

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

Grazieli Olinda Martins

Síntese, caracterização e estudos *in vitro* de derivados acetilados de quitosana como carreadores de RNA de interferência

São José do Rio Preto 2020

Grazieli Olinda Martins

Síntese, caracterização e estudos *in vitro* de derivados acetilados de quitosana como carreadores de RNA de interferência

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora 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", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera Coorientador: Prof. Dr. Sang Won Han

São José do Rio Preto 2020

M386s	Martins, Grazieli Olinda Sintese, caracterização e estudos in vitro de derivados acetilados de
	quitosana como carreadores de RNA de interferência / Grazieli Olinda
	Martins São José do Rio Preto, 2020
	149 f. : il., tabs.
	Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
	Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
	Orientador: Marcio José Tiera
	Coorientador: Sang Won Han
	1. Policátions. 2. Derivados de quitosana. 3. Estabilidade fisiológica. 4.
	N-acetilação. 5. Transfecção in vitro. 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.

Grazieli Olinda Martins

Síntese, caracterização e estudos *in vitro* de derivados acetilados de quitosana como carreadores de RNA de interferência

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora 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", Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof.^a. Dra. Carolina Colombelli Pacca UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof.^a. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior, UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Emerson Rodrigo da Silva UNIFESP – Câmpus de São Paulo

Prof. Dr. Fernando Carlos Giacomelli UFABC - Câmpus de Santo André

> São José do Rio Preto 13 de Agosto de 2020

À minha "Vó" Geni (*in memoriam*) que me ensinou o amor com a Fé e pela qual estamos em eterna união. A meu Pai Wilson e minha Mãe Maria pelo amor e respeito, e por sempre apoiarem minhas decisões no correr de todas as jornadas até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente a Deus por permitir que eu prossiga os caminhos com Fé, amor e coragem. Por me fazer presente em cada ação e por não me deixar desistir, por mais que dias difíceis tenham chegado até mim. Estes foram necessários para que eu me tornasse mais forte, e hoje tenho a consciência do crescimento pessoal e profissional adquiridos durante o período de realização deste trabalho.

À minha FAMÍLIA:

Minha "Vó" Geni pelo exemplo de ser PRESENTE e viver cada dia com amor, força de viver, coragem, FÉ e nunca desanimar.

Meu Pai Wilson por sempre me encorajar a alçar novos caminhos, a buscar crescimento profissional, e mais do que isso, amadurecimento pessoal. Sua perseverança, amor pela família e doação incondicional são exemplos que levo sempre comigo.

Minha Mãe Maria pelo incentivo de estar sempre disposta a continuar, a crescer e ser uma pessoa melhor a cada dia. Seu exemplo de luta, trabalho, carinho, e amor de mãe foram e são fundamentais em todos os momentos.

Meus Irmãos Gabrieli e Francisco pelos ensinamentos e apoio de sempre.

Ao Prof. Dr. Marcio José Tiera pela colaboração, amizade e por contribuir com correções e discussões ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Suas considerações enriqueceram grandemente este material, sendo uma oportunidade de muito aprendizado. Além disso, agradeço por se dispor com auxílio financeiro para que eu pudesse ir a congressos, bem como, realizar experimentos em outras cidades.

Ao Prof. Dr. Sang Won Han pela colaboração na forma de coorientador. As considerações, correções, paciência e a presença do professor quando precisei foram fundamentais para que eu pudesse me sentir mais segura no processo de conclusão deste trabalho.

À Prof.^a. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera pelo auxílio na compra de materiais e reagentes quando necessário.

Aos colegas do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia (LBN) por ajudarem na realização de experimentos e por tornarem meus dias mais agradáveis. Agradeço em especial à Amanda Dias, Anna Carolina, Fabiana Beneduzzi e à Hemelen Amoroso. E também, ao Maicon Petrônio que foi quem me direcionou no início deste trabalho e me ensinou a trabalhar com cultura celular e, também, ao André Martinez por realizar e me ensinar a quantificar proteína pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (*ELISA*).

Aos colegas do Centro de Terapia Celular e Molecular (CTC-Mol) por me receberem de braços abertos. Agradeço em especial ao Alex Nasaré, Bianca Garcia, Fernanda Coirada, Juliana Vieira, Lucas Rodrigues, Patrícia Terra e Tâmisa Honda.

Aos Laboratórios de Pesquisa e Didáticos do Departamento de Química, em especial à Jucilene Conceição de Souza, Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira e ao Claudinei Antonio Nobile por sempre ajudar com a disposição de reagentes e instrumentos quando necessário.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de São Paulo, Instituto de Química (IQSC), em especial à Dra. Sylvana Cardoso Miguel Agustinho e ao MSc. André Luiz Tognon pela realização das análises e auxílio na padronização das condições específicas das minhas amostras.

À EMBRAPA/São Carlos e à Dra. Aline Margarete Furuyama Lima pela realização das análises de raios X, infravermelho e MEV-FEG, além de outras contribuições e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima, coordenador do Laboratório de Química Bio-Orgânica Ambiental (LQBOA), por permitir as análises de estudo de auto associação dos polímeros e, também ao Dr. Ícaro Putinhon Caruso pelas contribuições e auxílio na padronização das análises. Ao Laboratório de Fotoquímica da Universidade de São Paulo, Instituto de Química (IQSC), em especial à Dra. Alessandra Lima Poli Leves pela realização das análises de GPC.

Ao Laboratório de Hemoglobinas e Genéticas das Doenças Hematológicas (LHGDH) pela disposição de todos do grupo a revelar os géis de eletroforese.

Ao Laboratório de Estudos em Peptídeos (LEPE) pela oportunidade de realização das análises de DLS e potencial Zeta. Agradeço em especial à Prof.^a. Dra. Marcia Cabrera pelos momentos de aprendizado, ao Vinicius Fazani e à Danúbia Martins pela companhia durante as análises e amizade.

Ao Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Protocolos em Nanotecnologia do Instituto de Química da UNESP- Araraquara (CCDPN), em especial ao Dr. Diego Luiz Tita pela preparação e captura das imagens por MEV-FEG.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia e Microanálise (LMM) pela captura das imagens de microscopia confocal e de fluorescência. Sou grata à generosidade da Prof.ª. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior. Agradeço também ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e à Dra. Ellen Cristina Rivas Leonel pelos ensinamentos e disponibilidade.

Ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), em especial ao Prof. Dr. Francisco Guimarães e o Prof. Dr. Sebastião Pratavieira pela captura das imagens de microscopia confocal. E também, ao Dr. Raphael Antonio Caface por ensinar a trabalhar com o *software* de tratamento das imagens.

Ao Laboratório de Estudos Genômicos (LEGO) pela disposição de todos sempre que precisei.

À União das Faculdades dos Grandes Lagos (UNILAGO), em especial ao Dr. Eduardo Meireles que foi quem abriu as portas para que eu pudesse lecionar na instituição. Hoje sou imensamente grata à coordenadora Prof.^a. Dra. Maria Angélica Marques Pedro pela amizade, confiança e respeito profissional. Agradeço também aos amigos de profissão, Amanda Dias, Anieli Pianheri, Danúbia Martins, Davi Rubinho, Gleyce Teixeira, Josimar Silva, Marcelo Araujo, Mirian Guerra e à Tabata Cruz, que tornam as noites e alguns sábados muito mais gratificantes.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP - IBILCE), em especial, ao Departamento de Química e todos os professores pela oportunidade de realização das disciplinas e pesquisa.

À Seção Técnica de Pós-graduação e o PPG-Química por todo amparo institucional e principalmente junto à CAPES, pela concessão de uma bolsa de 7 meses entre 2019/2020: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPESP:

Prof. Dr. Marcio José Tiera como coordenador do projeto nº 2017/10331-5.

Prof. Dr. Sang Won Han como coordenador do projeto nº 2015/20206-8.

Prof.^a. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera como coordenadora do projeto nº 2016/15736-0.

Prof.^a. Dra. Marcia Perez dos Santos Cabrera como coordenadora do projeto nº 2012/24259-0.

À CNPq:

Prof. Dr. Marcio José Tiera como coordenador do projeto nº 303644/2016-8.

E a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!

" O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem".

João Guimarães Rosa (1994, p. 448)

RESUMO

A quitosana tem recebido muita atenção como carreador de siRNA devido à sua boa capacidade de complexação para posterior liberação no interior celular. No entanto, uma de suas limitações é a insolubilidade em pH neutro e a tendência de suas nanopartículas (NPs, quitosana + siRNA) agregarem em condições fisiológicas. Portanto, realizar modificações na quitosana, junto às caracterizações físico-químicas e biológicas são necessárias para superar e compreender estas limitações. No presente trabalho, quitosanas anfipáticas foram sintetizadas, variando-se o grau de acetilação (GA) em aproximadamente 20 e 30 %, o grau de substituição (GS) por dietilaminoetil (DEAE) entre 5 e 25 % e o GS com cadeias de polietilenoglicol (PEG) na faixa de ~1,5. Os resultados mostraram que o ajuste destes parâmetros diminuiu as interações intermoleculares mediadas por ligações de hidrogênio para obtenção de nanopartículas com estabilidade coloidal e sérica: nanopartículas com tamanho de ~ 150 nm, com baixo índice de polidispersão (0,15 - 0,2) e potencial Zeta positivo (entre ~ +4 e +12 mV). A resistência à agregação é fornecida por mudanças na superfície das nanopartículas e destaca a importância de uma automontagem mais organizada para fornecer estabilidade em condições fisiológicas. A peguilação dos vetores reduziu o tamanho das nanopartículas para ~100 nm em pH 6,3, além de melhorar a estabilidade sérica do polímero com menor grau de acetilação em pH 7,4. Os polímeros na forma livre e suas respectivas nanopartículas com siRNA exibiram baixa toxicidade celular, eficiência da captação celular das nanopartículas, bem como a distribuição e a liberação em tempo real do siRNA-FAM no interior celular, que foram confirmados pelos marcadores fluorescentes. Os estudos de transfecção in vitro em macrófagos mostraram a influência do grau de acetilação na redução da expressão relativa de TNF-α em até 63 % com as NPs dos derivados modificados com DEAE e PEG, com eficiência de transfecção superior à lipofectamina, que reduziu em 48 % a expressão de TNF. De forma análoga, estudos de transfecção em célula epitelial de carcinoma cervical (HeLa-GFP) também mostraram que os derivados modificados com DEAE e PEG formaram NPs que promoveram o knockdown de GFP. E, portanto, os resultados forneceram uma abordagem clara para superar a limitada estabilidade de nanopartículas de quitosana em condições fisiológicas.

Palavras-chave: Policátions; Derivados de quitosana; Estabilidade fisiológica; N-acetilação; Transfecção *in vitro*.

ABSTRACT

Chitosan has received a lot of attention as a carrier of siRNA due to its good complexing capacity for subsequent release into the cell interior. However, one of its limitations is the insolubility in neutral pH and the tendency of its nanoparticles (NPs, chitosan + siRNA) to aggregate under physiological conditions. Therefore, to make changes in the chitosan, together with physicochemical and biological characterizations are necessary to overcome and understand these limitations. In the present work, amphipathic chitosans were synthesized, varying the degree of acetylation (GA) in approximately 20 and 30%, the degree of substitution (GS) by diethylaminoethyl (DEAE) between 5 and 25% and the GS with polyethylene glycol chains (PEG) in the range of $\sim l$, 5. The results showed that the adjustment of these parameters decreased the hydrogen bond mediated intermolecular interactions to obtain colloidal and serum stability nanoparticles: ~150 nm size nanoparticles, with low polydispersion index (0.15 - 0.2) and positive Zeta potential (between ~ +4 and +12 mV). Aggregation resistance is provided by changes in the surface of nanoparticles and highlights the importance of more organized self-assembly to provide stability under physiological conditions. Vector pegylation reduced nanoparticle size to ~100 nm at pH 6.3, and improved serum stability of the less acetylated polymer at pH 7.4. Polymers in free form and their respective nanoparticles with siRNA exhibited low cell toxicity, efficient cell uptake of the nanoparticles, as well as the real-time distribution and release of siRNA-FAM inside the cell, which were confirmed by fluorescent markers. In vitro transfection studies on macrophages showed the influence of the degree of acetylation on the reduction of the relative expression of TNF- α by up to 63% with the NPs of derivatives modified with DEAE and PEG, with greater transfection efficiency than lipofectamine, which reduced by 48% TNF expression. Similarly, transfection studies on epithelial cell of cervical carcinoma (HeLa-GFP) also showed that derivatives modified with DEAE and PEG formed NPs that enabled GFP knockdown. And therefore, the results provided a clear approach to overcome the limited stability of chitosan nanoparticles under physiological conditions.

Keywords: Polycations; Chitosan derivatives; Physiological stability; N-acetylation; In vitro transfection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química dos policátions mencionados. (a) PLL, (b) PEI e (c)
quitina, (X <y) (x="" e="" quitosana="">Y)</y)>
Figura 2. Quatro representações fenotípicas da petúnia (A-D), resultantes da introdução do gene
chalcona sintase (CHS) numa orientação antissenso
Figura 3. Mecanismo de interferência de RNA mediado por siRNA e miRNA
Figura 4. Representação esquemática da formação das nanopartículas, barreiras biológicas, etapas
de internalização e liberação intracelular do siRNA até o silenciamento gênico
Figura 5. Formação de nanopartícula a base de quitosana: interação eletrostática
Figura 6. Representação do processo hipotético de " esponja de prótons ". A captura de prótons
pelo policátion com boa capacidade de tamponamento leva ao intumescimento do endossomo, e
posteriormente, devido ao aumento do influxo de íons Cl- e moléculas de água, à ruptura da
membrana endossomal e liberação do poliplexo/ácido nucleico
Figura 7. Representação genérica da redução das ligações de hidrogênio (pontilhados em vermelho)
e espaçamento entre as cadeias poliméricas pela inserção de DEAE
Figura 8. Compostos utilizados como revestimento na nanopartícula, a fim de minimizar interações
indesejadas em meio biológico
Figura 9. Camada de hidratação nas nanopartículas dos derivados contendo cadeias de PEG
formada pela interação das unidades de etileno glicol e moléculas de água contidas no meio
fisiológico
Figura 10. Progresso da maturação do endossomo à lisossomo e ação das hidrolases ácidas 39
Figura 11. Organograma da estratégia de síntese para obtenção dos derivados anfipáticos de
quitosana. Blocos cinza: polímeros de partida; Blocos azul: derivados apenas acetilados de menor
massa molecular; Blocos verde: derivados de menor e maior massa molecular e modificados com
DEAE; Blocos alaranjado: derivados de menor massa molecular e modificados com DEAE e PEG;
Bloco vermelho: derivado de menor massa molecular e modificado com DEAE e RITC; Bloco
verde-limão: derivado de maior massa molecular e modificado com DEAE e FITC 43
Figura 12. Mecanismo proposto para a síntese dos derivados acetilados por anidrido acético 44
Figura 13. Mecanismo proposto para síntese dos derivados substituídos com o grupo dietilaminoetil
(DEAE)

Figura 14. Esquema do mecanismo proposto para síntese dos derivados modificados com Figura 15. Mecanismo proposto para a síntese dos derivados enxertados com cadeias de Figura 16. Estrutura química da pululana: padrão comum de polissacarídeo para determinação das Figura 17. Esquema geral da reação de redução extracelular do sal de tetrazólio à formazan mediado por PMS. O PMS é reduzido pelo NADH no interior da membrana celular e, Figura 18. Diagrama do formato de captura para detecção do alvo no ensaio de imunoabsorção Figura 19. Esquema geral da reação de oxidação do TMB catalisada pela peroxidase de rábano, Figura 20. Espectros de RMN ¹H dos polímeros de menor massa molecular da série com 20 % de GA e modificados com DEAE. (a) CH₂₀, (b) CH₂₀DEAE₅, (c) CH₂₀DEAE₁₅ e (d) CH₂₀DEAE₂₅.68 Figura 21. Espectros de RMN ¹H dos polímeros de menor massa molecular da série com 30 % de GA e modificados com DEAE. (a) CH₃₀, (b) CH₃₀DEAE₅, (c) CH₃₀DEAE₁₅ e (d) CH₃₀DEAE₂₅.69 Figura 22. Espectros de RMN ¹H dos polímeros de maior massa molecular da série com 15 % de Figura 23. Espectros de RMN ¹H de menor massa molecular modificados com DEAE e PEG. (a) Figura 24. Espectros de infravermelho dos polímeros da série com 20 % de GA e modificados com Figura 25. Espectros de infravermelho dos polímeros da série com 30 % de GA e modificados Figura 26. Comparação entre os espectros de infravermelho dos derivados modificados com DEAE e PEG. (a) CH₂₀DEAE₂₅, (b) CH₃₀DEAE₂₅, (c) CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5} e (d) CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}. 76 Figura 27. Determinação da CAC da série de polímeros com 15 % de GA e modificado com DEAE. Figura 28. Determinação da CAC da série de polímeros com 20 % de GA e modificados com

Figura 29. Determinação da CAC da série de polímeros com 30 % de GA e modificados com Figura 30. Determinação da CAC da série de polímeros com 20 e 30 % de GA e modificados com Figura 31. CAC de todos os polímeros em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹. 80 Figura 32. Difratogramas de raios X dos polímeros. (a) série de polímeros com variação do grau de acetilação, (b) série de polímeros com 20 % de GA e modificados com DEAE e (c) série de Figura 33. Curvas da capacidade de tamponamento (CT) com intervalo de pH de interesse entre 5,5 e 7,4. (a) polímero com 15 % de GA de maior massa molecular e seu derivado contendo DEAE, (b) polímeros com 20 % de GA de menor massa molecular e seus derivados contendo DEAE, (c) polímeros com 30 % de GA de menor massa molecular e seus derivados contendo DEAE e (d) polímeros com 20 e 30 % de GA de menor massa molecular modificados com DEAE e PEG... 86 Figura 34. Eletroforese das nanopartículas dos derivados CH₁₅ e CH₁₅DEAE₂₅ com siCCR2 nas razões N/P 0,5; 1; 2; 3, 5 e 10. (a) pH 6,3 e (b) pH 7,4. "L" refere-se ao padrão DirectLoadTM 1 kb Figura 35. Eletroforese das nanopartículas dos derivados CH₂₀ e CH₂₀DEAE_Z com siCCR2 nas razões N/P 0,5; 1; 2; 3, 5 e 10. (a) pH 6,3 e (b) pH 7,4. "L" refere-se ao padrão 1 kb plus DNA Figura 36. Eletroforese das nanopartículas dos derivados CH₃₀ e CH₃₀DEAE_Z com siCCR2 nas razões N/P 0,5; 1; 2; 3, 5 e 10. (a) pH 6,3 e (b) pH 7,4. "L" refere-se ao padrão 1 kb plus DNA Figura 37. Eletroforese das nanopartículas dos derivados CH_YDEAE₂₅PEG_{1,5} com siCCR2 nas razões N/P 0,5; 1; 2; 3, 5 e 10. (a) pH 6,3, "L": padrão 1 kb plus DNA Ladder e (b) pH 7,4, "L": Figura 38. Efeito da razão N/P sob o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e o potencial Zeta das Figura 39. Efeito da razão N/P sob o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e o potencial Zeta das nanopartículas CH_YDEAE_Z-siCCR2 em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹: (a) CH₂₀DEAE₁₅,

Figura 40. Estabilidade coloidal das NPs dos derivados CH _Y /CH _Y DEAE ₂₅ com siCCR2 nas razões
N/P 3 e 5, em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L^{-1} por 24 horas (a) CH ₁₅ , (b) CH ₁₅ DEAE ₂₅ , (c)
CH ₂₀ , (d) CH ₂₀ DEAE ₂₅ , (e) CH ₃₀ e (f) CH ₃₀ DEAE ₂₅
Figura 41. Índice de polidispersão em função de tempo. Nanopartículas dos derivados
CH_Y/CH_YDEAE_{25} com siCCR2 nas razões N/P 3 e 5, em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L ⁻¹ . (a)
CH ₁₅ , CH ₂₀ e CH ₃₀ , (b) CH ₁₅ DEAE ₂₅ , (c) CH ₂₀ DEAE ₂₅ e CH ₃₀ DEAE ₂₅
Figura 42. Distribuições representativas do tamanho das nanopartículas dos derivados
CH _Y /CH _Y DEAE ₂₅ com siCCR2 nas razões N/P 3 e 5, em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L ⁻¹ ,
nos tempos 0 e 24 horas. (a) CH15, (b) CH15DEAE25, (c) CH20, (d) CH20DEAE25, (e) CH30, (f)
CH ₃₀ DEAE ₂₅
Figura 43. Influência da massa molecular e grau de acetilação sob o diâmetro hidrodinâmico das
NPs em função do tempo. (a) CHH e CHM e (b) CH ₁₅ , CH ₂₀ e CH ₃₀ em pH 7,4 e força iônica de
0,15 mol L^{-1} nas razões N/P 3 e 5
Figura 44. Índice de polidispersão das nanopartículas em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L^{-1} nas
razões N/P 3 e 5, em função de tempo. (a) CHH e CHM (maior massa molecular) e (b) CH15, CH20
e CH ₃₀ (menor massa molecular) 100
Figura 45. Estabilidade coloidal e índice de polidispersão das nanopartículas dos derivados
CH_YDEAE_{25} com siCCR2 em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L ⁻¹ nas razões N/P 3 e 5, em
função do tempo. (a) diâmetro hidrodinâmico e (b) Pdi 101
Figura 46. Potencial Zeta das nanopartículas dos derivados CHH, CHM, CH ₂₀ CH ₃₀ , CH _Y DEAE ₂₅
com siCCR2 em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L ⁻¹ nas razões N/P 3 e 5 102
Figura 47. Estabilidade coloidal das nanopartículas dos derivados CH _Y DEAE ₂₅ PEG _{1,5} com siCCR2
na razão N/P 10. (a) pH 6,3 e (b) pH 7,4, ambos com força iônica de 0,15 mol L^{-1} 103
Figura 48. Potencial Zeta das nanopartículas dos derivados peguilados com siCCR2 na razão N/P
10 em pH 6,3 e 7,4, ambos com força iônica de 0,15 mol L^{-1} 104
Figura 49. Distribuições representativas do diâmetro das nanopartículas dos derivados em pH 7,4
e força iônica de 0,15 mol L ⁻¹ na razão N/P 10, nos tempos 0 e 7 horas. A curva preta corresponde
ao tempo zero e a vermelha após 7 horas. (a) CH20DEAE25, (b) CH20DEAE25PEG1,5, (c)
CH ₃₀ DEAE ₂₅ , (d) CH ₃₀ DEAE ₂₅ PEG _{1,5}
Figura 50. Distribuições representativas do diâmetro das nanopartículas dos derivados em pH 7,4
e força iônica de 0,15 mol L ⁻¹ na razão N/P 10, nos tempos 0 e 7 horas na presença de BSA. A

curva verde corresponde ao tempo zero e a azul após 7 horas. (a) CH₂₀DEAE₂₅, (b) Figura 51. Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução para dois derivados na razão N/P 5, em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹. (a) CH₂₀DEAE₂₅, (b) CH₃₀DEAE₂₅. Todas as amostras foram examinadas sob uma tensão de aceleração de 2,0 kV com 5,4 mm de distância do feixe. As imagens foram capturadas com um aumento de 30.000x, barra de escala de 100 nm. 107 Figura 52. Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução para os derivados contendo PEG na razão N/P 10, em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹. (a) CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1.5}, (b) CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}. Todas as amostras foram examinadas sob uma tensão de aceleração de 2,0 kV com 5,0 mm de distância do feixe. As imagens foram capturadas com um aumento de 100.000x, Figura 53. Viabilidade celular em macrófagos Raw 264.7 pela adição dos derivados poliméricos. (a) CH_YDEAE_Z (b) CH_YDEAE_ZPEG_{1,5}. Considerou um nível de significância com valor-p (*) < 0,05 e a análise estatística de cada derivado, para cada concentração, foi realizada em comparação ao grupo de controle de células não tratadas......109 Figura 54. Viabilidade celular em macrófagos Raw 264.7 pela adição das NPs dos derivados com siRNA, nas razões N/P entre 1 e 100. (a) CH_YDEAE_Z (b) CH_YDEAE_ZPEG_{1,5}. Considerou um nível de significância com valor-p (*) < 0.05 e a análise estatística das nanopartículas, para cada razão N/P, foi realizada em comparação ao grupo de controle de células não tratadas. As nanopartículas foram preparadas em tampão fosfato de pH 6,3..... 110 Figura 55. Viabilidade celular em macrófagos Raw 264.7 pela adição das soluções controles.. 111 Figura 56. Viabilidade celular em células HeLa-GFP pela adição dos derivados poliméricos $CH_YDEAE_ZPEG_{1,5}$. Considerou um nível de significância com valor-p (*) < 0,05 e a análise estatística de cada derivado, para cada concentração, foi realizada em comparação ao grupo de Figura 57. Viabilidade celular em células HeLa-GFP pela adição das NPs dos derivados com siRNA-GFP. (a) nanopartículas dos derivados sem modificação hidrofílica na razão N/P 5 e (b) nanopartículas dos derivados CHyDEAEz na razão N/P 5 e CHyDEAEzPEG_{1,5} na razão N/P 10. Considerou um nível de significância com valor-p (*) < 0,05 e a análise estatística das nanopartículas, para cada razão N/P, foi realizada em comparação ao grupo de controle de células não tratadas. As nanopartículas foram preparadas em tampão fosfato de pH 7,4...... 112

Figura 58. Viabilidade celular em células *HeLa*-GFP pela adição das soluções controles...... 112 Figura 59. Captação celular em macrófagos Raw 264.7 fixados com PFA. Após adição das NPs do derivado CH₃₀DEAE₂₅RITC com siRNA, as células foram incubadas por 4 horas. A coloração azul é a marcação do núcleo por DAPI e em vermelho o polímero marcado com rodamina. (a) razão N/P 3 e (b) razão N/P 5, pH 6,3. As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x, escala inferior direita de 5 µm...... 114 Figura 60. Captação celular em macrófagos Raw 264.7 fixados com PFA. Após adição das NPs as células foram incubadas por 4 horas. A coloração azul é a marcação do núcleo por DAPI e em verde o siRNA-FAM. (a) CH₃₀DEAE₂₅-siRNA-FAM na razão N/P 5 e (b) CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1.5}siRNA-FAM na razão N/P 10, ambos em pH 6,3. As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x..... 115 Figura 61. Captação celular em macrófagos Raw 264.7 fixados com PFA (3D). Após adição das NPs de CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}-siRNA-FAM na razão N/P 10 e pH 6,3, as células foram incubadas por 4 horas. A coloração azul é a marcação do núcleo por DAPI e em verde o siRNA-FAM. A imagem foi capturada em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x..... 116 Figura 62. Captação celular em macrófagos Raw 264.7 fixados com PFA. Após adição das NPs do derivado CH₁₅DEAE₂₅FITC com siRNA-Cy5 na razão N/P 5 e pH 7,4, as células foram incubadas por 4 horas. A coloração azul é a marcação do núcleo por DAPI, em verde o polímero marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e em vermelho o siRNA marcado com cianina 5 (Cy5). As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x. 117 Figura 63. Captação celular em macrófagos Raw 264.7 em tempo real (células vivas). NPs do derivado CH₃₀DEAE₂₅RITC com siRNA-FAM, na razão N/P 5 e pH 7,4 no tempo zero. (a) área total da região capturada (b) área ampliada com destaque na célula à esquerda. As imagens foram capturadas com lente objetiva de 63x..... 118 Figura 64. Captação celular em tempo real em macrófagos Raw 264.7. Nanopartículas do derivado CH₃₀DEAE₂₅RITC com siRNA-FAM na razão N/P 5 e pH 7,4, no intervalo de tempo entre 0 e 31 minutos. As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x. Nos painéis foram inseridos setas e círculos que mostram pontos amarelo-alaranjados perdendo sua coloração com o passar do tempo: a seta precede o que ocorre no círculo mostrado Figura 65. Captação celular em tempo real em macrófagos Raw 264.7. Nanopartículas do derivado CH₃₀DEAE₂₅RITC com siRNA-FAM na razão N/P 5 e pH 7,4, no intervalo de tempo entre 33 e 60 minutos. As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x. Nos painéis foram inseridos setas e círculos que mostram pontos amarelo-alaranjados perdendo sua coloração com o passar do tempo: a seta precede o que ocorre no círculo mostrado Figura 66. Análise da expressão relativa de TNF-α em macrófagos Raw 264.7 com nanopartículas preparadas em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹. Considerou um nível de significância de 0,05. As médias populacionais são consideradas significativamente diferentes com valor-p (***) < 0,0001; (**) < 0,01 e (*) < 0,05. NS refere às médias populacionais que não foram significativamente diferentes. (a) siRNA-TNF- α livre e conjunto de nanopartículas dos derivados de quitosana sem modificação hidrofílica (razão N/P 5) e (b) Lipofectamina e conjunto de nanopartículas dos derivados modificados com DEAE (razão N/P 5) e PEG (razão N/P 10).... 122 Figura 67. Análise qualitativa do knockdown após transfecção em células HeLa-GFP. As células foram incubadas por 24 horas com NPs contendo siRNA-GFP. As imagens foram capturadas em um microscópio de fluorescência com lente objetiva de 10x (barra de escala: 100 µm)...... 124

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

Abs	Absorbância
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês Bovine Serum Albumin)
CAC	Concentração de agregação crítica
CCR2	Gene receptor que codifica as proteínas receptoras de quimiocina da
	família C-C do tipo 2
CH _Y	Quitosana com Y % de unidades acetiladas
CH _Y DEAE _Z PEG _{1,5}	"Y" refere-se à porcentagem de unidades acetiladas, "Z" à porcentagem de
	unidades substituídas por DEAE e "T" à porcentagem de unidades
	substituídas por PEG
СТ	Capacidade de tamponamento
Dh	Diâmetro hidrodinâmico, (Dhs: plural)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEAE	Dietilaminoetil
DLS	Dispersão dinâmica de luz (do inglês Dynamic Light Scattering)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês Fluorescein Isothiocyanate)
GA	Grau de acetilação
GS	Grau de substituição
GD	Grau de desacetilação
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês Green Fluorescent Protein)
GPC	Cromatografia de permeação em gel (do inglês, Gel Permeation
	Chromatography)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês,
	Fourier-transform infrared spectroscopy)
I _{Cr}	Índice de cristalinidade
IF	Intensidade de fluorescência
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	Micro RNA
NP	Nanopartícula, (NPs: plural)

N/P	Relação molar entre a quantidade de grupo amina e grupo fosfato, (+/-)
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês Phosphate Buffered Saline)
PFA	Para-formaldeído
PEG	Polietilenoglicol
PEG-SH	O-(2-mercaptoetil)-O'-metil-polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
Pdi	Índice de polidispersão
Pol	Polímero
RNA	Ácido ribonucleico
RITC	Isotiocianato de rodamina B (do inglês Rhodamine B Isothiocyanate)
siRNA	Pequenos fragmentos de RNA (do inglês small interfering RNA)
siRNA-CCR2	siRNA para o silenciamento de CCR2 (siCCR2)
siRNA-GFP	siRNA para o silenciamento de GFP.
siRNA-Cy5	siRNA ligado à cianina 5 (Cy5)
siRNA-FAM	siRNA ligado à carboxifluoresceína (FAM)
siRNA-TNF-α	siRNA para o silenciamento de TNF-α.
UV	Radiação ultravioleta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, Tumor Necrosis Factor alpha)
u.a	Unidade arbitrária

LISTA DE SÍMBOLOS

\overline{M} n	Massa molecular média numérica
\overline{M} w	Massa molecular média ponderal
\overline{M} w/ \overline{M} n	Índice de polidispersão das massas moleculares
H-1(D)	Hidrogênio anomérico do monômero desacetilado
H-1(Ac)	Hidrogênio anomérico do monômero acetilado
H-1(DEAE)	Hidrogênio anomérico do monômero substituído com DEAE

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 Terapia gênica	
2.1.1 Vetores: viral, plasmidial e nanoestruturado	26
2.1.2 Terapia gênica via siRNA	29
2.2 Polímeros como base de um sistema multifuncional	31
2.2.1 Utilização da quitosana como vetor	32
2.2.2 Limitações e estratégias para obtenção de um vetor não viral eficiente	33
2.2.2.1 Grupo amina: abordagem prática em resposta à variação do pH endossomal	34
2.2.2.2 Grupo acetil como porção hidrofóbica	35
2.2.2.3 Cadeias de polietilenoglicol (PEG) e a manutenção da integridade das nanopartícu	ulas e do
conteúdo carreado	
3 OBJETIVOS	40
4 METODOLOGIA	41
4.1 Materiais	41
4.2 Principais equipamentos e instrumentos	42
4.3 Abordagem utilizada na síntese dos derivados anfipáticos de quitosana	42
4.3.1 Quitosana acetilada (CH)	44
4.3.2 Dietilaminoetil-quitosana (CH-DEAE)	45
4.3.3 Dietilaminoetil-quitosana marcado com isotiocianato de rodamina B (CH-DEAE-	RITC) e
isotiocianato de fluoresceína (CH-DEAE-FITC)	45
4.3.4 Dietilaminoetil-quitosana substituído com PEG (CH-DEAE-PEG)	47
4.4 Caracterização físico-química dos polímeros	49
4.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	49
4.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	51
4.4.3 Estudo da capacidade de auto associação dos polímeros via espectroscopia de fluor	escência
na região do ultravioleta	51
4.4.4 Difratometria de raios X: estimativa do índice de cristalinidade	52
4.4.5 Estimativa das massas moleculares médias via cromatografia de permeação em ge	el (GPC)
	53

4.4.6 Capacidade de tamponamento (CT)	54
4.5 Caracterização das nanopartículas	
4.5.1 Mobilidade eletroforética em gel de agarose	
4.5.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta ($\boldsymbol{\zeta}$)	
4.5.2.1 Estudo da estabilidade hidrodinâmica	57
4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)	
4.6 Ensaios biológicos	
4.6.1 Viabilidade celular	
4.6.2 Captação celular	61
4.6.3 Estudos de transfecção in vitro	62
4.6.3.1 Análise da expressão de TNF-α em macrófagos	
4.6.3.2 Análise da expressão de GFP em células <i>HeLa</i> -GFP	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	
5.1 Caracterização físico-química dos polímeros	
5.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	66
5.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)	72
5.1.3 Auto associação dos polímeros em solução aquosa	77
5.1.4 Difratometria de raios X: estimativa do índice de cristalinidade	80
5.1.5 Estimativa das massas moleculares médias via cromatografia de permeação em g	gel (GPC)
5.1.6 Capacidade de tamponamento (CT)	
5.2 Caracterização físico-química das nanopartículas	
5.2.1 Mobilidade eletroforética em gel de agarose	
5.2.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta ($\boldsymbol{\zeta}$)	91
5.2.2.1 pH 6,3	
5.2.2.1.1 Estabilidade coloidal	93
5.2.2.2 pH 7,4	
5.2.2.1 Estabilidade coloidal	
5.2.2.2 Distribuição de tamanho na presença de albumina	
5.2.3 Morfologia das nanopartículas	
5.3 Ensaios biológicos	

5.3.1 Viabilidade celular dos derivados e suas nanopartículas	
5.3.2 Captação celular	
5.3.2.1 Células fixadas	
5.3.2.2 Células vivas	117
5.3.3 Estudos de transfecção in vitro	
5.3.3.1 Análise da expressão relativa de TNF-α em macrófagos	
5.3.3.2 Análise da expressão de GFP em células HeLa-GFP	
6 CONCLUSÕES REFERÊNCIAS APÊNDICE A Determinação da porcentagem da marcação com isotiocianato de rodamina (RITC) Determinação da porcentagem da marcação com isotiocianato de fluoresceína (FITC) APÊNDICE B Sonda de associação hidrofóbica APÊNDICE C	125 127 142 142 143 143 144 144 145
Curva analítica de calibração das massas moleculares da pululana Cromatogramas dos polímeros APÊNDICE D Padrões para comparação dos tamanhos de ácido nucleico via eletroforese em gel o	145
APÊNDICE E Concentração comum de polímero na solução estoque das nanopartículas	

1 INTRODUÇÃO

A utilização de siRNA tem levado a uma grande variedade de potenciais aplicações terapêuticas para doenças cujos tratamentos convencionais são limitados. No entanto, a entrega segura e eficaz de siRNA no ambiente intracelular continua sendo a maior barreira para sua aplicação na terapia gênica (SPÄNKUCH *et al.*, 2005). Embora o silenciamento *in vitro* de genes (*knockdown*) possa ser eficiente com siRNAs, a liberação destes *in vivo* é limitada devido à rápida degradação enzimática e baixa captação celular. Portanto, a aplicação de siRNA em novas terapias depende do desenvolvimento de sistemas de liberação com propriedades que superem essas limitações.

Sistemas de liberação a base de polímeros possuem grande potencial de aplicação para liberação de siRNA. Em particular, polímeros que contêm grupos amina interagem com maior facilidade com ácidos nucleicos (DNA/RNA) protegendo-os da degradação, o que permite a liberação controlada/disparada por estímulos intracelulares, como por exemplo a alteração do pH endossomal. Entretanto, limitações como a citotoxicidade dos polímeros devem ser superadas (LIN *et al.*, 2012; TIERA *et al.*, 2013). Nosso grupo de pesquisa estudou recentemente a interação entre siRNA e derivados de quitosana com baixa proporção de grupos amina terciário (15 %) obtidos pela inserção de grupo dietilaminoetil (DEAE) em quitosanas com alto grau de desacetilação (98 %) (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Neste trabalho, foram realizadas modificações em quitosanas parcialmente acetiladas variando-se o grau de substituição (GS) por grupos DEAE e polietilenoglicol (PEG). Estas modificações permitiram a combinação de interações hidrofóbicas e eletrostáticas para a preparação de nanopartículas (NPs) mais estáveis em condições fisiológicas (pH 7,4 e força iônica 0,15 mol L⁻¹) (MARTINS *et al.*, 2019).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Terapia gênica

A descoberta da estrutura tridimensional do DNA (dupla hélice) por Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins, em 1953, impulsionou o progresso da genética. O esclarecimento da composição química, das propriedades e função dos ácidos nucleicos, bem como, ensaios com DNA de bactérias, ampliaram a perspectiva de novos avanços terapêuticos para o tratamento de doenças (LINDEN, 2010; WATSON, CRICK, 1953).

Entretanto, apenas em 1990 obteve-se aprovação do primeiro teste clínico de terapia gênica. Neste estudo clínico, o Dr. William French Anderson realizou a terapia do tipo *ex vivo* por múltiplas infusões de linfócitos de sangue periférico, que foi modificado geneticamente com um vetor retroviral carreando o gene que codifica a síntese da adenosina desaminase (ADA). Como resultado, obteve-se o enxerto sustentado de células T para o tratamento da síndrome de imunodeficiência combinada severa (SCID). Dentre as doenças genéticas, a SCID foi uma das primeiras doenças a ser tratada por terapia gênica, iniciando assim, uma nova era terapêutica (AIUTI, 2017; LINDEN, 2010; VOET; VOET, 2006).

A terapia gênica é uma estratégia clínica baseada no uso de genes nos organismos vivos com o intuito de prevenir ou tratar algum tipo de doença. O tratamento com material genético pode ser realizado pela recuperação, criação, aumento, redução ou bloqueio de determinada função gênica nas células alvo (AIRES, 2008; HARDEE *et al.*, 2017). A terapia pode ser efetuada utilizando-se dois tipos de vetores: o primeiro consiste na transferência do ácido nucleico às células hospedeiras por meio de vírus (transdução) e no segundo, o material genético pode ser carreado até as células alvo por meio de transportadores não virais, como por exemplo, plasmídeos, ou estes associados a lipídeos ou polímeros catiônicos (transfecção) (SHI *et al.*, 2011).

2.1.1 Vetores: viral, plasmidial e nanoestruturado

Proteger os ácidos nucleicos contra os processos de degradação pelas nucleases contidas no ambiente extracelular e garantir que eles atravessem a membrana plasmática até o ambiente intracelular são algumas das barreiras biológicas que devem ser superadas para aumentar o sucesso terapêutico (ESCOFFRE; TEISSIÉ; ROLS, 2010). É importante ressaltar que membranas celulares carregadas negativamente possuem potencial elétrico na ordem de -90 mV

(GUYTON; HALL, 1997) e são essenciais para a homeostase celular por dificultar a entrada de macromoléculas ou microrganismos que podem afetar a atividade celular e o código genético (BLAZEK; PALEO; WEISLEDER, 2015; HUO *et al.*, 2019).

Os primeiros estudos clínicos de terapia gênica se deram por meio de vetores virais. Estes são conhecidos pela alta capacidade de transdução (SHI et al., 2011). Os vetores retrovirais são capazes de inserir seu genoma no genoma das células hospedeiras e, portanto, as células filhas carregam a cópia dos genomas de vetores virais após a divisão celular (MISRA, 2013). No entanto, o uso destes vetores virais pode gerar consequências negativas devido às mutações causadas pela inserção aleatória do genoma do vetor do vírus no genoma das células hospedeiras, como por exemplo, a formação de tumores (HARDEE et al., 2017). Outro vetor viral bastante usado desde o início da história de terapia gênica clínica é o adenovírus. Diferente dos retrovírus, os vetores adenovirais não são integrativos, e consequentemente não provocam mutação insercional. Entretanto, as proteínas capsídicas deste vírus ou vetores derivados destes são altamente imunogênicos. Assim, quando os vetores adenovirais são administrados nos pacientes, estes podem induzir uma resposta imune de elevada magnitude. Já houve um caso de óbito após administração de um vetor adenoviral em um paciente com a deficiência da enzima ornitina transcarbamilase devido à indução de resposta imune contra o vetor (MISRA, 2013; RAPER et al., 2003). Assim, para prosseguir com êxito, um vetor gênico ideal deve ser menos: imunogênico, citotóxico e genotóxico (SMITH; ZHANG; NIVEN, 1997).

Estudos com vetores não virais, como plasmídeos e 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). Plasmídeos (pDNA) são moléculas circulares de dupla fita de DNA encontrados naturalmente em bactérias. Eles se replicam independentemente do DNA cromossômico das bactérias pois contém sua própria origem de replicação. E também, em geral, possuem um gene de resistência que fornece às bactérias resistência a um antibiótico (MISRA, 2013). Por meio da tecnologia do DNA recombinante pode-se inserir um gene de interesse no pDNA que será codificado após ser direcionado à célula alvo (CLINE, 1985). No entanto, a entrega de pDNAs modificados geneticamente na forma livre pode ser prejudicada devido ao maior tamanho e carga negativa, devido a uma maior dificuldade para os plasmídeos atravessarem a membrana plasmática (GOSWAMI *et al.*, 2019). Por esta razão, complexar o pDNA em um sistema

que atue como um "escudo" permite um maior tempo de circulação bem como a internalização do vetor modificado na matriz intracelular (GOSWAMI *et al.*, 2019; YIN *et al.*, 2014).

Moléculas catiônicas como lipídeos e polímeros sintéticos ou naturais, constituem a classe dos vetores não virais nanoestruturados que formam nanopartículas com ácidos nucleicos via interação eletrostática (JAYAKUMAR et al., 2010; PICOLA et al., 2016). Os lipídios formam um grupo diverso de moléculas sendo classificados de forma geral em ácidos graxos, acilgliceróis e fosfolipídios, e têm em comum a insolubilidade na água (hidrofóbico). Porém, alguns são anfipáticos, como os lipídios de membrana, que são formados basicamente por fosfolipídios com duas extremidades, sendo uma hidrofílica e outra hidrofóbica. Em meio aquoso os lipídeos podem se auto organizar na forma de micelas de centro hidrofóbico ou lipossomos de centro hidrofílico. As micelas são formadas devido à maior área do grupo polar, sendo diferente dos lipossomos, os quais são estruturados a partir da menor área do grupo polar ou pelo maior volume da região hidrofóbica (ISRAELACHVILI, 1992). Os lipossomos complexam o material genético na forma de lipoplexos como resultado da interação entre a carga positiva do lipídio e a carga negativa do ácido nucleico (MA et al., 2007). Testes clínicos com lipossomos têm sido realizados para o tratamento de doenças genéticas hereditárias como fibrose cística e hemofilia (FISHER et al., 2017; HYDE et al., 2000; RAMESH et al., 2001; SHI et al., 2011). Polímeros catiônicos (policátions) possuem unidades (meros) que se repetem ao longo da estrutura química formando uma macromolécula, o que permite por exemplo, uma maior facilidade de complexação com ácidos nucleicos (SHI et al., 2011). Outro ponto favorável, no caso dos polímeros sintéticos, é a facilidade de síntese para a maioria deles, junto à presença de sítios reativos que possibilitam modificações químicas estruturais conforme o interesse de aplicação (DE SOUZA et al., 2018; MARTINS et al., 2019; SHI et al., 2011; TIERA et al., 2011).

Uma ampla variedade de polímeros tem sido utilizada como vetor para transfecção gênica, incluindo poli-L-lisina (PLL), polietilenoimina (PEI), quitosana (Figura 1) e outros (DE SOUZA *et al.*, 2018; JAYAKUMAR *et al.*, 2010; MANSOURI *et al.*, 2004). De acordo com De Souza e colaboradores (2018), experimentos com nanopartículas a base de quitosana demonstraram viabilidade celular em células *HeLa* acima de 75 %, bem como uma taxa de silenciamento na expressão de mRNA-SSB (RNA que codifica a expressão da proteína associada à síndrome de *Sjögren*) na faixa de 60-80 %, dependendo da razão de grupos amina/fosfato (N/P) utilizada na preparação das nanopartículas (DE SOUZA *et al.*, 2018).





Fonte: Elaborado pela autora.

2.1.2 Terapia gênica via siRNA

Em 1990, na tentativa de obter as pétalas das petúnias geneticamente modificadas, de tonalidade púrpura mais intensa, Napoli e colaboradores (1990) observaram um fenômeno na expressão de genes responsáveis pela cor. Ao introduzir cópias do gene que levava à síntese do pigmento púrpura, as plantas resultantes exibiram zonas de coloração diferente nas folhas (Figura

2). Com isso, eles notaram que os genes responsáveis pela cor de alguma forma inativavam uns aos outros (NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990).

Figura 2. Quatro representações fenotípicas da petúnia (A-D), resultantes da introdução do gene *chalcona sintase* (CHS) numa orientação antissenso.



Fonte: Reprodução de NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990.

Em 1998, Andrew Fire e Craig Mello mostraram que a introdução da fita senso de RNA controlou a expressão de proteínas em um trabalho realizado com o verme nematoide *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998). Em 2006, Fire e Mello receberam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela participação na elucidação do silenciamento gênico. Este fenômeno ficou conhecido como interferência por RNA (RNAi), uma vez que há a interferência na expressão gênica pela inserção de dsRNA (do inglês, *double strand* RNA) (FRANÇA *et al.*, 2010).

Sendo um processo natural de defesa para a eliminação/redução de mRNAs anômalos e RNAs exógenos, o mecanismo de silenciamento por RNA, ou também, silenciamento póstranscricional do gene (PTGS) foi o primeiro mecanismo reconhecido na proteção dos organismos contra RNA viral (MEISTER; TUSCHL, 2004). O PGTS 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 (FRANÇA *et al.*, 2010). 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 3) (LAM *et al.*, 2015).



Fonte: Adaptação traduzida de LAM, 2015.

2.2 Polímeros como base de um sistema multifuncional

O desenvolvimento de nanopartículas (NPs) para liberação eficiente de DNA/RNA requer o ajuste na estrutura dos polímeros para a melhoria de várias propriedades, como por exemplo, a solubilidade e a estabilidade em meio fisiológico e baixa toxicidade celular (LAYEK *et al.*, 2014; PICOLA *et al.*, 2016). Neste sentido, sistemas multi-responsivos anfipáticos configuram-se como uma tecnologia promissora para a liberação de uma variedade de biomoléculas, sendo a proteção do material genético por polímeros hidrofílicos uma estratégia

necessária para evitar interações indesejáveis com proteínas do plasma, como a albumina, e células do sistema imune (ROZEMA *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2009). Além disso, dados da literatura mostram claramente que um conteúdo hidrofóbico mínimo se faz necessário para promover uma melhor adsorção pela membrana plasmática (CONVERTINE *et al.*, 2009), facilitando a interação, internalização e dissociação do poliplexo no interior celular (LAYEK *et al.*, 2014) (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática da formação das nanopartículas, barreiras biológicas, etapas de internalização e liberação intracelular do siRNA até o silenciamento gênico.



Fonte: Elaborado pela autora com adaptação de TIERA *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2019; *Smart Servier Medical Art.*

2.2.1 Utilização da quitosana como vetor

Devido às barreiras biológicas de captação e internalização celular até o silenciamento gênico, o desenvolvimento de vetores não virais vem sendo realizado como uma estratégia para a formação de nanopartículas estáveis (DE SOUZA *et al.*, 2018). Neste sentido, a quitosana, um polímero catiônico natural, é uma alternativa promissora para essa finalidade (Figura 5) (TIERA *et al.*, 2011; PICOLA *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2018).



Fonte: Adaptado de MAO; SUN; KISSEL, 2010.

Dentre as quitosanas utilizadas como vetores não virais, algumas características físicoquímicas são de primordial importância para otimizar a liberação do siRNA, como por exemplo, o grau de desacetilação (GD) e a massa molecular (LAVERTU *et al.*, 2006): o GD influencia as propriedades dos derivados por meio da densidade de carga, solubilidade, tamanho das NPs e velocidade de degradação (ELGADIR *et al.*, 2015; HUANG; KHOR; LIM, 2004) e, quitosanas de baixa massa molecular (*Mw* ~10 kDa) podem levar à baixa eficiência biológica, tanto para mediar a transfecção com pDNA (LAVERTU *et al.*, 2006) quanto para silenciamento de genes via siRNA (LIU *et al.*, 2007). Resultados da literatura mostram ainda que a formação de NPs a partir de quitosanas com massa molecular média em torno de 65-170 kDa, exibem maior eficiência no silenciamento de genes (entre 45 % e 65 %) com a formação de nanopartículas com tamanho hidrodinâmico de ~200 nm (LIU *et al.*, 2007; MA; BUSCHMANN; WINNIK, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2018).

2.2.2 Limitações e estratégias para obtenção de um vetor não viral eficiente

Um dos desafios da quitosana não modificada para atuar como um vetor não viral devese principalmente à sua baixa solubilidade em condições fisiológicas (STRAND *et al.*, 2008). Na formação de nanopartículas, deve ser levado em consideração uma complexação adequada, em que o tamanho, a forma e as características químicas da superfície da partícula são fundamentais para direcionar e facilitar o processo de captação celular (BUS; TRAEGER; SCHUBERT, 2018; ELSABAHY; WOOLEY, 2012; FRÖHLICH, 2012).

Os grupos amina primário e hidroxila contidos na estrutura da quitosana permitem modificações que possibilitam aos seus derivados atuarem como carreadores gênicos (KRITCHENKOV; ANDRANOVITŠ; SKORIK, 2017). Neste tema, a preparação de nanopartículas estáveis de baixa razão N/P foi resolvida em nosso grupo de pesquisa por meio de

derivados de quitosana contendo grupo amina terciário pelo enxerto com DEAE (DE SOUZA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2019; PICOLA *et al.*, 2016).

2.2.2.1 Grupo amina: abordagem prática em resposta à variação do pH endossomal

O desenvolvimento de vetores poliméricos que formam nanopartículas com tamanho em escala nanométrica e resistentes à agregação em condições fisiológicas é um dos maiores desafios da nanobiotecnologia envolvendo a terapia gênica (YEZHELYEV *et al.*, 2008). Com isso, a fim de melhorar a interação do polímero com o siRNA, uma abordagem sobre o controle do conteúdo hidrofílico tem sido investigada (ARANAZ; HARRIS; HERAS, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2018; ELSABAHY; WOOLEY, 2012; MARIE *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2019).

O grupo amina além de melhorar a afinidade da NP com a membrana plasmática também permite controlar a variação do pH no processo de maturação endossomal para os valores encontrados nos endossomos primário (pH 6,3) e tardio (pH 5,5) (BARUA *et al.*, 2011; LI; NICOL; SZOKA, 2004; PALERMO *et al.*, 2011; WAKEFIELD *et al.*, 2005). Essa estratégia, retarda a maturação do endossomo e a ação das hidrolases ácidas no processo de degradação lisossomal. E assim, a captura de prótons (H⁺) permite o intumescimento do complexo polimérico no endossomo por íons Cl⁻ e moléculas de H₂O decorrente do equilíbrio osmótico, seguido pela ruptura da membrana endossomal e liberação do DNA/RNA. Este processo tem sido denominado como efeito de "esponja de prótons" (Figura 6) (AKINC *et al.*, 2005; BUS; TRAEGER; SCHUBERT, 2018).

Figura 6. Representação do processo hipotético de "esponja de prótons ". A captura de prótons pelo policátion com boa capacidade de tamponamento leva ao intumescimento do endossomo, e posteriormente, devido ao aumento do influxo de íons Cl⁻ e moléculas de água, à ruptura da membrana endossomal e liberação do poliplexo/ácido nucleico.



Fonte: Reprodução traduzida de BUS et al., 2018.
Neste trabalho, o controle do grau de substituição por DEAE na cadeia polimérica de quitosana permitiu otimizar a interação com as sequências de ácidos nucleicos, pelo aumento da carga resultante positiva do polímero, mesmo em um pH mais elevado, e com isso, a obtenção de nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico entre 100 e 300 nm (DE SOUZA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2013). O aumento da carga resultante é fornecido pelo grupo amina terciário e, ao ser incorporado na quitosana, resulta em uma estrutura contendo grupos amina primário, secundário e terciário. E desta forma, enquanto o grupo amina terciário contribui para uma melhor interação com o ácido nucleico, os demais atuam na captação de prótons na vesícula endossomal (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2.2.2.2 Grupo acetil como porção hidrofóbica

Derivados de quitosana contendo porções hidrofóbicas permitem uma melhor captação celular, podendo facilitar a internalização e a liberação de ácido nucleico no interior celular (CAO *et al.*, 2019). De acordo com Kritchenkov e colaboradores (2017), a inserção de grupos hidrofóbicos na quitosana resulta na formação de um polímero anfipático (KRITCHENKOV; ANDRANOVITŠ; SKORIK, 2017). O ácido esteárico (DU *et al.*, 2010), capróico (LAYEK; SINGH, 2013) e anidrido acético (MARTINS *et al.*, 2019) são exemplos de compostos contendo porções hidrofóbicas que contribuem para a formação de vetores poliméricos como carreadores biológicos. Hu e colaboradores (2006) realizaram um estudo com derivados de quitosana com monômeros substituídos com ácido esteárico: neste estudo, os polímeros exibiram complexação eficiente com pDNA formando partículas estáveis com alto valor de potencial Zeta (~+20 mV) e diâmetro hidrodinâmico de ~225 nm na razão N/P 10 (HU *et al.*, 2006).

Neste contexto, o presente trabalho possui como estratégia, a utilização de unidades hidrofóbicas por meio da inserção de grupo acetil em torno de 20 e 30 %. Além disso, tem-se a combinação com porções hidrofílicas pela inserção de DEAE, as quais possibilitam reduzir as ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas (Figura 7). E assim, os grupos amina ficam disponíveis para interagir com o meio aquoso e moléculas de ácido nucleico (MARTINS *et al.*, 2019; STRAND *et al.*, 2008). As modificações sugeridas buscam a estabilidade de nanopartículas em um pH próximo à neutralidade (7,4) e uma captação eficiente das nanopartículas no interior celular.



Figura 7. Representação genérica da redução das ligações de hidrogênio (pontilhados em vermelho) e espaçamento entre as cadeias poliméricas pela inserção de DEAE.

Fonte: Elaborado pela autora.

2.2.2.3 Cadeias de polietilenoglicol (PEG) e a manutenção da integridade das nanopartículas e do conteúdo carreado

Para prolongar o tempo de circulação e manter a integridade das NPs são utilizadas moléculas com a habilidade de blindar estas nanopartículas contra a adsorção de proteínas séricas e a redução da atuação do sistema de defesa (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015). O poloxâmero (MÜLLER *et al.*, 1996) e álcool polivinílico (TAKEUCHI *et al.*, 2000) (Figura 8) são exemplos de compostos que promovem a blindagem das NPs. No entanto, estudos *in vivo* mostram que a inserção de PEG (peguilação) continua sendo a estratégia mais utilizada para camuflar as NPs do sistema de defesa mediante a prevenção estérica das opsoninas, as quais são proteínas específicas que sinalizam as NPs para serem fagocitadas (ALLEN *et al.*, 1991; BLANCO; SHEN; FERRARI,

2015; GUO; HUANG, 2011). Além disso, dentre as moléculas citadas, o PEG foi o que recebeu aprovação para algumas finalidades farmacêuticas. Os primeiros conjugados de enzimas ao PEG foram aprovados pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) e são conhecidos comercialmente como *ADAGEN*[®] (1994) e *ONCASPAR*[®] (1990), respectivamente para o tratamento da SCID e leucemia. No período de 1990 a 2008, o FDA aprovou 9 medicamentos contendo PEG (VERONESE, 2009) e, mais recentemente, em 2018, o *REBINYN*[®] para o tratamento de hemofilia B, com o PEG conjugado a uma proteína envolvida na cascata de coagulação (UNITED STATES, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2018).

Figura 8. Compostos utilizados como revestimento na nanopartícula, a fim de minimizar interações indesejadas em meio biológico.



Poloxâmero



Álcool polivinílico

H₃C (0) O SH

PEG-SH-MEO

Fonte: Elaborado pela autora.

A inserção de PEG favorece a camuflagem das nanopartículas por meio da formação de uma camada de hidratação na superfície destas mediante interação entre as unidades de etileno glicol e moléculas de água (Figura 9), o que reduz a carga resultante das NPs, camuflando-as de possíveis interações inespecíficas com os constituintes biológicos (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; HARRIS; CHESS, 2003; GUZMAN-VILLANUEVA *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2015).





Fonte: Adaptado de MARTINS et al., 2019.

Embora o PEG possa contribuir para manter a integridade das NPs, a redução da carga residual da nanopartícula prejudica o escape endossomal devido à menor interação com a membrana do endossomo, bem como a redução do efeito de esponja de prótons mediado pelos grupos amina (AGIRRE *et al.*, 2014; YUE *et al.*, 2011). Neste contexto, é descrito que a captação de nanopartículas formadas a partir de polímeros catiônicos ocorre por meio dos processos de endocitose (BUS *et al.*, 2018). Jiang e colaboradores (2017) mostraram em um estudo realizado em macrófagos, que nanopartículas de quitosana em torno de 200 - 250 nm são incorporadas principalmente via endocitose mediada por clatrina e que a fagocitose contribuiu para a captação de nanopartículas maiores que 500 nm (JIANG *et al.*, 2017).

Considerando o processo de maturação endossomal (Figura 10), no presente trabalho, a peguilação foi realizada por ligações dissulfeto com o intuito de facilitar o escape do conteúdo carreado no compartimento endossomal: as ligações dissulfeto são biorreduzidas no ambiente redutor intracelular e clivadas pela ação da glutationa reduzida (GSH) em alta concentração (< 10 mM em condições normais), permitindo assim a liberação do PEG da cadeia polimérica e uma melhor interação da nanopartícula com a membrana endossomal (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; TIERA *et al.*, 2013; VADER *et al.*, 2011; ZHANG; SATTERLEE; HUANG, 2012).



Figura 10. Progresso da maturação do endossomo à lisossomo e ação das hidrolases ácidas.

Fonte: Reprodução traduzida de COOPER; HAUSMAN, 2007.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal a síntese de derivados de quitosana com maior grau de acetilação para obtenção de nanopartículas estáveis em condições próximas às fisiológicas, visando a seleção de um carreador eficiente para a liberação de siRNA. Para compreender o comportamento físico-químico destes sistemas em meio aquoso, foram avaliados o diâmetro hidrodinâmico e o potencial Zeta. Estudos de transfecção *in vitro* foram realizados a fim de verificar a captação das nanopartículas até a liberação do ácido nucleico complexado no interior citoplasmático. A realização do objetivo proposto envolveu as seguintes etapas:

a) Síntese e caracterização de derivados de dietilaminoetil-quitosana (CH-DEAE);

b) Inserção de PEG na cadeia polimérica de dois derivados;

c) Preparação, caracterização e estudo físico-químico das nanopartículas (polímero de quitosana + siRNA);

d) Estudo da estabilidade das NPs em meio tamponado (pH 6,3 e 7,4 e força iônica de 0,15 mol L^{-1} de NaCl);

e) Estudo da toxicidade dos polímeros e suas nanopartículas em linhagens celulares de macrófago *RAW* 264.7 e célula epitelial de carcinoma cervical humano, *HeLa*-GFP;

f) Estudos de transfecção in vitro nas linhagens celulares supracitadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

Quitosana comercial de menor massa molecular ($M_W \sim 208$ kDa e ~ 20 % GA) utilizada como material de partida foi adquirida da Polymar (Fortaleza, Brasil). Outros reagentes como quitosana de maior massa molecular (M_W ~280 kDa e ~16 % GA), hidrocloreto de 2-cloro-N,Ndietilaminoetil (Cl-DEAE), O-(2-mercaptoetil)-O'-metil-polietilenoglicol (SH-PEG-MeO, Mw 2000 Da), propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), membrana de celulose (Spectra/Por®) 14 kDa, isotiocianato de rodamina B (RITC) e fluoresceína (FITC), agarose, cloreto de deutério (DCl), óxido de deutério (D₂O), soro fetal bovino (FBS), tripsina-EDTA 1X, (5'antimicótica e antibiótica (100×), siRNA-CCR2 solução UGCUAAACGUCUCUGCAAAdTsdT-3' (senso), 5'-UUUGCAGAGACGUUUAGCAdTsdT -3' (antissenso) - (M_w 13.317 Da), siRNA-FAM - (M_w 13.853 Da), siRNA-Cy5 - (M_w 13.849 Da), dihidrocloreto de 2-(4-amidinofenil)-6-indolecarbamidina (DAPI), meio de cultura celular com alta concentração de glicose contendo L-glutamina (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium), para-formaldeído (PFA) foram adquiridos da Merck KGaA. Dimetilsulfóxido (DMSO), soro bovino de albumina (BSA), cloreto de sódio, hidróxido de sódio, fosfato monossódico, anidrido acético, ácido acético glacial, acetato de sódio, etanol, metanol, tris-(hidroximetil) aminometano foram adquiridos da Synth. Ácido clorídrico foi obtido da Dinâmica LTDA. Todos solventes foram utilizados como recebido do fabricante. Kit de proliferação celular CellTiter96® AQueous One 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil))-2-(4-sulfofenil)-2H-Solution, contendo tetrazólio (MTS) e o acoplador de elétrons metassulfato de fenazina (PMS), foi adquirido da Promega Corporation, 1 kb plus DNA Ladder, DirectLoadTM 1 kb DNA Ladder, lipofectamina 2000 Da, lipopolissacarídeos de Escherichia coli O111:B4 (LPS) foram adquiridos da Invitrogen. *Kit* comercial *Murine TNF-* α *Standart TMB ELISA Development (PREPOTECH*[®]). siRNA-GFP, (5'-CGUCGUAGCAAACCACCAAdTsdT-3' 5'siRNA-TNF- α (senso), UUGGUGGUUUGCUACGACGdTsdT -3' (antissenso) - (M_w 13.340 Da) foram adquiridos da Ambion[®]. As linhagens celulares, macrófago murino Raw 264.7 e célula epitelial de carcinoma cervical humano HeLa-GFP, foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Água deionizada e água ultrapura foram purificadas pelo sistema de purificação GEHAKA e *Arium*[®] *Pro*, respectivamente.

4.2 Principais equipamentos e instrumentos

Centrífuga de baixa temperatura, *Beckman Coulter Allegra 64R Righ Speed*; Centrífuga Marconi, modelo *MA* 870; Cromatógrafo LC-20 com detector de índice de refração modelo RID-10^a (*Shimadzu*); Difratômetro de raios X, modelo XRD-6000 (*Shimadzu*); Estufa de secagem a vácuo, Marconi, modelo *MA* 030/12; Equipamento de eletroforese (*Life technology Model 250*), Fotodocumentador de luz ultravioleta (L-PIX, *Loccus*); Espectrômetro de infravermelho médio com transformada de *Fourier*, modelo Vertex 70, (*Bruker*) com acessório para pastilha de KBr; Espectrômetro de ressonância magnética Nuclear de 400 MHz (*Bruker*); Incubadora de CO₂, modelo 3100 *Forma Series II Water Jacket (Thermo Scientific*TM); Leitor de placas EL800 (*Bio-Tek Instruments, Inc*); Liofilizador L101 (*Liotop*); Medidor de pH (HANNA); Microscópio confocal a laser *Zeiss*, modelos LSM 710 e 780; Microscópio de fluorescência *Zeiss Imager* M2, *Zeiss, Gottingen, Germany*; Microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de campo JSM-6701F (JEOL) e 7500F (JEOL); *Zetasizer NanoZS (Malvern Instrument*, Worcstershire, UK).

4.3 Abordagem utilizada na síntese dos derivados anfipáticos de quitosana

A variação dos graus de acetilação e substituição por grupo DEAE foi proposta tendo como foco a obtenção de nanopartículas mais estáveis em condições fisiológicas (pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹). Portanto, as estruturas dos derivados foram modificadas construindo-se vetores com composições variáveis (Figura 11). Os polímeros utilizados tanto para sínteses como para caracterização foram previamente secos em estufa a 60 °C sob pressão reduzida.

A quitosana comercial de menor massa molecular com 20 % de GA (CH₂₀, ~208 kDa) foi utilizada como um dos polímeros de partida, da qual obteve-se derivados acetilados na faixa de 25 e 30 %. Posteriormente, nos polímeros com maior e menor graus de acetilação, foram inseridas porções hidrofílicas de DEAE em torno de 5, 15 e 25 % a fim de melhorar as propriedades físico-químicas das nanopartículas, como por exemplo o aumento do potencial Zeta, o qual permite melhorar a interação entre o derivado polimérico e o ácido nucleico com a formação de nanopartículas de menor diâmetro hidrodinâmico (Dh). Os polímeros com 25 % de DEAE foram

enxertados com cerca de 1,5 % de cadeias de PEG com o intuito de manter a integridade das nanopartículas em condições fisiológicas (ARYA; DAS; SAHOO, 2018). Para verificar a captação intracelular do polímero na forma complexada, derivados marcados com isotiocianato de rodamina B (CH-DEAE-RITC) e de fluoresceína (CH-DEAE-FITC) foram sintetizados. Por fim, para estudos de comparação do efeito da massa molecular sobre as propriedades físico-químicas das nanopartículas, realizou-se o enxerto com DEAE na faixa de 25 % numa quitosana de partida de maior massa molecular (CH₁₅, ~280 kDa).

Figura 11. Organograma da estratégia de síntese para obtenção dos derivados anfipáticos de quitosana. Blocos cinza: polímeros de partida; Blocos azul: derivados apenas acetilados de menor massa molecular; Blocos verde: derivados de menor e maior massa molecular e modificados com DEAE; Blocos alaranjado: derivados de menor massa molecular e modificados com DEAE e PEG; Bloco vermelho: derivado de menor massa molecular e modificado com DEAE e RITC; Bloco verde-limão: derivado de maior massa molecular e modificado com DEAE e FITC.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.1 Quitosana acetilada (CH)

O procedimento de N-acetilação foi conduzido com anidrido acético, adaptado dos métodos previamente descritos (LU *et al.*, 2004; QIN *et al.*, 2006). Neste procedimento a quitosana foi solubilizada em ácido acético 3,0 % (0,52 mol L⁻¹) por 12 h. Após este período, dissolveu-se o anidrido acético em etanol (1,34 equivalente de anidrido/-NH₂ a ser acetilado) para posterior adição na solução da quitosana previamente solubilizada. A mistura foi submetida à agitação magnética por 12 horas a temperatura ambiente. O produto reacional foi dialisado em membrana de celulose (14 kDa) contra água deionizada até atingir pH 7 e, em seguida, liofilizado para obtenção do produto seco. A Figura 12 mostra o mecanismo proposto para a síntese dos derivados acetilados por anidrido acético.



Fonte: Elaborado pela autora baseado em SOLOMONS; FRYHLE, 2009.

O mecanismo envolve o ataque do par de elétrons livres do grupo amina da quitosana (nucleófilo) ao carbono carbonílico do anidrido acético. Posteriormente, ocorre um rearranjo de elétrons para liberação do íon acetato, que ao final, captura um próton do grupo amina secundário para estabilização do derivado acetilado e formação de ácido acético.

4.3.2 Dietilaminoetil-quitosana (CH-DEAE)

Para modificação com DEAE, 1,00 g de quitosana foi solubilizada em 46,30 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ por 12 h. Posteriormente, aqueceu-se esta solução a 65 °C, com a correção do pH para 7,5 - 8 com NaOH 0,1 mol L⁻¹, para posterior adição de Cl-DEAE (2:1 - DEAE:-NH₂ livre). Agitou-se o sistema por 2 horas e o controle do pH foi realizado a cada 30 minutos. Ao final, o produto reacional foi dialisado em membrana de celulose (14 kDa) contra NaOH 0,05 mol L⁻¹ por 24 horas e, posteriormente, contra água deionizada por 3 dias até atingir pH 7. Liofilizou-se para obtenção do produto seco (adaptado de GABRIEL; TIERA; TIERA, 2015). A Figura 13 mostra o mecanismo proposto para a reação via substituição nucleofílica bimolecular (Sn2).



Figura 13. Mecanismo proposto para síntese dos derivados substituídos com o grupo dietilaminoetil (DEAE).

Fonte: Elaborado pela autora baseado em SOLOMONS; FRYHLE, 2009.

4.3.3 Dietilaminoetil-quitosana marcado com isotiocianato de rodamina B (CH-DEAE-RITC) e isotiocianato de fluoresceína (CH-DEAE-FITC)

Neste procedimento, 300 mg de polímero foram dispersos em 37 mL de água deionizada. Em seguida, sob agitação, 37 μ L de ácido acético glacial foram adicionados para a completa solubilização. O pH da solução foi ajustado para 6,2 com NaOH 0,05 mol L⁻¹ e a solução foi mantida sob atmosfera de nitrogênio (N₂) por 30 min. Posteriormente, adicionou-se gota a gota,

17 mg do marcador fluorescente previamente solubilizado em 9 mL de metanol. A reação foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e agitação constante por 18 horas em temperatura ambiente. O produto reacional foi dialisado em membrana de celulose (14 kDa) por 8 dias, sendo: 4 dias contra água deionizada, 1 dia contra NaOH 0,05 mol L⁻¹ e, novamente, contra água por mais 3 dias. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz, para posterior liofilização, seguido de extração do marcador não ligado via *Sohxlet*, utilizando metanol como solvente. Ao final, o produto foi caracterizado por UV-vis para determinação da porcentagem de marcação dos respectivos derivados contendo RITC e FITC (APÊNDICE A). A Figura 14 mostra o esquema do mecanismo proposto para a síntese dos derivados modificados com isotiocianato de rodamina B e de fluoresceína via adição nucleofílica.

Figura 14. Esquema do mecanismo proposto para síntese dos derivados modificados com isotiocianato de rodamina B (RITC) e isotiocianato de fluoresceína (FITC).



Fonte: Elaborado pela autora baseado em MA et al., 2008; SOLOMONS; FRYHLE, 2009.

A porcentagem de marcação fluorescente (\mathscr{M}_{MF}) foi determinada com base na Equação

1.

$$\mathcal{W}_{MF} = \left(\frac{n_{Marcador}}{n_{Polimero}}\right) x 100$$
 Equação 1

Em que $n_{Marcador}$ é o número de mol do marcador fluorescente (RITC/FITC) e $n_{Polímero}$ é o número de mol do polímero.

Neste procedimento, 200 mg do polímero seco previamente modificado com DEAE foi dissolvido em 20 mL de uma solução ácida de água deionizada contendo 320 µL ácido acético. Após completa solubilização do polímero, adicionou-se 20 mL de tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4. Em seguida, N-succinimidil-3-(2-piridilditiol), SPDP, (1:1; SPDP:PEG) previamente dissolvido em 1 mL de DMSO foi gotejado lentamente na solução polimérica. A reação foi mantida sob agitação por 3 horas em temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se lentamente o SH-PEG-MeO (1:33; PEG:-NH₂ livre), previamente dissolvido em 1 mL de PBS pH 7,4. A reação foi mantida a 40 °C por 16 horas, para posterior diálise contra PBS 7,4 por 3 dias em membrana de celulose (14 kDa) e um dia contra água (pH 7,4-8,0). Após a diálise, a amostra foi liofilizada (KIM *et al.*, 2008; SLÜTTER *et al.*, 2010). A Figura 15 mostra mecanismo proposto para a síntese, em que inicialmente, o grupo amina da quitosana (-NH₂) é funcionalizado com SPDP para acomodar a formação da ligação dissulfeto, liberando N-hidroxisuccinimida (NHS). Em seguida, o grupo piriditiol do SPDP é substituído com PEG-SH liberando a 2-mercaptopiridina em equilíbrio tautomérico com a piridina-2-tiona.



Figura 15. Mecanismo proposto para a síntese dos derivados enxertados com cadeias de polietilenoglicol-SH (PEG-SH) via ativação com SPDP.

Fonte: Elaborado pela autora baseado em KIM et al., 2008; SLÜTTER et al., 2010.

4.4 Caracterização físico-química dos polímeros

4.4.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

A análise de RMN é realizada na região da radiofrequência, região de baixa energia, e baseia-se nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos. Nesta região ocorre apenas transições de *spin* por meio da absorção induzida de energia, o que permite a mudança da orientação de *spin* em relação ao campo magnético aplicado, processo este denominado por fenômeno de ressonância magnética nuclear. Em uma análise de RMN ¹H, nem todos os hidrogênios de uma molécula possui ressonância na mesma frequência e, portanto, o ambiente químico de cada hidrogênio irá determinar a força do campo magnético aplicado para que ocorra a alteração de *spin*: átomos de "H" mais blindados absorvem a energia eletromagnética em um campo magnético induzido maior, enquanto que átomos de "H" menos blindados absorvem energia em um campo magnético induzido menor (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

As análises de RMN ¹H foram realizadas por meio do espectrômetro *Agilent Technologies* 400 MHz a 80 °C (WEINHOLD *et al.*, 2009) em colaboração com o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de São Paulo, Instituto de Química - IQSC, Campus de São Carlos. As amostras previamente secas foram dissolvidas em 600 μ L de D₂O e 20 μ L DCl numa concentração de 10 mg mL⁻¹. Considerando que a frequência ressonante de um núcleo é dada pelo seu ambiente magnético/químico, à medida que se aumenta a temperatura, a taxa de rotação (frequência) sobre a ligação aumenta e o sinal referente a este núcleo se desloca para um valor de maior frequência (baixo campo induzido). Portanto, o aumento da temperatura de 60 para 80 ° foi necessário para deslocar o sinal anomérico do monômero acetilado (que fica sobreposto ao sinal do hidrogênio do solvente posicionado em 4,7 ppm quando uma menor temperatura é utilizada) para a região de baixo campo. Esta alteração da metodologia contribuiu para a melhorar a linha de base dos espectros, sendo possível considerar todos hidrogênios anoméricos - H-1(D); H-1(Ac); H-1(DEAE) - e, por fim, obter a reprodutibilidade das determinações percentuais.

A quantidade de sinal obtido em um espectro de RNM ¹H refere-se aos diferentes tipos de hidrogênios na estrutura química da molécula e a área destes sinais está na mesma proporção da quantidade de hidrogênios do mesmo tipo. Com isso, pode-se integrar a área do sinal de resposta

(*I*) para determinações quantitativas de grupos contendo "H" em um dado composto. Neste trabalho, a integração da área dos sinais e os respectivos espectros foram obtidos por meio do *software Mestre Nova* versão 6.02 e, para determinação das modificações realizadas foi necessário atribuir um sinal de referência conhecido e que está presente em toda fração do polímero. A este sinal foi atribuída a área correspondente ao hidrogênio situado no carbono 1 (anomérico) do anel glicopiranosideo das porções monoméricas dos derivados de quitosana (I_{H_1}).

O número de monômeros contendo o grupo acetil faz referência ao grau de acetilação ($\%_{GA}$), em que $I_{CH_{3-Ac}}$ refere-se à ressonância dos 3 hidrogênios metílicos do grupo acetamida. A Equação 2 permitiu determinar a porcentagem do grau de acetilação (LAVERTU *et al.*, 2003).

$$\mathscr{M}_{GA} = \frac{\left[\frac{I_{CH_{3}-Ac}}{3}\right]}{I_{H_{1}}} X100$$
Equação 2

O grau de substituição com DEAE ($\%_{DEAE}$) refere-se à quantidade de monômeros substituídos com DEAE em relação ao total de monômeros contidos na cadeia polimérica. A integral do sinal $I_{CH_{3-DEAE}}$ refere-se ressonância dos 6 hidrogênios metílicos do grupo DEAE. A Equação 3 permitiu determinar a porcentagem do grau de substituição por DEAE (GABRIEL; TIERA; TIERA, 2015).

$$\%_{DEAE} = \frac{\left[\frac{I_{CH_{3-DEAE}}}{6}\right]}{I_{H_{1}}} X100$$
 Equação 3

Assim como para o \mathcal{W}_{DEAE} , a grau de substituição por PEG (\mathcal{W}_{PEG}) refere-se à quantidade de monômeros enxertados com PEG em relação à totalidade de monômeros no derivado. A integral do sinal I_{CH_2-PEG} refere-se à ressonância dos hidrogênios metilênicos repetitivos da cadeia de PEG ([CH₂-CH₂-O]-n). A Equação 4, adaptada de Belabassi e colaboradores (2017), permitiu determinar a porcentagem do grau de substituição por PEG (BELABASSI *et al.*, 2017).

$$\mathscr{W}_{PEG} = \frac{\left[\frac{I_{CH_2}}{172}\right]}{I_{H_1}} X100$$
Equação 4

4.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

As análises de IV baseiam-se nos modos vibracionais moleculares (deformações axiais/estiramentos e angulares) quando o campo elétrico da radiação incidente interage com as moléculas nas respectivas frequências de vibração de suas ligações químicas. Estes movimentos moleculares são observados nos espectros apenas quando há variação no momento dipolar de uma molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005).

Neste trabalho, os polímeros previamente secos foram misturados com KBr (1 % m/m) e prensados para obtenção de uma pastilha transparente. A análise foi realizada em temperatura ambiente, com 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹ no intervalo de 4000 – 400 cm⁻¹. Utilizou um espectrômetro de infravermelho médio com transformada de *Fourier* (FTIR), modelo *Vertex* 70, marca *Bruker (Germany)* do Laboratório de Físico-Química da Embrapa Instrumentação, São Carlos. Os espectros de infravermelho foram tratados pelo *software OriginPro 8.5*.

4.4.3 Estudo da capacidade de auto associação dos polímeros via espectroscopia de fluorescência na região do ultravioleta

A espectroscopia de fluorescência se baseia na excitação eletrônica e permite a detecção da radiação emitida por um composto fluoróforo quando seus elétrons relaxam de um estado energético excitado para o estado fundamental. A emissão de fluorescência da molécula depende diretamente da polaridade do meio, podendo assim reportar o microambiente ou a polaridade do meio em que a sonda está inserida (LAKOWICZ, 2006). Umas das formas de mensurar as mudanças é utilizar moléculas como sondas fluorescentes, como por exemplo, o pireno (APÊNDICE B, Figura B1-a) (PHILIPPOVA *et al.*, 2001; PHILIPPOVA; KORCHAGINA, 2012). O pireno é utilizado como sonda hidrofóbica a fim de verificar a formação de agregados em solução. Neste trabalho ele foi utilizado para determinar a capacidade de auto associação dos derivados anfipáticos de quitosana por meio da variação da concentração das soluções dos polímeros (GABRIEL, 2013; MARTINS *et al.*, 2019; PHILIPPOVA *et al.*, 2012).

O espectro do pireno exibe cinco bandas vibracionais nomeadas de I₁ à I₅ (APÊNDICE B, Figura B1-b), sendo bem resolvido que o pico I está associado a uma maior polaridade do solvente em relação ao pico III (MARTINS *et al.*, 2019; PHILIPPOVA *et al.*, 2001; PHILIPPOVA; KORCHAGINA, 2012). E, portanto, a razão I₁/I₃ possibilita uma análise quantitativa da polaridade do solvente em virtude da capacidade de auto associação dos derivados de quitosana, permitindo assim, determinar a concentração de agregação crítica do polímero (CAC) pela formação de micro domínios hidrofóbicos em solução (BARBOSA *et al.*, 2016; SILVA, 2002). O pireno foi excitado em 310 nm e o espectro de fluorescência registrado no intervalo 360 a 400 nm. Em uma cubeta de quartzo, contendo pireno e solução tampão fosfato de pH 6,3, foi realizada a adição de polímero (5,0 g L⁻¹) para leitura dos picos vibrônicos I₁ (373 nm) e I₃ (384 nm) no espectro a 25 °C. As medidas foram realizadas em triplicata, em um espectrofluorímetro da *Thermo Scientific*, modelo *Lumina*, no laboratório do Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima do Laboratório de Química Bio-Orgânica Ambiental (LQBOA) do Departamento de Química e Ciências Ambientais, IBILCE-UNESP.

4.4.4 Difratometria de raios X: estimativa do índice de cristalinidade

A difratometria de raios X se baseia na difração de fótons de raios X oriundos das transições eletrônicas das camadas mais internas de um átomo (K e L) (FILHO; LOPES, 2014). É a técnica mais indicada para determinação da estrutura cristalina de um material a partir do espalhamento dos feixes difratados dos quais se obtêm as medidas de direção, comprimento (*a*, *b* e *c*) e o ângulo (α , $\beta e \gamma$) entre os eixos de um retículo cristalino (ALBERS *et al.*, 2002; CULLITY, 1967). Neste sentido, o conhecimento da periodicidade do arranjo atômico interno permite determinar a natureza amorfa ou não do material (CULLITY, 1967). E desta forma, a estimativa do índice de cristalinidade (*I*_{Cr}) pode ser obtida por meio da relação das intensidades dos picos associados às regiões cristalina (~20°) e amorfa (~10°) de derivados de quitosana, conforme estabelecido pela Equação 5 (PEREIRA *et al.*, 2017).

$$I_{Cr} = \left(\frac{I_{MAX} - I_{AM}}{I_{MAX}}\right). 100$$
 Equação 5

Em que I_{MAX} é a intensidade máxima da difração cristalina em ~20° e I_{AM} é a intensidade máxima da difração amorfa a ~10°.

Neste trabalho, as medidas de difração de raios X dos polímeros foram obtidas por um difratômetro *SHIMADZU* (modelo XRD-6000) com radiação Cu-K α e um monocromador de grafite. Utilizou-se uma voltagem de 30 kV e uma corrente de 30 mA, com alcance de varredura do ângulo de difração (2 θ) entre 4 e 90° numa taxa de varredura de 2°/min a temperatura ambiente, no Laboratório de Técnicas Nucleares e AFM da Embrapa Instrumentação, São Carlos.

4.4.5 Estimativa das massas moleculares médias via cromatografia de permeação em gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel é um tipo de cromatografia líquida que se baseia na separação de moléculas em função do tamanho das cadeias moleculares, a qual é muito utilizada para determinação das massas moleculares de polímeros. Pela metodologia, uma solução da amostra é injetada em um sistema de fluxo (fase móvel) até atingir a coluna de separação cromatográfica. Esta coluna por sua vez, possui em seu interior um material microporoso (fase estacionária) que permite que apenas moléculas de menor massa molecular entrem nos poros, e assim, moléculas maiores são detectadas em um intervalo de tempo menor (LABARRE; PONCHEL; VAUTHIER, 2011).

Como um polímero pode ser constituído por cadeias com diferentes tamanhos distribuídos em sua composição, a determinação das massas moleculares é realizada através de uma média destes valores (ATKINS; PAULA, 2014). E para melhor precisão dos dados, uma calibração convencional com um padrão conhecido, neste caso a pululana (Figura 16), foi realizada. Neste trabalho foram utilizados os valores expressos em massa molecular média numérica (\overline{M}_n) e massa molecular média ponderal (\overline{M}_w) com o objetivo de estimar o tamanho médio das cadeias poliméricas e a relação M_w/M_n , a qual é denominada por índice de polidispersão (Pdi) e reflete a homogeneidade do tamanho médio das cadeias do polímero.

Figura 16. Estrutura química da pululana: padrão comum de polissacarídeo para determinação das massas moleculares médias de quitosana e seus derivados por GPC.



Fonte: Elaborado pela autora.

As amostras foram solubilizadas em uma solução eluente (tampão acetato com pH 4,5; ácido acético 0,3 mol L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹) numa concentração de 5 g L⁻¹. O fluxo da vazão de análise foi de 0,8 mL min⁻¹ a 40 °C. As amostras foram eluídas em duas colunas em série (SB-803 HQ e SB-805-HQ *Shodex*, 0,8 cm x 30 cm) para separação das cadeias poliméricas. Utilizou-se soluções monodispersas de pululana (Pdi < 1,1) com massas moleculares variando entre 6,2 e 805,0 kDa para obtenção da curva de calibração (APÊNDICE C, Figura C1). As medidas foram realizadas em um cromatógrafo *Shimadzu* (LC-20) com detecção por índice de refração, modelo RID-10^a, no Laboratório de Fotoquímica do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) pela Prof.^a. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavaleiro.

4.4.6 Capacidade de tamponamento (CT)

A capacidade de tamponamento refere-se à quantidade de ácido ou base que uma solução pode neutralizar sem que haja uma variação apreciável no pH da mesma (BROWN *et al.*, 2007.). No estudo de polímeros catiônicos em ambiente ácido, a capacidade de tamponamento está associada a capacidade do polímero em absorver prótons. Em condições fisiológicas, este parâmetro exibe papel importante para a compreensão do escape endossomal das nanopartículas por meio do efeito de esponja de prótons (DE SOUZA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2019; TIERA *et al.*, 2011).

A metodologia foi baseada em Richard e colaboradores (2013), na qual soluções de polímero estoque foram preparadas pela dissolução equivalente da relação molar de grupo amina e ácido clorídrico (HCl/grupo amina) (RICHARD *et al.*, 2013). Posteriormente, as soluções estoque de polímeros foram diluídas com água ultrapura para uma concentração final de 1×10^{-3} mol L⁻¹ de grupos amina, seguidos pela adição de 0,15 mol L⁻¹ de NaCl para um volume final de 20 mL. A titulação potenciométrica foi realizada com NaOH de baixa concentração a 25 °C (RICHARD *et al.*, 2013). A capacidade de tamponamento (CT) foi obtida pela Equação 6 e Equação 7 a partir das curvas extraídas das titulações potenciométricas.

$$\frac{dn_{NaOH}}{dpH}(i) = \frac{dn_{NaOH}(i+1) - dn_{NaOH}(i-1)}{dpH(i+1) - dpH(i-1)}$$
Equação 6

$$CT = \frac{dn_{NaOH}}{dpH} x \frac{1}{n_N}$$
 Equação 7

Em que n_{NaOH} é o número de mol de NaOH e n_N é o número de mol de grupos amina na solução.

4.5 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas de quitosana foram preparadas com base no método de complexação, no qual o tamanho das partículas pode variar em função da massa molecular do

polímero e da razão polímero/siRNA. A variação da razão de cargas, denominada razão N/P corresponde a razão molar de grupos amina para grupos fosfato. A variação da razão N/P afeta o potencial Zeta, o qual depende tanto do pH como do grau de desacetilação da quitosana (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016).

Na preparação das nanopartículas, os polímeros foram previamente solubilizados em HCl 0,1 mol L⁻¹ e, posteriormente em tampão fosfato (força iônica de 0,15 mol L⁻¹ e pH 6,3) para obtenção de uma solução estoque entre 1,0-1,5 mg mL⁻¹. As soluções de polímero e siRNA foram preparadas separadamente, para posterior preparação em soluções tamponantes de pH 6,3 ou pH 7,4. Para preparar diferentes razões N/P, alíquotas das soluções estoque dos policátions foram adicionadas no tampão contendo o siRNA. Durante o processo, a solução do siRNA foi mantida sob agitação magnética, e após a preparação as soluções das nanopartículas foram mantidas em repouso por 15 minutos para estabilização.

4.5.1 Mobilidade eletroforética em gel de agarose

A eletroforese se baseia na separação de partículas por meio da aplicação de uma voltagem externa que promove a migração destas partículas para um polo positivo ou negativo. As partículas são inseridas nos "poços" de uma matriz de gel, situada dentro de uma cuba contendo uma solução tampão que permite as condições ideais para a condução elétrica e a manutenção do valor do pH. Neste ponto, para visualização do ácido nucleico (banda) é necessário a utilização de um agente corante. Este ao se associar ao ácido nucleico emite maior fluorescência quando o gel é exposto à luz ultravioleta de um fotodocumentador.

A eletroforese foi realizada em uma matriz de gel de agarose 0,80 % corado com brometo de etídio (EtBr, 10 mg mL⁻¹) em uma solução tampão tris-acetato-EDTA 1x (TAE). As nanopartículas obtidas em diferentes razões N/P (0,5 - 10,0) foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente inseridas nos poços, tendo como padrões: *Ladder* 1 kb *plus* e *Ladder* 1 kb *DirectLoad* (APÊNDICE D). A corrida foi realizada a 80 V por 1h30 min (Adaptado de PICOLA *et al.*, 2013) e, em seguida, o gel foi revelado por um fotodocumentador via exposição à radiação UV (254 nm) no laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, coordenado pela Prof.^a. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, IBILCE-UNESP.

4.5.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (ζ)

DLS é uma técnica que permite a análise de partículas suspensas em um líquido, da qual pode-se extrair o diâmetro hidrodinâmico (Dh). A metodologia se baseia na iluminação das partículas por um laser em um curto período de tempo. O tamanho medido refere-se ao diâmetro da partícula que difunde numa direção e velocidade aleatórias. Desta forma, o equipamento utiliza o movimento Browniano das partículas para interpretar os respectivos tamanhos com base na velocidade de movimento, levando em consideração que partículas menores se movem mais rápido e as maiores se movem mais lentamente e dispersam mais luz (Manual *Zetasizer Nano*, 2013).

Na preparação das NPs, a concentração de siRNA foi mantida em 2x10⁻⁵ mol L⁻¹ de grupo fosfato para todas as medições de diâmetro hidrodinâmico e potencial Zeta. As soluções foram preparadas em duplicata, sendo cada medição em triplicata. O tamanho das partículas foi obtido a partir de uma média das distribuições de tamanho das populações analisadas pela equação de *Einstein–Stokes* (Equação 8), considerando a difusão de partículas esféricas através de um líquido. As medidas foram realizadas pelo instrumento *Zetasizer NanoZS (Malvern Instrument, Worcstershire, UK*), operando com laser He-Ne (633 nm) em um ângulo de espalhamento de 173°, no Laboratório de Estudos em Peptídeos (LEPE), IBILCE-UNESP, coordenado pela Prof.^a. Dra. Marcia Perez dos Santos Cabrera.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \eta r}$$
Equação 8

Em que *D* é a constante de difusão, k_B é a constante de *Boltzmann*, *T* é a temperatura absoluta, η é a viscosidade e *r* é o raio da partícula esférica.

O potencial Zeta (ζ) das nanopartículas em suspensão foi avaliado no mesmo equipamento, utilizando uma célula de amostra apropriada com capilar cilíndrico e de base dobrada, e foi obtido por meio da técnica da mobilidade eletroforética (μ_E) pela equação de *Henry* (Equação 9) e a aproximação de *Smoluchowski* (Equação 10), considerando solução eletrolítica, f(ka) = 1,5 (MERTINS; DIMOVA, 2011; MERTINS *et al.*, 2018; MANUAL *ZETASIZER NANO*, 2013).

$$\mu_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(ka)}{3 \eta}$$
Equação 9

$$\zeta = \frac{\mu_E \eta}{\varepsilon \varepsilon_0}$$
Equação 10

Em que μ_E é a mobilidade eletroforética, ε é a constante dielétrica do solvente, $\varepsilon_0 = 1$ é a permissividade do vácuo e η é a viscosidade da fase aquosa. (*ka* é a relação do raio da partícula "*a*" com a espessura da dupla camada elétrica, *k*, formada entre as camadas da superfície da partícula e o solvente, respectivamente, camada interna e difusa).

Todas as medições foram realizadas em uma câmara fechada com temperatura controlada a 25 °C. Os valores das triplicatas, tanto de tamanho como de potencial Zeta, foram obtidos diretamente do *software* fornecido com o equipamento e, posteriormente, tratados nos *softwares* gráficos *OriginPro* 8.5 ou *GraphPad Prism* 8.

4.5.2.1 Estudo da estabilidade hidrodinâmica

A tendência das nanopartículas em solução em formar agregados foi avaliada mediante a análise da estabilidade hidrodinâmica em função do tempo (7 e 24 horas). A forma de preparação e análise foi a mesma descrita anteriormente. A estabilidade foi avaliada em duas condições: (i) tampão fosfato já utilizado para a preparação das nanopartículas, com pH 6,3 e 7,4 e (ii) condição que mimetiza o ambiente sérico, utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como modelo de proteína do plasma sanguíneo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; GIACOMELLI *et al.*, 2011). Vale ressaltar que a concentração em massa dos polímeros na solução final do estoque de nanopartículas foi inferior aos valores de CAC (APÊNDICE E).

Em (i) as nanopartículas foram preparadas em pH 6,3 e os diâmetros foram monitorados em um período de 24 horas. O mesmo procedimento foi adotado para as NPs preparadas em pH 7,4. Quitosanas não modificadas com menores graus de acetilação também foram utilizadas (DE SOUZA *et al.*, 2018). Em (ii) as NPs foram preparadas em pH 7,4 com posterior adição de BSA: após o preparo e estabilização das nanopartículas, adicionou-se 200 μ L de BSA estoque (220 mg mL⁻¹) em 900 μ L da solução das nanopartículas para obtenção de uma solução final contendo 40 mg mL⁻¹ de BSA. O tamanho das NPs foi monitorado por um período de 7 horas.

4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é umas das técnicas disponíveis para análise de amostras com tamanho nanométrico, sendo possível obter informações sobre a morfologia e características estruturais da superfície das amostras. O microscópio eletrônico de varredura utiliza um feixe de elétrons que garante maior resolução à análise. Este feixe de elétrons é guiado para explorar a superfície da amostra e transmite um sinal ao detector, sendo este sinal utilizado para modular o brilho do monitor, permitindo assim, a observação. O feixe de elétrons pode ser obtido por aquecimento de um filamento de tungstênio (W) com cerca de 100 μ m de diâmetro dobrado na forma de "V", por hexaboreto de lantânio (LaB₆) ou por um canhão de emissão de campo elétrico a partir de um fio de tungstênio com uma ponta extremamente fina de cerca de 100 nm (FEG – *Field Emission Gun*) (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Neste trabalho, utilizou-se a fonte de elétrons do tipo FEG para obtenção de imagens com maior resolução.

As nanopartículas previamente preparadas foram fixadas por evaporação do solvente em uma placa de silício para posterior captura das imagens. As imagens foram coletadas por dois equipamentos: em ambos, utilizou-se uma tensão de aceleração de 2,0 kV. Para a NPs das amostras sem PEG utilizou-se o microscópio JSM-6701F (JEOL), na Embrapa de São Carlos e, para as amostras contendo PEG o microscópio 7500F (JEOL), no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Protocolos em Nanotecnologia do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pelo Dr. Diego Luiz Tita. Neste último, após evaporação do solvente, as amostras poliméricas foram revestidas com uma camada de carbono, a fim de recobrir regiões da superfície que exibiram diferença de altura, decorrente do espalhamento da solução no processo de evaporação do solvente. E também, para evitar efeitos de carga e minimizar a queima da superfície da amostra durante a aquisição das imagens (BARRETO; TITA; ORLANDI, 2019).

4.6 Ensaios biológicos

Cultivou-se os macrófagos da linhagem *RAW* 264.7 em meio de cultura celular DMEM de alta concentração de glicose. O meio de cultura foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução antibiótica antimicótica contendo penicilina (10.000-12.000 U mL⁻¹),

estreptomicina (10,0-12,0 mg mL⁻¹) e anfotericina B (25,0-30,0 μ g mL⁻¹). As células foram mantidas numa incubadora umidificada a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂.

Com o intuito de avaliar a entrega do material gênico por meio da fluorescência da proteína GFP (λ_{ex} : 395 nm e λ_{em} : 509 nm), utilizou-se a linhagem celular epitelial de carcinoma cervical humano, que expressa a proteína fluorescente verde (*HeLa*-GFP), nas mesmas condições de cultivo que a linhagem de macrófagos. No entanto, pelo fato das células *HeLa*-GFP terem sido transduzidas com genes resistentes ao antibiótico blasticidina-S, foram acrescidos ao meio de cultura 15 µg mL⁻¹ de blasticidina-S.

4.6.1 Viabilidade celular

Para triagem rápida de moléculas com potencial de aplicação biológica é fundamental verificar se estas moléculas possuem algum efeito sob a proliferação celular ou se podem desencadear a morte celular (KURA *et al.*, 2014). Com isso, ensaios de viabilidade celular *in vitro* são frequentemente utilizados para verificar os efeitos destas moléculas nas células durante um período de incubação. Neste trabalho a viabilidade celular foi avaliada nas duas linhagens celulares mencionadas no tópico anterior. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de $2x10^4$ células/poço e incubadas por 24 horas em estufa de CO₂. A viabilidade celular foi conduzida conforme recomendações do fabricante pelo *Kit* de proliferação celular *CellTiter96*® *AQueous One Solution*, composto por MTS e PMS.

Uma solução estoque dos polímeros foi preparada pela solubilização de 5 mg de amostra com 200 μ L de HCl 0,1 mol L⁻¹ e, em seguida com 1,8 mL de tampão fosfato 6,3 para obtenção de um estoque à 2,5 g L⁻¹. As soluções poliméricas foram diluídas em concentrações que variaram de 0,02 a 0,5 g L⁻¹ em um volume final de 200 μ L de meio suplementado. As nanopartículas foram preparadas nas respectivas razões N/P em tampão fosfato (pH 6,3 ou 7,4 com força iônica de 0,15 mol L⁻¹): utilizou-se 50 μ L da solução contendo as nanopartículas junto a 150 μ L de meio suplementado. Soluções controles como HCl 0,1 mol L⁻¹, tampões fosfato, lipoplexos de lipofectamina e lipofectamina livre também foram utilizadas com o intuito de verificar o efeito isolado destas soluções sobre a viabilidade celular.

Após o período de plaqueamento, retirou-se o sobrenadante para posterior adição de 200 μ L das moléculas em solução (polímeros, nanopartículas ou soluções controles). Incubou-se as células novamente por 24 horas em estufa de CO₂ e, em seguida, retirou-se o sobrenadante para

adição de 100 µL da solução de MTS/PMS previamente preparada em meio não suplementado, (DMEM puro: sem a suplementação com soro e antibiótico). Após 3 horas de incubação a viabilidade foi determinada por meio de uma análise colorimétrica quantitativa de formazan com absorção máxima em 490 nm.

O sal de tetrazólio (MTS) é reduzido à formazan por meio da mediação de uma reação redox do PMS com o NADH produzido pelas enzimas desidrogenase em células metabolicamente ativas (Figura 17) (PRÄBST *et al.*, 2017) e, a intensidade de absorção colorimétrica medida é diretamente proporcional à concentração das células viáveis em cultura (*PROTOCOL, Promega Corporation*, 2012). Os resultados foram obtidos pela média (± SD) de quatro repetições de um ensaio independente, sendo expressos como valores relativos em comparação às células não tratadas conforme a Equação 11 (GUZMAN-VILLANUEVA *et al.*, 2014). Os dados estatísticos foram analisados pelo teste T, seguindo o método de *Holm-Sidak* com significância estatística (*p*) de 0,05 por meio do *software GraphPad Prism* 8.

$$\%_{Viabilidade\ celular} = \left(\frac{Abs_{CT}}{Abs_{Controle}}\right) x100$$
 Equação 11

Em que Abs_{CT} refere-se à absorbância medida das células tratadas, ou seja, contendo os polímeros, NPs ou as soluções controles e, $Abs_{Controle}$ refere-se à absorbância medida das células controle, nas quais não foram realizados nenhum tipo de tratamento ou adição de moléculas, adicionou-se apenas meio de cultura para manutenção e crescimento celular. ($Abs_{Controle}$ mensura 100 % da viabilidade celular).

Figura 17. Esquema geral da reação de redução extracelular do sal de tetrazólio à formazan mediado por PMS. O PMS é reduzido pelo NADH no interior da membrana celular e, posteriormente, transfere elétrons ao tetrazólio através da membrana plasmática.



Fonte: Elaborado pela autora baseado em HUA et al., 2019; PRÄBST et al., 2017.

4.6.2 Captação celular

A captação celular é um processo que envolve a internalização de moléculas para o interior da célula, e para que essas moléculas sejam visualizadas elas são coradas com fluoróforos específicos. Além disso, protocolos envolvendo microscopia também permitem a marcação de componentes biológicos como o núcleo, receptores de membrana, organelas e outros. Em específico, o microscópio confocal permite a aquisição de imagens digitalizadas em diferentes planos focais de uma amostra, oferecendo uma melhor definição para compreensão dos processos biológicos previamente definidos pelos marcadores fluorescentes. Além disso, a microscopia confocal também é capaz de avaliar a captação de moléculas em amostras biológicas vivas ao longo do tempo, tendo acoplada ao microscópio uma câmera fechada com temperatura, umidade e CO₂ controlados (MORTARA *et al.*, 2015). Neste trabalho foi realizada a avaliação da captação celular de células aderidas em lamínulas de vidro, fixadas com para-formaldeído (PFA, 4% v/v) e vivas, na densidade de células adequada para cada tipo de placa.

Para estudo com células fixadas, após o período de plaqueamento o sobrenadante foi removido para adição das NPs e, posteriormente, as células foram incubadas por 4 h. Na sequência,

as células foram fixadas com PFA (15 min) e marcadas com DAPI (1µg mL⁻¹, 10 min), ambos a temperatura ambiente. Após montagem adequada em lâminas de vidro com glicerina, as imagens foram capturadas em um microscópio confocal de fluorescência. Para captura das imagens das células fixadas, houve a colaboração da Prof.^a. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior com o microscópio confocal *Zeiss*, modelo LSM 710, no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce-UNESP) e do Prof. Dr. Francisco Guimarães e o Prof. Dr. Sebastião Pratavieira com o microscópio confocal *Zeiss*, modelo LSM 780, no Laboratório Multiusuário do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

Para estudo em tempo real, após o período de plaqueamento o sobrenadante foi removido e o poço foi lavado com meio de cultura não suplementado para ajuste do foco. Posteriormente, removeu-se o meio contido no poço e adicionou-se a mistura de NPs e meio de cultura para imediata captura da imagem no tempo zero. Fechou-se o sistema de incubação e as imagens subsequentes foram capturadas a cada minuto, totalizando 60 imagens ao longo de 1 hora. Utilizou-se o microscópio confocal *Zeiss*, modelo LSM 780, detector *GaAsp* de 32 canais, no Laboratório de Microscopia Confocal do Instituto Nacional de Farmacologia de São Paulo (INFAR), com auxílio da técnica Elizabeth Naomi Kanashiro e o doutorando Lucas Rodrigues de Mello. Todas as imagens foram tratadas pelo *software ZEN Blue* 2.3.

4.6.3 Estudos de transfecção in vitro

4.6.3.1 Análise da expressão de TNF-α em macrófagos

Para quantificação da expressão do alvo TNF-α utilizou-se o ensaio de imunoabsorção enzimática (*ELISA*, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), na qual um anticorpo de captura específico é adicionado previamente, para então as amostras (proteína alvo) serem adicionadas e se ligarem ao anticorpo imobilizado. Posteriormente, é adicionado o segundo anticorpo contendo biotina e, em seguida, um complexo catalisador de reações redox (peroxidase de rábano, HRP). Ao final, é adicionado um substrato cromogênico (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, TMB) que reage com o complexo enzima-anticorpo-alvo (Figura 18) para produzir um valor mensurável por uma avaliação colorimétrica, em que intensidade de absorção é diretamente proporcional à concentração do alvo presente na amostra (TEUSCHER, 2014).



Figura 18. Diagrama do formato de captura para detecção do alvo no ensaio de imunoabsorção enzimática, ELISA.

Fonte: Reprodução traduzida de TEUSCHER, 2014.

Células *Raw* 264.7 foram plaqueadas numa placa de 24 poços a uma densidade de 1,8x10⁵ células/poço e a eficiência de transfecção foi determinada por meio do *kit* comercial *Murine TNF-* α *Standart TMB ELISA Development* (PEPROTECH[®]). Após o período de plaqueamento o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com meio não suplementado para adição de uma mistura contendo 450 µL da solução de nanopartícula já estabilizada, e após 5 minutos, adicionou-se 1,35 mL de meio não suplementado. Posteriormente, as células foram incubadas por 5 h e a concentração de siRNA-TNF- α em cultura foi de 50 nM. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido para adição de 1 mL de meio suplementado, mantendo as células incubadas por 19 horas. Após 24 horas de transfecção, o sobrenadante foi removido e depois foi adicionado 300 µL de uma mistura contendo meio suplementado e lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* a uma concentração de 100 ng mL⁻¹ para estimular a produção da TNF- α (REIS *et al.*, 2011). Incubou-se as células por 4 h e, posteriormente, o sobrenadante foi coletado, centrifugado (12.000 g / 15 minutos) e estocado a -20 °C para futura quantificação relativa da TNF- α conforme as recomendações do fabricante. Como controles, utilizou-se células não tratadas, siRNA livre, células tratadas com LPS e lipoplexos de lipofectamina.

Ao final das etapas de lavagem e adição dos reagentes do *kit ELISA*, a quantificação da TNF-α foi realizada por uma avaliação colorimétrica, com absorção máxima em 450 nm, em função da oxidação do substrato TMB (Figura 19).



Figura 19. Esquema geral da reação de oxidação do TMB catalisada pela peroxidase de rábano, HRP.

Fonte: Elaborado pela autora baseado em JIA; HE; JIN, 2002.

Como controle positivo utilizou-se as células somente tratadas com LPS e a porcentagem da expressão relativa de TNF- α foi obtida por meio da Equação 12, sendo os resultados obtidos pela média (± SD) de três repetições de um ensaio independente. Os dados estatísticos foram analisados pelo teste T, seguindo o método de *Holm-Sidak* por meio do *software GraphPad Prism* 8.

$$\mathscr{W}_{TNF-\alpha} = \left(\frac{Abs_{Amostra}}{Abs_{C\acute{e}lula+LPS}}\right) x100$$
 Equação 12

Em que $Abs_{Amostra}$ refere-se à absorbância medida das células após adição das moléculas (siRNA-livre, lipoplexos de lipofectamina e nanopartículas de quitosana) e $Abs_{Célula+LPS}$ refere-se à absorbância medida das células tratadas com LPS (mensura 100 % da expressão de TNF- α).

4.6.3.2 Análise da expressão de GFP em células HeLa-GFP

Para estudo qualitativo do *knockdown* de GFP, utilizou-se a microscopia de fluorescência, na qual as células *HeLa*-GFP foram plaqueadas numa placa de 24 poços em lamínulas de vidro a uma densidade de $6x10^4$ células/poço e, como controles, utilizou-se células não tratadas e lipoplexos de lipofectamina/siRNA-GFP.

Após o período de plaqueamento, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com meio não suplementado para adição de uma mistura contendo 500 μ L da solução de nanopartícula (pH 7,4) já estabilizada, junto a 300 μ L de meio não suplementado, numa concentração de 50 nM de siRNA-GFP e, posteriormente, as células foram incubadas por 4 horas. Após este período, foi adicionado 1 mL de meio suplementado para incubação por 24 horas. Na sequência, as células foram fixadas com PFA por 15 min a temperatura ambiente. E após a montagem adequada em lâminas de vidro com glicerina, as imagens foram capturadas em um

65

microscópio de fluorescência pela Dra. Ellen Cristina Rivas Leonel e pelo Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, com o microscópio de fluorescência *Zeiss Imager* M2, *Zeiss, Gottingen, Germany*, no Laboratório de Microscopia e Microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce-UNESP).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização físico-química dos polímeros

5.1.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H)

Os espectros de RMN ¹H confirmaram os graus de acetilação na faixa de 15 a 30 %, os graus de substituição com DEAE de 5 a 25 % e o enxerto com cadeias de PEG de aproximadamente 1,5 %. A determinação da composição dos polímeros foi realizada como descrito no item 4.4.1 e os espectros são mostrados da Figura 20 à Figura 23.

Os derivados não peguilados de menor massa molecular são mostrados na Figura 20 e Figura 21 e, os de maior massa molecular na Figura 22. O grau de acetilação foi obtido pela integração do sinal em 2,38 – 2,43 ppm, referente à ressonância dos 3 hidrogênios metílicos do grupo acetamida (I_{CH_3-Ac}) pela Equação 2. O grau de substituição por DEAE foi determinado, pela integral do sinal em 1,68 – 1,63 ppm, atribuído à ressonância dos 6 hidrogênios metílicos do grupo DEAE (I_{CH_3-DEAE}) pela Equação 3. Em 1,77-1,80 ppm surgiu o sinal atribuído a ressonância dos hidrogênios do grupo DEAE quaternizado. A formação dos monômeros quaternizados decorre do pH de reação próximo a 8, em que a amina terciária do DEAE compete com o grupo amina primário da quitosana como um nucleófilo. O grau de quaternização por DEAE foi determinado usando a mesma relação descrita pela Equação 3, em que considerou-se a integral do sinal em 1,77-1,80 ppm (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Não observou a formação de estruturas quaternizadas para os derivados substituídos com 5 % de DEAE e os baixos valores de quaternização obtidos para os derivados com aproximadamente 15 e 25 % de DEAE não influenciaram o comportamento físico-químico das nanopartículas preparadas neste estudo.

O grau de substituição por PEG foi determinado pela Equação 4, a partir da integral do sinal em 4,02 ppm, referente à ressonância dos hidrogênios metilênicos da cadeia de PEG, -[CH₂-CH₂-O]-n, (I_{CH_2-PEG}) (Figura 23). A representação das porções monoméricas dos derivados e os valores percentuais de cada unidade (grupos acetil, DEAE e PEG) são listados na Tabela 1.

A presença do grupo acetil na estrutura de um polímero catiônico aumenta a hidrofobicidade dos derivados obtidos, levando a uma maior associação das suas nanopartículas com a membrana plasmática (GABRIELSON; PACK, 2006). De acordo com Forrest e colaboradores (2004), para quantificação da expressão de luciferase em uma linhagem celular de

mioblastos (*C2C12*), NPs contendo 43 % de grupo acetil induziram um aumento de 21 vezes na eficiência de transfecção em comparação às NPs de PEI não modificado. E NPs contendo 27 e 15 % de grupo acetil aumentaram as transfecções em 6 e 2 vezes, respectivamente, em comparação com o PEI não modificado (FORREST *et al.*, 2004). E não somente é necessário melhorar a associação das NPs com a membrana plasmática, como também é preciso melhorar a estabilidade em condições fisiológicas a fim de manter a integridade do conteúdo carreado ao longo dos processos biológicos (CAO *et al.*, 2019; MARIE *et al.*, 2014). Neste sentido, uma melhor complexação entre o polímero e o conteúdo carreado tem sido alcançada por meio de modificações hidrofílicas (DOSTA; RAMOS; BORRÓS, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2019). Um estudo realizado por Gutoaia e colaboradores (2016) mostraram uma melhora da solubilidade de um derivado de quitosana substituído com 8 % de PEG, em pH 7,00, em relação a uma quitosana não modificada, e uma redução do diâmetro hidrodinâmico de 200 para 140 nm. Neste mesmo estudo, eles observaram *knockdown* de ~75 % do GFP em células de carcinoma pulmonar que expressa GFP (*H1299*-GFP) para um derivado substituído com 6 % de PEG (GUŢOAIA *et al.*, 2016).



Figura 20. Espectros de RMN ¹H dos polímeros de menor massa molecular da série com 20 % de GA e modificados com DEAE. (a) CH₂₀, (b) CH₂₀DEAE₅, (c) CH₂₀DEAE₁₅ e (d) CH₂₀DEAE₂₅.

Fonte: Dados da pesquisa.

69



Figura 21. Espectros de RMN ¹H dos polímeros de menor massa molecular da série com 30 % de GA e modificados com DEAE. (a) CH₃₀, (b) CH₃₀DEAE₅, (c) CH₃₀DEAE₁₅ e (d) CH₃₀DEAE₂₅.

Fonte: Dados da pesquisa.



Figura 22. Espectros de RMN ¹H dos polímeros de maior massa molecular da série com 15 % de GA e modificado com DEAE. (a) CH₁₅ e (b) CH₁₅DEAE₂₅.

Fonte: Dados da pesquisa.




Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 1. Representação química estrutural das porções monoméricas dos derivados de quitosana e os valores percentuais da composição dos monômeros modificados com grupos acetil, DEAE e PEG. X: monômero desacetilado, Y: monômero acetilado, Z: monômero substituído com DEAE, W: monômero substituído com DEAE quaternizado e T: monômero substituído com PEG.



Polímero	Composição percentual dos monômeros obtidos por RMN ¹ H a 80 °C						
	X	Y	Z	Т	W		
CH ₁₅	84,33	15,67	-	-	-		
CH_{20}	79,31	20,69	-	-	-		
CH ₂₅	73,53	26,47	-	-	-		
CH ₃₀	71,00	29,00	-	-	-		
CH15DEAE25	58,01	15,33	26,66	-	5,33		
CH ₂₀ DEAE ₅	75,84	19,33	4,83	-	-		
CH ₂₀ DEAE ₁₅	67,84	19,33	12,83	-	0,83		
CH ₂₀ DEAE ₂₅	55,17	20,33	24,50	-	1,50		
CH ₃₀ DEAE ₅	65,84	29,66	4,50	-	-		
CH ₃₀ DEAE ₁₅	59,84	29,66	10,83	-	1,16		
CH ₃₀ DEAE ₂₅	48,01	27,66	24,33	-	4,00		
CH ₂₀ DEAE ₂₅ PEG _{1,5}	57,06	18,66	22,66	1,62	1,66		
CH ₃₀ DEAE ₂₅ PEG _{1,5}	46,63	27,66	24,33	1,38	4,00		

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A interação das ligações entre moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética incidente permite verificar alterações nos modos vibracionais moleculares dos grupos funcionais mediante a polaridade da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005). Desta forma,

uma análise qualitativa quanto às alterações propostas pelas modificações químicas estruturais pode ser realiza por meio da espectroscopia de absorção na região do infravermelho.

A região espectral entre 1650 - 900 cm⁻¹ mostra as principais bandas de absorção na região do infravermelho. A Tabela 2 lista a frequência e o tipo de vibração molecular característicos dos respectivos grupos funcionais contidos nos derivados de quitosana deste trabalho. Os espectros de infravermelho do conjunto de polímeros são mostrados da Figura 24 à Figura 26.

Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração
O-H (álcool)	3450 - 3200	Estiramento, livre e LH*
N-H (amina)	3500 - 3300	Estiramento
N-H (amida)	3500 - 3100	Estiramento
С-Н	3000 - 2850	Estiramento
N-H (amina)	1510 - 1650	Dobramento
C-N (amina)	1400 - 1000	Estiramento
C-O (quitosana-cadeia cíclica)	1050 - 1150	Estiramento
C-O (PEG-cadeia linear)	837 – 1066	Estiramento

Tabela 2. Frequência e o tipo de vibração molecular das bandas atribuídas aos grupos funcionais dos derivados poliméricos.

*LH: Ligação de hidrogênio.

Fonte: SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2005.



Figura 24. Espectros de infravermelho dos polímeros da série com 20 % de GA e modificados com DEAE. (a) CH₂₀, (b) CH₂₀DEAE₅, (c) CH₂₀DEAE₁₅ e (d) CH₂₀DEAE₂₅.

Fonte: Dados da pesquisa.



Figura 25. Espectros de infravermelho dos polímeros da série com 30 % de GA e modificados com DEAE. (a) CH₃₀, (b) CH₃₀DEAE₅, (c) CH₃₀DEAE₁₅ e (d) CH₃₀DEAE₂₅.

Fonte: Dados da pesquisa.



Figura 26. Comparação entre os espectros de infravermelho dos derivados modificados com DEAE e PEG. (a) CH₂₀DEAE₂₅, (b) CH₃₀DEAE₂₅, (c) CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5} e (d) CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}.

Fonte: Dados da pesquisa.

De modo geral, os espectros de infravermelho dos derivados se mostraram muito semelhantes aos dos polímeros de partida. No entanto, a Figura 24 e a Figura 25 mostraram alterações da intensidade da banda, pela redução dos valores de transmitância com o aumento do grau de substituição por DEAE: a banda na região de 1510 cm⁻¹ - 1650 cm⁻¹ atribuída ao dobramento vibracional do grupo N-H de amina (MANSUR *et al.*, 2013), a banda atribuída ao estiramento C-N de amina em 1380 cm⁻¹ e aquela referente ao estiramento C-H na região entre 3000 - 2850 cm⁻¹. Este comportamento pode estar associado à necessidade de uma maior absorção da radiação incidente em virtude do aumento da magnitude do momento dipolar das moléculas, dada pela maior porcentagem de grupo hidrofílico (CRICHTON; LOURO, 2013; DIMZON; KNEPPER, 2015). Observa-se também que há uma sobreposição da banda em 3570-3200 cm⁻¹, referente ao estiramento O-H com as bandas atribuídas às ligações N-H dos grupos amina e amida em decorrência de alterações nas ligações de hidrogênio entre os grupos O-H e N-H (ZHANG *et al.*, 2014). A introdução de PEG foi evidenciada pela presença da banda posicionada em 950 cm⁻¹

característica do estiramento C-O da cadeia de PEG (MALHOTRA *et al.*, 2011; SHAMELI *et al.*, 2012). Vale ressaltar que o estiramento C-O da cadeia da quitosana situa-se numa região de maior número de onda em relação ao mesmo estiramento da cadeia de PEG (estrutura linear) em virtude da maior rigidez da estrutura cíclica da quitosana que aumenta a constante da força de ligação.

5.1.3 Auto associação dos polímeros em solução aquosa

A compreensão sobre o comportamento de agregação dos polímeros é de extrema importância biológica com relação à aplicação destes materiais como vetores não virais (LI *et al.*, 2006). Além da natureza anfifílica, um dos fatores que leva à agregação é o aumento de sua concentração. O fenômeno é caracterizado pelo entrelaçamento entre as cadeias que pode ser conduzido por ligações de hidrogênio (SUN *et al.*, 2017) e por atração induzida de interações hidrofóbicas (KORCHAGINA; PHILIPPOVA, 2010). A associação da sonda fluorescente aos agregados e, consequentemente, redução na polaridade de seu microambiente é evidenciada pela diminuição da intensidade da banda vibrônica I₁ (373 nm) e aumento da intensidade da banda I₃ (384 nm). A partir destes valores é possível obter a razão I₁/I₃ em função da concentração dos polímeros, em que a inflexão característica dos gráficos é utilizada para determinar a CAC (Figura 27 à Figura 30).

A Figura 31 mostra os gráficos de CAC obtidos dos valores da inflexão dos gráficos de parâmetro de polaridade em função da concentração. Conforme esperado, a CAC se mostrou dependente do conteúdo hidrofílico (DEAE e PEG). Para o conjunto com 20 % de GA, os valores de CAC partiram de 0,07 g L⁻¹ (quitosana não modificada) para 0,20 g L⁻¹ (derivado contendo 25 % de DEAE) e 0,34 g L⁻¹ (derivado contendo 1,5 % de PEG); e para o conjunto com 30 % de GA, os valores de CAC partiram de 0,07 g L⁻¹ (quitosana não modificada) para 0,15 g L⁻¹ (derivado contendo 25 % de DEAE) e 0,18 g L⁻¹ (derivado contendo 1,5 % de PEG). A inserção de grupos hidrofílicos pôde reduzir as ligações de hidrogênio inter cadeias contribuindo para aumentar o valor da CAC dos polímeros, e consequentemente, a solubilidade destes em solução. De acordo com Gabriel e colaboradores (2015), quitosanas modificadas com grupo hidrofílico (DEAE) e hidrofóbico (dodecil) exibiram um aumento da CAC de 0,007 para 0,0114 g L⁻¹, ao aumentar a concentração de DEAE de 14 para 30 %, mantendo-se fixa a concentração de dodecil em 10 % (GABRIEL; TIERA; TIERA, 2015).



Figura 28. Determinação da CAC da série de polímeros com 20 % de GA e modificados com DEAE.





Fonte: Dados da pesquisa.



Figura 30. Determinação da CAC da série de polímeros com 20 e 30 % de GA e modificados com DEAE e PEG.

Fonte: Dados da pesquisa.



Figura 31. CAC de todos os polímeros em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.4 Difratometria de raios X: estimativa do índice de cristalinidade

Em geral, os difratogramas de raios X das amostras de quitosana exibem dois picos de difração $(2\theta)^{\circ}$: o primeiro entre 10-10,5° e o segundo entre 20-20,5° (SAMUELS, 1981). He e colaboradores (2015) mostraram a influência do grau de desacetilação sobre o índice de cristalinidade. Eles observaram uma redução da intensidade do pico associado a região amorfa $(2\theta)^{\circ}=10^{\circ}$) pelo aumento da cristalinidade de derivados de quitosana ao aumentar o grau de desacetilação de 82 % para um valor acima de 95 % (HE *et al.*, 2016).

A Figura 32 mostra os difratogramas utilizados para obtenção dos valores estimados do índice de cristalinidade (I_{Cr}) dos polímeros estudados neste trabalho.

Figura 32. Difratogramas de raios X dos polímeros. (a) série de polímeros com variação do grau de acetilação, (b) série de polímeros com 20 % de GA e modificados com DEAE e (c) série de polímeros com 30 % de GA e modificados com DEAE.



Fonte: Dados da pesquisa.

É bem estabelecido que o índice de cristalinidade é dependente da massa molecular e do grau de acetilação (JAWORSKA *et al.*, 2003), podendo ser afetado pela inserção de grupos substituintes (URAGAMI; KATO; MIYATA, 1997). Em comparação à quitosana de partida, que exibiu I_{Cr} igual à 67,09 %, o índice de cristalinidade dos derivados diminuiu com os processos de acetilação e substituição por DEAE (Tabela 3). O aumento da porcentagem de grupos acetil e DEAE indicou que as interações inter e intra cadeias são grandemente afetadas e que maiores reduções nos índices de cristalinidade estimados. Estes resultados pressupõem que o polímero não pôde ser densamente empacotado, em decorrência do aumento do espaçamento entre as cadeias de quitosana (URAGAMI; KATO; MIYATA, 1997), e que modificações químicas estruturais podem ser responsáveis pela quebra de ligações de hidrogênio inter cadeias (PEREIRA *et al.*, 2015;

Polímero	Índice de cristalinidade (%)
CH ₂₀	67,09
CH ₂₅	42,09
CH ₃₀	50,35
CH ₂₀ DEAE ₅	58,48
CH ₂₀ DEAE ₁₅	34,15
CH ₂₀ DEAE ₂₅	49,23
CH ₃₀ DEAE ₅	14,03
CH ₃₀ DEAE ₁₅	33,95
CH ₃₀ DEAE ₂₅	14,72

PEREIRA *et al.*, 2017). A Figura 7 mostrou uma representação genérica do espaçamento entre as cadeias de quitosana e a redução das ligações de hidrogênio mencionadas.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.5 Estimativa das massas moleculares médias via cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molecular, bem como o índice de polidispersão (Pdi) podem interferir na força de interação policátion-siRNA afetando as propriedades físico-químicas das nanopartículas e, portanto, o processo de complexação (TIERA *et al.*, 2011). Neste sentido, as condições reacionais estabelecidas como pH, temperatura e tempo de reação podem alterar a massa molecular e a polidispersividade (JIA; SHEN, 2002). A Tabela 4 lista os valores das massas moleculares médias ponderal e numérica, índice de polidispersão e os tempos de retenção extraídos da análise de GPC do presente trabalho. Os cromatogramas dos polímeros acetilados e modificados com DEAE são mostrados no APÊNDICE C.

Conforme lista a Tabela 4, o processo de acetilação não alterou significativamente a massa molecular média dos polímeros N-acetilados. E em reações de N-acetilação, o aumento do GA não é linear com o aumento da relação anidrido acético/amina, sendo que neste tipo de reação, o aumento gradativo da concentração de ácido acético diminui a capacidade nucleofílica do grupo amina pela maior protonação deste grupo. Além disso, o aumento da concentração de ácido acético

em solução pode ocasionar a hidrólise ácida da cadeia polimérica pela reação e ruptura das unidades de glucosamina (QUN; AJUN; YONG, 2007). E ainda que a acetilação contribua para aumentar a massa molecular, uma pequena degradação pode ocorrer, entretanto, ocorre em maior grau quando a relação molar de anidrido acético/grupos amina é superior a 0,30 (QUN; AJUN; YONG, 2007). No presente trabalho as razões molares da relação mencionada para os derivados CH₂₅ e CH₃₀ foram 0,20 e 0,28, respectivamente. E semelhante aos resultados obtidos por Gabriel e colaboradores (2015), as massas moleculares dos polímeros não foram bruscamente afetadas pelos processos de síntese (acetilação e inserção de DEAE) em comparação aos polímeros de partida: somado aos menores valores da relação anidrido acético/grupos amina, as sínteses foram conduzidas sob condições brandas de temperatura, pH e concentração de ácido acético e ácido clorídrico.

Para efeito de comparação com as condições reacionais utilizadas nesse trabalho, podese mencionar o estudo de Jia e Shen (2002), no qual quitosanas de baixa massa molecular foram preparadas a partir da hidrólise ácida com ácido fosfórico (H₃PO₄, 85 % m/m; 14,83 mol L⁻¹). Após 4 dias de reação em temperatura ambiente, a M_v diminuiu de 214 para 145 kDa e ao final de 8 dias para 113 kDa. Em um intervalo fixo de 8 horas de reação, ao variar a temperatura de 40 para 80 °C, eles observaram uma redução de 37 para 2 kDa. Neste mesmo estudo, foi avaliada a redução da M_v mantendo-se a temperatura a 60 °C e o tempo de reação de 1 hora e 15 horas, obtendo respectivamente valores de M_v de 164 e 19 kDa (JIA; SHEN, 2002). Em outro estudo, Gabriel e colaboradores (2015) mostraram que derivados de quitosana obtidos pela inserção de grupo DEAE não exibiram variação maior que 30 kDa nos valores de M_w em comparação aos polímeros de partida, em que as reações foram conduzidas em pH 8,0 por 2 horas sob atmosfera de nitrogênio: em um primeiro conjunto de polímeros, após a inserção de DEAE, a M_w partiu de 517,7 para 548,6 kDa, em um segundo conjunto de 176 para 151 kDa e em um terceiro de 16,9 para 15,7 kDa, com porcentagens de substituição por DEAE de 14, 30 e 43 %, respectivamente aos conjuntos.

Polímero	\overline{M}_{W} (kDa)	\overline{M}_n (kDa)	Pdi $(\overline{M}_w/\overline{M}_n)$	Tempo de retenção (minutos)
CHH*	236,7	139,4	1,70	18,90
CHM*	141,1	46,72	3,02	19,31
CH ₁₅	280,71	195,94	1,43	18,16
CH ₂₀	208,15	108,16	1,92	18,86
CH ₂₅	190,92	70,78	2,69	19,20
CH ₃₀	205,03	81,43	2,52	19,05
CH ₁₅ DEAE ₂₅	287,68	189,45	1,52	18,40
CH ₂₀ DEAE ₅	178,03	57,85	3,07	19,08
CH ₂₀ DEAE ₁₅	183,55	66,53	2,76	19,02
CH ₂₀ DEAE ₂₅	181,95	67,85	2,68	19,06
CH ₃₀ DEAE ₅	189,75	66,98	2,83	19,17
CH ₃₀ DEAE ₁₅	179,34	67,40	2,66	19,24
CH ₃₀ DEAE ₂₅	184,90	70,03	2,64	19,13

Tabela 4. Massas moleculares médias ponderal $(\overline{M_w})$ e numérica $(\overline{M_n})$, índice de polidispersão (Pdi) e tempo de retenção.

* Preparados previamente: CHH (GA = 4,2 %) e CHM (GA = 2,9 %).

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.6 Capacidade de tamponamento (CT)

O desenvolvimento de polímeros com grupos amina para aplicação como agentes de transfecção é uma estratégia bem estabelecida na literatura (FORREST *et al.*, 2004; RICHARD *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2011). No presente trabalho, a CT dos polímeros foi comparativamente avaliada em função das modificações realizadas (Tabela 5; Figura 33) e os valores da capacidade de tamponamento máxima (CT_{MAX}) dos polímeros foram condizentes com os dados reportados pela literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os grupos amina da quitosana contribuem para garantir uma boa capacidade de tamponamento e permitem a absorção dos prótons contidos no ambiente ácido endossomal,

favorecendo o escape do endossomo antes da atuação das hidrolases ácidas. E desta forma, a integridade do conteúdo carreado pode ser mantida (GARG *et al.*, 2013; LIU; REINEKE, 2007; MALHOTRA *et al.*, 2013; THIBAULT *et al.*, 2010). No presente trabalho, o aumento do grau de substituição com DEAE de 5 a 25 % reduziu a disponibilidade do grupo amina primário (-NH₂) na estrutura da quitosana levando a uma redução dos valores de CT_{MAX} em cerca de 20 - 25 %. Layek e Singh (2013) obtiveram um resultado similar em um estudo do efeito do grau de substituição com ácido capróico (5, 15 e 25 %): os resultados mostraram uma redução da capacidade de tamponamento para o polímero com 25 % de ácido capróico, o que levou à uma menor eficiência de transfecção deste derivado. No entanto, eles observaram uma melhora na captação para o derivado com 15 % de ácido capróico e uma redução superior à 60 % na expressão de GFP em células *HeLa*. Estes resultados mostram ao mesmo tempo, que o aumento da modificação no grupo amina pode afetar a transfecção possivelmente devido a redução da capacidade de tamponamento, como também revelam a importância de um conteúdo mínimo de porções hidrofóbicas que melhora o processo de captação celular através da membrana plasmática (LAYEK; SINGH, 2013).

A CT dos derivados sintetizados se manteve no intervalo de pH de interesse (5, 5, -7, 4), sendo favorecido pelo valor de pKa dos grupos amina primário e secundário da quitosana, 6,2 – 6,4 (TIERA et al., 2011; PICOLA et al., 2016). Este valor de pKa é o que permite a protonação da quitosana no compartimento ácido dos endossomos (MIYATA; NISHIYAMA; KATAOKA, 2012). E, portanto, estes derivados apresentam potencial endossomolítico, podendo responder às variações de pH mediante a captura de prótons contidos no interior do endossomo. O pH no ambiente extracelular é de 7,4 e decai para 7,2 no citoplasma e para 6,3 no endossomo primário, podendo chegar a 5,5 no endossomo tardio com a ativação das nucleases ácidas: enzimas responsáveis pela degradação lisossomal de qualquer substância internalizada no citoplasma (AKINC et al., 2005; MIYATA; NISHIYAMA; KATAOKA, 2012). Considerando a variação de pH de interesse, o grupo amina terciário contido na estrutura do DEAE não atua absorvendo prótons no intervalo endossomal devido ao valor de pKa mais elevado (9,0 - 9,5) (NITTA et al., 2014), sendo sua função principal a de fortalecer a interação com o siRNA. Neste sentido, os vetores sintetizados apresentam características que se complementam: grupos amina primário e secundário que contribuem para a resposta no intervalo de pH dos microambientes intracelulares e a possibilidade de uma melhor complexação com o siRNA pela carga resultante positiva do polímero mesmo em um pH mais elevado (7,4).

Polímero	CTMAX	Polímero	CT _{MAX}	Polímero	CT _{MAX}
CH ₁₅	0,37	CH ₂₀	0,32	CH ₃₀	0,34
CH ₁₅ DEAE ₂₅	0,23	CH ₂₀ DEAE ₅	0,32	CH ₃₀ DEAE ₅	0,32
		CH ₂₀ DEAE ₁₅	0,29	CH ₃₀ DEAE ₁₅	0,29
		CH ₂₀ DEAE ₂₅	0,26	CH ₃₀ DEAE ₂₅	0,24
		CH ₂₀ DEAE ₂₅ PEG _{1,5}	0,25	CH ₃₀ DEAE ₂₅ PEG _{1,5}	0,26

Tabela 5. Valores da capacidade de tamponamento máxima (CT_{MAX}) em função das modificações químicas realizadas com grupos acetil, DEAE e PEG.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 33. Curvas da capacidade de tamponamento (CT) com intervalo de pH de interesse entre 5,5 e 7,4. (a) polímero com 15 % de GA de maior massa molecular e seu derivado contendo DEAE, (b) polímeros com 20 % de GA de menor massa molecular e seus derivados contendo DEAE, (c) polímeros com 30 % de GA de menor massa molecular e seus derivados contendo DEAE e (d) polímeros com 20 e 30 % de GA de menor massa molecular e seus derivados contendo DEAE e DEAEE e DEAE e DEAEE e DEAE E DEAE



modificados com DEAE e PEG.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Caracterização físico-química das nanopartículas

5.2.1 Mobilidade eletroforética em gel de agarose

Para que moléculas com finalidade terapêutica, como plasmídeos e siRNA, sejam transportadas para o interior das células, elas devem ser protegidas da degradação e da repulsão eletrostática com a membrana plasmática (MANSOURI *et al.*, 2004; RAMAMOORTH; NARVEKAR, 2015). A interação eficiente do siRNA com policátions para a formação de nanopartículas estáveis é uma etapa crucial para obtenção de propriedades favoráveis a uma boa captação e liberação celular (MAO; SUN; KISSEL, 2010). Neste sentido, um estudo qualitativo da capacidade de complexação dos derivados poliméricos com ácidos nucleicos pode ser realizado por meio da mobilidade do DNA/RNA em eletroforese com gel de agarose (GUZMAN-VILLANUEVA *et al.*, 2014; VADER *et al.*, 2011).

A eficiência da complexação polímero-siRNA e a liberação do siRNA é visualizada mais ao final do gel no término da corrida de eletroforese. E, portanto, estudos sobre a proporção da razão N/P são realizados, tendo como objetivo estabelecer a melhor condição para que haja uma complexação eficaz do conteúdo a ser carreado. As Figura 34 à Figura 37 mostram as eletroforeses das nanopartículas preparadas com siCCR2. A partir das imagens é possível avaliar a influência da massa molecular, do grau de acetilação e do GS por DEAE e PEG, bem como, da razão N/P sobre a complexação com o siRNA. Este estudo foi realizado em tampão fosfato em dois pHs (6,3 e 7,4) com o controle da força iônica (0,15 mol L^{-1} de NaCl).

Os resultados mostram claramente os efeitos do pH, do GS por DEAE e do grau de acetilação das quitosanas, refletindo na razão de carga N/P necessária para retenção do siRNA nos poços. Na comparação das eletroforeses, em pH 6,3 e 7,4 (imagens "a" versus imagens "b"), o aumento do pH para 7,4 revela a maior migração do siRNA, o que se deve a desprotonação dos grupos amina primário e secundário e ao decréscimo na densidade de carga positiva das nanopartículas. Em pH 6,3, o grau de ionização da quitosana é próximo de 50%, e as quitosanas acetiladas (CH₁₅, CH₂₀ e CH₃₀) mostraram-se pouco eficientes na complexação com o siRNA nas razões de carga estudadas (N/P \leq 10). Em pH 7,4, o siRNA é liberado em todas as razões de carga, como observado em estudo anterior por DEHOUSSE e colaboradores (DEHOUSSE *et al.*, 2010). E, portanto, como esperado, a redução das unidades de glucosamina dada pelo maior grau de acetilação, levou a uma diminuição na força de interação policátion-siRNA, e um grande excesso

de polímero se tornou necessário para proporcionar a complexação eficiente do siRNA. Esse comportamento foi observado por Kim e colaboradores (2016) que relataram uma complexação em maior grau na razão N/P 20, com captações celulares de 10 % e 50 % para as razões N/P 10 e 20, respectivamente (KIM *et al.*, 2016). Gabrielson e colaboradores (2006) reportaram resultados similares em um estudo realizado com complexos de PEI não modificado e seus derivados acetilados (GA: 34, 57, 76, 96 e 100 %) com DNA: o aumento do GA diminuiu a complexação levando a uma necessidade de aumentar a quantidade de polímero para reduzir a migração de DNA (GABRIELSON; PACK, 2006).

Figura 34. Eletroforese das nanopartículas dos derivados CH₁₅ e CH₁₅DEAE₂₅ com siCCR2 nas razões N/P 0,5; 1; 2; 3, 5 e 10. (a) pH 6,3 e (b) pH 7,4. "L" refere-se ao padrão *DirectLoad*TM 1 kb DNA *Ladder* e "0" siRNA livre.



Fonte: Dados da pesquisa.





Fonte: Dados da pesquisa.





Fonte: Dados da pesquisa.

O aumento gradual de grupo DEAE aumentou a força de interação polímero-siRNA em comparação aos polímeros não modificados (Figura 34 à Figura 36). Nas razões N/P 3 e 5 dos polímeros mais substituídos, observou-se que quase todo siRNA ficou retido nos poços, evidenciando uma complexação mais eficaz. Este resultado também pode ser creditado aos grupos amina secundário e terciário que impactam positivamente na condensação do siRNA, proporcionando a formação de nanopartículas menores com maior grau de complexação (DE SOUZA *et al.*, 2018). E, portanto, o aumento do GS por DEAE permite que o grupo amina terciário possa interagir e complexar melhor o polímero com o siRNA.

O efeito da massa molecular e das unidades de glucosamina pode ser observado comparando-se os conjuntos de eletroforeses para o derivado de maior massa molecular e modificado com 25 % de DEAE (~287 kDa), em que houve uma maior complexação mesmo em razões N/P menores: N/P 1 em pH 6,3 e N/P 2 em pH 7,4.

Com o intuito de melhorar a biodisponibilidade das NPs, a inserção de PEG auxilia na redução de interações não específicas tornando-as mais estáveis em fluídos biológicos (YIN *et al.*, 2014). É bem estabelecido que a peguilação diminui o potencial Zeta, o que reduz a capacidade do policátion em complexar de forma eficaz moléculas de carga negativa. Portanto, neste trabalho, a peguilação foi realizada nos polímeros com maior grau de substituição com DEAE, os quais exibiram uma melhor complexação em baixas razões N/P em pH 7,4 (razão N/P 3). A estabilidade eletroforética das NPs também foi avaliada por eletroforese (Figura 37) em tampão fosfato em pH 6,3 e 7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹ nas razões N/P 0,5; 1; 2; 3, 5 e 10.

Figura 37. Eletroforese das nanopartículas dos derivados CH_YDEAE₂₅PEG_{1,5} com siCCR2 nas razões N/P 0,5; 1; 2; 3, 5 e 10. (a) pH 6,3, "L": padrão 1 kb *plus* DNA *Ladder* e (b) pH 7,4, "L": padrão *DirectLoad*TM 1 kb DNA *Ladder*. "0" siRNA livre.



Fonte: Dados da pesquisa.

O efeito da peguilação foi similar aqueles verificados com o aumento do grau de acetilação e o pH (Figura 37). O enxerto com PEG diminuiu a força de interação e o derivado CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5} complexou mais fortemente o siCCR2 a partir da razão N/P 5, enquanto que o derivado CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5} propiciou uma melhor complexação na razão N/P 10. O aumento do pH somado à blindagem de cargas catiônicas proporcionada pelas cadeias de PEG reduziu a capacidade de complexação dos polímeros com o siRNA (LAVERTU *et al.*, 2006).

5.2.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta (ζ)

5.2.2.1 pH 6,3

A eficiência da entrega do siRNA também depende do tamanho hidrodinâmico (Dh) das nanopartículas e tem sido relatado que diâmetros inferiores a 200 nm são mais apropriados para internalização celular (BISWAS *et al.*, 2014; RIZVI; SALEH, 2018). Além do tamanho, o potencial Zeta é uma das propriedades mais importantes, pois afeta tanto a captação celular como a toxicidade das NPs. Em geral, existe uma boa correlação entre o potencial Zeta e o tamanho das NPs (LAVERTU *et al.*, 2006). O aumento da razão N/P e consequente o aumento do potencial Zeta proporcionam uma redução no Dh e mostram uma boa correlação com os resultados de eletroforese (PICOLA *et al.*, 2016).

Inicialmente, o efeito da razão N/P sobre o potencial Zeta e Dh foi avaliado para os polímeros com maiores proporções de DEAE, ou seja, CH₁₅DEAE₂₅, CH₂₀DEAE₁₅, CH₂₀DEAE₂₅, CH₃₀DEAE₁₅, CH₃₀DEAE₂₅ (Figura 38 e Figura 39). Neste contexto, a observação do siRNA nas eletroforeses das NPs obtidas a partir do derivado contendo apenas 5 % de DEAE mostrou uma semelhança de comportamento com as NPs dos polímeros não modificados (CH₂₀ e CH₃₀), tanto em pH 6,3 como em 7,4, presumindo assim uma menor complexação com o siRNA e, por isso, as NPs dos derivados CH₁₅, CH₂₀, CH₂₀, CH₂₀, CH₂₀DEAE₅ e CH₃₀DEAE₅ não foram utilizadas para estudos de tamanho e potencial Zeta neste tópico.



Figura 38. Efeito da razão N/P sob o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e o potencial Zeta das nanopartículas CH₁₅DEAE₂₅-siCCR2 em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 39. Efeito da razão N/P sob o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e o potencial Zeta das nanopartículas CH_YDEAE_Z-siCCR2 em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹: (a) CH₂₀DEAE₁₅, (b) CH₂₀DEAE₂₅, (c) CH₃₀DEAE₁₅, (d) CH₃₀DEAE₂₅.



Na razão N/P 0,5 as soluções exibiram potencial Zeta ligeiramente negativo devido ao excesso de siRNA e aumentaram gradualmente atingindo valores próximos a + 12 mV. Os valores de Dh aumentam quando é atingida a equivalência de cargas (N/P 1), decrescem abruptamente para

razões N/P \ge 2 e voltam a aumentar ligeiramente para razões N/P \ge 5. Este comportamento decorre de nanopartículas ainda não estabelecidas nas menores razões N/P, em que o tamanho hidrodinâmico pode refletir o movimento de partículas mais lineares e, no caso das nanopartículas formadas para razões N/P \ge 5, o aumento do Dh pode estar associado a medição de populações menos complexadas ou na forma livre do polímero (VADER *et al.*, 2011).

Os valores de potencial Zeta obtidos nesse trabalho são menores que aqueles reportados na literatura na faixa de +17 e +25 mV (GUȚOAIA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015). Essa diferença pode ser parcialmente atribuída a combinação da força iônica do meio (0,15 mol L⁻¹) e um menor excesso de policátion. Esta interpretação é corroborada pelo estudo de Alameh e colaboradores (2018), em que os autores observaram que NPs obtidas com uma quitosana de 120 kDa (GA = 20 %, GD = 80 %) na razão N/P 5, em pH 5,5, e preparadas em uma solução contendo 0,010 mol L⁻¹ de NaCl, exibiram potencial Zeta na faixa de +25 mV, enquanto que as mesmas NPs em solução contendo 0,15 mol L⁻¹ de NaCl exibiram potencial Zeta na faixa de +10 mV (ALAMEH *et al.*, 2018)

Embora o derivado CH₁₅DEAE₂₅ (~290 kDa) tenha complexado fortemente o siRNA na razão N/P 1 (Figura 34-a), as NPs formaram partículas com Dh médio de 1600 nm (Figura 38) até a razão N/P 2 com baixos valores de potencial Zeta, indicando um mínimo de forças repulsivas entre as partículas, propiciando assim, um quadro de agregação (JOSEPH; SINGHVI, 2019). Além disso, este comportamento pode indicar uma competição das interações siRNA-polímero com as interações polímero-polímero, devido ao maior número de ligações de hidrogênio presentes nas cadeias do polímero de maior massa molecular (VILLEGAS-PERALTA *et al.*, 2020). A formação de nanopartículas é visualizada a partir da razão N/P 3, da qual obteve-se um potencial Zeta de +8,9 mV (Figura 38) e diâmetro médio entre 124 e 176 nm.

Os derivados de menor massa molecular ($M_W \sim 185 \text{ kDa}$; Figura 39) formaram NPs com Dhs entre 114 e 330 nm a partir da razão N/P 2 e os valores de Dh permaneceram abaixo de 400 nm, situando dentro da faixa de tamanho considerada aceitável para um carreador biológico.

5.2.2.1.1 Estabilidade coloidal

Em trabalhos anteriores verificou-se que NPs a base de quitosana desacetiladas são suscetíveis à agregação com o aumento da força iônica devido ao efeito de blindagem do sal (DE SOUZA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2013; PICOLA *et al.*, 2013). As NPs deste trabalho foram

preparadas em tampão fosfato com controle de força iônica (NaCl a 0,15 mol L^{-1}) e o monitoramento do diâmetro hidrodinâmico foi realizado em um período de 24 horas (Figura 40). As razões N/P foram escolhidas tendo como referência os Dhs inferiores a 200 nm (razões N/P 3 e 5).





Fonte: Dados da pesquisa.

O monitoramento do Dh em função do tempo mostrou que tanto o grau de acetilação como a inserção de grupo DEAE contribuem para a estabilidade das NPs. De Souza e colaboradores (2018) mostraram que nanopartículas preparadas com quitosanas desacetiladas (GD = 98 %), em pH 6,3, exibiram agregação abrupta no período de duas horas (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Conforme a Figura 40, a razão de carga N/P 3 proporcionou NPs com menores tamanhos tanto para as quitosanas acetiladas (CH₁₅, CH₂₀ e CH₃₀) quanto para as quitosanas substituídas com DEAE (CH₁₅DEAE₂₅, CH₂₀DEAE₂₅, CH₃₀DEAE₂₅) que se mantiveram abaixo de 200 nm no período de análise. As NPs preparadas na razão N/P 5 mostraram um ligeiro aumento em função do tempo e exibiram Dhs em torno de 150 nm, à exceção daquelas preparadas com CH₁₅ e CH₁₅DEAE₂₅ (Figura 40-a,b) com Dhs médios em torno de 300 nm: a contribuição do grupo DEAE para o tamanho e estabilidade das NPs ficou mais evidente para o derivado de maior massa molecular (Figura 40-b), o que reitera a redução de interações inter-cadeias favorecendo o processo de complexação. Além disso, os resultados confirmam a combinação do grau de acetilação e do grupo DEAE como uma estratégia promissora para melhorar a estabilidade das nanopartículas à base de quitosana e indicam que graus de acetilação de 15 a 20% são mais apropriadas para viabilizar um vetor eficiente.

Os resultados obtidos anteriormente fornecem índices de polidispersão (Figura 41) que refletem a homogeneidade dos tamanhos das partículas em solução. Valores de Pdi menores que 0,05 referem-se às NPs monodispersas e valores maiores que 0,7 indicam que a amostra possui uma distribuição de tamanho muito ampla não sendo adequada para a técnica de DLS (DANAEI *et al.*, 2018; WORLDWIDE, 2011). No presente trabalho, as nanopartículas a partir dos derivados acetilados exibiram valores de Pdi variando de 0,15 a 0,50. Os valores de Pdi, análoga à discussão do tamanho, mostram que o grau de acetilação teve uma influência positiva para a redução deste parâmetro.

A Figura 42 mostra as distribuições representativas das nanopartículas. É possível observar que para as NPs obtidas a partir de CH₁₅, CH₂₀ e CH₃₀, o aumento da razão N/P de 3 para 5 (curvas preta e vermelha; curvas verde e azul, respectivamente) melhorou a distribuição da população das partículas em solução. Além disso, as curvas de distribuição exibiram tendência ao estreitamento com o aumento do grau acetilação (Figura 42-a,c,e). Este comportamento fica mais evidente com a inserção do grupo DEAE, em que as curvas se tornaram mais estreitas, indicando

populações de partículas mais homogêneas. Os efeitos positivos das mudanças estruturais se tornaram mais evidentes quando o pH foi aumentado para 7,4 e são apresentados na seção seguinte.



Figura 41. Índice de polidispersão em função de tempo. Nanopartículas dos derivados CH_Y/CH_YDEAE₂₅ com siCCR2 nas razões N/P 3 e 5, em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹. (a) CH₁₅, CH₂₀ e CH₃₀, (b) CH₁₅DEAE₂₅, (c) CH₂₀DEAE₂₅ e CH₃₀DEAE₂₅.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 42. Distribuições representativas do tamanho das nanopartículas dos derivados CH_Y/CH_YDEAE₂₅ com siCCR2 nas razões N/P 3 e 5, em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹, nos tempos 0 e 24 horas. (a) CH₁₅, (b) CH₁₅DEAE₂₅, (c) CH₂₀, (d) CH₂₀DEAE₂₅, (e) CH₃₀, (f) CH₃₀DEAE₂₅.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.2.2 pH 7,4

5.2.2.1 Estabilidade coloidal

Além das características físico-químicas da solução em que as NPs são preparadas, o grau de desacetilação e a massa molecular do polímero têm grande influência sobre o tamanho e a estabilidade das nanopartículas formadas. O efeito da massa molecular combinada ao grau de desacetilação foi claramente observado por Lavertu e colaboradores (2006). Neste estudo, eles observaram que a redução do comprimento da cadeia do polímero (10 kDa) e o maior grau de desacetilação (80, 92 e 98 %) diminuíram a afinidade de ligação do polímero com o DNA na razão N/P 10 e pH 7,4, levando à formação de NPs na faixa de 700 a 1000 nm (LAVERTU *et al.*, 2006). E, portanto, como prova de conceito, foi realizado no presente trabalho, um estudo comparativo da estabilidade coloidal em pH 7,4 para as NPs preparadas com as quitosanas desacetiladas CHH e CHM (Figura 43-a) e quitosanas parcialmente acetiladas, CH₁₅, CH₂₀ e CH₃₀ (Figura 43-b).

Em ambas razões N/P, as NPs preparadas com CHH ($M_w = 237$ kDa, GA = 4,2 %) e CHM ($M_w \sim 141$ kDa, GA = 2,9 %) aumentaram continuamente de tamanho ultrapassando 2000 nm após 3 horas da preparação (Figura 43-a). Em pH 7,4 o grau de ionização das quitosanas é baixo e a interação siRNA-policátion é enfraquecida. Além disso, as ligações de hidrogênio entre as cadeias do polímero pode ser um dos fatores que favoreceram a agregação das NPs dos derivados altamente desacetilados ao longo do tempo (VILLEGAS-PERALTA *et al.*, 2020). A acetilação gradual da cadeia de quitosana contribuiu para a formação de nanopartículas mais estáveis, conforme mostra a Figura 43-b: NPs dos derivados CH₁₅, CH₂₀ e CH₃₀, em ambas razões N/P, complexaram o siRNA formando NPs menores, sendo que as nanopartículas de CH₃₀ foram menos afetadas pela relação N/P.



Figura 43. Influência da massa molecular e grau de acetilação sob o diâmetro hidrodinâmico das NPs em função do tempo. (a) CHH e CHM e (b) CH_{15} , CH_{20} e CH_{30} em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L^{-1} nas razões N/P 3 e 5.

Os valores de Dhs reportados refletem-se nos valores de Pdi: nas primeiras horas de análise, os valores de Pdi para as NPs preparadas com CHH e CHM aumentaram de ~0,27 para 1,0 (Figura 44-a). Os resultados tornam evidente o efeito positivo do aumento do GA na estabilidade das NPs, o qual proporciona populações mais homogêneas para as nanopartículas preparadas em pH 7,4 (Figura 44-b).

1.25 (a) pH 7.4 CHH N/P 3 CHH N/P 5 1.00 CHM N/P 3 0.75 CHM N/P 5 Pdi 0.50 I 0.25 Ī ₫ 0.00 Tempo (h) 1.25 CH15 N/P3 (b) pH 7.4 CH15 N/P 5 1.00 Tempo: 0, 3, 6, 9, 24h CH₂₀ N/P 3 0.75 Pdi CH₂₀ N/P 5 0.50 CH₃₀ N/P 3 CH₃₀ N/P 5 0.25 0.00 Tempo (h) Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 44. Índice de polidispersão das nanopartículas em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L^{-1} nas razões N/P 3 e 5, em função de tempo. (a) CHH e CHM (maior massa molecular) e (b) CH₁₅, CH₂₀ e CH₃₀ (menor massa molecular).

O efeito da substituição com o grupo DEAE pode ser visto nas Figura 45. As nanopartículas exibiram redução do tamanho hidrodinâmico e dos valores de Pdi, mantendo a estabilidade ao longo do tempo. As partículas exibiram Dhs na faixa de 200 nm para as NPs de CH₂₀DEAE₂₅ na razão N/P 5 e para as NPs de CH₃₀DEAE₂₅ nas duas razões avaliadas, sendo possível observar que na razão N/P 3 as NPs de CH₂₀DEAE₂₅ agregaram rapidamente no período de 6 horas. Neste sentido, o aumento da razão N/P para o derivado menos acetilado forneceu um excesso mínimo necessário de policátion que contribuiu para formação de nanopartículas mais compactas e estáveis.





Fonte: Dados da pesquisa.

A comparação dos valores de potencial Zeta permite visualizar melhor a contribuição de DEAE para as propriedades das nanopartículas em pH 7,4 (Figura 46). Os polímeros CHH e CHM interagem fracamente com o siRNA em pH 7,4 formando partículas maiores (Figura 43-a) com valores de potencial Zeta entre -2,7 e -3,5 mV.

A Figura 46 mostra ainda que um pequeno incremento no potencial Zeta de +3,6 mV na razão N/P 3 (Dh ~3000 nm) para +4,6 mV na razão N/P 5 (Dh < 250 nm) foi responsável para melhorar a estabilidade e reduzir o tamanho das NPs preparadas com CH₂₀DEAE₂₅, o que indica que o excesso de policátion desempenha um papel importante na condensação e estabilidade das NPs. O derivado CH₃₀DEAE₂₅ formou NPs menores e mais estáveis que as NPs preparadas pelo derivado CH₂₀DEAE₂₅ tanto na razão N/P 3 (+3,4 mV, Dh 230 nm) quanto na razão N/P 5 (+ 3,7 mV, Dh 182 nm) sugerindo que o maior caráter hidrofóbico desse derivado favoreceu a condensação e estabilidade. Neste sentido, a estratégia de variar o grau de acetilação somado à avaliação da razão N/P mostrou-se essencial para a obtenção de NPs mais estáveis em pH 7,4.



Figura 46. Potencial Zeta das nanopartículas dos derivados CHH, CHM, CH₂₀ CH₃₀, CH_YDEAE₂₅ com siCCR2 em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹ nas razões N/P 3 e 5.

Fonte: Dados da pesquisa.

A inserção de cadeias de PEG tem sido amplamente utilizada com o intuito de aumentar o tempo de circulação de NPs a fim de conferir maior integridade ao conteúdo carreado e evitar interações inespecíficas com componentes biológicos (YANG *et al.*, 2017). Malhotra e colaboradores (2013) demonstraram o efeito do pH sobre derivados peguilados de quitosana com 20 % de GA, obtendo menores diâmetros em pH 6,0 (~100 nm). A elevação do pH ocasionou um aumento gradual no tamanho das nanopartículas, resultando em tamanhos de ~142 nm em pH 6,3 para ~215 nm em pH 7,0 (MALHOTRA *et al.*, 2013).

Além do pH afetar a habilidade de complexação, sabe-se que a peguilação diminui o potencial Zeta do polímero, o que pode reduzir sua interação com o siRNA e, com isso, formar partículas maiores e/ou menos estáveis em condições fisiológicas. Portanto, a estabilidade das NPs dos derivados peguilados (Figura 47) foi avaliada na razão N/P 10, considerando-se para isso os resultados de eletroforese (Figura 37).



Figura 47. Estabilidade coloidal das nanopartículas dos derivados CH_YDEAE₂₅PEG_{1,5} com siCCR2 na razão N/P 10. (a) pH 6,3 e (b) pH 7,4, ambos com força iônica de 0,15 mol L⁻¹.

Fonte: Dados da pesquisa.

Em pH 6,3, as NPs de $CH_{20}DEAE_{25}PEG_{1,5}$ e $CH_{30}DEAE_{25}PEG_{1,5}$ (Figura 47-a) exibiram menores Dhs (~ 100 nm) que os derivados não peguilados ($CH_{20}DEAE_{25}$ e $CH_{30}DEAE_{25}$) (Figura 39). Entretanto, o aumento do pH para 7,4, como esperado, aumentou o tamanho médio das NPs de $CH_{20}DEAE_{25}PEG_{1,5}$ em ~50 nm e praticamente triplicou o tamanho das NPs do derivado mais acetilado $CH_{30}DEAE_{25}PEG_{1,5}$. Contudo, ambas composições se mantiveram estáveis no período de 24 horas. Observou-se que o aumento da porcentagem de grupo acetil somado a blindagem de carga oriunda das cadeias de PEG reduziu a densidade de carga do polímero diminuindo a força de interação policátion-siRNA (Figura 47-b). O efeito do grau de acetilação e pH nos Dhs correlacionam-se com os valores de potencial Zeta das formulações: o grau de acetilação reduziu o potencial Zeta das nanopartículas de +9,2 para +7,2 mV em pH 6,3 e de +6,2 para +3,9 mV em pH 7,4 (Figura 48).



Figura 48. Potencial Zeta das nanopartículas dos derivados peguilados com siCCR2 na razão N/P 10 em pH 6,3 e 7,4, ambos com força iônica de 0,15 mol L⁻¹.

Guţoaia e colaboradores (2016) mostraram que para NPs em pH 5,5, o enxerto de 1,5 a 8,0 % de PEG numa quitosana, reduziu o potencial Zeta de ~+17 mV para ~+8 mV e que a agregação foi inibida (GUŢOAIA *et al.*, 2016; LEE; JEONG; PARK, 2002). Em outro trabalho, Guzman-Villanueva e colaboradores (2014) relataram silenciamento gênico com um derivado de quitosana contendo PEG e potencial Zeta de ~+10 mV em pH 5,5, em um estudo comparativo com NPs de siRNA e lipofectamina 2000: eles observaram uma redução de aproximadamente 17 % nos níveis de expressão de GFP para NPs de PEG-quitosana e redução de 22 % para os lipoplexos de lipofectamina 2000 (GUZMAN-VILLANUEVA *et al.*, 2014). Portanto, embora o potencial Zeta desempenhe um papel importante na determinação do tamanho e estabilidade das nanopartículas, fatores estruturais podem ser utilizados para controlar as propriedades físico-químicas das NPs

conforme evidenciado pelos resultados descritos neste trabalho (Figura 43 e Figura 46).

O efeito positivo da peguilação também pode ser visto comparando-se a distribuição representativa dos diâmetros médios para as NPs de CH₂₀DEAE₂₅ e seu respectivo derivado peguilado (Figura 49). As NPs de CH₂₀DEAE₂₅ preparadas na razão N/P 10 exibiram uma clara agregação após 7 horas de incubação (Figura 49-a) que é diminuída para NPs de CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5} (Figura 49-b). Entretanto para as NPs de CH₃₀DEAE₂₅, a peguilação diminuiu a estabilidade da formulação, e após 7 horas um maior deslocamento da distribuição foi observado junto a maiores valores de Dh (Figura 49-d), o que possivelmente se deve a um decréscimo do potencial Zeta.

Figura 49. Distribuições representativas do diâmetro das nanopartículas dos derivados em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹ na razão N/P 10, nos tempos 0 e 7 horas. A curva preta corresponde ao tempo zero e a vermelha após 7 horas. (a) CH₂₀DEAE₂₅, (b) CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5}, (c) CH₃₀DEAE₂₅, (d) CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.2.2.2.2 Distribuição de tamanho na presença de albumina

As características da superfície das nanopartículas desempenham um papel fundamental no processo de opsonização e, portanto, para a permanência das NPs na corrente sanguínea e eficiência da entrega do material gênico (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Desta forma, o estudo da estabilidade das NPs em um ambiente que se aproxima das condições fisiológicas é de extrema importância no transporte biológico (CHENG; SUN; GONG, 2018).

Para a avaliação qualitativa da interação NP-albumina, curvas de distribuição foram comparadas na razão N/P 10 com a adição de BSA. A Figura 50 mostra as curvas representativas de distribuição do diâmetro médio das NPs dos derivados CH₂₀DEAE₂₅, CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5}, CH₃₀DEAE₂₅ e CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5} em um intervalo de 7 horas a 37 °C.

Figura 50. Distribuições representativas do diâmetro das nanopartículas dos derivados em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹ na razão N/P 10, nos tempos 0 e 7 horas na presença de BSA. A curva verde corresponde ao tempo zero e a azul após 7 horas. (a) CH₂₀DEAE₂₅, (b) CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5}, (c) CH₃₀DEAE₂₅, (d) CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}.



Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 50 mostra um pico adicional em torno de 9 nm correspondente à albumina (LI *et al.*, 2016) que se manteve em todas as formulações após 7 horas. Para as NPs não peguiladas (CH₂₀DEAE₂₅, CH₃₀DEAE₂₅) embora não seja notada maiores variações na intensidade do pico da albumina, após 7 horas nota-se um suave estreitamento do pico das NPs que sugere alguma interação com albumina. Para as NPs de CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5} as mudanças são mais discretas, mostrando o efeito positivo das cadeias de PEG. Entretanto para NPs de CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5} uma visível alteração nas intensidades com estreitamento das curvas indica claramente interações NP-proteína decorrente de cadeias poliméricas fracamente associadas ao siRNA.

5.2.3 Morfologia das nanopartículas

A morfologia das nanopartículas tem grande importância no processo de captação e internalização celular, sendo a morfologia esférica a mais comum para nanopartículas poliméricas.
Nesse tema, Elsabahy e Wooley (2012) reportaram que NPs esféricas são mais facilmente internalizadas que NPs de formatos mais alongados (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Zhang e colaboradores (2008), em um estudo comparativo, demonstraram que partículas esféricas foram internalizadas mais facilmente em um período de 1 hora em células epitelial de ovário de *hamster*, *CHO*, em relação às partículas cilíndricas. Neste estudo, eles funcionalizaram as NPs com um marcador fluorescente vermelho e, obtiveram uma fluorescência de 27 % para as NPs de formato esférico contra 10-15 % para as NPs de formatos mais alongados (ZHANG *et al.*, 2008).

Inicialmente a morfologia foi avaliada para as NPs dos derivados acetilados contendo apenas DEAE, as quais foram preparads na razão N/P 5 e solução tampão fosfato de pH 6,3 (Figura 51). As nanopartículas exibiram morfologia esférica, sendo o tamanho inferior à 200 nm condizente com o obtido nas análises de espalhamento de luz (Figura 39-b,d). Também foi possível observar uma distribuição de tamanho heterogênea, mas com dimensões dentro das curvas de distribuição obtidas por DLS (Figura 42-d,f). Posteriormente, imagens das NPs dos derivados contendo PEG, preparadas em solução tampão fosfato de pH 7,4 na razão N/P 10 (Figura 52), foram capturadas, sendo possível verificar que o derivado mais acetilado (CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}) exibiu NPs com morfologia mais irregular (Figura 52-b), o que corrobora com o aumento de tamanho (Figura 47b, rosa salmão) e o deslocamento da curva de distribuição de diâmetro observado após 7 horas (Figura 49-d).

Figura 51. Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução para dois derivados na razão N/P 5, em pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹. (a) CH₂₀DEAE₂₅, (b) CH₃₀DEAE₂₅. Todas as amostras foram examinadas sob uma tensão de aceleração de 2,0 kV com 5,4 mm de distância do feixe. As imagens foram capturadas com um aumento de 30.000x, barra de escala de 100 nm.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 52. Imagens de microscopia eletrônica de alta resolução para os derivados contendo PEG na razão N/P 10, em pH 7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹. (a) CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5}, (b) CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}. Todas as amostras foram examinadas sob uma tensão de aceleração de 2,0 kV com 5,0 mm de distância do feixe. As imagens foram capturadas com um aumento de 100.000x, barra de escala de 100 nm.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.3 Ensaios biológicos

5.3.1 Viabilidade celular dos derivados e suas nanopartículas

Experimentos que avaliam a viabilidade celular *in vitro* possuem a vantagem de não requerer o uso de animais e, também, permitem testes com um grande número de amostras ao mesmo tempo, e assim verificar se as moléculas adicionadas em cultura afetam ou não os processos biológicos fundamentais que mantém as células vivas (ASLANTÜRK, 2018). Níveis elevados de células mortas em um experimento são decorrentes da toxicidade celular das moléculas e afetam a viabilidade celular (MU *et al.*, 2018). Neste trabalho, a viabilidade celular em macrófagos *Raw* 264.7 foi avaliada na presença de concentrações crescentes dos polímeros e das nanopartículas, comparada ao controle de células não tratadas (HU *et al.*, 2006). Outra linhagem, células *HeLa*-GFP, foi utilizada, e em ambas as linhagens foram realizados estudos de transfecção *in vitro*. A viabilidade celular em macrófagos *Raw* 264.7 foi realizada nas concentrações de 0,02 à 0,5 g L⁻¹ de polímero (Figura 53). Os resultados são a média de 4 réplicas de um experimento independente e são expressos como valores relativos em comparação às células não tratadas, a qual refere-se à 100 % de viabilidade celular. O tratamento estatístico foi realizado de forma comparativa de cada conjunto de valores de células não tratadas com os dados obtidos pelas células em cultura após adição das moléculas.

A viabilidade da linhagem *Raw* 264.7 permaneceu acima de 90% para quase todos os derivados, indicando que os grupos DEAE e PEG não conferiram toxicidade à linhagem celular avaliada, com uma exceção pontual do polímero CH₃₀DEAE₂₅ que reduziu a viabilidade para próximo de 75 %: para este derivado sugere-se uma melhor investigação, tendo em vista que para maiores valores de concentração de polímero a viabilidade ficou em torno de 94 %.

A inserção de PEG ocasionou uma melhora na viabilidade, o que está de acordo com o trabalho publicado por Guţoaia e colaboradores (2016), no qual a peguilação não mostrou redução da viabilidade celular, ao contrário, houve um aumento da viabilidade de ~ 72 para ~ 90 % ao aumentar a porcentagem de 1,5 para 8,0 % de PEG na quitosana. Como discutido pelos autores, a peguilação tem o potencial de aumentar a viabilidade celular (GUŢOAIA *et al.*, 2016), o que pode estar relacionado com o efeito da blindagem das cargas positivas por meio das cadeias de PEG.

Figura 53. Viabilidade celular em macrófagos *Raw* 264.7 pela adição dos derivados poliméricos. (a) CH_YDEAE_Z (b) CH_YDEAE_ZPEG_{1,5}. Considerou um nível de significância com valor-p (*) < 0,05 e a análise estatística de cada derivado, para cada concentração, foi realizada em comparação ao grupo de controle de células não tratadas.



Fonte: Dados da pesquisa.

A viabilidade da linhagem *RAW* 264.7 na presença das NPs foi avaliada nas razões N/P entre 1 e 100, em que as NPs foram complexadas com o siRNA para uma população de 2x10⁴ células/poço (Figura 54). A viabilidade celular foi maior que 75 % para as nanopartículas preparadas nas razões N/P 1, 5 e 10. Vale ressaltar que foi possível observar uma redução da viabilidade celular com o aumento da razão N/P. Este comportamento pode estar relacionado com o excesso de policátion em solução e, de acordo com a ISO 10993-5: 2009-5, referente à avaliação biológica para testes de citotoxicidade *in vitro*, a redução da viabilidade celular em mais de 30 % é considerado um efeito citotóxico (ISSO 10993–5, 2009).





Fonte: Dados da pesquisa.

Os estudos de transfecção foram realizados com as nanopartículas preparadas nas razões N/P 5 (sem PEG) e 10 (com PEG), as quais exibiram viabilidade celular superior à

recomenda pela norma técnica citada e ao lipídeo comercial de transfecção lipofectamina na forma complexada com valor igual à 67 %. As soluções controles também não exibiram perfil citotóxico (Figura 55).



Figura 55. Viabilidade celular em macrófagos Raw 264.7 pela adição das soluções controles.

Fonte: Dados da pesquisa.

A viabilidade da linhagem *HeLa*-GFP a partir da adição dos polímeros (Figura 56) foi realizada nas concentrações de 0,02 à 0,5 g L⁻¹ e o mesmo estudo foi realizado com suas nanopartículas nas razões N/P 5 e 10 em uma população de $2x10^4$ células/poço (Figura 57). Tanto os polímeros nas concentrações avaliadas como as nanopartículas preparadas em tampão fosfato de pH 7,4 não exibiram toxicidade à cultura celular avaliada. As soluções controles também não exibiram perfil citotóxico (Figura 58).





Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 57. Viabilidade celular em células *HeLa*-GFP pela adição das NPs dos derivados com siRNA-GFP. (a) nanopartículas dos derivados sem modificação hidrofílica na razão N/P 5 e (b) nanopartículas dos derivados CH_YDEAE_Z na razão N/P 5 e CH_YDEAE_ZPEG_{1,5} na razão N/P 10. Considerou um nível de significância com valor-p (*) < 0,05 e a análise estatística das nanopartículas, para cada razão N/P, foi realizada em comparação ao grupo de controle de células não tratadas. As nanopartículas foram preparadas em tampão fosfato de pH 7,4.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 58. Viabilidade celular em células HeLa-GFP pela adição das soluções controles.



Fonte: Dados da pesquisa.

Foi possível observar valores de viabilidade superior à 100 % para as duas linhagens avaliadas. Este resultado reflete uma limitação do método de viabilidade disponível. Como já reportado na metodologia, o *kit* de proliferação celular *CellTiter96*[®] contendo MTS/PMS, ou

qualquer outro método baseado na viabilidade metabólica, não quantifica células vivas, e sim, o produto reacional da atividade metabólica que é proporcional ao número de células metabolicamente viáveis em cultura (RAI *et al.*, 2018). Portanto, uma pequena parcela de células mortas pode ter gerado produtos metabólicos quantificáveis, levando a uma resposta superestimada para avaliação da viabilidade. Porém, esta metodologia é amplamente utilizada e fornece resultados que geram uma boa resposta quanto ao auxílio da seleção de moléculas para aplicações biológicas (LARRAMENDY; SOLONESKI, 2018). Outro ponto a ser considerado é que possivelmente alguns derivados possam ter provocado proliferação celular sobre a linhagem em vez de causar toxicidade, e por isso, o aumento da taxa de viabilidade, que é medida através da atividade enzimática, pode ser devido ao aumento do número de células viáveis. Mediante essa situação, é necessária a realização de experimentos que possam esclarecer melhor o fenômeno. Lakard e colaboradores (2004) publicaram um trabalho em que eles avaliaram a adesão e proliferação de células neuronais de ratos em superfícies de eletrodos tratadas com polímeros. Eles testaram polímeros constituídos basicamente por grupos amina e obtiveram resultados de microscopia que confirmaram a proliferação das células neuronais (LAKARD *et al.*, 2004).

5.3.2 Captação celular

5.3.2.1 Células fixadas

A captação e liberação do siRNA no ambiente intracelular é uma etapa crucial para verificação do potencial dos nanocarreadores e podem orientar ajustes na estrutura química dos polímeros aumentar a eficiência biológica (RAGELLE; VANDERMEULEN; PRÉAT, 2013; YANG *et al.*, 2017). Sun e colaboradores (2016) mostraram uma maior internalização de siRNA marcado com carboxifluoresceína (FAM) quando complexado a um derivado peguilado de quitosana em comparação ao siRNA livre. Após 4 horas de incubação, o siRNA encapsulado no polímero PEG-quitosana foi facilmente visualizado no interior citoplasmático por meio da marcação verde característica do FAM (SUN *et al.*, 2016).

Inicialmente neste trabalho, foram realizados estudos de microscopia confocal com células fixadas com para-formaldeído (PFA) a fim de verificar a internalização de nanopartículas em duas razões N/P (3 e 5) em pH 6,3. Foram utilizadas NPs do derivado de maior grau de acetilação sem a inserção de PEG e marcado com isotiocianato de rodamina (CH₃₀DEAE₂₅RITC),

fluorescência vermelha (λ_{ex} : 542 nm e λ_{em} : 565 nm) (Figura 59). O polímero de partida (CH₃₀DEAE₂₅) exibiu tamanho estável na faixa de 150 nm (Figura 39-d e Figura 40-f) e morfologia esférica na razão N/P 5 (Figura 51-b). Utilizou-se 6×10^4 células/poço fixadas em lamínulas circulares para placa de 24 poços.

Figura 59. Captação celular em macrófagos *Raw* 264.7 fixados com PFA. Após adição das NPs do derivado CH₃₀DEAE₂₅RITC com siRNA, as células foram incubadas por 4 horas. A coloração azul é a marcação do núcleo por DAPI e em vermelho o polímero marcado com rodamina. (a) razão N/P 3 e (b) razão N/P 5, pH 6,3. As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x, escala inferior direita de 5 µm.



Fonte: Dados da pesquisa.

A internalização das NPs contendo RITC ($CH_{30}DEAE_{25}RITC + siCCR2$) foi observada após 4 horas de incubação. O aumento da razão N/P de 3 para 5 favoreceu a internalização das NPs contendo rodamina conforme a visualização de uma maior quantidade de pontos vermelhos no interior da célula (Figura 59-b).

Posteriormente, uma avaliação das NPs do mesmo polímero de partida na razão N/P 5 (CH₃₀DEAE₂₅) foi realizada para comparação do respectivo derivado contendo PEG na razão N/P 10 (CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}). Como ambos os derivados não possuem marcação fluorescente, a avaliação da captação celular foi realizada com siRNA-FAM, fluorescência verde (λ_{ex} : 495 nm e

 λ_{em} : 516 nm) (Figura 60), em que utilizou-se 4×10⁵ células/poço fixadas em lamínulas quadradas para placa de 6 poços. Nota-se que o siRNA foi internalizado pelas células mesmo com a redução do potencial Zeta das NPs após a peguilação (de + 10 mV - Figura 39-d para +7 mV - Figura 48, pH 6,3).



Fonte: Dados da pesquisa.

Neste mesmo estudo, uma imagem em três dimensões (3D) do poço contendo as NPs do derivado peguilado foi capturada (Figura 61), sendo possível verificar com maior clareza que a captação e distribuição do siRNA-FAM está além da superfície celular compondo todo entorno citoplasmático (JIANG *et al.*, 2017; MAO *et al.*, 2006). A viabilidade celular foi considerada para o ensaio de captação celular e as NPs selecionadas correspondem aos derivados CH₃₀DEAE₂₅ (N/P 5) e CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5} (N/P 10) que exibiram viabilidades de 92% e 89 %, respectivamente.

Figura 61. Captação celular em macrófagos *Raw* 264.7 fixados com PFA (3D). Após adição das NPs de CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}-siRNA-FAM na razão N/P 10 e pH 6,3, as células foram incubadas por 4 horas. A coloração azul é a marcação do núcleo por DAPI e em verde o siRNA-FAM. A imagem foi capturada em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x.



Fonte: Dados da pesquisa.

Uma avaliação da internalização das NPs também foi realizada em pH 7,4. No entanto, utilizou-se apenas o derivado de maior massa molecular o qual foi previamente marcado com isotiocianato de fluoresceína (CH₁₅DEAE₂₅FITC), fluorescência verde (λ_{ex} : 495 nm e λ_{em} : 525 nm). Neste estudo, as NPs foram preparadas pelo polímero complexado ao siRNA-Cy5 de fluorescência vermelha (λ_{ex} : 650 nm e λ_{em} : 670 nm) e adicionadas em poços contendo 4×10⁵ células, as quais foram aderidas em lamínulas de vidro quadradas para placa de 6 poços na razão N/P 5 e fixadas com PFA. As imagens foram capturadas após 4 horas de incubação (Figura 62) e, de modo semelhante ao já discutido, pôde-se observar a internalização das NPs por meio dos pontos em amarelo, resultante da sobreposição da marcação verde e vermelha, sendo possível presumir neste momento, a liberação do siRNA do complexo polimérico, por meio dos pontos em verde isolados no citoplasma.

Figura 62. Captação celular em macrófagos *Raw* 264.7 fixados com PFA. Após adição das NPs do derivado CH₁₅DEAE₂₅FITC com siRNA-Cy5 na razão N/P 5 e pH 7,4, as células foram incubadas por 4 horas. A coloração azul é a marcação do núcleo por DAPI, em verde o polímero marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e em vermelho o siRNA marcado com cianina 5 (Cy5). As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x.



Fonte: Dados da pesquisa.

5.3.2.2 Células vivas

A microscopia confocal de células em tempo real é uma análise qualitativa não destrutiva que utiliza células vivas para monitorar a captação e a internalização das nanopartículas. O controle das condições vitais das células é fundamental para garantir o sucesso do experimento. Zhang e colaboradores (2011) mostraram que a internalização de nanopartículas em macrófagos *Raw* 264.7 ocorre já nos primeiros 10 minutos de incubação e, dependendo do tamanho das NPs, o tempo de internalização inicial pode variar entre 10 minutos para nanopartículas com tamanho em torno de 50 - 100 nm e 35 minutos para NPs com 500 nm (ZHANG *et al.*, 2011).

Neste trabalho, NPs com tamanho entre 100 e 200 nm foram utilizadas para a observação da captação, internalização e distribuição em tempo real. Utilizou-se siRNA-FAM

complexado ao polímero marcado com RITC já estudado previamente (CH₃₀DEAE₂₅RITC) na razão N/P 5, porém agora, com as nanopartículas preparadas em tampão fosfato de pH 7,4. As NPs foram adicionadas em poços contendo $4x10^5$ células, as quais foram aderidas em lamínulas quadradas para placa de 6 poços. As imagens foram capturadas a cada minuto durante 1 hora de experimento pela conexão do microscópio confocal a uma incubadora climatizada com controle de temperatura a 37 °C e injeção controlada de CO₂, 5 %. A Figura 63-a mostra a imagem capturada imediatamente após a adição das NPs e a Figura 63-b mostra uma região ampliada com destaque da célula em que foi realizado o monitoramento da captação celular.

Figura 63. Captação celular em macrófagos *Raw* 264.7 em tempo real (células vivas). NPs do derivado CH₃₀DEAE₂₅RITC com siRNA-FAM, na razão N/P 5 e pH 7,4 no tempo zero. (a) área total da região capturada (b) área ampliada com destaque na célula à esquerda. As imagens foram capturadas com lente objetiva de 63x.





Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 64 mostra o painel de oito imagens capturadas no intervalo entre 0 e 31 minutos e, a Figura 65 mostra o painel de oito imagens selecionadas capturadas no intervalo entre 33 e 60 minutos.

Figura 64. Captação celular em tempo real em macrófagos *Raw* 264.7. Nanopartículas do derivado CH₃₀DEAE₂₅RITC com siRNA-FAM na razão N/P 5 e pH 7,4, no intervalo de tempo entre 0 e 31 minutos. As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x. Nos painéis foram inseridos setas e círculos que mostram pontos amarelo-alaranjados perdendo sua coloração com o passar do tempo: a seta precede o que ocorre no círculo mostrado no tempo seguinte.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 65. Captação celular em tempo real em macrófagos *Raw* 264.7. Nanopartículas do derivado CH₃₀DEAE₂₅RITC com siRNA-FAM na razão N/P 5 e pH 7,4, no intervalo de tempo entre 33 e 60 minutos. As imagens foram capturadas em um microscópio confocal a laser com lente objetiva de 63x. Nos painéis foram inseridos setas e círculos que mostram pontos amarelo-alaranjados perdendo sua coloração com o passar do tempo: a seta precede o que ocorre no círculo mostrado no tempo seguinte.



Fonte: Dados da pesquisa.

Neste estudo foi possível observar que nos primeiros 5 minutos de incubação as nanopartículas foram internalizadas para dentro do citoplasma. Com 20 minutos pôde-se observar um aumento da quantidade de nanopartículas internalizadas, as quais ficaram distribuídas em todo espaço citoplasmático e, a partir de 27 minutos foi possível verificar o acúmulo de pontos em verde (siRNA-FAM), destacados pelas setas e círculos, confirmando a liberação do siRNA do complexo polimérico para o citoplasma.

5.3.3 Estudos de transfecção in vitro

5.3.3.1 Análise da expressão relativa de TNF-α em macrófagos

A TNF- α é uma citocina pró-inflamatória pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF) sendo secretada principalmente por macrófagos. Embora em baixas concentrações a TNF- α estimule a produção de quimiocinas que auxiliam o tratamento de quadros infecciosos, a produção desta citocina pode levar a desordens que levam à artrite reumatoide e aterosclerose, por exemplo. E por isso, controlar a produção desta citocina tem se mostrado uma proposta como potencial terapêutico para o tratamento de várias doenças inflamatórias (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010). Associado à TNF- α , estudos reportaram ainda a produção desta citocina em macrófagos após estes terem sido tratados com lipopolissacarídeo (LPS) (BEUTLER *et al.*, 1985; REIS *et al.*, 2011). E portanto, para avaliação da expressão de TNF- α , as células foram tratadas com LPS, e a análise estatística foi obtida em comparação ao controle de células estimuladas com LPS (100 %).

Neste trabalho, maiores valores da expressão relativa de TNF-α indicam que a transfecção não ocorreu de forma eficiente. A análise quantitativa da expressão relativa de TNF-α (Figura 66) mostrou a influência do grau de acetilação. A Figura 66-a mostra que as NPs dos derivados contendo 3 e 5 % de grupo acetil (CHM e CHH, respectivamente) não levaram à redução da expressão de TNF-α, sendo que ao aumentar o GA para 20 e 30 % observou-se uma redução da citocina avaliada em comparação às células tratadas com LPS em torno de ~ 25 e 13 %, respectivamente. As melhores eficiências de silenciamento foram obtidas com as NPs dos derivados modificados com DEAE e PEG (Figura 66-b): as NPs dos derivados CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1.5} exibiram uma redução relativa de 56,17 %, 62,95 % e 57,23 %, respectivamente, as quais foram melhores do que os lipoplexos de lipofectamina com redução relativa da expressão de TNF-α de 47,69 %. As NPs do derivado CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1.5} proporcionaram um decréscimo da eficiência de transfecção pela redução da expressão de TNF-α em torno de 14 %: essa menor redução pode estar relacionada à instabilidade observada para as NPs deste derivado que foi visualizada por MEV-FEG pela maior alteração da morfologia esférica, bem como, pela agregação e aumento do diâmetro mostrados nos estudos de estabilidade.

Figura 66. Análise da expressão relativa de TNF-α em macrófagos Raw 264.7 com nanopartículas preparadas em pH

7,4 e força iônica de 0,15 mol L⁻¹. Considerou um nível de significância de 0,05. As médias populacionais são consideradas significativamente diferentes com valor-p (***) < 0,0001; (**) < 0,01 e (*) < 0,05. NS refere às médias populacionais que não foram significativamente diferentes. (a) siRNA-TNF-α livre e conjunto de nanopartículas dos derivados de quitosana sem modificação hidrofílica (razão N/P 5) e (b) Lipofectamina e conjunto de nanopartículas dos derivados modificados com DEAE (razão N/P 5) e PEG (razão N/P 10).



Fonte: Dados da pesquisa.

5.3.3.2 Análise da expressão de GFP em células HeLa-GFP

A eficiência de transfecção das NPs foi qualitativamente avaliada pela redução da fluorescência de GFP na linhagem celular *HeLa*-GFP via microscopia de fluorescência. A redução da fluorescência correlaciona-se com a diminuição da expressão desta proteína pelas células *HeLa*-GFP e, com isso, uma análise qualitativa das imagens capturadas mostrou bons resultados de transfecção para a maioria das NPs testadas (Figura 67). A Figura 67-a refere ao controle negativo de transfecção (células não tratadas com siRNA-GFP) e a Figura 67-b refere ao controle positivo de transfecção, na qual as células foram transfectadas com lipoplexos de lipofectamina/siRNA-GFP. As NPs dos derivados não peguilados foram preparadas na razão N/P 5: (c) CH₂₀, (d) CH₂₀DEAE₂₅, (f) CH₃₀ e (g) CH₃₀DEAE₂₅ e as nanopartículas dos derivados contendo PEG na razão N/P 10: (e) CH₂₀DEAE₂₅PEG_{1,5} e (h) CH₃₀DEAE₂₅PEG_{1,5}.

Para todos os derivados poliméricos foi possível observar uma redução da fluorescência em comparação ao controle negativo. Este resultado, junto aos reportados pela determinação quantitativa de TNF-α em macrófagos, demonstrou que o valor de potencial Zeta na faixa de + 4 e +6 mV não limitou a transfecção *in vitro*, pelo contrário, contribuiu para evitar interações indesejadas permitindo a captação celular, tendo em vista que os experimentos biológicos foram realizados em meio de cultura celular contendo 10 % do soro fetal bovino (FBS). Hoven e colaboradores (2007) mostraram a influência do potencial Zeta sobre a adsorção de proteínas em filmes de quitosana. Em um ambiente sérico contendo BSA, eles observaram um aumento gradativo de proteína no filme catiônico com o aumento do potencial Zeta de +13 para +31,25 eV, (HOVEN *et al.*, 2007). Ramana e colaboradores (2014), em um estudo utilizando quitosana para formar nanopartículas com fármacos para o tratamento de HIV, descreveram que a adsorção de proteínas na superfície da quitosana possui estreita relação com o potencial Zeta das nanopartículas, em que maiores valores de potencial Zeta favorecem a adsorção de proteínas (RAMANA *et al.*, 2014).

Nota-se também, que ao contrário da linhagem *Raw* 264.7, as imagens mostram que as quitosanas acetiladas CH₂₀ e CH₃₀ transfectaram com eficiência similar às NPs contendo DEAE e PEG na linhagem *HeLa*-GFP, sugerindo que a captação celular de partículas mais hidrofóbicas é mais facilitada com a linhagem *Hela* como observado por Alvarez e colaboradores (VILLAR-ALVAREZ *et al.*, 2019).

Figura 67. Análise qualitativa do knockdown após transfecção em células HeLa-GFP. As células foram incubadas por 24 horas com NPs contendo siRNA-GFP. As imagens foram capturadas em um microscópio de fluorescência com lente objetiva de 10x (barra de escala: 100 µm).



100 µm

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmaram a estratégia proposta para obtenção de nanopartículas estáveis em condições próximas às fisiológicas. As etapas e condições de síntese utilizadas permitiram controlar o grau de acetilação e os graus de substituição por grupos DEAE e PEG.

A inserção de DEAE mostrou-se efetiva na redução da cristalinidade, possibilitando uma melhor solubilidade dos polímeros em meio aquoso e os derivados exibiram capacidade de tamponamento no intervalo de pH de interesse (~4,5-7,4).

Nanopartículas preparadas em razão N/P \geq 3 complexaram o siRNA de forma a obter nanopartículas com morfologia esférica e potencial Zeta em torno de +12,4 mV. Os dados confirmaram que a acetilação controlada, a inserção dos grupos DEAE e PEG permitiram obter derivados anfipáticos que levaram à formação de nanopartículas com tamanhos em torno de 150 nm, com boa estabilidade e baixos valores de índice de polidispersão, mesmo em pH 7,4. Além disso, a peguilação reduziu o tamanho das nanopartículas para ~100 nm em pH 6,3.

Os derivados anfipáticos exibiram baixa toxicidade celular nas duas linhagens avaliadas. Os estudos biológicos mostraram que as nanopartículas são eficientemente internalizadas e distribuídas após 4 horas de incubação. E a microscopia confocal em tempo real mostrou a captação das nanopartículas, confirmando a liberação do siRNA-FAM do complexo polimérico no citoplasma.

Os resultados de estabilidade e transfecção *in vitro* mostraram a importância de aumentar o grau de acetilação. Na linhagem de macrófagos, ao comparar a redução relativa da expressão de TNF- α , os derivados menos acetilados não modificados com grupos hidrofílicos (CHM e CHH) não exibiram redução da expressão de TNF- α em pH 7,4. No entanto, os derivados com GA igual a 20 e 30 % levaram a formação de NPs que possibilitaram a redução de TNF- α em ~25 e 13 %, respectivamente, em comparação às células tratadas com LPS. Estes valores foram melhorados para as NPs obtidas com os derivados contendo DEAE e PEG, reduzindo a expressão de TNF- α em até ~63 % com o derivado CH₃₀DEAE₂₅ na razão N/P 5, sendo melhor do que os lipoplexos de lipofectamina que exibiram uma redução de 47,69 %. O estudo na linhagem epitelial de carcinoma cervical, *HeLa*-GFP, também mostrou resultados promissores de transfecção, nos

quais foi possível observar o *knockdown* do GFP mediante a redução da fluorescência da respectiva proteína.

As nanopartículas preparadas com os derivados $CH_{20}DEAE_{25}$, $CH_{20}DEAE_{25}PEG_{1,5}$ e $CH_{30}DEAE_{25}$ se mostraram promissoras para uma avaliação *in vitro* mais detalhada a fim de prospectar estudos e aplicação *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AGIRRE, M. *et al.* Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: from bench to bedside. **Polymers**, Basel, v. 6, n. 6, p. 1727-1755, 2014.

AIRES, M. M. Fisiologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

AIUTI, A.; RONCAROLO, M. G.; NALDINI, L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. **EMBO Molecular Medicine**, Chichester, p. e201707573, 2017.

AKINC, A. *et al.* Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. **The Journal of Gene Medicine**, Chichester, v. 7, p. 657-663, 2005.

ALAMEH, M. *et al.* siRNA delivery with chitosan: influence of chitosan molecular weight, degree of deacetylation, and amine to phosphate ratio on in vitro silencing efficiency, hemocompatibility, biodistribution, and in vivo efficacy. **Biomacromolecules**, Washington, v. 19, n. 1, p. 112-131, 2018.

ALBERS, A. P. F. *et al.* Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**, São Paulo, v. 48, n. 305, p. 34-37, 2002.

ALBUQUERQUE, L. J. C. *et al.* Efficient condensation of DNA into environmentally responsive polyplexes produced from block catiomers carrying amine or diamine groups. **Langmuir**, Washington, v. 32, n. 2, p. 577-586, 2016.

ALLEN, T. M. *et al.* Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly (ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**. **Biomembranes**, Amsterdam, v. 1066, n. 1, p. 29-36, 1991.

ARANAZ, I.; HARRIS, R.; HERAS, A. Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and applications. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 14, n. 3, p. 308-330, 2010.

ARYA, G.; DAS, M.; SAHOO, S. K. Evaluation of curcumin loaded chitosan/PEG blended PLGA nanoparticles for effective treatment of pancreatic cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 102, p. 555-566, 2018.

ASLANTÜRK, Ö. S. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *In*: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. **Genotoxicity**: a predictable risk to our actual world. IntechOpen, 2018. Disponível em:

https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-a-predictable-risk-to-our-actual-world/in-vitrocytotoxicity-and-cell-viability-assays-principles-advantages-and-disadvantages. Acesso em: 13 mar. 2020. ATKINS, P.; PAULA, J. D. Físico-química. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2014. v. 2.

BARBOSA, H. F. G. *et al.* Synthesis and self-assembly study of zwitterionic amphiphilic derivatives of chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 133, n. 44, p. 44176, 2016.

BARRETO, J. C. G.; TITA, D. L.; ORLANDI, M. O. Development of an automated method to perform a quantitative study of particle size distribution and the effect of a conductive layer in scanning electron microscopy. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 447-452, 2019.

BARUA, S. *et al.* Discovery of cationic polymers for non-viral gene delivery using combinatorial approaches. **Combinatorial chemistry & High Throughput Screening**, Hilversum, v. 14, n. 10, p. 908-924, 2011.

BELABASSI, Y. *et al.* Synthesis and characterization of PEGylated and fluorinated chitosans: Application to the synthesis of targeted nanoparticles for drug delivery. **Biomacromolecules**, Washington, v. 18, n. 9, p. 2756-2766, 2017.

BEUTLER, B. *et al.* Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, Nanjing, v. 161, n. 5, p. 984-995, 1985.

BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, London, v. 33, n. 9, p. 941, 2015.

BLAZEK, A. D.; PALEO, B. J.; WEISLEDER, N. Plasma membrane repair: a central process for maintaining cellular homeostasis. **Physiology**, Bethesda, v. 30, n. 6, p. 438-448, 2015.

BROWN, T. L. et al. Ciência central. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2007.

BUS, T.; TRAEGER, A.; SCHUBERT, U. S. The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 6, n. 43, p. 6904-6918, 2018.

CAO, Y. *et al.* Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery. **Marine Drugs**, Basel, v. 17, n. 6, p. 381, 2019.

CHENG, K.; SUN, S.; GONG, X. Preparation, characterization, and antiproliferative activities of biotin-decorated docetaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 54, n. 2, p. e17295, 2018.

CLINE, M. J. Perspectives for gene therapy: inserting new genetic information into mammalian cells by physical techniques and viral vectors. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 69-92, 1985.

CONVERTINE, A. J. *et al.* Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 133, p. 221-229, 2009.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. A célula: uma abordagem molecular. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

CRICHTON, R. R.; LOURO, R. O. Other spectroscopic methods for probing metal centres in biological systems. *In*: CRICHTON, R.; LOURO, R. **Practical approaches to biological inorganic chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p. 161-177.

CULLITY, B. D. Elements of x-ray diffraction. 2. ed. Reading: Addison-Wesley Publishing Company, 1978.

DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, Basel, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

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**, Guildford, v. 119, p. 186-197, 2018.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2007.

DEHOUSSE, V. *et al.* Comparison of chitosan/siRNA and trimethylchitosan/siRNA complexes behaviour in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 46, n. 3, p. 342-349, 2010.

DIMZON, I. K.; KNEPPER, T. P. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 72, p. 939-945, 2015.

DOSTA, P.; RAMOS, V.; BORRÓS, S. Stable and efficient generation of poly (β-amino ester) s for RNAi delivery. **Molecular Systems Design & Engineering**, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 677-689, 2018.

DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. I. **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement**: nanocarriers. San Francisco: Springer, 2016.

DU, Y.-Z. *et al.* Stearic acid grafted chitosan oligosaccharide micelle as a promising vector for gene delivery system: factors affecting the complexation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 391, n. 1-2, p. 260-266, 2010.

ELGADIR, M. A. *et al.* Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: a review. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei, v. 23, p. 619-629, 2015.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, London, v. 41, n. 7, p. 2545-2561, 2012.

ESCOFFRE, J. M.; TEISSIÉ, J.; ROLS, M.P. Gene transfer: how can the biological barriers be overcome? **The Journal of Membrane Biology**, New York, v. 236, n. 1, p. 61-74, 2010.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. **Nature**, London, v. 391, n. 6669, p. 806, 1998.

FISHER, R. K. *et al.* Improving the efficacy of liposome-mediated vascular gene therapy via lipid surface modifications. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 219, p. 136-144, 2017.

FONSECA FILHO, H. D.; LOPES, G. A. C. Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de difratometria de Raios-X. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 3, n. 1, p. 31-45, 2014.

FORREST, M. L. *et al.* Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 21, n. 2, p. 365-371, 2004.

FRANÇA, N. R. *et al.* Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 6, p. 695-709, 2010.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 5577, 2012.

GABRIEL, J. D. S. **Síntese, caracterização e atividade antifúngica de derivados anfipáticos de dietilaminoetil-quitosana contra aspergillus flavus e aspergillus parasiticus**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

GABRIEL, J. D. S.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. D. O. Synthesis, characterization, and antifungal activities of amphiphilic derivatives of diethylaminoethyl chitosan against Aspergillus flavus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 24, p. 5725-5731, 2015.

GABRIELSON, N. P.; PACK, D. W. Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 8, p. 2427-2435, 2006.

GARG, P. *et al.* Triphenylamine coupled chitosan with high buffering capacity and low viscosity for enhanced transfection in mammalian cells, in vitro and in vivo. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 1, n. 44, p. 6053-6065, 2013.

GIACOMELLI, F. C. *et al.* pH-triggered block copolymer micelles based on a pH-responsive PDPA (poly [2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate]) inner core and a PEO (poly (ethylene oxide)) outer shell as a potential tool for the cancer therapy. **Soft Matter**, Cambridge, v. 7, n. 19, p. 9316-9325, 2011.

GOSWAMI, R. *et al.* Gene therapy leaves a vicious cycle. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 9, p. 297, 2019.

GUO, S.; HUANG, L. Nanoparticles escaping RES and endosome: challenges for siRNA delivery for cancer therapy. **Journal of Nanomaterials**, New York, v. 2011, p. 11, 2011.

GUŢOAIA, A. *et al.* Fine-tuned PEGylation of chitosan to maintain optimal siRNA-nanoplex bioactivity. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 143, p. 25-34, 2016.

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

GUZMAN-VILLANUEVA, D. *et al.* D. Enhanced cellular uptake and gene silencing activity of siRNA molecules mediated by chitosan-derivative nanocomplexes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 473, n. 1-2, p. 579-590, 2014.

HARDEE, C. L. *et al.* Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy. **Genes**, Basel, v. 8, n. 2, p. 65-87, 2017.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 2, n. 3, p. 214, 2003.

HE, X. *et al.* The production of fully deacetylated chitosan by compression method. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, Alexandria, v. 42, n. 1, p. 75-81, 2016.

HOVEN, V. P. *et al.* Surface-charged chitosan: preparation and protein adsorption. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 68, n. 1, p. 44-53, 2007.

HU, F. *et al.* Cellular response to magnetic nanoparticles "PEGylated" via surface-initiated atom transfer radical polymerization. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 3, p. 809-816, 2006.

HU, F. Q. *et al.* A novel chitosan oligosaccharide–stearic acid micelles for gene delivery: properties and in vitro transfection studies. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 315, n. 1, p. 158-166, 2006.

HUA, A. B. *et al.* Repurposing the electron transfer reactant phenazine methosulfate (PMS) for the apoptotic elimination of malignant melanoma cells through induction of lethal oxidative and mitochondriotoxic stress. **Cancers**, Basel, v. 11, n. 5, p. 590, 2019.

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**, New York, v. 21, p. 344-353, 2004.

HUO, S. *et al.* DNA Nanotechnology Enters Cell Membranes. Advanced Science, Weinheim, v. 6, n. 10, p. 1900043, 2019.

HYDE, S. C. *et al.* Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. **Gene Therapy**, London, v. 7, n. 13, p. 1156, 2000.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5**:2009. Biological evaluation of medical devices-part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO, 2009.

ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and surface forces. 3. ed. Amsterdam: Academic Press, 1992.

JAWORSKA, M. *et al.* Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: crystallographic properties. **Polymer International**, London, v. 52, n. 2, p. 198-205, 2003.

JAYAKUMAR, R. *et al.* Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 79, n. 1, p. 1-8, 2010.

JIA, M.; HE, Z.; JIN, W. Capillary electrophoretic enzyme immunoassay with electrochemical detection for cortisol. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 966, n. 1-2, p. 187-194, 2002.

JIA, Z.; SHEN, D. Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of lowmolecular-weight chitosan using phosphoric acid. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 49, n. 4, p. 393-396, 2002.

JIANG, L. Q. *et al.* Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 12, p. 6383, 2017.

JOSEPH, E.; SINGHVI, G. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. *In*: GRUMEZESCU, A. M. Nanomaterials for drug delivery and therapy. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 91-116.

KIM, J. *et al.* Silencing CCR2 in macrophages alleviates adipose tissue inflammation and the associated metabolic syndrome in dietary obese mice. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, New York, v. 5, n. 1, p. e280, 2016.

KIM, S. H. *et al.* Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 107-116, 2008.

KORCHAGINA, E. V.; PHILIPPOVA, O. E. Multichain aggregates in dilute solutions of associating polyelectrolyte keeping a constant size at the increase in the chain length of individual macromolecules. **Biomacromolecules**, Washington, v. 11, n. 12, p. 3457-3466, 2010.

KRITCHENKOV, A. S.; ANDRANOVITŠ, S.; SKORIK, Y. A. Chitosan and its derivatives: vectors in gene therapy. **Russian Chemical Reviews**, London, v. 86, n. 3, p. 231, 2017.

KURA, A. U. *et al.* Nanotechnology in drug delivery: the need for more cell culture based studies in screening. **Chemistry Central Journal**, London, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2014.

LABARRE, D. J. P.; PONCHEL, G.; VAUTHIER, C. **Biomedical and pharmaceutical polymers**. London: Pharmaceutical Press, 2011.

LAKARD, S. *et al.* Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 19-27, 2004.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2006.

LAM, J. K. W. *et al.* siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, New York, v. 4, p. e252, 2015.

LARRAMENDY, M.; SOLONESKI, S. **Genotoxicity**: a predictable risk to our actual world. IntechOpen, 2018. Disponível em: https://www.intechopen.com/books/genotoxicity-apredictable-risk-to-our-actual-world/in-vitro-cytotoxicity-and-cell-viability-assays-principlesadvantages-and-disadvantages. Acesso em: 18 mar. 2020.

LAVERTU, M. *et al.* A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 32, n. 6, p. 1149-1158, 2003.

LAVERTU, M. *et al.* High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 27, p. 4815-4824, 2006.

LAYEK, B. *et al.* Hexanoic acid and polyethylene glycol double grafted amphiphilic chitosan for enhanced gene delivery: Influence of hydrophobic and hydrophilic substitution degree. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 11, n. 3, p. 982-994, 2014.

LAYEK, B.; SINGH, J. Caproic acid grafted chitosan cationic nanocomplexes for enhanced gene delivery: effect of degree of substitution. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 447, n. 1-2, p. 182-191, 2013.

LEE, H.; JEONG, J. H.; PARK, T. G. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 79, n. 1-3, p. 283-291, 2002.

LI, R. *et al.* Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 9, p. 46-52, 2016.

LI, W.; NICOL, F.; SZOKA JR., F. C. GALA: a designed Synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 56, p. 967-985, 2004.

LI, Y.-Y. *et al.* Aggregation of hydrophobically modified chitosan in solution and at the air– water interface. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 102, n. 2, p. 1968-1973, 2006.

LIN, C.; LOU, B. Bio reducible cationic polymers for gene transfection. *In*: LIN, C. (ed.) **Biomedicine**. IntechOpen, 2012.

LIN, F. *et al.* Chitosan-based core–shell structured particles for in vivo sustainable gene transfection. Journal of Materials Chemistry B, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 893-901, 2015.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, p. 31-69, 2010.

LIU, X. *et al*. The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p. 1280-1288, 2007.

LIU, Y.; REINEKE, T. M. Poly (glycoamidoamine) s for gene delivery. Structural effects on cellular internalization, buffering capacity, and gene expression. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 18, n. 1, p. 19-30, 2007.

LU, S. J. *et al.* Preparation of water-soluble chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 91, p. 3497-3503, 2004.

MA, B. *et al.* Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 123, n. 3, p. 184-194, 2007.

MA, O. *et al.* Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 72, n. 4, p. 616-624, 2008.

MA, P. L.; BUSCHMANN, M. D.; WINNIK, F. M. Complete physicochemical characterization of DNA/chitosan complexes by multiple detection using asymmetrical flow field-flow fractionation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, p. 9636-9643, 2010.

MALHOTRA, M. *et al.* A novel method for Synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and in vitro analysis. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 6, p. 485, 2011.

MALHOTRA, M. *et al.* Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 8, p. 2041, 2013.

MANSOURI, S. *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2004.

MANSUR, H. S. *et al.* Functionalized-chitosan/quantum dot nano-hybrids for nanomedicine applications: towards biolabeling and biosorbing phosphate metabolites. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 1, p. 1696-1711, 2013.

MAO, H. Q. *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 70, n. 3, p. 399-421, 2001.

MAO, S. *et al.* Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly (ethylene imine)-graft-poly (ethylene glycol) block copolymer/SiRNA polyplexes. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 17, n. 5, p. 1209-1218, 2006.

MAO, S.; SUN, W.; KISSEL, T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 12-27, 2010.

MARIE, E. *et al.* Amphiphilic macromolecules on cell membranes: from protective layers to controlled permeabilization. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 247, p. 861-881, 2014.

MARTINS, G. O. *et al.* Amphipathic chitosans improve the physicochemical properties of siRNA-chitosan nanoparticles at physiological conditions. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 216, p. 332-342, 2019.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, London, v. 431, n. 7006, p. 343, 2004.

MERTINS, O. *et al.* Interaction of pDNA with reverse phase chitosome. **Colloids and Surfaces** A: Physicochemical and Engineering Aspects, Amsterdam, v. 543, p. 76-82, 2018.

MERTINS, O.; DIMOVA, R. Binding of chitosan to phospholipid vesicles studied with isothermal titration calorimetry. **Langmuir**, Washington, v. 27, n. 9, p. 5506-5515, 2011.

MISRA, S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. **The Journal of the Association of Physicians of India**, Bombay, v. 61, n. 2, p. 127-33, 2013.

MIYATA, K.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses. **Chemical Society Reviews**, London, v. 41, n. 7, p. 2562-2574, 2012.

MORTARA, R. A. **Microscopia confocal por varredura a laser**: fundamentos e métodos. Biotecnologia aplicada à saúde, fundamentos e aplicações. São Paulo: Edgard Blücher, 2015. p. 221-247.

MU, X. *et al.* Efficient delivery of therapeutic siRNA with nanoparticles induces apoptosis in prostate cancer cells. **Journal of Nanomaterials**, New York, v. 2018, 2018.

MÜLLER, R. *et al.* Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. **Journal of Drug Targeting**, Yverdon, v. 4, n. 3, p. 161-170, 1996.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone Synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. **The Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 4, p. 279-289, 1990.

NITTA, M. *et al.* ¹³C-NMR study of acid dissociation constant (pKa) effects on the CO₂ absorption and regeneration of aqueous tertiary alkanolamine– piperazine blends. **Energy Procedia**, Oxford, v. 63, p. 1863-1868, 2014.

OLIVEIRA, F. P. P. *et al.* Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: charge density effects on in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, Bristol, v. 24, p. 55-101, 2013.

PALERMO, E. F. *et al.* Role of cationic group structure in membrane binding and disruption by amphiphilic copolymers. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 115, n. 2, p. 366-375, 2010.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor-α signaling in macrophages. **Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression**, Boca Raton, v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010.

PEREIRA, F. S. *et al.* Study of chitosans interaction with Cu (II) from the corresponding sulfate and chloride salts. **Cellulose**, London, v. 22, n. 4, p. 2391-2407, 2015.

PEREIRA, F. S. *et al.* Thermal and morphological study of chitosan metal complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 129, n. 1, p. 291-301, 2017.

PHILIPPOVA, O. E. *et al.* Aggregation of some water-soluble derivatives of chitin in aqueous solutions: role of the degree of acetylation and effect of hydrogen bond breaker. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 87, n. 1, p. 687-694, 2012.

PHILIPPOVA, O. E. *et al.* Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. **Biomacromolecules**, Washington, v. 2, n. 2, p. 483-490, 2001.

PHILIPPOVA, O. E.; KORCHAGINA, E. V. Chitosan and its hydrophobic derivatives: Preparation and aggregation in dilute aqueous solutions. **Polymer Science Series A**, Moscow, v. 54, n. 7, p. 552-572, 2012.

PICOLA, I. P. D. Aplicação de derivados de quitosana como agentes de transfecção para transferência gênica não viral. 2013. 136 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

PICOLA, I. P. D. *et al.* Chitosan derivatives for gene transfer: effect of phosphorylcholine and diethylaminoethyl grafts on the in vitro transfection efficiency. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, Abingdon, v. 27, n. 16, p. 1611-1630, 2016.

PICOLA, I. P. D. *et al.* Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan–DNA nanoparticles. **Journal of Experimental Nanoscience**, Abingdon, v. 8, n. 5, p. 703-716, 2013.

PRÄBST, K. *et al.* Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *In*: GILBERT, D. F.; FRIEDRICH, O. (ed.). **Cell viability assays**: methods and protocols. New York: Humana Press, 2017. p. 1-17.

PROTOCOL. CellTitter 96® AQueous non-radioactive cell proliferation assay: instructions for use of products G5421, G5430, G5440, G1111 and G1112. Madison: Promega Corporation, 2012. (Technical Bulletin). Disponível em: https://www.promega.com.br/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-non_radioactive-cell-proliferation-assay-_mts_/?catNum=G5421#protocols. Acesso em: 19 maio 2020.

QIN, C. *et al*. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 63, p. 367-374, 2006.

QUN, G.; AJUN, W.; YONG, Z. Effect of reacetylations and degradations on the chemical and crystal structures of chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 104, p. 2720-2728, 2007.

RAGELLE, H.; VANDERMEULEN, G.; PRÉAT, V. Chitosan-based siRNA delivery systems. Journal of Controlled Release, Amsterdam, v. 172, n. 1, p. 207-218, 2013.

RAI, Y. *et al.* Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

RAMAMOORTH, M.; NARVEKAR, A. Non viral vectors in gene therapy-an overview. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, India, v. 9, n. 1, p. GE01, 2015.

RAMANA, L. N. *et al.* Evaluation of chitosan nanoformulations as potent anti-HIV therapeutic systems. **Biochimica et Biophysica Acta**. **General Subjects**, Amsterdam, v. 1840, n. 1, p. 476-484, 2014.

RAMESH, R. *et al.* A. Successful treatment of primary and disseminated human lung cancers by systemic delivery of tumor suppressor genes using an improved liposome vector. **Molecular Therapy**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 337-350, 2001.

RAPER, S. E. *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 80, n. 1-2, p. 148-158, 2003.

REIS, J. *et al.* LPS-induced formation of immunoproteasomes: TNF-α and nitric oxide production are regulated by altered composition of proteasome-active sites. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Totowa, v. 60, n. 1-2, p. 77-88, 2011.

RICHARD, I. *et al.* Ionization behavior of chitosan and chitosan–DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI. **Biomacromolecules**, Washington, v. 14, p. 1732-1740, 2013.

RIZVI, S. A. A.; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Riyadh, v. 26, n. 1, p. 64-70, 2018.

ROSA, J. G. Grande sertão: veredas. Rio de Janeiro: Nova Aguilar, 1994.

ROZEMA, D. B. *et al.* Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 104, n. 32, p. 12982-12987, 2007.

SAMUELS, R. J. Solid state characterization of the structure of chitosan films. **Journal of Polymer Science**: Polymer Physics Edition, New York, v. 19, n. 7, p. 1081-1105, 1981.

SHAMELI, K. *et al.* Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 6, p. 6639-6650, 2012.

SHI, Q. *et al.* Chitosan-DNA/siRNA nanoparticles for gene therapy. In: YUAN, X.-B. **Non-viral gene therapy**. IntechOpen, 2011. Disponível em: https://www.intechopen.com/books/non-viral-gene-therapy/chitosan-dna-sirna-nanoparticles-for-gene-therapy. Acesso em: 13 mar. 2020.

SILVA, M. A. D. R. **Utilização do pireno como uma sonda fluorescente na investigação de ligações intermoleculares em misturas binárias de solventes**. 2002. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Spectrometric identification of organic compounds. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

SLÜTTER, B. *et al.* Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 207-214, 2010.

SMITH, J.; ZHANG, Y.; NIVEN, R. Toward development of a non-viral gene therapeutic. Advanced Drug Delivery Reviews, Amsterdam, v. 26, n. 2-3, p. 135-150, 1997.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química orgânica. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

SPÄNKUCH, B.; STREBHARDT, K. RNA interference-based gene silencing in mice: the development of a novel therapeutical strategy. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 11, p. 3405-3419, 2005.

STRAND, S. P. *et al.* Tailoring of chitosans for gene delivery: novel self-branched glycosylated chitosan oligomers with improved functional properties. **Biomacromolecules**, Washington, v. 9, n. 11, p. 3268-3276, 2008.

SUN, L. *et al.* One pot synthesis of gold nanoparticles using chitosan with varying degree of deacetylation and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 178, p. 105-114, 2017.

SUN, P. *et al.* Chitosan-based nanoparticles for survivin targeted siRNA delivery in breast tumor therapy and preventing its metastasis. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 11, p. 4931, 2016.

TAKEUCHI, H. *et al.* Polymer coating of liposomes with a modified polyvinyl alcohol and their systemic circulation and RES uptake in rats. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 195-205, 2000.

TEUSCHER, N. **Ligand binding assays**. Certara, 2014. Disponível em: https://www.certara.com/2014/07/22/ligand-binding-assays/?ap=&UTM_LeadSource. Acesso em: 5 maio 2020.

THIBAULT, M. *et al.* Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan–pDNA polyplexes. **Molecular Therapy**, Cambridge, v. 18, n. 10, p. 1787-1795, 2010.

TIERA, M. J. *et al.* Polycation-based gene therapy: current knowledge and new perspectives. **Current Gene Therapy**, Boca Raton, v. 11, n. 4, p. 288-306, 2011.

TIERA, M. J. *et al.* Polymeric system as nanodevices for siRNA delivery. **Current Gene Therapy**, Boca Raton, v. 13, p. 1-12, 2013.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Rebinyn**. Disponível em: https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-blood-products/rebinyn. Acesso em: 10 jul. 2020.

URAGAMI, T.; KATO, S.; MIYATA, T. Structure of N-alkyl chitosan membranes on waterpermselectivity for aqueous ethanol solutions. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 124, n. 2, p. 203-211, 1997.

VADER, P. *et al.* Disulfide-based poly (amido amine) s for siRNA delivery: effects of structure on siRNA complexation, cellular uptake, gene silencing and toxicity. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 28, n. 5, p. 1013-1022, 2011.

VERONESE, F. M. (ed.). **PEGylated protein drugs**: basic science and clinical applications. Basel: Birkhäuser, 2009.

VILLAR-ALVAREZ, E. *et al.* SiRNA silencing by chemically modified biopolymeric nanovectors. **ACS Omega**, Washington, v. 4, n. 2, p. 3904-3921, 2019.

VILLEGAS-PERALTA, Y. *et al.* Impact of the molecular weight on the size of chitosan nanoparticles: characterization and its solid-state application. **Polymer Bulletin**, Berlin, p. 1-20, 2020.

VOET, D.; VOET, J. G. Bioquímica. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WAKEFIELD, D. H. *et al.* Membrane activity and transfection ability of amphipathic polycations as a functions of alkyl group size. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 16, p. 1204-1208, 2005.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, London, v. 171, p. 737-738, 1953.

WEINHOLD, M. X. *et al.* Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 11, n. 4, p. 498-509, 2009.

WORLDWIDE, M. I. **Dynamic light scattering**: common terms defined. Malvern: Malvern Instruments, 2011. (Inform White Paper).

YANG, C. *et al.* Impact of PEG chain length on the physical properties and bioactivity of PEGylated chitosan/siRNA nanoparticles in vitro and in vivo. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 9, n. 14, p. 12203-12216, 2017.

YEZHELYEV, M. V. *et al.* Proton-sponge coated quantum dots for siRNA delivery and intracellular imaging. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 130, n. 28, p. 9006-9012, 2008.

YIN, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 15, n. 8, p. 541, 2014.

YU, B. *et al.* Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. **AAPS J**, Arlington, v. 11, n. 1, p. 195-203, 2009.

YUE, Z.-G. *et al.* Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosanbased nanoparticles. **Biomacromolecules**, Washington, v. 12, n. 7, p. 2440-2446, 2011.

ZETASIZER nano: user manual. Malvern: Malvern Instruments, 2013. Disponível em: <u>https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20</u> <u>manual.pdf</u>. Acesso em: 15 dez. 2019.

ZHANG, A. *et al.* Synthesis, characterization, and drug-release behavior of amphiphilic quaternary ammonium chitosan derivatives. **Journal Applied Polymer Science**, New York, v. 131, n. 4, p. 39890.1-39890.9, 2014.

ZHANG, K. *et al.* Shape effects of nanoparticles conjugated with cell-penetrating peptides (HIV Tat PTD) on CHO cell uptake. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 19, n. 9, p. 1880-1887, 2008.

ZHANG, M. *et al.* Polyaspartamide-based oligo-ethylenimine brushes with high buffer capacity and low cytotoxicity for highly efficient gene delivery. **Bioconjugate Chemistry**, Washington, v. 20, p. 440-446, 2009.

ZHANG, M. *et al.* Variation in the internalization of differently sized nanoparticles induces different DNA-damaging effects on a macrophage cell line. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 85, n. 12, p. 1575-1588, 2011.

ZHANG, X. *et al.* Preparation of arginine modified PEI-conjugated chitosan copolymer for DNA delivery. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 122, p. 53-59, 2015.

ZHANG, Y.; SATTERLEE, A.; HUANG, L. In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? **Molecular Therapy**, Cambridge, v. 20, n. 7, p. 1298-1304, 2012.

APÊNDICE A

Determinação da porcentagem da marcação com isotiocianato de rodamina (RITC)

Figura A1. Curva de calibração para determinação da porcentagem de rodamina no polímero $CH_{30}DEAE_{25}RITC$ ($\lambda_{ABS,MAX} = 554$ nm).



Tabela A1. Parâmetros para determinação da porcentagem de substituição com rodamina.

λ _{MAX}	M _{RITC}	n _{RITC}	n _{Polímero}	RITC (%)
554 nm	(mol L ⁻¹)	(mol)	(mol)	
0,778	9,945x10 ⁻⁶	2,983x10 ⁻⁸	7,719x10 ⁻⁶	0,386
Determinação da porcentagem da marcação com isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Figura A2. Curva de calibração para determinação da porcentagem de fluoresceína no polímero $CH_{15}DEAE_{25}FITC$, ($\lambda_{ABS,MAX} = 480$ nm).



Tabela A1. Parâmetros para determinação da porcentagem de marcação com fluoresceína.

λ _{MAX}	M _{FITC}	n _{FITC}	n _{Polímero}	FITC
480 nm	(mol L ⁻¹)	(mol)	(mol)	(%)
1,415	7,930x10 ⁻⁵	2,379x10 ⁻⁷	7,575x10 ⁻⁶	3,14

APÊNDICE B

Sonda de associação hidrofóbica

Figura B1. Sonda de associação hidrofóbica. (a) Fórmula química estrutural do pireno e (b) espectro de emissão padrão do pireno $(0,75 \ \mu mol \ L^{-1})$ em solução tamponante de pH 6,3 e força iônica de 0,15 mol L^{-1} .



Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE C

Curva analítica de calibração das massas moleculares da pululana



Figura C1. Curva analítica de calibração das massas moleculares da pululana.

Fonte: Dados da pesquisa.

Cromatogramas dos polímeros



Figura C2. Cromatogramas dos polímeros acetilados. (a) CH15, (b) CH20, (c) CH25 e (d) CH30.

Fonte: Dados da pesquisa.



Figura C3. Cromatogramas dos polímeros modificados com DEAE. (a) $CH_{15}DEAE_{25}$, (b) $CH_{20}DEAE_5$, (c) CH_{20} DEAE₁₅, (d) $CH_{20}DEAE_{25}$, (e) CH_{30} DEAE₅, (f) $CH_{30}DEAE_{15}$, (g) $CH_{30}DEAE_{25}$.

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE D

Padrões para comparação dos tamanhos de ácido nucleico via eletroforese em gel de agarose

(b)

Figura D1. (a) Ladder 1 kb Plus DNA, 15.000-100 pb e (b) Ladder DirectLoadTM 1 kb DNA, 10.000-500 pb.

(a)





APÊNDICE E

Concentração comum de polímero na solução estoque das nanopartículas



Figura E1. Concentração comum de polímero na solução estoque das nanopartículas.