



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

ANA HELENA CASÉ

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

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2011

Casé, Ana Helena.

Síntese, caracterização e estudo físico-químico de nanopartículas formadas pela interação de derivados hidrofílicos de quitosana com DNA / Ana Helena Casé. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

88 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcio José Tiera

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Físico-Química. 3. Nanopartículas – Síntese. 4. Quitosana. I. Tiera, Marcio José. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

ANA HELENA CASÉ

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, área de Polímeros e Colóides junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular 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 José Tiera
Professor Livre Docente
UNEP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
Professor Titular
UNESP - São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Laura Tiemi Okano
Professor Doutor
USP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. Mário Sérgio Galhiane
Professor Doutor
UNESP - Bauru

Prof. Dr. Miguel Jafelicci Júnior,
Professor Titular,
UNESP - Araraquara,

São José do Rio Preto, 7 de dezembro de 2011.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO. POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ao meu filho, Vinícius, por ser a inspiração de todos os meus feitos.

A Irene e a Sandra Helena, pelo incentivo, compreensão, carinho e ajuda. Principalmente no decorrer desses últimos meses.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcio José Tiera, pela orientação, paciência e constante incentivo à pesquisa e ao aprendizado.

A Prof^a. Dr^a. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli, por contribuir para realização das pesquisas e pelas discussões dos resultados.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pelo auxílio e discussões.

A Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida de Oliveira Tiera, pela amizade e por estar sempre à disposição.

Ao Prof. Dr. José Ramon Beltran Abrego, pela amizade, pelas discussões e incentivo à pesquisa.

Aos colegas de laboratório por pela convivência e discussões sobre as pesquisas desenvolvidas.

As minhas amigas do grupo, Bruna, Evelin, Karen, Eduardo e Tamiris, pela ajuda, pelo companheirismo e por tornarem, com suas presenças, o laboratório um ambiente tão agradável.

As Secretárias Rita e Ilva, pela dedicação, eficiência e amizade.

Aos técnicos: Barbosa, Claudinei, Daniela, Eliani, João e Paulinho, pela competência e paciência.

RESUMO

A quitosana tem emergido na última década como um bom candidato para a entrega genética devido suas propriedades, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e versatilidade, como vetor em administração intravenosa e oral. Além disso, possui a capacidade de condensar de forma eficiente com o DNA formando poliplexos resistentes, o que é importante para evitar a degradação por desoxirribonucleases (DNAses). As nanopartículas resultantes têm recebido grande atenção por suas potenciais aplicações em terapia gênica não viral. Neste trabalho foi realizada a síntese, caracterização e estudo físico químico das nanopartículas formadas pela interação de derivados hidrofílicos de quitosana com DNA. As interações entre derivados de quitosana contendo os grupos fosforilcolina e os grupos poli(etileno glicol) com DNA foram investigadas com base nos efeitos da razão de cargas, pH e conteúdo dos grupos substituintes (PC e PEG) sobre o tamanho e estabilidade dos complexos. Nos estudos foram utilizadas as técnicas de fluorescência com o ensaio do brometo de etídio (EtBr), eletroforese em gel de agarose, espalhamento de luz dinâmico e microscopia de fluorescência. O tamanho e estabilidade coloidal das nanopartículas preparadas com quitosana desacetilada (CH_D), quitosana-fosforilcolina (CH-PC) e quitosana-PEG (CH-PEG) mostraram-se fortemente dependentes do conteúdo dos grupos hidrofílicos, bem como, da razão de cargas e pH. A força de interação foi avaliada por meio de ensaio com EtBr. Para razões de carga (N/P) maiores que 5,0, nenhuma liberação do DNA foi observada das nanopartículas por eletroforese em gel. As nanopartículas formadas pela interação dos derivados com DNA (CH-PC-DNA e CH-PEG-DNA) em baixos valores de pH exibiram uma maior resistência à agregação quando comparada à quitosana desacetilada (CH_D) em pH 7,0. Neste pH à alta densidade de cargas positivas da quitosana e seus derivados hidrofílicos mostraram maior afinidade com DNA. Por outro lado em altos valores de pH as nanopartículas preparadas com quitosana desacetilada (CH_D) formaram agregados e somente

os derivados contendo PC e PEG foram capazes de formar nanopartículas menores, com raios hidrodinâmicos variando de 100 a 150 nm. As nanopartículas sintetizadas em baixa força iônica com os derivados contendo PC com graus de substituição de 20 e 40% permaneceram estáveis por semanas. As fotomicroscopias das nanopartículas preparadas com os derivados marcados com rodamina também confirmaram que os derivados contendo PC apresentam estabilidade coloidal superior que aquelas sintetizadas com quitosana desacetilada e CH-PEG. Portanto devido às propriedades físico-química das nanopartículas preparadas esses derivados configuram-se como um material de grande potencial para a terapia gênica não viral.

ABSTRACT

Chitosan has been recognised in the past decade as a good candidate for gene delivery due to its properties as low toxicity, biodegradability and versatility as a carrier for intravenous and oral administration. Also, the ability to condense efficiently with DNA forming tight polyplexes is important to avoid the degradation by DNAses. The resulting nanoparticles have received great attention for their potential applications in nonviral gene therapy. In this work it was carried out the synthesis, characterization and physicochemical studies of nanoparticles formed by the interaction of hydrophilic derivatives of chitosan with DNA. The interactions between chitosan derivatives containing phosphorylcholine (CH-PC) and poly(ethylene glycol) (CH-PEG) moieties and calf thymus DNA (DNA) were investigated focusing on the effects of the charge ratio, the pH and phosphorylcholine content on the size and stability of the complexes using the ethidium bromide fluorescence assay, gel electrophoresis, dynamic light scattering and fluorescence microscopy. The size and colloidal stability of deacetylated chitosan (CH-DNA), CH-PC-DNA and CH-PEG-DNA complexes were strongly dependent upon phosphorylcholine (PC) and poly(ethylene glycol) contents, charge ratios and pH. The interaction strengths were evaluated by ethidium bromide fluorescence and, at N/P ratios higher than 5.0, no DNA release was observed in any synthesized CH-PC-DNA and CH-PEG-DNA polyplexes by gel electrophoresis. The CH-PC-DNA and CH-PEG-DNA polyplexes exhibited a higher resistance to aggregation compared to deacetylated chitosan (CH_D) at neutral pH. At low pH values highly charged chitosan and its phosphorylcholine and PEG derivatives had strong binding affinity with DNA, whereas at higher pH values chitosan (CH_D) formed large aggregates and only CH-PC derivatives were able to form small nanoparticles with hydrodynamic radii varying from 100 to 150 nm. Nanoparticles synthesised at low ionic strength with CH-PC derivatives containing moderate degrees of substitution (DS = 20 and 40%) remained stable for weeks. Photomicrographs also

confirmed that rhodamine-labelled CH-PC₄₀-DNA derivative nanoparticles presented higher colloidal stability than those synthesized using deacetylated chitosans. Accordingly, due to their improved physicochemical properties these phosphorylcholine and PEG modified chitosans provide new perspectives for controlling polyplexes properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vetores não virais mais estudados na formação de nanopartículas para a terapia gênica.....	2
Figura 2 - Mecanismo idealizado do processo “Transfecção”	6
Figura 3 - Alguns crustáceos (camarão, lagosta e siri) utilizados na obtenção de quitina	7
Figura 4 - Estruturas primárias de quitina (a), celulose (b) e quitosana (c)	8
Figura 5 - Modelo proposto por Watson e Crick.....	10
Figura 6 - Representação esquemática do processo de coacervação utilizado para a preparação das nanopartículas.....	13
Figura 7 - Representação esquemática da estratégia para aumentar a estabilidade e tempo de circulação das partículas	15
Figura 8 - (a) Estrutura da quitosana e (b) Derivados de quitosana-fosforilcolina	16
Figura 9 – Substituição Nucleofílica	19
Figura 10 - Adição - eliminação nucleofílica: Formação da base de Schiff.....	20
Figura 11 - Esquema estrutural do derivado de quitosana com fosforilcolina (CH-PC).....	21
Figura 12 - Esquema estrutural do derivado de quitosana com poli(etileno glicol).....	23
Figura 13 - Esquema representativo do mecanismo de reação para a marcação com rodamina isotiocianato.....	24
Figura 14 - Estrutura da molécula de Brometo de Etídio (EtBr).....	28
Figura 15 - i) Espectro de RMN de quitosana acetilada (GD = 77,35%) e ii) Titulação potenciométrica; a) pH em função do volume de [NaOH] e b) derivada primeira da curva de pH em função do volume de [NaOH] (GD = 79,5%).....	32
Figura 16 - i) Espectro de RMN de quitosana desacetilada (GD = 98,1%) e ii) Titulação potenciométrica; a) pH em função do volume de NaOH e b) derivada primeira da curva de pH em função do volume de [NaOH] (GD = 97,4%)	33
Figura 17 - Espectro de RMN do PEG-aldeído (Mw = 2000 g/mol). Solvente: CDCl ₃	34
Figura 18 - Espectros de RMN ¹ H dos derivados de quitosana sintetizados com PEG a) CH-PEG ₉ , b) CH-PEG ₅ e c) CH-PEG ₃	36
Figura 19 - Espectros de RMN ¹ H dos derivados de quitosana substituídos com grupos fosforilcolina de cima para baixo, CH-PC ₂₀ , CH-PC ₄₀ , CH-PC ₈₀	39
Figura 20 - Determinação do coeficiente de absorvidade molar da rodamina-isotiocianato .	40
Figura 21 - Titulação do complexo DNA-EtBr por quitosanas desacetilada e modificadas	43
Figura 22 - Titulação do complexo DNA-EtBr por quitosanas modificadas com a) PC em pH 7,0 e b) desacetiladas em pH 4,0 em temperatura ambiente.....	44
Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose das nanopartículas preparadas pela interação de DNA com as quitosanas desacetiladas: CH _{5D} , CH _{10D} , CH _{57D} e CH _{150D} em pH 4,0 para razões N/P crescentes	45
Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose das nanopartículas a) CH _{57D} -DNA; b) CH-PEG ₃ -DNA; c) CH-PEG ₅ -DNA e d) CH-PEG ₉ -DNA, nas razões N/P = 0 (DNA), 0,2; 0,4; 0,6; 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente da esquerda para a direita em pH 4,0.....	47
Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose das nanopartículas a) CH _{57D} -DNA; b) CH-PEG ₃ -DNA; c) CH-PEG ₅ -DNA e d) CH-PEG ₉ -DNA, nas mesmas razões N/P e na mesma ordem que as Figuras anteriores, mudando somente o pH para 6,2	47
Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose das nanopartículas em pH 4,0 a) CH _{57D} -DNA b) CH-PC ₁₀ -DNA c) CH-PC ₄₀ -DNA e pH 6,2 d) CH _{57D} -DNA; e) CH-PC ₁₀ -DNA e f) CH-PC ₄₀ -DNA nas razões	48
Figura 27 – Potencial zeta dos políplexos CH-DNA em função da razão N/P (■) CH _{57D} -DNA, (△) CH _{5D} -DNA e (●) CH-PC ₅₀ -DNA, a) 10 mM HAc/NaAc pH 4,0 b) tampão fosfato pH 6,2 e força iônica 10 mM.....	52

Figura 28 - Micrografias de nanopartículas marcadas com rodamina, a) CH57 _D -DNA, b) CH-PEG ₉ -DNA, c) CH-PC ₄₀ -DNA, d) CH-PC ₁₀ -DNA e e) CH-PEG ₅ -DNA em pH 7,0, após um dia da preparação	58
Figura 29 - Micrografias de nanopartículas de CH-PC ₄₀ -DNA marcado com rodamina, nos pHs: a) 4,0, b) 6,2, c) 7,0 e d) 7,4 após 1 dia de preparação	59
Figura 30 - Microfotografias de nanopartículas de DNA preparadas a) CH-PC ₁₀ -DNA b) CH-PC ₄₀ -DNA c) CH-PEG ₃ -DNA e d) CH-PEG ₉ -DNA, em pH 4,0, força iônica 150 mM, concentração de DNA = 16 μM e razão N/P = 5.....	60
Figura 31 - Micrografias de nanopartículas nanopartículas a) CH57 _D -DNA, b) CH-PC ₄₀ -DNA, c) CH-PEG ₅ -DNA e d) CH-PEG ₉ -DNA, em pH 7,0, força iônica 150 mM, concentração de DNA = 80 μM e N/P = 5	62
Figura 32 – Cromatogramas das amostras de quitosanas desacetiladas a) Detecção por IR....	72
Figura 33 – Cromatogramas das amostras de quitosanas modificadas com fosforilcolina. Detecção por IR	72
Figura 34 - Micrografias de nanopartículas de CH57 _D -DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0.....	73
Figura 35 - Micrografias de nanopartículas de CH-PEG ₅ -DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0.....	73
Figura 36 - Micrografias de nanopartículas de CH-PEG ₉ -DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0.....	74
Figura 37 - Micrografias de nanopartículas de CH-PC ₁₀ -DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0.....	74
Figura 38 - Micrografias de nanopartículas de CH-PC ₄₀ -DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características de ácidos nucleicos nas conformações A-DNA, B-DNA e Z-DNA (STRYER, 1992)	11
Tabela 2 - Valores do grau de desacetilação (GD) da quitosana comercial e desacetilada.....	33
Tabela 3 – Resultados do Grau de Substituição dos derivados de quitosana contendo PEG...	35
Tabela 4 - Propriedades das quitosanas desacetiladas e seus derivados com PC.....	38
Tabela 5 – Resultados da marcação fluorescente e porcentagem de rodamina de quitosana e seus derivados.....	41
Tabela 6 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 4,0 e razão N/P = 1	49
Tabela 7 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 4,0 e razão N/P = 3	49
Tabela 8 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 4,0 e razão N/P = 5	49
Tabela 9 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 6,2 e razão N/P = 1	49
Tabela 10 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 6,2 e razão N/P = 3	50
Tabela 11 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 6,2 e razão N/P = 5	50
Tabela 12 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 7,0 e razão N/P = 5	50
Tabela 13 - Diâmetros hidrodinâmicos, CH-PC ₁₀ , pH 4,0, 6,2 e 7,0 e razão N/P = 5	54
Tabela 14 - Diâmetros hidrodinâmicos, CH-PC ₄₀ , pH 4,0, 6,2 e 7,0 e razão N/P = 5	54
Tabela 15 - Diâmetros hidrodinâmicos, CH-PEG ₅ , pH 4,0, 6,2 e 7,0 e razão N/P = 5	55
Tabela 16 - Diâmetros hidrodinâmicos, CH-PEG ₉ , pH 4,0, 6,2 e 7,0 e razão N/P = 5	55

Lista de Símbolos

AIDS: *Síndrome da imunodeficiência adquirida*
CH5_D: *Quitosana desacetilada 5 kDa*
CH10_D: *Quitosana desacetilada 10 kDa*
CH150_D: *Quitosana desacetilada 150 kDa*
CH57_A: *Quitosana acetilada 57 kDa*
CH57_D: *Quitosana desacetilada 57 kDa*
CH57_D-DNA: *Políplexo quitosana 57 kDa-DNA*
CH-DNA: *Políplexo quitosana-DNA*
CH-PC-DNA: *Políplexo quitosana-fosforilcolina-DNA*
CH-PC₁₀-DNA: *Políplexo quitosana- fosforilcolina10%-DNA*
CH-PC₂₀-DNA: *Políplexo quitosana fosforilcolina20%-DNA*
CH-PC₄₀-DNA: *Políplexo quitosana fosforilcolina40%-DNA*
CH-PC₅₀-DNA: *Políplexo quitosana fosforilcolina50%-DNA*
CH-PC₈₀-DNA: *Políplexo quitosana fosforilcolina80%-DNA*
CH-PEG-DNA: *Políplexo quitosana-poli(etileno glicol)-DNA*
CH-PEG₃-DNA: *Políplexo quitosana-poli(etileno glicol)3%-DNA*
CH-PEG₅-DNA: *Políplexo quitosana-poli(etileno glicol)5%-DNA*
CH-PEG₉-DNA: *Políplexo quitosana-poli(etileno glicol)9%-DNA*
D₂O: *Água deuterada ou óxido de deutério*
Dh: *Diâmetros hidrodinâmicos*
DLS: *Espalhamento de luz dinâmico*
DNA: *Ácido desoxirribonucléico*
EtBr: *Brometo de etídio*
GA: *Grau de acetilação*
GD: *Grau de desacetilação*
GS: *Grau de substituição*
kbp: *Quilo pares de bases*
MEV: *Microscopia eletrônica de varredura*
Mn: *Massa Molecular média*
Mw: *Massa molecular Ponderal média*
N/P: *Razão de grupos amino de quitosana e grupos fosfato de DNA*
NaCNBH₃: *Borocianohidreto de sódio*
PC: *Fosforilcolina*
PEG: *Poli(etileno glicol)*
PEG-COH: *PEG-aldeído*
RMN ¹H: *Ressonância Magnética nuclear de prótons*
SCID: *Imunodeficiência combinada grave*
ε: *Coefficiente de absorção molar em 260 nm*

Sumário

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Introdução Geral	1
1.2 – Vetores Virais.....	2
1.3 – Vetores não Virais.	4
1.4 – Quitina e Quitosana.....	6
1.5 – DNA	9
1.6 – Nanopartículas de Quitosana para Terapia Gênica não Viral.....	12
2 - OBJETIVOS	17
3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	18
3.1 - Materiais	18
3.2 - Métodos	18
3.2.1 – Desacetilação da Quitosana.	18
3.2.2 – Síntese dos Derivados Contendo Fosforilcolina.....	19
3.2.3 - Síntese dos Derivados Contendo Poli(etileno glicol).	21
3.2.3.1 - Preparação de Poli(etileno glicol-aldeído) PEG-COH.....	21
3.2.3.2 - Síntese e Caracterização de Quitosana-poli(etileno glicol).....	21
3.2.4 - marcação Fluorescente com Rodamina Isotiocianato.....	23
3.2.5 – Caracterização de Quitosana e Seus Derivados.....	24
3.2.5.1 – Determinação do Grau de Desacetilação (GD) e de Substituição (GS) por Titulação Potenciométrica.	24
3.2.5.2 – Determinação do Grau de Desacetilação e de Substituição por RMN 1H.	24
3.2.5.3 - Determinação do Grau de Substituição por Rodamina.....	25
3.2.6 - Preparação de Nanopartículas pelo Método de Coacervação.....	26
3.2.7 - Estudos da Interação.....	27
3.2.7.1 - Ensaio utilizando-se a Fluorescência de Brometo de Etídio.....	27
3.2.7.2 - Eletroforese em Gel de Agarose.....	28
3.2.8 - Análise e Caracterização das Partículas.	29
3.2.8.1 - Microscopia de Fluorescência.	29
3.2.8.2 - Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta.....	30
3.2.8.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	30
4.1 - Caracterização.....	31
4.1.1 – Quitosana Desacetilada e Acetilada.	31
4.1.2 – Derivados de Quitosana-poli(etileno glicol).	33
4.1.3 – Derivados de Quitosana-Fosforilcolina.	37
4.1.4 - Marcação Fluorescente com Rodamina.	40
4.2 - Avaliação Comparativa da Interação de DNA com Quitosana e seus Derivados.	41
4.2.1 - Ensaio Utilizando-se a Fluorescência de Brometo de Etídio.....	41
4.2.2 - Estudo Comparativo da Estabilidade das Nanopartículas por meio da Eletroforese em Gel de Agarose.	44
4.2.3 - Determinação do Tamanho das Nanopartículas por Espalhamento de Luz Dinâmico.....	49
4.2.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	59
6 – REFERÊNCIAS	65
7 – APÊNDICE A	72
8 – APÊNDICE B.....	73

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Introdução Geral

A terapia gênica pode ser definida como o tratamento de doenças hereditárias e adquirida, pela transferência de material genético para dentro de células específicas de um paciente, com o objetivo de substituir, corrigir ou suplementar genes ausentes ou defeituosos, responsáveis pelo desenvolvimento de doenças. A primeira terapia gênica autorizada foi realizada nos Estados Unidos em 1990 num paciente com quatro anos de idade. Nascido com uma doença genética rara, chamada de Imunodeficiência Combinada Grave (SCID). Crianças que apresentam este quadro não possuem um sistema imunológico saudável, são vulneráveis a todos os germes que tiverem contato, desenvolvem geralmente muitas infecções e dificilmente sobrevivem até a idade adulta (Roman *et al.*, 2005).

Atualmente existem várias doenças sendo tratadas com protocolo de terapia gênica, como por exemplo: fenilcetonúria, fibrose cística, hemofilia, distrofia muscular, câncer, AIDS, doenças neurológicas (como mal de Parkinson e de Alzheimer), doenças infecciosas e doenças vasculares (Dani, 2000).

O maior desafio na terapia gênica desde seu surgimento até o presente é a transferência do material genético. A maioria dos esforços se concentra na busca de vetores eficientes que possam transportar e transferir o DNA de modo seguro e eficiente (Somia; verma, 2000). Existem dois tipos de terapias, as chamadas virais que utilizam vírus como as retrovírus e adenovírus (Godbey; mikos, 2001), e as não virais (Figura 1) que se referem ao uso do DNA “desprotegido” ou incorporado em formulações que utilizam vesículas poliméricas e lipídeos catiônicos (lipoplexos), polímeros catiônicos (poliplexos) e sistemas que incorporam proteínas, peptídeos e outras moléculas biológicas (ROTH; sundaram, 2004). Nos tópicos seguintes serão introduzidos breves conceitos sobre os tipos de vetores mais utilizados.

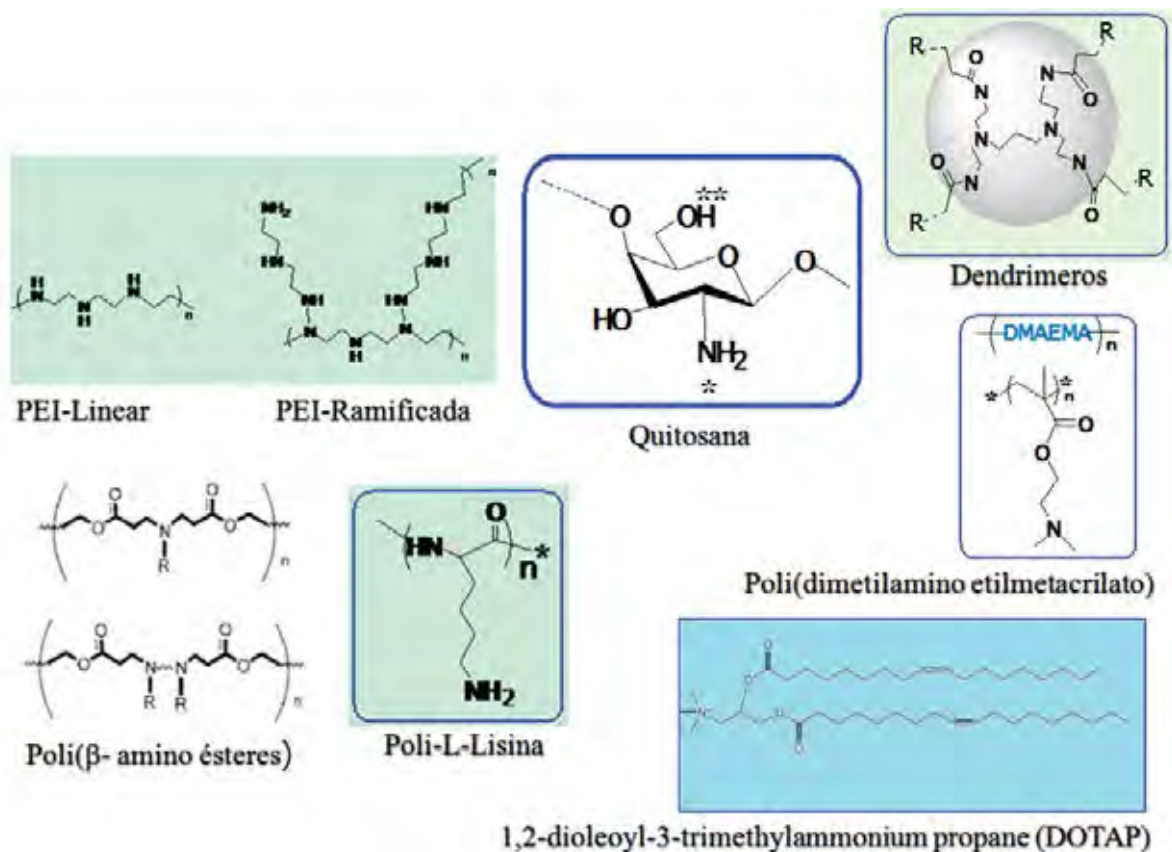


Figura 1 - Vetores não virais mais estudados na formação de nanopartículas para a terapia gênica

1.2 – Vetores Virais.

Os primeiros candidatos para entrega genética foram os vírus. Eles eram considerados os melhores candidatos para promoverem a entrega genética, devido a sua eficácia em transferir seu material genético para células. Uma grande vantagem em sua utilização vem do fato de que os vírus podem ser manipulados geneticamente, substituindo suas componentes genéticas (genes patogênicos) que é essencial para sua propagação por genes terapêuticos, o que reduz a sua patogenicidade sem anular totalmente o seu poder de infectar uma população celular alvo. Utilizando técnicas de engenharia genética é possível somar ao DNA do vírus o gene terapêutico que deverá ser transferido para células específicas e ao infectar uma célula o vírus transferirá uma ou mais cópias do gene desejado (PEDROSO *et al.*, 2001).

A primeira classe de vetores virais estudados foram os adenovírus. Eles são vírus que possuem seu material genético na forma de um DNA dupla-hélice. Eles não são integrantes, ou seja, o material genético dos adenovírus não é incorporado no genoma da célula hospedeira. O DNA fica livre no núcleo da célula e sua expressão dura pouco tempo. Possuem a capacidade de infectar também células que não estão sofrendo meiose e transportam genes de grandes dimensões (SILMAN; FOOKS, 2000).

Em 1989 os estudos estavam todos voltados para os retrovírus, que se tornaram o mais eficaz e popular modelo de vetores. Eles possuem seu material genético na forma de RNA e infectam somente as células que estão se dividindo. Ao infectar a célula hospedeira, introduz seu RNA junto com algumas enzimas na célula. E por meio da transcrição reversa reproduz uma cópia de DNA que deverá ser inserida nos cromossomos das células hospedeiras. Este processo é feito por uma enzima viral chamada integrase. Quando o material genético do vírus está incorporado e se tornou parte da célula, pode-se dizer que a célula hospedeira está modificada por conter um novo gene. Se posteriormente essa célula se dividir, o novo gene será transferido a todas as suas descendentes (PEREIRA, 2010).

Em 1996 iniciaram-se estudos envolvendo os vírus adenoassociados que são vírus pequenos com um genoma na forma de DNA de fita simples. Apresentam algumas vantagens em relação aos retrovírus por serem não patogênicos e também integra seu DNA ao cromossomo da célula hospedeira. Contudo, uma das limitações em seu uso é que os vírus adenoassociados possuem uma baixa capacidade de transporte, dessa forma somente genes de dimensões pequenas poderão ser introduzidos e outra limitação é a dificuldade em reproduzi-lo (AUDOUY; HOEKSTRA, 2001).

De modo geral os vetores virais permitem uma alta taxa de transfeção e uma rápida transcrição do material genético terapêutico. Entretanto, seu uso em terapia gênica atualmente encontra-se limitado por vários fatores. Inicialmente por motivos de segurança, devido à

morte de paciente durante o tratamento clínico que investigava o potencial da terapia gênica usando vetores virais (FERBER, 2001). Outra limitação é fato de que somente seqüências pequenas de DNA podem ser inseridas no genoma do vírus e a produção em larga escala pode ser difícil de ser viabilizada. Mais uma limitação é o fato de que geralmente os vírus apresentam uma serie de problemas potenciais como toxicidade, respostas imunológicas e respostas inflamatórias. Além disso, a mutagênese decorrente da inserção no genoma humano e efeitos oncogênicos podem ocorrer na utilização “in vivo”. Diante desses fatores a solução é a busca de vetores alternativos baseados em sistemas não virais.

1.3 – Vetores não Virais.

A utilização de vetores não virais apresenta algumas vantagens sobre vetores virais, como a produção em larga escala e baixa imunogenicidade do hospedeiro. Inicialmente o uso de métodos não virais era limitado devido à baixa transfecção e expressão do gene (PEDROSO *et al.*, 2001). Contudo, avanços recentes na tecnologia desses vetores permitem transfecção “in vitro” tão eficiente quanto às apresentadas por métodos virais. Atualmente o maior desafio no campo da terapia gênica é desenvolver um vetor não viral efetivo “in vivo”. Vários métodos de entrega genética por vetores não virais têm sido utilizados, como por exemplo, a utilização de DNA “despido” em micro-injeção de DNA livre diretamente no núcleo celular, Oligo deoxinucleotídeo, eletroporação, complexos formados pela interação de DNA e lipídeos catiônicos (lipoplexos) e complexos formados pela interação de polímeros catiônicos e DNA (poliplexos) (Pereira, 2010).

A interação entre o DNA e polímeros ou lipídeos catiônicos ocorre devido às cargas positivas dos polímeros ou lipídeos e as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA. Os complexos têm habilidade de proteger o DNA contra degradação durante o processo de transfecção (Figura 2) contribuindo para maior eficácia na entrega do material genético. Os lipídeos formam estruturas organizadas como micelas ou lipossomos e podem ser lipoplexos

carregados negativamente (aniônicos), lipoplexos neutros ou lipoplexos carregados positivamente (catiônicos). A utilização dos lipoplexos aniônicos e neutros foi limitada por serem compatíveis com fluídos do corpo e adaptação para que eles atingissem um tecido específico seria demorada e complexa, por essa razão a atenção voltou-se para os poliplexos catiônicos. Estudos recentes mostraram que lipoplexos são eficientes na transfecção em células epiteliais respiratórias (PEDROSO *et al.*, 2001; FERBER, 2001).

Os complexos formados entre polímeros e DNA (poliplexos) consistem de polímeros catiônicos e sua produção é regulada por interações iônicas. A maior diferença entre o mecanismo de ação dos poliplexos e lipoplexos é que os poliplexos não podem liberar o gene terapêutico no citoplasma, a liberação é realizada no endossomo durante o processo de endocitose. Os poliplexos sintéticos e naturais são apontados como bons candidatos devido a algumas vantagens sobre vetores virais como, por exemplo, baixa resposta imunológica e ao contrário de vetores virais, seqüências relativamente grandes de DNA podem ser condensadas em partículas pequenas. Além de oferecer boa proteção ao DNA e serem de “fácil manufatura”, podem ser modificados para atingir populações de células específicas. Entretanto, alguns problemas tais como toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e em particular baixa eficiência na transfecção precisam ser resolvidos antes de sua aplicação (ALAN *et al.*, 2002; POUTON; SEYMOUR, 2001). Um dos poliplexos pesquisados com êxito nos últimos anos e com vários estudos promissores publicados é a quitosana. Alguns estudos variam o grau de acetilação e a massa molar, mas a maioria desses estudos tem usado quitosanas de alta massa molar (GODBEY; MIKOS, 2001).

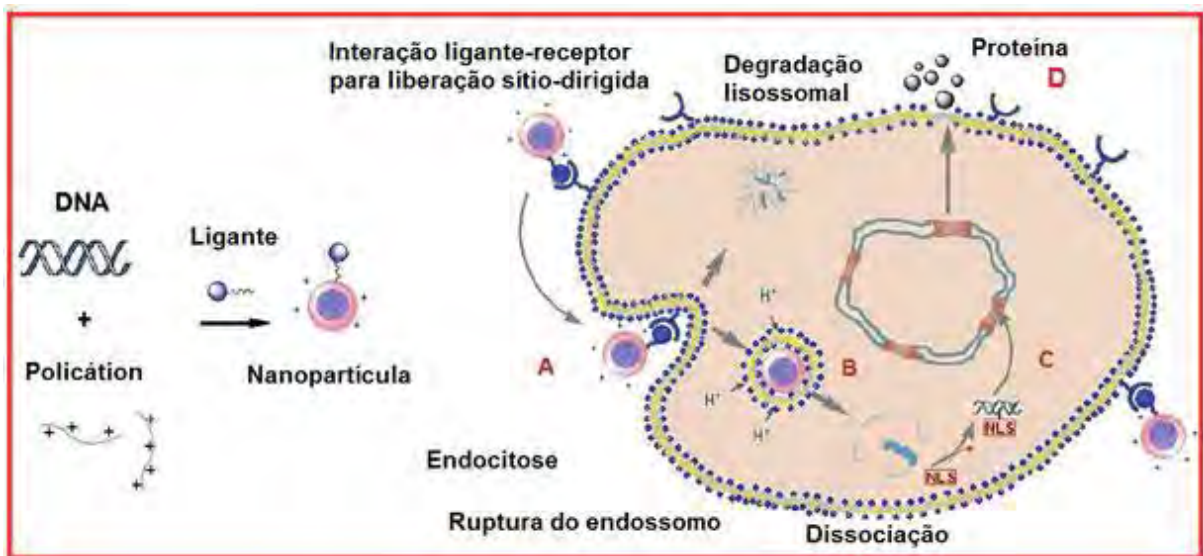


Figura 2 - Mecanismo idealizado do processo “Transfecção”

1.4 – Quitina e Quitosana

A quitina é um polissacarídeo, um homopolímero constituído por resíduos de monossacarídeos unidos por ligação glicosídica, encontrado como principal componente das carapaças de lagosta, camarão e caranguejo. A quitina é isolada por processos químicos que envolvem as etapas de desmineralização, desproteinização com soluções diluídas de HCl e NaOH respectivamente e despigmentação com $KMnO_4$ e ácido oxálico, e por reações de desacetilação alcalina é transformada em quitosana (AZEVEDO *et al.*, 2007).

A quitosana pode ser obtida de forma natural, sendo extraída de alguns fungos, como *Aspergillus niger* e *Mucor rouxii* (PETER, 1995) em pouca quantidade e complexada com outros polímeros, por esta razão a maioria das quitosanas são obtidas pelo processo de desacetilação da quitina. É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos (Figura 3) são resíduos abundantes e rejeitadas pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 2001).



Figura 3 - Alguns crustáceos (camarão, lagosta e siri) utilizados na obtenção de quitina

A quitosana é um biopolímero que possui propriedades químicas e biológicas importantes para várias aplicações tecnológicas. Pode ser utilizada na medicina como controladores de liberação de fármacos, na biomedicina é usada nas suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, redutor de níveis de colesterol no sangue, antiácido, no controle de pressão alta, prisão de ventre, na redução de ácido úrico no sangue e coadjuvante no controle de doenças como a artrose. Na biofarmacêutica como antitumoral, hemostático e anticoagulante. Na área de cosméticos, é utilizada na formulação de cremes para o rosto, mãos e corpo, loções de banho, esfoliantes para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental e na fabricação de xampus (SIGNINI, 2001; RINAUDO, 1989).

Na agricultura é utilizada em mecanismos defensivos e como adubo para plantas. Na indústria alimentícia é aplicada como fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, recobrimento de frutas, fungicida e bactericida. Na área ambiental, a quitosana é conhecida como um bioadsorvente para remoção de íons metálicos tóxicos, corantes e compostos orgânicos. É utilizada no processo de tratamento e purificação de água. Atua como floculante e coagulante nos processos de tratamento de efluentes industriais. Ainda pode remover o petróleo de derramamentos no mar contribuindo na solução de um dos grandes problemas ambientais.

A quitina e a quitosana são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. A estrutura química da quitosana é similar à quitina, que é semelhante à fibra vegetal chamada celulose (Figura 4), diferenciando-se somente no grupo funcional ligado ao carbono 2 do anel glicopirranose, grupos hidroxil (OH) na celulose, grupos -N-acetil (NHCOCH_3) na quitina e grupos amino (NH_2) na quitosana. É solúvel em meio levemente ácido, formando um polímero catiônico, com a adição de prótons (protonação) do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais.

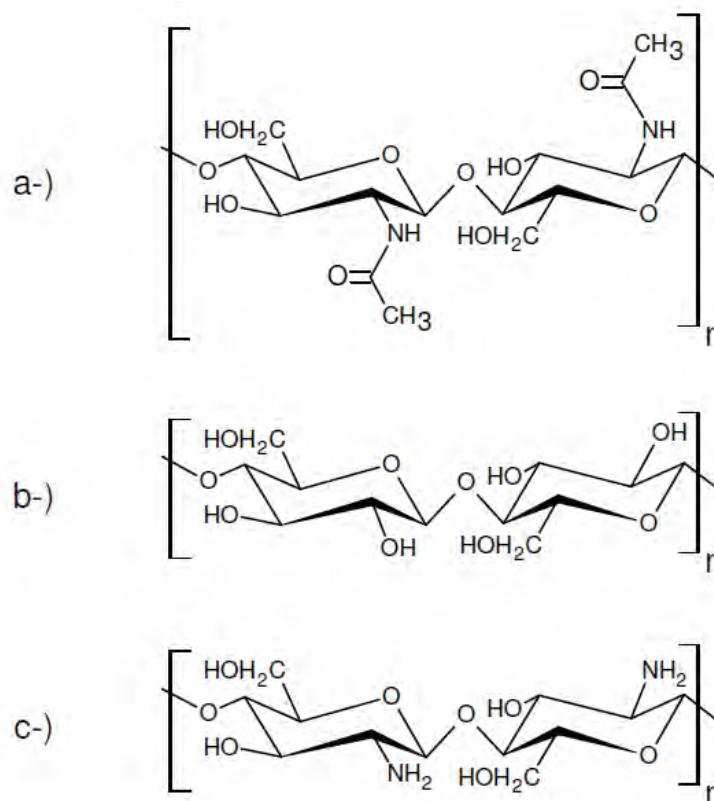


Figura 4 - Estruturas primárias de quitina (a), celulose (b) e quitosana (c)

De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades N-acetil-D-glicosamina de quitina e quitosana, podem-se obter diversas quitosanas variando-se suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, pK_a e viscosidade. O homopolímero é uma base fraca com o valor de

pK_a para os resíduos de glucosamina variando de 6.2 a 7.0, é insolúvel em pH 7,0 ou alcalino. Como em todos os polieletrólitos a constante de dissociação depende do grau de dissociação no qual é determinado O valor do pK_a pode ser calculado utilizando-se a equação (1) de Katchalsky (1954).

$$pK_a = pH + \log [(1-\alpha)/\alpha] = pK_0 - \varepsilon\Delta\Psi(\alpha)/kT \quad (1)$$

onde $\Delta\Psi$ é a diferença do potencial eletrostático entre a superfície do poli(íon) e a referência, α é o grau de dissociação, k é a constante de Boltzman, T é a temperatura, e ε é a carga do elétron. A extrapolação dos valores de pK_a para $\alpha = 1$, situação na qual o polímero não está carregado, portanto o potencial eletrostático é zero, torna possível determinar a constante de dissociação intrínseca, pK_0 . O valor obtido não depende do grau de acetilação, enquanto que o valor de pK_a é altamente dependente deste parâmetro, já que o potencial eletrostático será variado dependendo da quantidade de grupos amino livres.

1.5 – DNA

Em 1952, Linus Pauling propôs um modelo para o ácido nucléico, onde a molécula estaria com o grupo fosfato, carregado negativamente, no interior de uma tripla hélice. Ele acreditava, que a primeira interação e a que mantinha as fitas da hélice juntas, seriam pontes salinas formadas por íons e o grupo fosfato carregado negativamente (THIEMANN, 2005).

Em 1953, após muitos estudos sobre ácido desoxirribonucléico (DNA), James Watson, geneticista americano, e Francis Crick, físico britânico, deduziram a estrutura tridimensional do DNA utilizando difração de Raios X, e logo depois, também o mecanismo de replicação. Essa descoberta foi um marco importante na história da biologia, pois levou à compreensão do funcionamento do gene em termos moleculares. Estudos realizados por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins levaram Watson e Crick a proporem um modelo estrutural que conhecemos hoje (Figura 5). Neste modelo são descritos que duas

cadeias nucleotídicas helicoidais formam ligações fosfodiéster internucleotídicas e que correm em sentido anti-paralelo. Estas cadeias estão enroladas em torno do mesmo eixo, sendo que as bases purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (citosina e timina), hidrofóbicas, estão do lado interno da hélice, em planos perpendiculares ao seu eixo, enquanto as unidades fosfato e desoxirribose, com características hidrofílicas, estão localizadas no exterior da molécula. A adenina está pareada com a timina e a citosina com a guanina, fazendo 2 e 3 ligações de hidrogênio, respectivamente (STRYER, 1992).

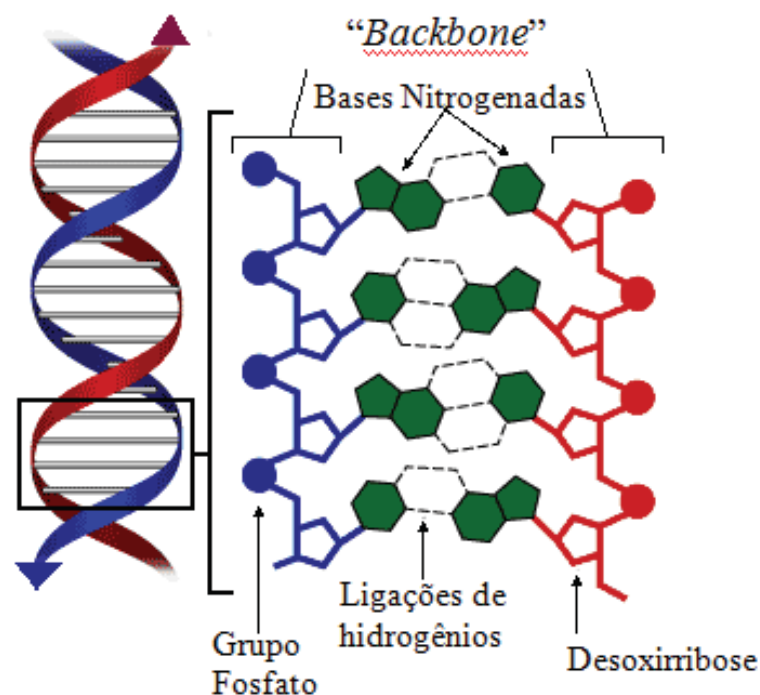


Figura 5 - Modelo proposto por Watson e Crick

Hoje sabe-se que o grupo fosfato, por ser carregado negativamente, é um dos responsáveis pela instabilidade da dupla hélice do ácido nucléico, devido à repulsão eletrostática. A repulsão eletrostática existente na molécula de DNA fita simples é maximizada e favorecida em baixa concentração salina, já na fita dupla ocorre uma blindagem destes grupos fosfatos minimizando a repulsão eletrostática em alta concentração salina (VAN HOLDE, 1998).

De acordo com a composição do solvente e das bases, a dupla hélice de DNA pode admitir várias estruturas distintas (VOET, 2000). O modelo proposto por Watson e Crick é

conhecido como B-DNA. A análise cristalográfica por difração de raios X em oligonucleotídeos revelou que o DNA apresenta variabilidade e diversidade: a disposição do anel da ribose e a orientação da base determinam estruturas importantes, em conformações agrupadas em 3 famílias principais A, B, e Z. Estas conformações dependem das condições físico-química do meio, tais como a espécie de contraíon, concentração e espécie do eletrólito suporte, pH, hidratação e composição de bases (SAENGER, 1988). O A-DNA apresenta uma característica conformacional muito semelhante ao A-RNA, e o B-DNA com os tipos C, D, E e T-DNA, sendo essas conformações de dupla hélice com giro à direita. Encontra-se também dupla hélice, com o giro à esquerda, identificada como Z-DNA. O diâmetro da hélice na conformação A é maior, o passo da hélice é mais curto e seus pares de bases são inclinados, ao invés de perpendiculares ao eixo da base, características comparadas com as da conformação do B-DNA. Os grupos fosfatos no A-DNA ligam menos moléculas de H₂O do que na conformação B-DNA. Assim, a desidratação favorece a forma A (STRYER, 1992). Algumas das principais características dos ácidos nucleicos na conformação A-DNA, B-DNA e Z-DNA estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Características de ácidos nucleicos nas conformações A-DNA, B-DNA e Z-DNA (STRYER, 1992)

CARACTERÍSTICA	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Passo da hélice por par de base	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
Diâmetro da hélice	22 Å	20 Å	18,4 Å
Sentido do giro	Direita	Direita	Esquerda
Pares de base por volta da hélice	11	10,4	12
Sulco maior	Estreito e muito profundo	Largo e bem profundo	Raso
Sulco menor	Muito largo e raso	Estreito e bem profundo	Muito estreito e profundo

1.6 – Nanopartículas de Quitosana para Terapia Gênica não Viral.

Nos últimos anos, a quitosana tem emergido como um carreador promissor devido às propriedades de biodegradação, biocompatibilidade, não imunogenicidade, baixa toxicidade e por sua versatilidade como carreador em administrações orais e intravenosas (THANOOU *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2007). A quitosana é capaz de condensar DNA de forma eficiente (CORSI *et al.*, 2003) e as nanopartículas resultantes receberam grandes atenções devido às potenciais aplicações na terapia não viral, por via intravenosa (Qi; Xu, 2006; DAI *et al.*, 2006; RICHARDSON *et al.*, 1999; ROY *et al.*, 1999) e administração oral/mucosa (VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001). Existem inúmeras metodologias publicadas na preparação de micro e nanopartículas de quitosanas para terapia gênica. Contudo, o método da coacervação (Figura 6) é geralmente empregado para obtenção de nanopartículas (MUMPER *et al.*, 1995). A complexação é dirigida principalmente pela interação eletrostática entre os grupos amino da quitosana e os grupos fosfato carregados de DNA (FERNANDES *et al.*, 2005; MACLAUGHLIN *et al.*, 1998). O processo é uma separação de fase espontânea, que ocorre quando os dois polieletrólitos de cargas opostas são misturados em uma solução aquosa. A interação eletrostática entre as duas macromoléculas resulta na separação de um coacervante (fase rica em polímero) e do sobrenadante (fase pobre em polímero).

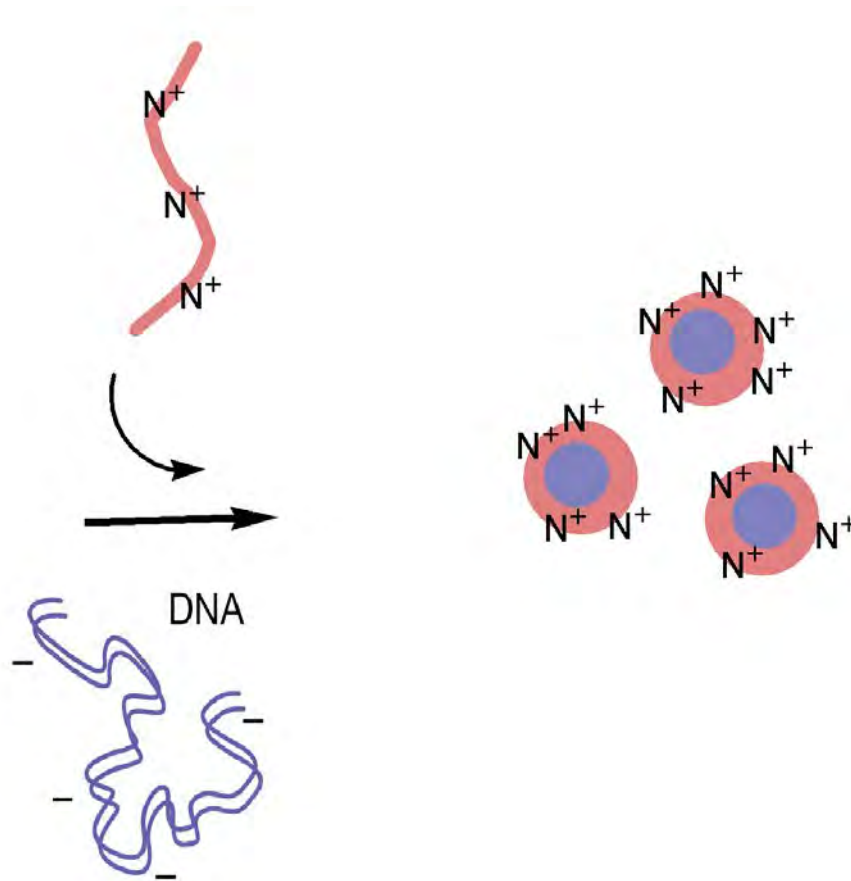


Figura 6 - Representação esquemática do processo de coacervação utilizado para a preparação das nanopartículas

Vários parâmetros, incluindo o massa molecular, razão de cargas (+/-), pH, estrutura do polieletrólito e força iônica podem afetar a interação e, conseqüentemente, o tamanho e estabilidade das nanopartículas. A interação é totalmente favorecida em meio levemente ácido, onde todos os grupos amino estão carregados. Estudos mostram que dependendo do massa molecular e do grau de desacetilação da quitosana, os tamanhos médios dos complexos de DNA-quitosana (CH-DNA), obtidos através de misturas simples e encubação, variam entre 50 e 6000 nm (MUMPER *et al.*, 1995; ISHII *et al.*, 2001, ERBACHER *et al.*, 1998). Em geral, os complexos se estabilizam quando a quitosana é adicionada em excesso molar relativo ao do

DNA, e dependendo do grau de excesso as partículas de quitosana apresentam valores de potencial zeta entre 10 e 20 mV.

O controle do tamanho e da estabilidade das nanopartículas é de grande importância, uma vez que o mecanismo de entrada na membrana celular depende de ambos, tamanho e razão de cargas das nanopartículas (ISHII *et al.*, 2001; CHAN *et al.*, 2001; ERBACHER *et al.*, 1998). O tamanho das partículas é reconhecido como um parâmetro chave por afetar tanto o tempo de circulação no sangue, quanto à captação celular (WOLFERT; SEYMOUR, 1996; AKBUGA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2003). Várias estratégias (Figura 7) têm sido empregadas com o objetivo de aumentar a eficiência das nanopartículas de DNA-quitosana como vetores na terapia gênica, para diminuir a sua interação com componentes do sangue e sua captação pelo sistema retículo endotelial. O tempo de circulação adequado é um fator necessário e fundamental para que as partículas alcancem as células alvo, especialmente no caso de injeção intravenosa (DE SMEDT *et al.*, 2000; BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004; DES RIEUX *et al.*, 2006). Contudo, tem sido relatado que após administração interna a quitosana apresenta uma rápida liberação e acúmulo no fígado o que pode limitar o alcance de tecidos diferentes do fígado (CARRENO-GOMEZ; DUCAN, 1997; HELLER *et al.*, 1996).

Por isso, é importante fazer modificações na quitosana, através da introdução de unidades hidrofílicas ou por inserção de polímeros para evitar interações com proteínas e fagócitos, prolongando assim o tempo de circulação na corrente sanguínea (KIM *et al.*, 2007). Galactose (MURATA *et al.*, 1996; KIMA *et al.*, 2004), poli(etileno) glicol (PARK *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2007; CHAN *et al.*, 2007, ZHR *et al.*, 2006), poli(vinil) pirrolidona (BODNAR *et al.*, 2006), e dextrana (PARK *et al.*, 2003) têm sido ligadas a cadeia principal da quitosana ou em nanopartículas pré-formadas para melhorar suas propriedades físico-químicas. A inserção de PEG na superfície das nanoesferas pré-formadas foi relatada para minimizar a agregação em solução (PARK *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2006).

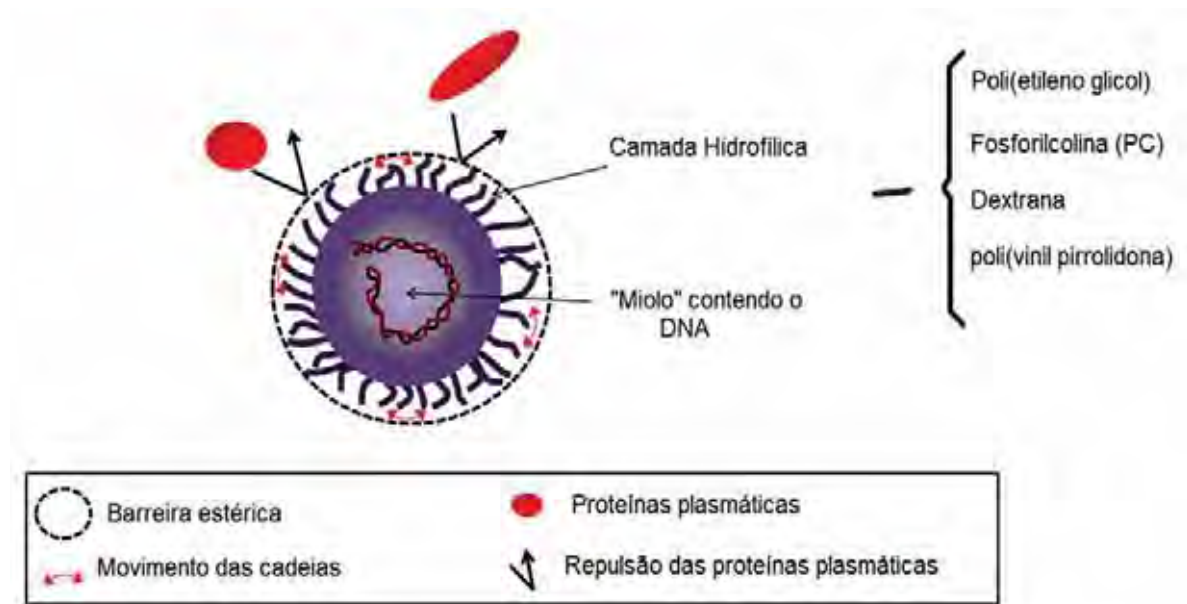


Figura 7 - Representação esquemática da estratégia para aumentar a estabilidade e tempo de circulação das partículas

Contudo, a força de ligação do DNA mostrou-se dependente da massa molecular e da composição da cadeia hidrofílica da quitosana (MAO *et al.*, 2001). Recentemente, foi descrita uma metodologia fácil para a preparação de quitosanas substituídas por fosforilcolina (Figura 8), que exibiram notável solubilidade em água sob condições de pH fisiológico, demonstrando que a introdução de seqüências de fosforilcolina zwitteriônica mesmo que em baixo grau de substituição, proporciona uma nova e eficaz via para atoxicidade da quitosana, mantendo-se solúvel em pH neutro e até mesmo em condições levemente alcalinas (DANIELSEN *et al.*, 2005; TIERA *et al.*, 2006). Os polímeros foram obtidos através da aminação reductiva do PC-CHO para os grupos amino da quitosana -N-acetilado. Além disso, a citotoxicidade dos polímeros foi avaliada, confirmando a natureza não tóxica da quitosana e de seus derivados (PC-CH). A alteração resultou na conversão de amina primária da quitosana em um grupo amino secundário, cujo valor de pKa foi estimado em torno de 7,0. Esses grupos amino conservam a sua capacidade para interagir com o DNA em condições neutras.

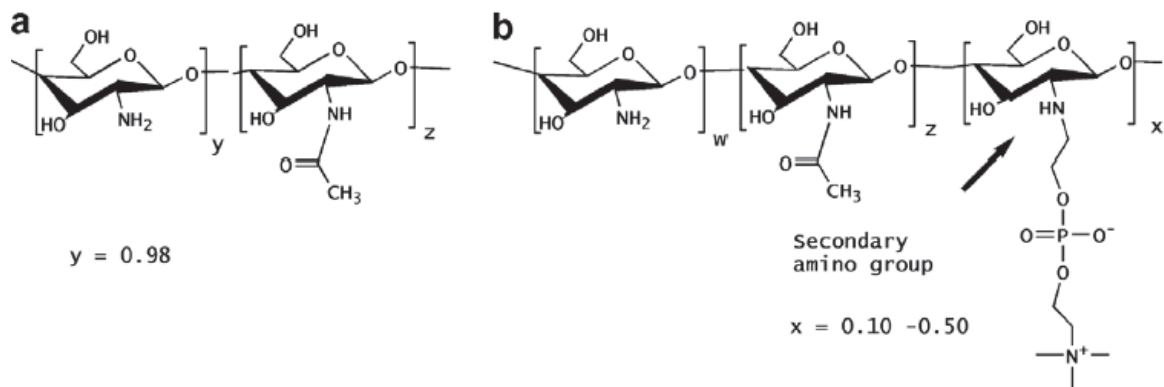


Figura 8 - (a) Estrutura da quitosana e (b) Derivados de quitosana-fosforilcolina

2 - OBJETIVOS

O trabalho aqui relatado teve por objetivo preparar, caracterizar e estudar derivados de quitosana que diminuíssem sua hidrofobicidade e insolubilidade em pH fisiológico. Outra limitação em utilizar a quitosana (CH) na terapia gênica é que a força iônica e interação com proteínas e opsonização impedem qualquer tratamento clínico efetivo. A busca por derivados com maior biocompatibilidade que permitam preparar nanopartículas mais estáveis em meio neutro, e com resistência a adsorção de proteínas é uma necessidade para viabilizar qualquer tipo de tratamento. Após inserção de grupos de fosforilcolina (PC) e de poli(etileno glicol) (PEG) na quitosana foram realizados vários estudos com o objetivo de avaliar a formação e força de interação dos complexos entre vários CH, CH-PC, CH-PEG e DNA. Os efeitos da razão de carga, o pH e o conteúdo dos grupos inseridos sobre a formação, o tamanho e a estabilidade do poliplexos foram investigados. Os estudos foram realizados procurando-se avaliar como a composição desses híbridos afeta a força de interação e a estabilidade coloidal de nanopartículas, abrindo assim novas perspectivas de controlar as propriedades dos poliplexos DNA-quitosana.

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Materiais

A quitosana adquirida da Wako Chemical Co. (MM 57 kDa), foi utilizada como material de partida para a síntese de todos os derivados de quitosana. Ácido acético (Synth), metanol (Vetec), rodamina isotiocianato (Sigma - Aldrich), acetato de sódio (Synth), mono-metoxi de Poli(etileno glicol) (Mw = 2000 kDa, Sigma Aldrich), foram todos utilizados como recebidos. O DNA foi adquirido da Sigma Aldrich (10 – 14 Kbp) e sua pureza foi testada por meio da razão das absorvâncias em 260 e 280 nm ($A_{280}/A_{260} = 1.90$) uma indicação de que a contaminação por proteínas é desprezível (VIJAYANATHAN *et al.*, 2001).

Todos os demais reagentes como hidróxido de sódio e ácido clorídrico (Merck) e os solventes, metanol e acetona (Merck) foram aqueles de maior grau de pureza disponível e foram utilizados como recebidos. Para os experimentos de síntese, purificação e caracterização foram utilizadas águas deionizadas em um sistema Milli-Q da Millipore. A Glicerilfosforilcolina foi adquirida da empresa Bachem com um grau de pureza nominal de 99% e utilizada como recebidas.

3.2 - Métodos

3.2.1 – Desacetilação da Quitosana.

A Figura 9 mostra o mecanismo de reação utilizado para o processo de desacetilação. Este procedimento oferece graus de desacetilação elevados sem que haja grandes degradações nas amostras. Para iniciar o processo de desacetilação foi colocado num balão volumétrico sob agitação contendo 400 ml de água foram dispersos 8 g de quitosana. A esta dispersão foram adicionados 10 ml de ácido acético até solubilização

completa da quitosana. Em seguida, foram adicionados lentamente 200 ml de solução de NaOH 50% obtendo-se uma suspensão finamente dividida. A suspensão foi aquecida à temperatura de 100°C durante 90 minutos sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, a suspensão foi transferida para 4 litros de água deionizada numa temperatura de 60°C sob agitação. O precipitado foi decantado, lavado por mais cinco vezes e isolado por filtração. O procedimento foi repetido mais uma vez para se obter um grau de desacetilação mais

elevado. A quitosana foi filtrada e seca em estufa à temperatura de 40°C por 72 h (TIERA *et al.*, 2006; VIJAYANATHAN *et al.*, 2001; KURITA, 1997).

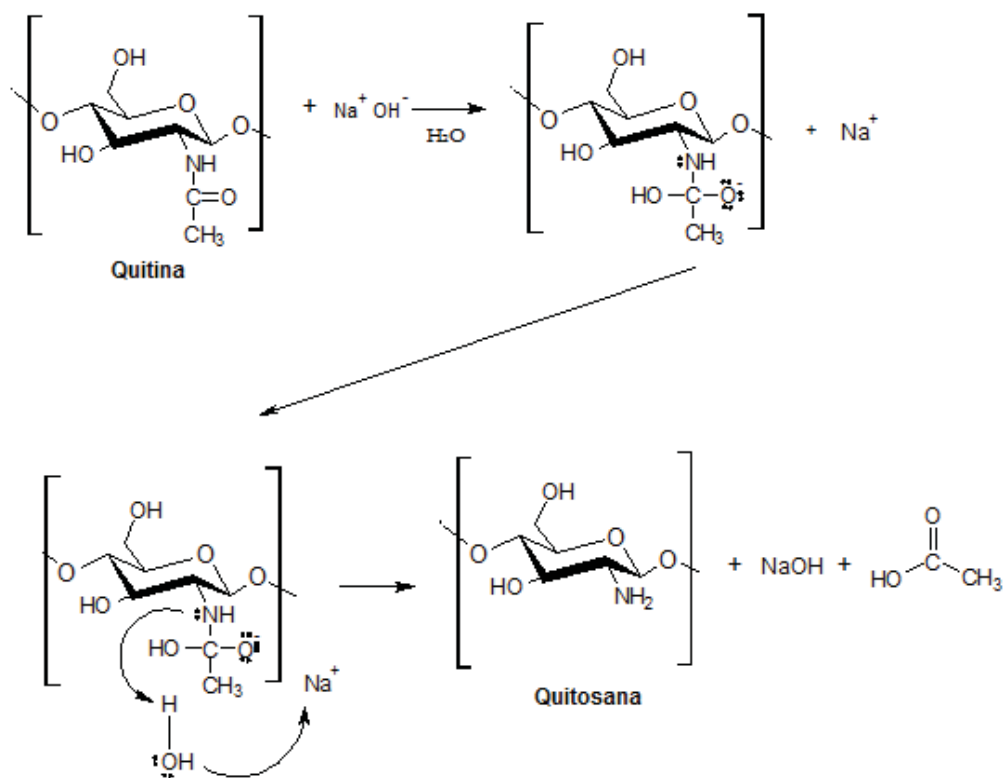


Figura 9 – Substituição Nucleofílica

3.2.2 – Síntese dos Derivados Contendo Fosforilcolina.

Na preparação dos derivados de quitosana contendo fosforilcolina e contendo poli(etileno glicol) foi utilizado o mesmo mecanismo de reação (Figura 10). A mesma foi realizada em solução aquosa de ácido acético e cianoborohidreto de sódio, sob agitação

constante e em temperatura ambiente por 20 horas. Transcorrido o tempo a solução resultante foi dialisada em membrana Spectrapore (MWCO 12 - 14 kDa) por 5 dias. Inicialmente, contra H₂O por 2 dias, em seguida contra solução de NaOH (0,05 M) por 1 dia e para finalizar contra H₂O por mais 2 dias. As amostras resultantes foram congeladas e liofilizadas. Os procedimentos seguidos para a síntese dos derivados de quitosanas com fosforilcolina foram realizadas anteriormente com sucesso por TIERA e colaboradores (2006). Os derivados foram caracterizados utilizando-se titulação potenciométrica e ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ¹H). A Figura 11 mostra um esquema da estrutura geral do derivado de quitosana com fosforilcolina que foi sintetizado.

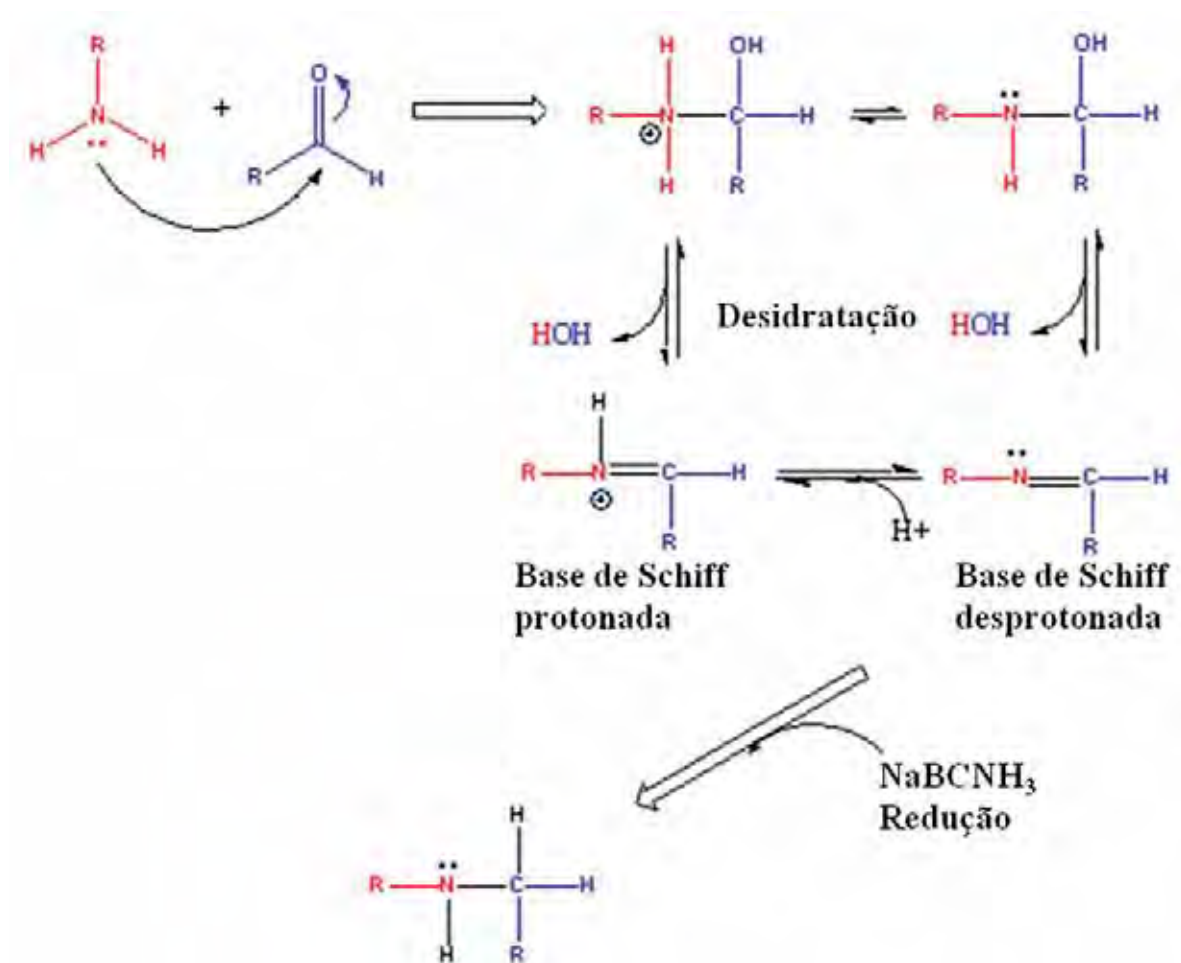


Figura 10 - Adição - eliminação nucleofílica: Formação da base de Schiff

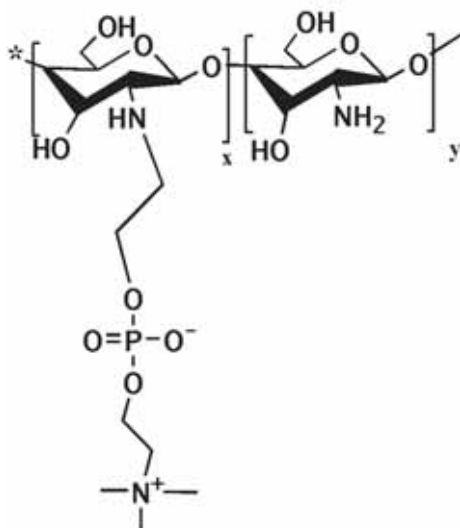


Figura 11 - Esquema estrutural do derivado de quitosana com fosforilcolina (CH-PC).

3.2.3 - Síntese dos Derivados Contendo Poli(etileno glicol).

3.2.3.1 - Preparação de Poli(etileno glicol-aldeído) PEG-COH.

Poli(etileno glicol) contendo a função aldeído numa das extremidades foi sintetizado pela oxidação de monometoxi de poli(etileno glicol com anidrido acético tendo como solvente dimetil sulfóxido (DMSO) utilizando-se o método reportado por SUGIMOTO e colaboradores (1998). 5 mL de anidrido acético foram adicionados a 32 ml de uma solução contendo 10g de MeO-PEG ($M_n = 2000$ g/mol) em dimetil sulfóxido com 6% de clorofórmio (v/v). A reação foi mantida sob agitação por 9 horas em atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente. A mistura reacional foi então precipitada com adição de 400 ml de éter etílico. O precipitado foi filtrado a vácuo em papel de filtro e novamente precipitado por duas vezes com uma mistura de clorofórmio com éter etílico (v/v). Após a secagem um pó branco foi obtido. O produto foi caracterizado por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H).

3.2.3.2 - Síntese e Caracterização de Quitosana-poli(etileno glicol)

Da mesma forma que na síntese dos derivados de quitosana contendo fosforilcolina foi seguido um protocolo previamente testado e publicado (TIERA *et al.*, 2006), na síntese dos

derivados de quitosanas contendo poli(etileno glicol) foi utilizado a metodologia descrita por HARRIS e colaboradores (1984). 1,0 g de quitosana (6,0 mM) foi dissolvida em 40 ml de uma solução a 2% de ácido acético e 20 ml de metanol. Em seguida, foi adicionado gota a gota 10 ml de uma solução aquosa de PEG-COH (PEG-aldeído) ($M_n = 2000$ g/mol). Essa mistura reacional ficou sob agitação por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Passado os 30 minutos o pH da mistura foi ajustado para 6,5 com NaOH (0,05 M) e resfriada a 0 °C. Após o resfriamento foi adicionado lentamente, 10 ml de uma solução aquosa previamente preparada de NaCNBH_3 (0.952 g, 15 mM). A mistura foi mantida por 18 horas sob agitação constante e temperatura ambiente.

A solução obtida foi dialisada em membrana Spectrapore (MWCO 12 kDa) contra NaOH (0.05 M) por um dia e depois contra água deionizada por três dias, trocando a água 3 vezes por dia, ou até o pH da solução exterior a membrana atingir o valor de 7,5. A mistura reacional contendo o híbrido (CH-PEG) foi então centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi recolhido e o polímero recuperado por meio de liofilização.

Para purificação, ou seja, para a remoção do PEG não ligado, realizou-se extração em sistema soxhlet durante dois dias, usando o clorofórmio como solvente. O polímero foi então seco sob vácuo por 24 horas a 40 °C e o derivado (CH-PEG) obtido foi um pó branco e para sua caracterização, como feito para os derivados de quitosana contendo fosforilcolina, foram aplicadas as técnicas de titulação potenciométrica e ressonância magnética de prótons (RMN ^1H). A Figura 12 contém um esquema da estrutura geral do derivado de poli(etileno glicol) que foi sintetizado.

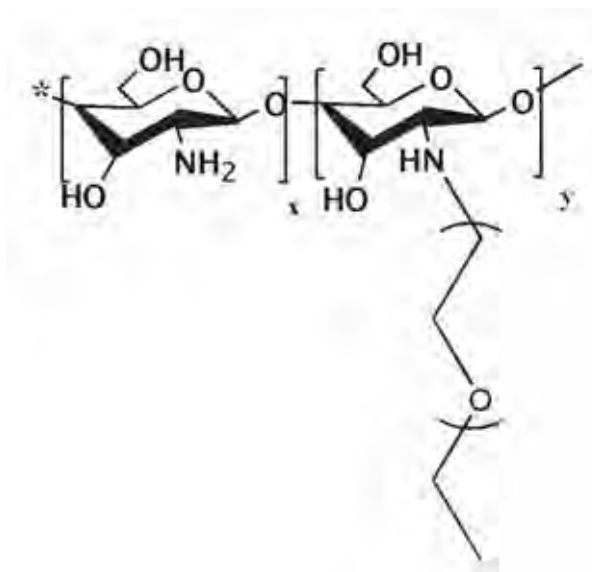


Figura 12 - Esquema estrutural do derivado de quitosana com poli(etileno glicol)

3.2.4 - marcação Fluorescente com Rodamina Isotiocianato

Os derivados de quitosana foram marcados com rodamina utilizando-se o derivado do corante contendo o grupo isotiocianato (Figura 13). 0,2 g de quitosana foram dispersos sob agitação em 25 ml de água Milli-Q, após a dispersão da quitosana foi acrescentado 25 μ l de ácido acético e deixado sob agitação até a solubilização da quitosana, em seguida o pH foi ajustado para 6,2 com NaOH (0,05 M) e a amostra foi mantida sobre atmosfera de N₂ por 30 minutos, posteriormente utilizando-se uma seringa foi adicionado (gota a gota) 12 mg de rodamina previamente solubilizada em 6 ml de metanol. A reação foi mantida sob atmosfera de N₂ e agitação constante por 18 horas em temperatura ambiente. A mistura reacional foi então dialisada em membrana Spectrapore (MWCO 12 kDa) por 8 dias, sendo 4 dias contra H₂O, 1 dia contra NaOH (0,05 M), e novamente contra H₂O por mais 3 dias. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz e a água trocada 3 vezes por dia. Com o término da diálise a mistura reacional foi congelada e em seguida liofilizada.

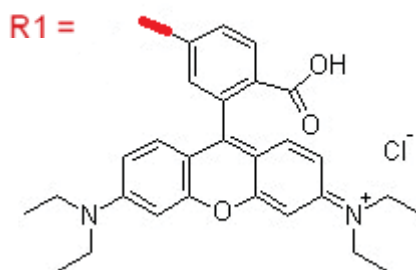
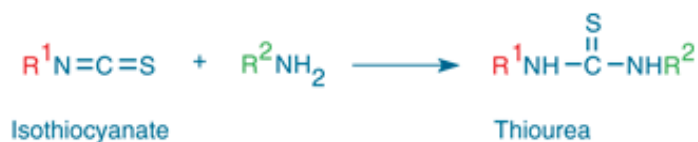


Figura 13 - Esquema representativo do mecanismo de reação para a marcação com rodamina isotiocianato

3.2.5 – Caracterização de Quitosana e Seus Derivados.

3.2.5.1 – Determinação do Grau de Desacetilação (GD) e de Substituição (GS) por Titulação Potenciométrica.

Existem na literatura várias metodologias usadas para a determinação do grau de desacetilação (GD) e de substituição (GS). Neste trabalho utilizou-se primeiramente titulação potenciométrica, por ser um método simples, de baixo custo, não destrutivo e por utilizar um pHmetro convencional. Os métodos descritos por Tolaimate e colaboradores (2000) e Muzzareli (1977) foram adaptados para determinar o GD das quitosanas comercial, desacetilada e o GS de todos os derivados obtidos. No preparo das soluções de quitosanas que seriam analisadas foram dissolvidos 40 mg de quitosana em 10 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M, sob agitação magnética constante em temperatura ambiente por 24h. Todos os experimentos de titulação potenciométrica foram realizados utilizando-se um pHmetro Digimed mod. DM31 para monitorar o pH.

3.2.5.2 – Determinação do Grau de Desacetilação e de Substituição por RMN 1H.

Como citado no tópico anterior, a primeira técnica utilizada para a determinação do grau de desacetilação e de substituição da quitosana comercial, desacetilada e seus derivados, respectivamente, foi titulação potenciométrica, por razões também já mencionadas. Com o intuito de comparar, avaliar e validar os resultados obtidos com a experiência anterior foi empregada uma segunda técnica, a ressonância magnética de prótons (RMN ^1H). Embora, possua custo elevado, RMN ^1H é uma das técnicas mais utilizadas na determinação do grau de desacetilação por ser segura e oferecer algumas vantagens, como por exemplo, a utilização de pequena quantidade de amostra em cada análise, permite ainda que a amostra seja analisada em estado líquido (RMN ^1H e ^{13}C) e/ou em estado sólido (RMN ^{13}C e ^{15}N).

As soluções foram previamente preparadas, e posteriormente transferidas para tubos de vidro apropriados de 5 mm de diâmetro. 20 mg de cada amostra foram solubilizadas em 1 ml de D_2O e 10 μl de DCl sob agitação magnética constante e temperatura ambiente. O espectrômetro utilizado foi um Bruker ARX-400, na frequência de prótons de 400 MHz com 32 acumulações por varreduras. Com o intuito de diminuir a interferência do sinal do solvente com os picos da amostra, o experimento foi conduzido em temperatura de 70 $^\circ\text{C}$ e os espectros foram calibrados a partir do sinal do hidrogênio (HOD) em 4,8 ppm.

3.2.5.3 - Determinação do Grau de Substituição por Rodamina.

A determinação do grau de substituição da rodamina ligada à quitosana foi realizada utilizando-se de rodamina isotiocianato como padrão. Uma solução estoque de rodamina-isotiocianato foi preparada pela solubilização de 3 mg da sonda em 10 ml do solvente, uma mistura (v/v) de metanol e tampão (ácido acético 0,3 M e acetato de sódio 0,2 M). Utilizando-se uma microseringa a solução estoque foi diluída para obtenção de soluções com concentrações variadas para obtenção da curva de calibração. O máximo de absorvância foi medido no comprimento de onda de 554 nm. Na seqüência 1,5 mg de cada quitosana marcada com a rodamina foi pesada e solubilizada em 3 ml da mistura

metanol/tampão e mantida sob agitação magnética por 2 horas, sempre na ausência de luz. Os resultados das absorvâncias medidas em 554 nm foram utilizados para o cálculo da concentração de rodamina em solução pela lei de Beer-Lambert para obtenção da massa de rodamina e posterior correlação com a massa da amostra. Todas as medidas foram feitas utilizando-se um espectrofotômetro Cary 100-Bio no intervalo de 200 a 600 nm em temperatura ambiente.

3.2.6 - Preparação de Nanopartículas pelo Método de Coacervação.

Na preparação das nanopartículas o DNA utilizado foi o de timo de bezerro (10 – 14 kpb, Sigma Aldrich), por existir no laboratório em quantidade suficiente para o desenvolvimento de todas as experiências necessárias e também por ser de baixo custo quando comparado aos plasmídeos. Soluções tampões de acetato e de fosfato foram preparados em diferentes pH (4,0 e 5,0) e (6,2 e 7,0), respectivamente. Durante os estudos também foi avaliado o efeito da força iônica do meio e os ajustes das forças iônicas foram realizados com NaCl para 10, 50, 100, 150, 200 e 300 mM. As soluções estoque de DNA foram preparadas utilizando-se 5 mg de DNA e 10 ml de tampão fosfato 10 mM e pH 7,0. A solubilização do DNA foi obtida após 36 horas sob agitação magnética suave e refrigeração de aproximadamente 4 °C. Após a solubilização do DNA as amostras foram congeladas em quantidades variando entre 0,5 a 2 ml.

A determinação do teor de grupos fosfato foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível Cary modelo 100Bio. Inicialmente colocou-se em duas cubetas de quartzo 2,5 ml de tampão fosfato, o mesmo usado para o preparo da solução estoque de DNA. Calibrou-se o aparelho e em seguida foi adicionado 50 µl da solução estoque de DNA sob agitação suave a uma das cubetas. Dessa solução foi obtido o espectro e sabendo-se que ε

= 6600 (l/mol.cm) em comprimento de onda 260 nm, estimou-se a concentração de DNA estoque.

As nanopartículas de CH-DNA foram preparadas em diferentes forças iônicas e razões N/P (razão N/P refere-se à razão de grupos amino por grupos fosfato em solução). Para o cálculo da razão N/P foi considerada a massa molecular média previamente determinada da quitosana e seus derivados. As soluções estoques da quitosana e seus derivados foram preparadas na concentração de 3,1 mM e diluídas quando necessário. A solubilização foi realizada em solução de ácido clorídrico 1 M. sob agitação magnética constante em temperatura ambiente, sendo o tempo de solubilização dependente da composição de cada amostra. Para facilitar à interpretação dos dados resultantes, na maioria das experiências a concentração do DNA foi fixada em 16 μ M de grupos fosfato.

3.2.7 - Estudos da Interação.

3.2.7.1 - Ensaio utilizando-se a Fluorescência de Brometo de Etídio.

Na preparação das amostras para as experiências que estudaram a interação das nano e micropartículas de CH-DNA usando a sonda fluorescente EtBr (Figura 14), foram utilizados tampões acetato e fosfato em pHs (4,0 e 5,0) e (6,2 e 7,0), respectivamente. A concentração 10 mM e força iônica 150 mM (NaCl) dos tampões mantiveram-se fixos durante todas as experiências. O protocolo de preparo das soluções seguiu a seguinte seqüência, primeiro adicionou a solução de DNA no tampão em pH apropriado, sob agitação, na seqüência adicionou-se o EtBr e a agitação manteve-se constante por mais 5 minutos, a amostra permaneceu em repouso por 24 horas, e logo após foram tituladas com quitosana e seus derivados utilizando-se microseringas para adições de 2 - 8 μ l e micropipetas para adições entre 10 e 200 μ l. Durante as adições mantinham-se agitação suave para facilitar a formação das nano e micropartículas; após 2 minutos de agitação, desligava-se o agitador magnético e a intensidade de fluorescência era medida. Todas as medidas foram obtidas utilizando-se um

fluorímetro Hitachi F4500. O comprimento de onda de excitação foi de 560 nm e a intensidade de fluorescência foi registrada em 605 nm. A concentração final (na cubeta) foi fixada em 16 μM de grupos fosfato e 4 μM de EtBr. Para a determinação da concentração de grupos amino foram considerados o grau de desacetilação previamente determinado e a composição dos derivados utilizando-se a equação 2.

$$\text{MM} = U_A \times (203,27) + U_D \times (161,22) + \text{GS} \times (370,41) \quad (2)$$

com U_A igual a porcentagem de unidades acetilada da quitosana e 203,27 a massa molar da unidade acetilada, U_D é a porcentagem de unidades desacetiladas e 161,22 a massa molar da unidade desacetilada, GS corresponde respectivamente ao grau de substituição por fosforilcolina (PC) ou poli(etileno glicol) e 370,41 é a massa molar da unidade substituída.

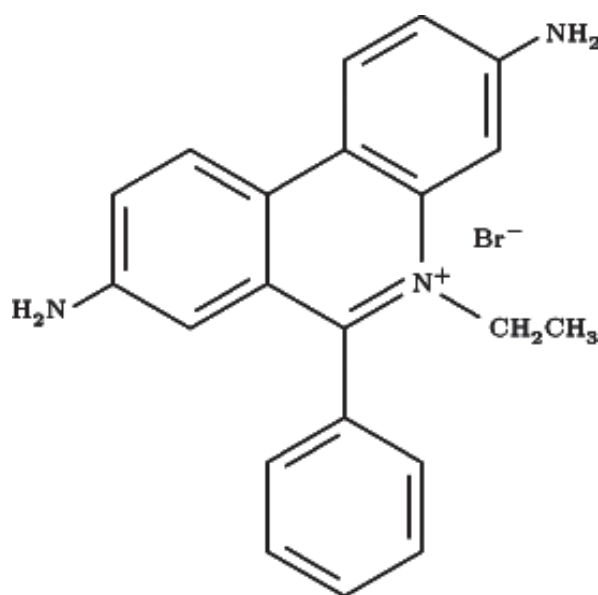


Figura 14 - Estrutura da molécula de Brometo de Etídio (EtBr)

3.2.7.2 - Eletroforese em Gel de Agarose.

O procedimento usado para preparar a solução estoque de DNA foi o mesmo citado no tópico 3.2.6. Já as soluções estoques da quitosana e seus derivados foram preparadas em

tampões acetato e fosfato com valores diferentes de pH (4,0, 6,2 e 7,0), respectivamente. A concentração das soluções estoque de quitosana e seus derivados foram fixadas em 3,1 mM. As nanopartículas foram obtidas pelo método de coacervação e mantidas sob agitação magnética constante por mais 10 minutos. O procedimento para realizar a eletroforese foi adaptado da metodologia descrita por Li e colaboradores (2003). Para a corrida utilizou-se uma cuba pequena e a concentração do gel foi mantida em 0,75% de agarose e com 14 cm de comprimento, 11,2 cm de largura e 0,7 cm de altura. Em cada corrida foram utilizados 150 ml de tampão TAE 1x (pH 8,0), por ser uma cuba pequena, esse volume era suficiente para cobrir o gel. Em cada poço do gel foram adicionados 10 µl da solução de CH-DNA juntamente com a solução de azul de bromofenol (5 µl). Todas as corridas foram realizadas em 80 V e o tempo de duração de 1h15min. Em seguida o gel foi transferido para um recipiente contendo uma solução aquosa de EtBr (1mg/ml) para ser corado, o recipiente foi colocado numa Incubadora mini (Shaker) MA832 Marconi na velocidade de rotação 12 rpm por 30 minutos. Posteriormente o gel foi exposto à luz ultravioleta (UV) para a visualização das bandas do DNA e em seguida fotografado.

3.2.8 - Análise e Caracterização das Partículas.

3.2.8.1 - Microscopia de Fluorescência.

A avaliação qualitativa do tamanho das nanopartículas formadas pela interação entre o DNA e a quitosana e seus derivados marcados com rodamina foi realizada utilizando-se um fotomicroscópio de fluorescência Olympus (Hamburg, Germany), equipado com filtros para detecção da fluorescência de rodamina. Estes experimentos foram feitos em colaboração com o Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia, IBILCE-UNESP. Todas as lâminas foram preparadas utilizando-se 15 µL de cada amostra, foram visualizadas e fotografadas em seguida.

3.2.8.2 - Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi utilizada com o intuito de analisar o tamanho das partículas e todas as medidas foram realizadas utilizando-se um aparelho Zetasizer 3000HS, da Malvern Instruments em colaboração com a Prof^a Dra. Maria Elisabete D. Zaniquelli do Laboratório Físico-Química de Superfícies (FFCLRP-USP). As nanopartículas de CH-DNA foram preparadas em diferentes razões de N/P (1, 3 e 5), em tampão acetato e fosfato 10 mM nos pHs 4,0 6,2 e 7,0, respectivamente, em força iônica fixa de 150 mM. Foram preparadas nanopartículas com a adição de alíquotas sob agitação magnética da solução estoque de quitosanas que inicialmente tinha uma concentração de 3,1 mM. A concentração final de cada amostra para a realização das medidas foi de 16 μ M de grupos fosfato, e para todas as amostras foram feitas duas medidas, ou seja, com duas acumulações. Para as medidas de potencial zeta foram utilizadas as mesmas soluções analisadas por DLS.

3.2.8.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

O tamanho e a morfologia das partículas obtidas em pHs 4,0 e 7,0, com força iônica de 150 mM, razão N/P = 5,0 e concentração de DNA de 16 μ M foram investigados em um microscópio eletrônico de varredura Leo 450vpi do centro de microscopia e microanálise do IBILCE-UNESP. As amostras foram previamente preparadas depositando-se 100 μ l da suspensão em uma lâmina de vidro, que estava fixada em uma fita adesiva de carbono que revestiam os “stubs” de alumínio. Para secar, cada amostra ficou em repouso por 12h em temperatura ambiente e em seguida foram recobertas com uma camada de ouro com 20 nm de espessura durante 7 minutos. A tensão e a corrente do feixe utilizados foram de 15 kV e 2,85 pA, respectivamente (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 2001; LU *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2007; GOMES, *et al.*, 2006; CASÉ *et al.*, 2009).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 - Caracterização.

4.1.1 – Quitosana Desacetilada e Acetilada.

A quitosana utilizada na preparação dos derivados foi previamente desacetilada e caracterizada. O grau de desacetilação (GD) das amostras de quitosanas acetilada 57 kDa (comercial, CH57_{Ac}) e da quitosana desacetilada (CH57_D) foram determinados por ressonância magnética nuclear de prótons a 70 °C e titulação potenciométrica (Tabela 2). As Figuras 15i e 15ii mostram respectivamente o espectro de RMN e o gráfico da titulação potenciométrica para a amostra da quitosana comercial. Nas Figuras 8i e 8ii são apresentados, respectivamente o espectro e o gráfico obtido para a amostra da quitosana desacetilada.

O espectro de RMN da Figura 15, mostra sinais localizados em 4,5 e 4,3 ppm que correspondem aos átomos de hidrogênio ligados ao “carbono anomérico” (C₁), os localizados na região de 3,4 a 4,0 ppm correspondem aos hidrogênios ligados aos átomos de carbono 3, 4, 5 e 6 da unidade glucopirranose, e o sinal centrado em 3,1 ppm corresponde ao átomo de hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel e o centrado em 2.1 ppm corresponde aos átomos de hidrogênio pertencentes aos grupos acetamido. Para o cálculo do grau de desacetilação utilizou-se a razão entre as integrais dos picos (2.1 ppm) atribuídos aos prótons metílicos do grupo acetamida e em (3.18 ppm) referente ao próton ligado ao carbono 2 do anel glicopiranosídico conforme mostra a equação 3,

$$GD = 100 - GA$$

uma vez que,

$$GA = [(I_{Me}/3)/(I_{H2})] \times 100 \quad (3)$$

onde, I_{Met} é atribuídos aos prótons metílicos do grupo acetamida e I_{H2} refere-se ao próton ligado ao carbono 2 do anel glicopiranosídico.

Os gráficos das Figuras 16i e 16ii mostram respectivamente o RMN e o gráfico da primeira derivada da titulação potenciométrica da quitosana de partida. Após o período de solubilização da quitosana em solução aquosa de HCl, as soluções foram tituladas com alíquotas de 100 μ l de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M. Para melhor compreensão, o processo de titulação pode ser analisado em 2 etapas. Na primeira a titulação leva à neutralização dos íons hidrogênio em excesso, no ponto em que ocorre a neutralização verifica-se o aumento brusco do pH (primeiro pico). Na segunda etapa inicia-se a neutralização dos prótons dos grupos amina da quitosana, e ao atingir a neutralização outro aumento brusco do pH (segundo pico) é observado. As duas titulações são similares e a principal diferença encontra-se no volume de NaOH necessário para desprotonação dos grupos amino. Para a quitosana desacetilada esse volume foi de 2,54 mL (Figura 15ii) enquanto que o volume para a quitosana de partida foi de 1,86 mL, denotando o aumento do grau de desacetilação.

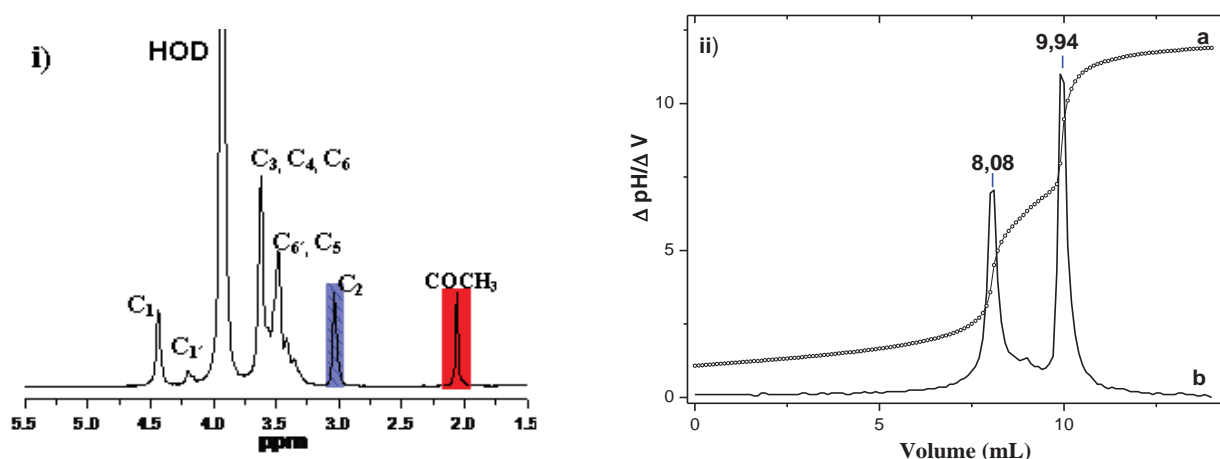


Figura 15 - i) Espectro de RMN de quitosana acetilada (GD = 77,35%) e ii) Titulação potenciométrica; a) pH em função do volume de [NaOH] e b) derivada primeira da curva de pH em função do volume de [NaOH] (GD = 79,5%)

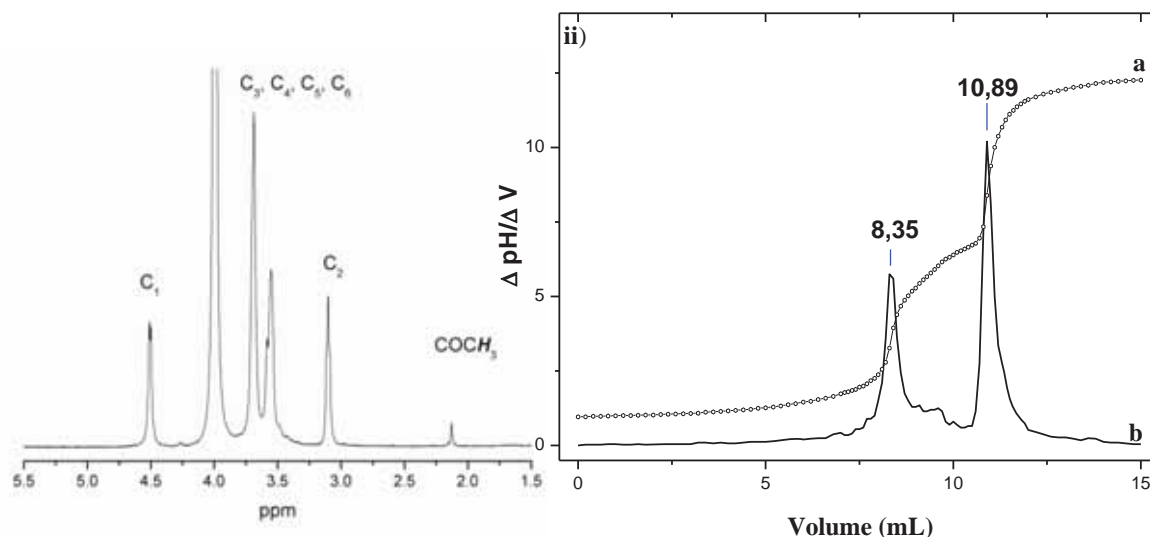


Figura 16 - i) Espectro de RMN de quitosana desacetilada (GD = 98,1%) e ii) Titulação potenciométrica; a) pH em função do volume de NaOH e b) derivada primeira da curva de pH em função do volume de [NaOH] (GD = 97,4%)

Tabela 2 - Valores do grau de desacetilação (GD) da quitosana comercial e desacetilada

Amostra	GD ^a	GD ^b	Mw*	Mn*	Mw/Mn*
CH57 _{Ac}	77,35%	79,5%			
CH57 _D	98,1%	97,4%	5,7 x 10 ⁴	4,4 x 10 ⁴	1,29

* Dados da referência (Tiera *et al.*, 2006) ^aRMN ^bTitulação potenciométrica

De acordo com os resultados obtidos a reação de desacetilação da quitosana comercial gerou um derivado com alto grau de desacetilação, sem que houvesse grandes degradações das quitosanas e aumentando em 12,4% o GD. Os valores obtidos revelam que a técnica de titulação potenciométrica também pode ser aplicada para a determinação do GD, visto que os resultados obtidos são próximos aos de RMN.

4.1.2 – Derivados de Quitosana-poli(etileno glicol).

O PEG-aldeído foi utilizado como intermediário para a preparação das quitosanas modificadas com poli(etileno glicol) (CH-PEG). O espectro de RMN do PEG é mostrado na Figura 17, e os picos característicos de PEG podem ser observados em 3.25 e 3.6 ppm, que correspondem respectivamente ao CH₃ terminal da cadeia de PEG e aos prótons metilênicos

da cadeia principal ((O-CH₂-CH₂)_n). O triplete observado em 5.1 ppm é o pico característico do grupo aldeído hidrolisado (CH(OH)₂) que confirma a presença do grupo aldeído na extremidade oposta (MIYAZAWA; WINNIK, 2002).

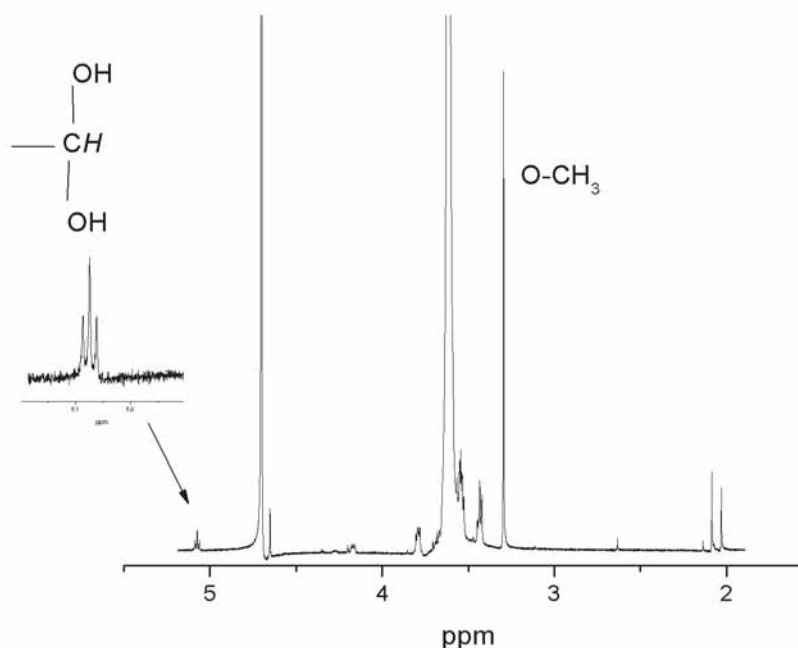


Figura 17 - Espectro de RMN do PEG-aldeído (Mw = 2000 g/mol). Solvente: CDCl₃

Nos derivados de quitosana que contém PEG o RMN foi realizado na temperatura de 70 °C e os picos característicos dos prótons do PEG foram observados em 4,25 ppm para o grupo metil (O-CH₃), e em 4,6 ppm para os grupos metileno da cadeia de PEG (O-CH₂CH₂) (Figura 18). Utilizando-se a equação 4 que compara a integração do sinal do grupo metoxi com a integração correspondente ao próton ligado ao carbono C₁ da cadeia de quitosana estimou-se a porcentagem de PEG ligado.

$$\% \text{PEG} = (I_{\text{OCH}_3}/3)/(I_{\text{H}_1}) \times 100 \quad (4)$$

As evidências da incorporação das cadeias de PEG à quitosana podem ser também comprovadas para os derivados menos substituídos (3 e 5%) , confirmadas pelo aparecimento de novos picos, intensos, em 4,25 ppm, correspondente aos prótons metilênicos da cadeia de

PEG. Na Figura 18 o desdobramento do pico do hidrogênio anomérico, aparece para o derivado mais substituído e (9%) que é indicado como C₁ e C_{1S} que se referem respectivamente as unidades não substituídas e substituídas da cadeia de quitosana.

Para a determinação do grau de desacetilação das quitosanas acetiladas e desacetiladas foram empregadas duas técnicas, ressonância magnética nuclear de prótons e titulação potenciométrica. O mesmo foi feito na determinação do grau de substituição (Tabela 3). Portanto foram sintetizadas três amostras com graus diferentes de PEG. Outras reações com o intuito de aumentar o DS de PEG foram realizadas (resultados não mostrados). Contudo, os resultados da caracterização revelaram valores próximos dos obtidos anteriormente.

Tabela 3 – Resultados do Grau de Substituição dos derivados de quitosana contendo PEG

Amostra	DS^a	DS^b
CH-PEG ₃	2,5	3,4
CH-PEG ₅	4,0	7,0
CH-PEG ₉	9,5	9,0

^aGrau de substituição determinado por RMN.

^bGrau de substituição determinado por potenciometria.

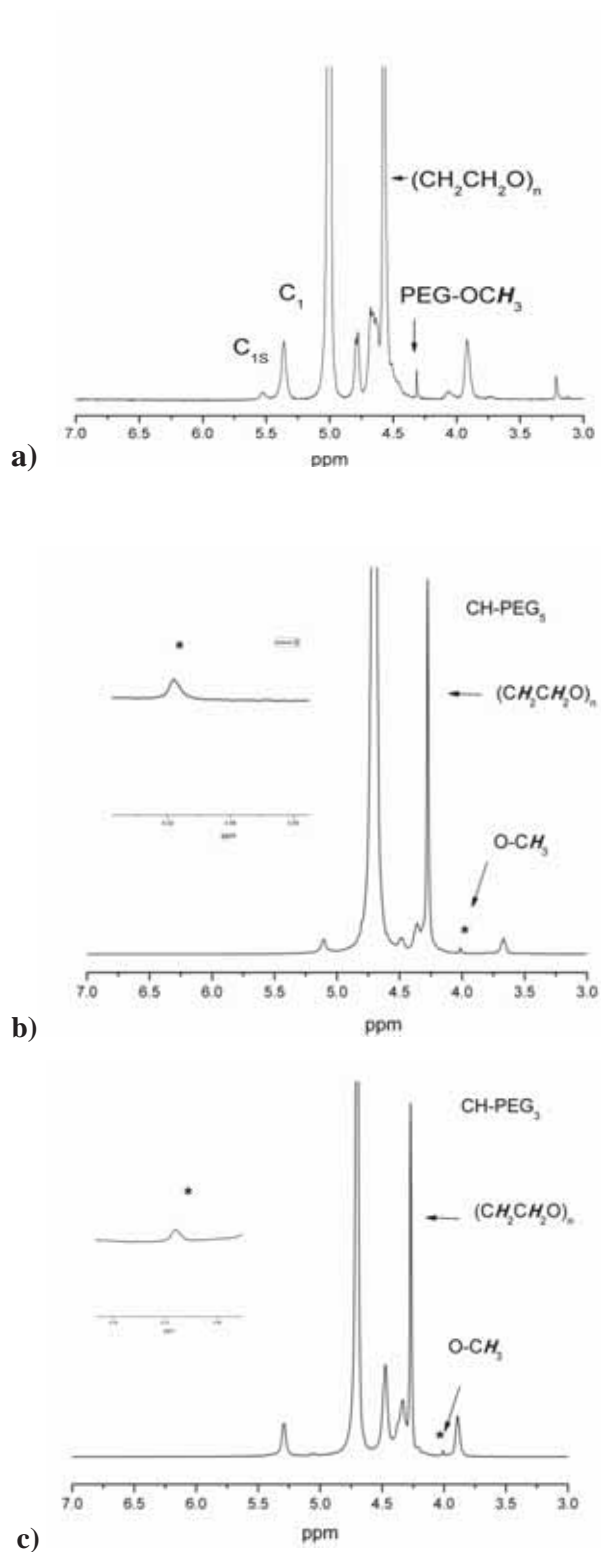


Figura 18 - Espectros de RMN ^1H dos derivados de quitosana sintetizados com PEG a) CH-PEG₉, b) CH-PEG₅ e c) CH-PEG₃

4.1.3 – Derivados de Quitosana-Fosforilcolina.

Outro grupo utilizado foi a fosforilcolina (PC), para ligá-la à cadeia da quitosana utilizou-se o fosforilgliceraldeído, intermediário obtido a partir da glicero-3-fosforilcolina, por meio da oxidação com periodato de sódio (Stults *et al.*, 1987). Tanto o PEG-aldeído quanto a fosforilcolina foram ligados à quitosana por meio da mesma reação de aminação redutiva com borocianohidreto de sódio (NaCNBH_3). Utilizando-se esses dois intermediários foram sintetizadas amostras com grau de substituição crescente do grupo fosforilcolina (DS). O DS das quitosanas substituídas com fosforilcolina foi calculado por meio da equação 5 que utiliza o desdobramento do pico anomérico calculando-se a área dos dois picos.

$$DS = \frac{C_{H_{1s}}}{C_{H_1} + C_{H_{1s}}} \quad (5)$$

onde DS é o grau de substituição, $C_{H_{1s}}$ corresponde a área do pico referente ao hidrogênio das unidades substituídas e C_{H_1} a área do pico referente aos hidrogênios das unidades glucosamina não substituídas.

Na Tabela 4 são apresentadas informações sobre o DS das cinco amostras obtidas de derivados de PC.

Tabela 4 - Propriedades das quitosanas desacetiladas e seus derivados com PC

Polímero	DS ^a (Grau de substituição)	Mw (g mol ⁻¹)	Mw/Mn	Rodamina (% em mols de glucosamina)
CH 5 kDa	-	5,38 x10 ³	1,14	1,25
CH 10 kDa	-	9,29 x10 ³	1,07	1,05
CH 57 kDa	-	5,67x10 ⁴	1,29	0,93
CH 150 kDa	-	1,475 x10 ⁵	1,69	1,10
*CH-PC ₁₀	11 ± 1	5,14x10 ⁴	1,32	0,19
CH-PC ₂₀	28 ± 1 (24,9) ^b	6,21x10 ⁴	1,65	-
CH-PC ₄₀	40 ± 2	6,00x10 ⁴	2,17	0,20
*CH-PC ₅₀	53 ± 1	3,98x10 ⁴	1,62	-
CH-PC ₈₀	79,0 (83,0) ^b	-	-	-

^aRMN ^bTitulação potenciométrica *Amostras previamente obtidas por Tiera *et al.*, 2006.
(Apêndice A, resultados da caracterização por GPC)

Nos espectros de RMN obtidos dos derivados de quitosana contendo os grupos fosforilcolina verificou-se o aparecimento dos picos correspondentes a fosforilcolina (Figura 19) (TIERA *et al.*, 2006). Como foi verificado para o derivado de CH-PEG₉, nos derivados de PC também ocorre o desdobramento do pico do hidrogênio anomérico, que são indicados como H₁ e H_{1S} que se referem respectivamente as unidades não substituídas e substituídas da cadeia de quitosana.

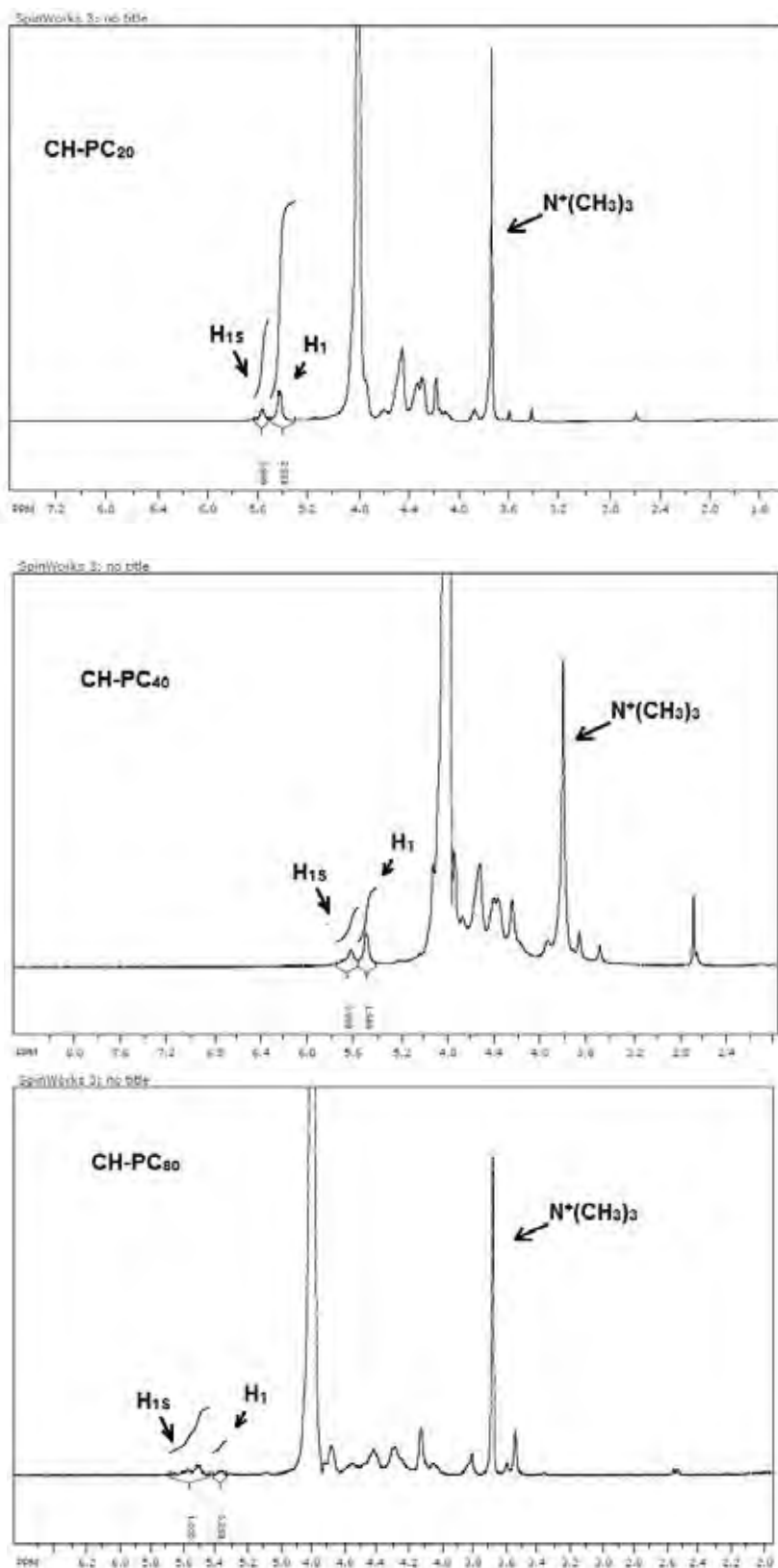


Figura 19 - Espectros de RMN ^1H dos derivados de quitosana substituídos com grupos fosforilcolina de cima para baixo, CH-PC₂₀, CH-PC₄₀, CH-PC₈₀

4.1.4 - Marcação Fluorescente com Rodamina.

O gráfico apresentado na Figura 20 foi utilizado para determinar o coeficiente de absorvidade molar. O valor resultante foi de $8,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este resultado é muito próximo daquele obtido recentemente por MA e colaboradores (2008) de $8,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para evitar agregação do corante em meio aquoso utilizou-se uma mistura tampão/metanol na construção da curva de calibração. Por outro lado o tampão ácido acético/acetato de sódio permite a solubilização da quitosana e impede possíveis agregações e mudanças no espectro de absorção da rodamina.

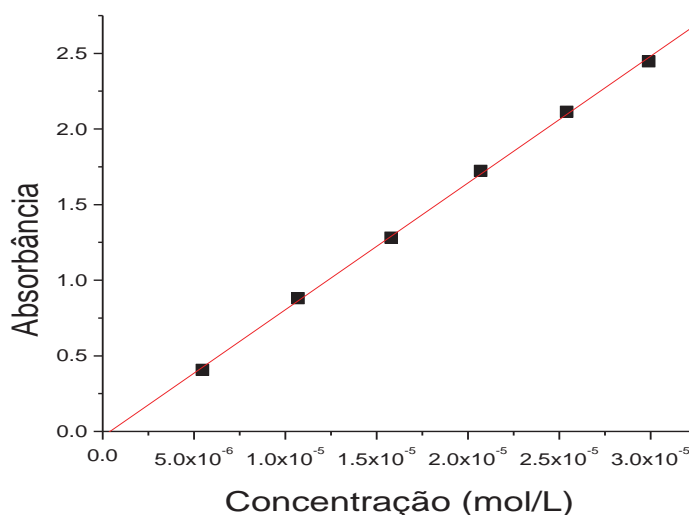


Figura 20 - Determinação do coeficiente de absorvidade molar da rodamina-isotiocianato

A porcentagem de rodamina nas quitosanas (%R) foi determinada calculando-se a concentração de rodamina indicada pela absorbância de cada quitosana. Os dados utilizados e as porcentagens obtidas são descritos na Tabela 5. Para o cálculo da porcentagem de rodamina ligada em cada amostra de quitosana e seus derivados foi utilizada a equação:

$$\%R = ((\eta_r) / (\eta_q)) \times 100 \quad (6)$$

onde, η_r indica o número de mols de rodamina ligada à quitosana e η_q o número de mol total de quitosana.

Os valores de %R obtidos variaram entre 0,2 e 1,1% de rodamina ligada e são similares aos reportados na literatura (MA *et al.*, 2008), obtidos com diferentes procedimentos de síntese e purificação.

Tabela 5 – Resultados da marcação fluorescente e porcentagem de rodamina de quitosana e seus derivados

<i>Amostra</i>	<i>Massas (mg)</i>	<i>Absorbâncias</i>	<i>%Rodamina</i>
CH57 _D	1,25	2,527	0,93
CH-PC ₁₀	1,00	0,438	0,19
CH-PC ₄₀	1,00	0,350	0,2
CH-PEG ₅	1,5	1,92	1,38
CH-PEG ₉	1,00	1,126	0,92
CH150 _D	0,63	1,485	1,1
CH10 _D	2,36	1,670	1,05
CH5 _D	1,11	1,270	1,25

4.2 - Avaliação Comparativa da Interação de DNA com Quitosana e seus Derivados.

4.2.1 - Ensaio Utilizando-se a Fluorescência de Brometo de Etídio.

A comparação da interação de quatro derivados foi investigada procurando-se avaliar o efeito de PEG e PC sobre a força da interação, bem como, sobre a estabilidade coloidal das nanopartículas formadas. Os derivados comparados são mostrados nas Tabelas 4 e 5, CH57_D, CH-PEG₅, CH-PEG₉, CH-PC₁₀ e CH-PC₄₀. Tanto o grupo PC, quanto o PEG são unidades hidrofílicas e podem fornecer uma maior estabilidade coloidal às nanopartículas formadas. O

estudo comparativo utilizando-se o ensaio com EtBr é apresentado nas Figuras 21a e b nos valores de pH 4,0 e 6,2, à força iônica de 150 mM. A intensidade de fluorescência de EtBr decai rapidamente com o aumento da concentração de quitosana o que claramente indica a ligação polycation-DNA. Em pH 4,0 a eficiência do deslocamento de EtBr é praticamente a mesma para todos os derivados com exceção de CH-PC₄₀, sendo que o deslocamento é mais eficiente para quitosana desacetilada CH57_D. A fluorescência atinge um patamar para razão N/P próximo de 1,0, o que pode ser interpretado como uma indicação de que a interação é predominantemente eletrostática. Nessa série a menor interação de CH-PC₄₀ com DNA pode ser atribuído a um impedimento estérico das cadeias de PC que impedem em certa medida a aproximação das cadeias do possicarídeo com DNA, o que se traduz por um menor deslocamento do EtBr. Em pH 4,0 a ligação de cadeias de PEG afeta muito pouco a interação.

Para pH 6,2 o resultado inesperado é a interação mais forte dos derivados contendo PEG com DNA, que deslocam com maior eficiência o EtBr, cuja fluorescência alcança patamares de aproximadamente 20%, equivalentes àqueles obtidos em pH 4,0 para a CH57_D e os demais derivados. Por outro lado em pH 6,2 CH57_D interage muito fracamente com DNA e para maior razão N/P, o decréscimo na fluorescência de EtBr atingiu um mínimo de 60%. Estes resultados podem ser interpretados como uma indicação clara que a agregação da quitosana deve competir na interação com DNA. Por outro lado os grupos hidrofílicos de PEG e PC além de diminuir a agregação podem indiretamente favorecer a interação com DNA, aumentando a disponibilidade dos grupos carregados.

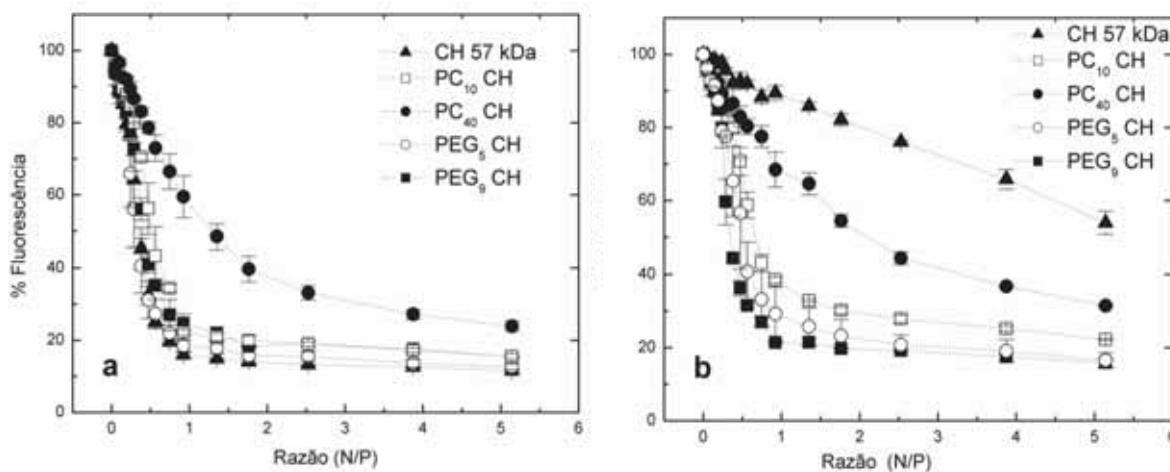


Figura 21 - Titulação do complexo DNA-EtBr por quitosanas desacetilada e modificadas

O mesmo ensaio em pH 7,0 mostra que a interação para dos derivados é mais fraca, pois como discutido anteriormente nesse pH o grau de protonação dos grupos substituídos e não substituídos da quitosana é muito baixo. As interações desses grupos com o DNA enfraquecem, refletindo na diminuição da intensidade de fluorescência para todos os derivados e em especial para a quitosana desacetilada. Esse resultado é mostrado na Figura 22a na qual são apresentados os resultados da interação de DNA com os derivados contendo o grupo fosforilcolina. Em pH 7,0 a ionização de quitosana desacetilada é desprezível e ela se torna insolúvel nesse pH, para os derivados fosforilcolina o que apresentou melhor interação foi CH-PC₂₀ que atinge um mínimo de fluorescência de 40% para razão N/P 6,0. Para os derivados com maior proporção de grupos PC ocorre um decréscimo na força de interação, o qual se deve provavelmente ao crescente número de grupos PC sobre a cadeia, os quais podem impedir a aproximação das duas cadeias e, portanto o deslocamento do EtBr para o meio aquoso. O efeito da massa molecular sobre a interação é exibido na Figura 22b, na qual são comparadas as interações das quatro quitosanas (5, 10, 57 e 150 kDa) com DNA. Nota-se claramente que a força de interação diminui com o decréscimo da massa molar e que maiores razões N/P são necessárias para que as quitosanas de menor Mw alcancem o mesmo nível de deslocamento de EtBr.

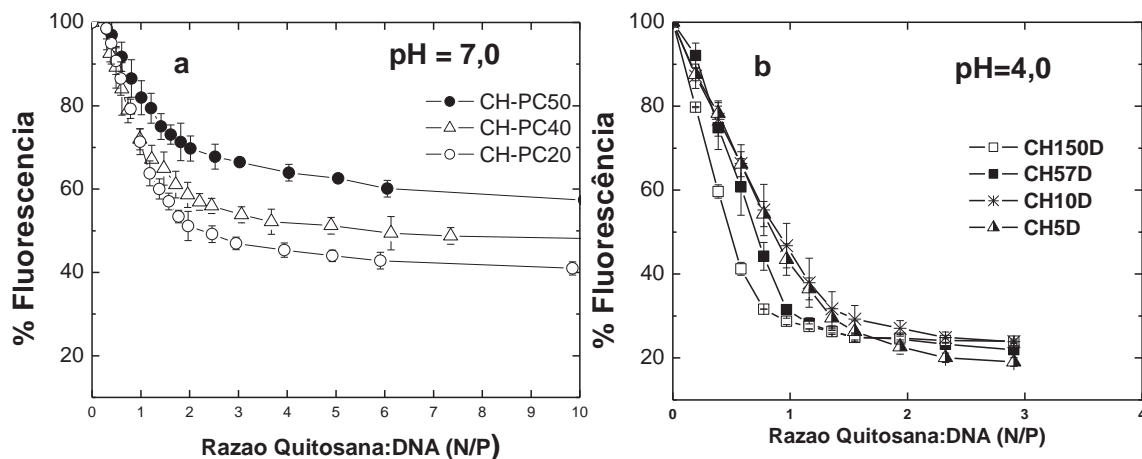


Figura 22 - Titulaçqo do complexo DNA-EtBr por quitosanas modificadas com a) PC em pH 7,0 e b) desacetiladas em pH 4,0 em temperatura ambiente

4.2.2 - Estudo Comparativo da Estabilidade das Nanopartículas por meio da Eletroforese em Gel de Agarose.

Os estudos de eletroforese para as nanopartículas sintetizadas com os derivados de quitosanas contendo PEG e PC são apresentados de forma comparativa nas Figuras 23-26. A síntese das partículas foi realizada em pH 4,0 e 6,2. O tampão utilizado nas corridas da eletroforese foi o tampão TAE em pH 8,0, e este experimento pode ser utilizado como um teste comparativo da estabilidade dos complexos formados entre o DNA, a quitosana e seus derivados. Em pH 4,0 todos os grupos amino da quitosana desacetilada encontram-se protonados e as nanopartículas CH57_D-DNA após a preparação não liberaram nenhum DNA na eletroforese para razões N/P maiores que 1,0. Uma indicação da alta estabilidade desse complexo após a formação. A Figura 23 mostra de forma comparativa o efeito da massa molecular na estabilidade das nanopartículas preparadas com as quitosanas desacetiladas. Independentemente da massa molecular da quitosana, em pH 4,0 nenhum DNA é liberado para razões N/P maiores que 1,0, o que se deve ao alto grau de ionização das quitosanas.

Os derivados com PEG e PC, de forma semelhante à quitosana desacetilada, em pH 4,0 (Figura 24) liberaram DNA até a razão N/P 1,0.

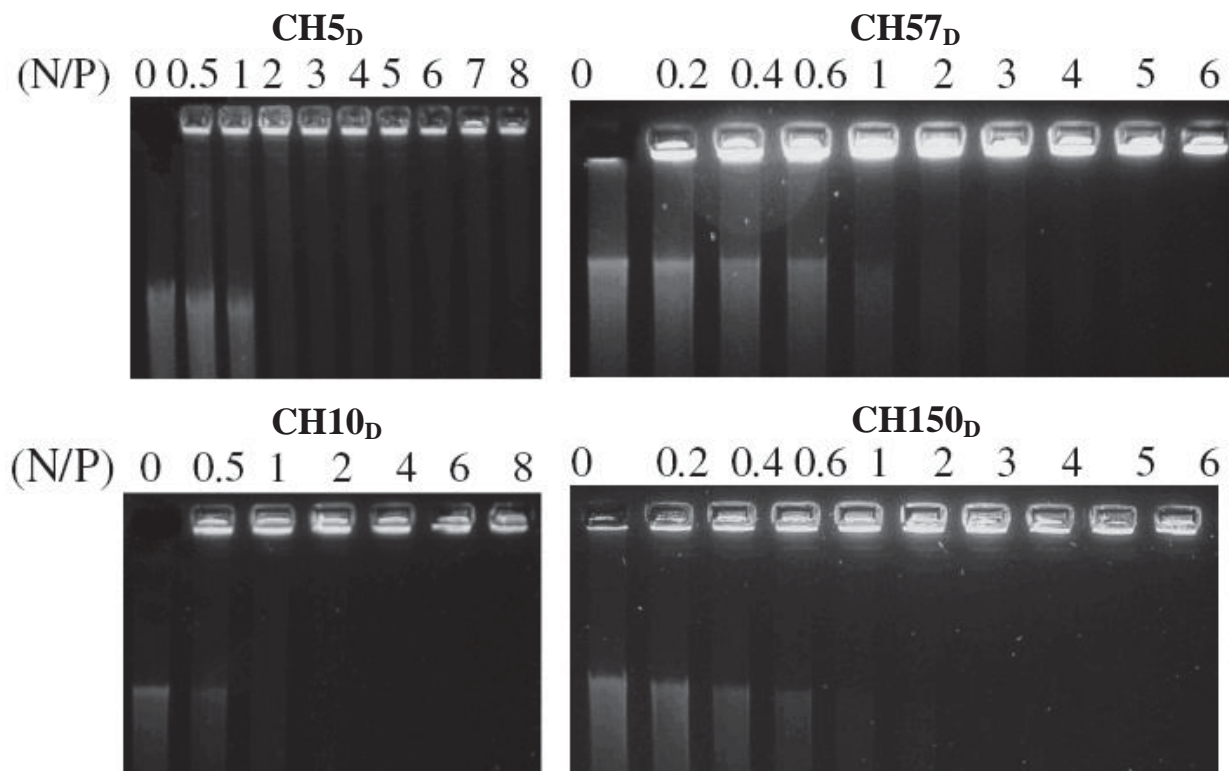


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose das nanopartículas preparadas pela interação de DNA com as quitosanas desacetiladas: CH5_D, CH10_D, CH57_D e CH150_D em pH 4,0 para razões N/P crescentes

O aumento do pH para 6,20 (Figura 25) mostra que a quitosana desacetilada libera uma fração muito pequena de DNA para $N/P = 2$, uma vez que sua densidade de carga neste pH é menor. Nesse pH o grau de ionização é de 0,53 e mais uma vez, admitindo-se uma interação predominantemente eletrostática, a razão $N/P = 2$ seria necessária para contrabalancear as cargas dos grupos fosfato. Tanto os derivados contendo PEG quanto os contendo PC exibem o mesmo comportamento observado para a quitosana desacetilada. O aumento do pH requer maiores razões N/P para evitar que o DNA seja liberado na eletroforese. E para os derivados contendo PEG em pH 4,0 observa-se que quanto maior o grau de substituição de PEG, maior a razão N/P necessária para impedir a liberação de DNA. A estabilidade decresce no sentido CH57_D-DNA > CH-PEG₃-DNA > CH-PEG₅-DNA > CH-PEG₉-DNA, sendo que para o complexo formado com o último deles a razão N/P 4,0 foi necessária para evitar a liberação de DNA (vide Figuras 25 e 26). Foi observado também que

o aumento do pH para 6,2 não produziu grandes diferenças nas eletroferogramas dos derivados, entretanto razões N/P maiores ou iguais a 3-4 foram necessárias para evitar a dissociação do complexo.

O mesmo comportamento foi observado para os complexos sintetizados com os derivados contendo PC. Em pH 4,0 os complexos preparados com derivados, CH-PC₁₁-DNA e CH-PC₄₀-DNA liberaram parcialmente o DNA em razão N/P 1,0. Entretanto em pH 6,2 a comparação entre as duas séries de derivados mostra claramente que para a complexo CH-PC₄₀-DNA razões N/P maiores ou iguais a 5-6 são necessárias para evitar a dissociação do complexo (Figura 26). Os resultados da eletroforese em geral estão em concordância com aqueles obtidos utilizando-se o ensaio de fluorescência com o EtBr, sugerindo uma eficiência ligeiramente maior para a interação com os derivados substituídos com PEG, sobretudo quando comparados com os resultados obtidos com o derivado CH-PC₄₀-DNA (Figura 22a e b). A introdução dos grupos hidrofílicos na cadeia de quitosana pode dificultar a aproximação das cadeias de DNA com os derivados impedindo interações de importância secundária como as ligações de hidrogênio que contribuem para a estabilidade do complexo (PREVETTE *et al.*, 2007).

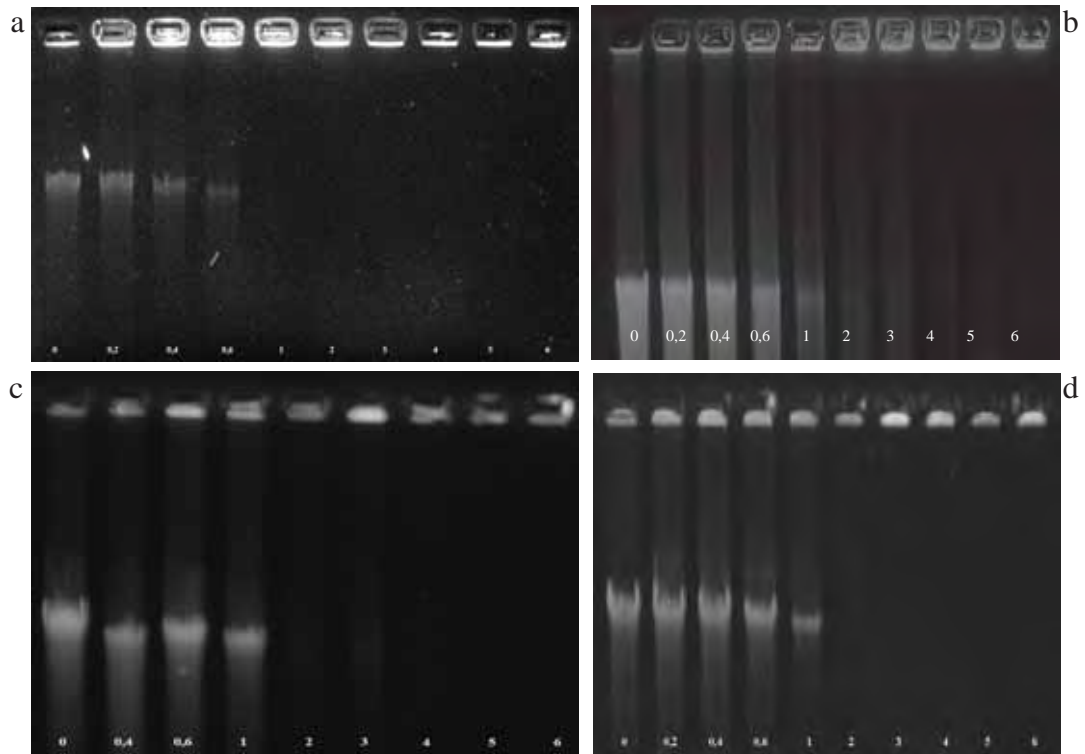


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose das nanopartículas a) CH57_D-DNA; b) CH-PEG₃-DNA; c) CH-PEG₅-DNA e d) CH-PEG₉-DNA, nas razões N/P = 0 (DNA), 0,2; 0,4; 0,6; 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente da esquerda para a direita em pH 4,0

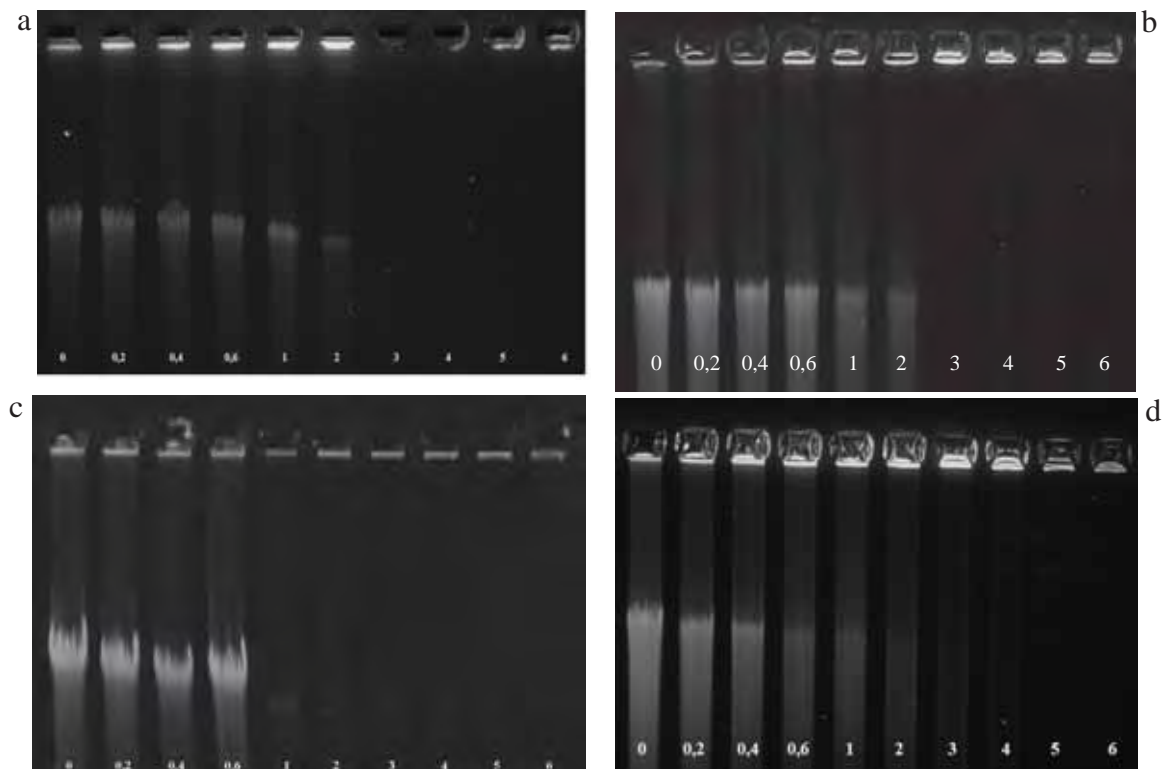


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose das nanopartículas a) CH57_D-DNA; b) CH-PEG₃-DNA; c) CH-PEG₅-DNA e d) CH-PEG₉-DNA, nas mesmas razões N/P e na mesma ordem que as Figuras anteriores, mudando somente o pH para 6,2

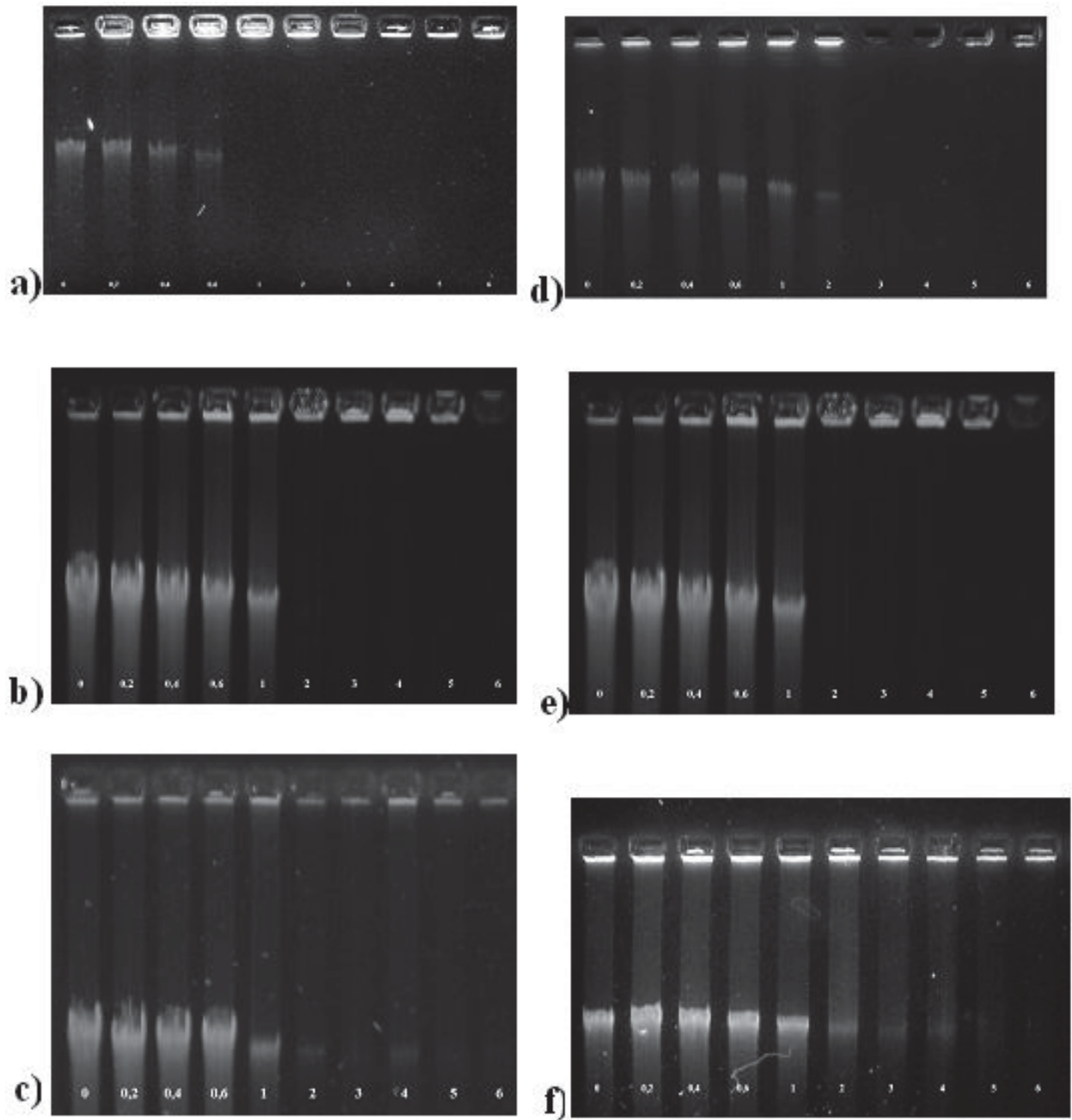


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose das nanopartículas em pH 4,0 a) CH57_D-DNA b) CH-PC₁₀-DNA c) CH-PC₄₀-DNA e pH 6,2 d) CH57_D-DNA; e) CH-PC₁₀-DNA e f) CH-PC₄₀-DNA nas razões

4.2.3 - Determinação do Tamanho das Nanopartículas por Espalhamento de Luz Dinâmico.

O tamanho foi determinado por espalhamento de luz dinâmico em diferentes valores de pH (4,0, 6,2 e 7,0) e força iônica variando de 10 à 300 mM (Tabelas 6-12) para as nanopartículas preparadas com quitosana desacetilada e os derivados contendo PC e PEG.

Tabela 6 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 4,0 e razão N/P = 1

Nanopartículas	Dh ₁ (nm)	Dh ₂ (nm)
CH57 _D	202±0(99)	37±3(1)
CH-PEG ₃	150±3(100)	-
CH-PEG ₅	197±34(95)	53±8(5)
CH-PEG ₉	207±15(99)	46±6(1)
CH-PC ₁₀	145±6(100)	-
CH-PC ₄₀	146±12(93)	1001±3(7)

Tabela 7 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 4,0 e razão N/P = 3

Nanopartículas	Dh ₁ (nm)	Dh ₂ (nm)
CH57 _D	152±1(63)	32±3(37)
CH-PEG ₃	127±16(100)	-
CH-PEG ₅	192±10(95)	76±6(5)
CH-PEG ₉	205±0(83)	1885±3(17)
CH-PC ₁₀	148±2(99)	53±5(1)
CH-PC ₄₀	181±1(100)	-

Tabela 8 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 4,0 e razão N/P = 5

Nanopartículas	Dh ₁ (nm)	Dh ₂ (nm)
CH57 _D	160±8(99)	29±0(1)
CH-PEG ₃	144±8(82)	67±(18)
CH-PEG ₅	201±50(93)	88±(6)
CH-PEG ₉	206±26(97)	73±(3)
CH-PC ₁₀	156±10(100)	-
CH-PC ₄₀	136±0,1(96)	40±10(4)

Tabela 9 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 6,2 e razão N/P = 1

Nanopartículas	Dh ₁ (nm)	Dh ₂ (nm)
CH57 _D	-	-
CH-PEG ₃	298±15(43)	1311±33(58)
CH-PEG ₅	248±4(16)	1451±5(84)
CH-PEG ₉	199±15(15)	1630±20(85)
CH-PC ₁₀	8468±48(30)	90886±78(70)
CH-PC ₄₀	276±34(100)	-

Tabela 10 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 6,2 e razão N/P = 3

Nanopartículas	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
CH57 _D	1914±10(50)	2192±9(50)
CH-PEG ₃	217±2(100)	-
CH-PEG ₅	259±16(100)	-
CH-PEG ₉	273±5(100)	-
CH-PC ₁₀	279±12(39)	1393±143(61)
CH-PC ₄₀	294±14(35)	1435±11(65)

Tabela 11 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 6,2 e razão N/P = 5

Nanopartículas	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
CH57 _D	239±9(32)	1284±45(68)
CH-PEG ₃	243±9(100)	-
CH-PEG ₅	254±7(87)	2997±6(13)
CH-PEG ₉	280±4(90)	2186±40(10)
CH-PC ₁₀	233±12(100)	-
CH-PC ₄₀	227±4(100)	-

Tabela 12 - Diâmetros hidrodinâmicos, força iônica 10 mM, pH 7,0 e razão N/P = 5

Nanopartículas	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
CH57 _D	-	-
CH-PEG ₃	289±10 (48)	-
CH-PEG ₅	226±9(100)	-
CH-PEG ₉	202±8(100)	-
CH-PC ₁₀	203±8(100)	-
CH-PC ₄₀	1751±38(90)	699.0±2(10)

As funções de correlação foram ajustadas a duas distribuições e as nanopartículas em pH 4,0 exibem tamanhos que variam de 50 a 200 nm de diâmetro. Nesse pH o tamanho permanece praticamente inalterado com o aumento da razão N/P na faixa de 1 a 5 (Tabelas 6-8). O acréscimo no pH para 6,2 aumenta drasticamente os tamanhos das nanopartículas principalmente para razão N/P 1 (Tabela 9). Isso ocorre devido à ausência de excesso de carga e aumento da hidrofobicidade das partículas o que leva à agregação e formação de estruturas da ordem de micrometros. Para pH 6,2 e razão N/P = 1, somente a CH-PC₄₀ levou a formação de partículas pequenas da ordem de 280 nm (Tabela 9). O aumento da razão N/P para 3 diminui a formação de agregados e partículas da ordem de 250 nm foram formadas utilizando-se os derivados CH-PEG₃, CH-PEG₅ e CH-PEG₉ (Tabela 10). Esses diâmetros são

similares aqueles obtidos recentemente por Zhang e colaboradores (2008), que sintetizaram nanopartículas de derivados de quitosana contendo PEG para liberação controlada de insulina. Na mesma razão $N/P = 3$ ambos os derivados contendo CH-PC₁₀ e CH-PC₄₀ levaram a formação de uma mistura de partículas de 300 nm e agregados da ordem de 1,3 micrometros (Tabela 9). Posteriormente o aumento para a razão $N/P = 5$ resulta principalmente na formação de estruturas menores da ordem de 280 nm para todos os derivados contendo PEG e PC. Entretanto, nessa razão partículas formadas com a quitosana desacetilada (CH57_D) exibem a formação de agregados da ordem de micrometros o que se deve a ausência de carga e maior hidrofobicidade.

Os dados dos tamanhos das nanopartículas correlacionam-se bem com as medidas de potencial zeta, as quais foram realizadas para CH57_D e o derivado CH-PC₅₀. O potencial zeta do DNA livre é de aproximadamente -30 mV e para baixos valores de pH aumentam gradualmente com a razão N/P atingindo um patamar de 30 mV para razões N/P de 4 a 6,0. Esses resultados confirmam que para baixos valores de pH a força da interação dos derivados CH-PC-DNA é similar àquela exibida para CH57_D (Figura 27a). Os valores crescentes de potencial zeta podem ser atribuídos a neutralização gradual dos grupos fosfato do DNA pelos grupos amino carregados positivamente da quitosana. Para altos valores da razão N/P , os valores de potencial zeta permanecem constantes indicando que o excesso de quitosana não participa da complexação e permanece dissolvido em solução como polímero “livre”, não complexado. O potencial zeta dos complexos CH-PC-DNA também aumenta com a razão N/P atingindo um valor limite (Figura 27b). A Figura 27 mostra também que o potencial zeta das nanopartículas depende da massa molecular do polieletrólito, e isso se torna mais evidente em pH 6,2 (Figura 27b). Neste pH fica claro também que a incorporação do grupo fosforilcolina tem um efeito sobre a força de interação com DNA, ou seja, os valores de potencial zeta atingidos para as nanopartículas preparadas com CH-PC₅₀ são menores que aqueles obtidos com quitosana desacetilada. Entretanto em pH 6.2 o potencial zeta aumentou gradualmente

para um patamar de 10 mV para as razões N/P de 4–6, indicando assim que uma menor quantidade de polímero foi condensada sobre os poliplexos. Este resultado está em concordância com aquele obtido com o ensaio do brometo de etídio, o qual mostrou um menor deslocamento de EtBr com o aumento do pH.

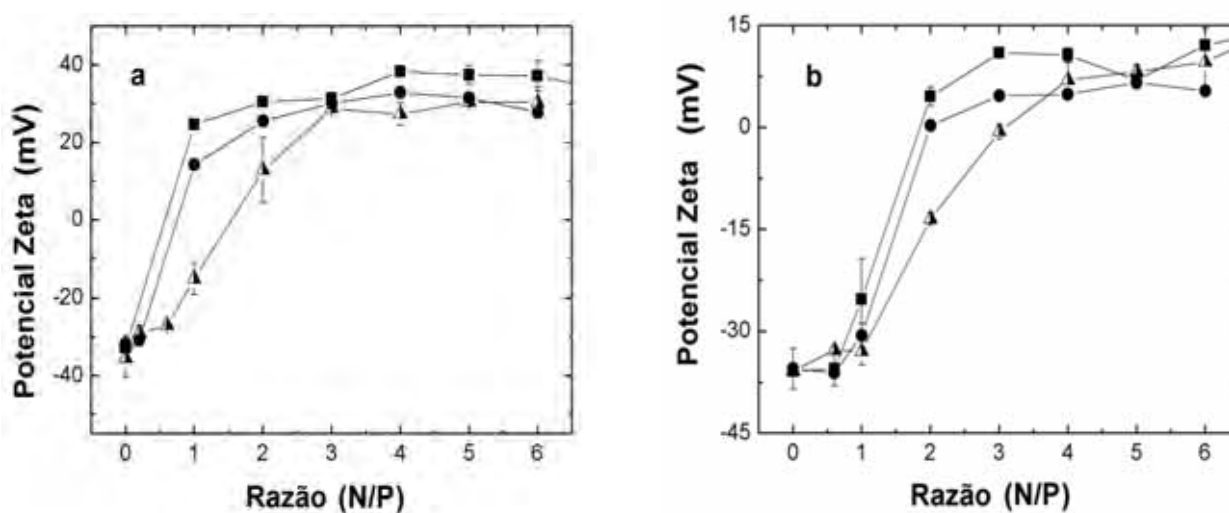


Figura 27 – Potencial zeta dos poliplexos CH-DNA em função da razão N/P (■) CH57_D-DNA, (△) CH5_D-DNA e (●) CH-PC₅₀-DNA, a) 10 mM HAc/NaAc pH 4,0 b) tampão fosfato pH 6,2 e força iônica 10 mM

Nas Tabelas 13-16 são apresentados os resultados obtidos do estudo do efeito do aumento da força iônica sobre o tamanho das partículas que também foi avaliado para todos os derivados, variando o pH (4,0, 6,2 e 7,0) e razão N/P = 5. Os dados foram todos ajustados como duas distribuições exceto as nanopartículas obtidas com CH-PEG₅ para as quais foi aceita a presença de três populações. De forma geral o aumento na força iônica da solução provoca o aumento dos diâmetros das partículas, tanto as preparadas com os derivados contendo PC, quanto àqueles que contêm PEG. Para baixos valores de pH o aumento é significativo, variando de uma média de 150 nm para um valor médio de 250 nm em 300 mM de força iônica. Com o aumento do pH o tamanho médio da distribuição principal permanece em torno de 280 nm de diâmetro e ocorre o aparecimento de agregados maiores da ordem de micrometros, sobretudo para as nanopartículas preparadas com os derivados que contêm PEG.

Entretanto para as quitosanas modificadas com o grupo fosforilcolina (CH-PC₁₀ e CHPC₄₀) os diâmetros das partículas permaneceram praticamente constantes com o aumento da força iônica denotando o efeito positivo da modificação hidrofílica que impede a formação de agregados maiores (Tabelas 13 e 14). Para esses derivados os diâmetros permaneceram praticamente constantes nos três valores de pH estudados (4,0, 6,2 e 7,0).

Para quitosana desacetilada (CH57_D) as partículas apresentaram diâmetros da ordem de micrometros em todas as forças iônicas estudadas. Estudos recentes do grupo mostram que para quitosanas desacetiladas as partículas aumentam de tamanho com o tempo e que o processo depende diretamente da massa molar da quitosana (PICOLA *et al.*, 2011). A interação das quitosanas com DNA em pH 6,2 e baixa força iônica leva à formação de nanopartículas estáveis somente para razões N/P maiores que 7,0. Nanopartículas preparadas na razão N/P 7,0 com quitosanas de baixa massa molar (57, 27, 16 e 5 kDa) agregam num período de tempo de três horas quando submetidas à força iônica de 150 mM. Somente quitosana desacetilada de 150 kDa forma partículas estáveis na força iônica de 150 mM. Portanto nanopartículas preparadas com quitosanas desacetiladas têm estabilidade bastante limitada em força iônica do soro podendo comprometer a eficiência da transfecção tanto *in vitro* como *in vivo* (PICOLA *et al.*, 2011).

Tabela 13 - Diâmetros hidrodinâmicos, CH-PC₁₀, pH 4,0, 6,2 e 7,0 e razão N/P = 5

pH 4,0		
Força Iônica	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
10	117±0,5(100)	
50	215±5(96)	78±4(4)
100	234±12(100)	-
150	235±6(100)	-
300	186±0(85)	1110±40(15)
pH 6,2		
Força Iônica	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
10	297±19(90)	2827±68(10)
50	205±5(100)	-
100	214±8(100)	-
150	207±4(100)	-
300	232±1(100)	-
pH 7,0		
Força Iônica	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
10	195±0,1(100)	-
50	224±2(100)	-
100	221±8(100)	-
150	224±2(100)	-
300	245±8(100)	-

Tabela 14 - Diâmetros hidrodinâmicos, CH-PC₄₀, pH 4,0, 6,2 e 7,0 e razão N/P = 5

pH 4,0		
Força Iônica	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
10	91±4(100)	-
50	158±7(75)	1635±15(25)
100	225±4(100)	-
150	209±2(84)	2425±98(16)
300	258±3(96)	1004±30(4)
pH 6,2		
Força Iônica	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
10	209±1(100)	-
50	222±15(100)	-
100	279±6(100)	-
150	256±8(100)	-
300	274±4(100)	-
pH 7,0		
Força Iônica	Dh₁ (nm)	Dh₂ (nm)
10	209±1(100)	-
50	222±0,5(100)	-
100	197±6(90)	2376±85(10)
150	203±4(89)	2236±6(11)
300	284±7(100)	

Tabela 15 - Diâmetros hidrodinâmicos, CH-PEG₅, pH 4,0, 6,2 e 7,0 e razão N/P = 5

pH 4,0			
Força Iônica	Dh1 (nm)	Dh2 (nm)	Dh3 (nm)
10	217±9(100)	-	-
0	304±3(100)	-	-
100	298±19(100)	-	-
150	281±2(100)	-	-
300	284±7(65)	1417±30(35)	
pH 6,2			
Força Iônica	Dh1 (nm)	Dh2 (nm)	Dh3 (nm)
10	274±6(100)	-	-
50	236±4(92)	1313±15(8)	
100	252±13(90)	1220±45(10)	-
150	259±2(77)	1454±25(13)	869±13(10)
300	261±6(75)	6397±18(25)	-
pH 7,0			
Força Iônica	Dh1 (nm)	Dh2 (nm)	Dh3 (nm)
10	317±2(73)	1123±40(27)	-
50	315±5(78)	1120±366(22)	-
100	271±26(64)	1096,55(36)	-
150	284± (73)	1407±85(27)	
300	273±21(43,1)	1437±55(24,9)	592±40(32)

Tabela 16 - Diâmetros hidrodinâmicos, CH-PEG₉, pH 4,0, 6,2 e 7,0 e razão N/P = 5

pH 4,0		
Força Iônica	Dh1 (nm)	Dh2 (nm)
10	140±1(100)	-
50	266±5(100)	-
100	269±37(100)	-
150	289±8(100)	-
300	297±9(100)	-
pH 6,2		
Força Iônica	Dh1 (nm)	Dh2 (nm)
10	188±2(100)	
50	280±31(100)	-
100	253±29(97)	59±4(3)
150	284±6(100)	-
300	245±17(80)	1188±156(18)
pH 7,0		
Força Iônica	Dh1 (nm)	Dh2 (nm)
10	157±6(87)	1798±79(13)
50	228±6(80)	1772±95(18)
100	268±36(100)	-
150	263±28(93)	1660±59(7)
300	268±13(93)	29±4(7)

4.2.4 - Microscopia de Luz

A microscopia de luz foi utilizada como uma ferramenta qualitativa para avaliar comparativamente o efeito da substituição hidrofílica no tamanho e na estabilidade coloidal das partículas. As nanopartículas sintetizadas com a CH57_D e os derivados CH-PEG₅, CH-PEG₉, CH-PC₁₀ e CH-PC₄₀ foram também avaliadas em função do tempo e pH como descrito no tópico 3.2.8.1 utilizando-se os derivados marcados com rodamina. As soluções foram preparadas em força iônica 10 mM e 23,6 μM de DNA na razão N/P = 5. Essas soluções foram observadas por meio de microscopia óptica imediatamente após a preparação, depois de 5 horas, de 24 horas, de 1 semana e de 1 mês. Durante o período de análise as amostras foram mantidas em geladeira à temperatura de 4^oC. Devido à quantidades de microfotografias, serão apresentadas somente as realizadas 24 horas após a preparação, as demais, ou seja, as realizadas em seguida ao preparo, após 5 horas, uma semana e 1 mês, são apresentadas no Apêndice B.

Para pH 4,0 não se observam variações significativas no tamanho das nanopartículas sintetizadas com as cinco amostras (fotos não mostradas). Como mencionado anteriormente, nesse pH a maioria dos grupos amino estão protonados o que aumenta a força de interação e impede a agregação das partículas. Para pH 6,2 a quitosana desacetilada exibe um aumento considerável no tamanho, como observado nos dados de espalhamento de luz. As nanopartículas preparadas com CH-PC₁₁ exibiram uma agregação discreta, com pouca alteração nos tamanhos, quando comparado aos experimentos realizados nos pHs 4 e 5. Para as nanopartículas preparadas com os demais derivados, CH-PEG₅ e CH-PEG₉ também não foram observadas variações significativas no tamanho. Em pH 7,0 observa-se que para os derivados CH-PC₁₀, CH-PC₄₀, CH-PEG₅, CH-PEG₉ existe uma maior estabilidade das nanopartículas comparado à quitosana desacetilada que apresentou agregados maiores que 5 micrometros. Esta estabilidade se deve em parte à maior hidroflicidade das nanopartículas, pois ambos grupos são fortemente hidratados. Entretanto, para partículas preparadas com CH-

PC₄₀ alguns agregados maiores podem ser detectados em concordância com os resultados de espalhamento de luz (Tabela 14). As micrografias realizadas um dia após a síntese das nanopartículas em pH 7,0 são apresentadas na Figura 281a-e. Para pH 7,4 foi selecionado inicialmente o derivado CH-PC₄₀ e as micrografias comparativas das partículas desse derivado em diferentes valores de pH, após 1 dia de sua síntese são apresentadas na Figura 29. A Figura 28 mostra as nanopartículas obtidas com os derivados contendo PC e PEG apresentam maior estabilidade coloidal quando comparadas àquelas sintetizadas com quitosana não modificada (Figura 28a). A maior estabilidade em pH 7,0 para esses derivados se deve a um maior pKa do grupo amino substituído, o qual apresenta um valor aproximado de 7,0 (TIERA, *et al.*, 2006), e que pode contribuir para maior estabilização através da atração eletrostática, bem como proporcionar uma carga líquida positiva na nanopartícula. Entretanto mesmo para esses derivados nota-se claramente uma mistura de partículas de diferentes tamanhos, ou seja, a estabilidade depende diretamente da composição, ou seja, nanopartículas preparadas com CH-PC₄₀ apresentam menor estabilidade quando comparadas com aquelas preparadas com o derivado com 10% de substituição (Figura 28d).

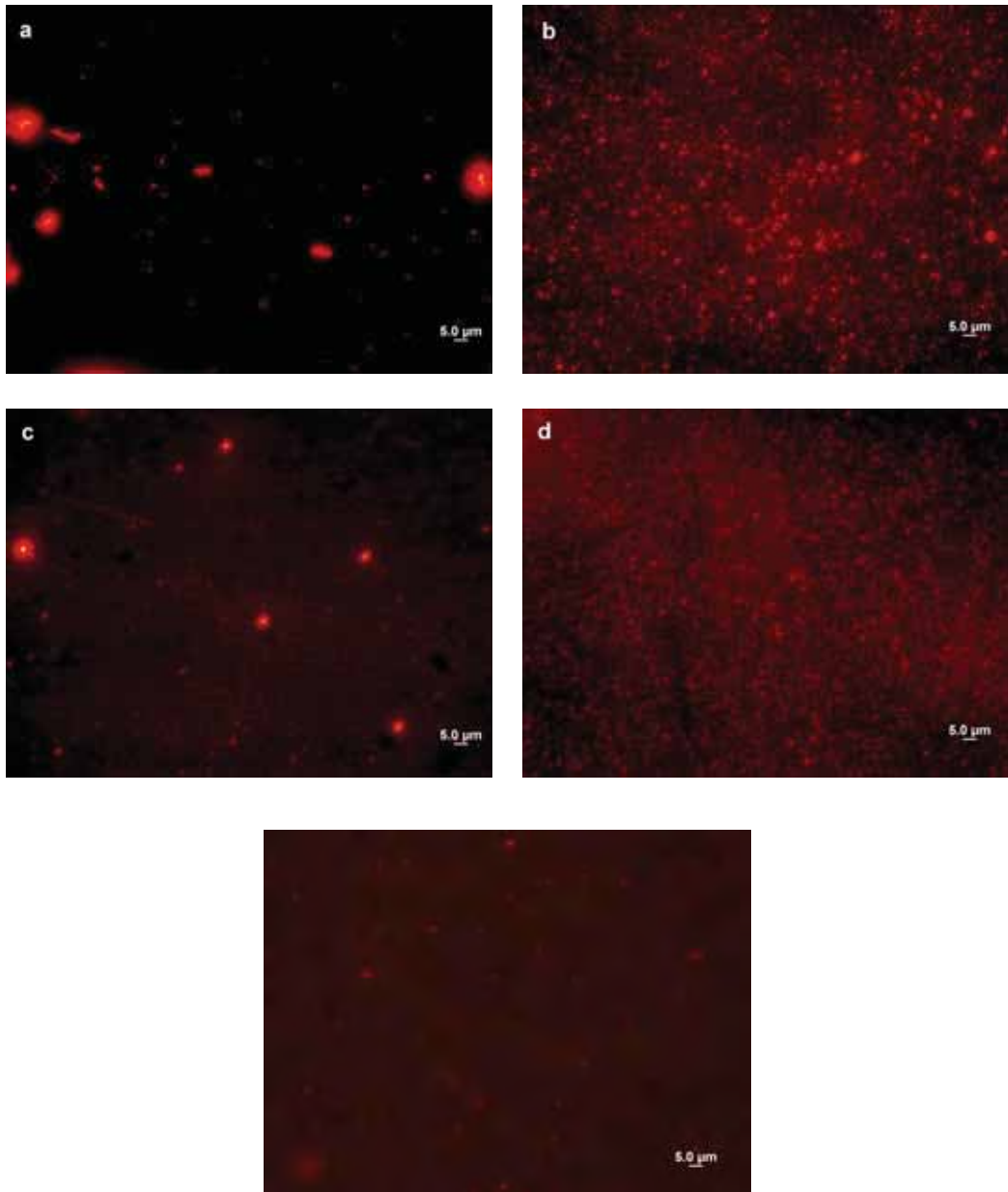


Figura 28 - Micrografias de nanopartículas marcadas com rodamina, a) CH57_D-DNA, b) CH-PEG₉-DNA, c) CH-PC₄₀-DNA, d) CH-PC₁₀-DNA e e) CH-PEG₅-DNA em pH 7,0, após um dia da preparação

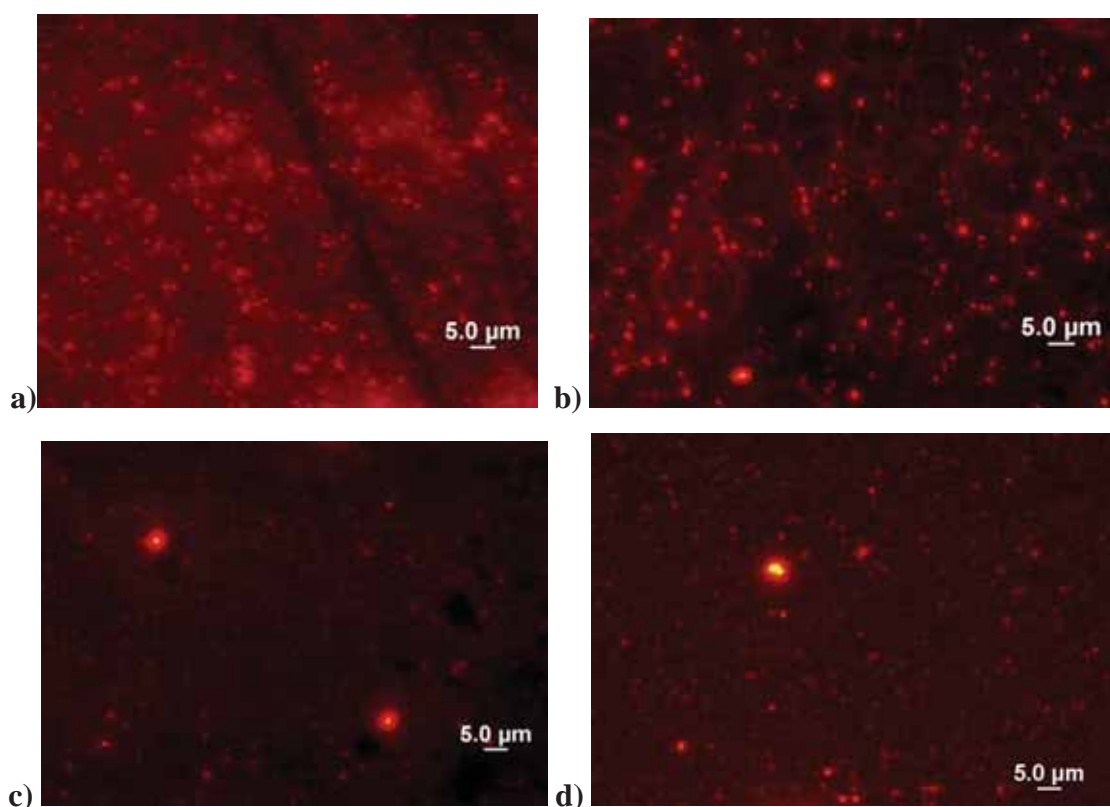


Figura 29 - Micrografias de nanopartículas de CH-PC₄₀-DNA marcado com rodamina, nos pHs: a) 4,0, b) 6,2, c) 7,0 e d) 7,4 após 1 dia de preparação

4.2.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

O tamanho e a morfologia das partículas obtidas em pHs 4,0 e 7,0 e com concentração do DNA em 16 e 80 μM , respectivamente, foram investigados. Neste experimento a força iônica foi de 150 mM e a razão N/P = 5, parâmetros que foram mantidos constantes durante todas as análises de MEV. Verificou-se que a forma e o tamanho dependem do pH e da composição dos derivados. A observação de nanopartículas pequenas foi prejudicada, sobretudo em pH 4,0, entretanto partículas esféricas foram observados como pontos menores que $1\mu\text{m}$ nas Figuras 30a-d para as nanopartículas preparadas com CH-PC₁₀, CH-PC₄₀, CH-PEG₃ e CH-PEG₉. Os resultados confirmam aqueles obtidos com espalhamento de luz que

mostraram tamanhos entre 100 e 300 nm, bem como aqueles obtidos com micrografias ópticas obtidas com os derivados marcados com rodamina.

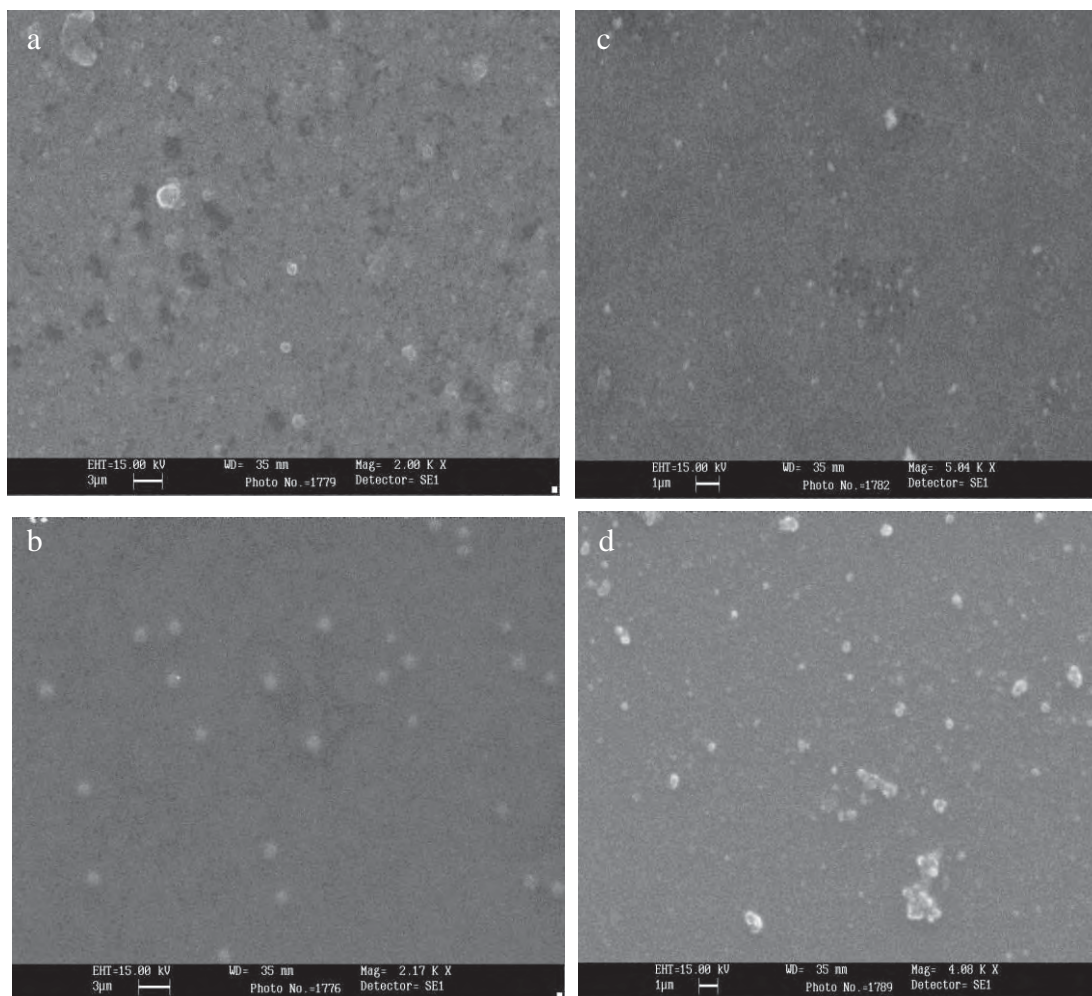


Figura 30 - Microfotografias de nanopartículas de DNA preparadas a) CH-PC₁₀-DNA b) CH-PC₄₀-DNA c) CH-PEG₃-DNA e d) CH-PEG₉-DNA, em pH 4,0, força iônica 150 mM, concentração de DNA = 16 µM e razão N/P = 5

Anteriormente foi mencionado que o aumento do pH leva a desprotonação dos grupos amino da quitosana contribuindo para o enfraquecimento da interação e provocando o crescimento das partículas, que passam a ter tamanhos maiores da ordem de micrômetros. E isso se confirma com os resultados obtidos nas análises de MEV, que também está em concordância com os resultados de DLS e microscopia de fluorescência, vistos anteriormente. A Figura 31a apresenta a micrografia das partículas sintetizadas com a CH57_D em pH 7,0,

nota-se claramente o aparecimento de partículas maiores e de agregados, confirmando assim a hipótese levantada de que o pH influencia o tamanho e o formato das partículas. Neste pH as partículas passaram a ter uma maior variedade de formas e tamanhos, com predominância de partículas que são aproximadamente esféricas.

Entretanto o aumento concomitante da concentração de DNA bem como do pH mostram que tanto as partículas preparadas com quitosana desacetilada como aquelas preparadas com os derivados (CH-PC₄₀, CH-PEG₃ e CH-PEG₉) formam partículas grandes e o aparecimento de agregados é evidente (Figura 31c e d, respectivamente).

Esses resultados são contraditórios aqueles obtidos nas medidas de espalhamento de luz, e se devem provavelmente ao processo de secagem e preparação da amostra, bem como a maior concentração de DNA utilizada. Após a deposição da solução das partículas nos “stubs” o processo lento de secagem pode levar a formação de agregados com tamanhos crescentes (Figura 31). Este processo de agregação também pode ser favorecido pela maior concentração de DNA utilizado na preparação, o que leva a um aumento da concentração das partículas e a uma maior propensão à agregação.

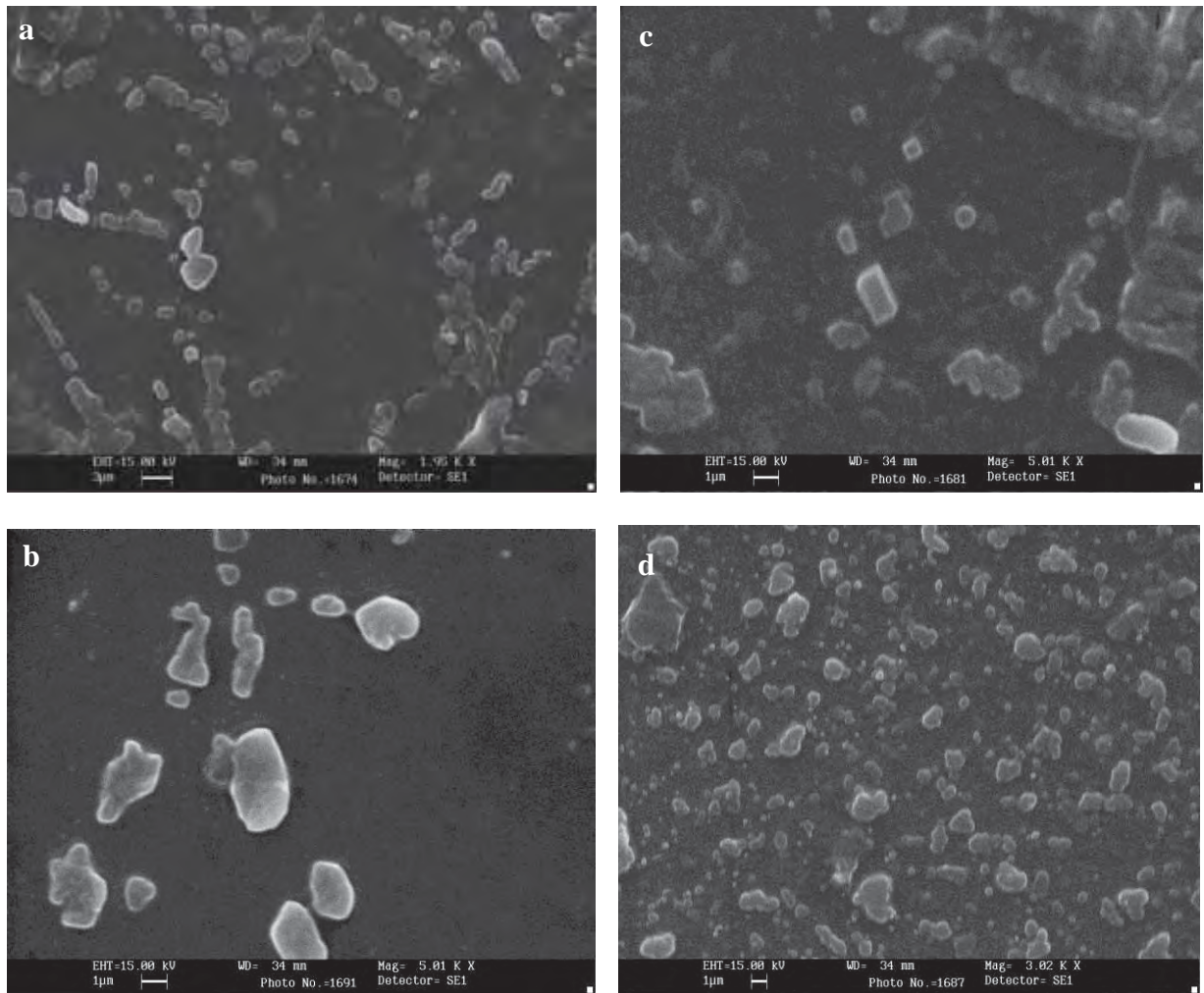


Figura 31 - Micrografias de nanopartículas nanopartículas a) CH57_D-DNA, b) CH-PC₄₀-DNA, c) CH-PEG₅-DNA e d) CH-PEG₉-DNA, em pH 7,0, força iônica 150 mM, concentração de DNA = 80 µM e N/P = 5

5 - CONCLUSÕES

Derivados hidrofílicos de quitosana contendo os grupos PEG e fosforilcolina PC podem ser preparados por meio das reações de substituição nucleofílica dos grupos amina da quitosana. Esses derivados formam complexos com DNA, os quais variam em propriedades de acordo com os conteúdos de PC, PEG, pH e razão de cargas. Em baixos valores de pH tanto quitosana desacetilada quanto os derivados contendo PC e PEG interagem eficientemente com DNA, o que pode ser atribuído à interação eletrostática entre os grupos amino da quitosana e os grupos fosfato do DNA. A interação dos derivados CH-PC com DNA em pH neutro leva à formação de partículas estáveis, que pode ser atribuída ao maior valor de pKa dos grupos amino substituídos pelo grupo PC. Entretanto a maior estabilidade coloidal das nanopartículas preparadas com os derivados contendo PEG se deve à estabilidade estérica proporcionada por essas cadeias hidrofílicas. Para os derivados CH-PC os resultados de eletroforese mostraram que à medida que o grau de substituição aumenta uma maior razão N/P é necessária para promover a complexação total do DNA. Em baixos valores de pH os tamanhos e potencial zeta das partículas preparadas com os diferentes derivados CH-PC não variam significativamente. Em pH 6,2 a formação de nanopartículas pequenas para a quitosana desacetilada ocorre somente para razões N/P maiores que 5,0. Por outro lado em pH 6,2 os derivados contendo grupos fosforilcolina CH-PC foram capazes de formar partículas estáveis para razões menores de 2,0-3,0. Os resultados de fluorescência e eletroforese mostraram que os derivados com PEG interagem mais fortemente com DNA que os derivados com PC em ambos os pHs (4,0 e 6,2) e formam partículas relativamente estáveis nesses valores de pH. Entretanto o aumento da porcentagem de PEG aumenta a estabilidade das nanopartículas e o derivado com maior grau de substituição (CH-PEG₉) produziu partículas mais estáveis que os outros dois derivados. Em pH 7,0 e força iônica 10mM as nanopartículas sintetizadas com CH-PC₂₀ e CH-PC₄₀ mostraram-se estáveis por um mês sem sinal de

agregação. O aumento da força iônica teve um efeito discreto sobre o tamanho das partículas preparadas com os derivados CH-PC, entretanto o tamanho das nanopartículas preparadas com quitosana desacetilada, sofrem um aumento substancial formando agregados da ordem de micrômetros. Entretanto, próximo da força iônica média do plasma sanguíneo (150 mM) as nanopartículas preparadas com os derivados contendo PC exibiram maior estabilidade coloidal que aquelas preparadas com os derivados contendo PEG. Os derivados contendo o grupo PC levam à formação de nanopartículas estáveis em pH 7,0 e os resultados obtidos permitem vislumbrar novas aplicações desses derivados no controle das propriedades dos políplexos para aplicações na terapia gênica não viral.

6 – REFERÊNCIAS

AKBUGA, J.; OZBAS-TURAN, E.; ERDOGAN, N. PLASMID-DNA LOADED CHITOSAN MICROSPHERES FOR IN VITRO IL-2 EXPRESSION ORIGINAL RESEARCH. EUR. J. PHARM. BIOPHARM. V. 58, P. 501-507, 2004.

ALAN, D. O.; PARKER, L.; SEYMOUR, L. W. LATERALLY STABILIZED COMPLEXES OF DNA WITH LINEAR REDUCIBLE POLYCATIONS: STRATEGY FOR TRIGGERED INTRACELLULAR ACTIVATION OF DNA DELIVERY VECTORS. J. AM. CHEM. SOC. V. 124, P. 8-9, 2002.

AUDOUY, A.; HOEKSTRA, D. CATIONIC LIPID-MEDIATED TRANSFECTION IN VITRO AND IN VIVO. MOLECULAR MEMBRANE BIOLOGY. V. 18, P. 129-143, 2001.

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, P. 27-34, 2007

BODNAR, M.; HARTMANN, J. F.; BORBELY, J. SYNTHESIS AND STUDY OF CROSS-LINKED CHITOSAN-N-POLY(ETHYLENE GLYCOL) NANOPARTICLES. BIOMACROMOLECULES. V. 7, P. 3030-3036, 2006.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. NANOPARTICLE AND TARGETED SYSTEMS FOR CANCER THERAPY. ADV. DRUG DELIV. REV. V. 56 P. 1649-1659, 2004.

CARRENO-GOMEZ, B.; DUNCAN, R. EVALUATION OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF SOLUBLE CHITOSAN AND CHITOSAN MICROSPHERES. INT. J. PHARM. V. 116, P. 231-240, 1997.

CASÉ, A. H.; PICOLA, I. P. D.; ZANIQUELLI, M. E. D.; FERNANDES, J. C.; TABOGA, S. R.; WINNIK, F. M.; TIERA, M. J. PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLES FORMED BETWEEN DNA AND PHOSPHORYLCHOLINE SUBSTITUTED CHITOSANS. JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE. V. 336, P. 125-133, 2009.

CHAN, P.; KURISAWA, M.; CHUNG, J. E.; YANG, YI-YAN. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-G-POLY(ETHYLENE GLYCOL)-FOLATE AS A NON-VIRAL CARRIER FOR TUMOR-TARGETED GENE DELIVERY. BIOMATERIALS. V. 28, P. 540-549, 2007.

CHAN, V.; MAO, H. Q.; LEONG, K. W. CHITOSAN-INDUCED PERTURBATION OF DIPALMITOYL-SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE MEMBRANE BILAYER. LANGMUIR. V. 17, 3749-3756, 2001.

CORSI, K.; CHELLAT, F.; YAHIA, L.; FERNANDES, J. C. MESENCHYMAL STEM CELLS, MG63 AND HEK293 TRANSFECTION USING CHITOSAN-DNA NANOPARTICLES. BIOMATERIALS. V. 24, P. 1255-1261, 2003.

DAI, H.; JIANG, X.; TAN, G. C.; CHEN, Y.; TORBENSON, M.; LEONG, K. W. CHITOSAN-DNA NANOPARTICLES DELIVERED BY INTRABILIARY INFUSION ENHANCE LIVER-TARGETED GENE DELIVERY. *INT. J. NANOMED.* V. 1, P. 507, 2006.

DANI, S. U. TERAPIA GÊNICA. *BIOTECNOLOGIA CIÊNCIA & DESENVOLVIMENTO.* V. 12, P. 28-33, 2000.

DANIELSEN, S.; STRAND, S.; DAVIES, C. L.; STOKKE, B. T. GLYCOSAMINOGLYCAN DESTABILIZATION OF DNA-CHITOSAN POLYPLEXES FOR GENE DELIVERY DEPENDS ON CHITOSAN CHAIN LENGTH AND GAG PROPERTIES. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA.* V. 1721, P. 44-54, 2005.

DE SMEDT, S. C.; DEMEESTER, J.; HENNINK, W. E. CATIONIC POLYMER BASED GENE DELIVERY SYSTEMS *PHARM. RES.* V. 17, P. 113-126, 2000.

DES RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SCHNEIDER, Y.-J.; PRÉAT, V. J. NANOPARTICLES AS POTENTIAL ORAL DELIVERY SYSTEMS OF PROTEINS AND VACCINES: A MECHANISTIC APPROACH. *J. CONTROL. RELEASE.* V. 116, P. 1-27, 2006.

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. *PHARM. RES.* V. 15 P. 1332-1339, 1998.

FERBER, D. GENE THERAPY: SAFER AND VIRUS-FREE? *SCIENCE*, V. 294, P.1638-1642, 2001.

FERNANDES, J. C.; TIERA, M. J.; WINNIK, F. M. IN: C.S.S.R. KUMAR (ED.), *BIOLOGICAL AND PHARMACEUTICAL NANOMATERIALS*, WILEY, NEW YORK, P. 200, 2005.

GODBAY, W. T.; MIKOS, A. G. RECENT PROGRESS IN GENE DELIVERY USING NON-VIRAL TRANSFER COMPLEXES. *J. CONTROL. RELEASE.* V. 72, P. 115-125, 2001.

GOMES, A. J.; FAUSTINO, A. S.; MACHADO, A. E. H. EVALUATION OF NANOPARTICLES LOADED WITH BENZOPSORALEN IN RAT PERITONEAL EXUDATE CELLS. *PHARM. NANOTECHNOL.* V. 332, P. 153-160, 2007.

GOMES, A. J.; FAUSTINO, A. S.; MACHADO, A. E. H.; ZANIQUELLI, M. E. D.; RIGOLETTO, T. P. LUNARDI, C. N.; LUNARDI, L. O. CHARACTERIZATION OF PLGA MICROPARTICLES AS A DRUG CARRIER FOR 3-ETHOXYCARBONYL-2H-BENZOFURO[3,2-F]-1-BENZOPYRAN-2-ONE. *ULTRASTRUCTURAL STUDY OF CELLULAR UPTAKE AND INTRACELLULAR DISTRIBUTION.* *DRUG DELIVERY*, V. 13, P. 447-454, 2006.

HARRIS, J. M.; STRUCK, E. C.; CASE, M. G.; PALEY, M. S.; YALPANI, M.; JAMES, M. V. A.; DONALD, E. B. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLY(ETHYLENE GLYCOL) DERIVATIVES. J. POLYM. SCI. POLYM. CHEM. V. 22, P. 341-348, 1984.

HELLER, J.; LIU, L. S.; DUNCAN, R.; RICHARDSON, S. ALGINATE:CHITOSAN MICROPOROUS MICROSPHERES FOR THE CONTROLLED RELEASE OF PROTEINS AND ANTIGENS. PROC. INT. SYMPOS. CONTROL. RELEASE BIOACT. MATER. V. 23, P. 269-270, 1996.

[HTTP://EVOLUTION.BERKELEY.EDU/EVOLIBRARY/IMAGES/HISTORY/DNA_STRUCTURE.GIF](http://evolution.berkeley.edu/evolibrary/images/history/dna_structure.gif) - MODELO PROPOSTO POR WATSON E CRICK.

[HTTP://WWW.CRQ4.ORG.BR/QV_QUITOSANAS](http://www.crq4.org.br/qv_quitosanas) - ORIGEM: SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P – CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DE QUITOSANAS PURIFICADAS.

ISHII, T.; OKAHATA, Y.; SATO, T. MECHANISM OF CELL TRANSFECTION WITH PLASMID/CHITOSAN COMPLEXES. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. V. 1514P. 51-64, 2001.

JIANG, X.; DAI, H.; LEONG, K. W.; GOH, S. -H.; MAO, H. -Q.; YANG, Y. -Y. CHITOSAN-G-PEG/DNA COMPLEXES DELIVER GENE TO THE RAT LIVER VIA INTRABILIARY AND INTRAPORTAL INFUSIONS. J. GENE MED. V. 8, P. 477-487, 2006.

KATCHALSKY, A. PROPERTIES OF PROBLEMS IN THE PHYSICAL CHEMISTRY OF POLYELECTROLYTES. J POLYM SCI. V. 12 P . 159-184, 1954.

KIM, T. -H.; JIANG, H. -L.; JERE, D.; PARK, I. -K.; CHO, M. -H.; NAH, J. -W.; CHOI, Y. -J.; AKAIKE, T.; CHO, C. -S. CHEMICAL MODIFICATION OF CHITOSAN AS A GENE CARRIER IN VITRO AND IN VIVO. PROG. POLYM. SCI. V. 32 P. 726-753, 2007.

KIMA, T. H.; PARKA, I. K.; NAHB, J. W.; CHOIA, Y. J.; CHO, C. S. GALACTOSYLATED CHITOSAN/DNA NANOPARTICLES PREPARED USING WATER-SOLUBLE CHITOSAN AS A GENE CARRIER. BIOMATERIALS. V. 25, P. 3783-3792, 2004.

KURITA, K. CHEMISTRY AND APPLICATION OF CHITIN AND CHITOSAN. POLYMER DEGRODATION AND SFABILIFY. V.59, P.17-20, 1997.

LI, X. W.; LEE, D. K. L.; CHI CHAN, A. S.; ALPAR, H. O. SUSTAINED EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS WITH DNA COMPLEXED WITH CHITOSAN NANOPARTICLES. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. V. 1630, P. 07-18, 2003.

LIU, W. G.; ZHANG, X.; SUN, S. J.; SUN, G. J.; DE YAO, K. N-ALKYLATED CHITOSAN AS A POTENTIAL NONVIRAL VECTOR FOR GENE TRANSFECTION. BIOCONJ. CHEM. V. 14, 782-789, 2003.

LU, B.; WANG, CH. F.; WU, Q.; LI, C.; ZHANG, Z. Z.; ZHUO, R. X. CHITOSAN BASED OLIGOAMINE POLYMERS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND GENE DELIVERY. JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE. V. 137, P. 54-62, 2009.

MA, O; LAVERTU, L; SUN, J; NGUYEN, S; BUSCHMANN, MICHAEL D.; WINNIK, F. M.; HOEMANN, C. D. PRECISE DERIVATIZATION OF STRUCTURALLY DISTINCT CHITOSANS WITH RHODAMINE B ISOTHIOCYANATE. CARBOHYDRATE POLYMERS. V. 72, P. 616-624 2008.

MACLAUGHLIN, F. R. J.; WANG, J.; TAGLIAFERRI, J. M.; GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; ROLLAND, A. P. J. CHITOSAN AND DEPOLYMERIZED CHITOSAN OLIGOMERS AS CONDENSING CARRIERS FOR IN VIVO PLASMID DELIVERY. J. CONTROL. RELEASE. V. 56, P. 259-272, 1998.

MAO, H. Q.; ROY, K.; TROUNG-LE, V. L.; JANES, K. A.; LIN, K.Y.; AUGUST, J. T.; LEONG, K. W. CHITOSAN-DNA NANOPARTICLES AS GENE CARRIERS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND TRANSFECTION EFFICIENCY. J. CONTROL. RELEASE. V. 70, P. 399-421, 2001.

MIYAZAWA K.; WINNIK, F. M. SOLUTION PROPERTIES OF PHOSPHORYLCHOLINE HYDROPHOBICALLY MODIFIED POLYBETAINES IN WATER AND MIXED SOLVENTS. MACROMOLECULES. V. 35, P. 9536-9544, 2002.

MUMPER, R. J.; WANG, J.; CLASPELL, J. M.; ROLLAND, A. P. CHITOSAN RELATED COMPOSITIONS AND METHODS FOR DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS AND OLIGONUCLEOTIDES INTO A CELL. PROC. INT. SYMPOS. CONTROL. REL. BIOACT. MATER. V. 22, P. 178-179, 1995.

MURATA, J. -I.; OHYA, Y.; OUCHI, T. POSSIBILITY OF APPLICATION OF QUATERNARY CHITOSAN HAVING PENDANT GALACTOSE RESIDUES AS GENE DELIVERY TOOL. CARBOHYDR. POLYM. V. 29, P.69-74, 1996.

MUZZARELLI, R. A. A. CHITIN, OXFORD: PERGAMON PRESS, P. 255-265, 1977.

PARK, I. K.; IHM, J. E.; PARK, Y. H.; CHOI, Y. J.; KIM, S. I.; KIM, W. J.; AKAIKE, T.; CHO, C. S. GALACTOSYLATED CHITOSAN (GC)-GRAFT-POLY(VINYL PYRROLIDONE) (PVP) AS HEPATOCYTE-TARGETING DNA CARRIER: PREPARATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF GC-GRAFT-PVP/DNA COMPLEX (1). J. CONTROL. RELEASE. V. 86 P. 349-359, 2003.

PARK, I. K.; KIM, T. H.; PARK, Y. H.; SHIN, B. A.; CHOI, E. S.; CHOWDHURY, E. H.; AKAIKE, T.; CHO, C. S. GALACTOSYLATED CHITOSAN-GRAFT-POLY(ETHYLENE GLYCOL) AS HEPATOCYTE-TARGETING DNA CARRIER. J. CONTROL. RELEASE. V. 76, P 349-362, 2001.

PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; SHIN, B. A.; CHOI, E. S.; PARK, Y. R.; AKAIKE, T. CHO, C. S. GALACTOSYLATED CHITOSAN-GRAFT-DEXTRAN AS HEPATOCYTE-TARGETING DNA CARRIER. J. CONTROL. RELEASE. V. 69, P. 97-108, 2000.

PEDROSO, L. M. C.; SIMOES, S.; PIRES, P.; FANCA, H.; DUZGUNES, N. CATIONIC LIPID-DNA COMPLEXES IN GENE DELIVERY: FROM BIOPHYSICS TO BIOLOGICAL APPLICATIONS. *ADV. DRUG. DELIV. REV.* V. 47, P. 277-294, 2001.

PEREIRA, N. M. TERAPIA GÊNICA: VECTORES EM TERAPIA GÊNICA. VISITADO EM: 12/10/2010.

PETER, M. G. APPLICATIONS AND ENVIRONMENTAL ASPECTS OF CHITIN AND CHITOSAN. *JOURNAL OF MACROMOLECULAR SCIENCE-PURE & APPLIED CHEMISTRY.* V. A32, P. 629-640, 1995.

PICOLA, I. P. D.; BUSSON, K. A. N.; CASÉ, A. H.; NASÁRIO, F. D.; OLIVEIRA, V. A.; TABOGA, S. R.; NETO, J. R.; TIERA, M. J. EFFECT OF IONIC STRENGTH SOLUTION ON THE STABILITY OF CHITOSAN-DNA NANOPARTICLES. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL NANOSCIENCE.* P. 1-14, 2011.

POUTON, C. W.; SEYMOUR, L. W. KEY ISSUES IN NON-VIRAL GENE DELIVERY. *ADV. DRUG. DELIV. REV.* V. 46, P. 187-203, 2001.

PREVETTE, L. E.; KODGER, T. E.; REINEKE, T. M.; LYNCH, M. L. DECIPHERING THE ROLE OF HYDROGEN BONDING IN ENHANCING DNA-POLYCATION INTERACTIONS. *LANGMUIR.* V. 23, P. 9773-9784, 2007.

QI, L.; XU, Z. IN VIVO ANTITUMOR ACTIVITY OF CHITOSAN NANOPARTICLES. *BIOORG. MED. CHEM. LETT.* V. 16, P. 4243-4245, 2006.

RICHARDSON, S. C. W.; KOLBE, H. V. J.; DUNCAN, R. POTENTIAL OF LOW MOLECULAR MASS CHITOSAN AS A DNA DELIVERY SYSTEM: BIOCOMPATIBILITY, BODY DISTRIBUTION AND ABILITY TO COMPLEX AND PROTECT DNA. *INT. J. PHARM.* V. 178, P. 231-243, 1999.

RINAUDO M.; DOMARD A. CHITIN AND CHITOSAN. SOURCES, CHEMISTRY, BIOCHEMISTRY, PHYSICAL PROPERTIES AND APPLICATIONS. ELSEVIER. P. 71-86, 1989.

ROMAN, G; PÁLFFY, R; HODOSY, J; LUKÁCS, J; TURNA, J; CELEC, P. "VECTORS AND DELIVERY SYSTEMS IN GENE THERAPY". *MEDICAL SCIENCE MONITOR.* V. 11, P. 110-121, 2005.

ROTH, CH. M., SUNDARAM, S. ENGINEERING SYNTHETIC VECTORS FOR IMPROVED DNA DELIVERY: INSIGHTS FROM INTRACELLULAR PATHWAYS. *ANNU. REV. BIOMED. ENG.* V. 6, P. 397-426, 2004.

ROY, K.; MAO, H. -Q.; HUANG, S. -K.; LEONG, K. W. ORAL GENE DELIVERY WITH CHITOSAN-DNA NANOPARTICLES GENERATES IMMUNOLOGICAL PROTECTION IN A MURINE MODEL OF PEANUT ALLERGY. *NAT. MED.* V. 5, P. 387-391, 1999.

SAENGER, W. PRINCIPLES OF NUCLEIC ACIDS STRUCTURES. 2 ED. NEW YORD, SPRINGER VERLAG. 1988.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DE QUITOSANAS PURIFICADAS NAS FORMAS NEUTRA, ACETATO E CLORIDRATO. POLÍMEROS: CIÊNCIA E TECNOLOGIA. V. 11, N. 2, P. 58-64, 2001

SILMAN, N. J; FOOKS, A. R. BIOPHYSICAL TARGETING OF ADENOVIRUS VECTORS FOR GENE THERAPY. CURR. OPIN. MOL. THER. V. 2, P.524-531, 2000.

SOMIA, N.; VERMA, I. M. GENE THERAPY: TRIALS AND TRIBULATIONS, NAT. REV. GENET. V. 1, P. 91-99, 2000.

STRYER, LUBERT. BIOQUÍMICA. GUANABARA KOOGAN, RIO DE JANEIRO, TERCEIRA EDIÇÃO, 1992.

STULTS, N. L.; LEE Y. C.; HOPE, C. A.; KAWAGUCHI, K.; KOHDA, TAKAGAHARA S.; KOSHI, I., T.; LIU, T, Y. PREPARATION OF PHOSPHORYLCHOLINE DERIVATIVES OF BOVINE SERUM ALBUMIN AND THEIR APPLICATION TO THE AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF C-REACTIVE PROTEIN. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. V. 161, P. 567-573, 1987.

SUGIMOTO, M.; MORIMOTO, M.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF WATER-SOLUBLE CHITIN AND CHITOSAN DERIVATIVES, CARBOHYDR. POLYM. V. 36, P. 49-59, 1998.

THANOU, M.; FLOREA, B. I.; GELDOLF, M.; JUNGINGER, H. E.; BORCHARD, G. QUATERNIZED CHITOSAN OLIGOMERS AS NOVEL GENE DELIVERY VECTORS IN EPITHELIAL CELL LINES. BIOMATERIALS. V. 23, P. 153-159, 2002.

THIEMANN, O. H. [HTTP://BIOLOGIA.IF.SC.USP.BR/AULA1-OTÁVIO.PDF](http://biologia.if.sc.usp.br/aula1-otavio.pdf) – VISITADO EM 26/10/2005

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. V. 7, P. 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. V. 41, P. 2463-2469, 2000.

VAN DER LUBBEN, I. M.; VERHOEF, J. C.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. CHITOSAN FOR MUCOSAL VACCINATION. ADV. DRUG DELIV. REV. V. 52, P. 139-144, 2001.

VAN HOLDE, KENSAL E. PRINCIPLES OF PHYSICAL BIOCHEMISTRY, UPPER SADDLE RIVER, PRENTICE HALL, NEW JERSEY, 1998.

VIJAYANATHAN, V.; THOMAS T.; SHIRAHATA A.; THOMAS T. J. DNA CONDENSATION BY POLYAMINES: A LASER LIGHT SCATTERING STUDY OF STRUCTURAL EFFECTS. BIOCHEMISTRY. V. 40, P. 13644, 2001.

VOET, DONALD. FUNDAMENTOS DE BIOQUÍMICA, ARTMED, PORTO ALEGRE, 2000.

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 THER. V. 3 P. 269-273, 1996.

ZAHR, A. S.; DAVIS, C. A.; PISHKO, M. V. MACROPHAGE UPTAKE OF CORE-SHELL NANOPARTICLES SURFACE MODIFIED WITH POLY(ETHYLENE GLYCOL). LANGMUIR. V. 22, P. 8178-8185, 2006.

ZHANG, X.; ERCELEN; S.; DUPORTAIL, G.; SCHAUB, E.; TIKHONOV, V.; SLITA, A.; ZARUBAEV, V.; BABAK, V.; MELY, Y. HYDROPHOBICALLY MODIFIED LOW MOLECULAR WEIGHT CHITOSANS AS EFFICIENT AND NONTOXIC GENE DELIVERY VECTORS. J. GENE MEDICINE. V. 10, P. 527-539, 2008.

ZHANG, Y. Q.; CHEN, J. J.; ZHANG, Y. D.; PAN, Y. F.; ZHAO, J. F.; REN, L. F.; LIAO, M. M.; HU, Z. Y.; KONG, L.; WANG, J. W. A NOVEL PEGYLATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES FOR GENE DELIVERY. BIOTECHNOL. APPL. BIOCHEM. V. 46, P. 97-204, 2007.

ZHENG, F.; SHIB, X. -W.; YANG, G. -F.; GONGC, L. -L.; YUAN, H. -Y.; CUI, Y. -J.; WANG, Y.; DU, Y. -M.; LI, Y. CHITOSAN NANOPARTICLE AS GENE THERAPY VECTOR VIA GASTROINTESTINAL MUCOSA ADMINISTRATION: RESULTS OF AN IN VITRO AND IN VIVO STUDY. LIFE SCIENCES. V. 80, P. 388-396, 2007.

7 – APÊNDICE A

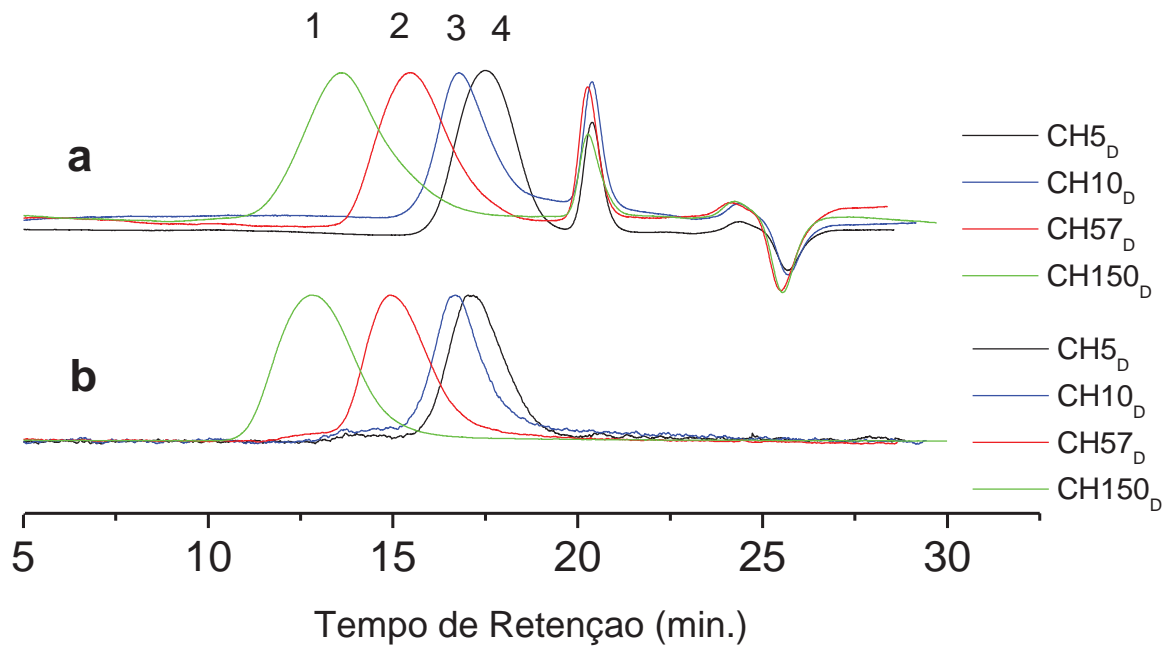


Figura 32 – Cromatogramas das amostras de quitosanas desacetiladas a) Detecção por IR.

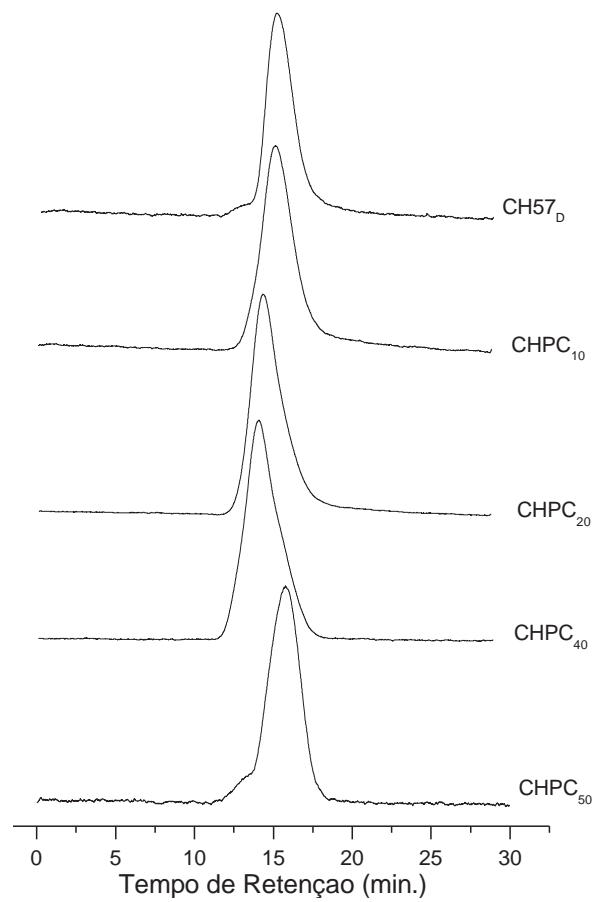


Figura 33 – Cromatogramas das amostras de quitosanas modificadas com fosforilcolina. Detecção por IR

8 – APÊNDICE B

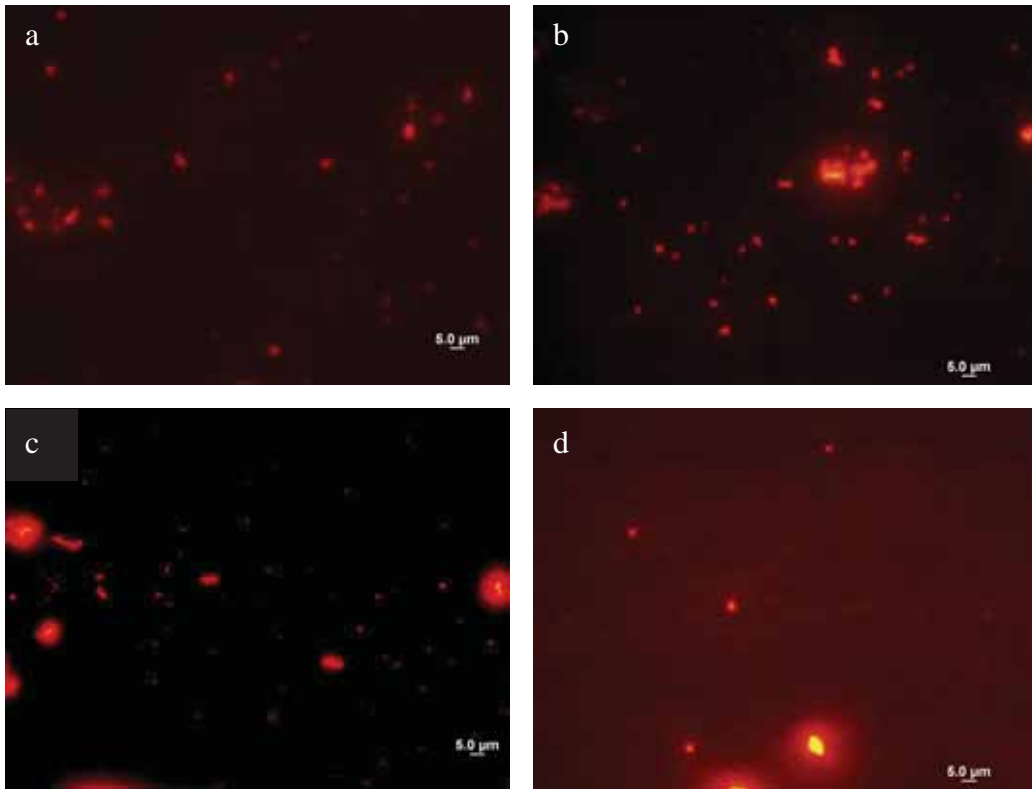


Figura 34 - Micrografias de nanopartículas de CH57_D-DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0

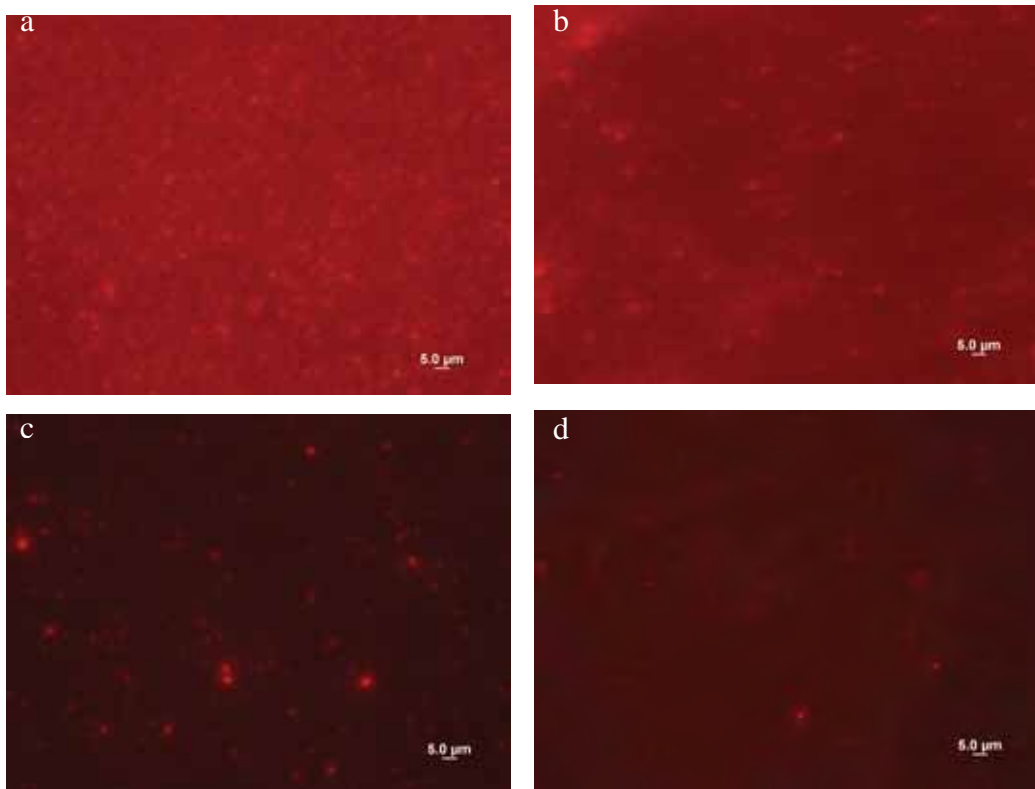


Figura 35 - Micrografias de nanopartículas de CH-PEG₅-DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0

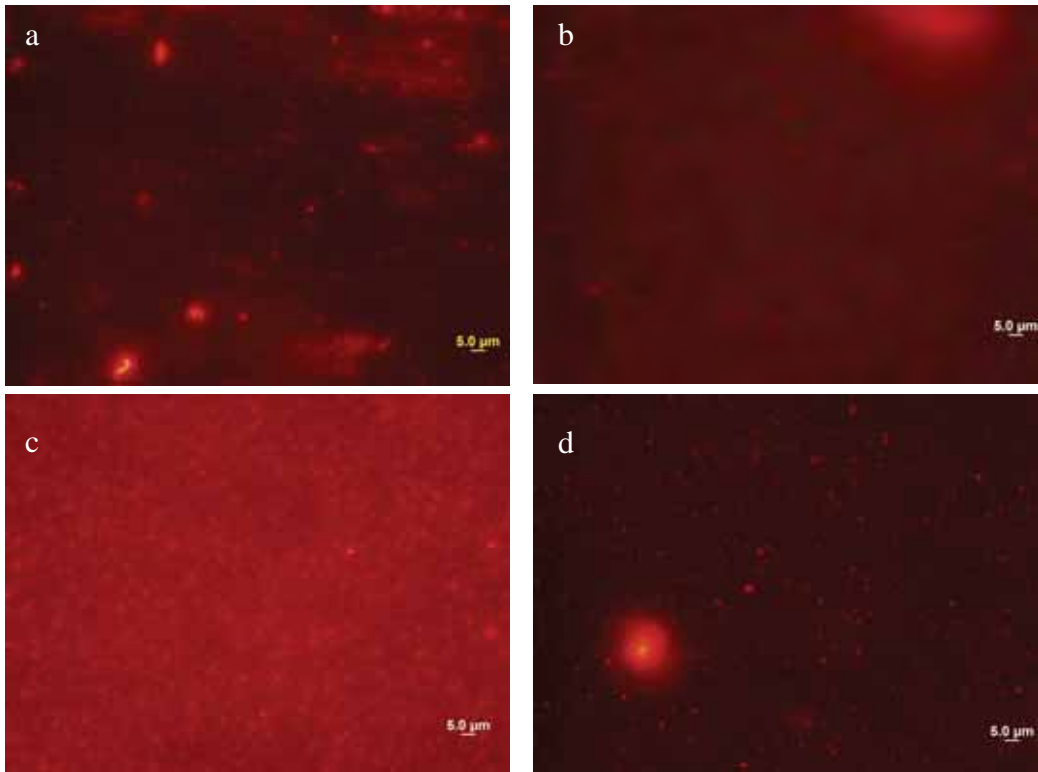


Figura 36 - Micrografias de nanopartículas de CH-PEG₉-DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0

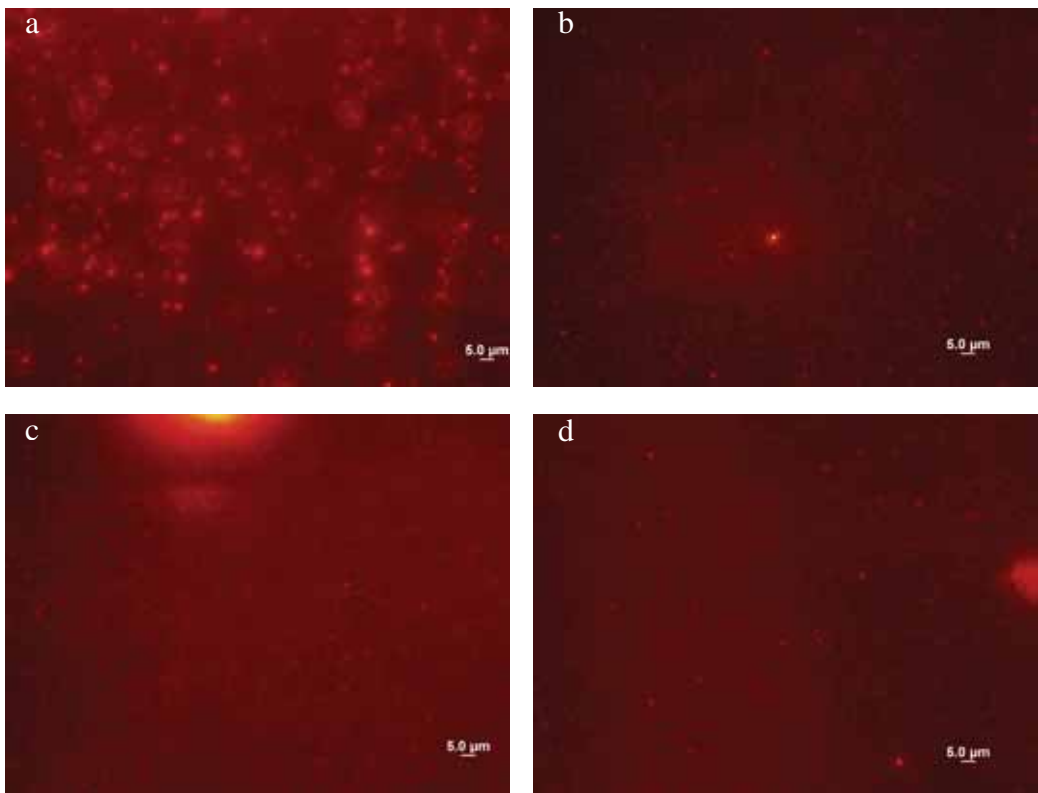


Figura 37 - Micrografias de nanopartículas de CH-PC₁₀-DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0

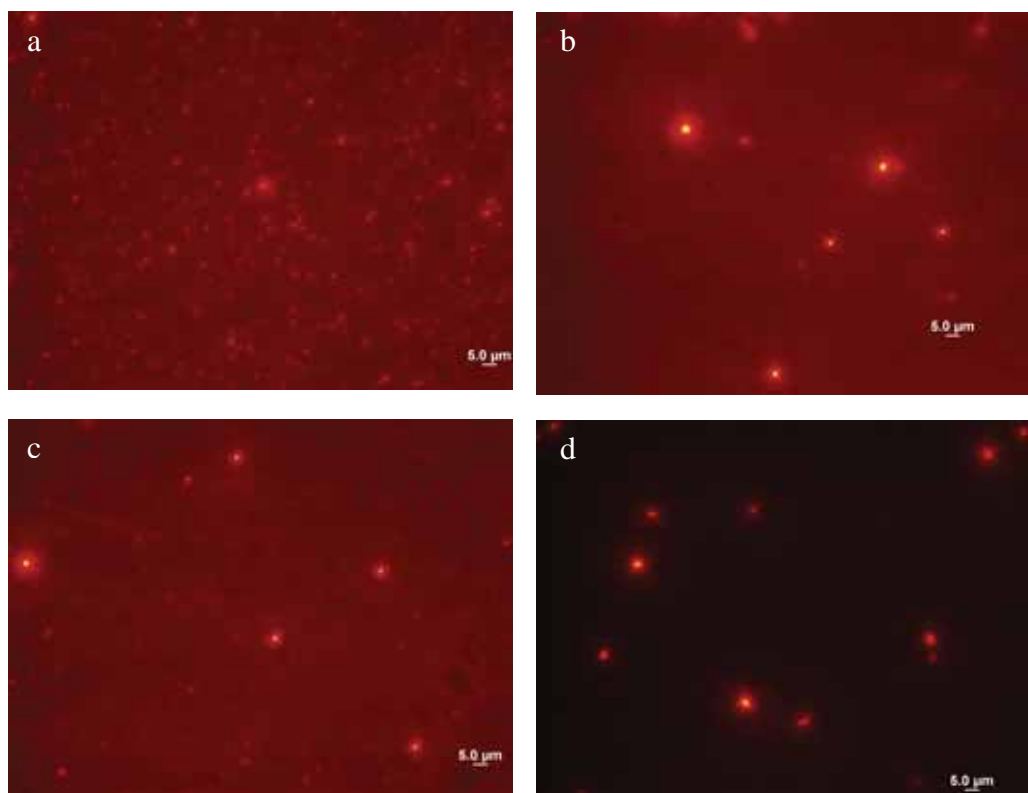


Figura 38 - Micrografias de nanopartículas de CH-PC₄₀-DNA marcado com rodamina: a) Em seguida, b) 1 dia, c) 1 semana e d) 1 mês após a preparação em pH 7,0