



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

Víctor Augusto dos Santos Jonas

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

São José do Rio Preto

2021

Víctor Augusto dos Santos Jonas

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

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

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Aparecida de Oliveira Tiera

São José do Rio Preto

2021

J76s

Jonas, Víctor Augusto dos Santos

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

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

68 f. : il., tabs.

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

Orientadora: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Víctor Augusto dos Santos Jonas

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

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Aparecida de Oliveira Tiera  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientadora

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

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eny Maria Vieira  
USP - Universidade de São Paulo - Câmpus de São Carlos

São José do Rio Preto  
7 de julho de 2021

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

## ABSTRACT

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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

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

## LISTA DE TABELAS

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

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

## SUMÁRIO

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

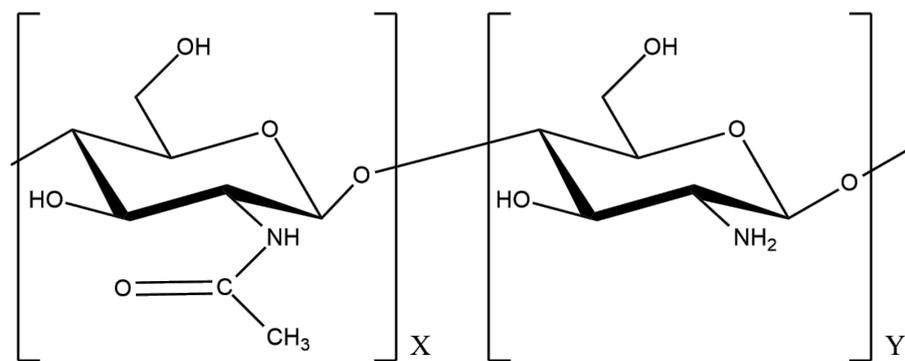
4.1 Caracterização da quitosana desacetilada: determinação do grau de desacetilação por potenciometria .....	34
4.2 Síntese das quitosanas com diisopropilaminoetil (DIPEA) .....	36
4.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de <sup>1</sup> H.....	38
4.4 Determinação da massa molar dos polímeros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

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Quitosana: Propriedades e Potencial como carreador de siRNA

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

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



Fonte: Elaborado pelo autor

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

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

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

**Tabela 1** - Exemplos de aplicações para a quitosana e derivados

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

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

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

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

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

## 1.2 Terapia Gênica

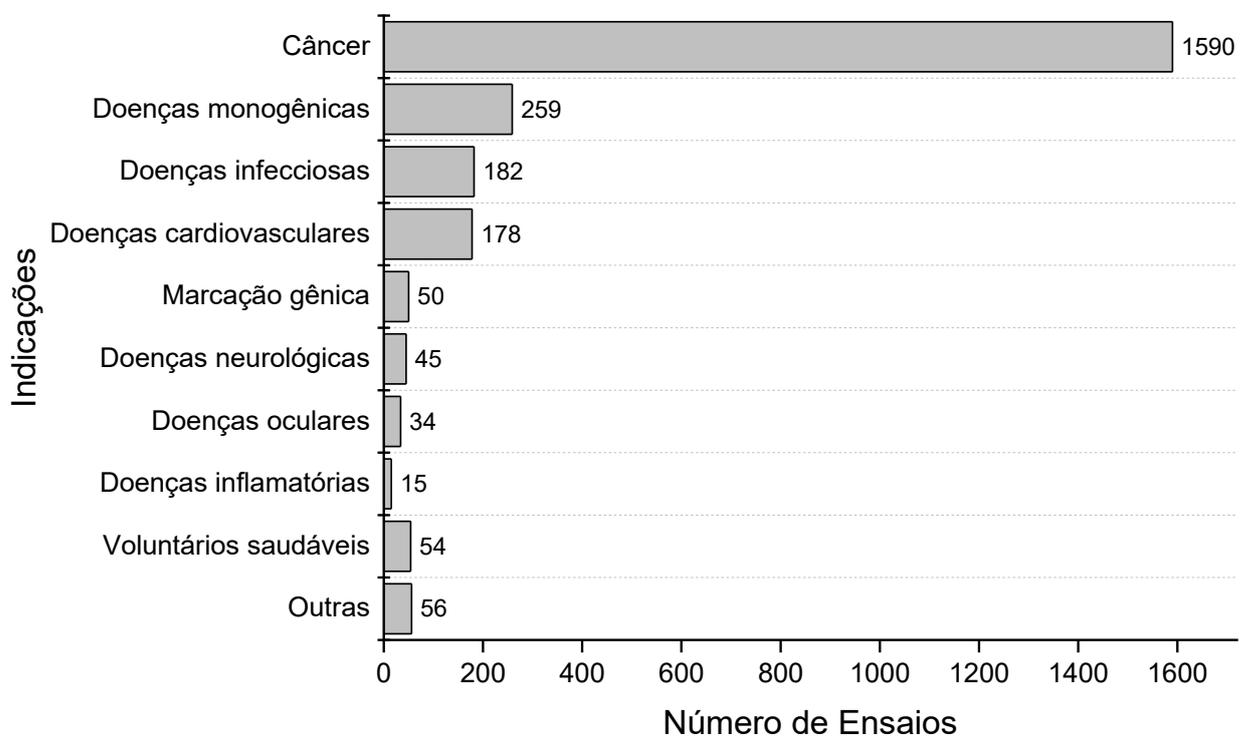
A terapia gênica pode ser definida como uma técnica de tratamento que se baseia na inserção de material genético em células do organismo com o objetivo de modificar genes defeituosos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças, e com isso, reduzir ou eliminar a doença (BALLY et al., 1997). O conceito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

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

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

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

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



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

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

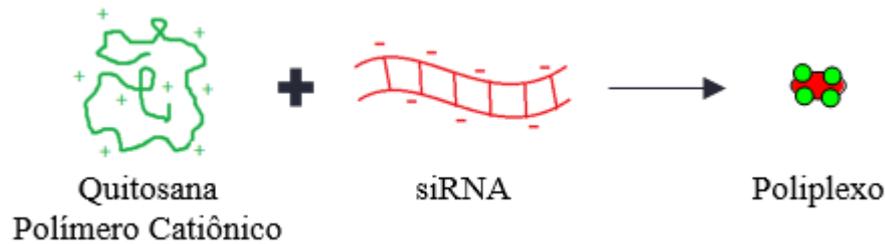
### 1.3 Vetores: viral e não-viral

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

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

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

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



Fonte: autoria própria

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

#### 1.4 Vetores para a terapia gênica baseados em quitosana

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

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

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

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

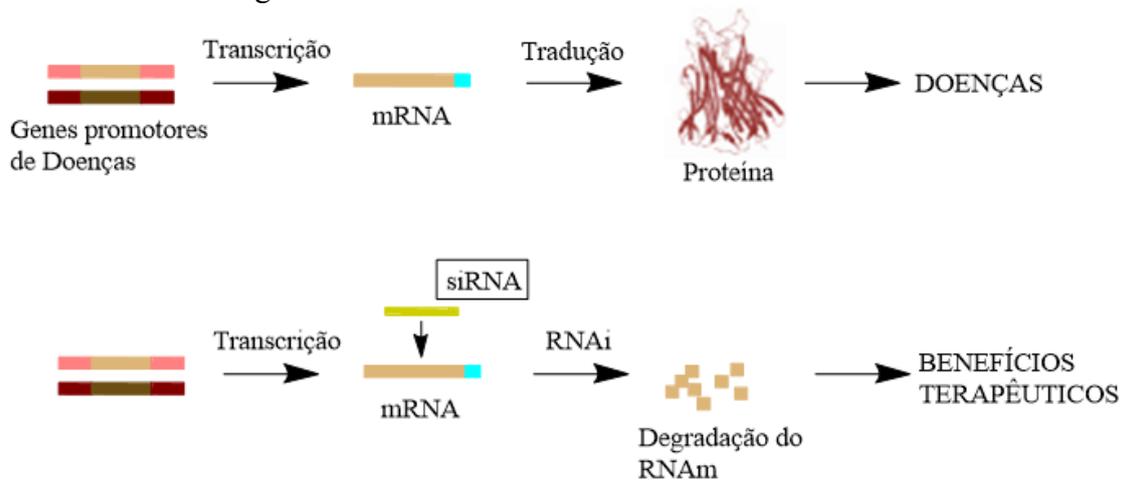
Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que a força de interação siRNA-policação pode ser ajustada variando-se a massa molar e o grau de substituição por grupos amino terciários. Na liberação de DNA plasmidial (pDNA), derivados de média massa molar (40 - 100 kDa) com graus de substituição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

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

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

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

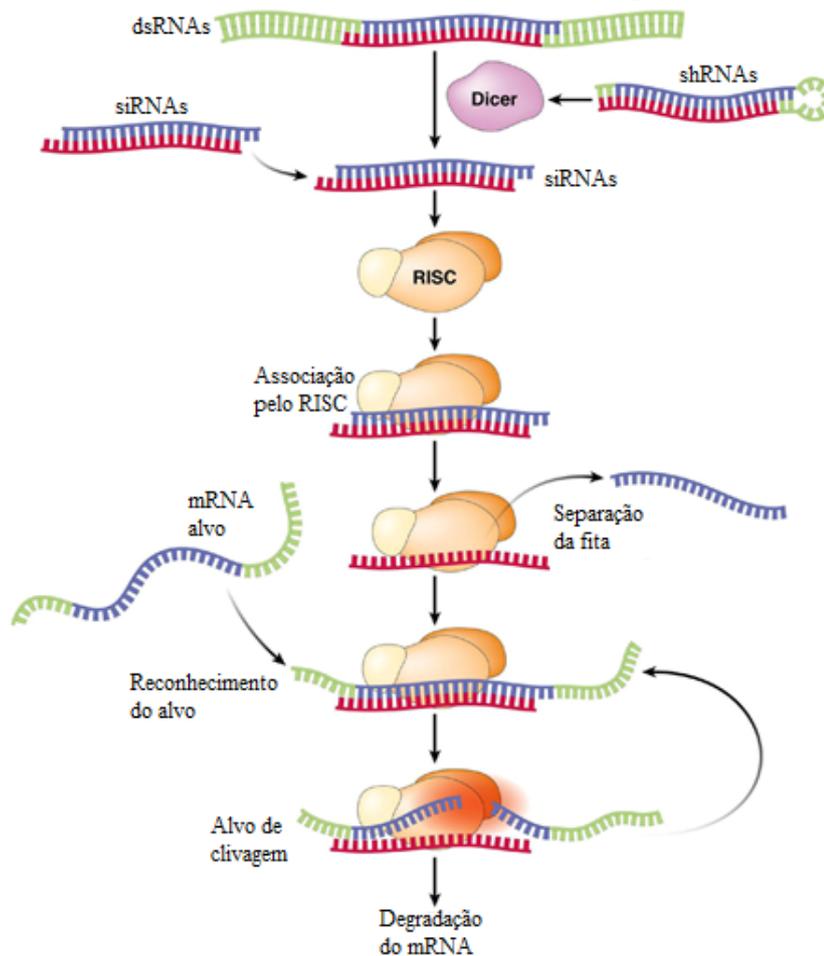
**Figura 4** - Processo de silenciamento gênico pós-transcricional capaz de suprimir a expressão de um determinado gene



Fonte: autoria própria

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

**Figura 5** - Mecanismo de interferência de RNA mediado por siRNA



Fonte: Adaptado de SKLAN; GLENN, 2007

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

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi a síntese e caracterização de derivados de quitosana com grupos amino diisopropilaminoetil, e o estudo da interação com RNA de interferência, visando avaliar o efeito do grau de substituição na força de interação e na capacidade de formação de poliplexos nanométricos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- i. Síntese e caracterização de derivados de quitosana de baixa massa molar modificados com DIPEA, variando grau de acetilação e grau de substituição;
- ii. Avaliar as propriedades físico-químicas dos derivados sintetizados e das nanopartículas;
- iii. Avaliar a citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas formadas com siRNA;
- iv. Avaliar o efeito do grau de substituição por DIPEA na eficiência de complexação e formação de nanopartículas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Os materiais utilizados na pesquisa estão listados na Tabela abaixo.

**Tabela 2** – Materiais e reagentes utilizados

Reagentes	Procedência
ABTS	Sigma-Aldrich Co.
Agarose	Sigma-Aldrich Co.
Brometo de Etídeo	Sigma-Aldrich Co.
Cloreto de Cálcio	Dinâmica
Cloreto de Deutério	Sigma-Aldrich Co.
Cloreto de Sódio	Dinâmica
DIPEA	Sigma-Aldrich Co.
Fosfato monobásico	Dinâmica
Hidróxido de Sódio	Dinâmica
Nitrito de Sódio	Dinâmica
Óxido de Deutério	Sigma-Aldrich Co.
Quitosana	Polymar Ind. Com. Ltda e Sigma-Aldrich Co.
Meio de Cultura Dulbecco (DMEM)	Sigma-Aldrich Co.
Membrana de MWCO	Thermo Scientific
Penicilina-Estreptomicina (PS)	Sigma-Aldrich Co.
Persulfato de Potássio	Synth
siRNA anti-TNF- $\alpha$	GE Healthcare Dharmacon, Inc.
Soro Fetal Bovino	Sigma-Aldrich Co.
Tampão fosfato pH 6,3 e 7,4	-
Tampão fosfato salino (PBS)	-
Tampão tris-amino-EDTA	-
Tripsina-EDTA	Sigma-Aldrich Co.

Fonte: Dados da pesquisa

A água utilizada na preparação dos experimentos foi deionizada em um sistema purificador de água da Gehaka modelo DG-500. As células utilizadas para o ensaio de citotoxicidade foram fibroblastos da linhagem 3T3/NIH (ATCC) e macrófagos da linhagem RAW 264.7 (Banco de Células do Rio de Janeiro). Também foi utilizado o *kit* comercial CellTiter96® *Aqueous One Solution* (Promega Corporation) para os estudos de citotoxicidade *in vitro*.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Desacetilação da quitosana

A quitosana comercial de partida foi adquirida da Polymar Ltda com grau de desacetilação de 76%, determinada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de  $^1\text{H}$  e massa molar de 338,5 kDa, determinada por Cromatografia de Permeação em Gel. A reação de desacetilação é uma reação de hidrólise básica de amida (KURITA et al., 1993; TOLAIMATE et al., 2000) e foi realizada, solubilizando-se 20 gramas de quitosana comercial em 980 mL de água deionizada e 20 mL de ácido acético glacial. Após a solubilização completa, a solução foi transferida para um balão de reação equipado com condensador, termômetro e submetido a atmosfera de  $\text{N}_2$ . O aquecimento da solução foi feito por meio de uma manta aquecedora, e na temperatura de  $90^\circ\text{C}$ , 250 mL de uma solução concentrada de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ )  $23,5\text{ mol L}^{-1}$  foi adicionada para obtenção de uma suspensão do polímero. A reação ocorreu em sistema de refluxo com atmosfera de nitrogênio por 90 minutos em temperatura de  $95^\circ\text{C}$ . Ao final, a solução foi transferida para um béquer de 4 litros e lavada com água deionizada duas vezes ao dia até atingir pH próximo de neutro. Em seguida, o polímero foi recuperado por filtração e todo o processo anterior repetido com o objetivo de se obter uma quitosana com o maior grau de desacetilação possível. O sólido resultante foi recuperado por filtração, e colocado para secar em liofilizador. A água residual do processo de lavagem da quitosana foi tratada antes do descarte. O novo grau de desacetilação da quitosana, agora denominada quitosana desacetilada (ChD) foi determinado por titulação potenciométrica e confirmado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de  $^1\text{H}$ .

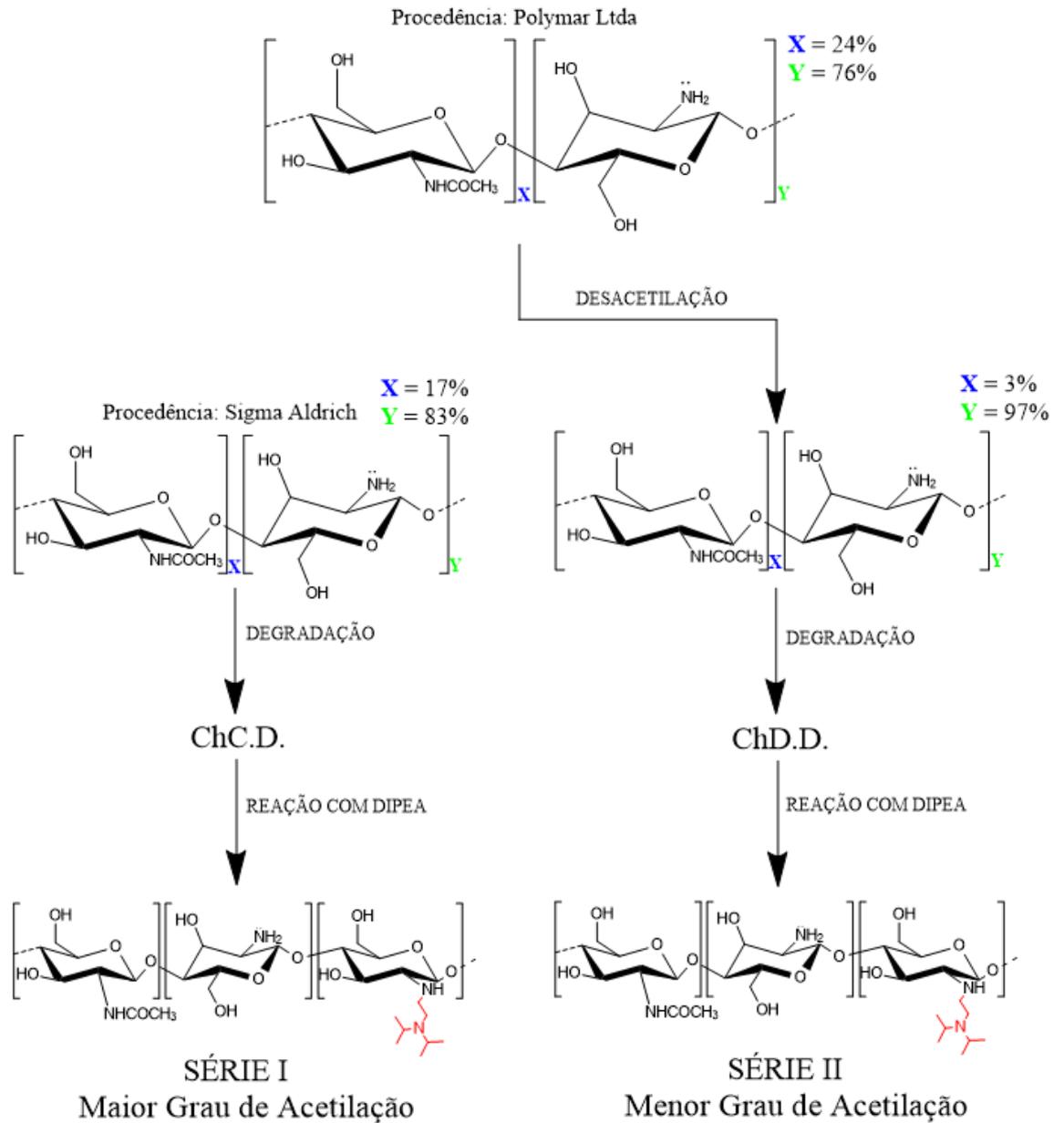
### 3.2.2 Degradação da quitosana comercial e da quitosana desacetilada

A reação de degradação da quitosana foi realizada por oxidação com nitrito de sódio (TØMMERAAS et al., 2001). 15 gramas de quitosana comercial de baixa massa molar da Sigma Aldrich foi solubilizada em 865 mL de solução de ácido acético 2% v/v por 24 horas. A solução foi mantida em agitação por fluxo de gás nitrogênio por 1 hora sob agitação constante e resfriadas a 4 °C. Em seguida, uma solução de 45 mL contendo 574,0 miligramas de nitrito de sódio foi vertida na solução de quitosana. Agitou-se por 24 horas em uma temperatura de 9° C dentro da geladeira. O polímero degradado foi dialisado no primeiro dia contra uma solução de hidróxido de sódio 0,05 molar e no segundo dia em diante com água deionizada, sendo recuperados no final por liofilização. O mesmo procedimento foi feito com a quitosana da Polymar Ltda desacetilada anteriormente no item 3.1. A quitosana comercial degradada (ChC.D.) foi utilizada na Série I de reações e a quitosana desacetilada degradada (ChD.D.) faz parte da Série II de reações.

### 3.2.3 Modificação da quitosana com diisopropilaminoetil (DIPEA) em meio aquoso: séries I e II

A reação foi conduzida utilizando-se cloridrato de 2-cloroetil-diisopropilamina (DIPEA-Cl) em procedimento adaptado ao descrito por Oliveira et al., 2013. Inicialmente, a quitosana foi solubilizada com quantidade estequiométrica de ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Após a solubilização, a solução foi aquecida a 70 °C, sob agitação constante, e teve seu pH elevado para 8,0, por meio da adição de uma solução de NaOH 5 mol L<sup>-1</sup>. Sob essas condições o sal de DIPEA-Cl foi dissolvido na solução, e o pH ajusto em 8 e controlado durante todo o tempo de reação. Após 1 hora e 30 minutos, o aquecimento e a agitação foram interrompidos e a solução foi resfriada em temperatura ambiente. A mistura foi transferida para uma membrana de diálise com massa molecular de corte (MWCO) igual a 3,5 kDa e dialisada por 5 dias contra água deionizada. Por fim, o produto foi liofilizado, e o derivado obtido como um pó branco. A quitosana comercial degradada (ChC.D.) e a quitosana desacetilada degradada (ChD.D.) foram ambas substituídas com DIPEA em 8 diferentes proporções obtendo-se duas séries, a primeira série tendo um grau de acetilação maior e a segunda série um grau de acetilação menor como mostrado na Figura 6.

**Figura 6** - Reações da quitosana comercial e da quitosana desacetilada



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.2.4 Determinação do grau de desacetilação (GD) das quitosanas por titulação potenciométrica

O grau de desacetilação foi determinado como descritos por Tolaimate et al., (2000) utilizando-se a potenciometria. Para esse processo, uma massa de 40 mg de quitosana desacetilada, previamente seca, foi dissolvida em 10 mL de ácido clorídrico padronizado

(0,0954 M). Essa solução foi titulada com solução de hidróxido de sódio padronizado (0,1002 M), monitorando-se o pH com o auxílio de um pHmetro.

### 3.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN $^1\text{H}$

As amostras dos derivados de quitosana foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$  e preparadas pela solubilização de aproximadamente 5 mg do polímero, previamente seco em estufa à vácuo, em 700  $\mu\text{L}$  de óxido de deutério (água deuterada) e 20  $\mu\text{L}$  de cloreto de deutério, a solução permaneceu sob agitação até sua solubilização completa. Após isso, as soluções foram transferidas para tubos de RMN de  $^1\text{H}$  para que a análise fosse feita. Os espectros foram obtidos na temperatura de 70  $^\circ\text{C}$  sem supressão de água. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados no laboratório Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos – USP.

### 3.2.6 Determinação da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel – GPC

Medidas de cromatografia de permeação em gel foram realizadas para a determinação da massa molar numérica média ( $\bar{M}_n$ ), massa molar ponderal média ( $\bar{M}_w$ ) e da polidispersividade ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ ). Os polímeros foram preparados em solução tamponante de ácido acético (0,3 mol  $\text{L}^{-1}$ ) / acetato de sódio (0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ ) em pH 4,5 sob agitação por 3 dias até completa solubilização e, depois, filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  antes da análise (TIERA et al., 2006). Duas colunas em série (SB-803 HQ e SB-805- SHODEX) com tamanhos de 8 mm x 300 mm e vazão de 0,8 mL/min foram utilizadas para a análise das amostras. O padrão utilizado para calibração foi o Pullulan de massas moleculares de 805 kDa a 6,2 kDa. As análises de cromatografia de permeação em gel foram realizadas em um HPLC Shimadzu LC-20A com detector de índice de refração Shimadzu RID-10A do Laboratório de Fotoquímica da Prof. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos – USP.

### 3.2.7 Determinação do grau de ionização dos polímeros

Os graus de ionização foram obtidos por titulação potenciométrica e permitiram avaliar a densidade de cargas positivas em função do pH (TIERA et al., 2006). Uma massa de 40 mg

do polímero foi solubilizada em 10 mL de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e titulada com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, sendo o pH medido após cada adição de alíquotas de 100 µL no início da titulação e após o pH variar mais que 0,3 as alíquotas foram de 50 µL em 50 µL para maior precisão dos cálculos. O grau de ionização foi calculado utilizando-se o gráfico da primeira derivada da titulação e a equação 1 abaixo,

$$\alpha = 1 - \left( \frac{V_x - V_i}{V_f - V_i} \right) \quad (1)$$

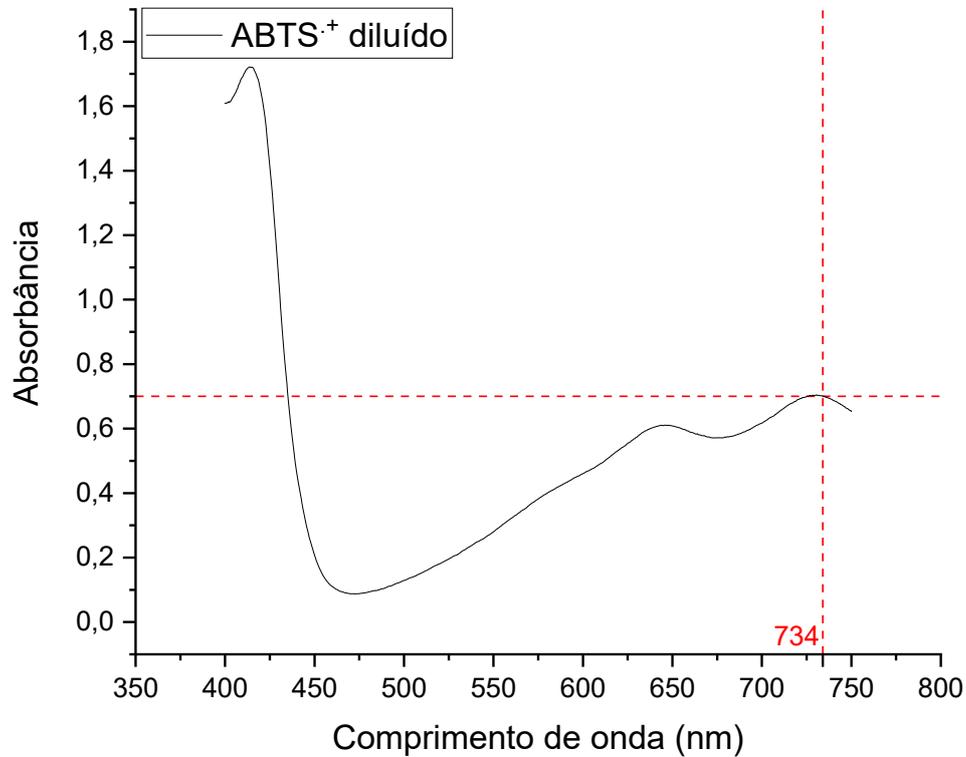
Sendo V<sub>i</sub> o volume inicial (o primeiro pico do gráfico da derivada), que corresponde ao início da desprotonação, ou seja 100% dos grupos amino estão protonados, V<sub>f</sub> corresponde ao volume do 2º pico no gráfico da derivada (todos os grupos aminos estão desprotonados), e V<sub>x</sub> corresponde aos volumes intermediários, compreendidos entre os dois picos.

### 3.2.8 Atividade antioxidante

O procedimento para analisar a atividade antioxidante das quitosanas e dos derivados foi realizado com o radical ABTS<sup>•+</sup>. O método foi descrito por (DUY et al., 2013) e para os testes, 2 mL de uma solução de ABTS (7,4 mM) foi adicionado a 2 mL de uma solução de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (2,6 mM) com o objetivo de gerar o cátion radical ABTS<sup>•+</sup>. A mistura foi deixada no escuro por no mínimo 16 horas para se obter uma solução de coloração verde azulada com oxidação estável. As soluções de quitosana e os derivados foram preparadas em ácido acético (2% v/v) e mantidas sob agitação por 16 horas. As soluções estoques na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>, e, foram transferidas para a obtenção de soluções na faixa de 0,1 a 1,5 g L<sup>-1</sup> (0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 g L<sup>-1</sup>).

Após as 16 horas, a solução de ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em uma solução de ácido acético (2% v/v) até o valor de referência de absorvância de 0,7 no comprimento de onda de 734 nm (Figura 7) obtido por um Espectrofotômetro Biochrom Libra S60.

**Figura 7** - Espectro de absorção do ABTS<sup>•+</sup> + diluído



Fonte: Elaborado pelo autor

O ABTS<sup>•+</sup> apresenta uma coloração azulada, com picos máximos de absorbância 645 nm, 734 nm (valor analisado) e 815 nm. O radical é consumido a medida que a doação do elétron acontece com atuação do antioxidante na solução (RE et al., 1999).

As alíquotas das soluções dos polímeros preparadas anteriormente foram adicionadas em uma cubeta juntamente com a solução de ABTS<sup>•+</sup>. A leitura da absorbância foi feita para todas as concentrações citadas e analisadas de 5 em 5 minutos até o tempo de 10 minutos, com exceção da concentração de 0,75 g L<sup>-1</sup> em que foi analisada até o tempo final de 30 minutos. As soluções inicialmente de cor verde azulada são descoradas com a eliminação dos radicais livres ABTS<sup>•+</sup>, com o conseqüente decréscimo da absorbância inicial de 0,7.

A partir dos dados, construiu-se o primeiro gráfico da absorbância versus concentração e um segundo gráfico de absorbância versus tempo para todos os polímeros. Além disso, aplica-se a equação (2):

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{A_0 - A_1 - A_2}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

Sendo  $A_0$  a absorvância controle (0,7),  $A_1$  a absorvância das amostras e  $A_2$  a absorvância do branco (solução de ácido acético). No final, tem-se um terceiro gráfico com os valores da atividade antioxidante em porcentagem. O ácido L-ascórbico (Vitamina C) foi usado como referência nos testes, já que o mesmo apresenta uma boa atividade antioxidante como referência em estudos.

### 3.2.9 Preparação das nanopartículas de siRNA

As nanopartículas foram preparadas em soluções tampão de fosfato pH 7,4 e pH 6,3, com concentração de 50 mM e força iônica de 150 mM. Inicialmente, preparou-se as soluções estoque em microtubos, solubilizando 2 mg dos polímeros em 200  $\mu\text{L}$  de HCl 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , seguido da adição de 1,8 mL da solução tamponante, obtendo-se um volume final de 2 mL. Em seguida, fixou-se a quantidade de siRNA TNF $\alpha$  dependendo do tipo de caracterização realizada e adicionou-se diferentes volumes da solução estoque de polímero preparada anteriormente de modo a formar poliplexos em diferentes razões N/P: 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 e 20 utilizadas nesse estudo. Onde, N corresponde ao número total dos grupos amins dos polímeros e P corresponde o total dos grupos fosfato no montante de ácido nucleico (siRNA). As nanopartículas foram preparadas pela complexação que acontece na interação entre os grupos amino da quitosana (carga positiva) com os grupos fosfato do siRNA (carga negativa).

### 3.2.10 Eletroforese em gel de agarose

Este experimento permite avaliar a força de interação e estabilidade dos poliplexos formados com os diferentes polímeros, possibilitando uma análise qualitativa do efeito do grau de substituição, e das razões de carga N/P utilizadas. Para o preparo da solução dos poliplexos, fixou-se a quantidade de siRNA em 0,5  $\mu\text{g}$  e o volume final das soluções dos poliplexos em 10  $\mu\text{L}$ , sendo que destes, 1,6  $\mu\text{L}$  são da solução corante de carregamento de coloração azul. As razões N/P utilizadas nesse estudo foram de 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 e 20.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose com a dissolução de 0,2 gramas em 25 mL de TAE 1X (tampão Tris-Acetato-EDTA), seguido da adição de 10  $\mu\text{L}$  de brometo de etídeo (concentração de 10 g  $\text{L}^{-1}$ ). Após a solidificação do gel, aplicou-se 10  $\mu\text{L}$  das soluções dos poliplexos nos poços, e a corrida foi realizada por 75 minutos a 90 V em cuba de 8,5 cm x 6 cm x 0,5 cm (comprimento x largura x altura). O tampão TAE 1X foi empregado como condutor

elétrico durante a corrida e o corante de carregamento facilitou o rastreamento visual da migração do siRNA durante a eletroforese. Após a corrida, o gel foi revelado em um transiluminador UV.

### 3.2.11 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta

Neste estudo, a quantidade de siRNA foi fixada em 5 µg e o volume final da solução dos poliplexos em 1 mL. Analisou-se o diâmetro hidrodinâmico e o potencial Zeta dos poliplexos nas razões N/P 1, 3, 5, 10 e 20. As soluções foram preparadas em duplicata, sendo cada medição realizada em triplicata no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instrument). Os resultados de diâmetro hidrodinâmico (Dh) foram expressos com base na média-Z. O potencial Zeta das nanopartículas em suspensão foi avaliado no mesmo equipamento, utilizando cubeta específica (*Folded Capillary Zeta Cell*) para análise. Todas as medições foram realizadas em uma câmara fechada com temperatura controlada de 25 °C. Os valores das triplicatas, tanto de tamanho como de potencial Zeta das nanopartículas, foram obtidos diretamente do *software* Zetasizer do equipamento.

### 3.2.12 Citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas

Os ensaios de citotoxicidade dos polímeros foram realizados a partir do método colorimétrico com MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) para analisar a viabilidade celular dos polímeros com a cultura de células de fibroblastos de camundongo 3T3/NIH e para a viabilidade celular das nanopartículas com a cultura de células RAW 264.7. A viabilidade celular foi conduzida conforme recomendações do fabricante pelo *kit* CellTiter96® *Aqueous One Solution*. O ensaio da citotoxicidade é realizado em 3 etapas, cada uma feita em um dia: no primeiro dia, realizou-se a contagem das células na câmara de Neubauer e diluiu-se a quantidade necessária para possuir  $1 \times 10^4$  células por poço, foram incubadas por 24 horas em 200 µL/poço de DMEM (*Dulnecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de FBS (soro fetal bovino) e 1% penicilina (PS), nas seguintes condições: 37° C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. Já no segundo dia, o meio completo foi retirado e adicionou-se as soluções de polímero em diferentes volumes a fim de obter as concentrações finais desejadas (0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 mg mL<sup>-1</sup>), e permaneceu nas mesmas condições anteriores da incubadora por mais 24 horas.

Por fim, no último dia do procedimento, retirou-se as soluções de polímero da placa e adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  DMEM e 20  $\mu\text{L}$  MTS por poço. A manipulação foi feita no escuro durante o processo por conta de o MTS ser sensível à luz. Em seguida, incubou-se por 3 horas, e após, foi realizada a leitura da absorbância em 490 nm, em um leitor de microplacas *Biotek Elx 808*, o programa utilizado na leitura foi o *Gen5*. A viabilidade celular foi calculada ajustando-se as células sem tratamento (controle) como 100%. O teste foi realizado em triplicata para análise de dados. Os polímeros analisados foram da série I e II.

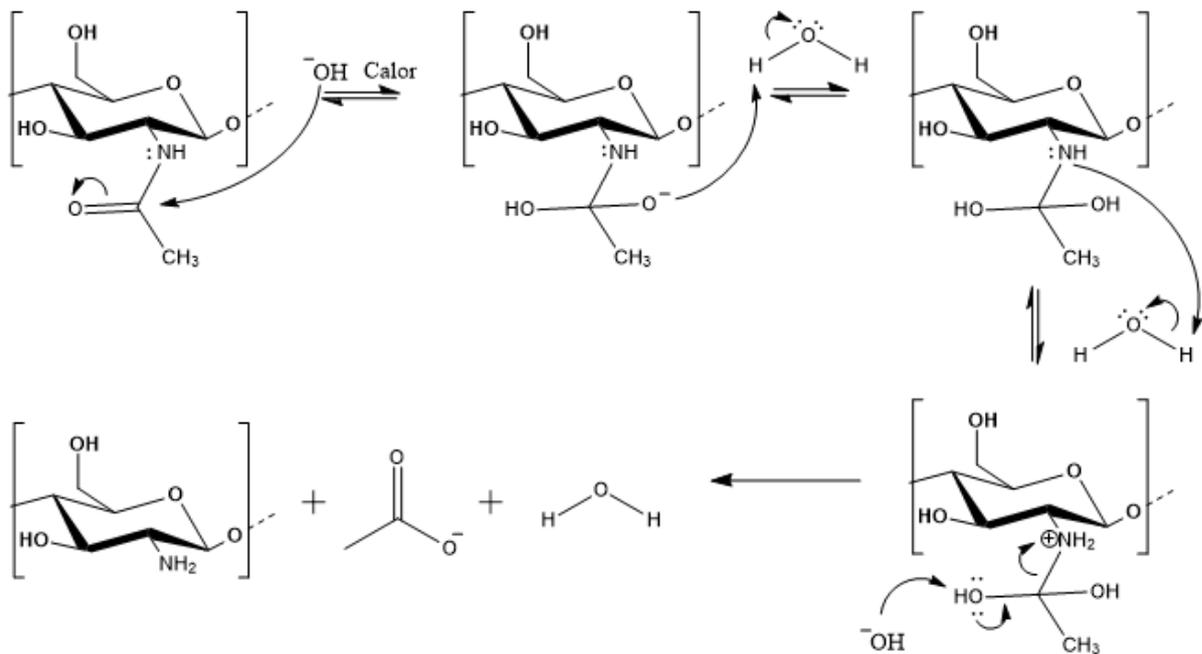
A viabilidade celular na presença das nanopartículas foi realizada modo análogo à viabilidade celular dos polímeros descrito anteriormente. Para a preparação dos poliplexos, a quantidade de siRNA foi fixada em 0,55  $\mu\text{g}$  e o volume da solução dos poliplexos em 50  $\mu\text{L}$  por poço. Em seguida, 150  $\mu\text{L}$  de meio completo foram aplicados sobre as células para a continuação do experimento. As razões N/P estudadas foram: 1, 3, 5, 10, 20 e 50 para os polímeros menos substituídos da série I e da série II (ChC.D.21DI; ChC.D.37DI; ChD.D.14DI e ChD.D.45DI). Controles de siRNA livre e tampão fosfato pH 6,3, preparados e aplicados sob as mesmas condições dos poliplexos, também foram empregados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da quitosana desacetilada: determinação do grau de desacetilação por potenciometria

A quitosana comercial da Polymar Ltda (massa molar de 338 kDa e grau de desacetilação de 76%) foi submetida ao processo de desacetilação com objetivo de aumentar a proporção de grupos amina. O mecanismo de reação está representado na Figura 8.

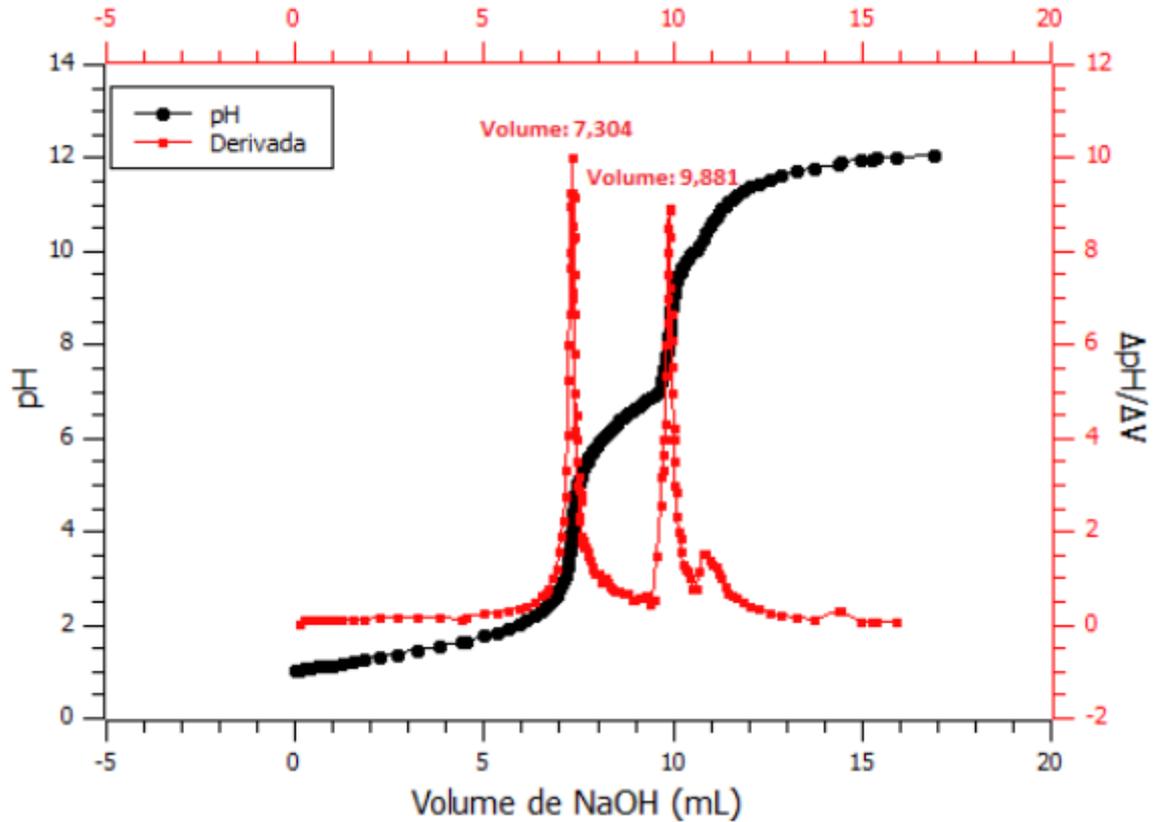
**Figura 8** - Reação de hidrólise básica da quitosana



Fonte: Elaborado pelo autor

A titulação potenciométrica foi realizada para a determinação do grau de desacetilação. Os polímeros foram dissolvidos em excesso de solução aquosa de ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ )  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução ácida promove a protonação dos grupos aminos, gerando cargas positivas (SHUKLA et al., 2013). A adição de solução aquosa padronizada de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ )  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , e a neutralização do ácido, e dos grupos amina geram os dados de pH vs volume de base (Figura 9). O primeiro pico da derivada corresponde à neutralização do excesso de  $\text{H}^+$  na solução, proveniente do excesso de  $\text{HCl}$  usado para solubilizar a quitosana, e o segundo pico corresponde à desprotonação total dos grupos aminos.

**Figura 9** - Gráfico da titulação potenciométrica da quitosana desacetilada



Fonte: Dados da pesquisa

A diferença entre esses dois picos corresponde ao volume de NaOH necessário para a desprotonação dos grupos amino, o que permite calcular o número de mols de unidades desacetiladas. Para o cálculo do grau de desacetilação (GD) foram utilizadas as equações 4 e 5:

$$GD = \left( \frac{\eta_{VD}}{\eta_{VD} + \eta_{VA}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

$$GD = \left\{ \frac{M_{NaOH} \times V_{NaOH}}{M_{NaOH} \times V_{NaOH} + \left[ \frac{m_t - (M_{NaOH} \times V_{NaOH} \times 161,22)}{203,40} \right]} \right\} \times 100\% \quad (5)$$

Onde:

$\eta_{VD}$  é o número de mols de unidades desacetiladas;

$\eta_{VA}$  é o número de mols de unidades acetiladas;

$M_{NaOH}$  é a concentração em quantidade de matéria de NaOH;

$V_{\text{NaOH}}$  (L) o volume da solução de NaOH usado para neutralizar as unidades protonadas da quitosana, e;

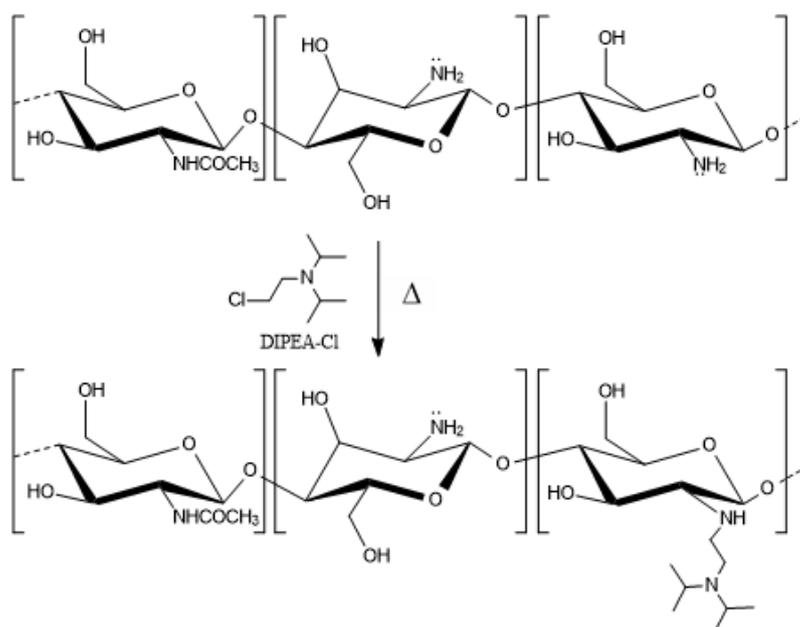
$m_t$  é a massa total de quitosana utilizada na titulação.

A partir das equações anteriores e os parâmetros acima descritos, o grau de desacetilação obtido foi de aproximadamente 97%. Com os resultados da titulação potenciométrica foi possível concluir que o processo de desacetilação foi eficiente com um aumento de 21% no grau de desacetilação, ou seja, de 76% da quitosana de partida para 97% após o procedimento.

#### 4.2 Síntese das quitosanas com diisopropilaminoetil (DIPEA)

As quitosanas ChC.D. e ChD.D. foram submetidas às reações de substituição com os grupos DIPEA e o esquema para reação é descrito na Figura 10.

**Figura 10** - Esquema de reação para a substituição das quitosanas degradadas com DIPEA

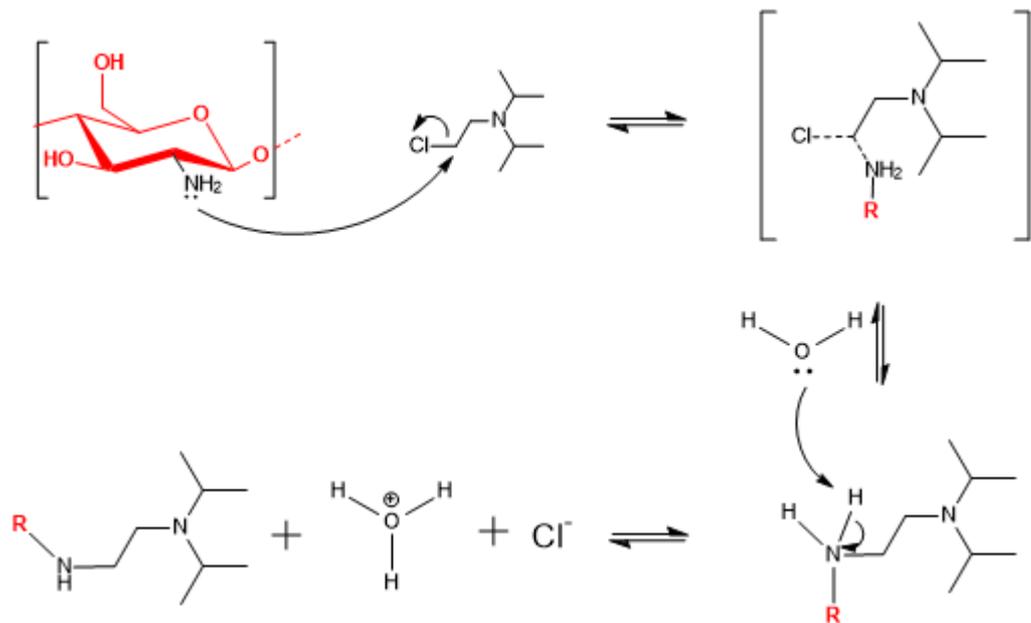


Fonte: Elaborado pelo autor

A reação da quitosana com o 2-cloroetil-di-isopropilamina (DIPEA) é uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S<sub>N</sub>2) que deve ser realizada em meio ligeiramente alcalino para permitir o ataque nucleofílico (Figura 11), portanto o pH do meio reacional foi mantido em 8,0 com adições de NaOH ao longo de toda reação. Na síntese, como o sistema reacional apresenta pH 8 e alguns derivados foram submetidos a altas proporções de DIPEA

com intuito de se obter alto grau de substituição, pode haver a inserção de frações de DIPEA na hidroxila ligada ao carbono 6, por meio da formação de um éter, entretanto como reportado por Martinez Junior a inserção de grupos DIPEA nas hidroxilas não atingiu mais do que 6%. No entanto, é esperado que o principal sítio para substituição seja a amina primária ligada ao carbono 2, uma vez que ela é o sítio reativo onde ocorre a maioria das reações químicas envolvendo a quitosana, principalmente em pH não elevado, resultando na formação de uma amina secundária. Ambas as reações são de substituição nucleofílica bimolecular como descrito.

**Figura 11** - Mecanismo de reação de substituição nucleofílica bimolecular entre quitosana e o substituinte DIPEA



Fonte: Elaborado pelo autor

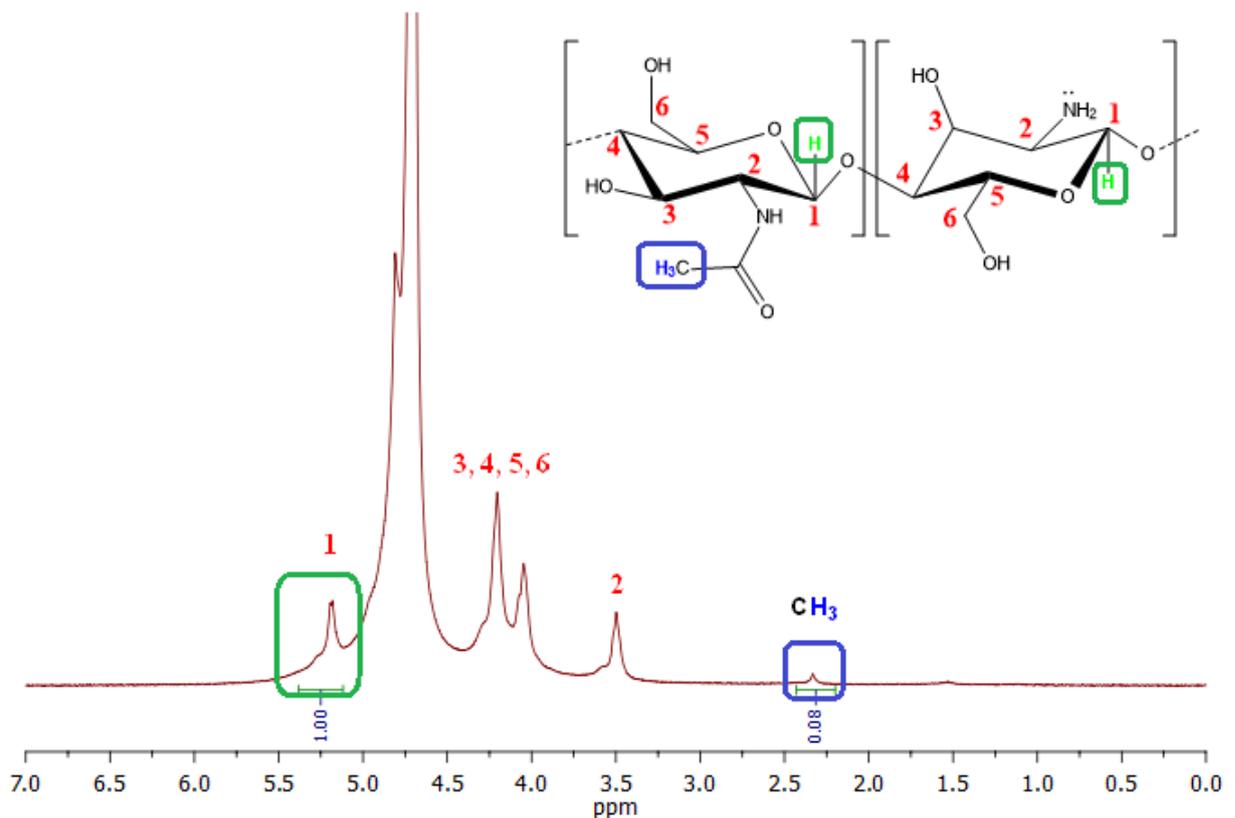
Na Figura 11, o 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose (representado em vermelho na Figura) foi trocado pela letra “R” ao longo do mecanismo para questão de ilustração.

A quitosana comercial degradada (ChC.D.) foi submetida a quatro reações com proporções de DIPEA com intuito de se obter diferentes graus de substituição. O mesmo foi feito para a quitosana desacetilada degradada (ChD.D.). Após as substituições, os derivados receberam a notação “DI” juntamente com um número indicando seu grau de substituição.

### 4.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de $^1\text{H}$

O RMN de  $^1\text{H}$  foi utilizada para determinar os graus de desacetilação das quitosanas (ChC e ChD), bem como a composição dos derivados com DIPEA. O espectro da quitosana desacetilada obtido a partir da quitosana comercial da Polymar Ltda está apresentado na Figura 12. O sinal característico em 5,2 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono 1 anomérico, o hidrogênio ligado ao carbono 2 (aparece como um sinal em 3,5 ppm) e os hidrogênios do grupo acetamido apresentam um sinal em 2,3 ppm. Além desses, o espectro apresenta sinais entre 4,0 e 4,3 ppm que correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6.

**Figura 12** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana desacetilada (ChD) a partir da quitosana comercial (ChC)

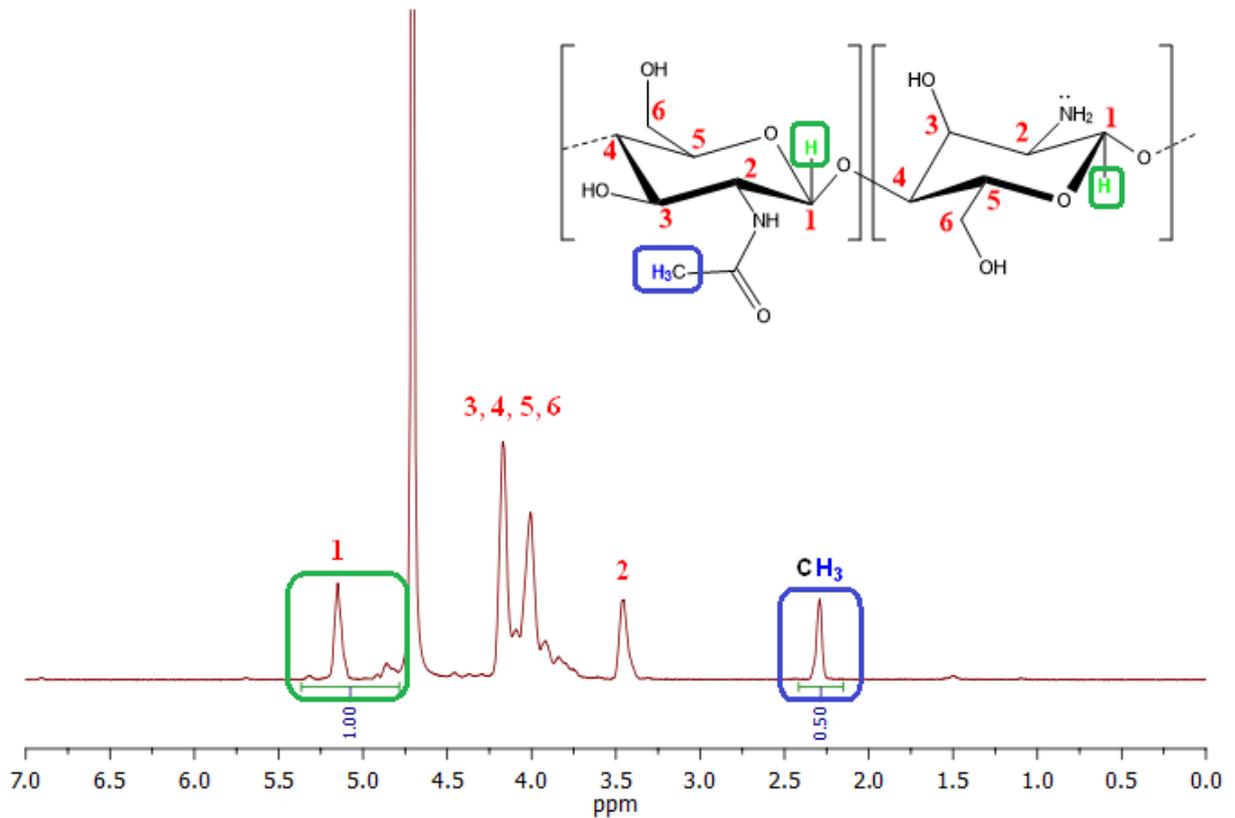


Fonte: Dados da Pesquisa

Com os valores destacados dos hidrogênios dos sinais em 5,2 (H) e 2,3 (H<sub>3</sub>) ppm, o grau de desacetilação para ChC e ChD foram estimados utilizando a Equação 6:

$$GD (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{I_{H3}}{3I_H} \right) \right] \times 100 \quad (6)$$

**Figura 13** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana comercial (ChC)

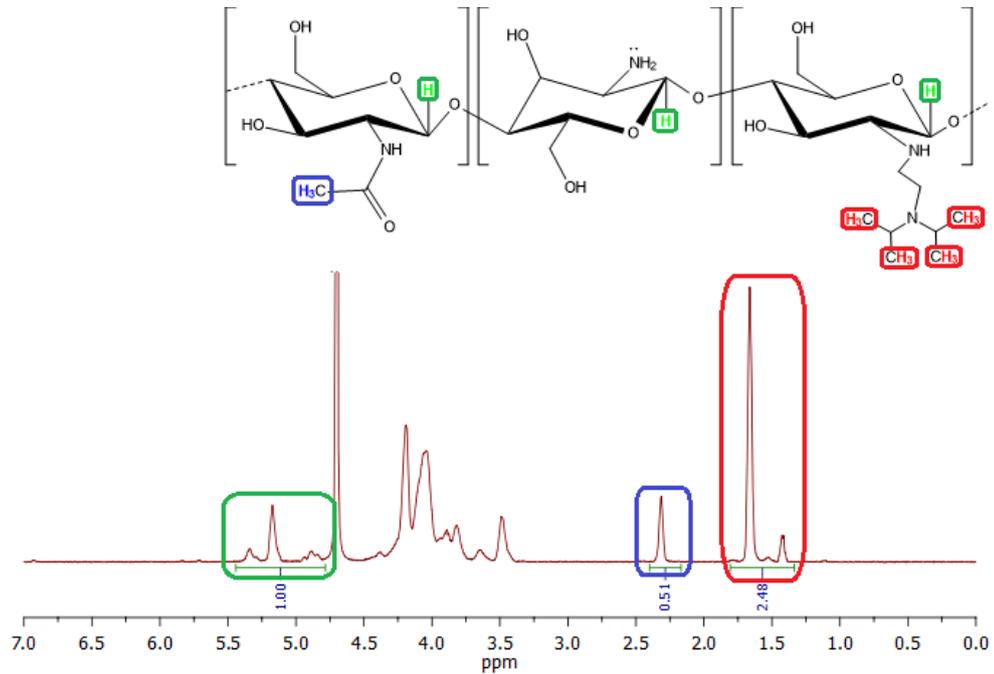


Fonte: Dados da Pesquisa

Os graus de desacetilação para a quitosana comercial (ChC) e para a quitosana desacetilada (ChD) foram de 83,3% e 97,3%, respectivamente.

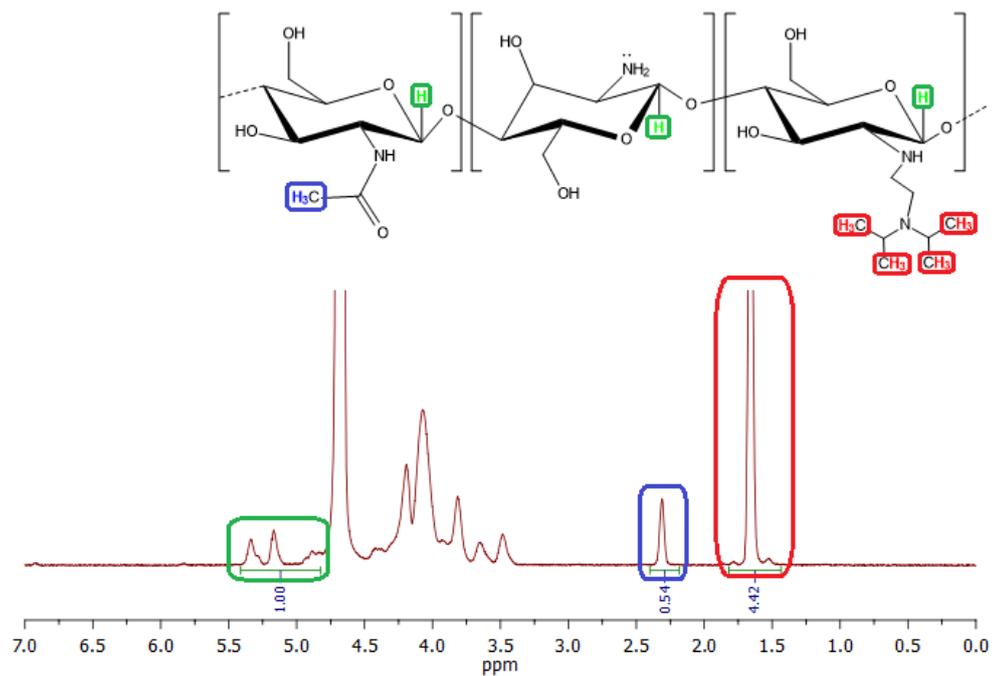
A substituição com grupos DIPEA dá origem a novos sinais no espectro e mudanças são observadas na absorção dos hidrogênios ligados ao carbono 1 anomérico

**Figura 14** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do primeiro derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChC.D.



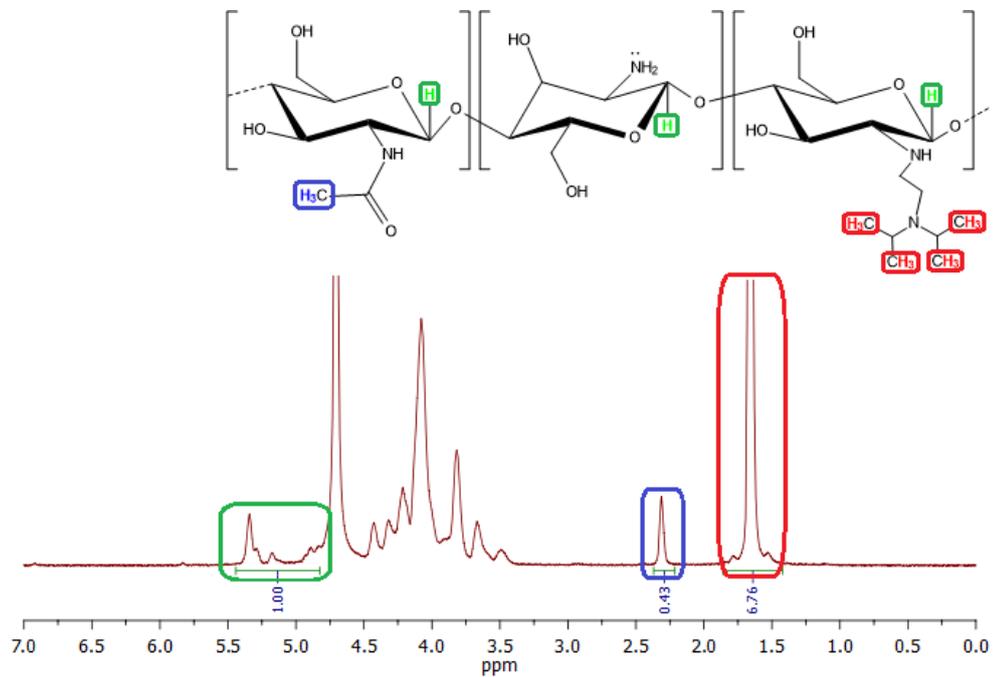
Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 15** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do segundo derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChC.D.



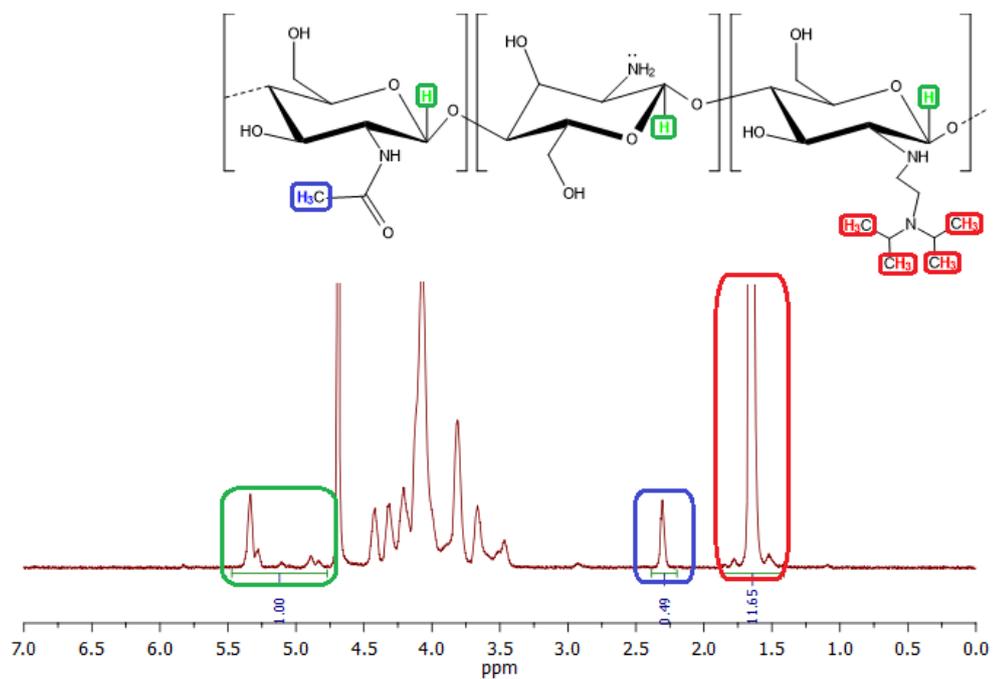
Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 16** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do terceiro derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChC.D.



Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 17** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do quarto derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChC.D.



Fonte: Dados da pesquisa

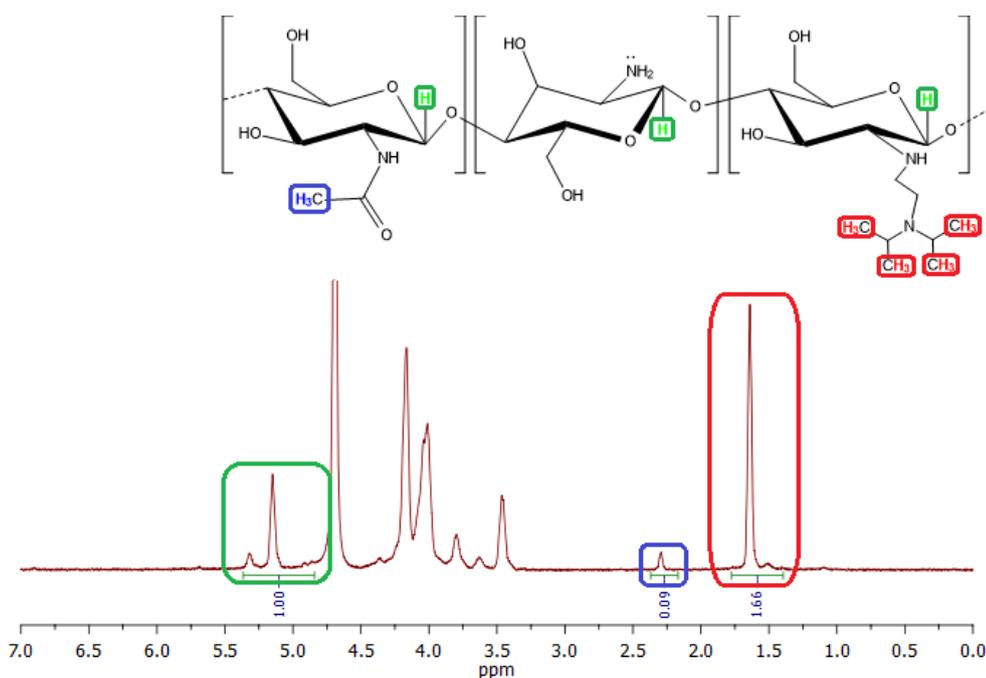
É possível observar das Figuras 14 até 17 um novo sinal no 1,4 ppm referentes aos hidrogênios dos grupos metila de DIPEA. Na estrutura geral é possível observar as unidades que se repetem ao longo da cadeia. Essas unidades dão origem a 3 sinais que se referem aos hidrogênios do carbono 1 anomérico e o aumento da intensidade em 5,4 ppm reflete o aumento no grau de substituição por DIPEA.

O grau de substituição pode ser calculado a partir da integração dos sinais destacados, utilizando-se a equação 7:

$$GS (\%) = \left( \frac{I_{H_{12}}}{12I_H} \right) \times 100 \quad (7)$$

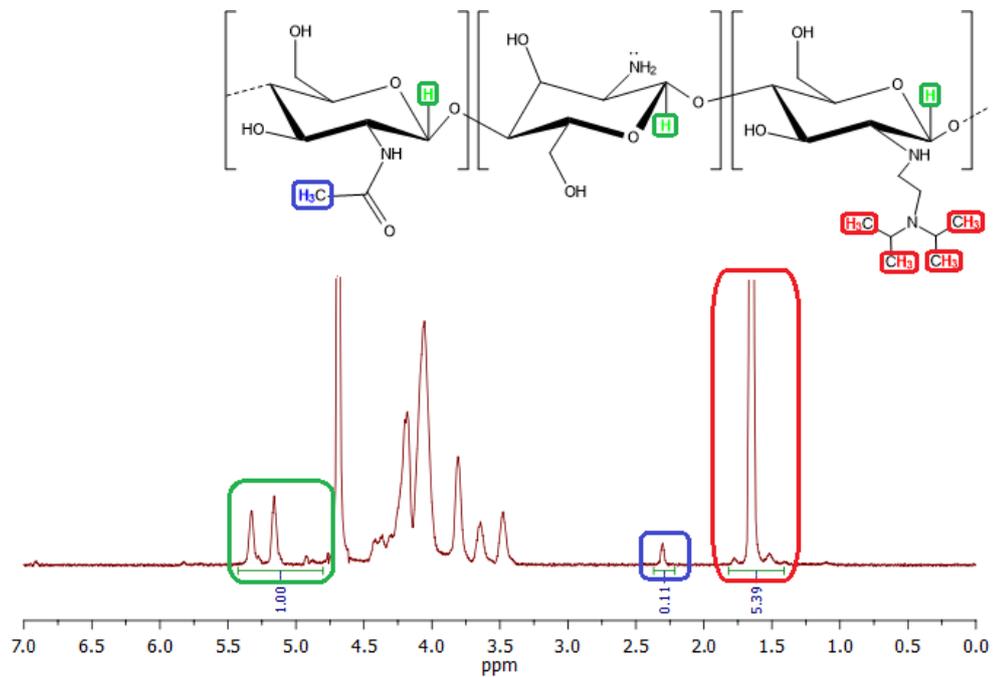
Em que  $I_{H_{12}}$  corresponde a integração do sinal dos grupos metila de DIPEA e  $I_H$  corresponde a integração dos hidrogênios ligados ao carbono anomérico. Os graus de substituição (GS) para a quitosana comercial degradada foram de 20,7%; 36,8%; 56,3% e 97,1%. Para os derivados da série II (desacetilados), os espectros de RMN estão representados nas Figuras 18 a 21.

**Figura 18** - Espectro de RMN de  $^1H$  do primeiro derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChD.D.



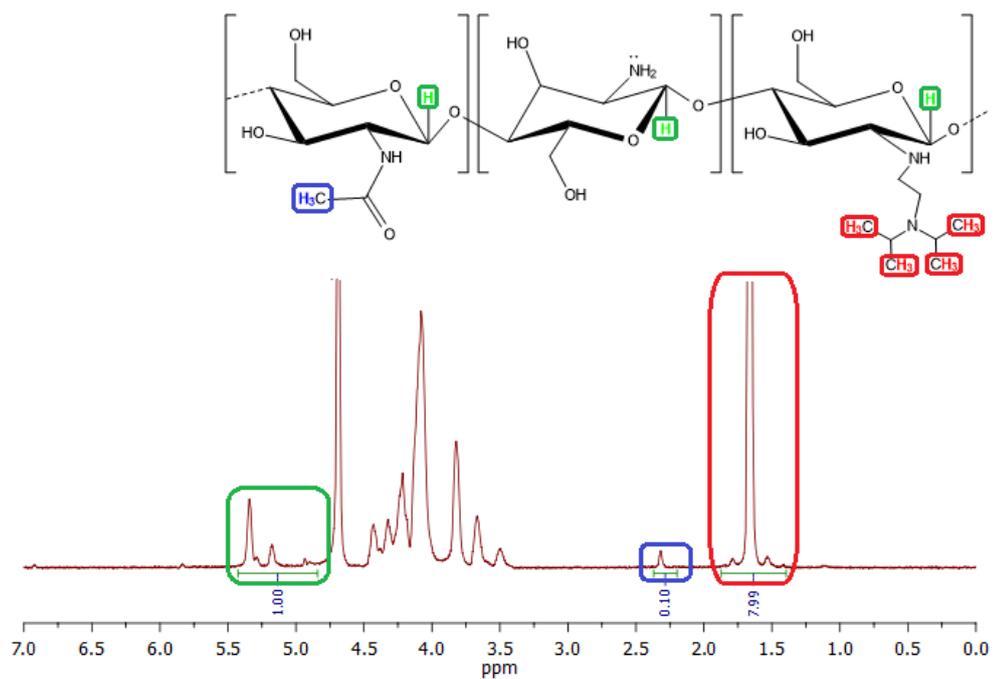
Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 19** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do segundo derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChD.D.



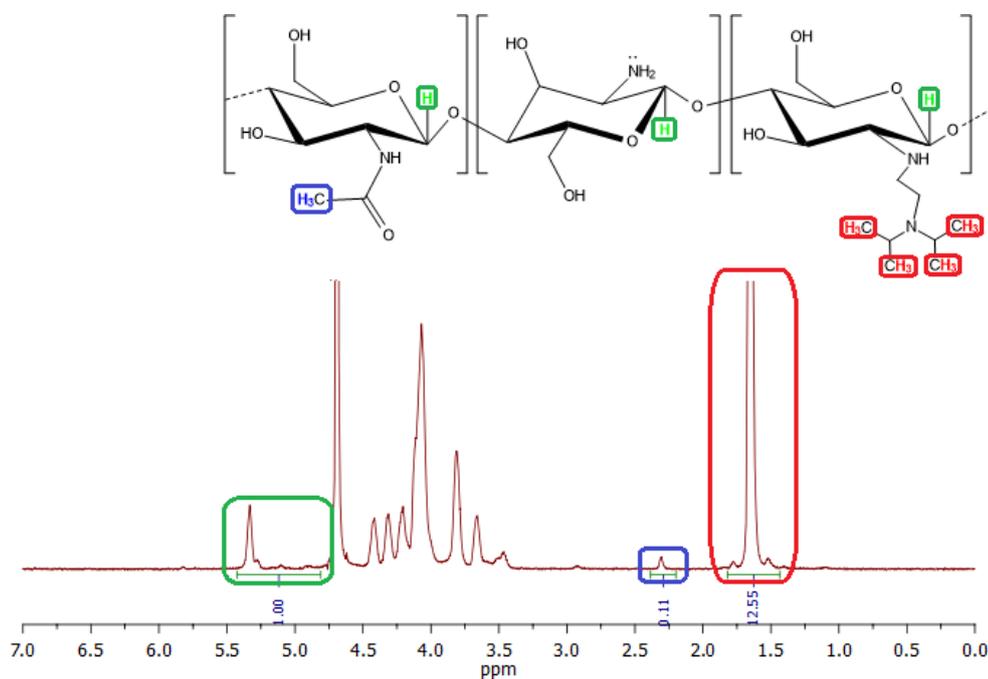
Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 20** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do terceiro derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChD.D.



Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 21** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do quarto derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da ChD.D.



Fonte: Dados da pesquisa

Os graus de substituição (GS) de DIPEA decorrente da reação com a quitosana desacetilada degradada foram de 13,8%; 44,9%; 66,6% e 104,6%. Para os derivados que foram submetidos à grandes quantidades de DIPEA, uma parte das moléculas foram enxertadas na hidroxila do carbono 6 da quitosana, por isso um dos derivados ultrapassou o 100% de substituição teórico.

A tabela 3 abaixo apresenta os GD e GS das quitosanas e dos derivados de quitosana:

**Tabela 3** - GD e GS das quitosanas e dos substituintes com DIPEA

Polímero	Grau de desacetilação (%)	Grau de substituição DIPEA (%)
ChC (Polymar)	76,0	-
ChC (Sigma)	83,3	-
ChD	97,3	-
ChC.D.	83,3	-
ChD.D.	96,7	-
ChC.D.21DI	83,0	20,7

<b>ChC.D.37DI</b>	82,0	36,8
<b>ChC.D.56DI</b>	85,7	56,6
<b>ChC.D.97DI</b>	83,7	97,1
<b>ChD.D.14DI</b>	97,0	13,8
<b>ChD.D.45DI</b>	96,3	44,9
<b>ChD.D.67DI</b>	96,7	66,6
<b>ChD.D.105DI</b>	96,3	104,6

Fonte: Dados da pesquisa

As linhas da tabela de coloração verde indicam os derivados da série I, enquanto as de coloração azul indicam os derivados da série II.

#### 4.4 Determinação da massa molar dos polímeros por GPC

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma técnica muito utilizada para determinar massa molar e distribuição de massa molar em polímeros naturais e sintéticos. O princípio da técnica está na separação de moléculas pelo seu raio hidrodinâmico. Os resultados de massa molar confirmam a eficiência do processo de degradação (Tabela 4).

**Tabela 4** - Massas molares dos diferentes polímeros de quitosana substituídos com o grupo DIPEA

<b>Polímero</b>	<b><math>\bar{M}_w</math> (<math>10^3</math> g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\bar{M}_n</math> (<math>10^3</math> g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pdi (Đ)</b>
<b>ChC (Polymar)</b>	338,5	77,5	4,36
<b>ChC (Sigma)</b>	280,0	52,4	5,34
<b>ChD</b>	247,0	48,7	5,07
<b>ChC.D.</b>	16,4	6,153	2,66
<b>ChD.D.</b>	11,2	5,120	2,20
<b>ChC.D.21DI</b>	16,1	6,746	2,39
<b>ChC.D.37DI</b>	14,9	5,881	2,53
<b>ChC.D.56DI</b>	14,3	5,566	2,57
<b>ChC.D.97DI</b>	14,0	5,567	2,51
<b>ChD.D.14DI</b>	13,3	5,965	2,23
<b>ChD.D.45DI</b>	11,4	5,398	2,12

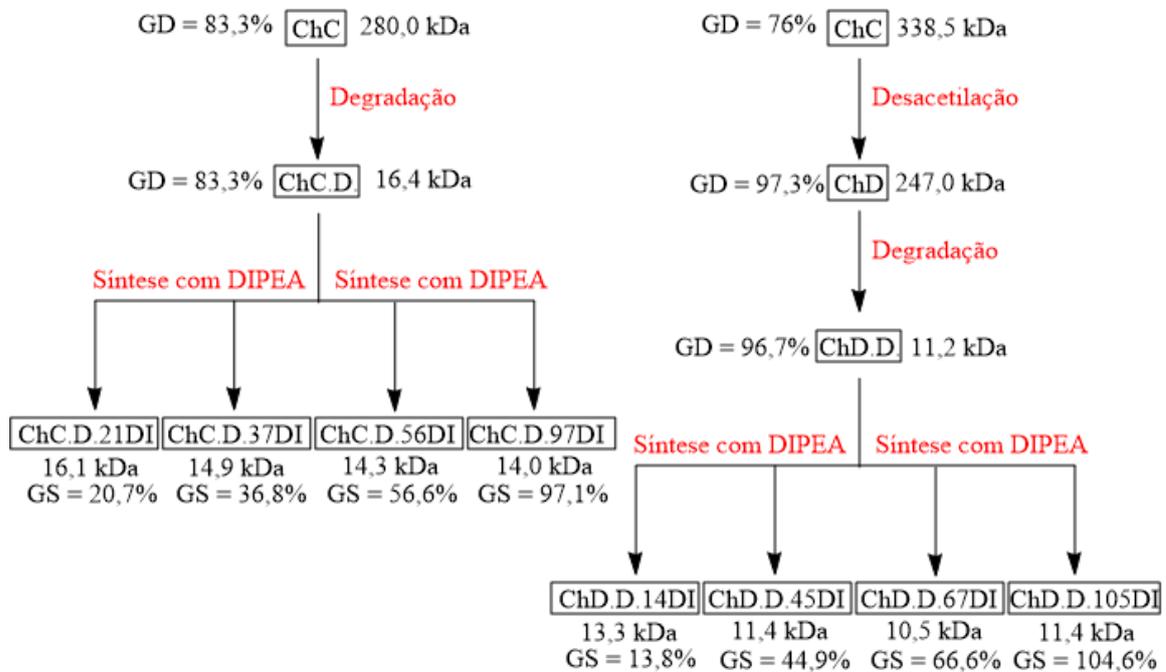
<b>ChD.D.67DI</b>	10,5	4,875	2,15
<b>ChD.D.105DI</b>	11,4	5,039	2,25

Fonte: Dados da pesquisa

A reação de desacetilação em meio alcalino resultou numa diminuição da massa molar. Esse decréscimo deve-se principalmente a hidrólise das cadeias e, em menor extensão, à remoção dos grupos acetil. Essa diminuição ocorreu, sobretudo, devido às condições de reação, ou seja, temperatura e concentração de NaOH, ambas elevadas. Já a reação de degradação das quitosanas com o nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) mostrou-se eficiente e reduziu em até 19 vezes a massa molar das quitosanas de partida, ChD e ChCD (TØMMERAAS *et al.*, 2001). Além disso, a degradação e o processo de diálise, combinados, reduziram a polidispersividade das amostras, que ficaram na faixa de 2,1 a 2,6 (Tabela 4).

As rotas de sínteses dos diferentes derivados a partir da quitosana e um resumo dos resultados obtidos são ilustradas na Figura 22 na forma de um diagrama.

**Figura 22** - Diagrama com a rota de reações para obtenção de derivados de quitosana



Fonte: Elaborado pelo autor

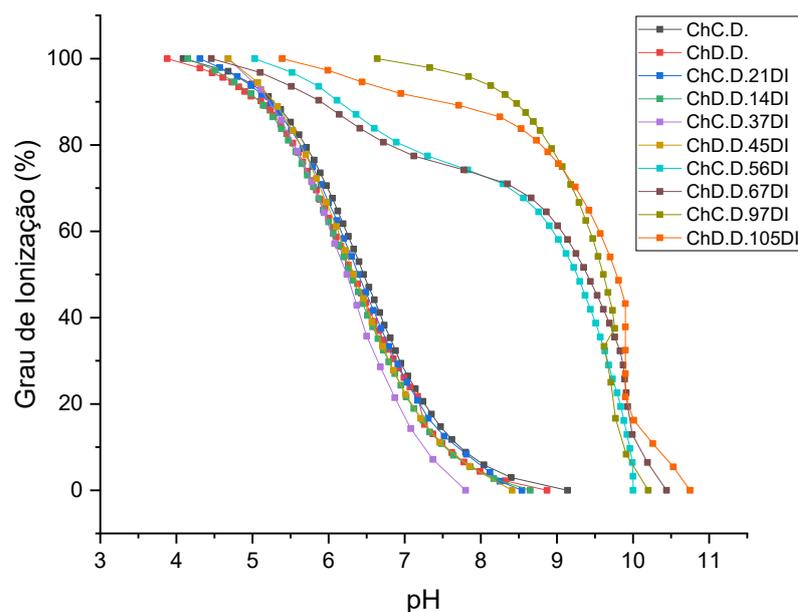
Sendo, GD (grau de desacetilação), GS (grau de substituição de DIPEA) e kDa (quiloDalton).

#### 4.5 Avaliação do grau de ionização

O grau de ionização (GI) de um polímero expressa em porcentagem a quantidade de cargas positivas presentes ao longo da cadeia polimérica em determinado pH. Nesse caso, corresponde à porcentagem de grupos amino protonados em função do pH, e permite visualizar como a grau de substituição afeta esse parâmetro.

Os dados apresentados na Figura 23 mostram que o grau de ionização dos polímeros aumenta com o grau de substituição por grupos DIPEA. De acordo com Oliveira *et al.* (2013), para a quitosana sem grupos substituintes o grau de ionização é 100% em pH próximo de 4,0 e próximo a zero em pH 7,0 - 7,5. Os resultados mostram que para as quitosanas não substituídas (ChC.D e ChD.D) o grau de ionização é próximo de zero, somente em 9,0, o que se deve às baixas massas molares das quitosanas de partida, com isso, as curvas sigmóides são gradualmente deslocadas para faixas de pH maiores com o aumento do grau de substituição, ou seja, grupos positivamente carregados são observados em uma faixa de pH mais ampla.

**Figura 23** - Gráfico do grau de ionização para os polímeros ChC.D., ChD.D. e derivados de DIPEA série I e II



Fonte: Dados da pesquisa

**Tabela 5** - Grau de Ionização no pH 7,4

<b>Polímero</b>	<b>Grau de Ionização (%) em pH 7,4</b>
<b>ChC.D.</b>	14,7
<b>ChD.D.</b>	13,1
<b>ChC.D.21DI</b>	12,5
<b>ChC.D.37DI</b>	7,14
<b>ChC.D.56DI</b>	77,4
<b>ChC.D.97DI</b>	95,0
<b>ChD.D.14DI</b>	13,5
<b>ChD.D.45DI</b>	11,1
<b>ChD.D.67DI</b>	77,4
<b>ChD.D.105DI</b>	90,0

Fonte: Dados da pesquisa

A comparação dos GIs em pH 7,4 (Tabela 5) torna evidente que não existe uma correlação direta com o grau de substituição, entretanto, os derivados com DSs > 50% apresentaram maiores graus de ionização que os derivados com DS < 50%. Esses últimos, exibiram graus de ionização próximo de zero em pH 9,0, enquanto aqueles com DS > 50% apresentaram um grau de ionização próximo de zero somente acima de pH 10,0.

O grau de ionização dos polímeros tem um papel importante na formação e nas propriedades das nanopartículas. O GI refere-se à densidade de cargas positivas ao longo da cadeia polimérica. Portanto, o GI está diretamente relacionado com a intensidade de interação com o ácido nucleico (carregado negativamente, em pH fisiológico) e com a carga superficial dos políplexos.

#### **4.6 Testes da atividade antioxidante dos derivados frente ao radical cátion ABTS<sup>+</sup>**

Sabe-se que a atividade de inibição de radicais livres é de grande importância, pelo papel deletério dos radicais livres nos sistemas biológicos e também nos alimentos (BURSAL; KÖKSAL, 2011). Antioxidantes são substâncias capazes de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável. O papel dos antioxidantes em nosso organismo é evitar que as células sadias sejam danificadas pela ação oxidante dos radicais livres. Os antioxidantes são divididos em dois grupos, antioxidante endógeno que é o produzido pelo nosso corpo (enzimas), e o

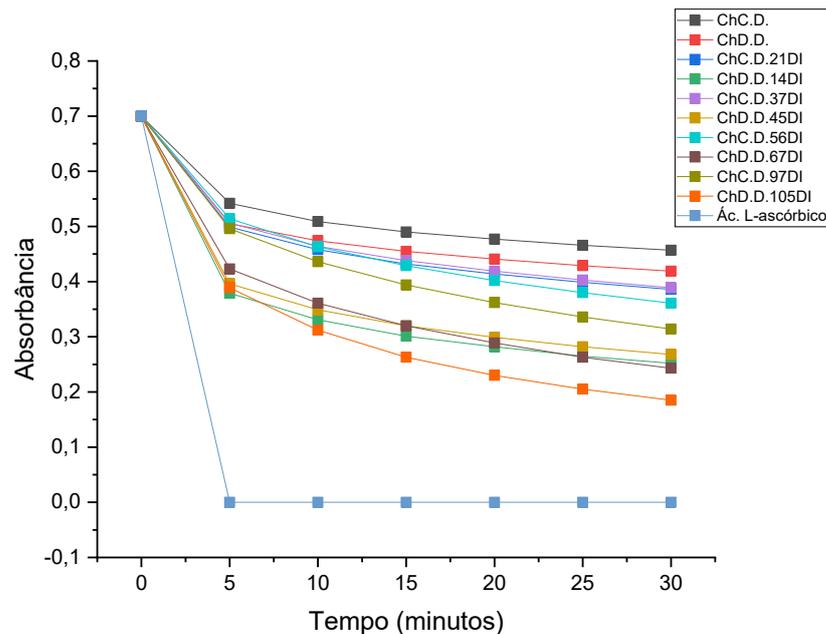
antioxidante exógeno que são adquiridos pela alimentação ou suplementação de nutrientes com ação antioxidante (PU et al., 2019). O estresse oxidativo acontece quando temos um aumento dos radicais livres e/ou uma diminuição dos antioxidantes do organismo, portanto, um desequilíbrio dos radicais livres. Com isso, doenças podem surgir pelo ataque em demasia desses radicais livres atuando na oxidação dos lipídeos, proteínas e DNA (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A atividade antioxidante da quitosana pode ser explicada por algumas interações, e uma delas é a interação do radical livre com as hidroxilas dos carbonos 3 e 6 da quitosana, e a interação com os grupos aminos para formar macromoléculas estáveis (XIE; XU; LIU, 2001).

A Figura 24 mostra a inativação do radical  $ABTS^{\cdot+}$  pelos polímeros em função do tempo. Nos primeiros 5 minutos ocorre um decréscimo mais abrupto dos radicais livres em solução, que atinge uma quase estabilidade próximo dos 30 minutos do experimento (último ponto). A utilização do ácido L-ascórbico zerou a absorbância logo nos primeiros minutos, demonstrando realmente sua eficácia como antioxidante.

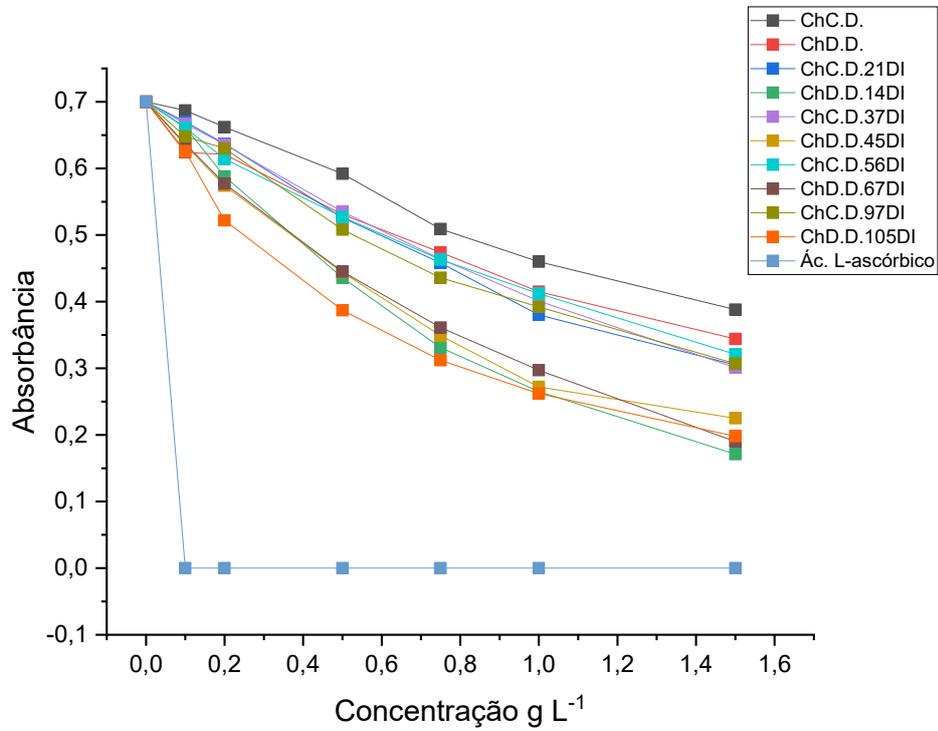
Já no gráfico da Figura 25, observa-se o decaimento da concentração do cátion radical em função da concentração dos polímeros. Novamente, o ácido L-ascórbico se mostrou bem evidente logo na primeira concentração ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ).

**Figura 24** - Gráfico da absorbância do cátion radical ABTS em função do tempo para os diferentes polímeros na concentração de  $0,75 \text{ g/L}$



Fonte: Dados da pesquisa

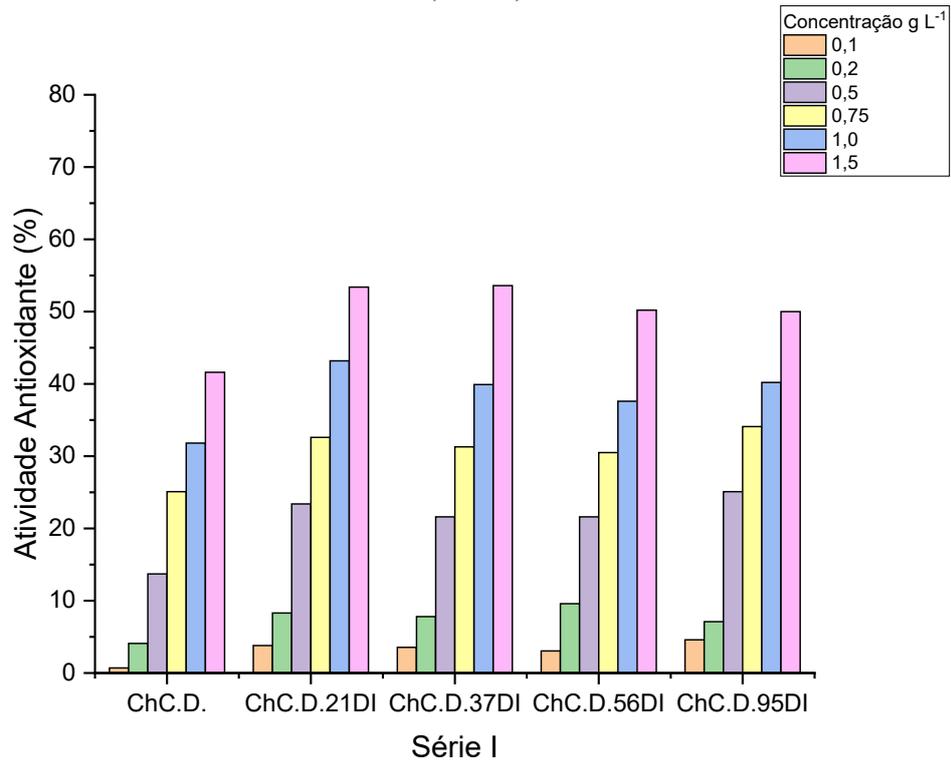
**Figura 25** - Gráfico da absorbância do cátion radical ABTS em função da concentração (tempo de 30 min)



Fonte: Dados da pesquisa

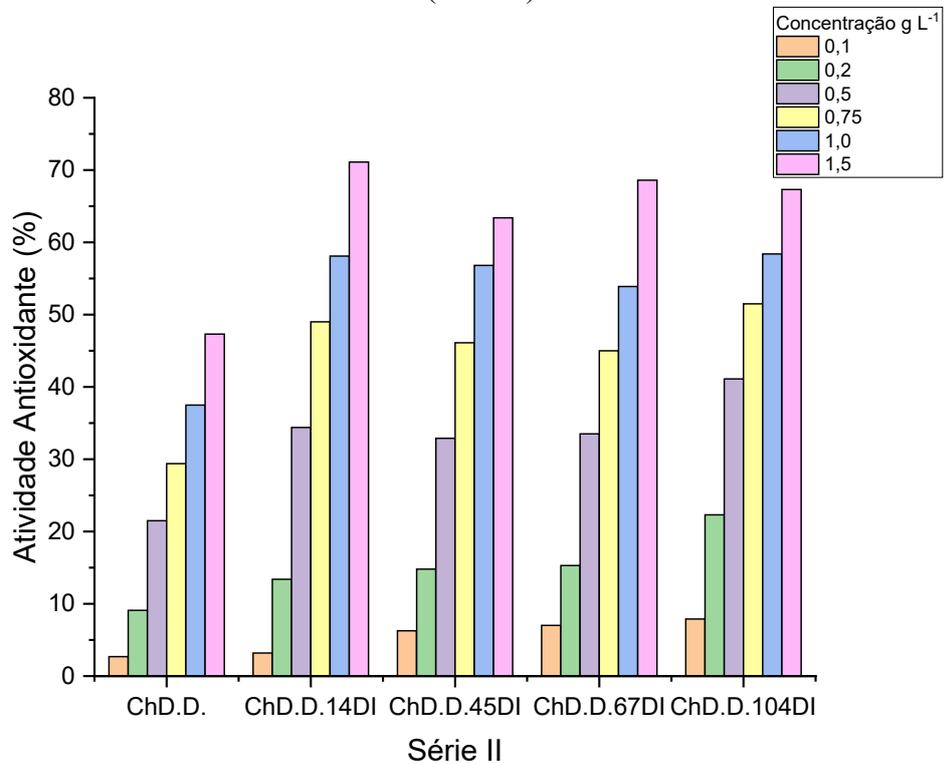
A partir desses resultados e utilizando a equação mostrada no tópico 4.2.9, calculou-se a porcentagem da atividade antioxidante dos polímeros (Figuras 26 e 27). Considerou-se que o valor da atividade antioxidante do ácido L-ascórbico é de 100% para todas as concentrações utilizadas, pois o mesmo consumiu totalmente o cátion radical para todas as concentrações testadas.

**Figura 26 - Gráfico da atividade antioxidante (série I)**



Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 27 - Gráfico da atividade antioxidante (série II)**



Fonte: Dados da pesquisa

Em geral, os resultados foram similares à estudos anteriores, e os derivados apresentaram melhor atividade antioxidante que as quitosanas não modificadas. ChD.D. apresentou um resultado ligeiramente melhor do que a ChC.D., o que denota a importância dos grupos  $-NH_2$  e sua protonação para produzir grupos para  $-NH_3^+$ , que contribuem para aumentar a atividade antioxidante. (GARCÍA et al., 2015). Na literatura, os derivados de quitosanas quaternários são os que apresentam melhor atividade antioxidante comparados com outros tipos de aminas (primária, secundária) e iminas, sendo estas com resultados bem próximos de atividade antioxidante. Isso se deve por conta da quitosana quaternária possuir maior densidade de cargas positivas. (GUO et al., 2006).

#### 4.7 Eletroforese

Na terapia gênica, o siRNA é uma molécula com finalidade terapêutica e para que ela possa ser transportada até o interior das células alvo com eficácia é preciso protegê-la da degradação e da repulsão eletrostática com a membrana plasmática (SALCHER; WAGNER, 2010). Os polications (nesse caso, a quitosana modificada) possuem a função de neutralizarem as cargas negativas do siRNA evitando a repulsão eletrostática contra a membrana plasmática e fornecerem proteção ao material genético preservando-o de uma possível degradação enzimática (SOLEIMANI et al., 2016). A eletroforese das nanopartículas permite avaliar qualitativamente ambas as funções descritas (GUZMAN-VILLANUEVA et al., 2014; HUH et al., 2017)

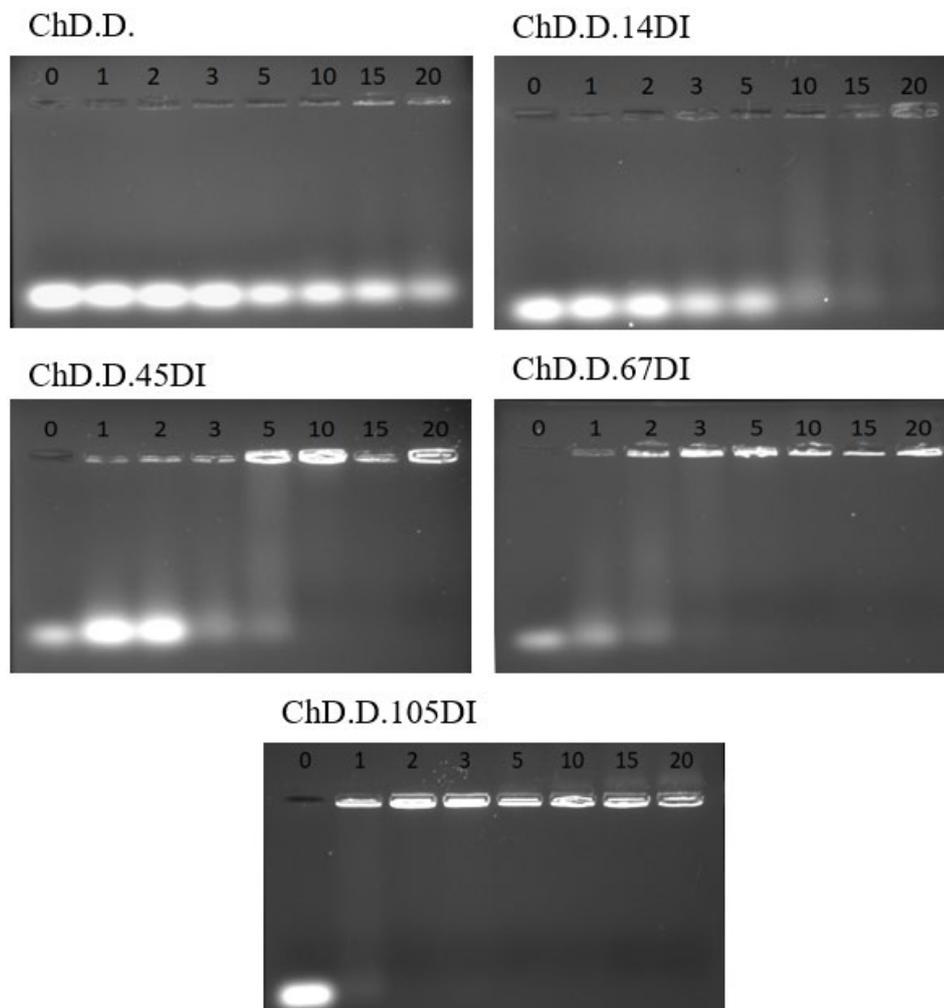
A eficiência da interação entre os polications e o siRNA-TNF-alfa é determinante para a formação de nanopartículas estáveis e que as deixem favoráveis para uma boa captação e liberação celular. Nesse estudo, analisou-se a capacidade de complexação dos derivados poliméricos com o siRNA por meio da mobilidade do material genético em eletroforese com gel de agarose (MAO; SUN; KISSEL, 2010). A partir dos resultados é possível avaliar a influência da massa molar, do grau de acetilação, do grau de substituição por DIPEA, e principalmente da razão N/P sobre a complexação dos polímeros com o siRNA.

Este estudo foi realizado em tampão fosfato pH 7,4 com o controle da força iônica  $0,15 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl. Foram submetidos a esse experimento, os polímeros da série II (desacetilados) e os dois menos substituídos da série I (acetilados), cujos resultados são apresentados nas Figuras 28 e 29. Os números acima de cada poço correspondem as razões de carga N/P (0, 1,

2, 3, 5, 10, 15, 20), sendo que a razão “0” refere-se ao siRNA controle, na ausência de polímero.

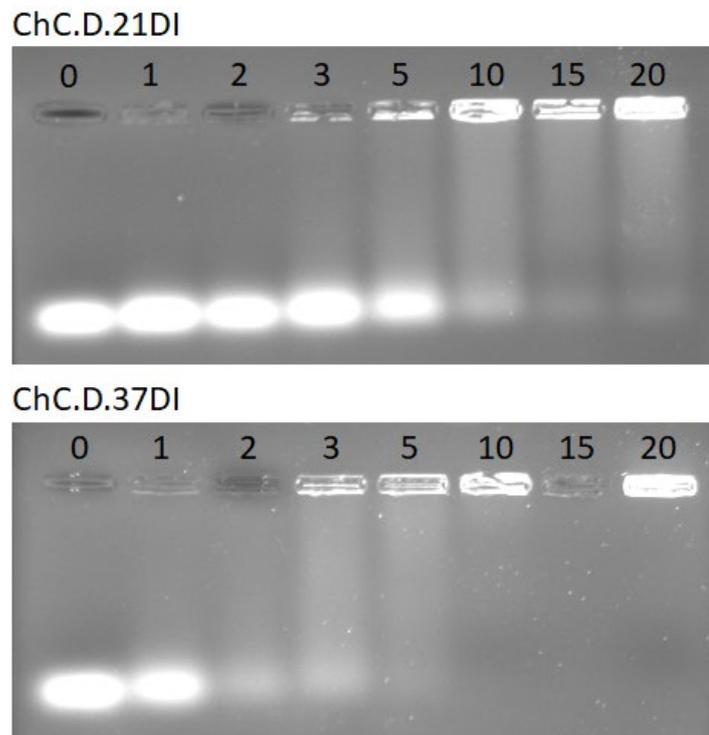
Os políplexos obtidos com a quitosana não modificada ChD.D. liberaram o RNA para todas as razões N/P estudadas, entretanto a liberação diminuiu para razões acima de 5. Para os derivados substituídos com DIPEA a força de interação polycation-RNA aumentou com o grau de substituição, e para o derivado menos substituído, ChD.D.14DI, o RNA foi completamente retido a partir N/P 15. Além disso, para os derivados mais substituídos da série II: ChD.D.45DI, ChD.D.67DI e ChD.D.105DI, a retenção completa nos poços ocorreu nas razões N/P 5, 3 e 2, respectivamente. O comportamento observado para os derivados mais substituídos se deve ao crescente grau de ionização observado em pH 7,4. Portanto, a força de interação e em princípio a velocidade de liberação do siRNA pode ser controlada com o grau de substituição.

**Figura 28** - Imagens de eletroforese obtidas das nanopartículas dos polímeros da série II com siRNA em pH 7,4



Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 29** - Imagens de eletroforese obtidas das nanopartículas dos polímeros menos substituídos da série I com siRNA-TNF-alfa em pH 7,4



Fonte: Dados da pesquisa

Para as quitosanas modificadas da série I (Figura 29), o ChC.D.21DI teve o RNA bem retido a partir da razão N/P 10, porém, com um pouco de liberação apresentada até na razão maior razão. Já o ChC.D.37DI houve retenção completa a partir da razão 10, e com pouca liberação na razão 5.

#### 4.8 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta ( $\zeta$ )

DLS é uma técnica de caracterização físico-química que permite a análise de pequenas partículas suspensas em um líquido, da qual pode-se extrair o diâmetro hidrodinâmico (Dh). A importância desse estudo é na caracterização no que se diz respeito ao tamanho das nanopartículas, estas além de possuir um tamanho adequado, necessitam de um potencial Zeta ( $\zeta$ ) positivo mínimo para favorecer a captação celular e, conseqüentemente, a eficiência de transfecção.

A forma e o tamanho das nanopartículas afetam a forma como as células do corpo as identificam e, portanto, ditam sua distribuição, toxicidade e capacidade de direcionamento. Foi relatado que nanopartículas de 100 nm exibiram uma absorção 2,5 vezes maior em comparação

com partículas de diâmetro de 1  $\mu\text{m}$  e uma absorção e de até 6 vezes maior do que partículas de 10  $\mu\text{m}$  (DESAI et al., 1997).

À medida que o tamanho da nanopartícula fica menor, sua área de superfície em relação ao volume fica maior, isso indica que maior quantidade de material genético está mais perto da superfície da nanopartícula em comparação com uma nanopartícula maior. Estar próximo da superfície leva a uma liberação mais rápida e eficaz dentro da célula, ou seja, o tamanho é uma propriedade importante. Por outro lado, é necessário controlar a toxicidade da nanopartícula e avaliar a proteção contra vazamento do material genético até o destino alvo (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

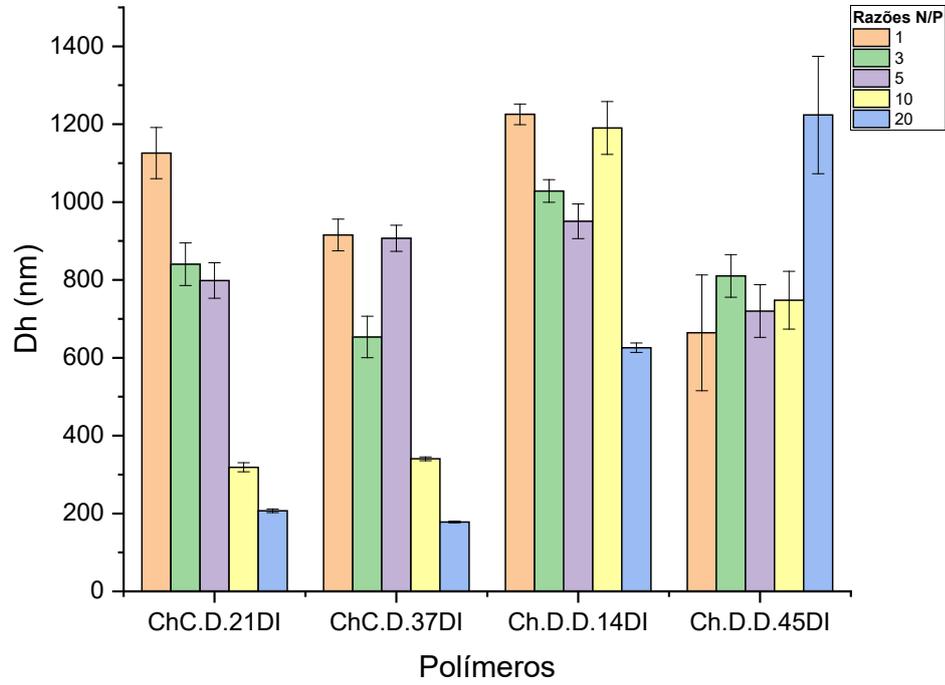
Estes fatores devem ser considerados para desenvolver uma nanopartícula ideal. Tem sido relatado que nanopartículas com diâmetros 200 nm ou inferiores são mais apropriados para internalização celular (RIZVI; SALEH, 2018). Foi demonstrado que partículas de 200 nm ou maiores tendem a ativar o sistema linfático e são removidas da circulação mais rapidamente (PROKOP; DAVIDSON, 2008).

A massa molar também exerce uma importante influência no tamanho dos políplexos. Fernandes *et al.* obtiveram políplexos grandes e instáveis utilizando quitosana de 2 kDa, a formação de nanopartículas só pôde ser observada com quitosanas de 25 e 50 kDa quando utilizados em meio pH 5,5 ou menor (FERNANDES et al., 2012). O aumento da razão N/P favorece uma melhor complexação do siRNA, resultando em partículas menores e mais estáveis. Kong *et al.* trabalhou com quitosanas de 2 a 80 kDa, e obtiveram nanopartículas na faixa de 100 nm utilizando razões N/P de 50 a 100 (KONG et al., 2012).

Outro estudo no que se diz respeito à derivados de quitosanas com massas molares baixas é do Malmo *et al.* que obtiveram quitosanas na faixa de 16,4 a 141,6 kDa em que formaram-se nanopartículas estáveis de 34,0 nm a 95,4 nm nas razões N/P de 10, 30 e 60 (MALMO et al., 2012).

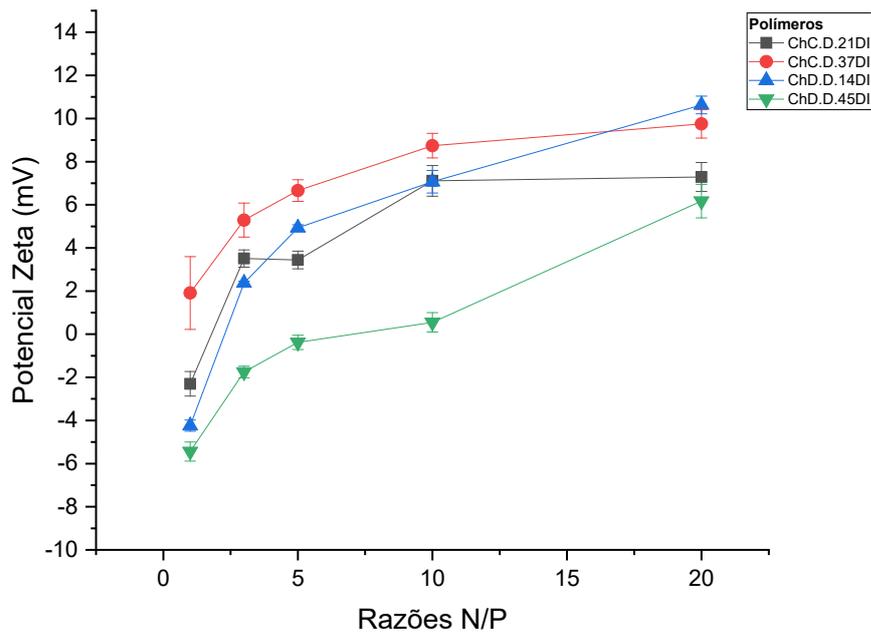
No presente trabalho, dois polímeros menos substituídos da série I e da série II: ChC.D.21DI, ChC.D.37DI, ChD.D.14DI, ChD.D.45DI foram utilizados. Os resultados de Dh e potencial Zeta são apresentados nas Figuras 30 e 31 abaixo.

**Figura 30** - Diâmetro hidrodinâmico dos políplexos preparados com polímeros das séries I e II em diferentes razões de carga (N/P) em pH (6,3) e força iônica 150 mM.



Fonte: Dados da pesquisa

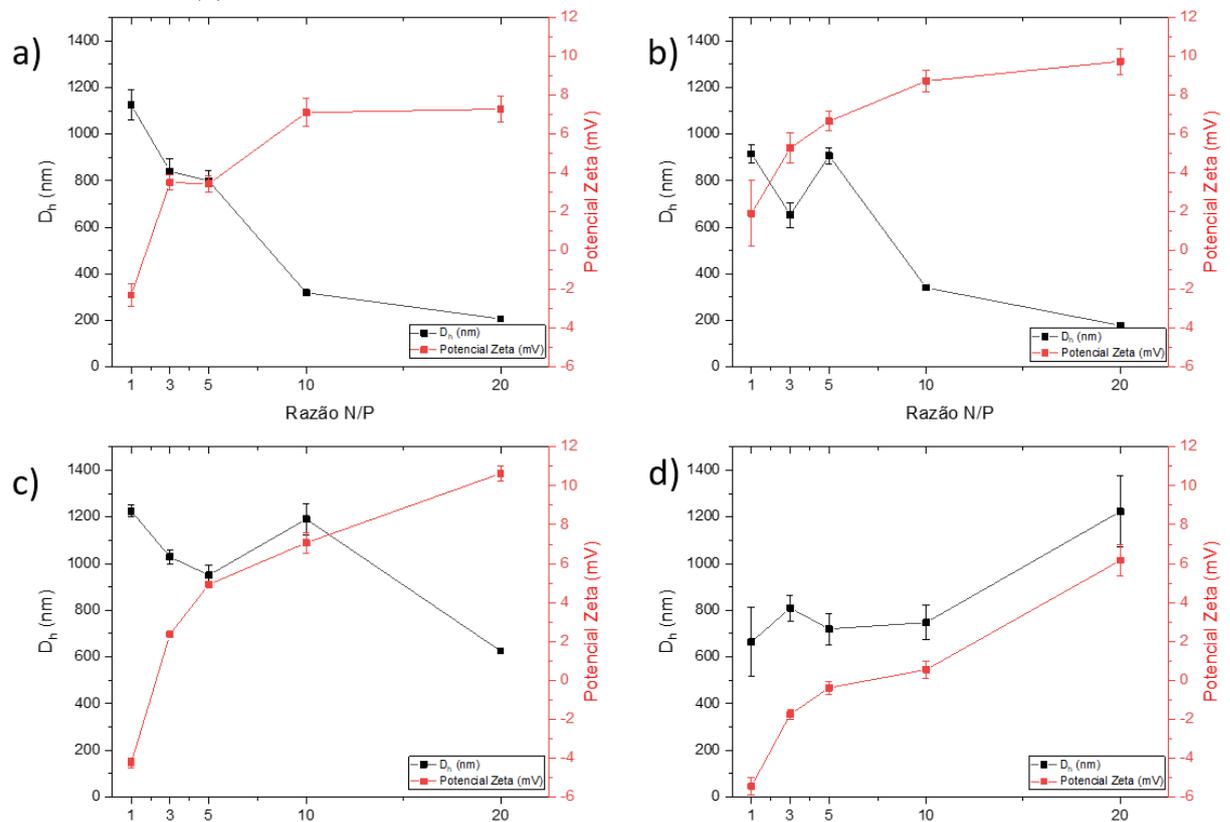
**Figura 31** - Potencial Zeta dos políplexos formados pelos polímeros sob diferentes razões N/P e em condições fisiológicas de pH (6,3)



Fonte: Dados da pesquisa

Os derivados da série I (acetilados) foram os que apresentaram melhores resultados, os mesmos formaram nanopartículas com diâmetro menores que 200 nm na razão N/P 20, e, na razão 10 obteve-se no tamanho na faixa de 300 nm. Os valores de Dh permaneceram abaixo de 400 nm, situando dentro da faixa de tamanho considerada aceitável para um carreador biológico. No que se diz respeito ao potencial Zeta, todas as nanopartículas, exceto o ChD.D.45DI, revelaram um potencial positivo a partir da razão N/P 3. O aumento da razão N/P e consequente o aumento do potencial Zeta geralmente proporcionam uma redução no Dh como apresentado na Figura 32.

**Figura 32** - Efeito da razão N/P sob o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e o potencial Zeta das nanopartículas em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L<sup>-1</sup>: (a) ChC.D.21DI, (b) ChC.D.37DI, (c) ChD.D.14DI, (d) ChD.D.45DI



Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.9 Avaliação da citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas

A citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas foram avaliadas em função da viabilidade celular em ensaios realizados com células fibroblastos 3T3/NIH de camundongos e células RAW 264.7, respectivamente. Os fibroblastos sintetizam componentes da matriz

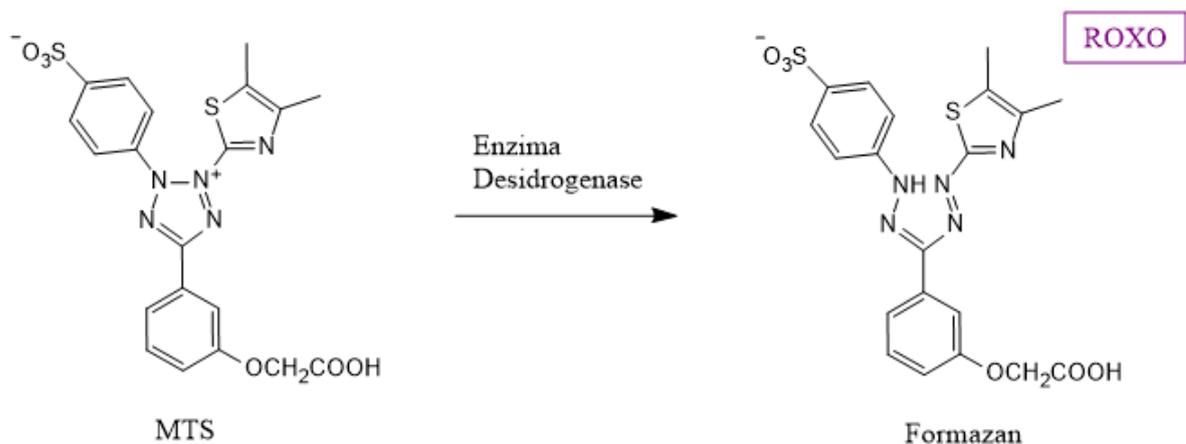
extracelular dos tecidos e, devido à sua grande abundância no organismo, são células que têm grande chance de entrarem em contato com os polications. Os macrófagos (nesse caso, a RAW), são células de defesa do organismo que atuam na fagocitose de corpos estranhos, assim, também apresentam uma alta probabilidade de interagirem com os políplexos (GORMLEY; GHANDEHARI, 2009).

O procedimento da citotoxicidade utilizando MTS é um método colorimétrico quantitativo baseado na quebra do sal de tetrazólio por células biologicamente ativas. O MTS por sua vez é reduzido e forma-se um produto colorido (Formazan) (Figura 33). O composto formado pode ser determinado quantitativamente por meio da leitura de absorvância de 490 nm (HUANG; KHOR; LIM, 2004; MOSMANN, 1983). As células na ausência de polímero (grupo controle) foram consideradas como 100% viáveis e a viabilidade celular das demais (na presença dos polímeros) foi calculada utilizando-se equação 8.

$$\% = \frac{A_{\text{poço}} \times 100}{\bar{x} A_{\text{controle}}} \quad (8)$$

Onde  $A_{\text{poço}}$  refere-se a leitura da absorvância de uma solução de polímero em uma concentração específica e  $\bar{x}A_{\text{controle}}$  refere-se a média das absorvâncias dos poços com as células controle.

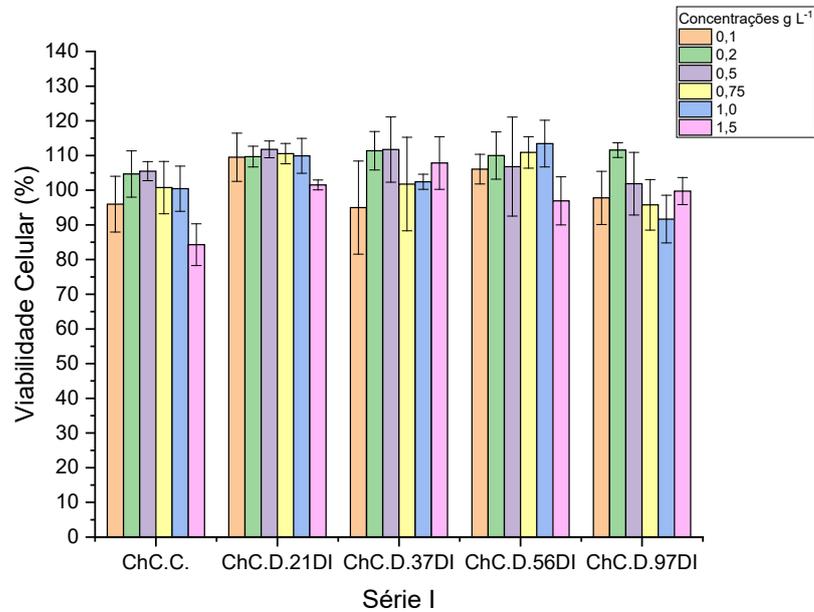
**Figura 33** - Reação do MTS para formação do Formazan



Fonte: Elaborado pelo autor

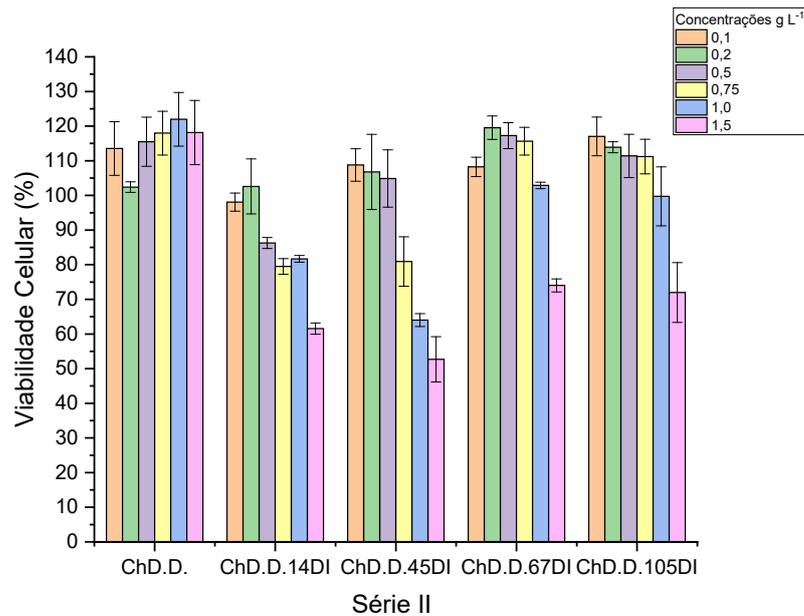
Os resultados obtidos são expressos como gráficos da viabilidade celular para concentrações dos polímeros, e são apresentados nas Figuras 34 e 35.

**Figura 34** - Ensaio de viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH realizado com ChC.D e seus derivados modificados com DIPEA (série I)



Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 35** - Ensaio de viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH com ChD.D. e seus derivados modificados com DIPEA (série II)



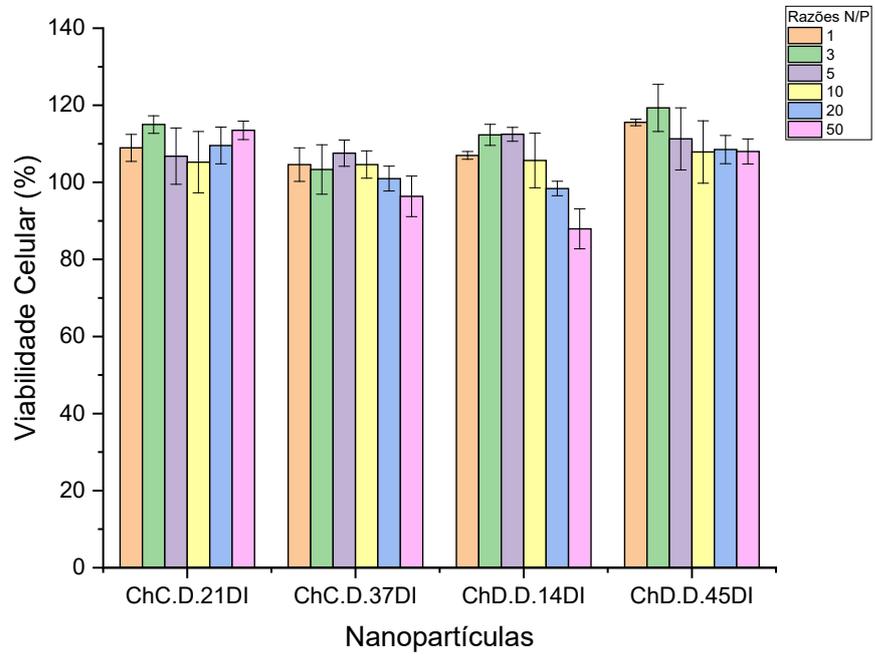
Fonte: Dados da pesquisa

A citotoxicidade de polímeros depende de vários parâmetros, como a massa molecular, a densidade de cargas positivas, sua biodegradabilidade a conformação, e de como interagem com a membrana celular (HUANG et al., 2004). Em geral, quitosanas não modificadas apresentam baixa toxicidade, entretanto, a literatura mostra que quando modificadas com grupos positivos permanentes, como as trimetil-quitosanas, a toxicidade aumenta com o grau de trimetilação, e com a massa molecular (KEAN; ROTH; THANOU, 2005). A Figura 34 mostra que os derivados da série I são atóxicos para células de fibroblastos NIH3/3T3 em todas as concentrações estudadas, uma vez que, em todas as concentrações apresentaram viabilidade celular acima de 90%.

Comparativamente, os níveis de toxicidade dos derivados parcialmente acetilados, são menores que aqueles exibidos por derivados trimetilados, e muito superiores àqueles exibidos por polímeros sintéticos como a polietilenoimina, a qual é usada como agente de transfecção comercial (KEAN; THANOU, 2010). Entretanto para os polímeros da série II (Figura 35), nota-se que a viabilidade celular permaneceu acima de 80%, somente para concentrações abaixo de  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Este resultado indica que o grau de acetilação tem um papel importante na toxicidade, o que pode estar relacionado com o espaçamento dos grupos DIPEA na cadeia polimérica, já que a quitosana desacetilada ChDD (Figura 35) não apresentou qualquer toxicidade contra os fibroblastos.

No caso das nanopartículas, a literatura mostra que a toxicidade é diminuída, devido a neutralização das cargas positivas proporcionadas pelos grupos amina (KEAN & THANOU, 2010). A citotoxicidade das nanopartículas foi avaliada para os polímeros ChC.D21DI, ChC.D.37DI, ChD.D.14DI e ChD.D.45DI nas razões 1, 3, 5, 10, 20 e 50. A viabilidade (%) ficou acima de 90% para as nanopartículas em todas as razões estudadas (Figura 36), o que indica uma boa biocompatibilidade, e confere potencial aos derivados como carreadores de siRNA para a realização de estudos de transfecção *in vitro* e *in vivo*, bem para o transporte e liberação de outros fármacos.

**Figura 36** - Ensaio de viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 para nanopartículas preparadas com razões de carga N/P crescentes.



Fonte: Dados da pesquisa

## 5. CONCLUSÕES

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

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

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

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

## REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA**

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 07/07/2021

Victor A. dos S. Jones  
Assinatura do autor