

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/07/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Víctor Augusto dos Santos Jonas

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE BAIXA MASSA
MOLECULAR DE DIISOPROPILETILAMINA-QUITOSANA: ESTUDO DA
INTERAÇÃO COM RNA DE INTERFERÊNCIA**

São José do Rio Preto

2021

Víctor Augusto dos Santos Jonas

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE BAIXA MASSA
MOLECULAR DE DIISOPROPILETILAMINA-QUITOSANA: ESTUDO DA
INTERAÇÃO COM RNA DE INTERFERÊNCIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vera Aparecida de Oliveira Tiera

São José do Rio Preto

2021

J76s

Jonas, Víctor Augusto dos Santos

Síntese e caracterização de derivados de baixa massa molecular de diisopropiletilamina-quitosana: estudo da interação com RNA de interferência

/ Víctor Augusto dos Santos Jonas. -- São José do Rio Preto, 2021

68 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

1. Química. 2. Terapia genética. 3. Quitosana. 4. Materiais nanoestruturados. 5. Polímeros. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Víctor Augusto dos Santos Jonas

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE BAIXA MASSA
MOLECULAR DE DIISOPROPILETILAMINA-QUITOSANA: ESTUDO DA
INTERAÇÃO COM RNA DE INTERFERÊNCIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^ª. Dr^ª. Eny Maria Vieira
USP - Universidade de São Paulo - Câmpus de São Carlos

São José do Rio Preto
7 de julho de 2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio Sérgio Jonas e Mariângela dos Santos Jonas, por me apoiarem em todos os momentos.

Agradeço a Prof^ª. Dr^ª. Vera Aparecida de Oliveira Tiera pela orientação, pelos ensinamentos desde a minha graduação e Iniciação Científica, por todo o apoio, carinho e encorajamento e confiança durante todas as etapas envolvidas nesses anos.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Renan Surian de Oliveira, ao André Miguel Martinez Junior e à Letícia Mozaner por todo o apoio, companheirismo, ajudas na execução de experimentos e ideias compartilhadas ao longo meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Marcio José Tiera pelos ensinamentos, ajuda no desenvolvimento de experimentos e pelo suporte oferecido durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

À todos os professores, técnicos e amigos que ajudaram na execução dos experimentos e na análise dos resultados.

Agradeço à Instituição UNESP-IBILCE por toda a estrutura disponibilizada.

Ao Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN), DQCA-IBILCE-UNESP.

Ao Laboratório de Química Bio-orgânica Ambiental (LQBoA), DCQA-IBILCE-UNESP

Aos membros da banca examinadora que se disponibilizaram em avaliar e contribuir para melhoria deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

RESUMO

A terapia gênica tem o potencial de tratar doenças hereditárias para as quais há poucos tratamentos eficazes. As terapias baseadas em RNA interferente (siRNA) tem demonstrado grande potencial para silenciar proteínas alvo causadoras de doenças. Essa modalidade de terapia exige carreadores seguros e eficientes, capazes de transportar o material genético até o ambiente intracelular, um desafio que tem limitado suas aplicações terapêuticas. Nesse estudo, foram sintetizados e caracterizados polications derivados de quitosana, para avaliação como potenciais carreadores para RNA de interferência. Derivados de quitosana de baixa massa molar e graus variados de acetilação (76,0 – 97,3%) foram modificados com grupos diisopropiletilamina (DIPEA) variando de 13,8 a 104,6 %. Os polímeros foram caracterizados por RMN ^1H e as massas molares (10,5 – 16,4 kDa) determinadas por GPC. O grau de ionização dos derivados foi estudado em função do pH e os resultados mostraram que a densidade de cargas pode ser controlada variando-se o grau de substituição por DIPEA. O potencial de interação desses derivados com siRNA, e da formação de nanopartículas foi estudada por meio das técnicas de eletroforese, e espalhamento de luz. As nanopartículas apresentaram potencial Zeta positivo a partir da razão de carga 3,0 de amino/fosfato (N/P) para maioria dos polímeros testados. O estudo de eletroforese indicou que os derivados de quitosana interagiram fortemente com o siRNA e graus de substituição intermediários de 20 e 40 % se mostraram mais favoráveis para a formação de poliplexos nanométricos (~200 nm) em baixas razões de carga (N/P 10,0 e 20,0). A toxicidade dos polímeros e das nanopartículas foram testadas para maioria dos polímeros até 1,5 g/L, e a totalidade dos derivados estudados apresentou baixa toxicidade e atividade antioxidante significativa. A partir dos estudos conduzidos foram selecionados derivados que apresentam propriedades físico-químicas favoráveis para a aplicação como carreadores de RNA de interferência.

Palavras-chave: Derivados de quitosana. siRNA. Vetor não viral. Transfecção *in vitro*. Terapia gênica.

ABSTRACT

Gene therapy has the potential to treat hereditary diseases for which there are few effective treatments. Interfering RNA (siRNA)-based therapies have shown great potential to silence disease-causing target proteins. This modality of therapy requires safe and efficient carriers, capable of transporting genetic material to the intracellular environment, a challenge that has limited its therapeutic applications. In this study, polycations based on chitosan derivatives were synthesized and characterized for evaluation as potential carriers for interfering RNA. Chitosan derivatives with low molar mass and varying degrees of acetylation (76.0 – 97.3%) were modified with diisopropylethylamine (DIPEA) groups ranging from 13.8 to 104.6%. The polymers were characterized by ^1H NMR and the molar masses (10.5 – 16.4 kDa) determined by gel permeation chromatography GPC. The degree of ionization of derivatives was studied as a function of pH and the results showed that the charge density can be controlled by varying the degree of substitution by DIPEA. The ability of these derivatives to interact with siRNA, and the formation of nanoparticles was studied by electrophoresis and light scattering techniques. The nanoparticles exhibited positive Zeta potentials at charges ratios (amino/phosphate (N/P) higher than 3.0 for most of the tested polymers. The electrophoresis study indicated that chitosan derivatives strongly interacted with siRNA and polymers having intermediate degrees of substitution of 20 and 40% were more favorable for the formation of nanometric polyplexes (~200 nm) at low charge ratios (N/P 10.0 and 20.0). The toxicity of polymers and nanoparticles were tested and for the majority of the polymers up to 1.5 g/L, and all polyplexes studied showed low toxicity and significant antioxidant activity. From the studies conducted, it was possible to select derivatives that have displayed favorable physicochemical properties for application as small interfering RNA carriers.

Keywords: Chitosan. siRNA. Non-viral vector. In vitro transfection. Gene therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas químicas da quitina e da quitosana	13
Figura 2 - Números de ensaios clínicos de terapia gênica até 2017	16
Figura 3 – Complexação do polímero com o ácido nucleico para formação de poliplexos.....	18
Figura 4 - Processo de silenciamento gênico pós-transcricional capaz de suprimir a expressão de um determinado gene.....	20
Figura 5 - Mecanismo de interferência de RNA mediado por siRNA	21
Figura 6 - Reações da quitosana comercial e da quitosana desacetilada.....	27
Figura 7 - Espectro de absorção do ABTS ^{•+} diluído	30
Figura 8 - Reação de hidrólise básica da quitosana.....	34
Figura 9 - Gráfico da titulação potenciométrica da quitosana desacetilada	35
Figura 10 - Esquema de reação para a substituição das quitosanas degradadas com DIPEA..	36
Figura 11 - Mecanismo de reação de substituição nucleofílica bimolecular entre quitosana e o substituinte DIPEA	37
Figura 12 - Espectro de RMN de ¹ H da quitosana desacetilada (ChD) a partir da quitosana comercial (ChC)	38
Figura 13 - Espectro de RMN de ¹ H da quitosana comercial (ChC).....	39
Figura 14 - Espectro de RMN de ¹ H do primeiro derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChC.D.	40
Figura 15 - Espectro de RMN de ¹ H do segundo derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChC.D.	40
Figura 16 - Espectro de RMN de ¹ H do terceiro derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChC.D.	41
Figura 17 - Espectro de RMN de ¹ H do quarto derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChC.D.	41
Figura 18 - Espectro de RMN de ¹ H do primeiro derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChD.D.	42
Figura 19 - Espectro de RMN de ¹ H do segundo derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChD.D.	43
Figura 20 - Espectro de RMN de ¹ H do terceiro derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChD.D.	43
Figura 21 - Espectro de RMN de ¹ H do quarto derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChD.D.	44

Figura 22 - Diagrama com a rota de reações para obtenção de derivados de quitosana	46
Figura 23 - Gráfico do grau de ionização para os polímeros ChC.D., ChD.D. e derivados de DIPEA série I e II	47
Figura 24 - Gráfico da absorbância do cátion radical ABTS em função do tempo para os diferentes polímeros na concentração de 0,75 g/L	49
Figura 25 - Gráfico da absorbância do cátion radical ABTS em função da concentração (tempo de 30 min).....	50
Figura 26 - Gráfico da atividade antioxidante (série I)	51
Figura 27 - Gráfico da atividade antioxidante (série II)	51
Figura 28 - Imagens de eletroforese obtidas das nanopartículas dos polímeros da série II com siRNA em pH 7,4	53
Figura 29 - Imagens de eletroforese obtidas das nanopartículas dos polímeros menos substituídos da série I com siRNA-TNF-alfa em pH 7,4	54
Figura 30 - Diâmetro hidrodinâmico dos políplexos preparados com polímeros das séries I e II em diferentes razões de carga (N/P) em pH (6,3) e força iônica 150 mM.	56
Figura 31 - Potencial Zeta dos políplexos formados pelos polímeros sob diferentes razões N/P e em condições fisiológicas de pH (6,3).....	56
Figura 32 - Efeito da razão N/P sob o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e o potencial Zeta das nanopartículas em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L ⁻¹ : (a) ChC.D.21DI, (b) ChC.D.37DI, (c) ChD.D.14DI, (d) ChD.D.45DI	57
Figura 33 - Reação do MTS para formação do Formazan	58
Figura 34 - Ensaio de viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH realizado com ChC.D e seus derivados modificados com DIPEA (série I).....	59
Figura 35 - Ensaio de viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH com ChD.D. e seus derivados modificados com DIPEA (série II).....	59
Figura 36 - Ensaio de viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 para nanopartículas preparadas com razões de carga N/P crescentes.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de aplicações para a quitosana e derivados	14
Tabela 2 – Materiais e reagentes utilizados.....	24
Tabela 3 - GD e GS das quitosanas e dos substituintes com DIPEA	44
Tabela 4 - Massas molares dos diferentes polímeros de quitosana substituídos com o grupo DIPEA	45
Tabela 5 - Grau de Ionização no pH 7,4.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	células de carcinoma de pulmão humano
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ADA	enzima adenosina desaminase
Ch	quitosana
ChC	quitosana comercial
ChC.D.	quitosana comercial degradada
ChC.D.21DI	derivado de quitosana comercial de massa molar baixa modificado com DIPEA (~21%)
ChC.D.37DI	derivado de quitosana comercial de massa molar baixa modificado com DIPEA (~37%)
ChC.D.56DI	derivado de quitosana comercial de massa molar baixa modificado com DIPEA (~56%)
ChC.D.97DI	derivado de quitosana comercial de massa molar baixa modificado com DIPEA (~97%)
ChD	quitosana desacetilada
ChD.D.	quitosana desacetilada degradada
ChD.D.14DI	derivado de quitosana desacetilada de massa molar baixa modificado com DIPEA (~14%)
ChD.D.45DI	derivado de quitosana desacetilada de massa molar baixa modificado com DIPEA (~45%)
ChD.D.67DI	derivado de quitosana desacetilada de massa molar baixa modificado com DIPEA (~67%)
ChD.D.105DI	derivado de quitosana desacetilada de massa molar baixa modificado com DIPEA (~105%)
Dh	diâmetro hidrodinâmico
DIPEA	N-diisopropiletilamina
DIPEA-Cl	cloridrato de 2-cloroetil-di-isopropilamina
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMEM	meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima (do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay)
EtBr	Brometo de etídeo
FBS	soro fetal bovino
GD	grau de desacetilação
GI	grau de ionização
GS	grau de substituição

GPC	cromatografia de permeação em gel
kDa	quiloDalton
LPS	lipopolissacarídeo
MM	massa molar
\bar{M}_n	massa molar numérica média
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
\bar{M}_w	massa molar ponderal média
MWCO	limite de peso molecular
N/P	N corresponde ao número de aminas dos polímeros e P corresponde ao número de fosfatos dos ácidos nucleicos
NIH 3T3	células de fibroblastos de camundongo
Pdi	“polydispersity index” (polidispersividade)
pH	potencial hidrogeniônico
pKa	negativo do logaritmo de base 10 da constante de dissociação ácida (Ka)
PS	penicilina-estreptomicina
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
SCID	síndrome da imunodeficiência combinada severa
siRNA	RNA de interferência curto
siRNA anti-TNF-α	siRNA para o bloqueio da expressão de TNFa
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
TNFα	“tumor necrosis factor” alfa
α	grau de ionização
ζ	Zeta (potencial)
\mathfrak{D}	“dispersity” (dispersidade)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Quitosana: Propriedades e Potencial como carreador de siRNA.....	13
1.2 Terapia Gênica	15
1.3 Vetores: viral e não-viral.....	17
1.4 Vetores para a terapia gênica baseados em quitosana	18
1.5 Terapia Gênica via siRNA e os Derivados de diisopropilaminoetil-quitosana..	20
2.OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Materiais	24
3.2 Métodos	25
3.2.1 Desacetilação da quitosana	25
3.2.2 Degradação da quitosana comercial e da quitosana desacetilada	26
3.2.3 Modificação da quitosana com diisopropilaminoetil (DIPEA) em meio aquoso: séries I e II.....	26
3.2.4 Determinação do grau de desacetilação (GD) das quitosanas por titulação potenciométrica	27
3.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN ¹ H....	28
3.2.6 Determinação da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel – GPC .	28
3.2.7 Determinação do grau de ionização dos polímeros.....	28
3.2.8 Atividade antioxidante	29
3.2.9 Preparação das nanopartículas de siRNA	31
3.2.10 Eletroforese em gel de agarose	31
3.2.11 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta.....	32
3.2.12 Citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

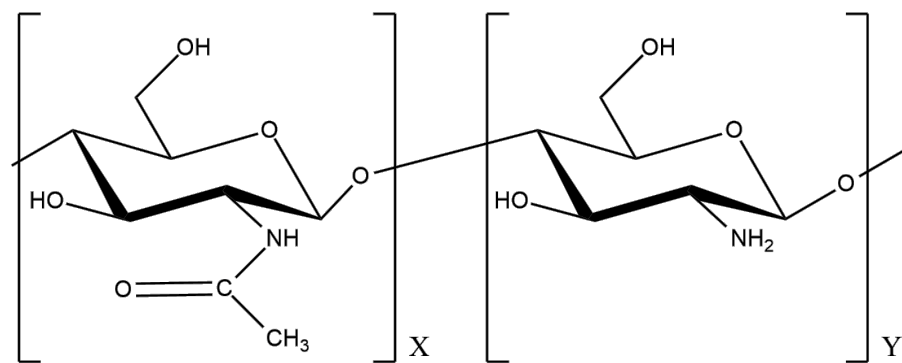
4.1 Caracterização da quitosana desacetilada: determinação do grau de desacetilação por potenciometria	34
4.2 Síntese das quitosanas com diisopropilaminoetil (DIPEA)	36
4.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de ¹ H.....	38
4.4 Determinação da massa molar dos polímeros por GPC.....	45
4.5 Avaliação do grau de ionização.....	47
4.6 Testes da atividade antioxidante dos derivados frente ao radical cátion ABTS ⁺	48
4.7 Eletroforese.....	52
4.8 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (ζ)	54
4.9 Avaliação da citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas	57
5. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quitosana: Propriedades e Potencial como carreador de siRNA

A quitosana é um polissacarídeo natural catiônico que tem recebido uma grande atenção da literatura para a entrega de RNA de interferência (siRNA). Devido a presença de grupos amina em sua estrutura, em meio ligeiramente ácido, a quitosana pode complexar moléculas de RNA. As interações eletrostáticas que movem a complexação levam a formação de complexos nanométricos, que tem se mostrado capazes de liberar o siRNA no ambiente intracelular. Devido à presença de unidades 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amina-2-deoxi-D-glicopiranosose (Figura 1), as propriedades da quitosana podem ser ajustadas para melhorar sua capacidade de complexação e aplicação como carreador de ácidos nucleicos. A distinção entre a quitosana e o polissacarídeo que lhe dá origem, a quitina, é feita em geral por meio das unidades acetiladas (representado por X na Figura 1) e desacetiladas (Y), quando $Y \geq X$, o polissacarídeo é denominado quitosana.

Figura 1 - Representação esquemática das estruturas químicas da quitina e da quitosana



Fonte: Elaborado pelo autor

As estruturas de ambas são muito parecidas, uma vez que a quitosana nada mais é que um produto da desacetilação da quitina, essa reação química trata-se de uma hidrólise alcalina dos grupos acetamido da quitina (CAMPANA FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007).

Embora a quitosana apresente um grande potencial para liberar moléculas de siRNA, a solubilidade da quitosana é bastante limitada em pH neutro, devido ao pKa dos grupos amina (~6.3 - 6.5), que se encontram desprotonados em pH fisiológico. Além disso, a solubilidade depende ainda do grau de desacetilação, da força iônica do meio, bem como a massa molar e

concentração do biopolímero (GOY; DE BRITTO; ASSIS, 2009). Portanto, a insolubilidade em pH neutro tem levado à síntese e caracterização de derivados buscando-se melhorar suas propriedades para aplicações em diferentes áreas. Algumas das aplicações da quitosana e seus derivados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de aplicações para a quitosana e derivados

Aplicação	Exemplos
Medicina, e materiais biomédicos e farmacêuticos	Tratamento para queimaduras (WANG et al., 2012), preparo de peles artificiais (PARVEZ et al., 2012), membranas de diálise (AYENSU et al., 2012), anticoagulante (CHANG; HUANG, 2012), vetor de transfecção de genes, carreadora para transporte e liberação controlada de fármacos (YUAN et al., 2013), medicamentos em geral (JAYAKUMAR et al., 2007).
Cosméticos	Produtos de cabelo e pele (MATOS et al., 2015).
Agricultura	Fungicidas e bactericidas (SAHARAN et al., 2013; SAHARIAH; MÁSSON, 2017).
Tratamento de Água	Tratamento de efluentes e quelantes de íons metálicos (YANG et al., 2016).
Indústria de Alimentos	Antioxidante (TAMER et al., 2016), emulsificante, conservante de alimento (CHANTARASATAPORN et al., 2014).

Fonte: Adaptado de (ZARGAR; ASGHARI; DASHTI, 2015)

Além da ampla gama de potenciais aplicações acima, uma das propriedades da quitosana e seus derivados que se destaca, é o potencial antimicrobiano contra muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, e sem apresentar toxicidade em células de mamíferos (KONG et al., 2010). Embora a quitosana apresente propriedades importantes como biocompatibilidade, biodegradabilidade, e baixa citotoxicidade, a

desprotonação dos grupos amino em pH neutro, resulta numa fraca interação com o siRNA (BORCHARD, 2001; KIM et al., 2007).

Portanto, a síntese e caracterização de derivados de quitosana pode permitir não somente sobrepor suas limitações, mas também ampliar suas aplicações, sendo este o foco principal do presente trabalho, ou seja, a síntese e caracterização de derivados de quitosana visando melhorar a interação e aplicação como potencial vetor para a liberação de siRNA.

1.2 Terapia Gênica

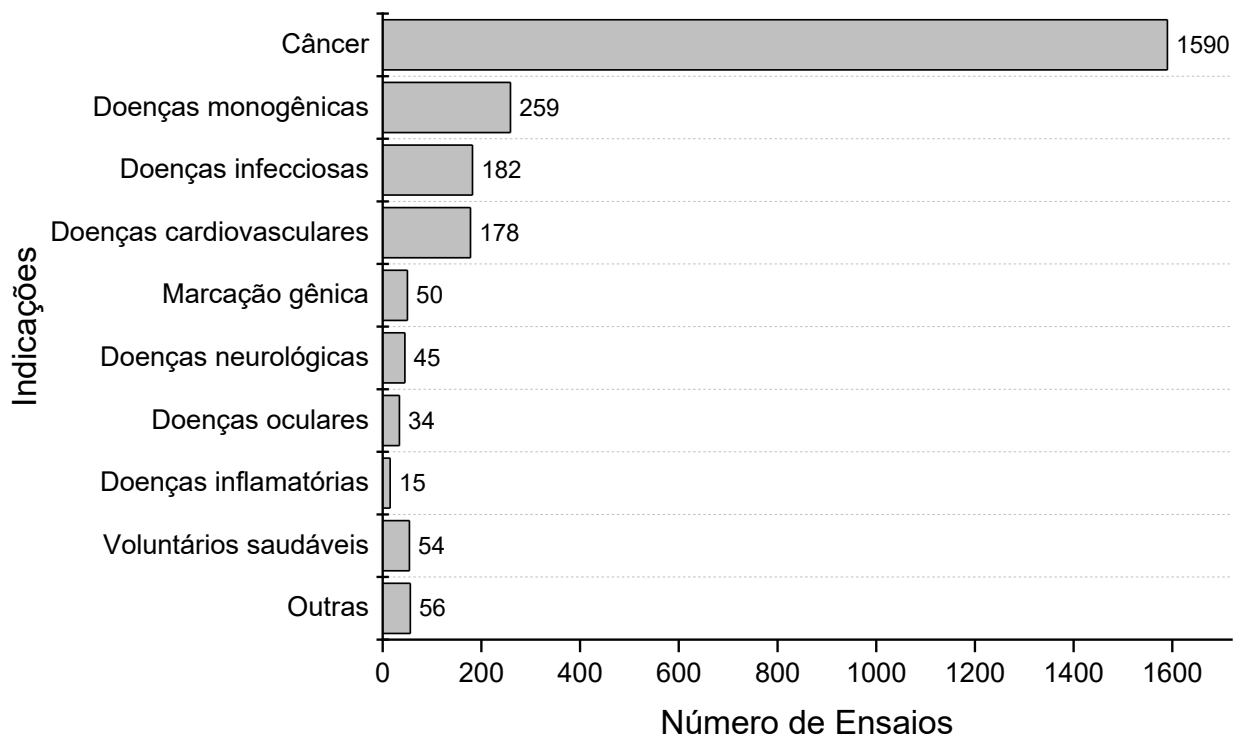
A terapia gênica pode ser definida como uma técnica de tratamento que se baseia na inserção de material genético em células do organismo com o objetivo de modificar genes defeituosos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças, e com isso, reduzir ou eliminar a doença (BALLY et al., 1997). O conceito envolve o transporte do ácido nucleico para células específicas para que aconteça alteração da produção de uma proteína, onde mudanças na expressão terão como consequência um benefício terapêutico. Uma de suas aplicações envolve silenciamento de genes, via introdução de RNAs de interferência nas células, com o intuito de evitar a síntese de proteínas que resultam na manifestação clínica de uma doença (ALBERTS et al., 2011).

Existem duas modalidades de terapia gênica, *in vivo* e *ex vivo*, sendo que na primeira o vetor contendo o ácido nucleico é administrado diretamente no organismo, e a segunda corresponde ao tratamento no qual as células são removidas fisicamente do paciente, transfectadas *in vitro* e depois de modificadas são novamente administradas ao paciente.

Um dos primeiros sistemas terapêuticos eficientes foi realizado em moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, onde utilizou-se um elemento genético de transposição que transferiu um gene normal para embriões que apresentavam um defeito genético na cor dos olhos. O gene transferido codificou a enzima que produz a cor de olhos natural da espécie, e as moscas adquiriram a coloração vermelha (normal) nos olhos (SPRADLING; RUBIN, 1982). A primeira aplicação em humanos, foi realizada em 1989, quando duas crianças com quadro de imunodeficiência combinada severa (SCID - *Severe Combined Immunodeficiency*) devido ao defeito genético na enzima catabólica adenosina deaminase (ADA - *Adenosine Deaminase Deficiency*) foram submetidas à terapia gênica pelo protocolo de Blaese *et al.*, 1990. Para esta doença, a terapia gênica foi segura e efetiva, com dois anos de tratamento *ex vivo* e posteriormente mais quatro anos de acompanhamento com sucesso.

A terapia gênica é um tratamento que corresponde a um novo paradigma em medicina com enorme potencial terapêutico, vide Figura 2 que mostra número de ensaios de terapia gênica por doenças até 2017. Por outro lado, vários resultados adversos ao longo dessas décadas chamaram a atenção para alguns riscos dessa terapia, por exemplo, uma das limitações da transfecção direta do DNA em células no organismo era a falta de especificidade com as células-alvo (KASAHARA; DOZY; KAN, 1995).

Figura 2 - Números de ensaios clínicos de terapia gênica até 2017



Fonte: Adaptado de (SILVA; BARBOSA JÚNIOR, 2018)

A entrada de DNA ou RNA diretamente através da membrana plasmática acontece raramente em células eucarióticas (LINDEN, 2010; VELLAI; VIDA, 1999). Muitos estudos demonstraram que o material genético livre pode ser sim introduzido diretamente nas células alvo utilizando algumas técnicas, entretanto, os resultados são limitados, pois o DNA é rapidamente degradado no sangue pelas nucleases (NIVEN, 1998). Para superar essa barreira, carreadores denominados “vetores” são empregados para realizar a inserção do material genético nas células vivas. Os vetores podem ser separados em duas categorias: virais e não-virais.

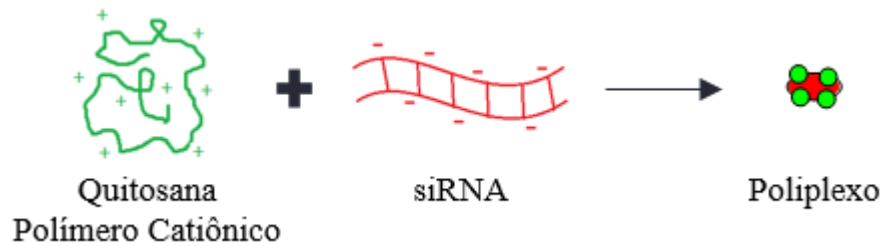
1.3 Vetores: viral e não-viral

A primeira dificuldade na introdução de ácidos nucleicos em uma célula é atravessar a membrana plasmática, pois ambos são carregados negativamente (PACK et al., 2005). A membrana celular é carregada negativamente e tem um potencial de cerca de -90 mV (GUYTON A. C., 2011), que é essencial para a segurança celular, evitando a entrada de macromoléculas ou microorganismos que afetam negativamente a viabilidade celular e o código genético (BLAZEK; PALEO; WEISLEDER, 2015). Proteger os ácidos nucleicos do processo de degradação das nucleases contidas no ambiente extracelular e garantir que eles passem pela membrana plasmática para o ambiente intracelular são alguns dos obstáculos biológicos que devem ser superados para melhorar a taxa de sucesso do tratamento (ESCOFFRE; TEISSIÉ; ROLS, 2010).

A maioria dos protocolos de terapia gênica são baseadas no uso de vetores virais por conta de sua alta eficiência, e por mais que tenham buscado desenvolver vetores seguros, ainda existem problemas relacionados com esses tipos de vetores: dificuldades de produção em alta escala, alto custo de produção, podem ativar respostas imunológicas e inflamatórias no organismo, risco de mutações e recombinação no genoma de vetores retrovirais, capacidade de transportar pouco material genético (SILVA; BARBOSA JÚNIOR, 2018).

Estudos com vetores não virais, como plasmídeos e vetores nanoestruturados a base de lipídeos e polímeros catiônicos, vem sendo realizados como uma alternativa menos invasiva para o processo de transfecção (MAO et al., 2001). Os vetores nanoestruturados abrangem basicamente lipídeos e polímeros catiônicos capazes de interagir eletrostaticamente com o material genético por meio de complexação. Os complexos formados pelos polímeros são chamados de poliplexos (Figura 3) e os formados pelos lipídeos são lipoplexos. Por conta dos polímeros catiônicos possuírem unidades (meros) que se repetem ao longo da estrutura química, permite uma maior facilidade de complexação com os ácidos nucleicos e são capazes de complexar maior quantidade de material genético (SHI et al., 2011).

Figura 3 – Complexação do polímero com o ácido nucleico para formação de poliplexos



Fonte: autoria própria

Polímeros catiônicos possuem flexibilidade estrutural para serem modificados pela inserção de grupos químicos, formando, como exemplo, complexos com aminas primárias, secundárias e terciárias que apresentam maiores pKas e maiores capacidades de tamponamento do polímero. Dessa forma, vários polímeros vem sendo estudados como potencial carreadores, como polietileniminas (PEI) (IHM et al., 2015), polimetacrilatos catiônicos, dextrana e quitosana (YIN et al., 2014).

1.4 Vetores para a terapia gênica baseados em quitosana

Os ácidos nucleicos devido a seus tamanhos e cargas negativas dificilmente conseguem atravessar a membrana celular, portanto viabilizar a terapia gênica envolve não somente o transporte para dentro célula-alvo, mas também a liberação intracelular. A quitosana, devido aos grupos amino ionizáveis, interage com o DNA ou RNA formando poliplexos com potencial positivo, que podem proteger o material genético da degradação por endonucleases, transportando o material genético para dentro da célula e liberando-os dentro da mesma. Entretanto, os níveis de liberação podem variar bastante dependendo das propriedades físico-químicas da quitosana e seus derivados (MAO et al., 2001; SATO; ISHII; OKAHATA, 2001). Vários aspectos como o grau de desacetilação (HU et al., 2013), a massa molar, a razão N/P (onde N corresponde ao número de grupos aminos da quitosana e P corresponde ao número de grupos fosfatos do material genético) o pH, a força iônica do meio e o tipo de célula podem afetar a eficiência de transfecção (MINTZER; SIMANEK, 2009).

Quitosanas com maior grau desacetilação (maior porcentagem de grupos aminos comparados com os grupos acetamidos da cadeia polimérica) apresentaram resultados melhores para transfecção em ensaios *in vitro* em grande parte das linhagens celulares. Isso se deve à maior densidade de cargas positivas na cadeia do polímero geradas pelo $-NH_2$ formando $-NH_3^+$.

Em contra partida, quitosanas com graus de desacetilação moderados apresentaram melhores resultados de transfecção em estudos *in vivo* (KIANG et al., 2004). Outra propriedade importante da quitosana é sua biodegradabilidade, a qual depende também do grau de acetilação do polissacarídeo.

Entre as modificações implementadas para melhorar suas propriedades como vetor, a inserção de grupos catiônicos adicionais na estrutura de quitosana, pode aumentar a capacidade da quitosana de interagir com os ácidos nucleicos aumentando a captação celular e a eficiência da transfecção (YU et al., 2010). Contudo, como a interação é predominantemente eletrostática, uma interação muito forte pode em contrapartida dificultar a liberação do material genético do carreador. Outro parâmetro que deve ser controlado é a massa molar (MM), pois o aumento do comprimento da cadeia, aumenta a força de interação e alguns estudos indicam que melhores eficiências de transfecção *in vitro* podem ser obtidas com quitosanas de maior massa molar. Estudos com quitosanas de massa molar média ou baixa são melhores dependendo da célula em estudo, por exemplo, para as células A549, quitosanas com maior massa foram mais efetivas (HUANG et al., 2005), enquanto nas células de condrócitos o inverso foi obtido (ZHAO et al., 2006). Strand e colaboradores mostraram que a otimização da transfecção pode ser alcançada ajustando-se a estabilidade dos poliplexos. Estes autores trabalhando com quitosanas de diferentes massas moleculares (MMs) concluíram que a expressão gênica máxima é obtida numa faixa estreita de MMs, cujo grau de polimerização varia de 32 – 42, e que quando o comprimento das cadeias eram maiores do que desses valores os poliplexos obtidos foram muito estáveis e reduziram a transfecção gênica (GAO et al., 2008; HUANG et al., 2010).

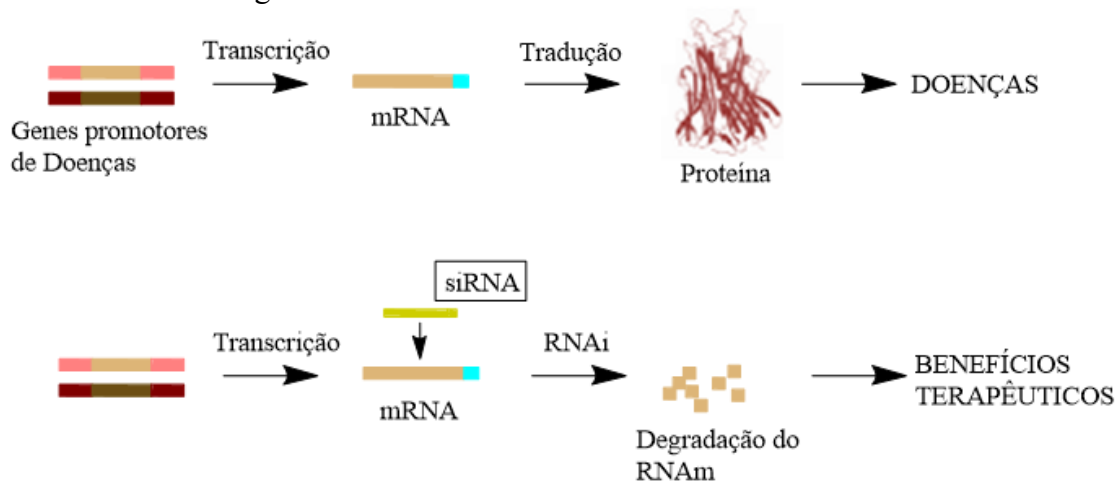
Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que a força de interação siRNA-policação pode ser ajustada variando-se a massa molar e o grau de substituição por grupos amino terciários. Na liberação de DNA plasmidial (pDNA), derivados de média massa molar (40 - 100 kDa) com graus de substituição variando de 15 a 25% de grupos amins secundárias e terciárias, formaram nanopartículas que mediaram eficiências de transfecção 10 vezes superior àquelas obtidas com quitosana desacetilada (GD = 95%). A substituição por grupos amina terciário aumentaram a estabilidade coloidal das nanopartículas em pH fisiológico bem como o escape endossomal do DNA plasmidial com um aumento na eficiência de transfecção (DE PAULA PANSANI OLIVEIRA et al., 2013). Entretanto, devido a menor massa molar de siRNA comparada com o pDNA, diminui a força de interação, o que requer um aumento da massa molar, e melhores eficiências de transfecção vem sendo obtidas com derivados de alta massa molar ($\bar{M}_w > 100$ kDa). Nesse sentido uma alternativa para melhorar a força de interação siRNA-policação é o controle preciso do grau de substituição, portanto o

presente trabalho explorou derivados de baixa massa molar com graus de substituição crescentes de DIPEA, o que pode permitir a seleção de vetores mais eficientes com quitosanas de baixa MM. Em princípio essa estratégia pode resultar numa liberação intracelular mais eficiente.

1.5 Terapia Gênica via siRNA e os Derivados de diisopropilaminoetil-quitosana

O mecanismo de silenciamento por RNA é um silenciamento gênico pós-transcricional específico de sequência, que é desencadeado por RNA de fita dupla (dsRNA) (Figura 4) e causa a degradação do mRNA homólogo em sequência ao dsRNA (DORSETT; TUSCHL, 2004). Entre as estratégias do RNA de interferência, o siRNA (RNA de interferência curto) é útil em células de mamíferos, porque essas células exibem resposta imune inata não específica quando expostas ao dsRNA por mais de trinta pares de bases (STARK et al., 1998). Para aplicação terapêutica, a tecnologia de siRNA promete maiores vantagens sobre as drogas convencionais devido à sua poderosa e específica capacidade de silenciamento de genes (KARAGIANNIS; EL-OSTA, 2005). No entanto, a terapia gênica utilizando siRNA é prejudicada pela baixa permeabilidade da membrana celular e pela estabilidade limitada (SATO et al., 2007). Como já mencionado anteriormente, o siRNA quando administrado no sangue, é facilmente degradado pelas nucleases e eliminado dos glomérulos renais antes de atingir as células alvo.

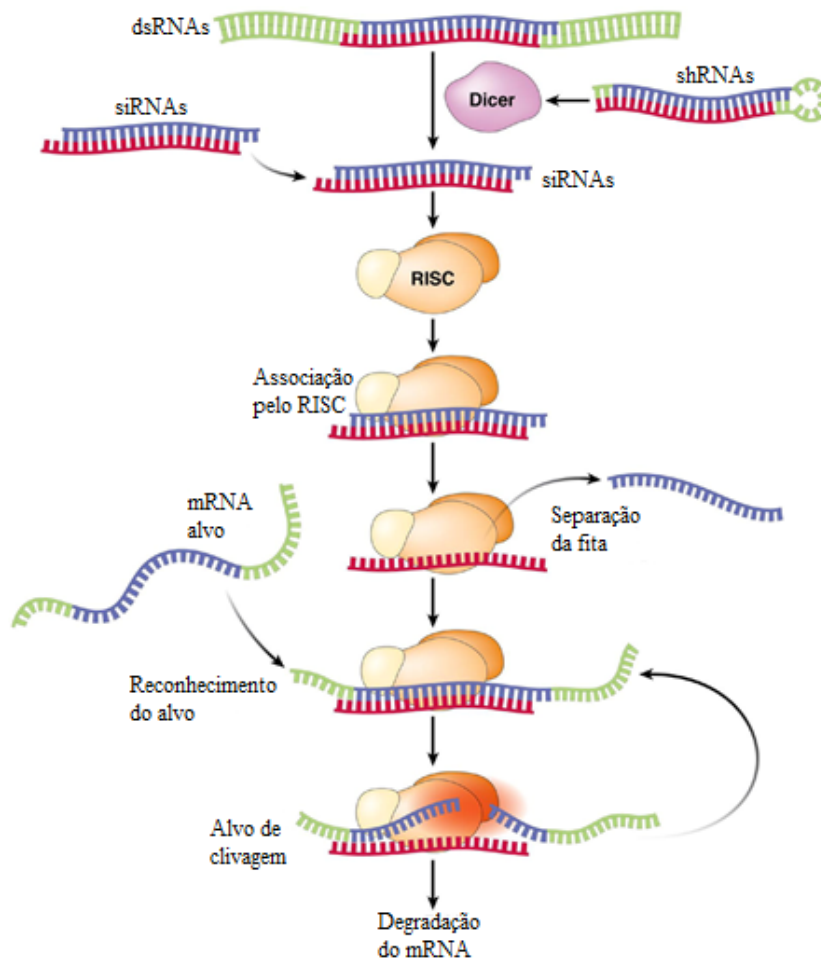
Figura 4 - Processo de silenciamento gênico pós-transcricional capaz de suprimir a expressão de um determinado gene



Fonte: autoria própria

O silenciamento pós-transcricional do gene tem por base uma molécula de fita dupla de RNA (dsRNA) que ao ser incorporada no citoplasma na forma de pequenos dsRNA (miRNA ou siRNA), se liga a um complexo proteico indutor de silenciamento de RNA (RISC). Este distingue as cadeias do dsRNA, degradando a do sentido direto (senso - mesma sequência do mRNA alvo). Posteriormente, a fita antissenso se associa ao complexo proteico RISC como um guia para se ligar a sua sequência de nucleotídeos complementar no mRNA, levando ao silenciamento gênico. O mecanismo de RNAi mediado por siRNA ou miRNA se assemelham por utilizarem tanto a DICER, enzima que cliva moléculas de dsRNA, como o complexo RISC no processo de silenciamento e, se diferenciam pelo fato do siRNA regular a expressão de um mRNA alvo e o miRNA levar à regulação de múltiplos mRNAs (Figura 5) (SKLAN; GLENN, 2007).

Figura 5 - Mecanismo de interferência de RNA mediado por siRNA



Fonte: Adaptado de SKLAN; GLENN, 2007

Estudos recentes do grupo mostraram que a inserção de grupos amino terciários favorecem a interação com os ácidos nucleicos, e podem melhorar a solubilidade da quitosana, bem como a eficiência de transfecção em pH fisiológico (DE SOUZA et al., 2018). Em particular a inserção de grupos amino terciários de disopropilaminoaminoetil (DIPEA) na quitosana, além de aumentar a solubilidade da quitosana em pH fisiológico, proporciona uma resposta ao pH em uma faixa ligeiramente abaixo do pH fisiológico o que pode favorecer a protonação dos grupos amino no ambiente intracelular e o escape do endossomo (MARTINEZ JUNIOR, 2019). Além disso, o impedimento estérico ocasionado pelos grupos isopropil impede reações de quaternização, verificadas com grupos dietilaminoetil (DE PAULA PANSANI OLIVEIRA et al., 2013). Nesse trabalho, buscou-se sintetizar e caracterizar derivados de quitosana com a inserção crescentes de grupos DIPEA, de baixa massa molecular, o que pode melhorar a interação com o siRNA e proporcionar a preparação de complexos nanométricos. Desta forma, buscou-se identificar composições de baixa toxicidade, que pudessem apresentar propriedades físico-químicas favoráveis à formação dos complexos, para aplicação em valores de pH mais próximos da neutralidade.

5. CONCLUSÕES

A síntese dos derivados de quitosana foi realizada com êxito e permitiu a obtenção de polímeros com baixa MM, com diferentes graus de desacetilação e diferentes graus de substituição de DIPEA. O sucesso das sínteses foi confirmado por meio de caracterizações realizadas pelas espectroscopias de RMN ^1H e GPC. A caracterização físico-química permitiu confirmar que o grau de substituição por grupos DIPEA pode ser controlada variando-se a proporção do reagente, o que possibilita ajustar a densidade de cargas em pH fisiológico, e melhorar a interação com ácidos nucleicos com polímeros de baixa massa molar. A atividade antioxidante dos derivados de quitosana substituídos com DIPEA apresentou melhora comparado com a quitosana comercial. Essa melhora se deve pela inserção do grupo amino terciário, o qual aumentou o potencial das cargas positivas dos polímeros.

Estudos de citotoxicidade com MTS em macrófagos (RAW 264.7) e fibroblastos (3T3/NIH), comprovaram a baixa toxicidade dos derivados que foi superior a 90% (viabilidade) para a maioria dos polímeros e para todos os poliplexos até a razão N/P 50. A presença de unidades acetiladas, ou seja, o grau de acetilação mostrou-se um parâmetro importante para a obtenção de derivados menos tóxicos, e com melhores propriedades para formação de nanopartículas, e indicaram que o espaçamento dos grupos DIPEA tem um papel importante no decréscimo na toxicidade.

Os resultados indicaram que os derivados parcialmente acetilados apresentam grande potencial de aplicação com carreadores para a terapia gênica não viral. Nanopartículas com Dh entre 180-350 nm e potencial Zeta positivo foram obtidas a partir da razão N/P 10 para os dois derivados estudados da série I (Série parcialmente acetilada), em pH (6,3) e força iônica ($0,15 \text{ mol L}^{-1}$).

Diante dos resultados apresentados, tem-se como perspectivas futuras, a realização de estudos de transfecção *in vitro* (para o bloqueio da expressão TNF- α e de GFP) dos polímeros (na forma de poliplexos) modificando alguns parâmetros para transfectar com eficiência, bem como da aplicação desses derivados para o transporte de outros fármacos e moléculas bioativas.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011
- ANDERSON, W. F.; BLAESE, R. M.; CULVER, K. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol, July 6, 1990. **Human gene therapy**, 1990.
- AYENSU, I.; MITCHELL, J. C.; BOATENG, J. S. Effect of membrane dialysis on characteristics of lyophilised chitosan wafers for potential buccal delivery of proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012.
- BALLY, M. B. et al. Lipid/DNA complexes as an intermediate in the preparation of particles for gene transfer: An alternative to cationic liposome/DNA aggregates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 24, n. 2–3, p. 275–290, 1997.
- BLAZEK, A. D.; PALEO, B. J.; WEISLEDER, N. Plasma membrane repair: A central process for maintaining cellular homeostasis. **Physiology**, 2015.
- BORCHARD, G. Chitosans for gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2001.
- BURSAL, E.; KÖKSAL, E. Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). **Food Research International**, 2011.
- BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, 2007.
- CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. **Revista Processos Químicos**, 2007.
- CHANG, S. H.; HUANG, J. J. Biodegradability and anticoagulant properties of chitosan and sulfonated chitosan films coated on TiNi alloys. **Surface and Coatings Technology**, 2012.
- CHANTARASATAPORN, P. et al. Water-based oligochitosan and nanowhisker chitosan as potential food preservatives for shelf-life extension of minced pork. **Food Chemistry**, 2014.
- DE PAULA PANSANI OLIVEIRA, F. et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: Composition effects on the in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, 2013.
- DE SOUZA, R. H. F. V. et al. Diethylaminoethyl- chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.
- DESAI, M. P. et al. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. **Pharmaceutical Research**, 1997.
- DORSETT, Y.; TUSCHL, T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2004.

DUY, N. N. et al. Synthesis of gold nanoparticles with seed enlargement size by γ -irradiation and investigation of antioxidant activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 633–638, 2013.

ESCOFFRE, J. M.; TEISSIÉ, J.; ROLS, M. P. Gene transfer: How can the biological barriers be overcome? **Journal of Membrane Biology**, 2010.

FERNANDES, J. C. et al. Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: Optimization studies. **International Journal of Nanomedicine**, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 1997.

GAO, Y. et al. Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 359, n. 1–2, p. 241–246, 2008.

GARCÍA, M. A. et al. Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on the antioxidant capacity of chitosan from lobster shells. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, 2015.

GORMLEY, A. J.; GHANDEHARI, H. Evaluation of toxicity of nanostructures in biological systems. In: SAHU, S. C.; CASCIANO, D. A. **Nanotoxicity: from in vivo and in vitro models to health risks**. Wiley, 2009.

GOY, R. C.; DE BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polimeros**, 2009.

GUO, Z. et al. Hydroxyl radicals scavenging activity of N-substituted chitosan and quaternized chitosan. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 24, p. 6348–6350, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

GUZMAN-VILLANUEVA, D. et al. Enhanced cellular uptake and gene silencing activity of siRNA molecules mediated by chitosan-derivative nanocomplexes. **International Journal of Pharmaceutics**, 2014.

HU, F. Q. et al. Effective antitumor gene therapy delivered by polyethylenimine-conjugated stearic acid-g-chitosan oligosaccharide micelles. **Gene Therapy**, 2013.

HUANG, H. et al. Low molecular weight polyethylenimine cross-linked by 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin coupled to peptide targeting HER2 as a gene delivery vector. **Biomaterials**, 2010.

HUANG, M. et al. Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. **Journal of Controlled Release**, v. 106, n. 3, p. 391–406, 2005.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. **Pharmaceutical Research**, 2004.

HUH, M. S. et al. Polysaccharide-based Nanoparticles for Gene Delivery. **Topics in Current Chemistry**, 2017.

IHM, J. E. et al. Improved biocompatibility of polyethylenimine (PEI) as a gene carrier by conjugating urocanic acid: In vitro and in vivo. **Macromolecular Research**, 2015.

JAYAKUMAR, R. et al. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2007.

KARAGIANNIS, T. C.; EL-OSTA, A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. **Cancer Gene Therapy**, 2005.

KASAHARA, N.; DOZY, A. M.; KAN, Y. W. Tissue-specific targeting of retroviral vectors via ligand-receptor interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1995.

KEAN, T.; ROTH, S.; THANOU, M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, 2005.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2010.

KIANG, T. et al. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. **Biomaterials**, 2004.

KIM, T. H. et al. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, 2007.

KONG, F. et al. Phosphorylatable short peptide conjugated low molecular weight chitosan for efficient siRNA delivery and target gene silencing. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 51–63, 2010.

KURITA, K. et al. Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, n. 2, 1993.

LINDEN, R. Terapia gênica: O que é, o que não é e o que será. **Estudos Avancados**, 2010.

MALMO, J. et al. SiRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. **Journal of Controlled Release**, 2012.

MAO, H. Q. et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, 2001.

MAO, S.; SUN, W.; KISSEL, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2010.

MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015.

MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. **Chemical Reviews**, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 1983.

NIVEN, R. Biodistribution of radiolabeled lipid-dna complexes and dma in mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1998.

PACK, D. W. et al. Design and development of polymers for gene delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2005.

PARVEZ, S. et al. Preparation and characterization of artificial skin using chitosan and gelatin composites for potential biomedical application. **Polymer Bulletin**, 2012.

PROKOP, A.; DAVIDSON, J. M. Nanovehicular intracellular delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008.

PU, S. et al. An in vitro comparison of the antioxidant activities of chitosan and green synthesized gold nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 211, n. December 2018, p. 161–172, 2019.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 1999.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2018.

SAHARAN, V. et al. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2013.

SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 11, p. 3846–3868, 2017.

SALCHER, E. E.; WAGNER, E. Chemically programmed polymers for targeted DNA and siRNA transfection. **Topics in Current Chemistry**, 2010.

SATO, A. et al. Polymer brush-stabilized polyplex for a siRNA carrier with long circulatory half-life. **Journal of Controlled Release**, 2007.

SATO, T.; ISHII, T.; OKAHATA, Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. **Biomaterials**, 2001.

SHI, Q. et al. Chitosan-DNA/siRNA nanoparticles for gene therapy. In: YUAN, X.-B. **Non-viral gene therapy**. IntechOpen, 2011.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2013.

SILVA, A. C. R. E; BARBOSA JÚNIOR, J. Realidades e perspectivas do uso de terapia gênica no tratamento de doenças. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, 2018.

SKLAN, E. H.; GLENN, J. S. The Power of Silence: Application of Small Interfering RNAs to Gastrointestinal Diseases. **Gastroenterology**, 2007.

SOLEIMANI, M. et al. Nanoparticles in gene therapy. **International Journal of Integrative Biology**, 2016.

SPRADLING, A. C.; RUBIN, G. M. Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes. **Science**, 1982.

STARK, G. R. et al. How cells respond to interferons. **Annual Review of Biochemistry**, 1998.

TAMER, T. M. et al. Free radical scavenger activity of chitosan and its aminated derivative. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 4, p. 195–201, 2016.

TIERA, M. J. et al. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. **Biomacromolecules**, 2006.

TOLAIMATE, A. et al. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, 2000.

TØMMERAAS, K. et al. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, 2001.

VELLAI, T.; VIDA, G. The origin of eukaryotes: The difference between prokaryotic and eukaryotic cells. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 1999.

WANG, T. et al. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, 2012.

XIE, W.; XU, P.; LIU, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2001.

YANG, R. et al. A review on chitosan-based flocculants and their applications in water treatment. **Water Research**, 2016.

YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, 2014.

YU, Y. Y. et al. Synthesis and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)-O-chitosan-polyethylenimine for gene delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 269–274, 2010.

YUAN, Z. et al. Chitosan-graft- β -cyclodextrin nanoparticles as a carrier for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, 2013.

ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, 2015.

ZHAO, X. et al. Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, 2006.