $R_{Arg/DIC}$ de 0,25. Esta ligação é presente quando o excesso de DIC sobressai sobre a Arg e NHS.

Uma nova condição de síntese em $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 à 70°C em sistemas microfluídicos, foi preparada em pH de 9,55 e processada em diferentes vazões, conforme caracterização de FT-IR, a fim aumentar o tempo de residência e assim, avaliar a influência que estas novas condições exercem sobre o processo de síntese. Este ensaio se deu com o objetivo de sintetizar nanopartículas em menores diâmetros, visto que nesta $R_{Arg/DIC}$ há menores concentrações de reagentes. O espectros de C1s e N1s referentes as reação de síntese em $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 são apresentados na Figura 28.

Figura 28: Espectros de alta resolução das nanopartículas sintetizadas na $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 à 70°C em sistemas microfluídicos. (A) C1s e (B) N1s.



Conforme apresentado na Figura 28, ambos os espectros C1s e N1s apresentam a ligação amida (-CONH-). Apesar das nanopartículas desta condição apresentarem a mesma $R_{Arg/DIC}$ do ensaio da (Figura 25 e 26), quando as novas modulações na condição do processo são feitas, é possível levar a formação da ligação peptídica. A alteração no pH foi feita a fim de promover a desprotonação da Arg e fazer com que esta participe da reação, e esse resultado

é confirmado pelo espectro N1s, no qual a intensidade da ligação referente aos grupamentos amino protonados diminui, ou seja, há uma maior quantidade de Arg participando da reação.

Assim, as modulações nas condições de vazão promoveram uma menor velocidade de escoamento e maior tempo de residência no microcanal, os quais associados à alta temperatura, promovem uma eficiente mistura e assim, conduz a uma possível formação de nanopartículas peptídicas. Como nesta mesma condição de $R_{Arg/DIC}$ de 0,25 e processada a 70°C, conforme apresentado na (Figura 26) que mostrou que não houve degradação do DIC, pode-se considerar que a ligação formada no espectro (Figura 28), seja referente a síntese de nanopartículas.

Dessa forma, os processos de síntese por meio de *bulk* e sistemas microfluídicos são capazes de promover a reação química, porém a diferença entre estes está associada à cinética de reação, sendo que em *bulk* é um processo que dura em média 24hs (tempo normalmente utilizado nas metodologias convencionais) ao contrário da microfluídica que consegue realizá-lo em questão de segundos.

Esses resultados indicam que a microfluídica é uma poderosa tecnologia no controle do processo de síntese. Mas, para confirmar efetivamente a síntese de nanopartículas peptídicas via sistemas microfluídicos é necessária a caracterização destas por espectrometria de massa. Assim, na sequência as nanopartículas deveriam ser caracterizadas por análise de massa. Nesta dissertação de mestrado houve a iniciativa de se realizar esta caracterização. No entanto limitações técnicas e disponibilidade de equipamento não levaram ainda a resultados conclusivos. Os resultados preliminares estão apresentados no Anexo II.

4 CONCLUSÃO

A investigação do uso de uma plataforma tecnológica como a microfluídica na produção de potenciais veiculadores de fármacos baseados em peptídeos via reação de polimerização de aminoácidos foi um desafio à parte, visto que trabalhos relacionados são escassos na literatura.

Apesar das dificuldades encontradas para a realização deste trabalho, principalmente relacionadas à técnica de caracterização por espectrometria de massa para confirmação da reação química de síntese, os resultados encontrados mostram a viabilidade do uso de tecnologia microfluídica na reação química de polimerização. A reação química ocorre através do uso de agente de acoplamento DIC e catalisador NHS que promovem a formação da ligação peptídica entre aminoácidos de Arg e derivado de ureia, como subproduto da reação, conduzindo a formação de peptídeos.

Assim, os resultados encontrados indicam que o pH, temperatura, razão molar entre Arg/DIC e principalmente, as condições de processamento em sistemas microfluídicos apresentam influência significativa para a ocorrência da reação de polimerização. Desta forma, as melhores condições encontradas que indicam a presença da ligação amida característica da união entre aminoácidos consistem na $R_{\text{Arg/DIC}}$ de 0,25 em pH de 9,55 e processada a 70°C. Além destas, as melhores condições de processamento estão relacionadas a uma menor velocidade de escoamento e conseqüentemente maior tempo de residência no microcanal.

As caracterizações feitas por FT-IR e XPS indicam a presença da ligação amida (-CONH-) que junto a esta, há também derivado de ureia. Para conhecer o grau de extensão da formação de peptídeos é necessário a caracterização por espectrometria de massa.

Estes resultados indicam o potencial uso de sistemas microfluídicos na síntese de nanopartículas peptídicas e, assim, permite explorar diferentes configurações de sistemas e otimizar o processo de síntese. Em estudos futuros pode-se avaliar a síntese de diferentes aminoácidos, conduzindo a formação de diferentes nanoestruturas e com potenciais aplicação na liberação de fármacos.

1 INTRODUÇÃO

A síntese de nanopartículas baseadas em peptídeos via rota eletrostática, é voltada principalmente para o desenvolvimento de veículos carreadores não-virais para futuras aplicações em terapia gênica. Para a construção desses sistemas de entrega, os polímeros de caráter catiônico são usualmente empregados (WARD; READ; SEYMOUR, 2001). O processo de síntese consiste na formação de poliplexos entre o polímero carregado positivamente e o DNA de carga negativa, por meio de interações eletrostáticas. Assim, estes carreadores são capazes de entregar o material genético no interior das células (ZHANG et al., 2010).

A polilisina (PLL) é um polipeptídeo catiônico com sequência primária do aminoácido Lisina (Lis) e é um dos polipeptídeos comumente utilizados como veículos de entrega em terapia gênica (WARD; READ; SEYMOUR, 2001; ZHANG et al., 2010). O caráter catiônico da PLL ocorre em razão da presença de grupamentos amino em sua estrutura química. Esta característica, permite condensar o DNA por meio de interações eletrostáticas, conduzindo então a formação de complexos, os quais se agregam em diferentes nanoestruturas como, por exemplo, esferas e toroides (TANG; SZOKA, 1997).

Após a complexação, os poliplexos são projetados de forma a possuir carga superficial resultante positiva, o que favorece a interação destes com a membrana celular, carregada negativamente e a consequente internalização, promovendo a transfecção celular e a liberação do material genético no interior das células (LECHARDEUR; VERKMAN; LUKACS, 2005; OPANASOPIT et al., 2011).

Na literatura há alguns trabalhos que reportam a formação de poliplexos entre PLL/DNA em processo Bulk (KATAYOSE; KATAOKA, 1997; LAI; VAN ZANTEN, 2001; LIU et al., 2001; NIU et al., 2015; WARD; READ; SEYMOUR, 2001) que serão explorados neste trabalho como base de comparação. Diversos são os fatores que podem influenciar o tamanho, a estabilidade e a eficiência dos poliplexos, como massa molar, pH do meio e relação N/P entre o

grupamento amino da PLL e o grupo fosfato do DNA (ELDER; EMRICK; JAYARAMAN, 2011; OPANASOPIT et al., 2011).

Nesta fase do projeto, investigou-se a viabilidade da produção de nanopartículas, utilizando a PLL como base de síntese, por meio de rota eletrostática em sistemas microfluídicos de regime contínuo, como potenciais carreadores de ácidos nucleicos com aplicação em terapia gênica. Dessa forma, na seção 4.2.1 foram investigadas as melhores condições para a síntese de poliplexos PLL/DNA em processo *bulk* e na sequência, na seção 4.2.2. foram sintetizadas nanopartículas PLL/DNA em sistemas microfluídicos através das melhores condições encontradas no processo *bulk*.

Mesmo a PLL sendo um polímero biodegradável capaz de condensar o DNA e formar poliplexos estáveis, esta apresenta toxicidade relacionada ao comprimento da sua cadeia de aminoácidos. À medida que aumenta o comprimento da cadeia de PLL, a citotoxicidade também aumenta (MARTIN; RICE, 2007; OPANASOPIT et al., 2011). Assim, na seção 4.2.3 investigou-se a associação de Poliacido glutâmico (PAG) à PLL via interação eletrostática, no intuito de reduzir a citotoxicidade da cadeia de PLL em processo “Bulk” e assim, formar o complexo PLL/PAG. Na sequência, na seção 4.2.4 investigou-se as mesmas condições, porém em sistemas microfluídicos a fim de avaliar a influência da síntese em fluxo contínuo nas propriedades físico-químicas dos poliplexos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os polipeptídeos, polilisina (PLL) de baixa massa molar (que varia entre 4 e 15KDa), poliacido glutâmico (PGA) com massa molar entre (50 e 100KDa) e o tampão HEPES, foram todos adquiridos da empresa (Sigma-Aldrich, EUA). A solução de 3M™ Novec™ EGC 1700 foi adquirida da empresa (3M, EUA).

2.2 Métodos

2.2.1 Amplificação do Plasmídeo

A amplificação e purificação do plasmídeo pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, EUA), DNA codificante para proteína verde fluorescente (GFP), foi realizada conforme Radaic, Paula e Jesus (2014). O plasmídeo foi isolado e purificado utilizando o kit *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit-Maxiprep* K2100-07 (Invitrogen, EUA). A concentração final do plasmídeo foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop UV (PeqLab, Alemanha) a 260 nm (A260). O nível de purificação do plasmídeo foi determinado pela razão A260/A280 entre absorbâncias medidas a 260 nm e 280 nm.

2.2.2 Formação das Nanopartículas PLL/pDNA e PLL/PGA em processo Bulk

As nanopartículas PLL/pDNA e PLL/PGA foram sintetizadas por processo convencional *bulk* (escala laboratorial) através de interações eletrostáticas, em temperatura ambiente. A solução de PLL e PGA foram preparadas em tampão HEPES (10 mM) em pH de 7,55. Os complexos PLL/pDNA foram formados pela adição da solução de pDNA à solução de PLL, por pipetagem, em diferentes razões mássicas ($R_{PLL/DNA}$) de 0,5 a 50 (m/m). Os complexos PLL/PGA foram também formados por pipetagem através da adição da solução de PGA à solução de PLL, em diferentes razões mássicas ($R_{PLL/PGA}$) de 0,5 a 10 (m/m). Na sequência, os complexos foram agitados em um agitador do tipo vórtex por 1 min, seguida de repouso em temperatura ambiente por 30 min para então serem refrigerados a 8°C. A caracterização físico-química dos complexos foi realizada dentro de 2 horas após sua formação, para determinação de diâmetro, índice de polidispersidade e potencial zeta.

2.2.3 Formação das Nanopartículas PLL/pDNA em sistemas microfluídicos

Para a produção das nanopartículas PLL/pDNA em sistemas microfluídicos de fluxo contínuo, avaliou-se a formação dos complexos na $R_{PLL/DNA}$ de 5 em Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica T Longo (DFHTL),

em três diferentes configurações. A concentração final de PLL em ambas as configurações foi de 10µg/mL. Primeiramente, investigou o uso de pDNA na corrente central focalizada por duas correntes de PLL, em seguida, a PLL na corrente central focalizada por duas correntes laterais de pDNA e por fim, o uso de uma corrente central aquosa focalizada por uma corrente lateral de PLL e outra de pDNA.

Na sequência, para a produção das nanopartículas PLL/pDNA em 25°C e 4°C, a superfície do dispositivo microfluídico foi tratada com 3M™ Novec™ EGC 1700. Na temperatura de 25°C, o fluxo hidrodinâmico foi monitorado em microscópio invertido Nikon, modelo ECLIPSE Ti-U, com o emprego de bombas seringas, modelo PHD2000 (Infuse/Withdraw), da Harvard Apparatus. No processo de síntese a 4°C, o dispositivo microfluídico foi colocado sobre um sistema termoelétrico *Peltier*, a fim de que a temperatura de que se mantenha uma temperatura controlada. Após o preparo das nanopartículas, estas foram armazenadas e refrigeradas a 8°C. A caracterização físico-química dos complexos foi realizada dentro de 2 horas após sua formação, para determinação de diâmetro, índice de polidispersidade e potencial zeta.

2.2.4 Produção de Nanopartículas PLL/PGA em Sistemas Microfluídicos

Nanopartículas PLL/PGA foram produzidas em sistemas microfluídicos nas diferentes razões mássicas de $R_{PLL/PGA}$ de 0,5 a 10 (m/m). A complexação ocorreu no dispositivo de focalização hidrodinâmica (DFHTL) tratado com 3M™ Novec™ EGC 1700, na presença de uma corrente central aquosa focalizada por uma corrente lateral de PLL e outra corrente central de PGA. A concentração de PLL ao final do processo foi de 10 a 100µg/mL.

Para a formação dos complexos, o dispositivo microfluídico foi colocado sobre um sistema termoelétrico *Peltier*, a fim de que a temperatura de que se mantenha constante a 4°C. Após o preparo das nanopartículas, estas foram armazenadas e refrigeradas a 8°C. A caracterização físico-química dos complexos foi realizada dentro de 2 horas após sua formação, para determinação de diâmetro, índice de polidispersidade e potencial zeta.

2.2.5 Caracterização Físico-Química das Nanopartículas de PLL/DNA e PLL/PGA

2.2.5.1 Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Índice de Polidispersidade

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas foram medidos utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, Reino Unido) através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* – DLS). As medidas foram realizadas utilizando laser He-Ne a 633 nm e fonte de energia de 4,0 mW, com detecção em ângulo de espalhamento de 173° (*backscattering*). Cada medida foi repetida em triplicata e os valores obtidos foram calculados para obter o tamanho médio das partículas em termos de intensidade e número. Já em relação ao índice de polidispersidade, este varia entre 0 e 1 e quanto mais próximo o valor se encontra de 1, maior é a polidispersidade das nanopartículas.

2.2.5.2 Potencial Zeta

O potencial zeta das nanopartículas de PLL/DNA e PLL/PGA foi obtido através da medida da velocidade de mobilidade eletroforética das partículas carregadas a partir da aplicação de um campo elétrico através das amostras analisadas, utilizando a técnica de anemometria laser Doppler. As medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra, em água a 25 °C, utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, Reino Unido).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

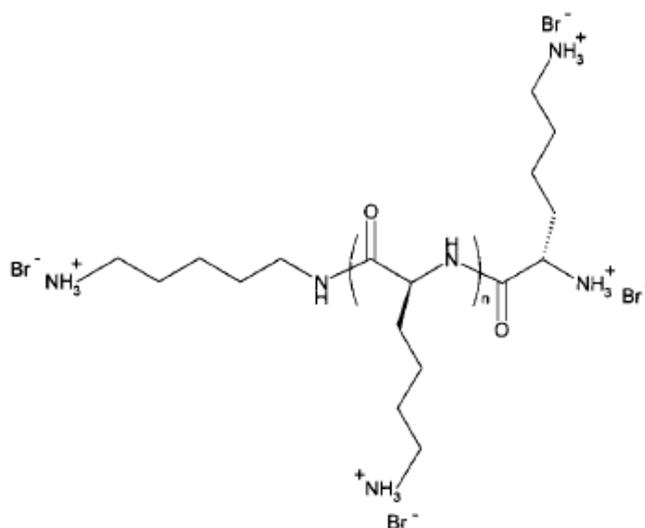
3.1 **Formação de nanopartículas PLL/DNA em processo “Bulk”**

Para melhor compreender o processo de formação dos poliplexos PLL/DNA em sistemas microfluídicos, avaliou-se primeiramente a sua formação por meio de processo *bulk* (escala laboratorial), a fim de se encontrar as proporções PLL/DNA que garantam características catiônicas, para futuras

aplicações em terapia gênica. Para dar início, devem-se levar em consideração algumas questões acerca da PLL.

Conforme mencionado anteriormente, a PLL é um polipeptídeo proveniente de repetições do resíduo de Lis. Neste trabalho, a PLL apresenta massa molar média de (MM: 9.5 KDa), o que leva a uma média de 75 resíduos de Lis em sua sequência. Vale ressaltar que cada resíduo de Lis apresenta um grupamento amina em sua cadeia lateral com carga positiva. A estrutura química da PLL é apresentada de acordo com a Figura 29.

Figura 29: Estrutura química referente à Polilisina (PLL). Adaptado de Krikorian et al., (2002).



Para que seja possível a formação de políplexos, a PLL deve estar em sua forma ionizada, na qual a carga líquida seja positiva. Este peptídeo apresenta ponto isoelétrico ($pI = 9,5$) e assim, os grupamentos amino da sua sequência estão protonados na condição neutra, permitindo a formação de complexos em pH fisiológico (WU et al., 2017). Logo, preparou-se a solução de PLL (0,5 mg/ml) em tampão HEPES a 10 mM em $pH = 7,55$ e esta, foi então preparada e acondicionada em recipiente de plástico.

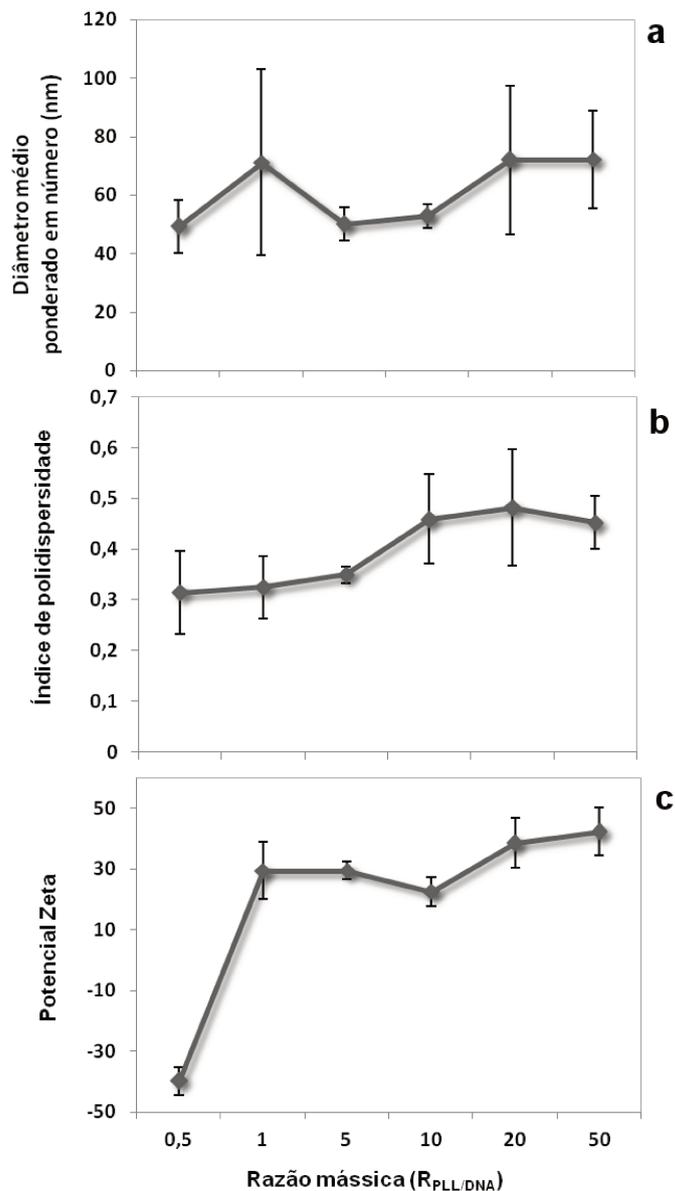
Todo o preparo das soluções de PLL foi padronizado em frascos de plástico. A questão acerca do armazenamento em plástico surgiu após ensaios preliminares, onde se detectou que a carga positiva da PLL diminuía com o tempo. Como a solução de PLL foi primeiramente preparada em vidro, percebeu-se que havia uma relação entre a diminuição da carga positiva e o vidro. Isso se deu por conta de uma interação entre a PLL carregada positivamente e o vidro com caráter aniônico, visto que este em condição neutra apresenta carga

negativa e isso ocorre em razão da desprotonação dos grupos silanol ($\equiv \text{Si-O}^-$) do vidro (HAU et al., 2003). Por essa razão, a fim de evitar a perda de PLL, optou-se por prepará-la e armazená-la sempre em recipiente de plástico.

Após um correto preparo da solução de PLL, os poliplexos foram sintetizados por complexação convencional *bulk*. Este processo consiste na pipetagem da solução de DNA à solução de PLL, em diferentes proporções, seguida de uma leve agitação. Assim, os poliplexos se agregam através de interações eletrostáticas entre a PLL carregada positivamente e o DNA com carga negativa.

Para melhor compreender a síntese dos poliplexos e o efeito que o excesso de cargas exerce sobre este processo, avaliaram-se diferentes razões mássicas $R_{\text{PLL/DNA}}$ na produção de nanopartículas PLL/DNA. A $R_{\text{PLL/DNA}}$ foi variada de 0,5 a 50 (m/m), permitindo assim, a compreensão da influência que a mesma quantidade de cargas ou o excesso de cargas positivas sobre as negativas refletem na síntese dos poliplexos. A concentração final de PLL foi (C_{PLL}) de (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) enquanto a concentração final de DNA variou-se (C_{DNA}) de (20 a 2 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados em termos de diâmetro, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta dos poliplexos formados são apresentados na Figura 30.

Figura 30: Políplexos PLL/DNA sintetizados em processo bulk em diferentes razões mássicas ($R_{PLL/DNA}$). (a) Diâmetro médio ponderado em número, (b) Índice de polidispersidade e (c) Potencial zeta. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.



Os resultados apresentados na Figura 30 mostram a influência que a variação da $R_{PLL/DNA}$ exerce sobre as propriedades físico-químicas dos políplexos formados. A variação da $R_{PLL/DNA}$ em ordem crescente está diretamente relacionada ao aumento da quantidade de PLL (carga positiva) presente no políplexo.

As Nanopartículas PLL/DNA apresentaram diâmetro médio em uma faixa de variação de aproximadamente 50 a 70nm, sem influência significativa da razão mássica $R_{PLL/DNA}$. Vale ressaltar que o diâmetro médio dos complexos é fortemente influenciado pelo tipo do polímero e pela massa molar deste

(OPANASOPIT et al., 2011). Como neste trabalho a variação da $R_{PLL/DNA}$ se deu com base na PLL de mesma massa molar (MM: 9.5 KDa), não houve uma variação expressiva no tamanho dos poliplexos.

A formação de nanopartículas PLL/DNA em processo *bulk* é bem consolidada na literatura. Liu et al., (2001), sintetizou poliplexos de PLL/DNA em meio a NaCl (1mM) que apresentaram duas diferentes populações de diâmetro, a primeira população com diâmetro médio de 15 nm a 30 nm, o qual apresenta nanoestruturas na forma esférica e uma segunda, com diâmetro médio maior que 100 nm na forma de hastes. Mas, a expressão do DNA nas células ocorreu apenas para complexos na forma esférica e com tamanhos menores que 30 nm. Este resultado implica a importância do diâmetro e da forma dos complexos na liberação dos ácidos nucleicos.

Katayose e Kataoka, (1997), formaram complexos PEG-PLL/DNA que apresentaram diâmetros de aproximadamente 50nm. Apesar de apresentarem essa faixa de tamanho, a caracterização por microscopia de força atômica mostrou uma nanoestrutura toroidal com um tamanho superior a 100 nm. Segundo Ward et al., (2001), complexos PLL/DNA na razão de cargas 2,8:1 utilizando PLL (MM: 20 KDa) e PLL(MM: 211KDa) apresentaram diâmetro de 54,1nm e 61,9nm, respectivamente. Esse resultado mostra como a massa molar da PLL influi sobre o tamanho dos complexos formados.

As nanopartículas PLL/DNA produzidas neste trabalho, apresentaram diâmetro médio equivalente aos trabalhos reportados na literatura. Em associação as análises do diâmetro dos poliplexos, devem-se levar em consideração a distribuição de tamanho em termos de índice de polidispersidade. Os poliplexos apresentaram alta polidispersidade, a qual aumentou proporcionalmente à medida que a $R_{PLL/DNA}$ aumenta, variando de 0,3 a 0,5, ou seja, o excesso de PLL conduz a formação de nanopartículas não uniformes. Isto pode estar associado à presença de PLL livre que não participa do processo de condensação do DNA, visto que há quantidade superior à necessária para realizar a condensação de todo o DNA.

Sabe-se que de um modo geral, a complexação através de processo convencional *bulk* por meio de pipetagem, conduz a uma distribuição de nanopartículas menos uniformes, o que gera essa alta polidispersidade (DEBUS; BECK-BROICHSITTER; KISSEL, 2012). Destaca-se que análises em termos de polidispersidade de complexos PLL/ DNA não são reportadas na literatura.

Dessa forma, as barras de erro presentes nos resultados estão associadas à difícil reprodutibilidade da complexação via processo *bulk*.

Uma caracterização importante para aplicação dos complexos como carreadores na terapia gênica está associada ao potencial zeta, visto que é essencial que as nanopartículas apresentem caráter catiônico. Essa propriedade físico-química mostra informações a respeito da formação dos poliplexos por meio de interações eletrostáticas, pois esta reflete a carga líquida da superfície da nanopartícula. Os resultados mostram que para a menor $R_{PLL/DNA}$ de 0,5, há uma neutralização das cargas positivas da PLL após a interação com as cargas negativas do DNA, devido ao excesso de ácido nucleico, o qual apresenta potencial zeta em torno de -40 mV e quando se tem a maior $R_{PLL/DNA}$, o potencial zeta é próximo a +40 mV.

Os resultados em termos de potencial zeta são então, um indicativo da formação das nanopartículas, pois com o aumento da razão mássica de PLL, esta é capaz de condensar o DNA e proporcionar poliplexos com carga superficial positiva. Este caráter catiônico possibilita a interação do poliplexo com a membrana celular (ROBISON et al., 2016) e assim, garante a proteção do DNA contra nucleases, reduzindo a sua degradação e a consequente liberação no interior das células (ELDER; EMRICK; JAYARAMAN, 2011). Opanasopit et al., (2011), apresentou o mesmo comportamento crescente do potencial zeta dos complexos PLL/DNA, os quais variaram entre +15 mV e +30 mV a partir da variação da razão mássica de (1 a 4) entre PLL/DNA.

Dessa forma, as nanopartículas PLL/DNA, apresentadas na Figura 30 apresentaram propriedades físico-químicas em termos de diâmetro e potencial zeta similares aos referidos na literatura, por ser tratar de um processo convencional de produção de complexos. No intuito de sintetizar complexos uniformes e de forma reprodutível, estes foram produzidos via sistemas microfluídicos, os quais permitem um maior controle sobre o processo de produção. Além disso, a síntese por microfluídica pode levar a uma diminuição da citotoxicidade da nanopartícula em razão de uma complexação bem estabelecida. Vale ressaltar que não há trabalhos na literatura que relacione a síntese de poliplexo PLL/DNA via sistemas microfluídicos.

Para investigar a produção dos complexos nesta nova abordagem, escolheu-se a melhor condição do processo *bulk*. Conforme os resultados apresentados, a $R_{PLL/DNA} = 5$ exibiu as melhores propriedades físico-químicas,

produzindo políplexos com menor diâmetro, maior reprodutibilidade e carga superficial positiva. Apesar das maiores $R_{PLL/DNA}$ apresentarem um maior potencial zeta, o que potencializa aplicação em terapia gênica, elas também possuem uma maior quantidade de PLL livre que pode conduzir a uma elevada citotoxicidade das nanopartículas. Por essa razão, optou-se por utilizar a $R_{PLL/DNA} = 5$ considerando o efeito da toxicidade das partículas serem menores nesta situação. Assim, as etapas seguintes de formação de complexos PLL/DNA foram realizadas utilizando esta ($R_{PLL/DNA}$).

3.2 Complexação PLL/DNA em sistemas microfluídicos

Compreender o processo de formação de complexos no modo convencional *bulk* é fundamental para identificar as melhores condições de síntese para então, reproduzi-las em sistemas microfluídicos. Sabe-se que a complexação em processos convencionais leva a formação de políplexos com alta polidispersidade e é nesta situação, que a microfluídica surge para sintetizar complexos de forma controlada, levando a uma produção e distribuição uniforme e bem definida de nanopartículas (DEBUS; BECK-BROICHSITTER; KISSEL, 2012).

Trabalhos que reportam a síntese de políplexos PLL/DNA em sistemas microfluídicos são inexistentes. Porém, há trabalhos que sintetizam políplexos entre polietilenoimina (PEI), um polímero catiônico e DNA via microfluídica (CHEE et al., 2009; DEBUS; BECK-BROICHSITTER; KISSEL, 2012). Estes trabalhos serão então, utilizados como base para comparação da influência da microfluídica no processo de síntese.

Conforme visto na seção anterior, a melhor condição para a formação de nanopartículas PLL/DNA em sistema *bulk* é na $R_{PLL/DNA}$ de 5 (Figura 30), a qual apresentou melhores propriedades físico-químicas. Nesta situação, tem-se um excesso de PLL que influi diretamente na carga superficial das nanopartículas, levando a um potencial zeta resultante de caráter catiônico.

Para dar início ao processo de formação de nanopartículas PLL/DNA em sistemas microfluídicos, optou-se por utilizar o Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica T Longo (DFHTL), o qual foi estabelecido no processo de síntese via rota química por apresentar melhor índice de mistura e maior tempo de

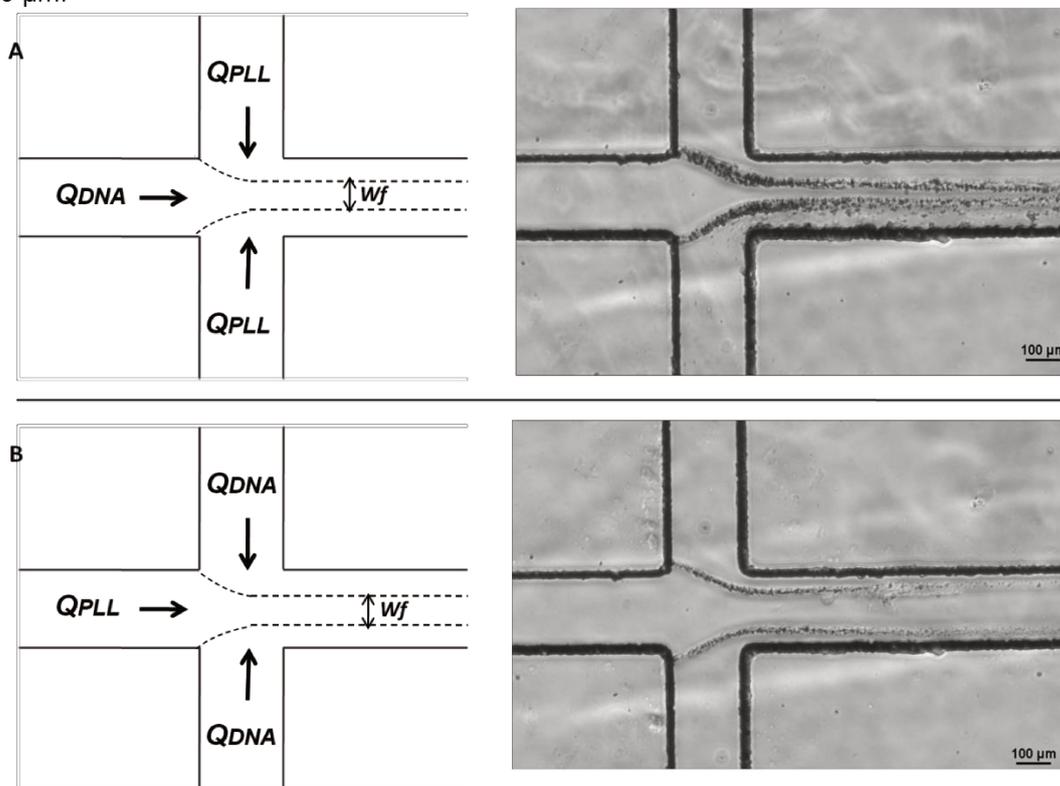
residência quando comparado ao Dispositivo de Focalização Hidrodinâmica T Simples (DFHT) (Figura 16).

3.2.1 Influência da configuração de processo

Os ensaios exploratórios da formação de poliplexos PLL/DNA em microfluídica foram conduzidos em duas diferentes configurações de processo a fim de investigar a melhor forma de contato entre as correntes de PLL e DNA em sistema de focalização hidrodinâmica. Primeiramente, a corrente central foi preenchida com DNA e focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de PLL (Figura 31A) e na sequência, a corrente central foi preenchida com PLL e focalizada hidrodinamicamente por correntes laterais de DNA (Figura 31B). Em ambas as configurações avaliadas do processo, observaram-se a presença de precipitados na região de focalização hidrodinâmica, após alguns minutos de processamento (Figura 31).

Como não há trabalhos que reportem a síntese de complexos nestas condições, a vazão total (Q_T) escolhida para o processo microfluídico foi $30\mu\text{L}/\text{min}$, com base no trabalho reportado para complexação entre PEI e DNA por (CHEE et al., 2009; DEBUS; BECK-BROICHSITTER; KISSEL, 2012), no qual o (Q_T) variou entre 10 e $50\mu\text{L}/\text{min}$. Assim, a corrente central foi processada a vazão volumétrica (Q_C) de $15\mu\text{L}/\text{min}$ enquanto a soma das vazões volumétricas das correntes laterais foi (Q_L) de $15\mu\text{L}/\text{min}$. Em ambas as configurações de processo investigadas a concentração da PLL ao final do processo foi (C_{PLL}) de $10\mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 31: Condições de processamento em DFHTL para a formação de políplexos PLL/DNA em $R_{PLL/DNA}$ de 5. (A) Corrente central preenchida com DNA e focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de PLL e (B) A corrente central de PLL foi focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de DNA. Ambas as condições foram processadas a uma $(Q_T) = 30 \mu\text{L}/\text{min}$, com uma vazão volumétrica da corrente central de $(Q_C) = 15 \mu\text{L}/\text{min}$ e vazão volumétrica da soma das correntes laterais de $(Q_L) = 15 \mu\text{L}/\text{min}$. Em ambas configurações (w_f) equivale a largura da corrente focalizada. Barras de escala correspondem a $100 \mu\text{m}$.



Sabe-se que a PLL se liga fortemente ao DNA por meio de interações eletrostáticas, neutralizando as cargas negativas e conduzindo a formação de políplexos. Essa neutralização de cargas geralmente induz a formação de precipitados insolúveis (KATAYOSE; KATAOKA, 1997). No sistema de focalização hidrodinâmica este processo é ainda intensificado, pois o dispositivo microfluídico favorece a formação de fronteiras que permite um contato imediato e local entre as correntes centrais e laterais.

Na condição (A, Figura 31A), a formação de precipitados é mais intensa que na condição (B, Figura 31B) e isto está provavelmente associado ao contato direto das correntes e o processo de interação eletrostática entre as moléculas, o qual é intensificado por meio do processo de difusão que rege a formação de nanopartículas em sistemas microfluídicos de regime laminar (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; MARK et al., 2010). De acordo com a literatura, em processo bulk a ordem de adição dos reagentes influencia fortemente a formação

dos poliplexos e quando se adiciona solução de polímero à solução de DNA, o processo é cerca de 10 vezes mais eficiente para obtenção das melhores propriedades físico-químicas (CHEE et al., 2009).

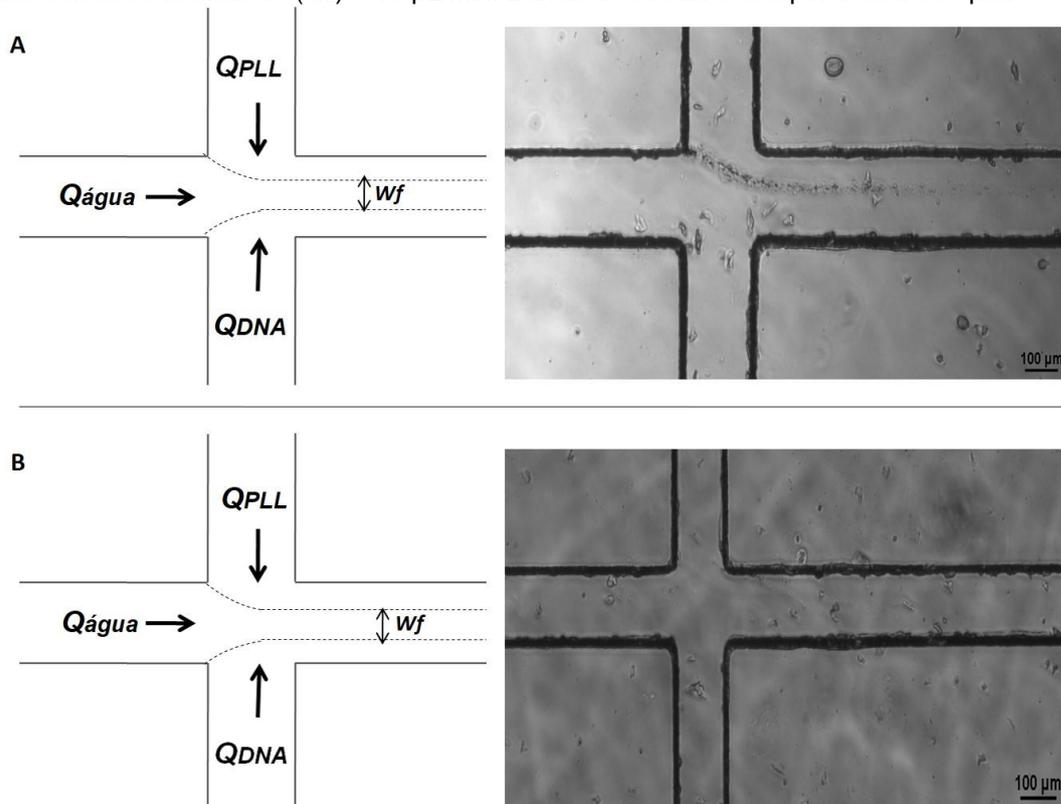
As configurações de processo avaliadas (Figura 31) apresentaram diferentes caminhos difusivos (W_f) e estes estão inteiramente relacionados à eficiência do modo de contato entre as correntes de PLL e DNA. Vale ressaltar que neste estudo, a partir das $R_{PLL/DNA}$ de 5, há uma maior concentração de PLL e assim, um excesso de cargas positivas que tendem a condensar o DNA por fortes interações eletrostáticas assim que se encontram. Além disso, a maior concentração do polímero pode levar a um fluxo difusivo maior, uma vez que a concentração de soluto influencia diretamente na transferência de massa, segundo a 1ª Lei de Fick. Na condição (A), como (W_f) é menor, isto pode sugerir que o fluxo difusivo no sentido transversal ao escoamento é maior, ou seja, o caminho para que as correntes se encontrem é menor e mais rápida, assim, a neutralização de cargas ocorre imediatamente. Já na condição (B) este caminho difusivo é maior, o qual permite que os fluxos se encontrem, mas que a interação entre eles ocorra de forma mais equilibrada.

A formação de precipitados em ambas as condições avaliadas, proporcionam uma interação desbalanceada entre as moléculas de PLL e DNA, pois a presença do precipitado dificulta a agregação destas de forma organizada, conduzindo assim, a formação de nanopartículas altamente polidispersas. Além da formação dos precipitados interferirem nas propriedades físico-químicas das nanopartículas e na reprodutibilidade do processo, eles dificultam a limpeza e reutilização dos dispositivos e podem ainda conduzir a obstrução destes.

A formação de microfibras na região de focalização hidrodinâmica e ao longo de todo o microcanal em DFHT são reportadas na literatura como no trabalho a respeito da formação de nanopartículas de quitosana CHI de baixa massa molar e adenosina trifosfato ATP em uma $R_{CHI/ATP}$ de 0,5. O processo microfluídico consiste de uma corrente central de CHI focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de ATP em uma vazão volumétrica total (Q_T) de 90 $\mu\text{L}/\text{min}$. As microfibras são provenientes da rápida interação eletrostática na fronteira dos fluxos de CHI e ATP. Para resolver a presença das fibras no canal microfluídico, estabeleceram a configuração de uma corrente central aquosa, a fim de criar uma barreira difusiva e permitir a complexação gradativa (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017).

Para solucionar a ocorrência de precipitados no processo de formação de nanopartículas PLL/DNA (Figura 31), investigou-se o efeito que a corrente central aquosa em sistemas microfluídicos proporciona no processo de síntese de nanopartículas. As condições de processamento em termos de vazão volumétrica são as mesmas aplicadas anteriormente e as concentrações das soluções foram ajustadas para obter a concentração final (C_{FPLL}) de $10\mu\text{g/mL}$. O efeito da corrente central de água em contato com as correntes laterais é apresentado na Figura 32.

Figura 32: Efeito da corrente central aquosa em DFHTL para a formação de políplexos PLL/DNA em $R_{PLL/DNA}$ de 5. (A) Corrente central preenchida com água e focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de PLL e DNA e (B) DFHTL após tratamento de superfície no qual a corrente central aquosa é focalizada hidrodinamicamente por correntes laterais de PLL e DNA. Ambas as condições foram processadas a uma (Q_T) = $30\mu\text{L/min}$, com uma vazão volumétrica da corrente central de (Q_C) = $15\mu\text{L/min}$ e vazão volumétrica da soma das correntes laterais de (Q_L) = $15\mu\text{L/min}$. Barras de escala correspondem a $100\mu\text{m}$.



Na condição (A, Figura 32) observa-se que a aplicação de uma corrente central aquosa elimina quase por completo a presença dos precipitados, visto que a leve formação que ainda ocorre é referente à corrente lateral de PLL. Segundo Pessoa et al., (2017) na presença da corrente central de água para a formação das nanopartículas CHI/ATP, não houve a formação de microfibras no microcanal. Esse resultado era o mesmo esperado para a formação de

nanopartículas PLL/DNA. Sendo assim, o precipitado que ainda está presente no microcanal pode ser recorrente de outra razão, pois a corrente central aquosa deveria eliminar por completo a presença deste.

Como visto na secção 4.2.1, a PLL catiônica pode interagir com o vidro de caráter aniônico. No caso dos dispositivos microfluídicos, estes são construídos através de um molde de PDMS o qual é selado ao vidro por plasma de oxigênio e, então, o dispositivo é formado. Assim, investigou-se a possível relação entre a PLL e o vidro, os quais estão em contato direto dentro do microcanal. Para conduzir este ensaio, a superfície do vidro foi tratada com NOVEC (solução de polímero de acrilato fluorado), o qual é usado para revestimento, a fim de tornar a sua superfície hidrofóbica e evitar a interação com a PLL.

O resultado deste ensaio é visto na condição (B, Figura 32), onde não há a presença de precipitados, confirmando a hipótese da interação entre o vidro e a PLL, que leva a uma complexação desbalanceada entre PLL/DNA. Este resultado ainda está correlacionado a formação de precipitados nas condições (A e B, Figura 31) que além de ocorrerem pela forte interação eletrostática entre as moléculas de PLL e DNA, ainda eram acentuados pela interação do vidro com a PLL.

A condição (B, Figura 32) representa a configuração ideal para o processo de síntese de nanopartículas PLL/DNA, pois a presença da corrente central aquosa em maior vazão volumétrica que as correntes laterais, conduzem a uma maior largura da corrente central e conseqüentemente, a formação de um maior comprimento do caminho difusivo (W_f). Logo, a formação de precipitados estava relacionada ao modo de contato entre as correntes de PLL e DNA que agora, favorece a formação de nanopartículas ao invés de precipitados.

O aumento do caminho difusivo conduz a uma difusão progressiva entre as moléculas presentes nos fluxos, retardando o efeito de mistura entre estes e permitindo que se interajam ao longo de todo o microcanal, levando a uma complexação gradual e uniforme. Assim, essa configuração evita o contato imediato das moléculas e a rápida interação eletrostática, conseguindo evitar o acúmulo de precipitado na região de focalização hidrodinâmica, favorecendo a formação de nanopartículas PLL/DNA de forma organizada.

Dessa forma, a presença da corrente central aquosa permitiu a consolidação de um processo de fluxo contínuo para a produção de

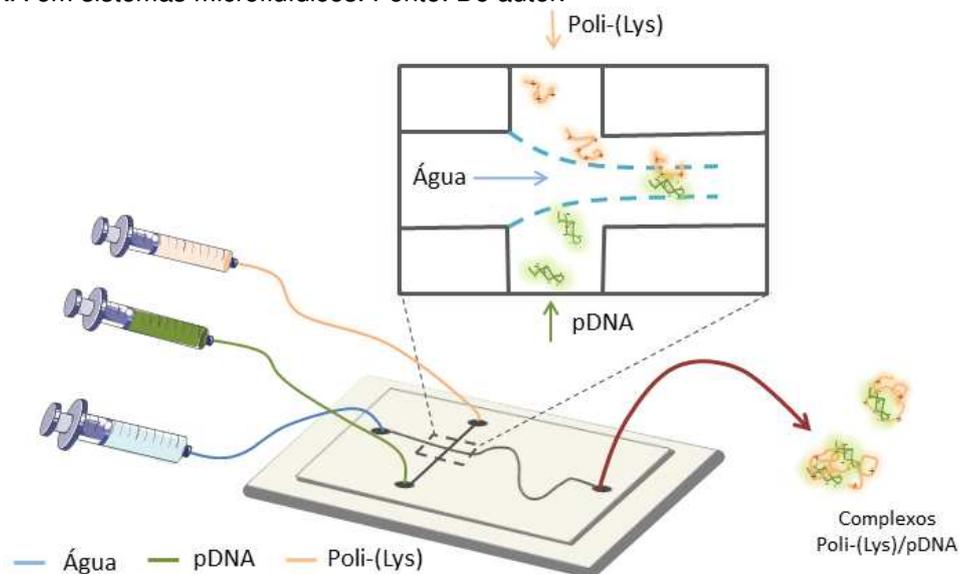
nanopartículas ordenadas de PLL/DNA. A partir disso, optou-se por utilizar essa configuração de sistema microfluídico para investigar o processo de formação de nanopartículas PLL/DNA nas etapas seguinte. Na sequência, avaliou-se o efeito da temperatura no processo de síntese das nanopartículas.

3.2.2 Avaliação do efeito da temperatura na síntese de nanopartículas PLL/DNA em sistemas microfluídicos

O processo de formação de nanopartículas PLL/DNA em sistemas microfluídicos é dependente da forma de contato entre os fluxos e principalmente da difusão entre estes. O processo difusivo está diretamente relacionado à temperatura, ou seja, quanto maior a temperatura maior é o coeficiente de difusão (ZHANG et al., 2016). Por essa razão, investigou-se a influência da temperatura na síntese de nanopartículas PLL/DNA, visto que a difusão gradativa é essencial na formação destas a fim de evitar a formação de precipitados no microcanal.

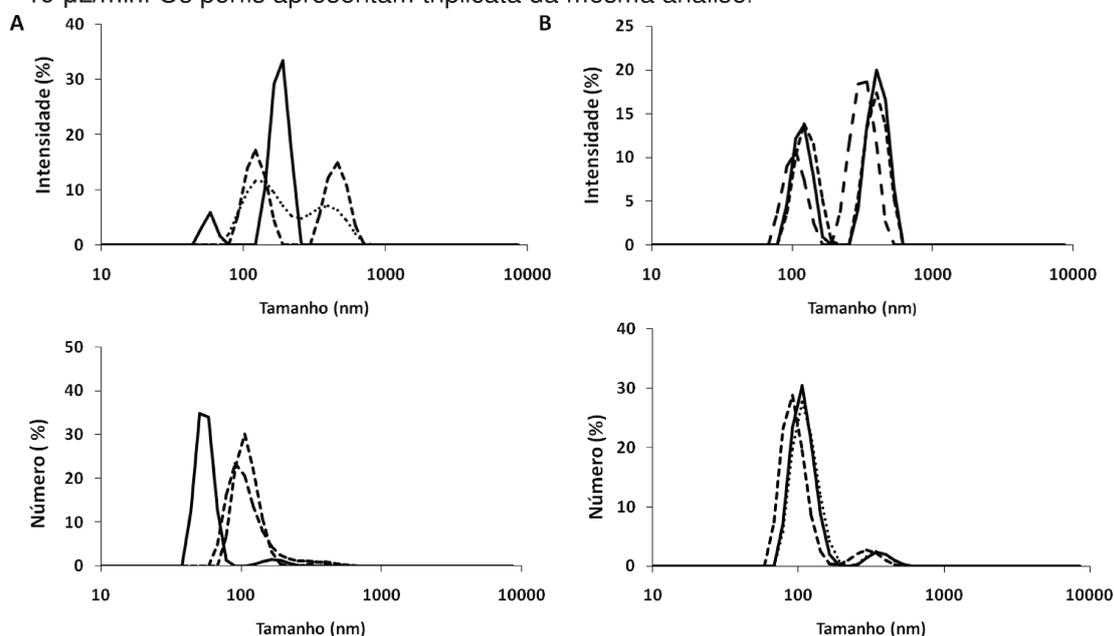
As nanopartículas PLL/DNA foram então produzidas a 25°C e 4°C, visto que na literatura trabalhos reportam a formação de lipoplexos entre lipossomas catiônicos/DNA em sistemas microfluídicos a 4°C, o qual conduz a formação de estruturas organizadas a esta temperatura (BALBINO et al., 2016). O esquema do processo de formação das nanopartículas PLL/DNA em sistemas microfluídicos é apresentado na Figura 33.

Figura 33: Esquema representativo do processo de formação das nanopartículas PLL/DNA em sistemas microfluídicos. Fonte: Do autor.



Para tal, as nanopartículas foram produzidas na $R_{PLL/DNA}$ de 5 em uma vazão volumétrica total (Q_T) de $30 \mu\text{L}/\text{min}$. Utilizou-se uma corrente central aquosa (Q_C) de $15 \mu\text{L}/\text{min}$, corrente lateral de PLL (Q_{PLL}) de $7,5 \mu\text{L}/\text{min}$ e corrente lateral de DNA (Q_{DNA}) de $7,5 \mu\text{L}/\text{min}$. A concentração de PLL ao final do processo foi (C_{PLL}) de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. O gráfico de distribuição de diâmetro em termos de intensidade e número nas diferentes temperaturas é apresentado na Figura 34.

Figura 34: Distribuição de diâmetro em termos de intensidade e número das nanopartículas PLL/DNA formadas em sistemas microfluídicos na presença de corrente central aquosa. (A) Nanopartículas produzidas em 25°C e (B) nanopartículas produzidas a 4°C. As nanopartículas foram processadas a uma $Q_T = 30 \mu\text{L}/\text{min}$, com uma vazão volumétrica da corrente central de $Q_C = 15 \mu\text{L}/\text{min}$ e vazão volumétrica da soma das correntes laterais de (Q_L) = $15 \mu\text{L}/\text{min}$. Os perfis apresentam triplicata da mesma análise.



A distribuição de diâmetro em termos de intensidade e número apresenta de forma mais detalhada o resultado encontrado para nanopartículas PLL/DNA formadas na $R_{\text{PLL/DNA}}$ de 5 em sistemas microfluídicos na presença de corrente central aquosa, em 25°C e 4°C. Na condição de 25°C, as nanopartículas apresentaram diâmetro médio ponderado por número de $99 \pm 33 \text{ nm}$, polidispersidade em torno de $0,36 \pm 0,07$ e potencial zeta de $+22,3 \text{ mV}$.

Na distribuição de tamanho por intensidade para nanopartículas produzidas a 25°C, observa-se que há presença de populações de nanopartículas em diferentes domínios de diâmetro, variando em torno de 50 a 700 nm. Esta ampla faixa de diâmetro está associada a um alto valor de polidispersidade das nanopartículas. Para a distribuição baseada em número (Figura 34A), identifica-se a presença de apenas duas populações distintas, porém a maior porcentagem de nanopartículas é referente à faixa de 50 a 100 nm, validando o diâmetro médio encontrado das nanopartículas de PLL/DNA a 25°C.

As nanopartículas PLL/DNA produzidas a 4°C apresentaram diâmetro médio ponderado em número de $124 \pm 9 \text{ nm}$, índice de polidispersidade de $0,37 \pm 0,04$ e potencial zeta de $+26,1 \text{ mV}$. De acordo com a distribuição de

diâmetro por intensidade, observa-se a presença de apenas duas populações de diâmetro entre 100 e 300nm. Na distribuição por número, a maior porcentagem de nanopartículas produzidas está em torno de 100 nm. Estes resultados de distribuição de diâmetro em termos de intensidade e número indicam a formação de nanopartículas uniformes quando se opera a 4°C. Pois estes, apesar de apresentarem maior tamanho, apresentam menor desvio padrão, o que confere maior reprodutibilidade na produção de nanopartículas.

Conforme apresentado na seção 4.2.2, a adoção de uma corrente central aquosa na configuração do sistema microfluídico permite a criação de uma barreira difusiva que retarda o efeito de mistura entre as moléculas. A produção de nanopartículas a 4°C se deu com o mesmo objetivo, pois a esta temperatura, a difusão entre as moléculas presentes nos fluxos tende a diminuir, levando a formação de complexos de uma forma balanceada e reprodutível. Por essa razão, os perfis de diâmetro baseados em intensidade mostraram apenas duas populações de diâmetro ao contrário do que é observado para as nanopartículas formadas a 25°C, as quais a distribuição em termos de intensidade mostra uma ampla faixa de diâmetros.

Os resultados de diâmetro (Figura 34B) equivalem aos reportados na literatura referentes à síntese de complexos PLL/DNA em processo convencional *bulk*, conforme apresentado na seção anterior, os quais apresentaram nanopartículas com diâmetro médio de aproximadamente 100 nm (KATAYOSE; KATAOKA, 1997; LIU et al., 2001). Já em comparação ao processo *bulk* referente às nanopartículas de PLL/DNA produzidas neste trabalho, observa-se que os complexos produzidos a 25°C em sistemas microfluídicos apresentam propriedades físico-químicas similares, o que era esperado em se tratando da síntese baseada nas mesmas condições de temperatura e $R_{PLL/DNA}$ de 5. Já os complexos produzidos a 4°C apresentam maior diâmetro em razão da influência da temperatura no processo de síntese, a qual diminui a velocidade de interação eletrostática promovendo a formação de nanopartículas de forma ordenada.

Esse efeito da temperatura sobre a síntese de complexos PLL/DNA pode ser mais bem compreendida quando se analisa o potencial zeta. A 4°C, a carga superficial das nanopartículas aumenta, ficando mais positiva, ou seja, esta temperatura permite provavelmente que a condensação do DNA pela PLL em fluxo contínuo, ocorra de forma totalmente organizada e que as moléculas de

DNA presentes no fluxo participem em maior quantidade da formação dos complexos.

Em relação à alta polidispersidade encontrada das nanopartículas PLL/DNA, sabe-se que no processo convencional *bulk* é comum que o PDI destas seja elevado (DEBUS; BECK-BROICHSITTER; KISSEL, 2012). Na microfluídica existem diversos parâmetros operacionais que podem ser explorados a fim de se ter um maior controle sobre o processo de produção destas, que favorece a formação de complexos uniformes. Para atingir essa homogeneidade de nanopartículas, algumas configurações de processo microfluídico podem ser moduladas, por exemplo, a vazão volumétrica total do sistema (QT), a vazão volumétrica das correntes laterais sobre a corrente central e o efeito da advecção caótica podem levar a formação de nanopartículas com melhores propriedades físico-químicas.

Dessa forma, o processo microfluídico apresenta inúmeras vantagens sobre a produção de nanopartículas PLL/DNA em relação ao processo *bulk*. A microfluídica também apresenta vantagens quando comparada ao processo *bulk* para a formação de políplexos PEI/DNA, produzindo políplexos bem definidos e uniformes (CHEE et al., 2009; DEBUS; BECK-BROICHSITTER; KISSEL, 2012). A temperatura também tem forte influência no controle da produção de nanopartículas PLL/DNA. Em associação ao uso da corrente central aquosa, a temperatura de 4°C conduz a uma diminuição do processo difusivo entre os fluxos de PLL e DNA e na mistura entre eles e, assim, essa configuração permite uma interação eletrostática de forma ordenada, levando a formação de políplexos PLL/DNA com carga superficial positiva.

3.3 Formação de nanopartículas PLL/PGA em processo “Bulk”

A PLL conforme mencionado anteriormente apresenta citotoxicidade relacionada ao comprimento da sua cadeia de aminoácidos, pois quanto maior o tamanho da sua cadeia, maior é a citotoxicidade desta (AKINC; LANGER, 2002). Como as melhores propriedades físico-químicas das nanopartículas de PLL/DNA se deu na $R_{PLL/DNA}$ de 5, a qual apresenta excesso de cargas positivas,

indicando a presença de PLL livre, a qual pode estar associada a uma elevada toxicidade das nanopartículas formadas.

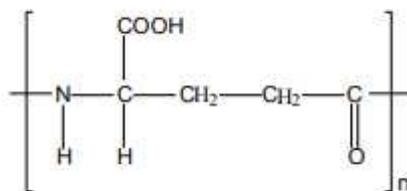
Uma abordagem para solucionar a citotoxicidade das nanopartículas, consiste na blindagem das cargas positivas do polímero por meio de interações com poliânions (NIÑO-PARIENTE et al., 2017). A associação entre dois polímeros conduz a formação de complexos, os quais são agregados por meio de interações eletrostáticas entre um polímero com carga positiva e outro carregado negativamente (YIN et al., 2007). Assim, a interação dos poliânions aos polímeros de caráter catiônico pode levar a formação de complexos estáveis, reduzir as interações não específicas do polímero catiônico e reduzir assim, a citotoxicidade do complexo aumentando o tempo de circulação *in vivo* (NIÑO-PARIENTE et al., 2017).

Neste trabalho, investigou-se a formação de nanopartículas entre a PLL e o ácido poliglutâmico (PGA) no intuito de reduzir a toxicidade da nanopartícula e conduzir a formação de complexos estáveis que apresentem carga superficial positiva para que futuras aplicações em terapia gênica sejam possíveis, através da incorporação de DNA ao complexo, direcionando a formação de um complexo ternário PLL/PGA/DNA.

Trabalhos envolvendo a formação de complexos entre PLL/PGA são escassos na literatura. Porém, há trabalhos que envolvem a formação de complexos entre PGA e outros polímeros, por exemplo, a quitosana (CHI) (JC; RM; MA, 2016; KANG et al., 2007; YIN et al., 2007). Como não há estudos indicando as melhores condições para a formação de complexos entre PLL/PGA, ensaios foram conduzidos em processo convencional *bulk*, para melhor compreender o mecanismo de agregação entre os polipeptídeos.

A aplicação de PGA na formação de complexos vem sendo estudada devido ao seu comportamento não-imunogênico, a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (SHIH; VAN, 2001). É um polipeptídeo de caráter aniônico que apresenta resíduos de ácido glutâmico em sua estrutura. A massa molar média de PGA usado neste trabalho equivale a (MM: 75KDa), o que leva a uma média de 580 resíduos de ácido glutâmico sendo que cada resíduo apresenta uma carga negativa. A estrutura química do PGA é apresentada na Figura 35.

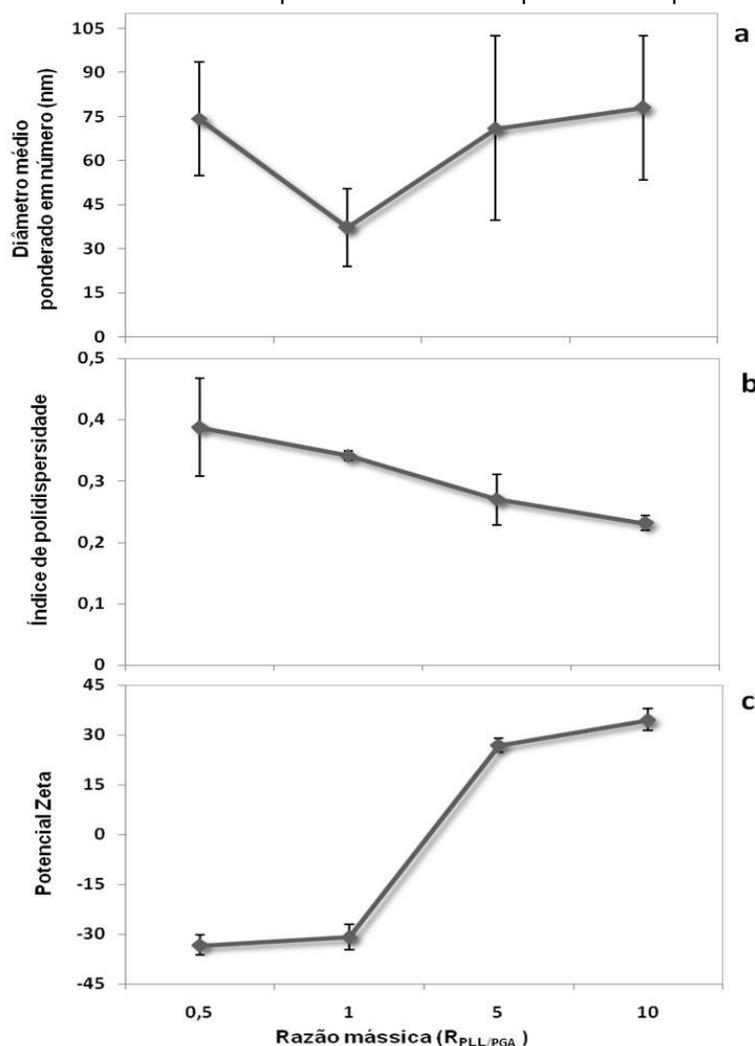
Figura 35: Estrutura química referente ao poliácido glutâmico (PGA). Fonte: Hamman, (2010).



Para dar início à formação dos complexos PLL/PGA, o PGA deve estar em sua forma ionizada e apresentar carga líquida negativa. O seu ponto isoelétrico (pI) equivale a 2,19 e isto indica que na condição neutra ou pH fisiológico, os grupamentos carboxílicos estão desprotonados, permitindo a formação de complexos. Assim, preparou-se a solução de PGA a (0,5mg/mL) em tampão HEPES a 10 mM e pH de 7,55 e a solução de PLL a (0,5mg/mL) foi preparada nas mesmas condições.

Para melhor compreender o processo de formação dos complexos, investigaram-se as melhores condições de síntese entre PLL/PGA através da variação da razão mássica $R_{\text{PLL/PGA}}$ de 0,5 a 10 (m/m). A complexação foi feita em processo convencional *bulk*, através da adição da solução de PGA à solução de PLL, seguida de agitação. A concentração de PLL ao final do processo foi de (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) enquanto a concentração de PGA ao final do processo foi de (20 a 10 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados de diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta dos complexos PLL/PGA formados são apresentados na Figura 36.

Figura 36: Políplexos PLL/PGA produzidos em processo bulk nas diferentes razões mássicas ($R_{PLL/PGA}$). (a) Diâmetro médio ponderado em número, (b) Índice de polidispersidade e (c) Potencial zeta. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes.



Os resultados apresentados na Figura 36, mostram a forma como a interação entre a PLL carregada positivamente e o PGA com carga negativa ocorre à medida que a $R_{PLL/PGA}$ aumenta e leva a formação de complexos com excesso de cargas positivas. O diâmetro médio dos complexos se deu por volta de 70 nm em todas as $R_{PLL/PGA}$ avaliadas, exceto para $R_{PLL/PGA}$ de 1 na qual o diâmetro diminuiu para 40 nm. Como o desvio padrão do diâmetro em todas as $R_{PLL/PGA}$ avaliadas é alto, essa diferença de tamanhos pode estar associada ao processo de formação dos complexos por pipetagem, tornando necessário o uso de técnicas que permitam melhor controle sobre o processo de produção.

A polidispersidade das nanopartículas PLL/PGA diminui à medida que a $R_{PLL/PGA}$ aumenta em uma faixa de 0,3 a 0,2. Esse resultado está inteiramente relacionado à agregação dos complexos por meio de interação eletrostáticas. Nas $R_{PLL/PGA}$ de 0,5 e 1, há um excesso de cargas negativas sobre as positivas

e vale ressaltar que a massa molar do PGA é 8 vezes maior que a PLL, o que leva a presença de maior quantidade de resíduos com cargas negativas. Assim, ocorre a neutralização de cargas positivas da PLL pelo PGA e ainda há uma grande quantidade de PGA livre, que conduz a formação de complexos polidispersos e com carga superficial negativa.

Quando se analisa as $R_{PLL/PGA}$ de 5 e 10, o oposto é observado. Nestas condições há uma maior concentração de PLL, porém há também uma alta quantidade de resíduos de PGA para se neutralizar. Assim, a PLL neutraliza as cargas negativas, formando um complexo com carga superficial positiva. A menor polidispersidade destas condições está provavelmente associada a uma menor quantidade de PLL livre. As razões mássicas de 5 e 10 conduziram a formação de complexos PLL/PGA monodispersos e uniformes.

De acordo com a literatura, complexos formados entre CHI/PGA apresentam estrutura esférica e diâmetro médio de 60nm (YIN et al., 2007). Em comparação aos estudos da literatura, os complexos produzidos na $R_{PLL/PGA}$ de 5 e 10 apresentaram ótimas propriedades físico-químicas, conduzindo a formação de nanopartículas, uniformes reprodutíveis e com carga superficial positiva, a qual permite futuras aplicações em terapia gênica. Para dar continuidade aos estudos envolvendo a formação de complexos PLL/PGA, investigou-se a síntese desses em microfluídica para avaliar a influência da síntese em fluxo contínuo nas propriedades físico-químicas dos complexos.

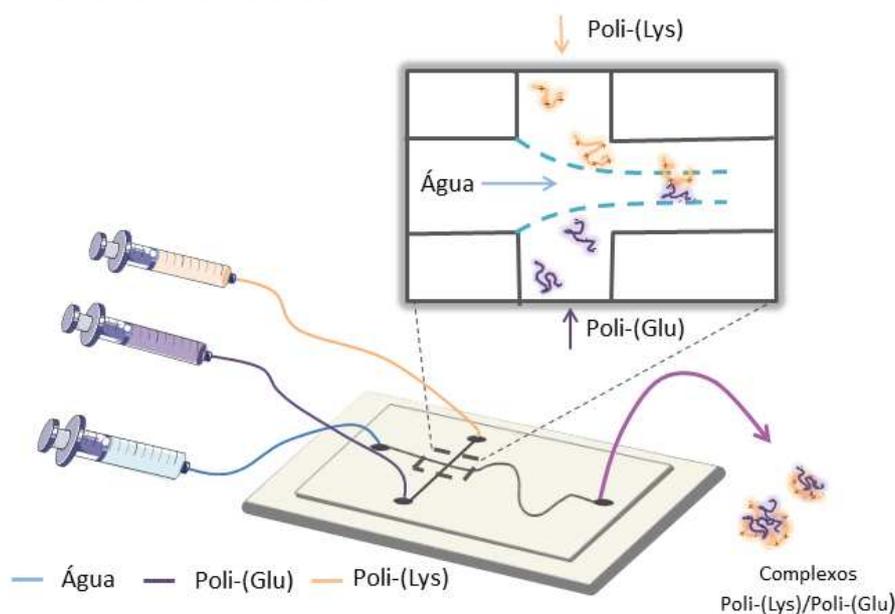
3.4 Formação de nanopartículas PLL/PGA em sistemas microfluídicos

Para a formação dos complexos PLL/PGA, estes foram processados em microfluídica a fim de avaliar a influência que a síntese por fluxo contínuo reflete sobre os complexos formados. Trabalhos que reportam a formação de complexos PLL/PGA ou de PGA com outros polímeros em microfluídica na literatura são escassos.

Para melhor compreender o processo de interação entre as moléculas de PLL e PGA e como estas se agregam na formação de complexos, todas as condições de $R_{PLL/PGA}$ avaliadas em *bulk* foram processadas em microfluídica. Os ensaios foram realizados em microdispositivos DFHTL, em razão dos

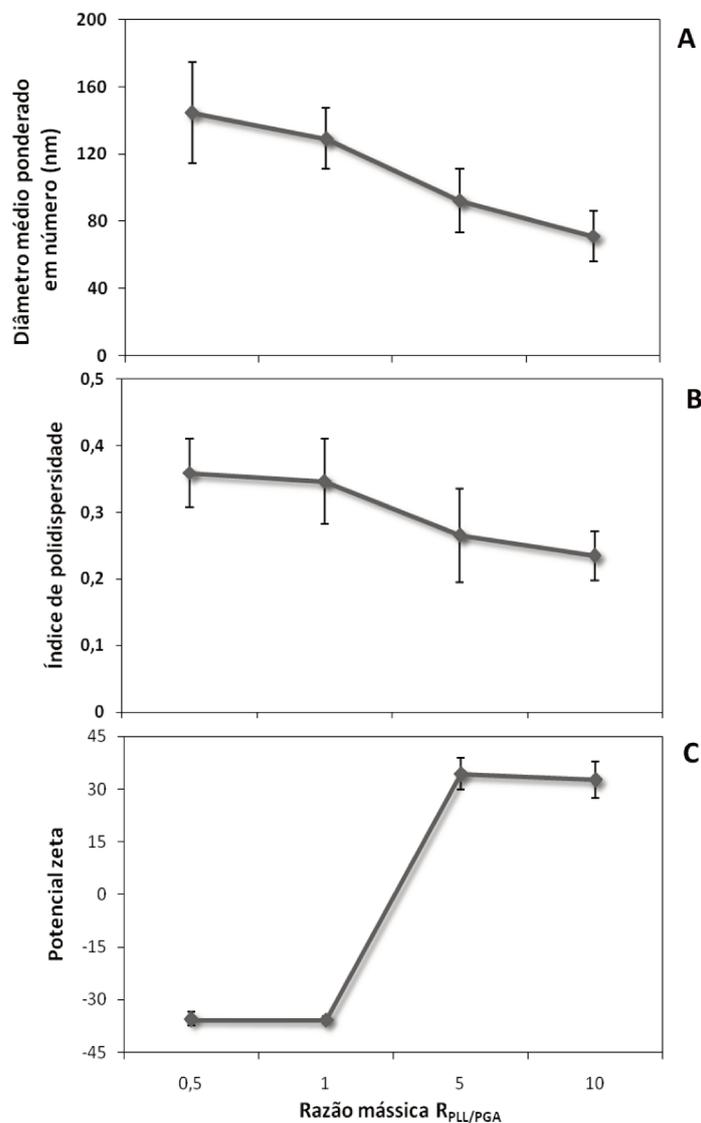
mesmos motivos apresentados na seção 3.1. A configuração do sistema microfluídico consiste na mesma aplicada para a complexação PLL/DNA que favoreceu a produção das nanopartículas. O esquema do processo de formação de complexos PLL/PGA em sistemas microfluídicos é apresentado na Figura 37.

Figura 37: Esquema representativo do processo de formação das nanopartículas PLL/PGA em sistemas microfluídicos



Dessa forma, complexos PLL/PGA foram produzidos nas $R_{PLL/PGA}$ de 0,5 a 10 em sistemas de focalização hidrodinâmica em uma vazão volumétrica total (Q_T) de $30\mu\text{L}/\text{min}$ a 4°C . Nesta configuração, utilizou-se uma corrente central aquosa (Q_C) de $15\mu\text{L}/\text{min}$, corrente lateral de PLL (Q_{PLL}) de $7,5\mu\text{L}/\text{min}$ e corrente lateral de DNA (Q_{DNA}) de $7,5\mu\text{L}/\text{min}$. A concentração de PLL ao final do processo foi (C_{PLL}) de (10 a $100\mu\text{g}/\text{mL}$). O perfil de distribuição de diâmetro em termos de intensidade e número nas diferentes razões mássicas é apresentado na Figura 38.

Figura 38: Complexos PLL/PGA produzidos em sistemas microfluídicos nas diferentes razões mássicas ($R_{PLL/PGA}$). (a) Diâmetro médio ponderado em número, (b) Índice de polidispersidade e (c) Potencial zeta. Os complexos foram processados a uma (Q_T) = 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, com uma vazão volumétrica da corrente central de (Q_C) = 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ e vazão volumétrica da soma das correntes laterais de (Q_L) = 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. As barras de erro representam o desvio padrão de triplicatas independentes



Os resultados apresentados na Figura 38 indicam um maior controle sobre o processo de produção dos complexos PLL/PGA quando processados em sistemas microfluídicos. Observa-se que o aumento da $R_{PLL/PGA}$ leva a formação de complexos uniformes e com carga superficial positiva, características que favorecem futuras aplicações em terapia gênica.

Nesta configuração do processo, a presença da corrente central aquosa e a temperatura a 4°C, exercem forte influência no modo de contato entre as moléculas PLL e PGA e na forma como estas se agregam. Neste sistema, o processo difusivo no sentido transversal aos fluxos é lento permitindo que as

moléculas então se encontrem ao longo do microcanal e que a interação eletrostática entre elas ocorra de forma organizada e não leve a formação de nanopartículas altamente polidispersas. Essa influência é vista quando se compara aos complexos PLL/PGA produzidos em *bulk* em temperatura ambiente, onde a forma de contato entre as moléculas ocorre de forma intensa e desorganizada.

Esse maior controle no processo de produção pode ser visto nas propriedades físico-químicas dos complexos formados. Conforme visto na seção 3.3, as menores $R_{PLL/PGA}$ avaliadas apresentam excesso de cargas negativas e conseqüentemente, a presença de PGA livre. Essa condição leva a formação de maiores tamanhos de partículas e polidispersidade como pode ser visto nos resultados apresentados na Figura 38. Os complexos PLL/PGA apresentaram uma faixa de diâmetro de 150 a 70 nm e polidispersidade de 0,35 a 0,2. Estes resultados mostram que a partir do aumento da concentração de PLL na $R_{PLL/PGA}$, menores e mais uniformes são os complexos formados.

O aumento da concentração de PLL permite a neutralização de cargas negativas, mesmo na presença de excesso de resíduos de PGA em razão da sua massa molar e conduz assim, a um melhor empacotamento desse complexo. Esse processo de neutralização de cargas é visto no potencial zeta da superfície da nanopartícula. A partir da $R_{PLL/PGA}$ de 5, há presença de excesso de cargas positivas e conseqüentemente o potencial zeta da superfície do complexo é positivo.

Dessa forma, a microfluídica é uma plataforma tecnológica potencial para a produção de complexos PLL/PGA, a qual permite um maior controle do processo de produção e é passível de inúmeras modulações para tornar este ainda mais eficiente. Nesta configuração de processo foi possível a formação de complexos uniformes, com cargas superficiais positivas e reprodutíveis, visto que o desvio padrão deste processo é bem menor comparado ao processo convencional *bulk*.

Para validar os complexos PLL/PGA produzidos, ensaios futuros serão conduzidos a fim de avaliar eficiência da adição de poliânions a PLL no intuito de reduzir a toxicidade causada em razão da presença de PLL livre, visto que as melhores propriedades físico-químicas encontradas dos complexos estão na presença de excesso de cargas positivas. Assim, será possível a aplicação dos

complexos em terapia gênica, através da inserção de DNA conduzindo a formação de um complexo ternário PLL/PGA/DNA.

4 CONCLUSÃO

O processo de síntese de nanopartículas baseadas em PLL/DNA via rota eletrostática em metodologia *bulk* é bem estabelecido na literatura. Problemas acerca deste, como a citotoxicidade, são a principal razão pela qual os complexos apresentam baixa eficiência de transfecção. Investigar a formação destes por meio de tecnologia microfluídica permite explorar infinitas modificações no intuito de contornar este problema, o que faz dessa uma versátil técnica.

Ensaio iniciais deste trabalho, mostraram a viabilidade da microfluídica como potencial plataforma na síntese de complexos PLL/DNA. As condições exploratórias de processamento que permitiram a formação de complexos uniformes e reprodutíveis, por meio do uso de uma corrente central aquosa e temperatura de 4°C. Para que melhores propriedades físico-químicas sejam ainda alcançadas, inúmeras modulações do sistema microfluídico podem ser realizadas.

Para validar a formação e a aplicação dos poliplexos PLL/DNA como carreadores, estes devem ser caracterizados por diferentes técnicas. Deve-se realizar análise de eletroforese em gel para confirmar a condensação do DNA pela PLL, realizar microscopia para determinar qual o tipo de nanoestrutura os poliplexos PLL/DNA apresentam e por fim, ensaios para avaliar a citotoxicidade e viabilidade de transfecção celular.

Já conhecendo a presença de toxicidade dos complexos PLL/DNA e para reduzir este efeito, investigou-se primeiramente a formação do complexo PLL/PGA, via microfluídica, que também conduziu a formação de complexos altamente organizados e reprodutíveis, utilizando as mesmas configurações do sistema para PLL/DNA.

Como trabalhos que reportam a síntese de ambos os complexos são escassos na literatura e considerando o tempo limitado para preparação das análises, os resultados iniciais apresentam a viabilidade da plataforma microfluídica no controle do processo de formação dos complexos quando

comparado ao método convencional. Os complexos aqui formados apresentam propriedades físico-químicas que permitem a aplicação da nanopartícula de PLL/DNA em terapia gênica e a incorporação de DNA ao complexo PLL/PGA.

Ensaio futuros podem ser conduzidos a fim de explorar as melhores condições para a síntese em sistemas microfluídicos na síntese do complexo e na sequência, serão realizados ensaios de citotoxicidade para a viabilidade de aplicação do complexo ternário PLL/PGA/DNA em terapia gênica.

CONCLUSÕES GERAIS

A rota de síntese química em sistemas microfluídicos foi capaz de produzir peptídeos que embora não tenham sido caracterizados via espectrometria de massas, os resultados apresentados mostram a potencialidade deste processo, que permite a reação de polimerização entre aminoácidos. Os resultados mostraram que a temperatura, o pH e o tempo de residência no microcanal exercem forte influência no processo de síntese de nanopartículas baseadas em peptídeos.

Esta possibilidade permitirá que estudos futuros sejam desenvolvidos pelo grupo de pesquisa para dar continuidade a investigação de combinações híbridas com outros aminoácidos, permitindo agora a síntese de polímeros do tipo *star shaped polymers* para futuros estudos de veiculação de fármacos.

As nanopartículas produzidas via rota de síntese eletrostática mostraram a viabilidade do uso da tecnologia microfluídica no controle e reprodutibilidade da formação de complexos de PLL/DNA e PLL/PGA. Os resultados indicaram a importância de uma complexação gradativa e organizada, levando em consideração a presença de uma corrente central e aquosa e a baixa temperatura para a formação de complexos com ótimas propriedades físico-químicas.

Estudos futuros podem ser conduzidos para investigar a adição de DNA ao complexo PLL/PGA para a formação de um complexo ternário PGA/PLL/DNA com propriedades físico-químicas ideais e com baixa citotoxicidade para então, avaliar a viabilidade de transfecção celular e liberação do DNA no interior das células.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Para dar continuidade às pesquisas futuras envolvendo a formação de nanopartículas em tecnologia microfluídica via rota de síntese química, sugere-se:

- Realizar ensaios controles isolados das condições de processamento (pH, temperatura, vazão volumétrica, $R_{Arg/DIC}$) e assim encontrar melhores condições de síntese.
- Realizar caracterização por espectrometria de massa para avaliar o grau de extensão da reação de polimerização.
- Avaliar a construção de geometrias que permita alcançar tempos de residência superiores a 1 min.
- Investigar o efeito da advecção caótica sobre a reação de polimerização pelo uso de dispositivos microfluídicos com presença de obstáculos.
- Realizar a reação de polimerização utilizando agente de acoplamento diferente das carbodiimidas e que não apresentem derivado de ureia como subproduto.

Quanto aos estudos futuros relacionados a síntese de nanopartículas baseadas em peptídeos via rota eletrostática, propõe-se:

- Explorar diferentes condições de processamento nos sistemas microfluídicos (FRR e vazão volumétrica total).
- Investigar o efeito da advecção caótica.
- Avaliar o efeito no processo de síntese utilizando diferentes PLL e PGA em diferentes massas molares.
- Utilizar a reação de reticulação investigada na primeira etapa desta dissertação para manter a estrutura eletrostática PLL/PGA mais estável.

REFERÊNCIAS

ABDELMOTY, F. ALBERICIO, L.A. CARPINO, B.M. FOXMAN, AND S. A. K. Solid Phase Peptide Synthesis. **Lett. Pep. Sci**, v. 1, n. 57, p. 1–55, 1994.

AKINC, A.; LANGER, R. Measuring the pH environment of DNA delivered using nonviral vectors: Implications for lysosomal trafficking. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 5, p. 503–508, 2002.

AL-WARHI, T. I.; AL-HAZIMI, H. M. A.; EL-FAHAM, A. Recent development in peptide coupling reagents. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 97–116, 2012.

ALAM, A.; AFZAL, A.; KIM, K. Chemical Engineering Research and Design Mixing performance of a planar micromixer with circular obstructions in a curved microchannel. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 3, p. 423–434, 2013.

ALAM, S. et al. Short peptide based nanotubes capable of effective curcumin delivery for treating drug resistant malaria. **Journal of nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 26, 2016.

ALBERICIO, F. Developments in peptide and amide synthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 3, p. 211–221, 2004.

ALBERICIO, F.; KRUGER, H. G. Therapeutic peptides. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 12, p. 1527–1531, ago. 2012.

ANSARI, M. A. Parametric study on mixing of two fluids in a three-dimensional serpentine microchannel. v. 146, p. 439–448, 2009.

ARMEN, R.; ALONSO, D. O. V.; DAGGETT, V. The role of α -, 310 -, and π -helix in helix→coil transitions. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 12, p. 1145–1157, 2003.

ATENCIA, J.; BEEBE, D. J. Controlled microfluidic interfaces. v. 437, n. September, 2005.

BAER, D. R.; ENGELHARD, M. H. Journal of Electron Spectroscopy and XPS analysis of nanostructured materials and biological surfaces. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 178–179, p. 415–432, 2010.

BALBINO, T. A. et al. Correlation of the physicochemical and structural properties of pDNA/cationic liposome complexes with their in vitro transfection.

Langmuir, v. 28, n. 31, p. 11535–11545, 2012.

BALBINO, T. A. et al. Microfluidic Assembly of pDNA/Cationic Liposome Lipoplexes with High pDNA Loading for Gene Delivery. **Langmuir**, v. 32, n. 7, p. 1799–1807, 2016.

BARBOSA, M.; MARTINS, M.; GOMES, P. Grafting Techniques towards Production of Peptide-Tethered Hydrogels, a Novel Class of Materials with Biomedical Interest. **Gels**, v. 1, n. 2, p. 194–218, 2015.

BARRÉ, A. et al. An Overview of the Synthesis of Highly Versatile N-Hydroxysuccinimide Esters. **Synthesis (Germany)**, 2016.

BAWA, R. et al. Self-assembling peptide-based nanoparticles enhance cellular delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine through caveolae-dependent endocytosis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 5, p. 647–654, 2012.

BEEBE, D. J.; MENSING, G. A; WALKER, G. M. Physics and applications of microfluidics in biology. **Annual review of biomedical engineering**, v. 4, p. 261–286, 2002.

CABEZA, V. S. et al. Size-Controlled Flow Synthesis of Gold Nanoparticles Using a Segmented Flow Micro fluidic Platform. **30th Anniversary Langmuir**, v. 28, n. 17, p. 7007–7013, 2012.

CAPRETTO, L. et al. Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 11–12, p. 1496–1532, 2013.

CHEE, G. K. et al. Delivery of polyethylenimine/DNA complexes assembled in a microfluidics device. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1333–1342, 2009.

CHEN, C. et al. 3D-printed microfluidic devices: fabrication, advantages and limitations-a mini review. **Analytical Methods**, v. 8, p. 6005–6012, 2016.

CHEN, C. L.; ROSI, N. L. Peptide-based methods for the preparation of nanostructured inorganic materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 11, p. 1924–1942, 2010.

CHEN, D. et al. Rapid discovery of potent siRNA-containing lipid nanoparticles enabled by controlled microfluidic formulation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 16, p. 6948–6951, 2012.

CHENG, C. et al. New Synthesis Route of Hydrogel through A Bioinspired Supramolecular Approach: Gelation, Binding Interaction, and in Vitro

Dressing. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 34, p. 19306–19315, 2015.

CHOE, U.-J. et al. Self-Assembled Polypeptide and Polypeptide Hybrid Vesicles: From Synthesis to Application. In: DEMING, T. (Ed.). . **Peptide-Based Materials**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 117–134.

CHOW, D. et al. Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 62, n. 4, p. 125–155, 2008.

CUI, H.; WEBBER, M. J.; STUPP, S. I. Self-assembly of peptide amphiphiles: From molecules to nanostructures to biomaterials. **Biopolymers**, v. 94, n. 1, p. 1–18, 20 jan. 2010.

CUSSLER, E. L. **Diffusion Mass Transfer in Fluid Systems**. Third Edit ed. [s.l: s.n.].

DASGUPTA, A.; MONDAL, J. H.; DAS, D. Peptide hydrogels. **RSC Advances**, v. 3, n. 24, p. 9117, 2013.

DAWSON, P. E.; KENT, S. B. H. S Ynthesis of Native Proteins By C Hemical Ligation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 923–960, 2000.

DEBUS, H.; BECK-BROICHSITTER, M.; KISSEL, T. Optimized preparation of pDNA/poly(ethylene imine) polyplexes using a microfluidic system. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 14, p. 2498, 2012.

DEMING, T. **Peptide-based Materials. Topics in Current Chemistry vol 310**. [s.l: s.n.].

DEMING, T. J. Synthetic polypeptides for biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 8–9, p. 858–875, 2007.

DESHAYES, S. et al. Self-assembling peptide-based nanoparticles for siRNA delivery in primary cell lines. **Small**, v. 8, n. 14, p. 2184–2188, 2012.

DESTREMAUT, F. et al. Microfluidics with on-line dynamic light scattering for size measurements. **Lab on a chip**, v. 9, n. 22, p. 3289–96, 2009.

EGELHAAF, S. U. et al. Determination of the size distribution of lecithin liposomes : a comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering. **Journal of Microscopy**, v. 184, n. 3, p. 214–228, 1996.

EL ANDALOUSSI, S. et al. Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 9, p. 3972–3987, 2011.

ELDER, R. M.; EMRICK, T.; JAYARAMAN, A. Understanding the effect of polylysine architecture on DNA binding using molecular dynamics simulations. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 3870–3879, 2011.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, 2009.

FLÖGEL, O. et al. Microreactor synthesis of β -peptides. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 42, p. 7000–7003, 2006.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122–128, 2015.

GALLAGHER, W. FTIR Analysis of Protein Structure. **Biochemistry**, n. 1958, p. 662–666, 1997.

GAZIT, E. Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 8, p. 1263, 2007.

HAMMAN, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1305–1322, 2010.

HASHMI, A.; XU, J. On the Quantification of Mixing in Microfluidics. 2014.

HASSAN, N.; CABUIL, V.; ABOU-HASSAN, A. Continuous multistep microfluidic assisted assembly of fluorescent, plasmonic, and magnetic nanostructures. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 7, p. 1994–1997, 2013.

HAU, W. L. W. et al. Surface-chemistry technology for microfluidics. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 13, n. 2, p. 272–278, 2003.

HE, C. et al. Stimuli-sensitive synthetic polypeptide-based materials for drug and gene delivery. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1, n. 1, p. 48–78, 2012.

HUA, J. et al. Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (γ -glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 879–892, 2016.

HUNG, L.-H. et al. PLGA micro/nanosphere synthesis by droplet microfluidic solvent evaporation and extraction approaches. **Lab on a chip**, v. 10, n. 14, p. 1820–1825, 2010.

ILIESCU, C. et al. On-chip controlled surfactant-DNA coil-globule

transition by rapid solvent exchange using hydrodynamic flow focusing. **Langmuir**, v. 30, n. 44, p. 13125–13136, 2014.

IM, J.-E. et al. Electrochemical detection of estrogen hormone by immobilized estrogen receptor on Au electrode. **Surface and Coatings Technology**, v. 205, n. SUPPL. 2, p. S275–S278, dez. 2010.

ISCHAKOV, R. et al. Peptide-based hydrogel nanoparticles as effective drug delivery agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 3517–3522, 2013.

JC, A.; RM, G.; MA, B. Chitosan/Poly(γ -glutamic acid) Polyelectrolyte Complexes: From Self-Assembly to Application in Biomolecules Delivery and Regenerative Medicine. **Research & Reviews: Journal of Material Sciences**, v. 4, n. 4, p. 19–21, 2016.

JEONG, J. H.; KIM, S. W.; PARK, T. G. Molecular design of functional polymers for gene therapy. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 11, p. 1239–1274, 2007.

KANG, H.-S. et al. Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly(γ -glutamic acid) for biological application: Preparation, physical properties, and cytocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, n. 1, p. 386–394, 5 jan. 2007.

KARNIK, R. et al. Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. **Nano Letters**, v. 8, n. 9, p. 2906–2912, 2008.

KATAYOSE, S.; KATAOKA, K. Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. **Bioconjugate Chemistry**, v. 8, n. 5, p. 702–707, 1997.

KENNEDY, M. J. et al. Analysis of a laminar-flow diffusional mixer for directed self-assembly of liposomes. **Biomicrofluidics**, v. 6, n. 4, p. 1–14, 2012.

KHOSHKBARCHI, M. K.; VERA, J. H. Effect of NaCl and KCl on the Solubility of Amino Acids in Aqueous Solutions at 298.2 K: Measurements and Modeling. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, n. 6, p. 2445–2451, 1997.

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549–559, 2007.

KRIKORIAN, V. et al. Polypeptide-based nanocomposite: Structure and properties of poly(L-lysine)/Na⁺-montmorillonite. **Journal of Polymer Science**,

Part B: Polymer Physics, v. 40, n. 22, p. 2579–2586, 2002.

KRISHNADASAN, S. et al. Intelligent routes to the controlled synthesis of nanoparticles. **Lab Chip**, v. 7, n. 11, p. 1434–41, 2007.

L. G. DE LA TORRE, T. A. BALBINO, C. C. SIPOLI, M. T. VITOR, A. F. O. Trends on Microfluidic Liposome Production Through Hydrodynamic Flow-Focusing and Microdroplet Techniques for Gene Delivery Applications. In: **Advances in Liposome Research**. New York: Nova Science Publishers, 2014. p. 63–96.

LAI, E.; VAN ZANTEN, J. H. Monitoring DNA/poly-L-lysine polyplex formation with time-resolved multiangle laser light scattering. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 2, p. 864–873, 2001.

LE, D. H. T. et al. Self-assembly of elastin-mimetic double hydrophobic polypeptides. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 4, p. 1028–1034, 2013.

LECHARDEUR, D.; VERKMAN, A. S.; LUKACS, G. L. Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 5, p. 755–767, 2005.

LEHTO, T. et al. A peptide-based vector for efficient gene transfer in vitro and in vivo. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 19, n. 8, p. 1457–67, 2011.

LITOWSKI, J. R.; HODGES, R. S. Designing heterodimeric two-stranded α -helical coiled-coils. Effects of hydrophobicity and α -helical propensity on protein folding, stability, and specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37272–37279, 2002.

LIU, G. et al. Biological Properties of Poly-L-lysine-DNA Complexes Generated by Cooperative Binding of the Polycation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34379–34387, 2001.

LO, C. T. et al. Controlled self-assembly of monodisperse niosomes by microfluidic hydrodynamic focusing. **Langmuir**, v. 26, n. 11, p. 8559–8566, 2010.

LOWIK, D. W. P. M. et al. Stimulus responsive peptide based materials. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 9, p. 3394–3412, 2010.

LU, M. et al. Microfluidic hydrodynamic focusing for synthesis of nanomaterials. **Nano Today**, v. 11, n. 6, 2016.

MA, K. et al. Injectable Self-Assembled Dipeptide-Based Nanocarriers for Tumor Delivery and Effective in Vivo Photodynamic Therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 45, p. 30759–30767, 2016.

MÄDE, V.; ELS-HEINDL, S.; BECK-SICKINGER, A. G. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, n. Scheme 1, p. 1197–1212, 2014.

MAJEDI, F. S. et al. Microfluidic synthesis of chitosan-based nanoparticles for fuel cell applications. **Chemical Communications**, v. 48, n. 62, p. 7744, 2012.

MANDAL, D.; NASROLAHI SHIRAZI, A.; PARANG, K. Self-assembly of peptides to nanostructures. **Org. Biomol. Chem.**, v. 12, n. 22, p. 3544–3561, 2014.

MARK, D. et al. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 3, p. 1153, 2010.

MART, R. J. et al. Peptide-based stimuli-responsive biomaterials. **Soft Matter**, v. 2, n. 10, p. 822–835, 2006.

MARTIN, M. E.; RICE, K. G. Peptide-guided gene delivery. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. E18–E29, 2007.

MAUDE, S. et al. Peptide Synthesis and Self-Assembly. In: DEMING, T. (Ed.). . **Peptide-Based Materials**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 27–69.

MISHRA, A. et al. Nanovesicles based on self-assembly of conformationally constrained aromatic residue containing amphiphilic dipeptides. **Langmuir**, v. 24, n. 9, p. 4571–4576, 2008.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827–10852, 2005.

MORAES, C. et al. **Métodos experimentales no estudo de proteínas**. [s.l: s.n.].

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134–179, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios da Bioquímica 3ª Edição Lehninger.pronto.parte2.pdf**. [s.l: s.n.].

NIÑO-PARIENTE, A. et al. Design of Poly- <scp>l</scp>-Glutamate-Based Complexes for pDNA Delivery. **Macromolecular Bioscience**, v. 201700029, p. 1700029, 2017.

NIU, L. et al. Dynamic assembly of DNA and polylysine mediated by

electric energy. **Chem. Commun.**, v. 51, n. 8, p. 1506–1509, 2015.

OPANASOPIT, P. et al. Chitosan enhances transfection efficiency of cationic polypeptides/DNA complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 410, n. 1–2, p. 161–168, 2011.

PACK, D. W. et al. Design and development of polymers for gene delivery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 7, p. 581–93, 2005.

PADHI, A. et al. Antimicrobial peptides and proteins in mycobacterial therapy: Current status and future prospects. **Tuberculosis**, v. 94, n. 4, p. 363–373, 2014.

PANDA, J. J.; CHAUHAN, V. S. Short peptide based self-assembled nanostructures: implications in drug delivery and tissue engineering. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 15, p. 4431, 2014.

PANDA, J. J.; VARSHNEY, A.; CHAUHAN, V. S. Self-assembled nanoparticles based on modified cationic dipeptides and DNA: novel systems for gene delivery. **Journal of nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 18, 2013.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147–166, 2012.

PESSOA, A. C. S. N.; SIPOLI, C. C.; DE LA TORRE, L. G. Effects of diffusion and mixing pattern on microfluidic-assisted synthesis of chitosan/ATP nanoparticles. **Lab Chip**, 2017.

PIHL, J.; KARLSSON, M.; CHIU, D. T. Microfluidic technologies in drug discovery microfluidic systems and technologies in the process of drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p. 1377–1383, 2005.

RADAIC, A.; PAULA, E. DE; JESUS, M. B. DE. Factorial Design and Development of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Gene Delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. xx, p. 1–8, 2014.

RAMAKERS, B. E. I.; VAN HEST, J. C. M.; LÖWIK, D. W. P. M. Molecular tools for the construction of peptide-based materials. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 8, p. 2743, 2014.

RECHES, M.; GAZIT, E. Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 625–627, 2003.

RECHES, M.; GAZIT, E. Formation of closed-cage nanostructures by self-assembly of aromatic dipeptides. **Nano Letters**, v. 4, n. 4, p. 581–585, 2004.

REKHA, M. R.; SHARMA, C. P. Oral delivery of therapeutic

protein/peptide for diabetes-Future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, n. 1, p. 48–62, 2013.

RENUKUNTLA, J. et al. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1–2, p. 75–93, 2013.

ROBISON, A. D. et al. Polyarginine Interacts More Strongly and Cooperatively than Polylysine with Phospholipid Bilayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, n. 35, p. 9287–9296, 2016.

RYDSTRÖM, A. et al. Direct translocation as major cellular uptake for CADY self-assembling peptide-based nanoparticles. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

SACKMANN, E. K.; FULTON, A. L.; BEEBE, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 181–9, 2014.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85–99, 2014.

SANTOSO, S. et al. Self-assembly of Surfactant-like Peptides with Variable Glycine Tails to Form Nanotubes and Nanovesicles. **Nano Letters**, v. 2, n. 7, p. 687–691, 2002.

SCHULTE, T. H.; BARDELL, R. L.; WEIGL, B. H. Microfluidic technologies in clinical diagnostics. **Clinica Chimica Acta**, v. 321, p. 1–10, 2002.

SHIH, I. L.; VAN, Y. T. The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresour Technol**, v. 79, n. 3, p. 207–225, 2001.

SIA, S. K.; WHITESIDES, G. M. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. **Electrophoresis**, v. 24, n. 21, p. 3563–3576, 2003.

SIMON, M. D. et al. Rapid Flow-Based Peptide Synthesis. **ChemBioChem**, v. 15, n. 5, p. 713–720, 21 mar. 2014.

SOUZA S.; SILVA, E.R.; ALVES, W.A., S. F.; K. J. R. Nanostructured Antigen-Responsive Hydrogels Based on Peptides for Leishmaniasis Detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 9, p. 1619–1629, 2017.

SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. **Reviews of Modern Physics**, v. 77, n. 3, p. 977–1026, 2005.

SREENATH, P. R. et al. Carbon dot – Unique reinforcing filler for polymer with special reference to physico-mechanical properties. **Polymer (United Kingdom)**, v. 112, n. February, p. 189–200, 2017.

STAWIKOWSKI, M.; FIELDS, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. Current Protocols in Protein Science. **Curr. Protoc. Protein Sci.**, v. 26, p. 1–17, 2002.

STEVENS, J. S. et al. Quantitative analysis of complex amino acids and RGD peptides by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). **Surface and Interface Analysis**, v. 45, n. 8, p. 1238–1246, 2013.

STOLL, V. S.; BLANCHARD, J. S. Buffers : Principles and Practice 1. v. 182, n. 9, p. 43–56, 1990.

SUN, B. et al. Application of microfluidics technology in chemical engineering for enhanced safety. **Process Safety Progress**, v. 35, n. 4, p. 365–373, dez. 2016.

SUN, L. et al. Soft Matter Tunable synthesis of self-assembled cyclic peptide nanotubes and nanoparticles †. **Soft Matter**, v. 11, p. 3822–3832, 2015.

TAN, M. L.; CHOONG, P. F. M.; DASS, C. R. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 184–193, 2010.

TANG, M. X.; SZOKA, F. C. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. **Gene Therapy**, v. 4, n. 8, p. 823–832, 1997.

TORCHILIN, V. P.; LUKYANOV, A. N. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: Challenges and solutions. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 6, p. 259–266, 2003.

UHLIG, T. et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 58–69, 2014.

ULIJN, R. V.; SMITH, A. M. Designing peptide based nanomaterials. **Chemical Society reviews**, v. 37, n. 4, p. 664–675, 2008.

VANDERMARLIERE, E. et al. Resolution of protein structure by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 35, n. 6, p. 653–665, out. 2016.

VENEZIA, A. M. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) for catalysts characterization. v. 77, p. 359–370, 2003.

WAGH, A. et al. A short circulating peptide nanofiber as a carrier for

tumoral delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 9, n. 4, p. 449–457, 2013.

WANG, Z. et al. Glycosylated aniline polymer sensor: Amine to imine conversion on protein–carbohydrate binding. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 46, n. 2, p. 183–189, ago. 2013.

WARD, C. M.; READ, M. L.; SEYMOUR, L. W. Systemic circulation of poly (L -lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. **Blood Journal**, v. 97, n. 8, p. 2221–2230, 2001.

WEIBEL, D. B.; WHITESIDES, G. M. Applications of microfluidics in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 584–591, 2006.

WELTY, JAMES R., WICKS, CHARLES E., WILSON, ROBERT E., RORRER, G. L. **Fundamentals of Momentum, Heat, and Mass Transfer**. [s.l.: s.n.].

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–73, 2006.

WU, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2009.

WU, T. et al. Fluorinated PEG-Polypeptide Polyplex Micelles Have Good Serum-Resistance and Low Cytotoxicity for Gene Delivery. **Macromolecular Bioscience**, v. 17, n. 8, p. 1–8, 2017.

XIA, Y. N.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography. **Annual Review Of Materials Science**, v. 37, n. 5, p. 551–575, 1998.

YIN, J. et al. Polyelectrolyte complexes based on chitosan and poly(L-glutamic acid). **Polymer International**, v. 56, n. 9, p. 1122–1127, set. 2007.

YUN, Y.; CHO, Y. W.; PARK, K. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 6, p. 822–832, 2013.

ZHANG, J. et al. Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review. **Lab Chip**, v. 16, n. 1, p. 10–34, 2016.

ZHANG, X. et al. Poly(l-lysine) nanostructured particles for gene delivery and hormone stimulation. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1699–1706, 2010.

ZHANG, Y.; GE, S.; YU, J. Chemical and biochemical analysis on lab-on-a-chip devices fabricated using three-dimensional printing. **TrAC - Trends in**

Analytical Chemistry, v. 85, p. 166–180, 2016.

ZHAO, C.-X.; MIDDELBERG, A. P. J. Synthesis and Characterization of Nanomaterials Using Microfluidic Technology. In: **Handbook of Nanoparticles**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 455–473.

ZHOU, M. et al. Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. **Biomaterials**, v. 30, n. 13, p. 2523–2530, 2009.

ZHU, L. et al. Cationic Polypeptoids with Optimized Molecular Characteristics toward Efficient Nonviral Gene Delivery. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 28, p. 23476–23486, 2017.

ANEXOS

ANEXO I

1. Avaliação das Condições Iniciais Para o Processo de Produção de Nanopartículas de Peptídeos

1.1 Escolha do Agente Tamponante

Para que melhores condições do processo sejam alcançadas, ensaios a fim de avaliar o efeito do uso de agente tamponante para a produção de nanopartículas peptídicas foram realizados. Conforme mencionado anteriormente, as nanopartículas formadas foram caracterizadas em relação ao diâmetro médio e índice de polidispersidade e então, esta análise servirá como base para a escolha do melhor modelo de tampão.

Vale ressaltar que os tampões são soluções aquosas formadas por um ácido fraco e um sal de sua base conjugada, ou uma base fraca e um sal de seu ácido conjugado. Sendo esses sistemas responsáveis pela manutenção do pH aproximadamente constante, mesmo após a adição de pequenas quantidades de ácido ou base (STOLL; BLANCHARD, 1990). Os tampões são extremamente importantes quando se trata de processos biológicos, visto que são utilizados a fim de manter constante o pH fisiológico, para futuras aplicações na liberação controlada de fármacos, por exemplo. Em termos de peptídeos e proteínas, é fundamental garantir a manutenção/estabilidade do pH, uma vez que grupos podem se ionizar e alterar as suas propriedades.

Dessa forma, conhecendo-se os aminoácidos que compõem uma proteína ou enzima e o pH do meio, na qual essa macromolécula se encontra é possível determinar se os grupos ácidos ou básicos estão protonados ou desprotonados. Essas informações podem ser obtidas a partir da análise dos valores de pK_a dos aminoácidos que compõem essa macromolécula.

Os valores de pK_a são determinados principalmente através de titulação, a qual consiste na adição ou remoção gradual de prótons. Em se tratando da Arg os seus referentes pK_a são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de pK_a referentes ao aminoácido ARG. Fonte: Adaptado de Nelson, Cox (2002).

Aminoácido	Nome Abreviado	pK_1 (-COOH)	pK_2 (-NH₃⁺)	pK_R (Grupo R)	pI
Arginina	Arg	2,17	9,04	12,48	10,76

Conforme os valores de pK_a apresentados referentes ao aminoácido Arg, são possíveis verificar a presença de três estágios distintos, correspondente a desprotonação dos três diferentes grupos da ARG. A remoção de um próton ocorre com o aumento do pH, sendo que a desprotonação ocorre quando o pH atinge o pK_a do grupo a ser ionizado.

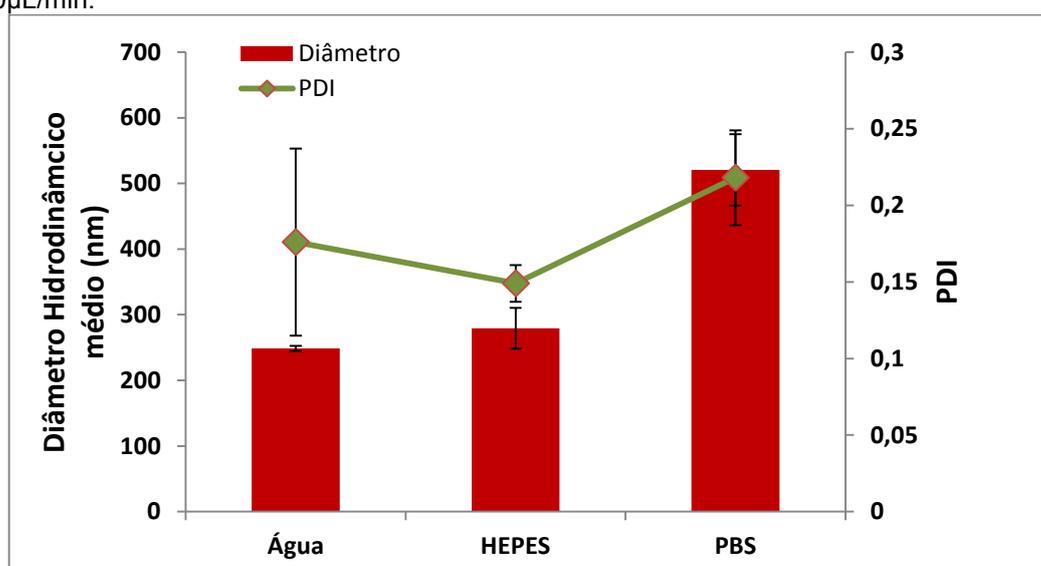
Quando o aminoácido se encontra em pH muito baixo, ele está em sua forma totalmente protonada e assim, não consegue participar do processo de reticulação química. Quando atinge o primeiro estágio com pK_a igual a 2,17, o grupo (-COOH) se ioniza e dar-se início a remoção do segundo próton. Somente quando atinge o segundo estágio com pK_a de 9,04, a remoção do próton é realmente completa e dar-se início a remoção do próton seguinte. Por essa razão, utilizamos tampão com pH 7, pois nesta faixa de pH a Arg está completando o processo de desprotonação do grupo (-NH₃⁺), tornando-a disponível para participar do processo de reticulação química para produção de nanopartículas peptídicas, além de ser um pH comum do meio fisiológico.

Sendo assim, foi avaliado o uso de dois diferentes agentes tamponantes para a manutenção do pH no processo de síntese de nanopartículas peptídicas. Os ensaios foram realizados avaliando o efeito do tampão HEPES (do inglês, Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico) e da solução salina tamponada com fosfato (do inglês, Phosphate-Buffered Saline - PBS) e estes, foram usados como solventes na solubilização da Arg. O tampão HEPES foi preparado a 100 mM em pH 7 e PBS em pH 7,2 (diluído 1x). Além dos tampões, foi também testado a água como solvente para solubilização da Arg, na forma de um ensaio controle para comparar com o uso de tampões na produção de nanopartículas.

Para avaliar a influência da água e dos agentes tamponantes na síntese de nanopartículas peptídicas, foi utilizado o DFHTL como base para o processo de produção, no qual a corrente central de DIC (0,5 mM) a uma vazão volumétrica (Q_{DIC}) de 30 μ L/min foi focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de Arg (0,5 mM) a uma vazão volumétrica total (Q_{Arg}) de 150

$\mu\text{L}/\text{min}$. Em seguida, as propriedades físico-químicas das nanopartículas foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering – DLS) e os resultados são apresentados na Figura 39.

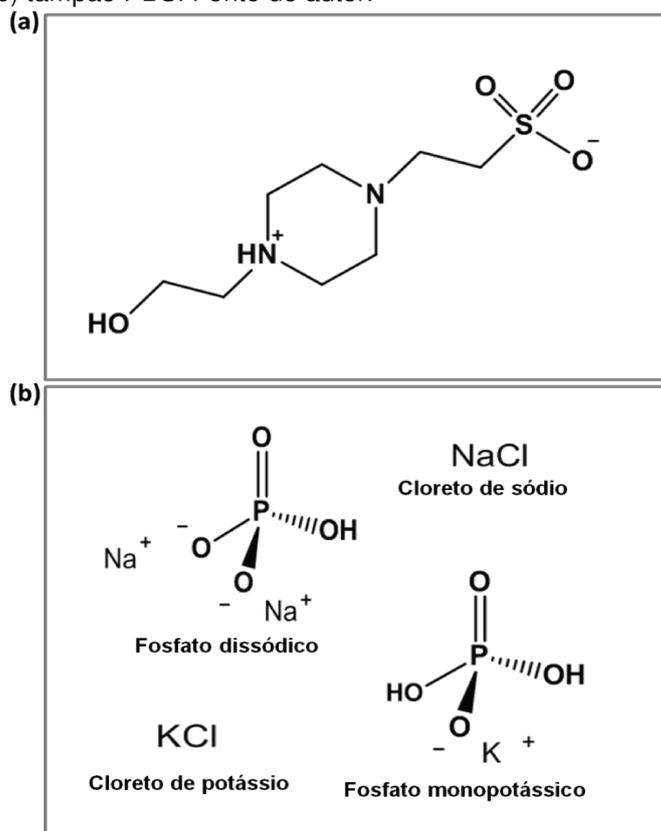
Figura 39: Avaliação da influência da água e dos agentes tamponantes no processo de produção de nanopartículas peptídicas e caracterização em termos de diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersidade com base no desvio padrão de triplicatas independentes. O ensaio avaliou o uso de água ultra purificada, HEPES (100 mM) em pH 7 e PBS (diluído uma vez) para solubilizar ARG. O processo microfluídico ocorreu no DFHTL, a 25°C , com a corrente central de DIC a uma vazão volumétrica (Q_{DIC}) de $30\mu\text{L}/\text{min}$, focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de Arg a uma vazão volumétrica total (Q_{Arg}) de $150\mu\text{L}/\text{min}$.



De acordo com os resultados apresentados, observa-se que os agentes tamponantes possuem certa influência na produção de nanopartículas peptídicas, visto que ambos influem de diferente forma no diâmetro e PDI. Observa-se que a solução de PBS conduziu a formação de nanopartículas com dimensões e polidispersidade diferentes dos valores encontrados para o arranjo experimental utilizando água. Por outro lado, a utilização da solução de HEPES promoveu à formação de sistema coloidal com aspectos similares aqueles produzidos a partir da utilização de água, de modo que os parâmetros não se distinguem dentro dos desvios padrões de cada medida.

Para melhor compreender os resultados apresentados, torna-se necessário a análise dos compostos responsáveis pelo efeito tamponante nas soluções de HEPES e PBS. A solução de HEPES é formada por um sal orgânico, com caráter zwitterionico, enquanto a solução de PBS é composta pelos sais cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato dissódico e fosfato monopotássico. Os agentes tamponantes são apresentados na Figura 40.

Figura 40: Imagem representativa dos componentes dos agentes tamponantes: (a) tampão HEPES e (b) tampão PBS. Fonte do autor.



Os sais, componentes dos agentes tamponantes, são responsáveis pelo efeito distinto nos valores de diâmetro e polidispersidade, sendo possível relacionar a característica desses, com o fenômeno de *salting*. Estudos foram desenvolvidos correlacionando o efeito da solubilidade de aminoácidos em função do aumento da concentração de cloreto de sódio e cloreto de potássio. O estudo em questão mostrou a diminuição da solubilidade de aminoácidos a partir do aumento da concentração de cloreto de sódio, de modo que essa diminuição da solubilidade foi justificada pelo efeito *salting out* (KHOSHKBARCHI; VERA, 1997).

Este efeito consiste no deslocamento das moléculas de água de hidratação do aminoácido para a solvatação dos íons constituintes dos sais. Esse fenômeno relaciona-se com a maior entalpia de solvatação dos íons se comparada à entalpia de solvatação dos aminoácidos, sendo que essa grandeza deve variar para diferentes íons em função, principalmente, de sua carga e raio iônico. O efeito de diferentes íons sobre o fenômeno *salting* foi estudado em uma série de cátions e ânions de acordo com sua potencialidade para promover a

interação com as moléculas de água e promover o efeito *salting*. Nesta série, destaca-se a aptidão dos íons cloreto e fosfato, sendo os maiores responsáveis pelo efeito de diminuição de solubilidade de biomoléculas em soluções contendo sais.

Nesse sentido, o maior diâmetro e índice de polidispersidade para as nanoestruturas formadas utilizando o PBS pode-se ser explicado pela diminuição de solubilidade seguida da autoagregação dos aminoácidos frente a agentes caotrópicos – íons cloreto e fosfato. O efeito de diminuição de solubilidade dos aminoácidos é menos expressivo na solução de HEPES devido à menor capacidade do íon zwitterionico em atuar como agente caotrópico, ou seja, menor capacidade em deslocar as moléculas água de hidratação dos aminoácidos.

Dessa forma, o tampão HEPES foi escolhido para a produção das nanopartículas peptídicas. Outros fatores influenciaram nesta escolha como, por exemplo, apresentar os valores de pK_a entre 6 e 8, ser solúvel em água, impermeabilidade à membrana, estável quimicamente e enzimaticamente, fácil de preparar e seus valores de pK_a permanecerem na mesma faixa quando há variação de temperatura.

1.2.1 Avaliação da razão molar ($R_{Arg/DIC}$) e concentração total Arg/DIC na síntese de nanopartículas peptídicas.

No intuito de proporcionar uma síntese efetiva de nanopartículas peptídicas, análises em relação à razão entre Arg e DIC que melhor conduzem à produção das nanopartículas foram realizadas. Em suma, este estudo investigou qual é a concentração ideal tanto de Arg quanto DIC para obtenção de nanopartículas peptídicas com melhores propriedades físico-químicas.

Para dar início, este estudo exploratório ocorreu em duas etapas: (i) Avaliação da razão molar ($R_{Arg/DIC}$) de 0,25 a 25. (ii) Escolha da concentração total de Arg/DIC. Os ensaios foram realizados a fim de encontrar as melhores condições de processo para a síntese de nanopartículas peptídicas.

1.2.2 Efeito da razão molar ($R_{Arg/DIC}$) de 0,25 a 25

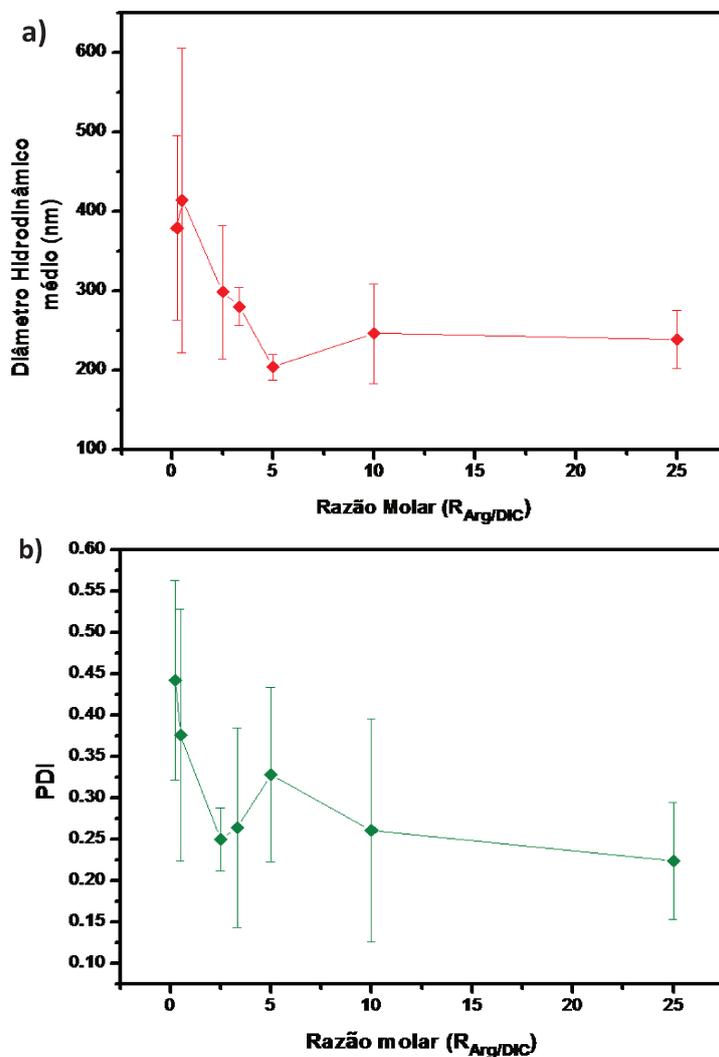
Nesta etapa, avaliou-se o efeito da razão molar entre arginina e DIC ($R_{Arg/DIC}$). Para tal, os ensaios foram conduzidos fixando a concentração inicial de Arg em 0,5 mM em todas as ($R_{Arg/DIC}$) avaliadas, enquanto a concentração de DIC variou entre 0,1 e 10 mM. A razão molar ($R_{Arg/DIC}$) é apresentada de acordo com a Equação 1.

$$R_{[Arg]/[DIC]} = \frac{[Arg] \times Q_{Arg}}{[DIC] \times Q_{DIC}} \quad (3)$$

Onde [Arg] é a concentração de Arginina, Q_{Arg} é a vazão volumétrica de Arg, [DIC] equivale à concentração do agente de acoplamento DIC e Q_{DIC} é a vazão volumétrica do agente de acoplamento DIC.

Conforme apresentado na equação, o cálculo da razão molar é dependente das vazões de ambos reagentes. Neste estudo, o processo microfluídico foi preparado preenchendo a corrente central com DIC a uma vazão volumétrica (Q_{DIC}) de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, a qual foi focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de Arg a uma vazão volumétrica total (Q_{Arg}) de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. Essas condições de vazão são invariáveis, ou seja, apenas a concentração de DIC é variável neste processo. Em seguida, as nanopartículas foram sintetizadas e avaliadas quanto as suas propriedades físico-químicas via espalhamento de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering – DLS). Os resultados são apresentados na Figura 41.

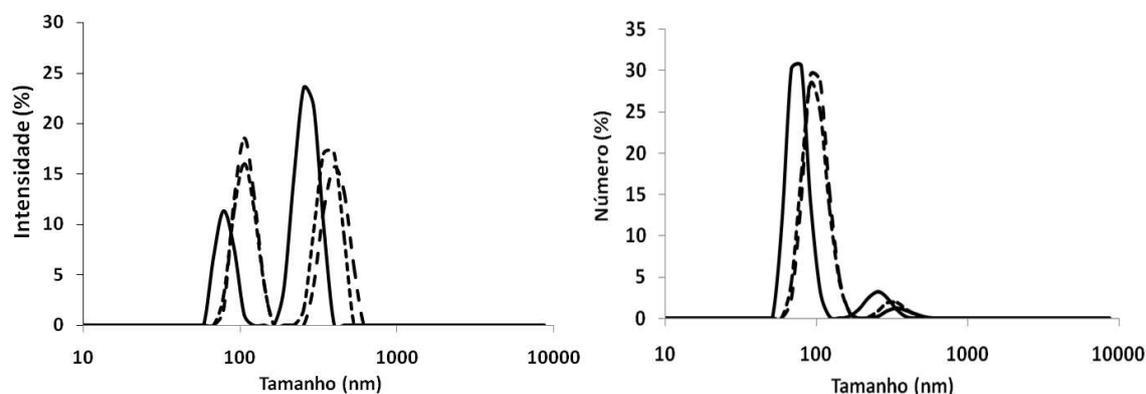
Figura 41: Caracterização das nanopartículas peptídicas em termos de: (a) diâmetro hidrodinâmico médio e (b) índice de polidispersidade. As nanopartículas foram avaliadas quanto à proporção de Arg/DIC através da variação da ($R_{Arg/DIC}$) à 25°C. Arg foi preparada a 0,5 mM enquanto DIC variou de 0,1 a 10 mM e as correntes foram bombeadas a uma vazão volumétrica de 30 μ L/min (central) e 150 μ L/min (duas correntes laterais). Os resultados apresentam desvio padrão de triplicatas independentes.



Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram a influência de ($R_{Arg/DIC}$) no tamanho e polidispersidade das nanopartículas peptídicas formadas. Analisando a razão molar, é possível observar claramente que à medida que ($R_{Arg/DIC}$) diminui tanto o diâmetro médio quanto o PDI tendem a aumentar. Este comportamento está associado diretamente à concentração de DIC, ou seja, quando ($R_{Arg/DIC}$) diminui, a concentração de DIC no sistema aumenta. Observa-se assim, que há uma tendência que associa o aumento do diâmetro médio e polidispersidade das nanopartículas ao aumento da concentração de DIC no sistema.

No entanto, pode-se observar que este comportamento não é linear, pois quando a concentração de DIC é próxima a concentração da Arg, com ($R_{Arg/DIC}$) de 5, o diâmetro médio diminui, apesar do PDI continuar um pouco elevado. Neste caso, pode-se aceitar que as concentrações de Arg/DIC são proporcionais e suficientes para que o processo de reticulação química ocorra e que as nanopartículas peptídicas sejam formadas em menor diâmetro. Como ($R_{Arg/DIC}$) de 5 apresenta as uma das melhores características físico-químicas das nanopartículas, o seu gráfico de distribuição de diâmetro em termos de intensidade e número é apresentado na Figura 42.

Figura 42: Distribuição de tamanho por intensidade e número da ($R_{Arg/DIC}$) de 5. Esta razão molar apresentou as melhores características físico-químicas. Resultados obtidos através da técnica de (Dynamic Light Scattering – DLS).



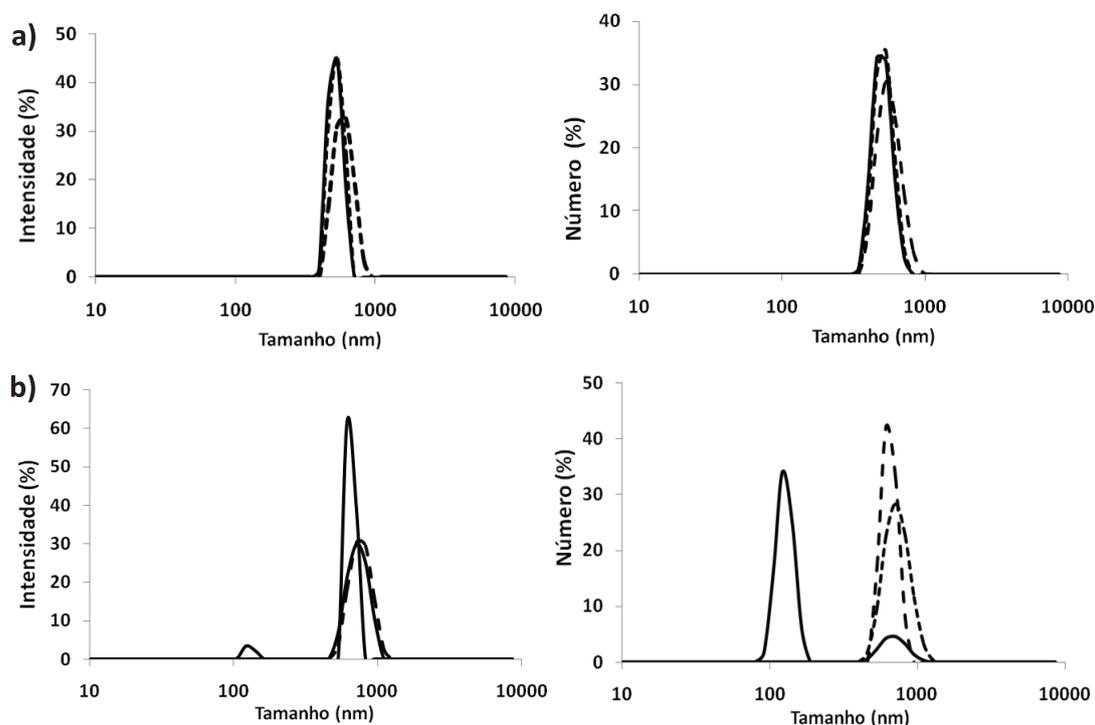
A distribuição de diâmetro em termos de intensidade e número apresenta de forma mais detalhada o resultado encontrado para ($R_{Arg/DIC}$) de 5 na Figura 41. Vale ressaltar que a intensidade de luz espalhada, está relacionada à capacidade das partículas em dispersarem a luz, a qual é proporcional a sexta potência do seu diâmetro. Em contrapartida, a análise de distribuição por número é diretamente proporcional ao diâmetro, permitindo assim, que a população predominante de partículas seja identificada (BALBINO et al., 2012; EGELHAAF et al., 1996).

Pela análise dos gráficos apresentados na Figura 42, observa-se que há uma alta intensidade de população de partículas em dois domínios de diâmetro, em torno de 100 e 400 nm. Logo, as nanopartículas foram produzidas em diversos tamanhos que estão incluídos nesta faixa de diâmetro e isto está diretamente associado a um valor mais alto de polidispersidade. Para identificar qual o tamanho das nanopartículas que predominam neste sistema, basta

analisar o gráfico da distribuição por número e, de acordo com este, a presença relevante de nanopartículas está em torno de 100 nm (Figura 5B). Este resultado confirma o tamanho encontrado para ($R_{Arg/DIC}$) de 5, pois a mesma apresenta um diâmetro médio de aproximadamente 200nm por número.

Para uma melhor análise dos resultados encontrados, ensaios controles foram conduzidos a fim de avaliar o diâmetro médio e PDI de um processo microfluídico contendo apenas Arg ou DIC. Para tal, utilizaram-se as mesmas condições de processamento em termos de vazão volumétrica. No primeiro ensaio a corrente central foi preenchida com álcool isopropílico e Arg nas correntes laterais e no segundo, a corrente central foi preenchida com DIC e tampão HEPES nas correntes laterais. Os resultados de distribuição em termos de intensidade e número são apresentados na Figura 43.

Figura 43: Distribuição de diâmetro médio em termos de intensidade e número de um processo microfluídico de apenas reagentes: (a) Arg a uma concentração inicial de 0,5 mM e (b) DIC a uma concentração inicial de 0,5mM. O ensaio ocorreu em microdispositivo DFHTL a uma vazão volumétrica da corrente central de 30 μ L/min e a soma das correntes laterais a 150 μ L/min.



Na análise de um processo microfluídico contendo apenas Arg ou DIC, vale ressaltar que não há formação de partículas e sim, pequenos aglomerados, pois os reagentes foram analisados isolados, sem ocorrer processo de reticulação química. Porém, a análise de diâmetro é realizada pela técnica do

DLS, a qual consiste na medida do movimento browniano das partículas, calculando o diâmetro de acordo com o processo de difusão no sistema (DESTREMAUT et al., 2009). Como a análise é feita considerando o movimento de partículas esféricas e nesta situação têm-se apenas Arg ou DIC em sua forma linear, os quais, mesmo formando pequenos agregados, podem levar a resultados inconclusivos.

A Figura 43 referente à distribuição de diâmetro em relação à Arg mostram uma alta intensidade de população em torno de 500 nm e com apenas um domínio de diâmetro na amostra, o que leva a um baixo PDI. Este resultado pode ser confirmado através da análise de distribuição por número, o qual apresenta população relevante de partículas também em torno de 500 nm. Já o contrário é observado para o DIC, o qual nitidamente se trata de uma amostra polidispersa. Nota-se que há duas populações distintas em torno de 100 e 700 nm e pela distribuição de número é possível constatar que as duas populações de diâmetro são relevantes, porém em torno de 700 nm há uma maior presença na amostra.

A análise dos reagentes isolados apresenta alto valor de diâmetro para ambos os casos e esta situação passa a ser compreendida quando se trata da reticulação química. O processo de reticulação entre Arg e DIC ocorre quando estes se ligam quimicamente e então, a formação de uma sequência de peptídeos é iniciada e, como estes estão em um sistema fluídico, tende a se aglomerar em um arranjo coloidal. É nesta situação, que a sequência de peptídeos pode ser organizar na forma de uma nanopartícula e assim, apresentar características físico-químicas ótimas, com menor valor de diâmetro e PDI quando comparado aos reagentes isolados, o que confirma os resultados apresentados na Figura 41 e permite também que a técnica do DLS forneça informações confiáveis.

Dessa forma, continuando as análises referentes à Figura 41, pode-se considerar que em maiores concentrações de DIC no sistema, provavelmente maior é o grau de reticulação e conseqüentemente, maior é a sequência de peptídeos. Isso ocorre devido ao excesso de agente de acoplamento no sistema, o qual conduz a uma maior quantidade de Arg participando da ligação peptídica e assim, potencializando a formação de nanopartículas peptídicas de maiores tamanhos e polidispersidade.

Entretanto, para afirmar que em maiores concentrações de DIC no sistema, existe um maior grau de reticulação, o qual conduz a formação de nanopartículas com maior sequência de aminoácidos, é necessária a caracterização dessas, em demais técnicas de análise de nanoestruturas, além de diâmetro médio e PDI. A partir de novas análises pode-se confirmar a presença de ligações peptídicas e saber, por exemplo, a quantidade aproximada de aminoácidos que participam da formação da nanopartícula.

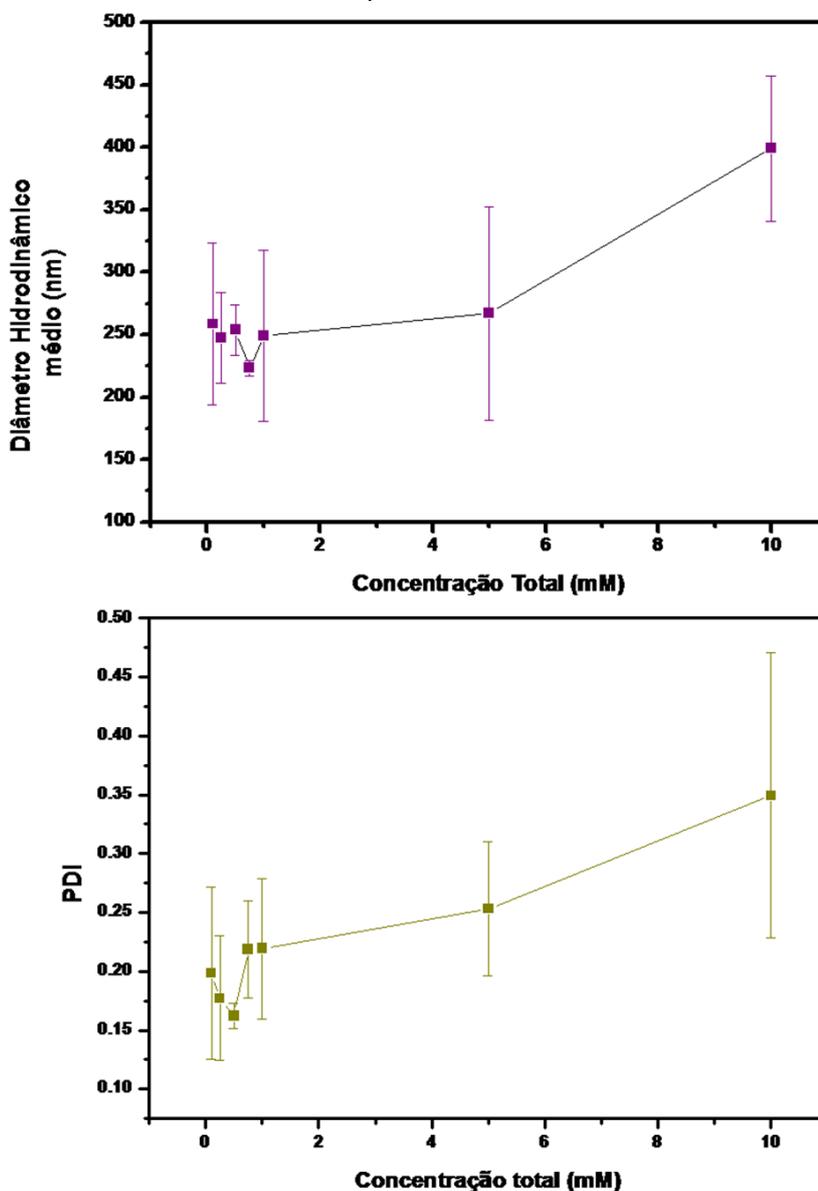
Nesta fase, para dar sequência nas etapas de avaliação das melhores condições para a formação de nanopartículas peptídicas, optou-se por continuar utilizando a ($R_{Arg/DIC}$) de 5, em razão das suas boas características físico-químicas.

1.2.3 Efeito da concentração total de Arg e DIC

A partir do estudo do efeito da razão molar ($R_{Arg/DIC}$) realizada na etapa anterior, efetuou-se a análise da concentração total dos reagentes. Para isso, ($R_{Arg/DIC}$) foi mantido em 5 e a concentração de Arg e DIC foram aumentadas proporcionalmente, respeitando-se o valor de ($R_{Arg/DIC}$).

Para dar início ao ensaio, as condições de processamento em termos de vazão volumétrica foram mantidas as mesmas da etapa anterior. Neste estudo, a variável do processo é a concentração inicial de Arg e DIC, já que a ($R_{Arg/DIC}$) se mantém constante. Para tal, a concentração de ambos irá variar na mesma proporção, ou seja, tanto a concentração inicial de Arg quanto DIC, irá variar ao mesmo tempo e em concentrações que vão de 0,1 a 10 mM. Na sequência, as nanopartículas peptídicas foram avaliadas em termos de diâmetro médio e índice de polidispersidade. Os resultados são apresentados conforme Figura 44.

Figura 44: Efeito da concentração total do sistema, avaliado a partir da variação da concentração inicial de ARG e DIC, mantendo-se RARG/DIC igual a 5. Nanopartículas foram produzidas variando a concentração de 0,1 a 10 mM em microdispositivo DFHTL, a 25°C. A vazão volumétrica (Q_{DIC}) na corrente central foi de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a vazão volumétrica (Q_{Arg}) da soma das correntes laterais foram de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 44, pode-se observar a forte influência da concentração total sobre a produção de nanopartículas peptídicas, afetando diretamente o tamanho e polidispersidade dessas. Nota-se que a partir do aumento da concentração total, as nanopartículas se tornam maiores e mais polidispersas.

As concentrações que vão até 5 mM, apresentaram a mesma faixa de diâmetro e polidispersidade. Porém, quando as concentrações atingem 10 mM, a diferença é observada e maiores tamanhos de partículas são alcançados. Isto

pode estar associado à ideia de que maiores quantidades de Arg e DIC potencializam o processo de reticulação química, formando uma maior sequência peptídica e assim, conduzindo à formação de nanopartículas de maiores diâmetros.

Apesar da influência que maiores concentrações de Arg e DIC, promovam uma maior reticulação química, esta, só pode ser confirmada através de outras técnicas de caracterização, as quais comprovam a presença da formação da ligação amida em maior ou menor quantidade. Por essa razão, é necessário avaliar essa influência a fim de verificar se estes contribuem definitivamente no processo de reticulação química.

Por enquanto, como as variações das menores concentrações apresentaram a mesma faixa de diâmetro, optou-se por utilizar a concentração de 0,5 mM para ambas às concentrações iniciais de Arg e DIC nas etapas seguintes. Esta escolha foi feita baseando-se nas propriedades físico-químicas, pois obteve a formação de nanopartículas peptídicas com menores tamanhos e polidispersidade.

1.2.4 Efeito do catalisador N-Hidroxisuccinimida (NHS) e influência da temperatura no processo de síntese de nanopartículas peptídicas

Neste estudo, avaliou-se a influência que o catalisador N-Hidroxisuccinimida (NHS) tem sobre o processo de reticulação química para a formação das nanopartículas peptídicas. Este reagente é bastante utilizado quando se trata de síntese peptídica, pois auxilia na formação da ligação amida, através de uma aceleração da reação e torna possível que esta seja realizada em menor tempo quando comparada a uma reação sem a sua presença.

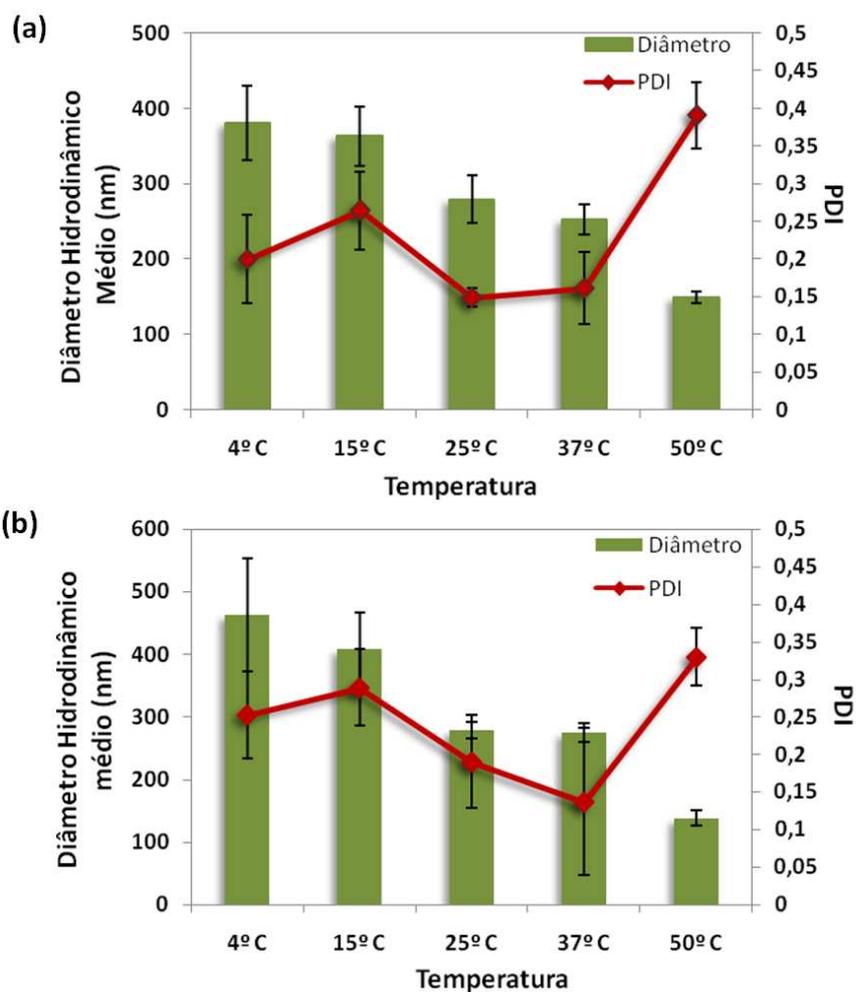
Após o aminoácido adicionar-se de forma nucleofílica no carbono da carbodiimida, ocorre a formação de um intermediário (O-acilisourea). Em seguida, o catalisador se adicionará a carbonila do O-acilisourea de forma a gerar um éster succimidil, cuja carbonila é muito reativa favorecendo a adição nucleofílica de um segundo aminoácido, efetivando assim, a formação da ligação peptídica (Figura 11).

Para melhor avaliar os efeitos do NHS na formação da ligação amida, foi avaliada simultaneamente a influência da temperatura no processo de síntese de nanopartículas. Portanto, testes iniciais exploraram os efeitos causados no

sistema através da variação da temperatura com a presença e sem a presença do catalisador.

Para dar início aos ensaios, as condições de processamento utilizadas são aquelas que apresentaram as melhores condições nas etapas anteriores. Já a influência que a temperatura exerce no sistema será avaliada em duas situações diferentes, conforme mencionado anteriormente, com e sem a presença de catalisador. As nanopartículas formadas foram caracterizadas de acordo com o diâmetro e índice de polidispersidade. Os resultados encontrados são apresentados conforme Figura 45.

Figura 45: Produção de nanopartículas peptídicas avaliando a influência do catalisador NHS: (a) Sem presença de NHS e (b) Com a presença de NHS. As nanopartículas também foram produzidas a fim de investigar os efeitos causados pela variação de temperatura. Os ensaios foram conduzidos em microdispositivos DFHTL, com uma corrente central de DIC (0,5 mM) a (Q_{DIC}) de $30\mu\text{L}/\text{min}$, focalizada hidrodinamicamente por duas correntes laterais de Arg (0,5 mM) a (Q_{Arg}) total de $150\mu\text{L}/\text{min}$.



De acordo com os resultados apresentados, observa-se que as nanopartículas peptídicas produzidas apresentam o mesmo comportamento nas

duas condições diferentes, com e sem NHS. Os resultados apresentam valores aproximados em termos de diâmetro médio e índice de polidispersidade, mas a comparação entre esses mostra que o sistema com a presença de catalisador conduz à obtenção de nanopartículas com maiores diâmetros e PDI, logo, torna-se necessário a caracterização dessas por diferentes técnicas.

Sabe-se que o NHS participa ativamente do processo de síntese peptídica e que sua maior contribuição está associada à aceleração das taxas de reação. Dessa forma, ele age para que o processo de reticulação química ocorra em maior proporção, o que leva a síntese de um maior número de peptídeos e conseqüentemente, a formação de nanopartículas em diâmetros maiores. Por essa razão, optou-se por utilizar NHS nas etapas seguintes de produção de nanopartículas peptídicas mesmo apresentando maiores diâmetros, pois o mesmo, traz benefícios para a síntese peptídica.

Já em relação à influência da temperatura no processo de síntese, observa-se claramente que à medida que a temperatura no sistema aumenta, o diâmetro médio tende a diminuir. Isto pode estar associado a um aumento da capacidade da sequência peptídica em se organizar em nanopartículas e quanto mais organizada, menor será o diâmetro. Para melhor compreensão deste resultado, alguns conceitos devem ser levados em consideração. Primeiramente, deve-se lembrar que o processo microfluídico para a produção de nanopartículas é denominado predominantemente por um regime laminar e neste, a mistura entre os fluxos de fluidos ocorre principalmente por um processo de difusão.

A temperatura tem forte influência sobre o processo de difusão, ainda mais quando se trabalha em pequenas dimensões, na qual processos de transferência de massa e calor são intensificados. Logo, com o aumento da temperatura no sistema, o processo de difusão tende a aumentar (CUSSLER, 2009; WELTY *et al.* 2008). Isso ocorre devido à influência que a temperatura tem sobre o movimento das moléculas, pois com o aumento desta, maior será a velocidade com que as moléculas se movimentam e assim, maior e mais rápido será o efeito da difusão. Em associação ao aumento da difusão, vale ressaltar que a solubilidade do agente de acoplamento no sistema também é aumentada, pois o mesmo é solubilizado em álcool isopropílico. Assim, o aumento da temperatura favorece a mistura entre as correntes de Arg e DIC e o conseqüente, o aumento da eficiência de síntese peptídica.

Conforme visto nos resultados, a uma maior temperatura é onde o processo de difusão é acentuado e então, são produzidas nanopartículas peptídicas com menor diâmetro, porém polidispersas em relação às demais. Essa alta polidispersidade traduz a necessidade de se aprimorar o processo microfluídico de forma que se tenha um maior controle na síntese peptídica. Por essa razão, para confirmar qual a melhor condição deve ser operado o sistema microfluídico para obtenção de nanopartículas com melhores propriedades físico-químicas, diferentes técnicas de caracterização, foram aplicadas em extremas temperaturas e assim, aquela que melhor favorecer o processo de síntese peptídica será utilizada no processo microfluídico.

ANEXO II

1. Espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica comumente utilizada na identificação e quantificação de estruturas orgânicas e inorgânicas, principalmente em se tratando de peptídeos e proteínas. A técnica se baseia na massa molecular, levando em consideração os isótopos constituintes da estrutura e suas respectivas proporções (VANDERMARLIERE et al., 2016). Para tal, as moléculas orgânicas de uma amostra são convertidas em espécies iônicas na fase gasosa, que são subsequentemente detectados de acordo com sua razão massa (m) sobre carga (z), m/z.

Ao contrário das técnicas de XPS e FT-IR que fornecem informações a respeito das ligações químicas presentes nas nanoestruturas em uma análise qualitativa, o MS é capaz de quantificar a sequência primária dos peptídeos através da massa molecular desses. Por essa razão, está se torna uma das técnicas mais importantes para a caracterização das nanopartículas peptídicas, visto que essa fornece informações sobre a real condição da nanoestrutura e se, no caso deste projeto, a síntese peptídica foi realmente sintetizadas.

Apesar de ser a principal técnica de caracterização de peptídeos, equipamentos disponíveis para realizar as análises são escassos, principalmente durante a realização desta pesquisa de mestrado. Este projeto de pesquisa encontrou dificuldades para realizar estas análises. A UNICAMP possui diversos equipamentos de espectrometria de massas. Apesar de ter sido contatada a central analítica do IQ, a administração encaminhou esta solicitação de análise para um professor do Instituto de Química – IQ, o responsável por um desses equipamentos. Ele se prontificou a realizar os ensaios e por lá as amostras preparadas durante os estágios iniciais deste projeto permaneceram por seis meses e os resultados foram inconclusivos. Os demais professores da UNICAMP e do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), FEA não se disponibilizaram a realizar as análises. Apenas recentemente, as nanopartículas peptídicas foram enviadas para análise por MS para o Centro de Química de Proteínas (CQP) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Esta situação dificultou o andamento do projeto, visto que apenas as análises

qualitativas não eram suficientes para comprovar a ocorrência ou não, da síntese química envolvida.

Enfim, as nanopartículas foram preparadas sob as duas condições de razão molar já avaliadas, para ($R_{Arg/DIC}$) de 0,25 e 5 e ambas foram produzidas em diferentes temperaturas, 15°C e 37°C, no intuito de avaliar a influência destas no processo de síntese. As condições de processamento são as mesmas aplicadas anteriormente e então, após a preparação, foram congeladas em ultra-freezer à -80°C para em seguida, serem liofilizadas.

Para análise de MS, as amostras de nanopartículas peptídicas passaram por um tratamento antes de serem inseridas no equipamento, a fim de eliminar os resíduos do tampão HEPES (Subitem 3.2.3.5), pois este sobressai nos espectros e impede que os outros compostos sejam identificados. Para melhor compreender os espectros de massas, primeiramente devem-se conhecer as massas moleculares dos compostos presentes na estrutura, visto que a técnica consiste na análise dessas. As massas moleculares referentes a todos os envolvidos no processo de síntese são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Massa molecular de todos os compostos envolvidos no processo de síntese peptídica.

Síntese peptídica	Massa molecular - Da
Arginina	174
DIC	126
NHS	115
Derivado de ureia	144
Dipeptídeo	330

Conforme apresentado na Tabela 4, a presença de massa molecular de 330 Da no espectro, indica que há a formação de um dipeptídeo, pois se trata da ligação entre duas moléculas de arginina e a eliminação de uma molécula de água. Esse processo ocorre sucessivamente até completar a sequência peptídica. Uma simulação de como seria a fragmentação de um peptídeo com uma sequência primária de 10 argininas é apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Simulação da fragmentação de um peptídeo com uma sequência primária de 10 argininas.

Arginina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MM-Da	174	330	486	642	798	954	1110	1266	1422	1578

No processo de síntese de nanopartículas peptídicas em sistemas microfluídicos não é possível controlar a sequência primária dos aminoácidos, pois o processo ocorre em fluxo contínuo e sem a presença de grupos protetores nos aminoácidos. Sendo assim, a Tabela 5 apresenta as massas moleculares que devem ser visualizadas nos espectros caso se tenha um peptídeo com no mínimo 10 argininas ligadas covalentemente. Os espectros referentes às nanopartículas com ($R_{Arg/DIC}$) de 0,25 e 5, são apresentados nas Figuras 46 e 47, respectivamente.

Figura 46: Espectros de massas referentes às nanopartículas produzidas em ($R_{Arg/DIC}$) = 0,25 para: (a) 15°C e (b) 37°C.

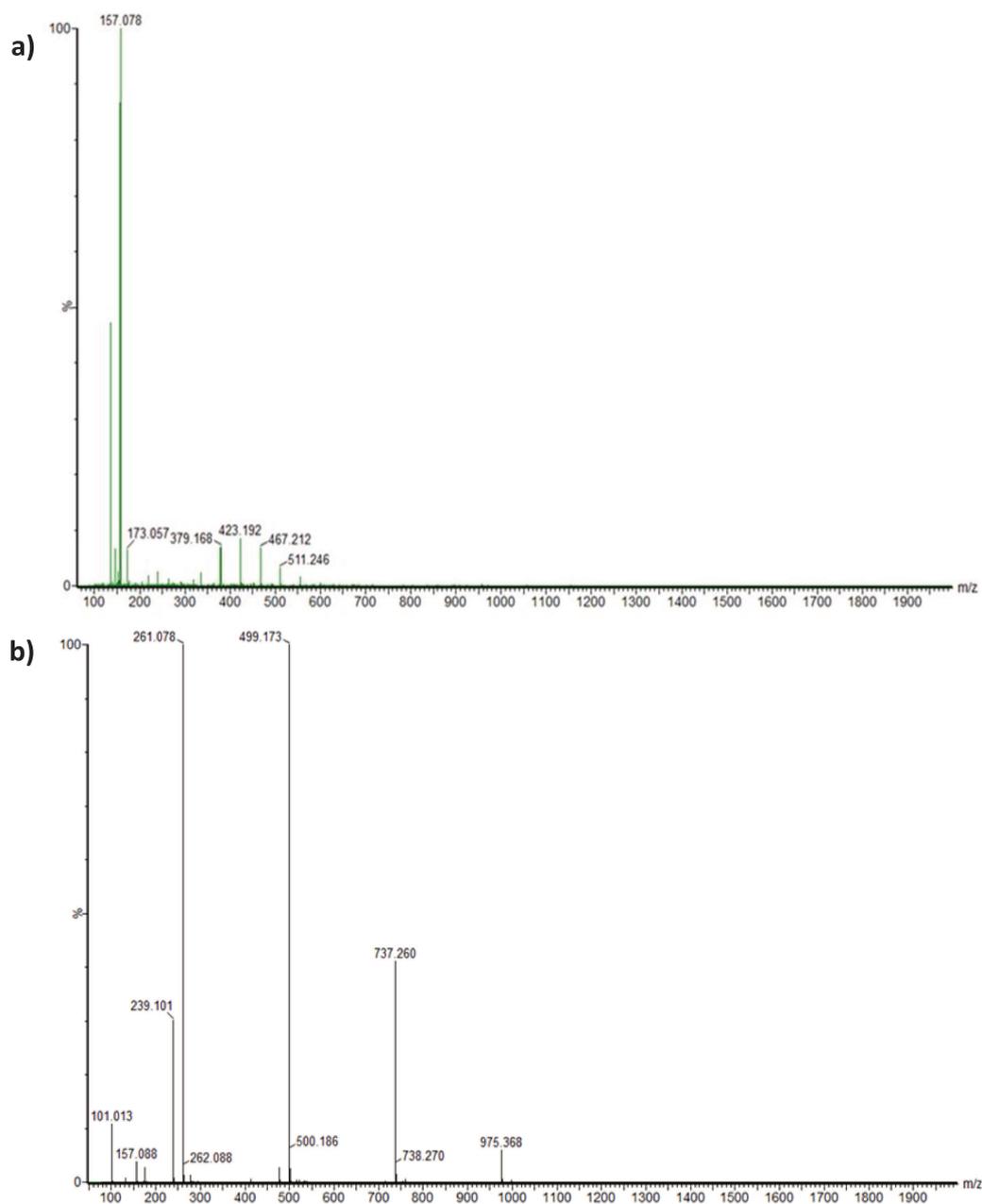
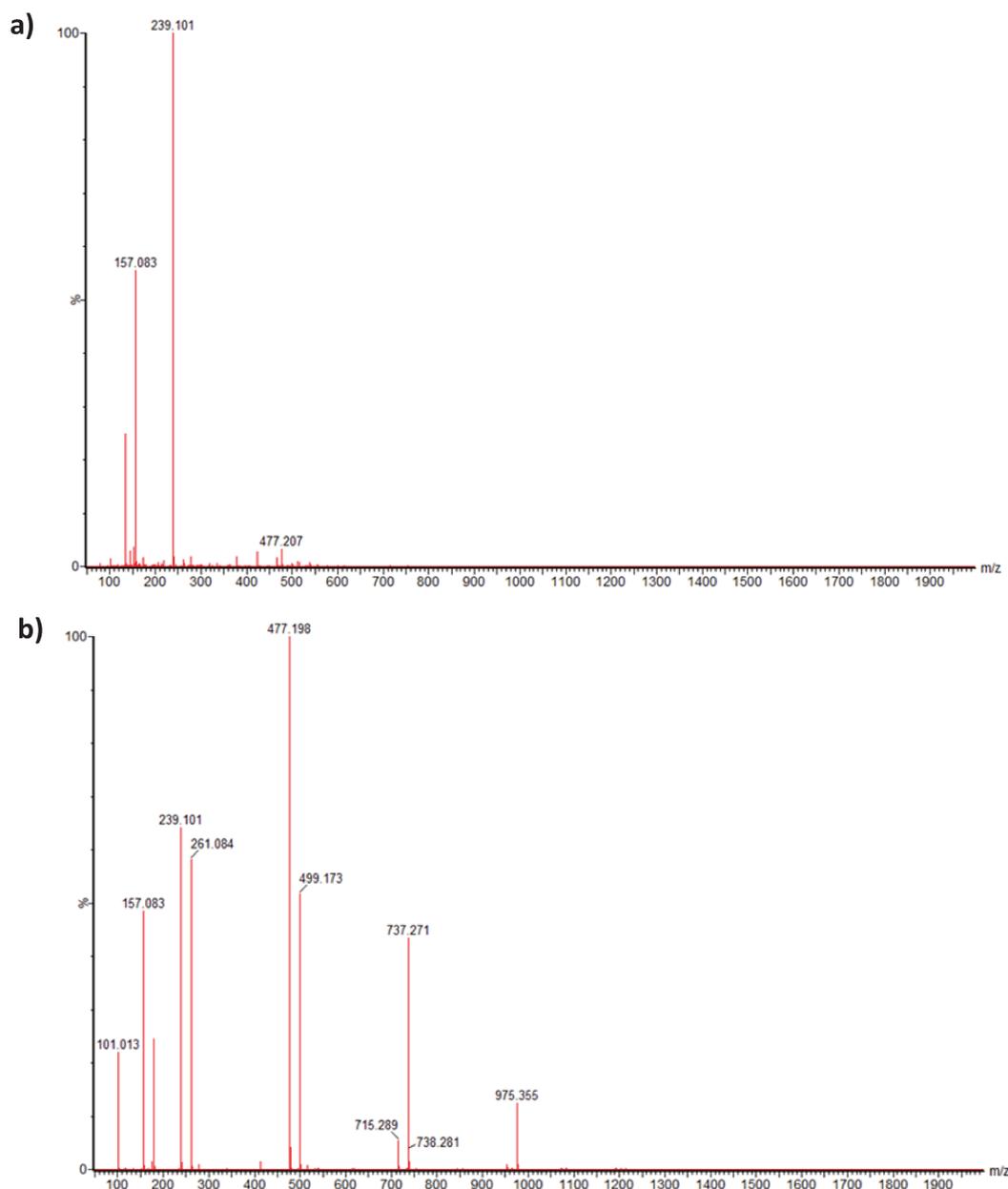


Figura 47: Espectros de massas referentes às nanopartículas produzidas em ($R_{Arg/DIC}$) = 5 para: (a) 15°C e (b) 37°C.



De acordo com os espectros apresentados para ambos ($R_{Arg/DIC}$) e para as diferentes temperaturas, observa-se que nenhum desses, apresenta qualquer massa molecular esperada. O mais suspeito desta caracterização está relacionado à massa molecular da arginina, pois nem esta que está presente no meio foi identificada. Além desta, nenhum dos outros reagentes do processo de síntese ou até mesmo o derivado de ureia não está presente no espectro. E ao contrário do que se esperava nenhuma sequência de arginina ou até mesmo a

formação de um dipeptídeo foi identificada e assim, não é possível compreender a influência que o excesso de DIC e a temperatura têm sobre o processo de síntese. Estes resultados contrariam o que foi encontrado para XPS e FT-IR.

Esta situação é bastante incomum, visto que ao menos os reagentes da síntese deveriam estar presentes no espectro, já que esta técnica é ideal para este tipo de análise. Quanto aos picos presentes no espectro, não foi possível identificá-los, pois nenhuma dessas massas moleculares é referente a qualquer composto que esteja presente na amostra. Vale ressaltar que a espectrometria de massa é uma técnica exata e os valores encontrados nos espectros não pode ser aproximado aos valores dos compostos presentes na amostra, ou seja, os valores que são fornecidos nos espectros são equivalentes à massa molecular exata de um composto qualquer.

Dessa forma, acredita-se que as concentrações das nanopartículas peptídicas produzidas não foram suficientes para serem lidas no equipamento ou também, que o tratamento anterior em que foram submetidas para a retirada do tampão HEPES, tenha eliminado todos os compostos que havia na amostra, a partir do momento em que estas, passaram por uma resina de filtração e pode ser que devido a sua baixa concentração, foram eliminadas. Estas são hipóteses relacionadas aos resultados encontrados pela análise dos espectros e assim, saber se as nanopartículas peptídicas foram realmente sintetizadas ainda segue em questão.