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

FRANCIELE DE PAULA PANSANI OLIVEIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS NANOPARTÍCULAS FORMADAS PELA INTERAÇÃO DE AMINO DERIVADOS DE QUITOSANA COM DNA.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2011

FRANCIELE DE PAULA PANSANI OLIVEIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS NANOPARTÍCULAS FORMADAS PELA INTERAÇÃO DE AMINO DERIVADOS DE QUITOSANA COM DNA.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2011

FRANCIELE DE PAULA PANSANI OLIVEIRA

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS NANOPARTÍCULAS FORMADAS PELA INTERAÇÃO DE AMINO DERIVADOS DE QUITOSANA COM DNA.

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Jose Tiera
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof[a]. Dr[a]. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro
USP – São Carlos

Prof[a]. Dr[a]. Iêda Aparecida Pastre Fertonani
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 11 de Agosto de 2011

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Luiz Antônio e Marta, ao meu irmão João Luis, e ao meu marido Alessandro, por acreditarem que este trabalho poderia ser realizado mesmo com tanta dificuldade.

Ao meu orientador, Marcio José Tiera, pela sua orientação neste projeto que sem esta não seria possível a realização deste trabalho.

A Deus pelo amor incondicional, inteligência, sabedoria, paciência e saúde, que me fez forte para superar todos os desafios. Assim podendo concluir esta fase maravilhosa que contribuiu muito para o meu melhoramento profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Marcio José Tiera, pelo período de convivência que me proporcionou conhecer mais do trabalho realizado no seu laboratório, pela sua dedicação neste projeto, a perseverança para alcançar os objetivos e o aprendizado adquirido. E a sua esposa e companheira, Vera Aparecida Oliveira Tiera, pela amizade, carinho e aprendizado neste período do mestrado.

Aos meus pais, Luiz Antônio e Marta, pelo amor incondicional, apoio, carinho, dedicação e incentivo para a realização deste projeto. Aos meus avôs, muito obrigada.

Aos meus colegas de Laboratório, Isadora, Fábio, Rafael, Hellen, Tamiris, Bruna, Evelyn, Idiberto e todos que trabalhei neste período do mestrado, obrigada pela contribuição no trabalho, carinho, amizade de cada um.

Ao Departamento de Química e Ciências Ambientais, pela conquista da Pós-graduação em Química, que me permitiu realizar este estudo maravilhoso, contribuindo para ampliação dos meus conhecimentos.

Ao Laboratório de Evolução Molecular de insetos da Prof.ª Dr.ª Cláudia Carareto por ceder seu Transiluminador e programa para revelação do gel de eletroforese.

Ao Laboratório de Fotoquímica do Prof. Dr. Fernando Fertonani e da Prof.ª Dr.ª Iêda Pastre Fertonani pela utilização do Espectrofluorímetro para medidas de intensidade de fluorescência.

Ao Laboratório de Microscopia e Microanálise do Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pelas fotos realizadas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).

A seção de Pós-Graduação, pelo excelente atendimento, paciência, dedicação, e o trabalho realizado.

Em especial ao meu marido, pelo amor, apoio, compreensão, dedicação, paciência e o incentivo por mais uma vitória da nossa vida.

“Agrada-te do Senhor, e ele satisfará os desejos do teu coração.”

Salmos 37:4

RESUMO

O presente trabalho apresenta a síntese e caracterizaçao de derivados de quitosana obtidos pela reação com cloreto de 2-cloro dietilaminoetilamônio (DEAE Cl). Os derivados obtidos foram utilizados na síntese de nanopartículas para liberação controlada de genes. Inicialmente a quitosana comercial foi desacetilada e as sínteses foram realizadas em meio aquoso alcalino pela reação de substituição nucleofílica dos grupos amino da quitosana. A caracterização dos derivados foi realizada utilizando-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN-^{1}H), titulações potenciométricas e condutimétricas. Os derivados obtidos apresentaram proporções crescentes de DEAE (15%, 24%, 80% e 117%) e diferentes capacidades de tamponamento. A massa molecular viscosimétrica foi determinada por medidas de viscosidade e variou de 17 a 21 kDa. As titulações potenciométricas mostraram que a modificação de quitosana com o grupo DEAE permite aumentar a capacidade tamponante com respeito à quitosana e pode contribuir para aumentar a liberação de DNA e a eficiência do processo de transfecção gênica. O estudo dos derivados com DNA foi realizado utilizando-se as técnicas de fluorescência, eletroforese, espalhamento de luz dinâmico (tamanho das nanopartículas) e potencial zeta. O ensaio com brometo de etídio mostrou que a força de interação de DNA com os derivados depende tanto do grau de substituição por DEAE quanto da razão de cargas (N/P). Em altos valores de pH (7,4) todos os derivados interagem fortemente com DNA devido a presença dos grupos amino terciários e quaternários ligados a cadeia de quitosana. Os resultados de eletroforese mostram que a força de interação aumenta com o grau de substituição de DEAE e os resultados iniciais de espalhamento de luz mostram que nanopartículas estáveis podem ser obtidas em pH fisiólogico o que se mostra como uma vantagem frente a quitosana desacetilada. Os resultados iniciais de transfecção mostram que a presença dos grupos DEAE aumenta a eficiência da transfecção gênica e podem ser promissores com estudos em animais.

PALAVRAS-CHAVE: quitosana, terapia gênica, derivados, DEAE.

ABSTRACT

This work presents the synthesis and characterization of chitosan derivatives obtained by reaction of chitosan with diethylaminoethyl chloride - Cl DEAE. The obtained derivatives were employed in the synthesis of nanoparticles for controlled delivery of genes. Commercial chitosan was deacetylated and the reactions were carried out in aqueous solution at pH 8.0 by the nucleophilic subsitituion of the chitosan amino groups. The characterization was performed using 1H NMR spectroscopy, potentiometric and conductimetric titrations. The obtained derivatives contain increasing proportions of DEAE (15%, 24%, 80% and 117%) and different buffering capacities. Viscosity measurements were performed to determine the viscoimetric molecular weight (Mv), which varied from 17 to 21 kDa. The potentiometric titrations showed that DEAE groups increase the buffering capacity of chitosan and this may contribute to increase the DNA delivery from nanoparticles and the efficiency of gene transfection. The study of interaction between the derivatives and DNA was performed using fluorescence, gel electrophoresis, dynamic light scattering and zeta potential. The ethidium bromide (EtBr) assay showed that the strenght of interaction between the derivatives and DNA depends on both, the degree of substitution (DS) and N/P charge ratio. At physiological pH all derivatives interacted with DNA due to the presence of tertiary quaternary amino groups attached to the chitosan main chain. The gel electrophoresis results showed that the strength of interaction increases with DS and the initial results employing light scattering techniques show that stable nanoparticles can be obtained in phyisological pH, which is clearly an important property in comparison to deacetylated chitosan. Transfection studies carried out with these derivatives confirmed that the presence of DEAE groups improves the transfection efficiency and may be promising in animal studies.

KEYWORDS: chitosan, gene therapy, derivates, DEAE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ordem de grandeza no mundo nanométrico..... 1

Figura 2. Representa Quitina, se y > x, e Quitosana se x > y. A numeração apresentada é a mais utilizada para identificar os carbonos do anel glicopiranosídico..... 4

Figura 3. Representação esquemática da preparação de nanogéis de quitosana sensíveis ao pH, e a liberação de drogas induzida pelo pH.(●) droga; (~) Bioconjugado para o reconhecimento celular. A, B, C e D representam respectivamente o nanogel obtido pela interação com TPP, a ligação do bioconjugado, a incorporação da droga e a liberação pelo decréscimo do pH [Adaptado de ZHANG et al., 2006]..... 6

Figura 4. As principais barreiras para a liberação do gene transportado por peptídeo: o peptídeo deve ser capaz de (A)-condensar o DNA firmemente em pequenas partículas compacta; (B)-intergir com receptores específicos de superfícies da célula; (C)-induzir a fuga endossomal, e (D)-entregar a carga de DNA para o núcleo e a expressão do gene (refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada em uma proteina) transportado (Molly, et al., 2007).....7

Figura 5. Representação das estruturas de quitosana (x = 0.85) e do processo de desacetilação em meio alcalino para a formação de quitosana (x = 0.95).....13

Figura 6. Esquema da síntese da quitosana com cloreto de 2-cloro dietilaminoetilamônio, DEAE Cl.....14

Figura 7. Estrutura dos derivados de quitosana-DEAE e os respectivos hidrogênios utilizados na determinação do grau de acetilação e substituição de DEAE. 17

Figura 8. Viscosímetro do tipo Cannon-Ubbelohde para a determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana.....18

Figura 9. Gráfico da Titulação Condutométrica e Potenciométrica realizadas simultânea mente..... 19

Figura 10. Representação esquamática do ensaio com EtBr em meio aquoso para estudo da interação de quitosana e seus derivados com DNA..... 20

Figura 11. Representação da estrutura da molécula de EtBr.....20

Figura 12. Representação da estrutura da molécula de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).....24

Figura 13. Representação da redução do MTT (Tetrazolium) para Formazan..... 24

Figura 14. Titulações potenciométricas de quitosana desacetilada CH-95%, CH-DEAE15%, CH-DEAE24%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117% para determinação do grau de desacetilação e ionização. A linha em vermelho corresponde à primeira derivada dos dados potenciométricos..... 26

Figura 15. Titulações condutimétricas da quitosana desacetilada CH-95%, CH-DEAE15%, CH-DEAE24%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117% para determinação do grau de ionização.....27

Figura 16. Espectro de RMN-H da Quitosana desacetilada (CH-95%).....29

Figura 17. Espectros de RMN-H das quitosanas CH-DEAE15%, CH-DEAE24%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117%..... 30

Figura 18. Gráfico de viscosidade reduzida em função da concentração de CH-95%, CH-DEAE117%, CH-DEAE80%, CH-DEAE24%, CH-DEAE15% em tampão acetato pH 4,5, para cálculo da massa molar viscosimétrica média (M_v)..... 32

Figura 19. a) Capacidade de tamponamento, avaliado por titulação condutimétrica em solução de NaCl 150mM titulados com HCl 0,1M; **b**) Grau de ionização, por titulação potenciométrica e condutimétrica para a CH-95%, CH-DEAE117%, CH-DEAE80%, CH-DEAE24%, CH-DEAE15%..... 34

Figura 20. Titulação do complexo DNA-EtBr por quitosana desacetilada e seus derivados substituidos com grupos DEAE em pH 4,0; 5,0; 6,2 e 7,4, força iônica 150mM e concentração de 50mM a 25^0C.....37

Figura 21. Titulação do complexo Plasmídeo-EtBr por quitosana desacetilada e seus derivados substituidos com grupos DEAE em pH 5,0 e 7,4, força iônica 150mM e concentração de 50mM a 25^0C.....38

Figura 22. Eletroforeses em gel de agarose de complexos ctDNA e quitosanas (a) CH-95%, (b) CH-DEAE15%, (c) CH-DEAE24%, (d) CH-DEAE80% e (e) CH-DEAE117% em tampão

acetato pH 4,0; 6,2 e 7,4. As bandas fluorescentes indicam o deslocamento do DNA. As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese..... 40

Figura 23. Eletroforeses em gel de agarose de complexos de VR 1412 e quitosanas CH-DEAE15%, CH-DEAE25%, em tampão acetato pH 5,0, 150mM de força iônica. As bandas fluorescentes indicam o deslocamento do DNA (plasmídeo). As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese. L= Ladder.....40

Figura 24. Eletroforeses em gel de agarose de complexos de VR 1412 e quitosanas CH-95%, CH-DEAE15%, CH-DEAE25%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117% em tampão fosfato pH 7,4, 150mM de força iônica. As bandas fluorescentes indicam o deslocamento do DNA (plasmídeo). As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese. L= Ladder.....41

Figura 25. Medidas de tamanho (a) e potencial zeta (b) das nanopartículas preparadas com quitosanas e seus derivados e o plasmídeo VR 1412 em pH 7,4 e força iônica 150 mM.....42

Figura 26. Efeito da modificação de quitosana com DEAE sobre a viabilidade cellular de células HeLa, avaliadas pelo ensaio de MTT após 24 horas de incubação a 37 °C com as nanopartículas na concentração de 5 μg de DNA por poço..... 44

Figura 27. Eficiência da transfecção das nanopartículas incubadas com células HeLa em presence de 10% de FBS. As células receberam 5,0 microgramas de DNA ou nanoparticulas preparadas com diferentes razãoes N/P e os diferentes polímeros CH –DEAE contendo 5.0 μg de DNA. 46

Tabela 1. Propriedades da quitosana e dos derivados utilizados na preparação das nanopartículas.....32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a	Constante de Mark-Houwink relacionada à flexibilidade do polímero
BCA	ácido bicinconínico
c	Concentração da amostra
CH	Quitosana
CH-DEAE	Quitosana com grupos Dietilaminoetil
CH-DEAEPC	Quitosana com grupos Dietilaminoetil e Fosforilcolina
D2O	Oxido de deutério
DCl	Cloreto de deutério
DEAE Cl	Dietilaminoetil cloro
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	Dulbeco´s Modified Eagle Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Brometo de Etídeo
FBS	Soro Fetal Bovino
GA	Grau de Acetilação
GD	Grau de Desacetilação
GS	Grau de Substiuição
GSq	Grau de Substituição de grupos quaternários
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	Henrietta Lacks
KB	Linhagem de células derivados de um carcinoma da nasofaringe
Kbp	kilobase de pares
Km	Constante de Mark-Houwink
M_v	Massa molar viscosimétrica média
MA	Monômeros Acetilados
MD	Monômeros desacetilados
MS_{DEAE}	Monômeros Substituidos por DEAE
MS_q	Monômeros Substituidos Quaternizados
MM	Massa Molecular
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
N	Grupos amina de quitosana
n	Número de mols
[η]	Viscosidade intrínseca
ηsp	Viscosidade específica
N/P	Razão de grupos amina de quitosana e grupos fosfato de DNA
NaOH	Hidróxido de sódio
P	Grupos fosfato de DNA
PEI	Polietilenamina
PS	Penicilina Streptomicina
RMN H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
t	Tempo de escoamento da solução polimérica
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
t_o	Tempo de escoamento do tampão
α	Grau de ionização

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Quitina e Quitosana 3

1.2. Nanopartículas na Terapia Gênica Não Viral 5

2. OBJETIVOS 11

3. MATERIAIS E MÉTODOS 12

3.1. Materiais 12

3.2. Desacetilação da Quitosana 12

3.3. Síntese dos derivados de Quitosana com DEAE Cl (CH-DEAE) 13

3.4. Determinação do Grau de Desacetilação (GD) por potenciometria 14

3.5. O Grau de Desacetilação(GD) e Substiuição (GS) por Ressonância Magmética Nuclear de Prótons (RMN-^{1}H) 14

3.6. Determinação da Massa Molar Viscosimétrica Média 17

3.7. Determinação da Capacidade de Tamponamento 18

3.8. Determinação do Grau de ionização (α) por Titulação Condutimétrica e Poteniométrica 18

3.9. Estudo da Interação DNA-Derivados utilizando-se o ensaio com Brometo de Etídio 20

3.9.1. Eletroforese das Nanopartículas preparadas pela interação de quitosana e seus derivados com DNA de timo de bezerro e Plasmídeo 21

3.10. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) para Tamanho e Potencial Zeta 22

3.11. Cultura das céulas e Protocolo de Transfecção in vitro de Células HeLa 22

3.12. Estudos de Toxicidade das Nanopartículas Preparadas Com Quitosana e Seus Derivados 23

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 25

4.1. Caracterização da Quitosana Desacetilada e dos seus derivados 25

4.1.1. Titulação Potenciométrica e Condutimétrica 25

4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 28
4.1.3. Determinação da Massa Molar Viscosimétrica 31
4.1.4. Determinação da Capacidade de Tamponamento e Grau de ionização dos derivados em função do pH 33
4.2. Estudo da Interação de quitosana e seus derivados com DNA de timo de Bezerro e Plasmídeo VR 1412 35
4.2.1. Ensaio de Fluorescência com Brometo de Etídio (EtBr) 35
4.2.2 Eletroforese das nanoparículas de Quitosana desacetilada e seus derivados com DNA de timo de bezerro e Plasmídeo 39
4.2.3. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Medidas de Potencial Zeta das Nanopartículas preparadas com o Plasmídeo VR 1412 41
4.3. Estudos de Toxicidade das Nanopartículas Preparadas Com Quitosana e Seus Amino Derivados 43
4.4. Eficiência da Transfecção in vitro de Células HeLa 44

5. CONCLUSÃO 47

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

1. INTRODUÇÃO

A busca pela exploração do universo nanométrico foi idealizada por Richard Feynman em 1959 ao proferir sua célebre conferência "There's Plenty of Room at the Bottom", antecipando a revolução tecnológica que se figura nos últimos anos. (FORMIGA, 2007)

Nos anos seguintes, diversas técnicas proporcionaram um avanço na direção das idéias precursoras de Feynman. Cabe destacar a invenção dos microscópios eletrônico que trouxeram mudanças extraordinárias no desenvolvimento de materiais. (FORMIGA, 2007).

Nanociência e nanotecnologia tratam do estudo e aplicação de estruturas que possuam ao menos uma dimensão na ordem de 10 a algumas centenas de nanometros (Figura 1). (FORMIGA, 2007).

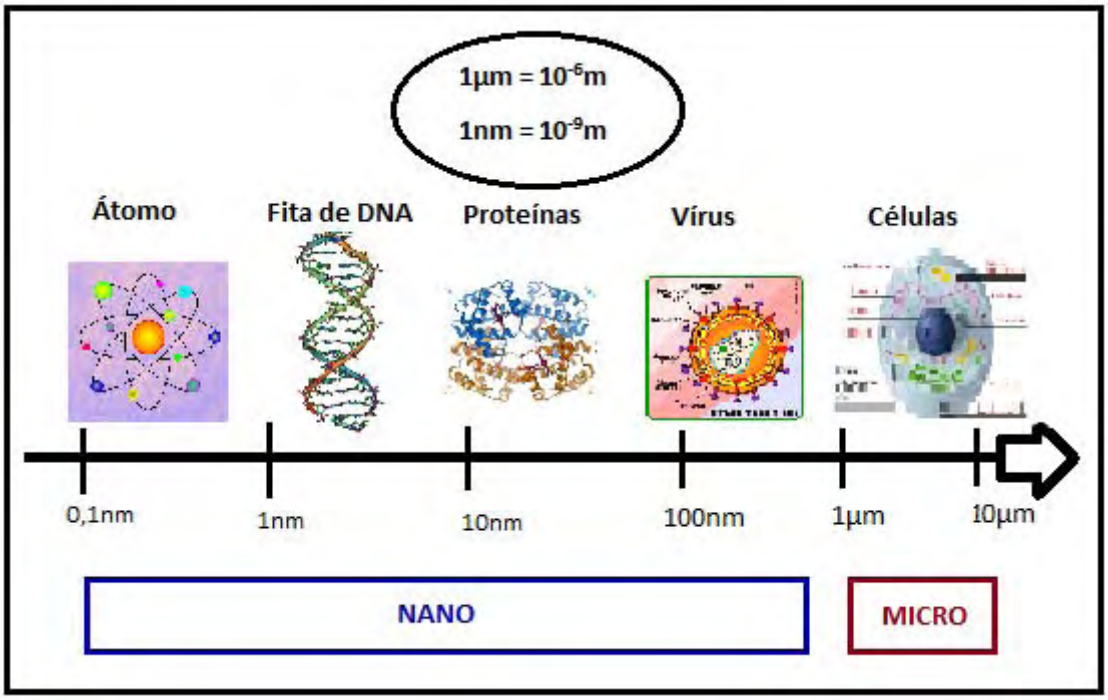


Figura 1. Ordem de grandeza no mundo nanométrico.

A terapia gênica tem o potencial para tratar uma grande variedade de desordens genéticas herdadas e adquiridas, incluindo o diabetes, fibrose cística, câncer e hemofilia (Grigsby &Leong, 2009). Essa tecnologia é essencialmente o transporte, transferência e

expressão de um ou mais genes na célula alvo (Crystal, 1995; Roth & Cristiano, 1997). Entre os vetores utilizados para transportar genes os vetores virais ainda são os mais amplamente investigados e aplicados clinicamente devido à sua alta eficiência de transfecção gênica (processo de entrega e expressão de material genético com sucesso no interior no núcleo celular). No entanto, a morte de Gelsinger, um voluntário adolescente na terapia gênica com vetor viral, levou à reconsideração a utilização de vetores virais em humanos para experimentos clínicos. Já os vetores não virais oferecem várias vantagens sobre o sistema viral, que inclue principalmente a segurança na utilização. Durante a última década, muitos esforços têm sido feitos para produzir sistemas não-virais que alcancem o nível de expressão de genes atingido por vetores virais. Os vetores não virais envolvem principalmente DNA "nu"(apenas DNA, sem vetor), vetores de lipídios e vetores de polímero. (Huang, et al., 2003)

O DNA é uma macromolécula muito flexível sob condições fisiológicas normais, é negativamente carregada devido aos seus grupos fosfato (PO_4^-) e muito grande para atravessar as membranas sem ajuda. Para o transporte eficaz do gene in vitro e in vivo, outro problema fundamental é a rápida degradação do DNA. Até o momento, mais atenção tem sido focada no polímero catiônico, que é capaz de condensar o DNA para formar complexos que protegem o DNA da degradação e mascara as cargas negativas do DNA plasmidial. (Huang, et al., 2003). Devido à importância dos complexos DNA-policátions para a terapia gênica, o processo de formação de complexos tem atraído um considerável interesse e tem sido estudado por uma grande variedade de técnicas tais como espectroscopia de fluorescência (Trubetskoy, et al., 1999), microscopia eletrônica (Perales, et al., 1997), e espalhamento de luz (Rungsardthong, et al., 2003).

O tamanho e forma das nanopartículas pode depender da massa molecular do policátion, da concentração e tipo do DNA/plasmídeo, bem como da razão de cargas policátion:DNA (+ : -) (Tiera, et al., 2006). O tamanho da partícula é considerado como um parâmetro importante, pois pode afetar o tempo de circulação na corrente sangüínea e o processo de captação celular. Em geral, tem sido relatado que poliplexos entram na célula principalmente por endocitose ou pinocitose, e que o tamanho deve ser inferior a 100 nm (Mao, et al., 2001; Wolfert, et al., 1996). Entretanto, os resultados experimentais disponíveis são contraditórios e alguns trabalhos afirmam que a transfecção pode ocorrer para partículas

com tamanhos variando de 100 nm (Erbacher, et al., 1998) a 2,0 μm (Akbuga, et al., 2004). Recentemente, estudos utilizando microscopia de força atômica indicaram que poliplexos quitosana-DNA com tamanhos de algumas centenas de nanômetros podem ser transferidos para dentro das células por meio da endocitose (Liu, et al., 2003).

Após a administração o sistema transportador contendo o DNA deve ser capaz de permanecer na corrente sangüínea até atravessar a membrana da célula alvo. Dependendo das características da superfície as nanopartículas são em geral, removidas por macrófagos do sistema retículo endotelial do fígado, baço e outros órgãos (Peppas, et al., 2004). A obtenção de novos polímeros com camadas protetoras na superfície das nanopartículas pode evitar interações com proteínas plasmáticas e fagócitos, prolongando, portanto, o tempo de circulação na corrente sangüínea (Leong, et al., 1998; Sato, et al., 2001).

Estudos realizados sobre a liberação de DNA de complexos não-virais em células têm levado a aceitação da hipótese denominada “esponja de prótons”. Essa hipótese propõe que o complexo entra na célula por meio de endocitose e, devido ao decréscimo do pH endossomal pela adição de Hidrogênio e Cloreto no endossomo, ocorre o aumento do grau de protonação do complexo. Isso favorece o deslocamento de íons para o interior do endossomo aumentando a força iônica do meio e, conseqüentemente, facilitando a liberação da partícula e do DNA (Boussif, et al., 1997). Portanto, a análise de novos poliplexos em diferentes condições experimentais se torna essencial para avanços nessa área.

1.1. Quitina e Quitosana

A quitina é encontrada no exoesqueleto de crustáceos, na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos. Esse biopolímero, devido a sua versatilidade, pode ser utilizado como agente floculante no tratamento de efluentes, como adsorvente na clarificação de óleos, e principalmente na produção de quitosana. Assim, a quitosana, que possui valor comercial maior e propriedades mais interessantes para ambito industrial e fins de pesquisa, torna-se uma alternativa de utilização para a quitina. (MOURA, et al., 2006)

A quitosana é um polissacarídeo encontrado em alguns microorganismos, mas que usualmente é obtido a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino. Sua estrutura

química é constituída de unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose e 2- acetamida-2-desoxi-D-glicopiranose interligadas por ligações glicosídicas β-(1→4). Em função da sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, esse polímero tem sido estudado extensivamente como excipiente em várias formulações farmacêuticas, sob a forma de comprimidos, micro e nanopartículas, microesferas, granulados, lipossomas, géis e hidrogéis. Esses produtos aplicados pelas vias parenteral, transdérmica, oral, vaginal, nasal, ocular, além da terapia gênica, tornam a quitosana um polímero versátil no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos sendo que o resultado final depende do comprimento da cadeia, densidade de carga e distribuição dessas cargas no polissacarídeo. (Garcia, et al., 2008)

A quitina e quitosana diferenciam-se pela proporção de grupo acetamida e amino no polímero, ou seja, a quitina possui mais que cinqüenta por cento de grupos acetamida comparando-se aos grupos amino, e a quitosana maior porcentagem de grupos amino em relação aos grupos acetil (Figura 2).

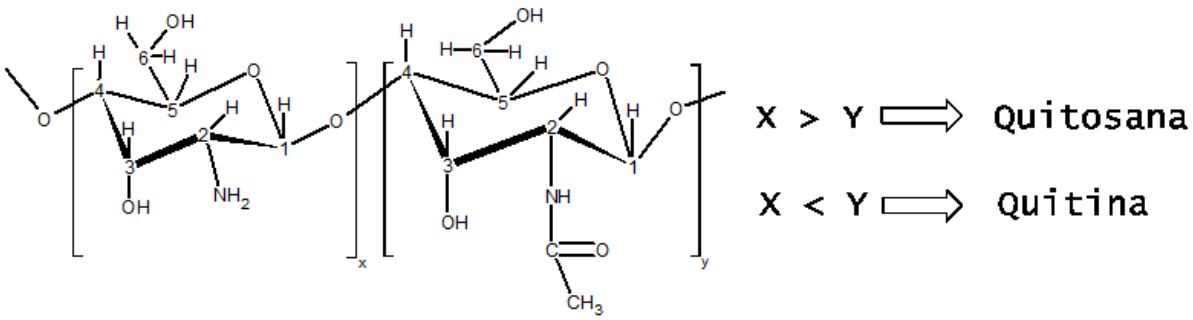


Figura 2. Representa Quitina, se y > x, e Quitosana se x > y. A numeração apresentada é a mais utilizada para identificar os carbonos do anel glicopiranosídico.

Na presença de soluções diluídas de ácidos, a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico, constituído de um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranose de composição variável em função do grau médio de acetilação, *GA*, que representa a fração de unidades 2-acetamido-2-glicopiranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranose. O grau de acetilação (GA) é um dos principais parâmetros para sua caracterização e os métodos utilizados para sua determinação incluem a titulação potenciométrica, condutimétrica, espectroscopia na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN H), entre outras (Santos, et al., 2003).

A quitosana é insolúvel em água, e solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos, como acético, fórmico, cítrico, e também em ácidos inorgânicos, como ácido clorídrico diluído (Santos, et al., 2003). A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino passíveis de protonação ($-NH_3^+$) na cadeia polimérica e a protonação destes grupos aumenta a repulsão eletrostática entre as cadeias e também a solvatação por água (Santos, et al., 2003). Na estrutura da quitosana existem grupos reativos como o grupo hidroxila e amino, que podem sofrer reações de N-acetilação, N-alquilação, N-carboxilação, N-sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (Santos, et al., 2003).

Devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, grupos aminos passíveis de protonação ($-NH_2$) e de reações químicas, a quitosana possui um grande potencial nas pesquisas em várias áreas como a terapia gênica, sendo utilizada na interação com o DNA a ser transportado em segurança até a célula alvo. Portanto a importância da pesquisa de transportadores de DNA configura-se como tema de grande importância na área da terapia gênica não viral.

1.2. Nanopartículas na Terapia Gênica Não Viral

Nanopartículas preparadas a partir de polímeros sensíveis a estímulos internos ou externos tem sido proposto como possíveis carreadores para a terapia gênica, bem como para liberação de drogas anticancerígenas (Ganta, et al., 2008). A construção desses sistemas explora mudanças nas propriedades físicas das nanopartículas que ocorrem ou em resposta às mudanças nas condições do meio circundante, ou são induzidas externamente. Esses estímulos podem alterar as interações com células e disparar a liberação da droga no sítio de interesse. Entre os vários estímulos que podem ser utilizados para induzir a liberação de drogas a mudança do pH tem sido um dos mais explorados. (Ganta, et al., 2008)

O pH em sítios sistêmicos de infecções e tumores primários é menor que o pH de um tecido normal. A título de exemplo pode-se mencionar que o pH da região cai de 7,4 sob condições normais para 6,5 após 60 horas do início da reação inflamatória (Ganta, et al., 2008). Este comportamento pode ser utilizado para a preparação de sistemas sensíveis ao pH para liberação de genes ou fármacos, os quais podem explorar as propriedades bioquímicas para a liberação sítio-dirigida. Os compartimentos celulares como citoplasma, endossomos,

lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de golgi, mitocondria e núcleo são conhecidos por manter seus próprios valores de pH característicos. Os valores de pH podem variar de 4,5 no lisossomo até aproximadamente 8,0 na mitocondria. Devido a esses gradientes de pH, compostos com pKa entre 5,0 e 8,0 podem exibir mudanças dramáticas nas propriedades físico-químicas de nanopartículas. A liberação intracelular de drogas ou genes é um dos principais desafios deste tipo de sistema devido a sua alta atividade degradativa do compartimento endossomal/fagossomal. (Ganta, et al., 2008)

Nanogéis formados com um derivado catiônico de quitosana, o qual foi intercruzado com tripolifosfato de sódio (TPP) para incorporação de metotrexato disódico, uma droga citotóxica utilizada no tratamento contra o câncer (Zhang, et al., 2006), mostraram que para meio ambientes de baixo pH os nanogéis podem expandir e liberar a droga, podendo ser úteis como sistemas para liberação de drogas em meio ácido (Figura 3).

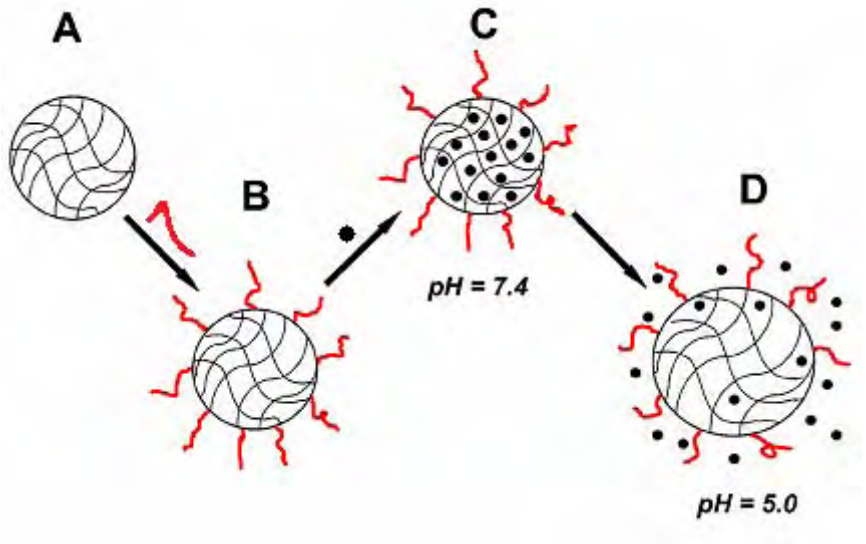


Figura 3. Representação esquemática da preparação de nanogéis de quitosana sensíveis ao pH, e a liberação de drogas induzida pelo pH.(●) droga; (~) Bioconjugado para o reconhecimento celular. A, B, C e D representam respectivamente o nanogel obtido pela interação com TPP, a ligação do bioconjugado, a incorporação da droga e a liberação pelo decréscimo do pH [Adaptado de ZHANG et al., 2006].

As principais barreiras que devem ser superadas por vetores não-virais para que a entrega do gene seja bem sucedida são descritas na Figura 4. O vetor deve ser capaz de

compactar e proteger o DNA, interagir com receptores específicos da superfície celular, induzir a fuga da membrana endossomal, e entregar a carga do DNA para o núcleo (Molly, et al., 2007).

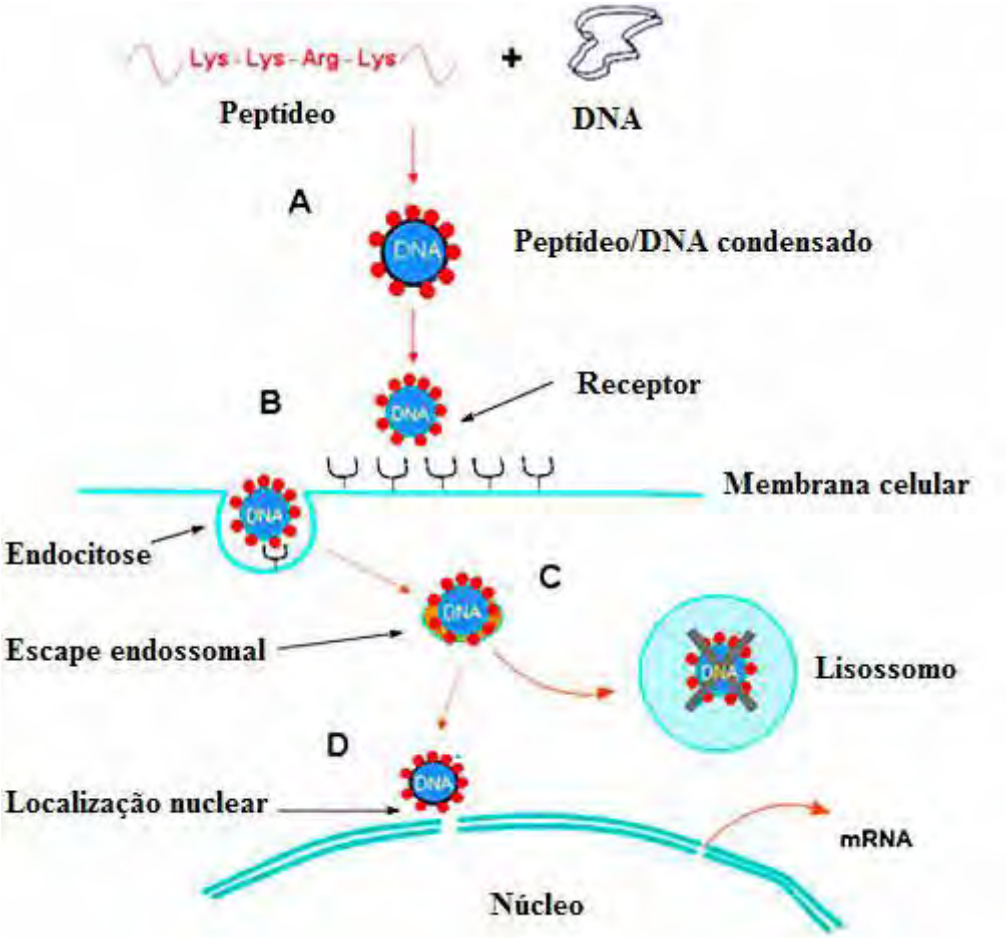


Figura 4. As principais barreiras para a liberação do gene transportado por peptídeo: o peptídeo deve ser capaz de (A)-condensar o DNA firmemente em pequenas partículas compacta; (B)-intergir com receptores específicos de superfícies da célula; (C)-induzir a fuga endossomal, e (D)-entregar a carga de DNA para o núcleo e a expressão do gene (refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada em uma proteina) transportado (Molly, et al., 2007).

Entretanto na terapia gênica não viral as duas etapas que mais limitam o processo de transferência gênica são o escape dos poliplexos do endossomo e a entrada nuclear. A liberação ineficiente do complexo polímero/DNA das vesículas endocíticas dentro do citoplasma é indicada por vários autores como uma das causas primárias da baixa taxa de

transfecção (Lechardeur, et al., 2002). A estratégia utilizada para vencer essa barreira tem sido aumentar o escape endossomal por meio da utilização de polímeros com grupos cujos pKas tenham valores ligeiramente abaixo do pH fisiológico. Esta alternativa está baseada no mecanismo proposto para o escape chamado de "esponja de prótons", e a importância desse mecanismo tem sido reconhecida e revisada (Cho, et al., 2003). O mecanismo foi proposto inicialmente por Boussif e colaboradores para explicar a alta taxa de transfecção para poli(etilenimina) (PEI). Estudos mostraram que o PEI tem uma grande capacidade de tamponamento em uma ampla faixa de pH, portanto poliplexos presentes no endossomo podem absorver os prótons que são bombeados para dentro desta organela. Devido à protonação e repulsão dos grupos amino protonados ocorre o inchamento do polímero. Além disso, para evitar um aumento da densidade de cargas dentro do endossomo ocasionado pelo fluxo de prótons, ocorre também um fluxo equivalente de íons cloreto Cl^-. A entrada de ambos os íons protons e íons cloreto (Cl^-) aumenta a osmolaridade do endossomo e causa uma absorção maior de água.

Esta hipótese foi testada utilizando-se derivados quarternizados de PEI (sem capacidade tamponante), e também por meio da utilização de inibidores específicos de funções celulares (Akinc, et al., 2005). Os autores reportaram que a quaternização de PEI e o uso de bafilomicina A1, um inibidor de bombeamento vacuolar, reduziram a eficiência de transfecção de PEI de aproximadamente duas ordens de magnitude.

O uso de quitosana como carreador para a terapia gênica é limitado pela baixa taxa de transfecção comparado aos vetores virais. A quitosana é reconhecida há vários anos como um carreador seguro devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e sua capacidade de interagir com ácidos nucleícos proporcionando a proteção necessária contra a degradação por nucleases no meio ambiente intracelular. No entanto ela tem uma solubilidade muito limitada em valores de pH maiores que 6,0 e em pH neutro uma cobertura hidrofóbica é formada sobre as nanopartículas quitosana-DNA, tornando-as facilmente “reconheciveis” por opsoninas (molécula que age como facilitadora de ligação no processo de fagocitose) que as “marcam” para a destruição por fagocitose. Várias alternativas tem sido utilizadas para sobrepor essas barreiras e o tempo de circulação pode ser aumentado pelo revestimento das nanopartículas com polímeros como PEG (Zhang, et al., 2007; Chan, et al., 2007; Zahr, et al., 2006; Bodnar, et al., 2006) e Dextrana (Park, et al., 2000).

Como mencionado anteriormente, após a internalização, as nanopartículas devem ser capazes de liberar o DNA e o escape endossomal é um etapa chave para o progresso da terapia (Ganta, et al., 2008). A transfecção pode ser aumentada variando-se alguns parâmetros da estrutura de quitosana como densidade de cargas, massa molecular e capacidade de tamponamento. Várias alternativas têm sido utilizadas para aumentar a capacidade de tamponamento da quitosana e o escape endossomal do DNA das nanopartículas. Sun et al. ligaram à quitosana pepitídeos curtos para facilitar a descompactação intracelular e otimizar a eficiência de tranfecção dos poliplexos. Embora a conjugação tenha resultado num aumento significativo na eficiência da transfecção, ela permaneceu baixa quando comparada a lipofectamina 2000 (Sun, et al., 2010). A ligação de cadeias de poli(etileneimina) na quitosana tem sido utilizada por vários autores (Yu, et al., 2010; Lu, et al., 2008; Gao, et al., 2010; Wang, et al., 2008) e a maioria dos resultados mostraram que os polimeros enxertados (PEI-quitosana) exibem uma alta eficiência para a transfecção que poli(etilenoimina) 25 kDa, tanto in vitro quanto em estudos in vivo (Wang, et al., 2008). Além disso, a citotoxicicidade dos polímeros híbridos foi muito menor que aquela de PEI (25 kDa)(Gao, et al., 2010). O mesmo princípio foi utilizado por Chang et al pela ligação de grupos histidina aos grupos amino de quitosana via ligações dissulfeto. O grau de substituição de histidina foi variado e a capacidade tamponante dos derivados foi aumentada com respeito à quitosana. Os autores reportaram uma maior eficiência de transfecção, sugerindo que os grupos histidina aumentaram a captação das nanopartículas pelas células bem como aumentaram o escape endossomal dos endossomos e lisossomos (Chang, et al., 2010).

Outras alternativas que podem ser empregadas compreendem a variação da massa molecular e/ou a densidade de cargas para controlar a força de interação entre quitosana e DNA. Lavertu e colaboradores mostraram que pelo controle do grau de acetilação e massa molecular (MM) da quitosana foi possível maximizar a expressão gênica. Os estudos mostraram que a maior expressão gênica foi obtida para valores altos da razão (massa molar/grau de desacetilação) (MM/GD) e baixos razões de carga (N/P). Por outro lado para baixos valores da razão MM/GD maiores razões N/P foram necessárias para maximizar a transfecção (Lavertu, et al., 2006). Apesar disso, a captação celular é mais eficiente quando o pH é menor que 7,0 e os complexos estão positivamente carregados e com tamanhos inferiores a 1 μm (Ma, et al., 2010).

Uma superfície positivamente carregada é particularmente importante para promover uma captação celular eficiente bem como para manter a estabilidade coloidal das nanopartículas quitosana/DNA (Anchordoquy, et al., 2005). Mao e colaboradores mostraram que o pH pode ter um impacto importante sobre a eficiência de transfecção gênica. Como o grau de ionização de quitosana é sensível ao pH isto afetou a expressão gênica em células HEK293 mediadas por oligômeros lineares de quitosana. Para valores de pH maiores que 7,2 baixos niveis de expressão gênica foram detectados. Entretanto complexos coloidalmente estáveis formados pela interação de DNA com oligomeros enxertados com glucose mostraram uma maior eficiência de transfecção em valores de pH maiores que 7,2 (Sabina, et al., 2008)

A introdução de grupos catiônicos adicionais na estrutura de quitosana pode aumentar a capacidade da quitosana de interagir com DNA aumentando a captação celular e a eficiência da transfecção (Yu, et al, 2010;Gao, et al., 2008) e altas eficiencias de transfecção foram recentemente reportadas para nanopartículas preparadas com quitosanas trimetiladas (Morris, et al., 2010). Entretanto como a interação é predominantemente eletrostática cargas positivas permanentes podem impedir a liberação do DNA do carreador, ou seja, da quitosana. Strand e colaboradores mostraram recentemente que a otimização da transfecção pode ser alcançada ajustando-se a estabilidade dos poliplexos. Estes autores trabalhando com quitosanas de diferentes massas moleculares (MMs) concluiram que a expressão gênica maxima é obtida numa faixa estreita de MMs, cujo grau de polimerização varia de 32 – 42, e que quando o comprimento das cadeias foi aumentado além desses valores os poliplexos obtidos foram muito estáveis e reduziram a transfecção gênica (Huang, 2010).

Portanto, a síntese e caracterização de novos derivados de quitosana configuram-se como uma alternativa promissora para o aprimoramento da eficiência de vetores não virais para o transporte e liberação de genes.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram à síntese e caracterização de derivados de quitosana contendo grupos amino terciários, os quais podem exibir maior capacidade tamponante que aquela exibida pela quitosana com grau de desacetilação superior a 90%. Numa segunda etapa foram realizados estudos da interação desses derivados com DNA focalizando-se o efeito da composição na capacidade de tamponamento, bem como na força de interação com o DNA em diferentes condições de pH e razão de cargas. Desta forma obtivemos nanopartículas que apresentaram uma maior estabilidade coloidal em pH neutro e que viabilizaram um aumento na taxa de transfecção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os reagentes utilizados para a elaboração deste estudo foram: NaOH, HCl (Sinth), Quitosana (Polymar), cloreto de 2-cloro dietilaminoetilamônio (DEAE Cl) (Sigma-aldrich), acetona (Sinth) , ácido acético(Sinth). O DNA de timo de bezerro (10-15 kbp) foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO) e usados sem tratamento posterior. O plasmídeo DNA VR 1412 com 8,1 kbp codificado com o gene da beta-Galactosidase com um promotor CMV foi obtido da Vical (San Diego, CA, USA). Este plasmídeo foi gentilmente cedido pelo Prof. Júlio Fernandes da Université de Montreal –Canadá. A contaminação por proteína foi determinada insignificante em A260/A280 = 1,90 que é uma indicação da pureza do DNA (Casé, et al., 2009).

3.2. Desacetilação da Quitosana

Uma massa de 8g de quitosana foi dispersa em 400ml de água deionizada sob agitação. Em seguida, 7,8 mL de ácido acético foram adicionados a dispersão sob agitação até solubilização completa da quitosana. Essa solução foi adicionada lentamente sobre 100ml de solução de Hidróxido de sódio (NaOH) 50% de forma a obter uma suspensão fina. Essa suspensão foi aquecida à temperatura de 100ºC durante uma hora e meia sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, a suspensão foi transferida para 3,5 litros de água deionizada sob agitação mantida a aproximadamente 40ºC. O precipitado foi decantado, lavado por quatro vezes e isolado por filtração. O procedimento descrito foi repetido mais uma vez para obter grau de desacetilação mais elevado. A quitosana foi filtrada, lavada com acetona e seca em estufa a temperatura de 50ºC por 72hs (Casé, et al., 2009). A reação de desacetilação esta mostrada na figura 5.

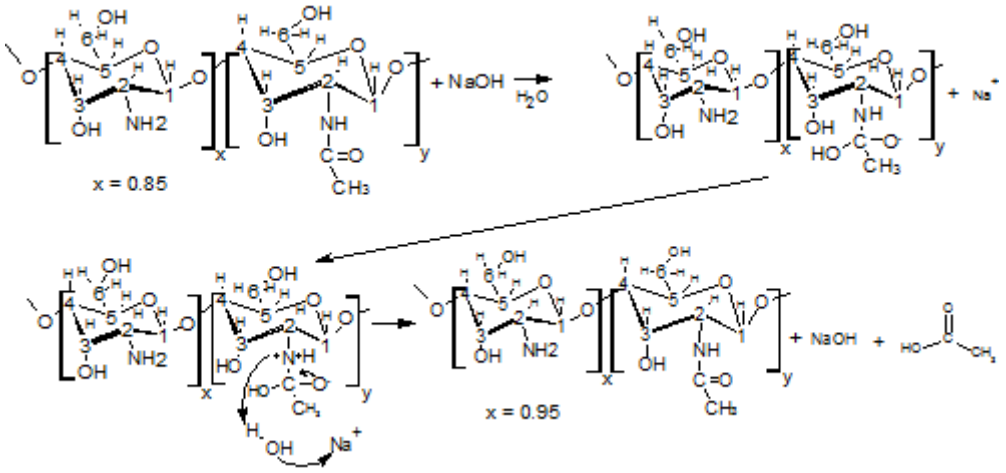


Figura 5. Representação das estruturas de quitosana (x = 0.85) e do processo de desacetilação em meio alcalino para a formação de quitosana (x = 0.95).

3.3. Síntese dos derivados de Quitosana com DEAE Cl (CH-DEAE)

Uma massa de 0,5g de quitosana desacetilada foi solubilizada em 20ml de Ácido clorídrico (HCl) 0,1M, em um balão de duas bocas (50ml). Adicionou-se em sequência 1g de DEAE Cl à solução de Quitosana, e ficou sob agitação por 24hs. Em seguida o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH aquoso 15%, formando uma suspensão fina e esta foi aquecida por 2hs à 65^{o}C. Em seguida, o produto da reação foi dialisado utilizando-se uma membrana Spectrapore de tamanho de exclusão de 2000 Da em solução de NaOH 0,05 mol/L por 24hs, seguida de 72hs de diálise contra água deionizada (trocando-se a água 2 vezes ao dia). Após a diálise a solução foi congelada para liofilização. Nesta síntese com DEAE (Figura 6), foram produzidos quatro polímeros, de "Grau de Substituição" (GS) de 15, 24, 80 e 117%, com proporções de mols de DEAE/Quitosana de 0.3, 0.5, 0.9 e 1.9. A tabela 1 na página 32 mostra as proporções de DEAE utilizadas em cada síntese. (Zambito et al., 2006)

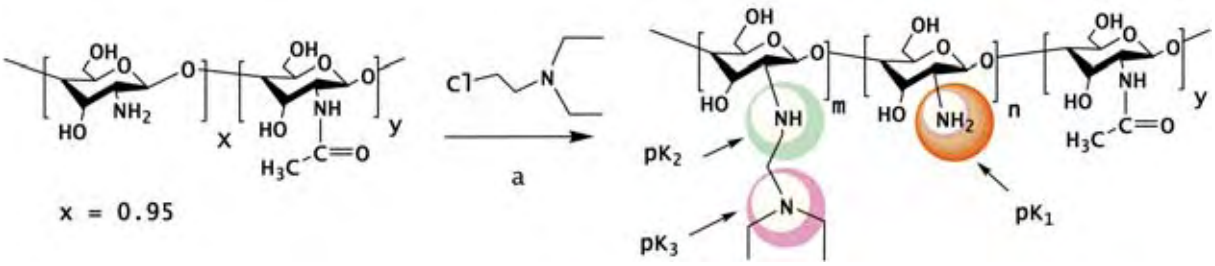


Figura 6. Esquema da síntese da quitosana com cloreto de 2-cloro dietilaminoetilamônio, DEAE Cl

3.4. Determinação do Grau de Desacetilação (GD) por potenciometria.

A determinação potenciométrica do grau de desacetilação foi feita utilizando-se o método de Tolaimate e Muzzareli (Muzzarelli, et al., 1977). Neste procedimento 40mg de quitosana foram dissolvidas em 10 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L, ficando sob agitação por 24hs, e titulados com alíquotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L padronizado. O pH foi monitorado utilizando-se um pHmetro digital, marca Digimed.

$$GD = \frac{n^o \text{ de mols de unidades desacetiladas}}{n^o \text{ de mols de unidades desacetiladas} + n^o \text{ de mols de unidades acetiladas}} \quad (1)$$

3.5. O Grau de Desacetilação (GD) e Substiuição (GS) por Ressonância Magmética Nuclear de Prótons (RMN-^{1}H)

O fenômeno da RMN foi observado experimentalmente pela primeira vez em 1946, por F. Bloch e E. Purcell (Prêmio Nobel de Física de 1952). A RMN é observada quando se incide ondas de rádio-freqüência em uma amostra que tem isótopos com spin nuclear maior que zero (por exemplo, 1H) na presença de um campo magnético. A RMN passou a ser de grande importância para análises químicas já na década de 50, com a descoberta de que seu

sinal reflete o ambiente químico em que o núcleo se encontra em uma molécula. Esse fenômeno, denominado deslocamento químico, permitiu um grande avanço na área de determinação estrutural de moléculas pequenas e/ou de média massa molecular. Até o final da década de 60, a RMN se restringia praticamente às análises baseadas no H_1 (Colnago, et al., 2002). A espectrometria de RMN utiliza como fonte de excitação uma radiação eletromagnética da região de radiofreqüências (ondas de rádio) λ = 100 mm – 1m.

Os núcleos magneticamente ativos possuem spin e comportam-se como pequenas barras magnéticas orientando, na ausência de um campo magnético, os seus pólos N/S aleatoriamente no espaço. Quando sujeitos a um campo magnético H_0 do espectrômetro de RMN, os núcleos alinham os seus pólos magnéticos no mesmo sentido (α) e no sentido contrário (β) aos do campo H_0 em igual probabilidade.

A irradiação, contínua ou pulsada dos núcleos com uma radiofreqüência de energia variável, $\Delta E = hv$, leva a absorção desta energia pelos núcleos α invertendo o seu estado magnético para o estado β. Este fenômeno designa-se por ressonância e é a energia absorvida pelos núcleos, ou emitida após a sua relaxação para o estado fundamental, que origina o sinal RMN.

Se o desvio químico dá informações sobre o ambiente eletrônico de um determinado tipo de próton, a integração revela o número de prótons responsável por um pico de RMN. Além do desvio químico e da integração, a forma dos sinais (multiplicidade) oferece toda a informação sobre a vizinhança dos prótons em estudo. Multiplicidade de sinais indica um desdobramento spin-spin, é o fenômeno que ocorre graças às influências magnéticas, sobre os átomos de hidrogênio responsáveis pelo sinal, de outros átomos de hidrogênio adjacentes. Este efeito é conhecido como acoplamento spin-spin. O acoplamento de um hidrogênio com outro gera um pico duplo (dupleto), o acoplamento entre três hidrogênios gera um pico triplo (tripleto) e assim por diante. Sinais com múltiplos picos (mais de 7 ou 8) podem ser chamados *multipletos*.

A análise de RMN-^{1}H da quitosana desacetilada e dos seus derivados foram realizadas em um instrumento da Bruker de 500 MHz na USP de Ribeirão Preto/SP. A massa de cada amostra foi de 20mg dissolvidos em 1mL de óxido de deutério (D_2O) e 10μL de Cloreto de deutério (DCl). As soluções foram deixadas sob agitação durante 24 horas para promover a dissolução e posterior análise. Os espectros de RMN-H foram obtidos a 70 ^oC e os graus de

desacetilação (GD) e de substituição (GS) (em porcentagem) foram calculados utilizando-se as áreas dos sinais referentes ao CH3 (I(CH3)) do monômero acetilado, hidrogênios anoméricos H1 (I(H1)) e H1s (I(H1s)), $N(CH_2CH_3)_2$ (I ($N(CH_2CH_3)_2$)), $N^+((CH_2CH_3)_2(CH_2CH_2)_2)$ ((Figura 7), e as equações 2, 3 e 4 (Tiera, et al., 2006; Tolaimate, et al., 2000).

$$GD = 100\% - \left(\frac{I(CH_3) / 3)}{I(H_1)} \times 100\% \right) \qquad 2$$

$$GS_{DEAE} = \left(\frac{I(N(CH_2CH_3)_2) / 6)}{(I(H_1)+I(H_{1s}))} \right) \times 100\% \qquad 3$$

$$GS_q = \left(\frac{I(N(CH_2CH_3)_2) / 6)}{(I(H_1)+I(H_{1s}))} \right) \times 100\% \qquad 4$$

A determinação dos graus de desacetilação e de substituição permitem estimar a massa molecular média das unidades que compõem os derivados (equação 5). Esse parâmetro é importante para calcular a razão N/P, sendo N a concentração de grupos amino carregados e P a concentração de grupos fosfato. Para o cálculo da massa molecular média das unidades a seguinte relação foi utilizada:

$$MM = (\%\ MD \times 161{,}22) + (\%\ MA \times 203{,}22) + (\%MS_{DEAE} \times 260{,}38) + (\%MS_q \times 360{,}59) \qquad 5$$

Sendo GA o grau de unidades acetiladas que pode ser calculado conhecendo-se GD.

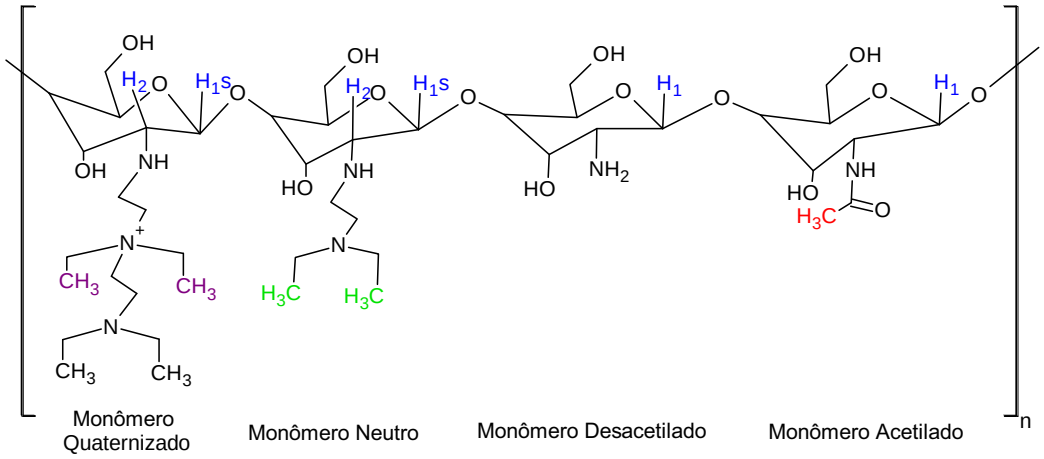


Figura 7. Estrutura dos derivados de quitosana-DEAE e os respectivos hidrogênios utilizados na determinação do grau de acetilação e substituição de DEAE.

3.6. Determinação da Massa Molar Viscosimétrica Média.

As medidas de viscosidade foram realizadas com o viscosímetro do tipo Cannon-Ubbelohde (Figura 8) em solução tampão de 0,3M de ácido acético-0,2M de acetato de sódio. A temperatura foi mantida constante a 25ºC e o tempo de escoamento de cada solução foi medido cinco vezes. O tempo de escoamento do tampão medido em segundos (t_o) e da solução polimérica (t) foi medido em diferentes concentrações (*c*), diluindo-se a solução inicial. Com os tempos de escoamento, calculou-se a viscosidade específica (η_{sp}) para cada concentração da amostra (Huggins, 1942; Santos, et al., 2003):

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \qquad 6$$

A partir de um gráfico de η_{sp}/c x *c*, pode-se encontrar a viscosidade intrínseca da solução polimérica [η], ou seja o coeficiente linear da reta. A massa molar da quitosana foi calculada pela equação de Mark-Houwink :

$$[\eta]=K_m M^a \quad (7)$$

Na qual: K_m=0,078 e a=0,797 (Brugnerotto, et al., 2001).

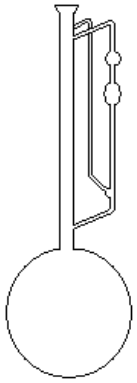


Figura 8. Viscosímetro do tipo Cannon-Ubbelohde para a determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana.

3.7. Determinação da Capacidade de Tamponamento

A Capacidade de Tamponamento foi determinada por titulação ácido-base, ajustando-se o pH da solução de quitosana para 10 e titulando até pH 2. A concentração das amostras foi de 0,2mg/ml, adicionadas a um volume de 10ml de NaCl 150mM. Após uma hora sob agitação o pH foi ajustado para 10 com uma solução de NaOH 0,1M. Em seguida a titulação foi realizada com de solução de HCl 0,1M (Lu, et al., 2008).

3.8. Determinação do Grau de ionização (α) por Titulação Condutimétrica e Potenciométrica

A Titulação condutimétrica e potenciométrica (ver exemplo da titulação do CH-DEAE15% na figura 9, página 19) foi realizada com a dissolução de 40mg da amostra em 10ml de HCl 0,1M, ficando sob agitação por 24hs. Na sequência a solução foi titulada com

alíquotas de solução de NaOH 0,1M (Santos, et al., 2003). Os cálculos para o Grau de ionização (α) foram feitos considerando-se o volumes de NaOH necessários para desprotonação dos grupos amino dos derivados. Esses volumes foram obtidos dso gráficos das titulações condutimétricas a partir do 1^o ponto ao 2^o pontos de equivalência. Desta forma utilizando-se os valores de pH, volume (V) de NaOH adicionado e o volume total (Vt) gasto para para desprotonação o grau de ionização foi calculado segundo a equação 7 (Tiera, et al., 2006)

$$\alpha = 1 - (V / Vt) \qquad 8$$

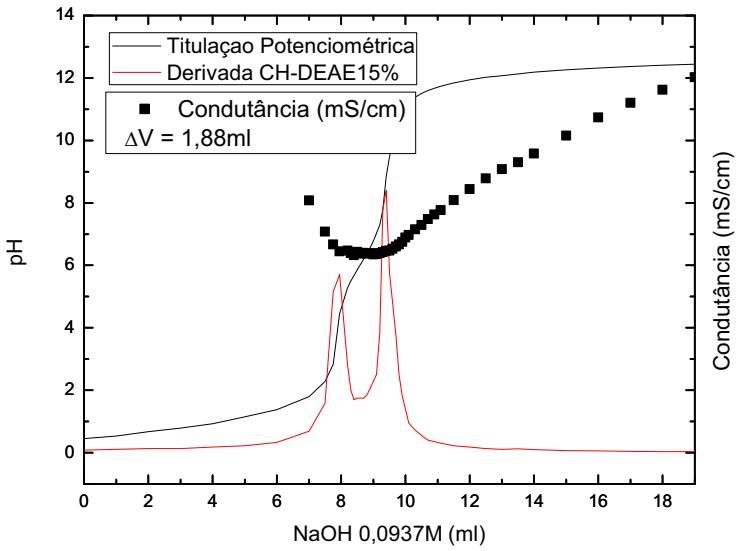


Figura 9. Gráfico da Titulação Condutométrica e Potenciométrica realizadas simultaneamente.

3.9. Estudo da Interação DNA-Derivados utilizando-se o ensaio com Brometo de Etídio

A interação da quitosana desacetilada, e seus derivados com DNA de timo de bezerro foi estudada utilizando técnicas de fluorescência e eletroforese em diferentes valores de pH e força iônica de 150 mM com o EtBr (Figura 11) (Casé, et al., 2009). O EtBr é uma sonda catiônica que emite fluorescência quando intercalada entre as bases da cadeia de DNA. A interação de quitosana com DNA desloca as moléculas de EtBr (Figura 10) e a fluorescência decresce devido a sua transferência para o meio aquoso.

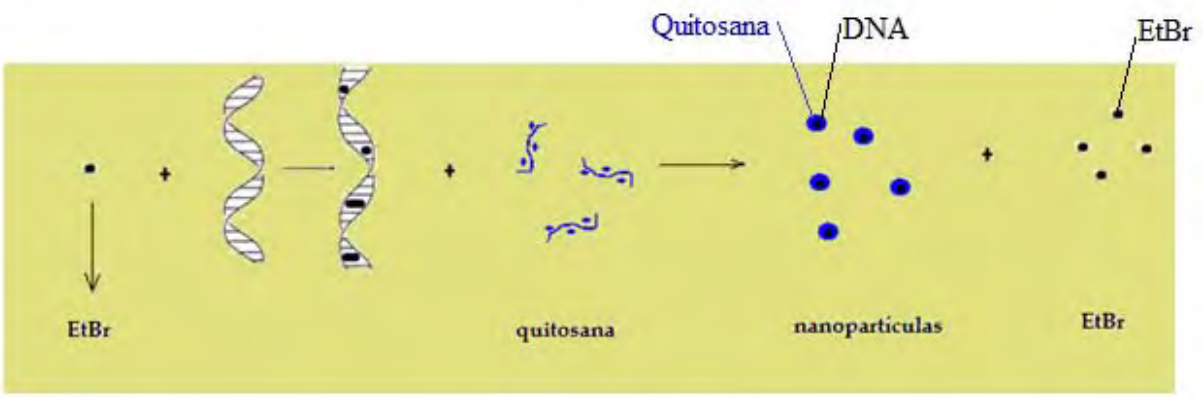


Figura 10. Representação esquamática do ensaio com EtBr em meio aquoso para estudo da interação de quitosana e seus derivados com DNA.

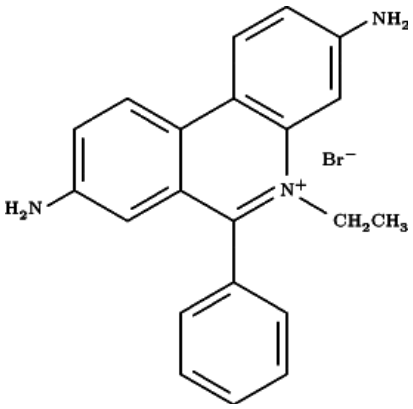


Figura 11. Representação da estrutura da molécula de EtBr.

A concentração de DNA foi determinada pela absorção no UV em 260 nm com o espectrofotômetro UV-visível Cary modelo 100Bio, utilizando-se a relação 1A (unidade de absorbância) = 50 mg/mL = 0,146 mM de grupos fostato (Felgner, et al., 1997). A solução de DNA utilizada foi de concentração final igual a 1,6 x 10^{-5} mol/L, e de EtBr a concentração final foi de 4 x 10^{-6} mol/L. O volume inicial na cubeta foi de 2 ml de solução de DNA-EtBr.

A Titulação da solução de DNA-EtBr por quitosana, foi feita com vários polímeros utilizando-se soluções estoque. A intensidade de fluorescência foi normalizada pela fluorescência do DNA-EtBr na ausência do policátion, e os resultados foram apresentados na forma de gráficos de % de fluorescência em função da razão nitrogênio/fosfato (N/P). Os tampões utilizados foram: HAc/NaAc em pH 4.0, HAc/NaAc pH 5.0, fosfato em pH 6,2, fosfato em pH 7,4 e força iônica 150 mM. Os comprimentos de onda utilizados na realização desse experimento no Fluorímetro Hitachi F 4500 foram de 560 nm de excitação e 605 nm de emissão.

3.9.1. Eletroforese das nanopartículas preparadas pela interação de quitosana e seus derivados com DNA de timo de bezerro e Plasmídeo

O ensaio utilizando-se eletroforese em gel das nanopartículas foi realizado com o objetivo de avaliar a estabilidade dos complexos formados em função do grau de substituição, pH e razão N/P. Os complexos formados para diferentes razões quitosana/DNA (+/-), para uma concentração fixa de DNA ou plasmídeo, foram incubados nos tampões apropriados por 30 minutos. A eletroforese foi realizada em tampão TAE (10X). A solução corante de Azul de Bromofenol utilizada para corar o gel de eletroforese foi feita utilizando as seguintes porcentagens: 0,25% de Azul de bromofenol, 0,25% de Xyleno Cyanol e 25% de Ficoll 400 .

As amostras para eletroforese foram preparadas pela mistura de 3,5 µl de azul de bromofenol e 8,5 µl de amostra de solução de DNA e Quitosana (N/P). Os poços do gel foram carregados com 7,5 µl desta solução final e o tempo de corrida utilizado foi de 1 hora na voltagem de 80 Volts. O gel foi corado com EtBr 1 µg/ml por 30 minutos e revelado no Lab.de Evolução Molecular de insetos da Prof. Dr^{a} Claudia Carareto, em sala isolada no

aparelho UVtransiluminator com maquína fotográfica conectada ao computador e interligada ao programa Alpha digital.

3.10. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) para Tamanho e Potencial Zeta

O tamanho bem como o potencial zeta das nanopartículas são parâmetros importantes para a captação celular. Esses parâmetros foram determinados por medidas de espalhamento de luz dinâmico utilizando o instrumento Zetasizer ZS90 (Malvern Instrument Worcstershire, UK), equipado com laser de 633-nm e ângulo de 90^{o}. Essas medidas foram realizadas no Laboratório do Prof. Júlio C. Fernandes da Université de Montreal Canadá. As nanopartículas de quitosana/Plasmídeo foram preparadas em diferentes razões de N/P (0,5, 1, 2, 3, 5, 7 e 10) em tampão fosfato pH 7,4 e força iônica 150 mM, por meio da titulação da solução de ctDNA (35 μM) com as soluções das diferentes quitosanas. As medidas foram feitas com três acumulações e repetidas com preparo de novas soluções. As mesmas soluções foram utilizadas nas medidas de potencial zeta.

3.11. Cultura das Células e Protocolo de Transfecção in vitro de Células HeLa.

As células HeLa utilizadas nos experimentos de toxicidade e transfecção foram obtidas da coleção da "American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)". Células HeLa são células cancerosas de uma doadora involuntária chamada Henrietta Lacks (1920-1951), mantida em cultura mibrobiológica pelo cientista George Otto Gey para criar a primeira linhagem imortal da história. As células HeLa foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS. As células foram incubadas em atmosfera de CO_2-O_2 (5-95%) a 37°C, suplementadas 24 horas antes da transfecção em placas de 24 poços, numa densidade de 50.000 células por poço em 1mL do meio de cultura, o qual foi suplementado com 10% FBS e 1% PS. No dia da transfecção o meio de cultura foi trocado por 500 μl do meio completo contendo DNA livre ou os complexos quitosana-DNA com uma quantidade equivalente de 5 μg de DNA. Após seis horas de incubação as células receberam 1 mL de meio completo e foram incubadas por 60 horas para a transfecção.

Para a análise quantitativa da expressão da β-galactosidade, o kit ELISA para β-gal foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente as células após 60 horas da transfecção foram submetidas ao lise com o tampão indicado incluído no kit. Os extratos celulares foram centrifugados por 15 minutos à 40 graus celsius. O sobrenadante foi depois utilizado para detecção com o kit ELISA. A expressão da β-galactosidade foi determinada como picogramas de β-gal por miligrama de proteína celular. O conteúdo de proteína total das amostras foi medido utilizando-se o ensaio com BCA (Pierce,Rockford, Illinois, USA). A concentração da proteína pode ser determinada baseada na absorbância por causa da relação linear entre eles. **Estes estudos foram realizados no laboratório do Prof. Júlio Fernandes da Université de Montreal –Canadá.**

3.12. Estudos de Toxicidade das Nanopartículas Preparadas Com Quitosana e Seus Derivados.

Nos estudos de toxicidade 200 μL do meio de cultura contendo as células foram transferidas para placas de 96 poços, seguido da adição de 50 microlitros das nanopartículas e um período de incubação de 24 horas. Após esse período a viabilidade celular foi depois avaliada pela adição de 50 μL da solução do corante MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(Figura 12) na concentração de 0,5 mg/mL. As células foram incubadas por mais 4 horas. O método baseia-se na redução do corante MTT (Thiazolyl blue), inicialmente amarelo na sua forma oxidada, mas adquire coloração azul na sua forma reduzida chamado de Formazan (Figura 13), e esta redução é feita pelas desidrogenases mitocondriais, ou seja, ocorrerá somente em células viáveis, o qual é insolúvel em água. Em seguida o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 microlitros da solução ácida de isopropanol (0,1 N HCl no isopropanol absoluto) e a placa foi incubada por mais 10 minutos a 37^0 C. A absorbância foi medida em 570 nm com um espectrofotometro para leitura de placas EL800 (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA). **Estes estudos foram realizados no laboratório do Prof. Júlio Fernandes da Université de Montreal –Canadá.**

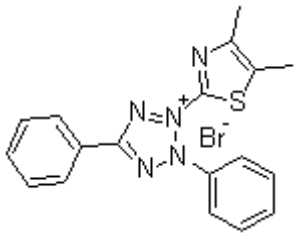


Figura 12. Representação da estrutura da molécula de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide).

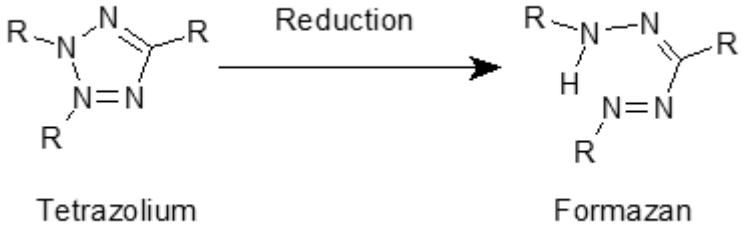


Figura 13. Representação da redução do MTT (Tetrazolium) para Formazan.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização da Quitosana Desacetilada e dos seus derivados

4.1.1. Titulação Potenciométrica e Condutimétrica

A caracterização da quitosana desacetilada e dos seus derivados foi iniciada pelas titulações potenciométricas (Figura 14), e sendo os dados utilizados para a determinação do grau de desacetilação. Para os derivados os dados em conjunto com as titulações condutimérticas (Figura 15) foram utilizados também para determinação do grau de ionização (Figura 19b). O grafico da primeira derivada para a quitosana desacetilada apresenta dois picos, que correspondem repectivamente ao início e termino da desprotonação dos grupos amino da quitosana pelo NaOH (0,1014mol/L). A partir da equação 1(página 14) o grau de desacetilação obtido foi de 95,2% . Para os demais derivados nota-se claramente o aparecimento de um terceiro pico nas derivadas primeiras que correspondem aos grupos aminos secundários e/ou terciários ligados à cadeia de quitosana.

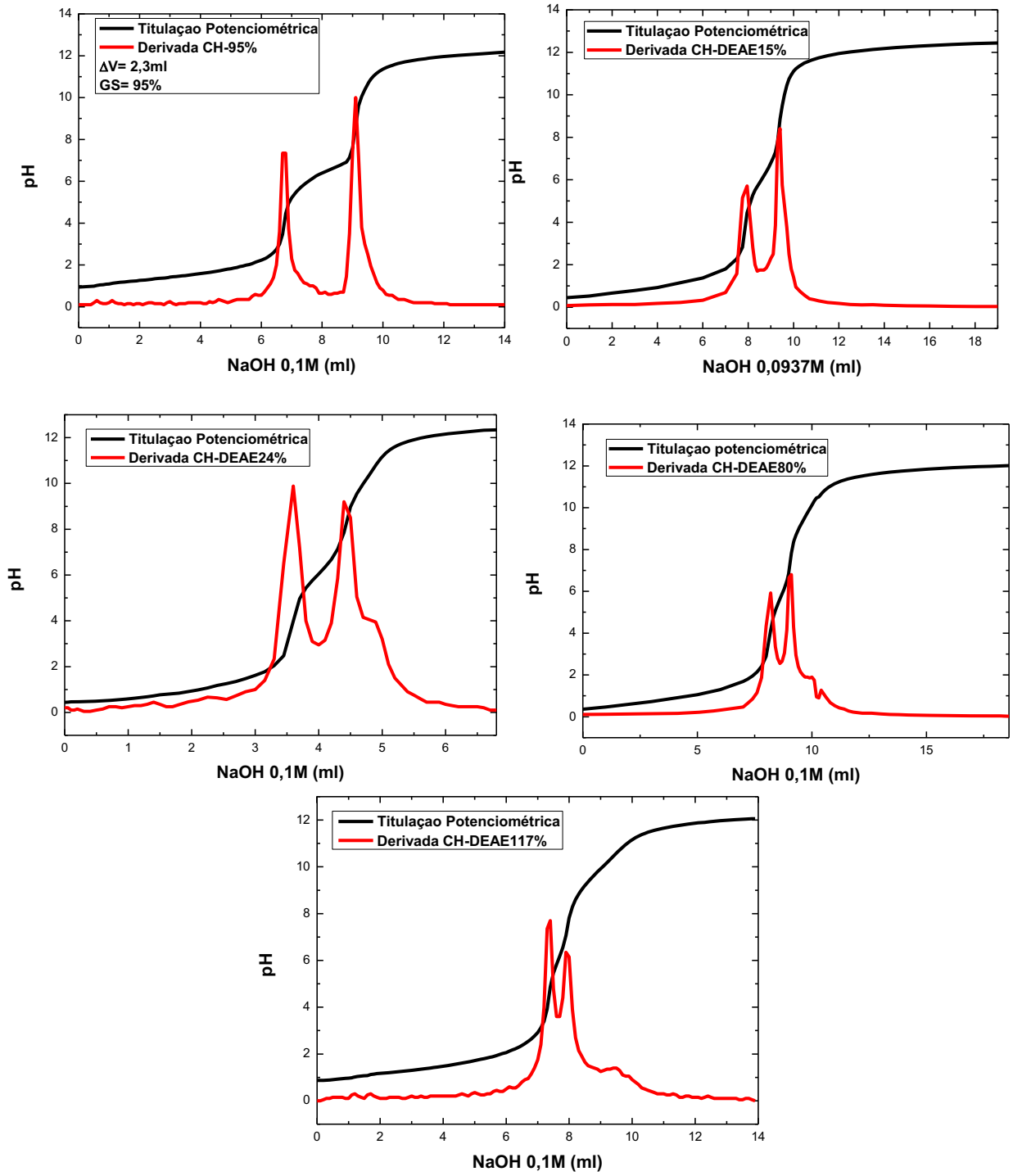


Figura 14. Titulações potenciométricas de quitosana desacetilada CH-95%, CH-DEAE15%, CH-DEAE24%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117% para determinação do grau de desacetilação e ionização. A linha em vermelho corresponde à primeira derivada dos dados potenciométricos.

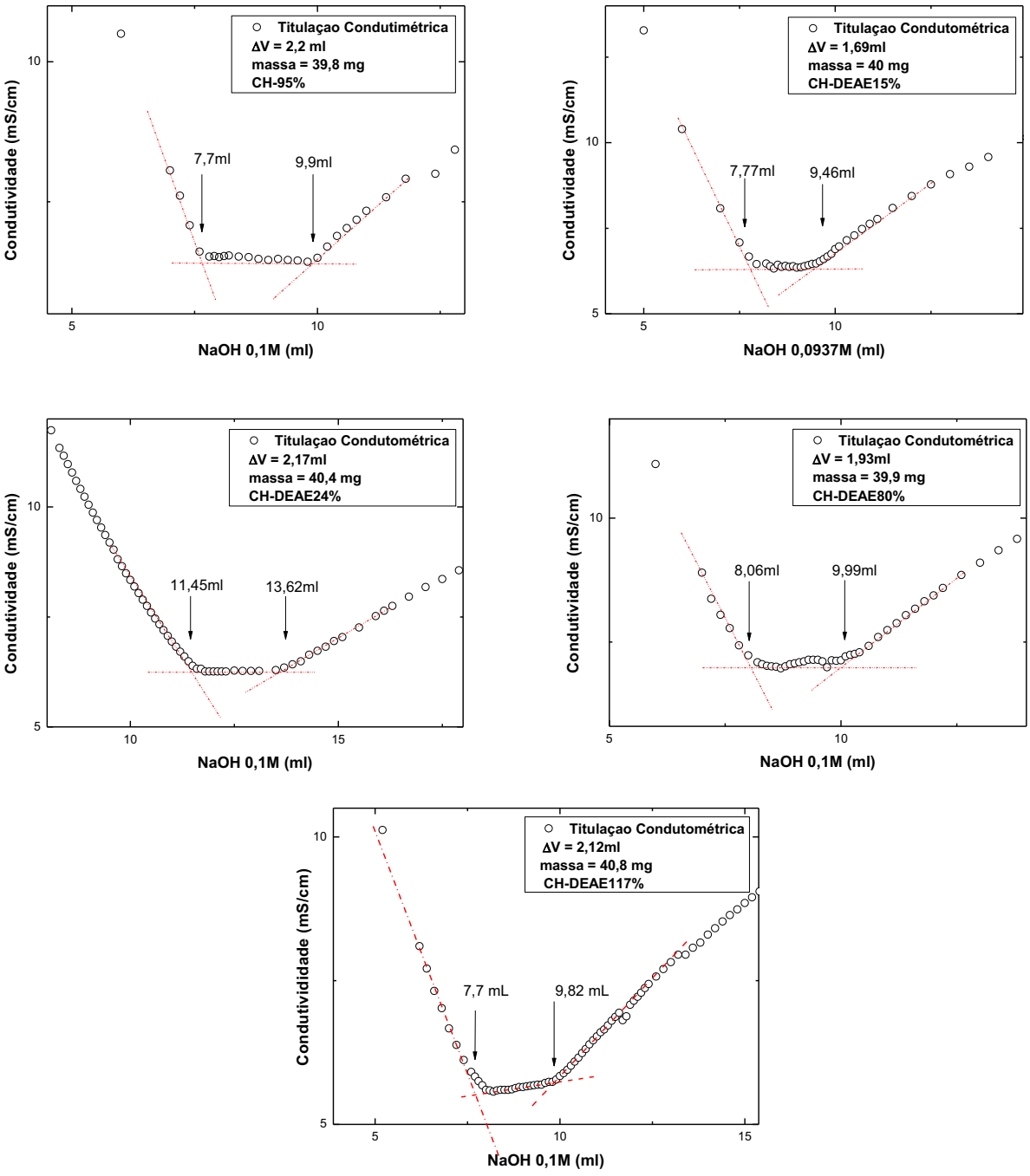


Figura 15. Titulações condutimétricas da quitosana desacetilada CH-95%, CH-DEAE15%, CH-DEAE24%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117% para determinação do grau de ionização.

4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O grau de desacetilação da quitosana desacetilada bem como os graus de substituição por DEAE foram também determinados por RMN-H como descrito no item 3.5. O RMN-H de quitosana apresenta picos característicos e bem separados dos prótons ligados ao carbono 1 (5,1-5,5 ppm), carbono 2 (3,6 ppm) e do grupo acetamida (2,5 ppm) que permitem determinar o grau de desacetilação. A figura 16 mostra o espectro da quitosana desacetilada e a figura 17 os espectros dos demais derivados substituídos com DEAE.

O grau de substituição dos derivados foram calculados pelos picos no intervalo de 1,6 a 1,9 ppm no RMN-H que correspondem respectivamente aos picos dos grupos metila de DEAE indicados na Figura 17 para o derivado CH-DEAE117%. Os resultados são apresentados na **Tabela 1** colocada no final da seção de caracterização (**pag. 32**). O pico em 1,6 ppm corresponde ao sinal dos grupos metila de DEAE dos grupos não quaternizados e o pico em 1,9 ppm corresponde aos grupos metila das unidades de DEAE quaternizadas. Esses resultados mostram que o aumento do grau de susbtituição leva ao ataque nucleofílico do próprio grupo DEAE e consequentemente a presença de cargas positivas permanentes na estrutura do derivado. Essa quaternização é evidente para os derivados CH-DEAE80% e CH-DEAE117% e a integração separada dos picos correspondentes permite estimar o grau de quaternização, os quais também são apresentados na Tabela 1 (pag. 32).

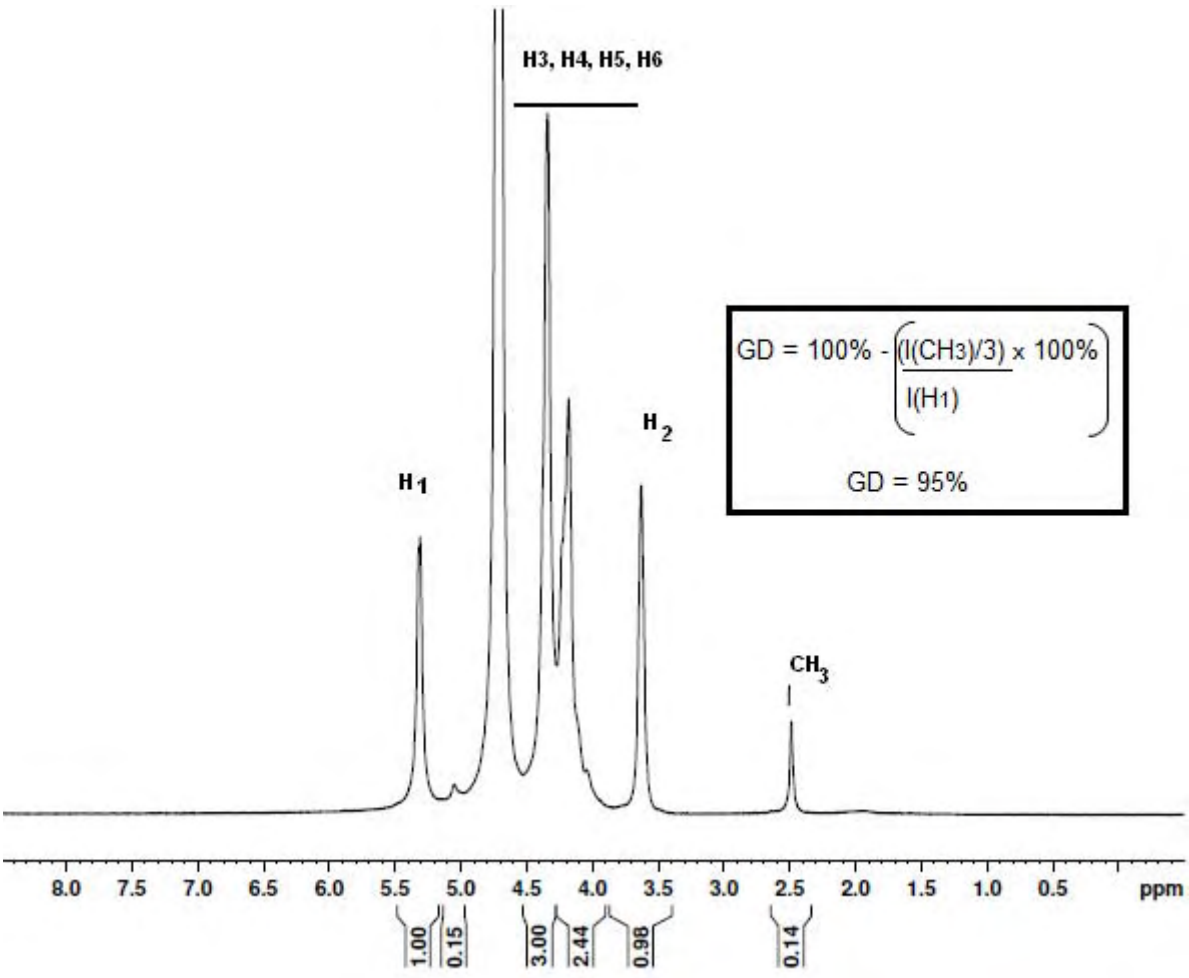


Figura 16. Espectro de RMN-H da Quitosana desacetilada (CH-95%).

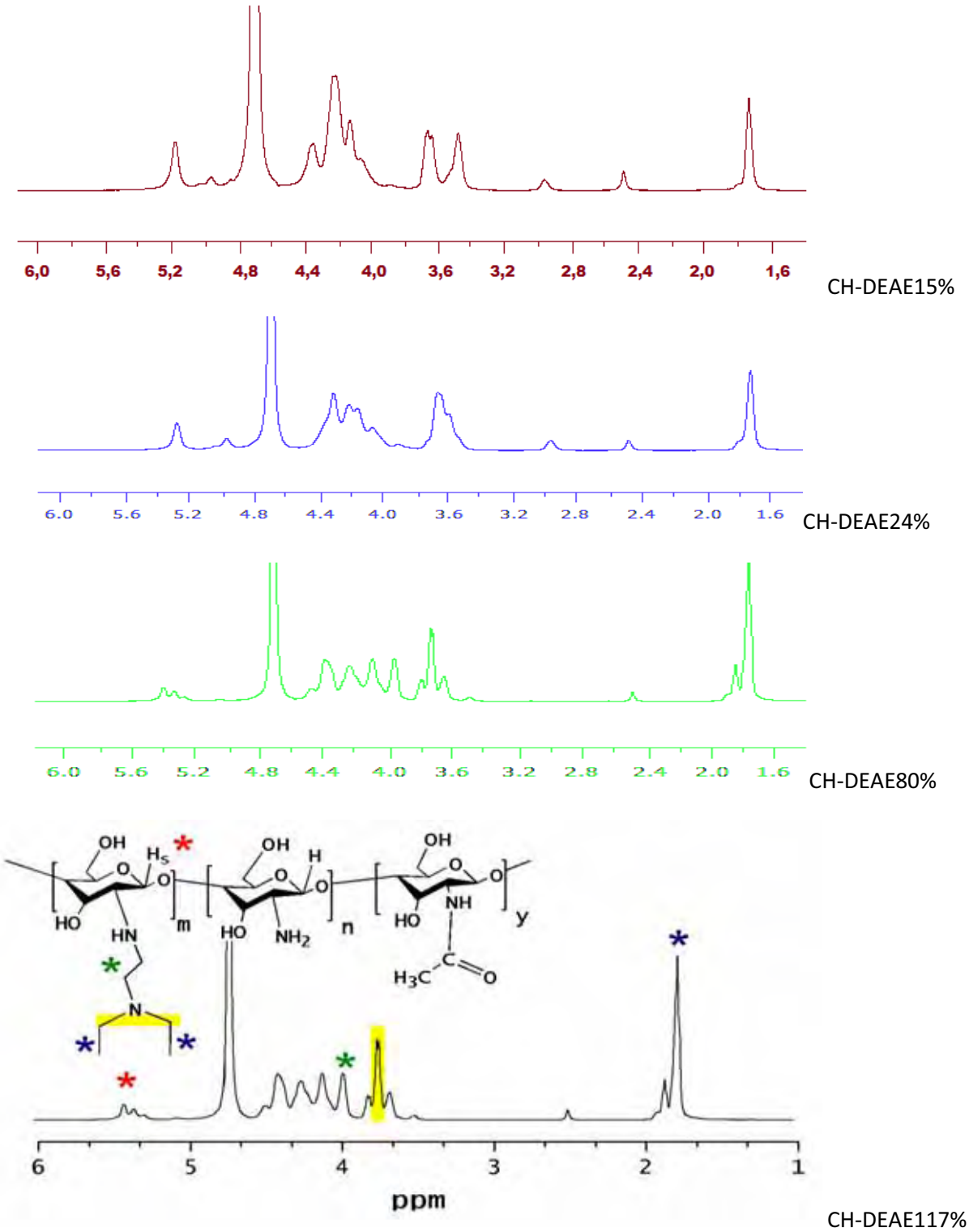


Figura 17. Espectros de RMN-H dos derivados CH-DEAE15%, CH-DEAE24%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117%.

4.1.3. Determinação da Massa Molar Viscosimétrica

A massa molar viscosimétrica média da quitosana desacetilada e seus derivados foram determinados a partir do tempo de escoamento das amostras realizadas pelo viscosímetro do tipo Cannon-Ubbelohde em solução tampão de 0,3M de ácido acético-0,2M de acetato de sódio em diferentes concentrações (c). A temperatura foi mantida constante a 25ºC e o tempo de escoamento de cada solução foi medido cinco vezes. O tempo de escoamento do tampão medido em segundos (t_o) e da solução polimérica (t) foi medido em diferentes concentrações (*c*), diluindo-se a solução inicial. Os valores das constantes para GD igual a 95% : K_m=0,078 e a=0,797 , e para os demais derivados foi utilizada as mesmas constantes visto que não há na literatura constantes para esses derivados de quitosana.

Os tempos de escoamento foram utilizados na elaboração do gráfico de ηsp/C em função de C (Figura 18) para encontrar a viscosidade intrínseca [η], ou seja, o intercepto da reta, e estes dados foram utilizados na equação 7. A tabela 1 mostra os resultados da massa molar viscosimétrica média para CH-95%, CH-DEAE117%%, CH-DEAE80%, CH-DEAE24%, CH-DEAE15%. Nota-se claramente que houve um aparente descréscimo na massa molecular com o grau de substituição. Esse descréscimo pode ser atribuído à degradação decorrente do aquecimento em meio alcalino por duas horas. Entretanto devemos considerar que a equação de Mark-Howuink se aplica a homopolímeros de quitosana e os parâmetros utilizados podem não ser os mais adequados para estimar a massa molar dos derivados.

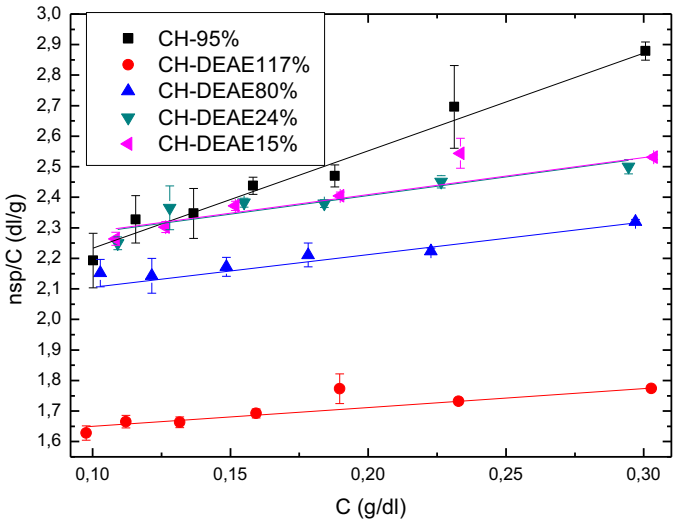


Figura 18. Gráfico de viscosidade reduzida em função da concentração de CH-95%, CH-DEAE117%, CH-DEAE80%, CH-DEAE24%, CH-DEAE15% em tampão acetato pH 4,5, para cálculo da massa molar viscosimétrica média (M_v).

Tabela 1. Propriedades da quitosana e dos derivados utilizados na preparação das nanopartículas.

Polímero	*Razão DEAE/Ch*	***[η]*** ***(ml/g)***	*Gs(%)*	*Gsq(%)*	**Mv g/Mol (kDa)**	**MM g/mol**
CH*	-	191(±3,8)	-		17,8(±0,4)	163,3
CH $DEAE_{15}$	0.3	216(±2,7)	14,9	-	20,8(±0,6)	176,3
CH $DEAE_{24}$	0.5	216(±4,8)	24,5	-	20,8(±0,6)	188,3
CH $DEAE_{80}$	0.9	200(±2,9)	62,5	15,5	18,9(±0,3)	243,4
CH $DEAE_{117}$	1.9	159(±1,3)	97,6	16,9	14,1(±0,1)	275,4

Grau de desacetilação (DDA) = 95,2 % por ^{1}H-NMR e 94.6 % por potenciometria (Contantes utilizadas na equação de Mark Houwink-Sakurada: K_m = 0,078 e a = 0,797) Gs = Grau de substituição; Gsq = Grau de subtituição por grupos quaternários; MM = Massa Molecular calculadas pelo Gs.

4.1.4. Determinação da Capacidade de Tamponamento e Grau de ionização dos derivados em função do pH.

A Capacidade de Tamponamento foi determinada por titulação ácido-base, variando-se o pH de 10 para 2. A concentração das amostras foi de 0,2mg/ml, adicionadas a um volume de 10ml de NaCl 150mM (Lu, et al., 2008). Após 24 horas sob agitação foi verificado o pH e corrigindo-o para 10 com uma solução de NaOH 0,1M. As amostras foram tituladas com alíquotas de solução de HCl 0,1M .

Os resultados da capacidade de tamponamento (Figura 19a) pelo método de Lu, et al., 2008 mostram que o derivado CH-DEAE24% foi o que apresentou melhor resultado para capacidade de tamponamento consumindo maior volume de HCl nas titulações para uma variação de pH de 10 a 2 seguida do CH-DEAE15%, CH-DEAE80%, CH-DEAE117%, CH-95%. Os resultados indicam que o aumento do grau de substituição, aumenta inicialmente a capacidade de tamponamento seguindo-se um decréscimo para maiores graus de susbstituição. Entretanto todos os polímeros apresentaram uma maior capacidade de tamponamento que a quitosana desacetilada. Este resultado pode ser explicado considerando-se que com o aumento do grau de substituição e a presença de unidades quaternizadas diminui a capacidade de tamponamento uma vez que cargas permanentes positivas são introduzidas na estrutura da quitosana. Portanto para os derivados com maior grau de substituição o grau de ionização decorrente da protonação, só pode ser avaliado das titulações condutimétricas que permitirão estimar como varia o estado de protonação em função do pH. As titulações condutométricas são apresentadas na figura 15 e foram realizadas simultaneamente as potenciométricas para determinação do grau de ionização, cujo gráfico é mostrado na figura 19b. Os cálculos para o grau de ionização (α) foram feitos considerando-se a região entre o 1^o e 2^o pontos de equivalência das titulações condutimétricas, utilizando-se os valores volume (V) de NaOH gastos e o total de volume (Vt) gastos nos intervalos de pH, usando a equação 8 (Tiera, et al., 2006)

Os resultados do grau de ionização (Figura 19b) deixam claro o que grau de ionização em função do pH variam com o grau de substituição por grupos DEAE. O grau de ionização da quitosana e seus derivados é dependente dos pKas dos grupos amino e do pH do meio. Os grupos amino terciários em geral apresentem valores de pKa menores que os grupos amino

secundários e como o aumento do grau de substituição aumenta em princípio ambos os grupos, o resultado esperado é um aumento do grau de ionização, uma vez que ambos os grupos apresentam valores de pKa maiores que o pKa da quitosana. Os resultados mostram que o grau de ionização diminui com o aumento do pH o que é consistente com a desprotonação dos grupos amino. Entretanto o grau de ionização diminui mais rapidamente para a quitosana desacetilada, cujos pKa médio é de 6,2. Para os demais derivados o grau de ionização diminui mais lentamente. Uma análise comparativa entre os cinco polímeros em pH 7,4 mostra que o grau de ionização aumenta de 0% para quitosana desacetilada para respectivamente 31%, 25 %, 46% e 73% nos derivados CH-DEAE15% CH-DEAE24% CH-DEAE80% e CH-DEAE117% . Esses graus de ionização deverão afetar de forma diferente a interação com DNA bem como a estabilidade das nanopartículas formadas.

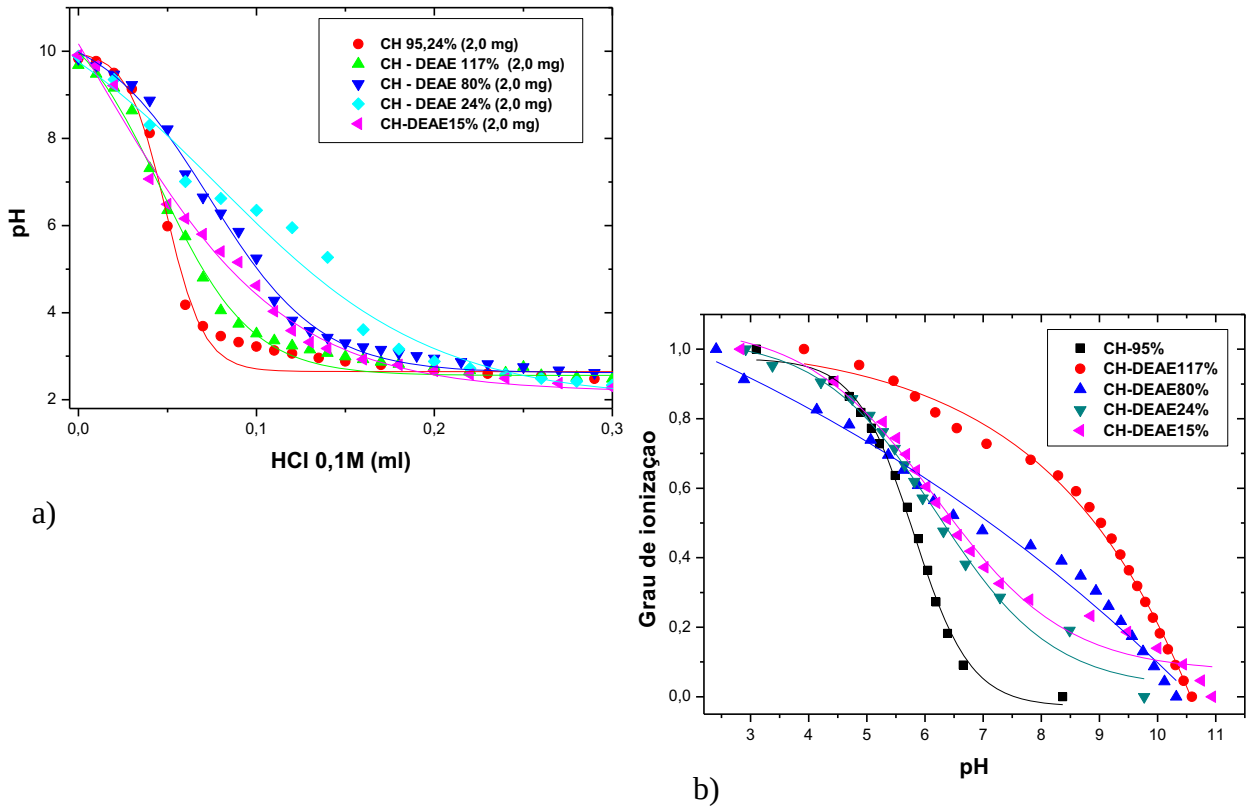


Figura 19. a) Capacidade de tamponamento, avaliado por titulação potenciométrica em solução de NaCl 150mM titulados com HCl 0,1M; **b**) Grau de ionização, por titulação potenciométrica e condutométrica para a CH-95%, CH-DEAE117%, CH-DEAE80%, CH-DEAE24%, CH-DEAE15%.

4.2. Estudo da Interação de quitosana e seus derivados com DNA de timo de Bezerro e Plasmídeo VR 1412

4.2.1. Ensaio de Fluorescência com Brometo de Etídio (EtBr)

A formação dos poliplexos da quitosana desacetilada e seus derivados com DNA de timo de bezerro foi avaliada utilizando-se a técnica de fluorescência em diferentes valores de pH(4,0, 5,0, 6,2 e 7,4) e força iônica de 150 mM e para o plasmídeo em pH 5,0 e 7,4. Na figura 20 e 21 são apresentados os resultados desses experimentos. Para todas as amostras utilizadas o comportamento é similar, ou seja, com a adição de quitosana a intensidade de fluorescência de EtBr diminui, devido ao seu deslocamento do EtBr para o meio aquoso, o que é uma medida indireta da interação da quitosana com DNA. Entretanto, a formação dos poliplexos se mostra dependente tanto do grau de substituição, quanto do pH do meio aquoso.

Em pH 4,0 a interação se mostra eficiente para quitosana desacetilada e para os derivados CH-DEAE15%, e CH-DEAE24%. Para CH-DEAE15%, o comportamento é similar a CH-95%, ou seja, a fluorescência decresce atingindo um mínimo na razão N/P 1,0 com um decréscimo de fluorescência para aproximadamente 30%. Para as demais quitosanas, o descréscimo da fluorescência é um pouco mais suave e atinge o mínimo de fluorescência em aproximadamente 30%, 38%, 45% e 50% para CH-95%, CH-DEAE24%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117% respectivamente, para razões N/P maiores que 1 (Figura 20).

Em pH 7,4 CH-DEAE117% causa um decréscimo rápido da intensidade de fluorescência de EtBr, alcançando um mínimo em aproximadamente 50% para uma razão N/P maior que 1. Para os demais derivados, ou seja, CH-DEAE80% e CH-DEAE24%, o mínimo é atingido respectivamente em 60%; para CH-DEAE15% o mínimo foi atingido em aproximadamente 70% na razão N/P próxima de 8. A CH-95% não mostrou eficiência neste pH devido ao baixo grau de ionização, ou seja o grau de ionização é próximo de zero (Figura 19b). De forma geral a interação diminui com o aumento do pH devido ao descréscimo no grau de ionização. Entretanto os resultados mostram que para os derivados mais substituídos o deslocamento de EtBr é menor, o que deve ser provavelmente pela estrutura ramificada das cadeias, o que pode impedir a aproximação do polímero com a cadeia de DNA e o

deslocamento do EtBr. Essa tendência se inverte somente em pH 7,4 já que o grau de ionização dos derivados CH-DEAE 80% e CH-DEAE 117%, como mostrado anteriormente na figura 19b, permanecem elevados mesmo para pH 7,4 permitindo uma maior interação desses derivados nesse pH.

Os resultados do ensaio com o plasmídeo seguem o mesmo padrão, ou seja, o aumento do pH diminui a eficiência da interação devido ao decréscimo no grau de ionização dos derivados. Entretanto o deslocamento do EtBr do plasmídeo pelos derivados é em geral menos eficiente quando comparado ao DNA de timo. Em pH 5,0 o minímo de fluorescência atingido foi de 40% para CH-95% e aumenta com o grau de subsitituição por DEAE. Entretanto em pH 7,4 a interação entre o plasmídeo e CH-95% é ligeiramente mais forte, ainda que quitosana esteja totalmente desprotonada. A maior diferença entre os dois tipos de DNA encontra-se no decréscimo contínuo da fluorescência para a razão N/P investigada.

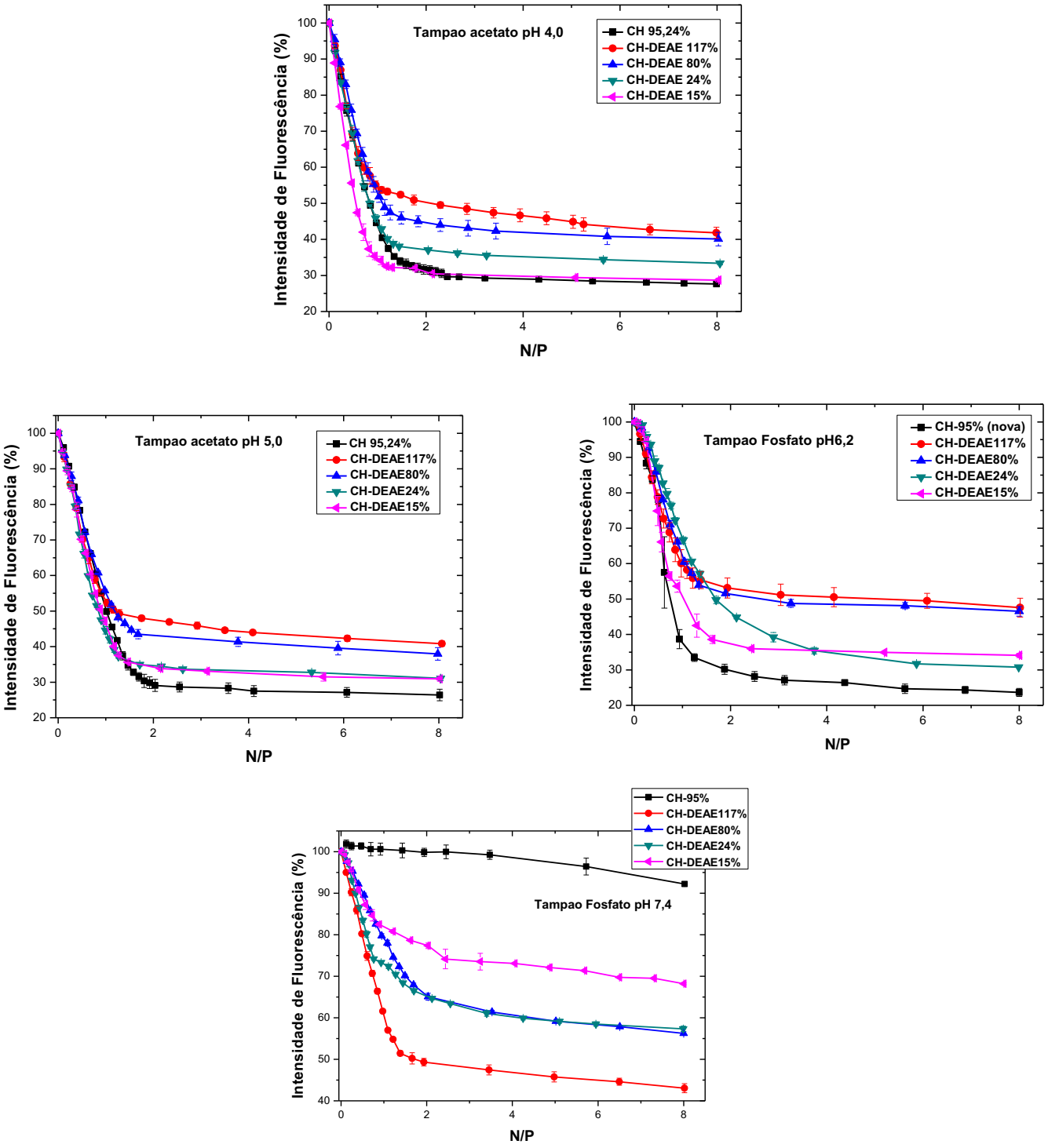


Figura 20. Titulação do complexo DNA-EtBr por quitosana desacetilada e seus derivados substituidos com grupos DEAE em pH 4,0; 5,0; 6,2 e 7,4, força iônica 150mM e concentração de 50mM a 25^0C.

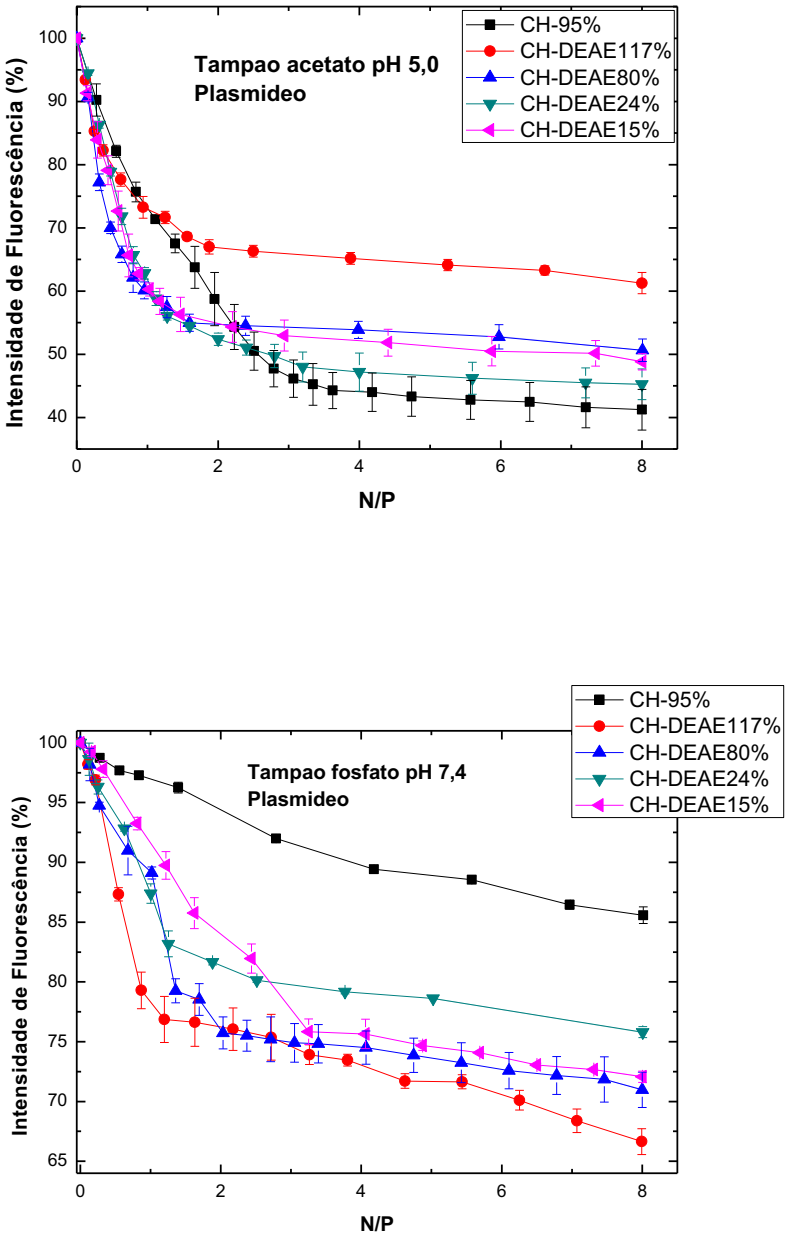


Figura 21. Titulação do complexo Plasmídeo-EtBr por quitosana desacetilada e seus derivados substituidos com grupos DEAE em pH 5,0 e 7,4, força iônica 150mM e concentração de 50mM a 25^0C.

4.2.2 Eletroforese das nanopariículas de Quitosana desacetilada e seus derivados com DNA de timo de bezerro e Plasmídeo

O estudo utilizando-se eletroforese em gel teve como objetivo principal avaliar a estabilidade dos complexos formados em função do grau de substiuição e do pH. Os complexos formados para diferentes razões quitosana/DNA (+/-), para uma concentração fixa de DNA, foram incubados nos tampões apropriados por 30 minutos. A figuras 22 apresenta os experimentos realizados em pH 4,0; 6,2 e 7,4, em diferentes razões N/P e F.I. 150mM. O primeiro poço a esquerda na razão zero refere-se à somente ao DNA (P), onde observa-se uma mancha larga, devido a polidispersividade da amostra de DNA.

Os resultados em pH 4,0 mostram que tanto para CH-95% quanto para os derivados a interação é forte e o DNA é liberado somente até a razão 0,5, exceto CH-DEAE24% que liberou DNA até a razão N/P 1. Estes resultados confirmam aqueles obtidos nos estudos da seção anterior com o ensaio de fluorescência com o EtBr, ou seja, em pH ácido a quitosana e todos os seus derivados interagem fortemente com o DNA devido as cargas positivas. O aumento do pH (para 6,2 e 7,4) e consequentemente o decréscimo na densidade de carga diminui a força de interação e o DNA passa a ser deslocado para maiores razões N/P somente para a quitosana desacetilada (CH 95%) e para CH-DEAE15%. (Figura 22). Esses resultados indicam que a interação é muito forte para os demais derivados, e embora seja importante para proteger o DNA contra a degradação, a liberação pode ser comprometida. Neste sentido os derivados que apresentam os menores graus de subsituição, ou seja, CH-DEAE24%, CH-DEAE15%, podem ser em principio os mais promissores, pois além de manter um baixo grau de ionização mesmo em pH alcalino, também podem em principio liberar mais facilmente o DNA em estudos de transfecção, o que é fundamental para o sucesso da terapia (Ganta, et al., 2008). Os mesmos experimentos foram realizados nos pHs 5,0 e 7,4 utilizando-se o plasmídeo VR 1412 e os resultados são apresentados nas figuras 23 e 24. Nesses experimentos o plasmídeo mostra uma banda estreita e aparentemente o pH não afetou de forma significativa a liberação do DNA.

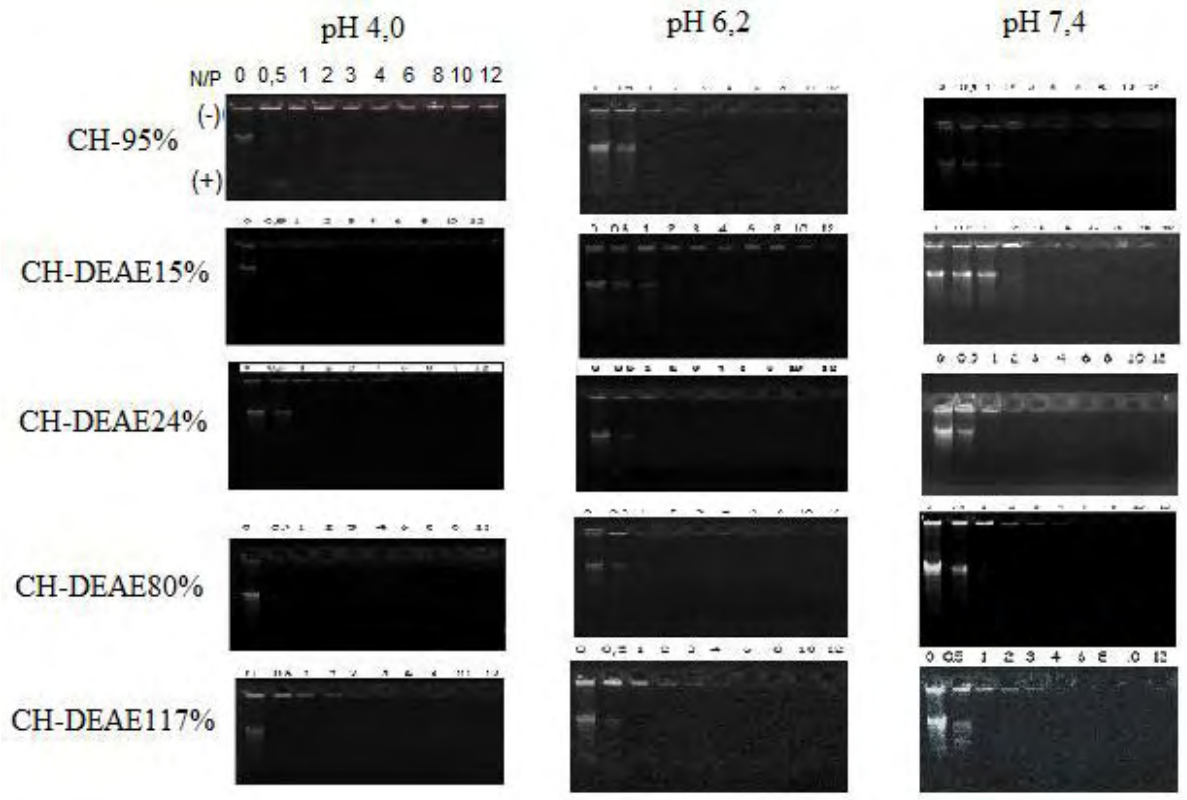


Figura 22. Eletroforeses em gel de agarose de complexos ctDNA e quitosanas (a) CH-95%, (b) CH-DEAE15%, (c) CH-DEAE24%, (d) CH-DEAE80% e (e) CH-DEAE117% em tampão acetato pH 4,0; 6,2 e 7,4. As bandas fluorescentes indicam o deslocamento do DNA. As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese.

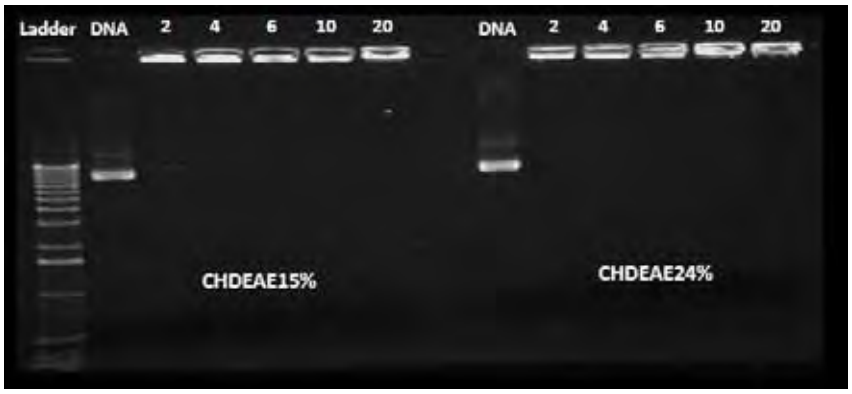


Figura 23. Eletroforeses em gel de agarose de complexos de VR 1412 e quitosanas CH-DEAE15%, CH-DEAE25%, em tampão acetato pH 5,0, 150mM de força iônica. As bandas fluorescentes indicam o deslocamento do DNA (plasmídeo). As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese. L= Ladder

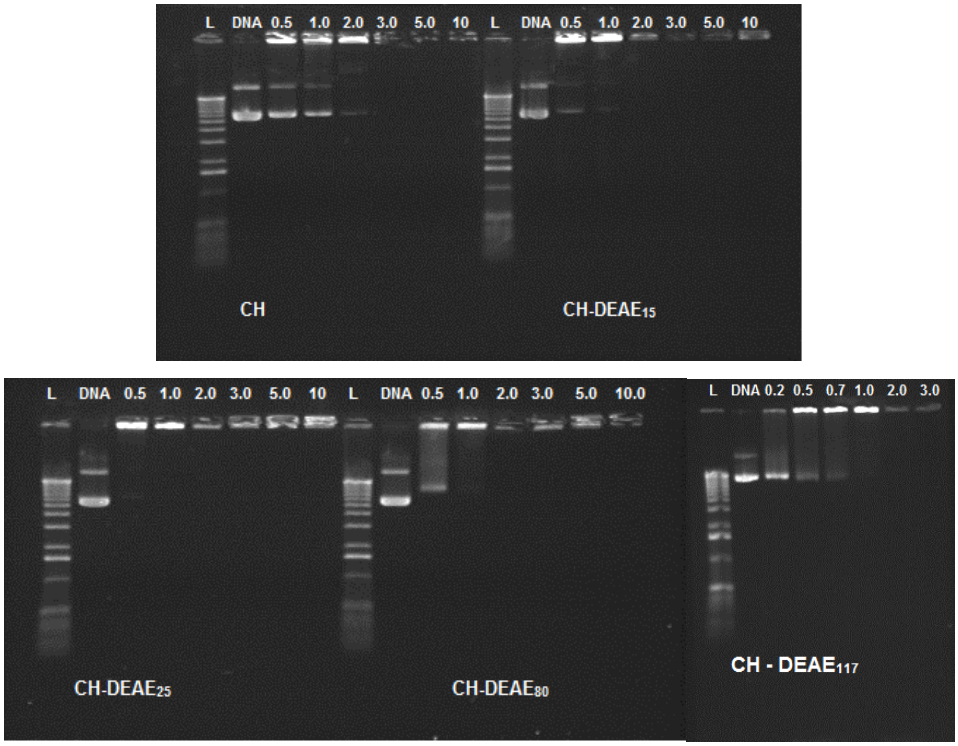


Figura 24. Eletroforeses em gel de agarose de complexos de VR 1412 e quitosanas CH-95%, CH-DEAE15%, CH-DEAE25%, CH-DEAE80% e CH-DEAE117% em tampão fosfato pH 7,4, 150mM de força iônica. As bandas fluorescentes indicam o deslocamento do DNA (plasmídeo). As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese. L= Ladder

4.2.3. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Medidas de Potencial Zeta das Nanopartículas preparadas com o Plasmídeo VR 1412.

O tamanho bem como o potencial zeta das nanopartículas são parâmetros importantes para a captação celular. Esses parâmetros podem ser determinados por medidas de espalhamento de luz dinâmico utilizando o instrumento Zetasizer ZS90 (Malvern Instrument (Worcstershire, UK), equipado com laser de 633 nm e ângulo de 90^{o}.

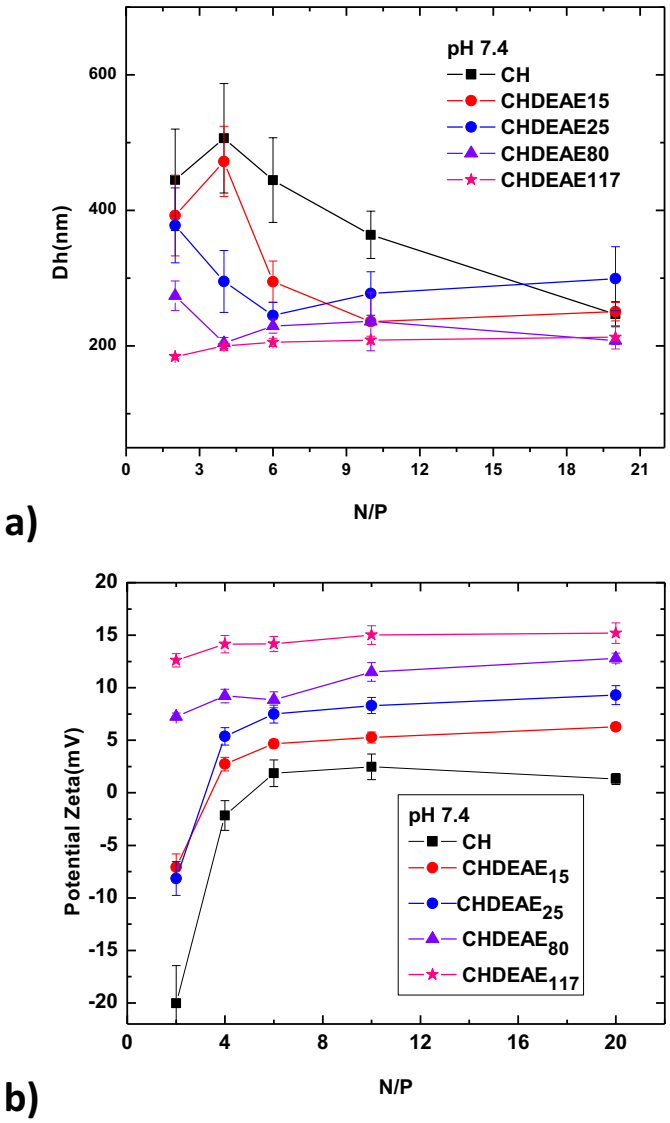


Figura 25. Medidas de tamanho (a) e potencial zeta (b) das nanopartículas preparadas com quitosanas e seus derivados e o plasmídeo VR 1412 em pH 7,4 e força iônica 150 mM.

A interação eletrostática dos policátions com o DNA leva à formação de nanopartículas cujos tamanhos e carga superficial dependem principalmente da razão de cargas N/P. Devido ao pH 7,4 e ao baixo grau de ionização para CH-95% e CHDEAE 15%, em baixas razões N/P (1-6) os diâmetros das nanopartículas são relativamente altos, da ordem de 400 a 500 nm (Figura 25a) . Esse resultado se deve principalmente a baixa carga superficial das partículas cujo potencial zeta encontra-se muito próximo de zero ou ligeiramente positivo como no caso de CHDEAE 15% e CHDEAE 25%. Nessa condição as

partículas podem agregar formando particulas maiores com o tempo. Os resultados recentes do grupo mostram que, dependendo da força iônica, partículas preparadas com quitosanas desacetiladas podem aumentar continuamente de tamanho num período de três horas, atingindo tamanhos da ordem de um a dois micrometros (Pfeifer et al., 2011). Os derivados tornam-se estáveis a partir da razão (N/P) 9 e com diâmetros variáveis em aproximadamente 300 a 200 nm nas medidas de diâmetro. Entretanto as partículas preparadas com os derivados com maior grau de substituição (CHDEAE80% e CHDEAE 117%) exibem menores tamanhos para menores razões N/P. Esse resultado se deve ao maior grau de ionização nesse pH (7,4), e que conferem uma maior potencial zeta as nanopartículas preparadas com esses derivados.

4.3. Estudos de Toxicidade das Nanopartículas Preparadas Com Quitosana e Seus Amino Derivados.

A quitosana é considerada um polímero atóxico e experimentos in vitro mostraram que, quando adicionada na forma de uma solução aquosa não afetou a viabilidade celular de células KB humanas, mantendo-se próximo de 100% (Tiera et al., 2006). Entretanto a citoxicidade de nanopartículas em geral é maior que o polímero, CH-95%. A Figura 26 mostra os ensaios de citoxicidade realizados para as nanopartículas preparadas com quitosana e seus derivados sobre células Hela. Os resultados mostram que as nanopartículas preparadas com quitosana apresentam uma viabilidadde celular em torno de 80% independentemente da razão N/P utilizada. Para todos os demais derivados as nanopartículas apresentaram uma citotoxicidade crescente com o aumento da razão N/P, entretanto fica claro que o aumento do grau de subsituição aumenta a citotoxicidade das nanopartículas e a viabilidade celular chega a decrescer para 20% para o derivado mais substituído na razão N/P mais elevada, ou seja N/P=20. A citoxicidade pode ser atribuída principalmente aos grupos amino terciários introduzidos na cadeia de quitosana com o grupo DEAE e ao excesso de policátion no meio. Devido ao excesso de policátion com o DNA os policátions podem permanecer em solução não associados as nanopartículas, aumentando assim a toxicidade do meio. É conhecido que polímeros catiônicos podem exercer um efeito citotóxico sobre diferentes tipos de células (Sellenett, et al, 2007), entretanto as citoxicidades dos polímeros CHDEAE15% e

CHDEAE25% podem ser consideradas baixas quando comparadas com polímeros como polietilenimina (Fischer et al, 1999)

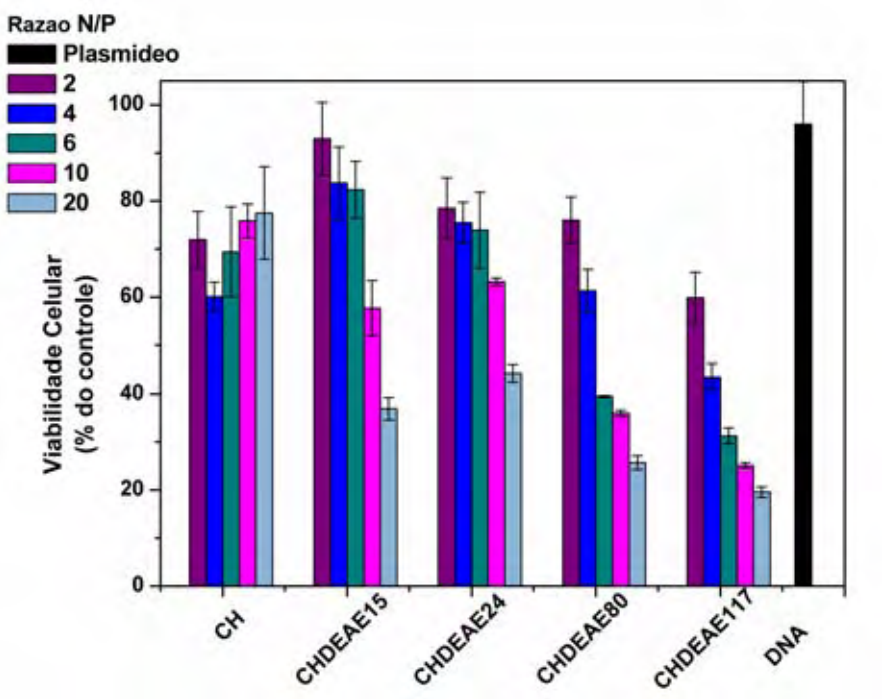


Figura 26 . Efeito da modificação de quitosana com DEAE sobre a viabilidade cellular de células HeLa, avaliadas pelo ensaio de MTT após 24 horas de incubação a 37 °C com as nanopartículas na concentração de 5 μg de DNA por poço.

4.4. Eficiência da Transfecção in vitro de Células HeLa.

A eficiência da transfecção in vitro de células HeLa com as nanopartículas foi realizada como descrito no item 3.11. As células receberam 5.0 μg de DNA livre ou nanopartículas compostas com diferentes CH –DEAE e 5.0 μg de DNA. Os resultados da transfecção das nanopartículas são mostrados na Figura 27. Os resultados motram que as nanopartículas preparadas com quitosana desacetilada na razão N/P 1,0 apresentam uma taxa de transfecção muito baixa, inferior à transfecção alcançada com o plasmídeo livre. Esse resultado indica que para esta razão N/P a partícula é incapaz de entrar na célula, o que pode ser devido a agregação durante o procedimento ou baixo potencial zeta. O aumento da razão

N/P para os valores 2 e 3 praticamente aumentou em 100 vezes a eficiência o que em parte corrobora a interpretação da importância carga positiva como fator determinante na captação celular. Na razão N/P 2,0 quitosana pura exibiu um taxa de transfecção quase 4 vezes maior que o DNA livre.

Esse comportamento é seguido para os derivados CHDEAE15% e CHDEAE25% que mostraram melhor taxa de transfecção para razão N/P 2,0 que foi cerca de 10 vezes superior àquela exibida pela nanopartículas preparadas com CH95% e aproximadamente 40 vezes superior ao DNA livre. Entretanto as taxas de transfecção são ainda inferiores ao produto comercial lipofectamina, um agente de transfecção de DNA. Para os derivados com maior grau de substituição CHDEAE80% e CHDEAE117% a eficiência diminui embora siga sendo maior que aquela obtida com o DNA desprotegido. Este descréscimo pode ser atribuído tanto a maior citotoxicidade desses derivados, como também a uma interação mais forte com o DNA devido à presença de cargas positivas permanentes. Além disso, como mostrado no estudo da capacidade de tamponamento, essa propriedade para esses dois derivados, diminui significativamente quando comparado aos demais derivados, o que pode contribuir para uma menor liberação do DNA no interior da célula.

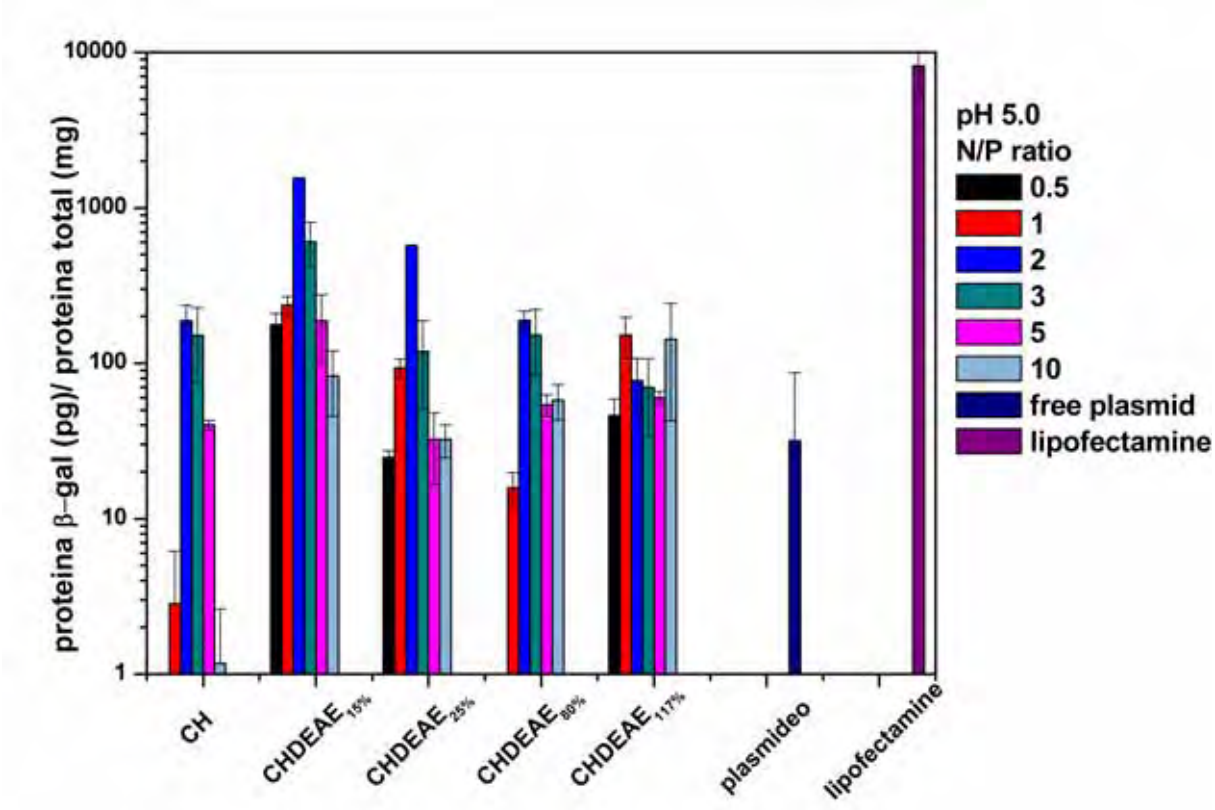


Figura 27. Eficiência da transfecção das nanopartículas incubadas com células HeLa em presença de 10% de FBS. As células receberam 5,0 microgramas de DNA ou nanopartículas preparadas com diferentes razãoes N/P e os diferentes polímeros CH –DEAE contendo 5.0 μg de DNA.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que a reação da quitosana desacetilada com cloreto de 2-cloro dietilaminoetilamônio (DEAE) permite a obtenção de derivados com proporções crescentes de grupos amino secundários e terciários. A caracterização por medidas de RMN-H permite determinar a composição dos derivados bem como estimar o grau de quaternização dos derivados. O grau de substituição dos derivados quitosana-DEAE pode ser controlado variando-se a proporção de mols na mistura reacional e os derivados mostraram-se solúveis em uma ampla faixa de pH (1 a 12) . As medidas de viscosidade permitiram estimar a massa molecular viscosimétrica e indicam que a quitosana sofre uma degradação desprezível no processo de síntese.

As análises de fluorescência indicaram que o derivado com menor grau de substituição de DEAE Cl foi o que interagiu melhor com o DNA em pH 4,0, entretanto a interação diminui com o aumento do pH. Este decréscimo na interação deve-se ao grau de ionização, que reduz com a elevação do pH. Em pH fisiológico (pH 7,4) a força de interação foi superior para os derivados com maiores graus de substituição, devido a ampla faixa de pH no qual temos grupos ionizados (pH 2 a pH 10,5).

A avaliação qualitativa por eletroforese permitiu a visualização da intensidade da força de interação Policátion-DNA, e os resultados mostraram que o derivado com menor grau de substituição tem uma interação maior em baixo pH comparada a quitosana desacetilada. Entretanto em valores de pH mais elevados a interação diminui, portanto um comportamento similar ao estudo da fluorescência. Os experimentos com derivados de maior grau de substituição mostram uma interação mais forte para o pH 7,4 que é o pH fisiológico da corrente sanguínea, assim inibindo a liberação do DNA, uma das dificuldades na transfecção. Por outro lado, o derivado com menor grau de substituição mostrou-se com uma interação mais fraca e maior estabilidade que a quitosana desacetilada, podendo ser favorável para a liberação do DNA dentro da célula.

As medidas de espalhamento de luz e potencial zeta mostraram que os tamanhos das partículas encontram-se na faixa de 200 a 400 nm e que um potencial positivo é importante para a captação celular. A citoxicidade das nanopartículas aumenta com o grau de substituição, mas podem ser mantidas baixas mantendo-se o grau de substituição por DEAE

em até 25%. Os experimentos de transfecção mostraram que os derivados CHDEAE15% e CHDEAE25% apresentaram resultados superiores a quitosana desacetilada com biocompatibilidade aceitável e boa eficiência na transfecção. Os resultados permitem vislumbrar novas possibilidades para aumentar a eficiência dos derivados, por exemplo, variando-se a massa molecular e aumentando-se a biocompatibilidade pela introdução de unidades de PEG ou fosforilcolina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBUGA, J.; OZBAS-TURAN, E. & ERDOGAN, N. **Plasmid-DNA loaded chitosan microspheres for in vitro IL-2 expression.** *Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , *58*, p. 501, 2004.

AKINC, A., THOMAS, M.; KLIBANOV, A. M., Langer R., **Exploring polyethyleniminemediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis**. *J Gene Med.* v. *7* , p. 657-663, 2005.

ANCHORDOQUY, T. J.; ARMSTRONG, T. K.; MOLINA, M. D. C. **Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes**. *J Pharm Sci*; 94: 1226-1236, 2005.

AZEVEDO, V. V. C., CHAVES ,S. A., BEZERRA, D. C., LIA FOOK, M. V. , COSTA, A. C. F. M. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais**. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. v.2.3. 27-34, 2007.

BODNAR, M.; HARTMANN, J. F. & BORBELY, J. **Synthesis and Study of Cross-Linked Chitosan-N-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles.** *Biomacromolecules* , pp. 3030-3036, 2006.

BOUSSIF, O., LEZOUALCH, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J.-P., **A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine**. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* v. 92, p.7297–7301, 1995.

BOUSSIF, O.; LEZOUALCH, F.; ZANTA, M.; MERGNY, M.; SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., et al. **A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine.** *Biochemistry* , pp. 7297- 7301, 1997.

BRUGNEROTTO J., DESBRIERES J., ROBERTS G. RINAUDO M., **Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography**. *Polymer*, 42, 9921-9927, 2001.

CASÉ, A. H., PICOLA, I.P.D. ; ZANIQUELLI, M.E.D.; FERNANDES, J. C.; TABOGA, S. R.; WINNIK, F. M.; TIERA, M.J.,. **Physicochemical Characterisation of Nanoparticles Formed Between DNA and Phosphorylcholine Substituted Chitosans**, *J. Coll. . Int. Sci.*, 336, p. 125-133, 2009.

CHAN, P.; KURISAWA, M.; CHUNG, J. E. & YANG, Y. Y. **Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery.** *Biomaterials , 28*, pp. 540-549, 2007.

CHANG, K-L; HIGUCHI, Y.; KAWAKAMI, S.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. **Efficient gene transfection by histidine-modified chitosan through enhancement of endosomal escape**. *Bioconjugate Chem*; 21: 1087-1095, 2010.

CHO, Y. W., KIM, J. D., PARK, K. **Pollycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol**, *J.Pharm. Pharmacol*, v. 55, p. 721–734, 2003.

COLNAGO, L. A., ALMEIDA, F. C. L. , VALENTE, A. P.**Espectroscopia de Massa e RMN Multidimensional e Multinuclear: Revolução no Estudos de Macromoléculas Biológicas**. *Quimica Nova na Escola*, 2002

CRYSTAL, R. G. **Transfer of Genes to Humans: Early Lessons and Obstacles to Success.** *Science , 270*, pp. 404-410, 1995.

CSABA, N., KÖPING-HÖGGÅRD, M., ALONSO, M. J. **Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery**. *Int. J. Pharm*, in press, 2009.

ERBACHER, P.; ZOU, S.; BETTINGER, T.; STEFFAN, A.-M. & REMY, J.-S. **Chitosan-Based vector/DNA Complexes for Gene Delivery: Biophysical Characteristics and Transfection Ability.** *Pharmaceutical Research , 15* (9), 1998.

FISCHER, D.,. BIEBER, T , LI, Y.X., ELSASSER, H.P., KISSEL, T. **A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity**, *Pharm. Res*. v. 16, p. 1273–1279, 1999

FORMIGA. A. L. B. **Nanotecnologia Molecular.** XI Encontro SBQ-Rio de Janeiro. Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2007.

GANTA, S., DEVALAPALLY, H., SHAHIWALA A., AMIJI, M. **A review of stimuliresponsive nanocarriers for drug and gene delivery.** *J. Control.Rel*., v.126, p.187-204, 2008.

GAO, Y.; XU, Z. H.; CHEN, S. W.; GU, W. W.; CHEN, L. L.; LI, Y. P. **Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency**. *Int J Pharm*; 359: 241-246, 2008.

GARCIA, R., B., Silva, D., L., P.; Costa, M., et al. **Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo**.Quím. Nova. v. 31, n^{o}. 3, 486-492, 2008.

GERWECK, L.E., SEETHARAMAN, K. **Cellular pH gradient in tumor versusnormal tissue: potential exploitation for the treatment of câncer**. *Cancer Res.* V. 56, p. 1194–1198, 1996.

GOREISH, H. H.; LEWIS, A. L.; ROSE, S. & LLOYD, A. W. **The effect of phosphorylcholine-coated materials on the inflammatory response and fibrous capsule formation: In vitro and in vivo observations.** *Wiley Periodicals* , pp. 1-9, 2003.

GRIGSBY, C. L. & Leong, K. W. **Balancing protection and release of DNA: tools to address a bottleneck of non-viral gene delivery**.Jounal of the Royal Society Interface. 2009.

YU, Y. Y.; WANG, Z.; CAI, L., *et al*. **Synthesis and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)-O-chitosan-polyethylenimine for gene delivery**. *Carbohydr Polym*; 81: 269-274, 2010.

HUANG, H. L; YU, H.; TANG, G.; WANG, Q.; LI, J. **Low molecular weight polyethylenimine cross-linked by 2-hydroxypropyl-gamma-cyclodextrin coupled to peptide targeting HER2 as a gene delivery vector**. *Biomaterials*; 31: 1830-1838, 2010.

HUANG, S. & ZHUO R. **Recent progress in polymerbased gene delivery vectors.** *Chinese Science Bulletin.*Vol. 48, N^{O}.13 , p.1304-1309, 2003.

HUNT, C.A., MACGREGOR, R.D., SIEGAL, R.A., **Engineering targeted In vivo drug delivery I. The physiological & physicochemical principles governing opportunities & limitations**, *Pharm. Res*., v. 3, p. 333–344, 1986.

LAM, J.; MA, Y.; ARMES, S.; LEWIS, A.; BALDWIN, T. & STOLNIK, S. **Phosphorylcholine–polycation diblock copolymers as synthetic vectors for gene delivery.** *Journal of Controlled Release* , pp. 293–312, 2004.

LAVERTU, M., MÉTHOT, S., TRAN-KHANH, N., BUSCHMANN, M.D., **High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation.** *Biomaterials* 27 ,4815, 2006.

LECHARDEUR D., LUKACS, G.L., **Intracellular barriers to non-viral gene transfer**, *Curr. Gene Ther.* v. 2, p. 183–194, 2002.

LEONG, K.; MAO, H.-Q.; TRUONG-LE, V. L.; ROY, K.; WALSH, S. M. & AUGUST, J. T. **DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles.** *Journal of Controlled Release , 53*, pp. 183-193, 1998.

LIBERDA, J.; TRNKA, T.; SEJBAL, J.; JONAKOVA, V.; KRAUS, M. & TICHA, M. **Preparation of Biotinylated and FITC-Labelled Phosphorylcholine Poly(acrylamide) Derivatives and Their Application for Protein Ligand-Binding Studies.** *Chimia* , pp. 528-532, 1999.

LIU, W. G.; ZHANG, X.; SUN, S. J.; SUN, G. J. & YAO, K. D. **NAlkylated Chitosan as a Potential Nonviral Vector for Gene Transfection.** *Bioconjugate Chemistry , 14*, pp. 782-789, 2003.

LU, B., XU, X. D., ZHANG,X. Z. , CHENG, S. X. , ZHUO, R. X. **Low Molecular Weight Polyethylenimine Grafted *N*-Maleated Chitosan for Gene Delivery: Properties and In Vitro Transfection Studies**. *Biomacromolecule*, v. 9, p. 2594–2600, 2008.

MA, P. L., BUSCHMANN, M. D. AND WINNIK F. M. **Complete physicochemical characterization of DNA/Chitosan complexes by multiple detection using asymmetrical Flow Field-Flow Fractionatio**. *Analytical Chemistry* 82(23): 9636-9643, 2010.

MAO, H.; ROY, K.; TROUNG-LE, V. L.; JANES, K. A.; LIN, K. Y., et al. **Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency.** *Journal of Controlled Release , 70*, pp. 399–421, 2001.

MIYAZAWA, K.; WINNIK, F. M. **Solution Properties of Hydrophobically-Modified Phosphorylcholine-Based Polymers in Water and in the Presence of Surfactants.** *Journal of Physical Chemistry* , pp. 10677-10682, 2003.

MOLLY, E. M., RICE, K. **Peptide-guided Gene Delivery**. *The AAPS Journal*. 2007

MORRIS, V. B.; SHARMA, C. P. **Folate mediated in vitro targeting of depolymerised trimethylated chitosan having arginine functionality.** *J Coll Interf Sci*; 348: 360-368, 2010.

MOURA, C., MUSZINSKI, P., SCHMIDT, C., ALMEIDA, J., PINTO, L. **Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto**. *Vetor*. Rio Grande. 16(1/2): 37-45, 2006.

MULLIGAN, R. C. **The Basic Science of Gene Therapy.** *Science , 260*, pp. 926-932, 1993.

MURPHY, E. F.; LU, J. R.; LEWIS, A. L.; BREWER, J.; RUSSELL, J. & STRATFORD, P. **Characterization of Protein Adsorption at the Phosphorylcholine Incorporated Polymer−Water Interface.** *Macromolecules* , pp. 4545-4554, 2000.

MUZZARELLI R., **Chitin**. *Oxford: Pergamon Press*, p. 105, 1977.

PARK, Y.; PARK, Y.; SHIN, B.; CHOI, E.; PARK, Y.; AKAIKE, T., et al. **Galactosylated chitosan–graft–dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier.** *Journal of Controlled Release , 69*, pp. 97-108, 2000.

PEPPAS, L. B. & BLANCHETT, J. O. **Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy.** *Advanced Drug Delivery Reviews , 56*, p. 1649, 2004.

PERALES, J. C.; GROSSMANN, G. A.; MOLAS, M.; LIU, G.; FERKOL, T.; HARPST, J., et al. **Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor.** *The Journal of biological chemistry , 272*, p. 7398, 1997.

PICOLA, I. P. D.; BUSSON, K. A. N.; CASÉ, A. H.; NASÁRIO, F. D.; TIERA, V. A. O.; TABOGA, S. R.; RUGGIERO, J. N.; TIERA, M. J. **Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan-DNA nanoparticles**. *Journal of Experimental Nanoscience (submetido)*, 2010.

ROTH, J. A. & CRISTIANO, R. J. **Gene Therapy for Cancer: What Have We Done and Where Are We Going?** *Journal of the National Cancer Institute , 89*, pp. 21-39, 1997.

RUNGSARDTHONG, U.; EHTEZAZI, T.; BAILEY, L.; ARMES, S. P.; GARNETT, M. C. & Stolnik, S. **Effect of polymer ionization on the interaction with DNA in nonviral gene delivery systems.** *Biomacromolecules , 4*, p. 683, 2003.

SABINA P. STRAND; MOHAMED M. ISSA; BJØRN E. CHRISTENSEN; KJELL M. VÅRUM AND PER ARTURSSON. **Tailoring of Chitosans for Gene Delivery: Novel Self-Branched Glycosylated Chitosan Oligomers with Improved Functional Properties.** *Biomacromolecules, 9* (11), pp 3268–3276, 2008.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA, S. P. & CAVALHEIRO, E. T. **Caracterização de Quitosanas Comerciais.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia* , pp. 242-249, 2003.

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 effciency.** *Biomaterials* , pp. 2075-2080, 2001.

SELLENET P. H., ALLISON B., APPLEGATE B. M., YOUNGBLOOD J. P. **Synergistic activity of hydrophilic modification in antibiotic polymers**. *Biomacromolecules* v. 8; p. 19–23, 2007.

SHENOY, D., LITTLE, S., LANGER, R., AMIJI, M. , **Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumortargeted delivery of hydrophobic drugs: part 2. In vivo distribution and tumor localization studies**, *Pharm. Res*. v. 22, p. 2107, 2005.

SHENOY, D.B., AMIJI, M.M., **Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsiloncaprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast câncer**. *Int. J. . Pharm.* , v.293, p. 261- 270, 2005.

SUN, B.; ZHAO, R.L.; KONG, F.Q., *et al*. **Phosphorylatable short peptide conjugation for facilitating transfection efficacy of CS/DNA complex**. *Int J Pharm*; 397: 206-210, 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* , pp. 823-832, 1997.

TIERA, M. J.; QIU, X.; BECHAOUCH, S.; SHI, Q.; FERNANDES, J. C. & WINNIK, F. M. **Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine- Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions.** *Biomacromolecules , 7*, pp. 3151-3156, 2006.

TOLAIMATE A., DESBRIERES J., RHAZI M, ALAGUI A., VINCENDON M., VOTTERO, P., **On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin**, *Polymer*, 41, 2463–2469, 2000.

TRUBETSKOY, V. S.; SLATTUM, P. M.; HAGSTROM, J. E.; WOLFF, J. A. & BUDKER, V. G. **Quantitative assessment of DNA condensation.** *Analytical Biochemistry , 267*, p. 309, 1999.

VAN HOLDE, C. K. M. **Lipids, Membranes and Cellular Transport.** In Mathews van Holde, *Biochemistry* (pp. 298-336). Redwood: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1990.

WANG, W., YAO , J., ZHOU, J.-P., LU , Y., WANG , TAO ,Y. L., LI, Y.-P. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* v. 377, p. 567–572, 2008.

WOLFERT, M. A. & SEYMOUR, L. W. **Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA.** *Gene Therapy , 3*, p. 269, 1996.

ZAHR, A. S.; DAVIS, C. A. & PISHKO, M. V. **Macrophage Uptake of Core-Shell Nanoparticles Surface Modified with Poly(ethylene glycol).** *Langmuir , 22*, pp. 8178-8185, 2006.

ZAMBITO, Y.; BARRETTA, G. U.; ZAINO, C.; BALZANO, F.; DI COLO, G. **Novel transmucosal absorption enhancers obtained by aminoalkylation of chitosan.** european journal of pharmaceutical sciences. 29, 460–469, 2006.

ZHANG, H., MARDYANI, S., CHAN, W. C. W., KUMACHEVA, E., **Design of Biocompatible Chitosan Microgels for Targeted pH-Mediated Intracellular Release of Cancer Therapeutics**. *Biomacromolecules*, v.7, p.1568-1572, 2006.

ZHANG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; PAN, Y.; ZHAO, J.; REN, L., et al. **A novel PEGylation of chitosan nanoparticles for gene delivery.** *Biotechnology and Applied Biochemistry , 46*, pp. 197-204, 2007.