



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

Ricchard Hallan Félix Viegas de Souza

Síntese, caracterização e transfecção *in vitro* mediada por nanopartículas de diisopropiletilamina e dietilaminoetil-quitosana: Efeito da massa molar na liberação de RNA de interferência

São José do Rio Preto  
2017

Ricchard Hallan Félix Viegas de Souza

Síntese, caracterização e transfecção *in vitro* mediada por nanopartículas de diisopropiletilamina e dietilaminoetil-quitosana: Efeito da massa molar na liberação de RNA de interferência

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

Financiadoras:  
CNPq – Proc. 202848/2015-9  
Capes

São José do Rio Preto  
17 de março de 2017

Souza, Ricchard Hallan Félix Viegas de.

Síntese, caracterização e transfecção *in vitro* mediada por nanopartículas de diisopropiletilamina e dietilamoetil-quitosana: efeito da massa molar na liberação de RNA de interferência/ Ricchard Hallan Félix Viegas de Souza. -- São José do Rio Preto, 2017

100 f. : il., grafs.

Orientador: Márcio José Tiera

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Quitosana. 4. Nanopartículas. 5. Terapia gênica.. 6. Massa molar 7. SiRNA.. I. Tiera, Márcio José. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ricchard Hallan Félix Viegas de Souza

Síntese, caracterização e transfecção *in vitro* mediada por nanopartículas de diisopropiletilamina e dietilaminoetil-quitosana: Efeito da massa molar na liberação de RNA de interferência

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

Financiadoras:  
CNPq – Proc. 202848/2015-9  
Capes

Comissão Examinadora

Profº. Drº. Márcio José Tiera  
UNESP – São José do Rio Preto-SP  
Orientador

Profº. Drº. Julio Cesar Fernandes  
UdeM – Montreal, Canadá

Profº Drº. Luis Alexandre Pedro de Freitas  
USP – Ribeirão Preto-SP

Profº Drº Éder Tadeu Gomes Cavalheiro  
USP – São Carlos-SP

Profº Drº Marinônio Lopes Cornélio  
UNESP – São José do Rio Preto-SP

São José do Rio Preto  
17 de março de 2017

**Dedico esse trabalho a minha amada esposa, Rosana Silistino Souza, mulher incomum e incomparável. Minha eterna companheira na vida e na pesquisa.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Márcio José Tiera pela oportunidade, dedicação, amizade, paciência, discussões, inspirações, confiança, ajuda e maestria na condução da pesquisa;

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Aparecida de Oliveira Tiera pela amizade, por acreditar e abrir as portas da universidade para mim;

Ao prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> MD. da Universidade de Montreal, Julio Cesar Fernandes pela orientação, ensinamentos, amizade, discussões e oportunidade ímpar de realização da pesquisa em seu laboratório;

Aos companheiros do Laboratório de Biotecnologia e Nanomateriais – LBN, Aline, Maicon, Amanda, Ana Carolina, Vitor, Larissa, Gabriela, Hemelen, Fabiana e Grazieli pela paciência e amizade durante esses anos;

À equipe do Laboratório de Ortopedia do Hôpital du Sacré-Coeur de Montreal, Qin Shi, Elsa-Patricia Rondon, Mohamed Benderdour, Houda Benabdoune e Isadora Picola que muito me ajudaram nos trabalhos de pesquisa e que constituíram minha família no Canadá;

Aos professores e companheiros do departamento de Física do Ibilce pela oportunidade, ensinamentos e amizade;

Ao técnico do Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Dr. Fábio Rogério de Moraes pela eficiência nas análises de RMN, explicações e paciência;

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Perez dos Santos Cabrera do Laboratório de Estudos em Peptídeos (LEPE) por nos ceder gentilmente o equipamento para a realização de medidas de tamanho e potencial zeta dos polímeros;

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Cristina Schmitt Cavalheiro do Laboratório de Fotoquímica do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos – USP por realizar, gentilmente, as análises de GPC dos polímeros;

A todos da seção de pós-graduação, principalmente ao Alex, à Silvia e à Rosemar pelo excelente atendimento, paciência, eficiência nos esclarecimentos e elaboração de documentos;

À minha mãe Antonia Aparecida Viegas de Souza, à minha irmã

Jaqueline Felix Viegas de Souza Sardinha e à minha filha Maria Regina Justi Souza pelo amor, carinho, paciência, por encherem de alegria a minha vida, e, em especial à minha esposa, bióloga, psicóloga, Dr<sup>a</sup> Rosana Silistino Souza, companheira inseparável de todos os momentos pelo amor, carinho, paciência, dedicação e compreensão; pessoa a quem devo todo o meu amor e felicidade;

À CAPES pela bolsa concedida, proporcionando o desenvolvimento e conclusão do meu doutorado;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado sandwich (SWE) concedida, possibilitando o desenvolvimento de parte da pesquisa no exterior;

A FAPESP pelo apoio financeiro, possibilitando a compra de materiais e equipamentos para o laboratório;

E a todos aqueles que me ajudaram de alguma forma ou outra em todas as dimensões.

O homem não é nada em si mesmo,  
não passa de uma probabilidade  
infinita. Mas, ele é responsável  
infinito dessa probabilidade.

Albert Camus

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                                 | <b>1</b>  |
| 1.1 Terapia gênica                                                                                                                                                                   | 1         |
| 1.2 Vetores virais                                                                                                                                                                   | 3         |
| 1.3 Vetores não-virais                                                                                                                                                               | 4         |
| 1.4 Quitosana e terapia gênica                                                                                                                                                       | 5         |
| 1.5 Transfecções com siRNA                                                                                                                                                           | 11        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                                                                                                                  | <b>13</b> |
| 2.1 Objetivos Específicos                                                                                                                                                            | 13        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                                                                        | <b>14</b> |
| 3.1 Materiais                                                                                                                                                                        | 14        |
| 3.2 Métodos                                                                                                                                                                          | 15        |
| 3.2.1 Desacetilação da quitosana                                                                                                                                                     | 15        |
| 3.2.2 Síntese da quitosana com o dietilaminoetil (DEAE)                                                                                                                              | 15        |
| 3.2.3 Degradação da dietilaminoetil-quitosana (DE)                                                                                                                                   | 16        |
| 3.2.4 Síntese da quitosana com diisopropilaminoetil (DIPEA)                                                                                                                          | 16        |
| 3.2.5 Determinação do grau de desacetilação (GD) das quitosanas por titulação potenciométrica                                                                                        | 17        |
| 3.2.6 Determinação do grau de desacetilação (GD) das quitosanas e substituição dos derivados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de $^1\text{H}$ | 17        |
| 3.2.7 Determinação da massa molar por Cromatografia de Permeação em Gel – GPC                                                                                                        | 17        |
| 3.2.8 Determinação da capacidade de tamponamento dos polímeros                                                                                                                       | 18        |
| 3.2.9 Determinação do grau de ionização dos polímeros                                                                                                                                | 18        |

|                                                                                                 |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.10 Formação das nanopartículas .....                                                        | 19        |
| 3.2.11 Determinação do tamanho e do potencial zeta das nanopartículas                           | 19        |
| 3.2.12 Eletroforese em gel de agarose .....                                                     | 20        |
| 3.2.13 Citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas.....                                   | 20        |
| 3.2.14 Transfecção com siRNA – SSB.....                                                         | 21        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                          | <b>23</b> |
| 4.1 Desacetilação da quitosana e determinação do grau de desacetilação por potenciometria ..... | 23        |
| 4.2 Síntese dos derivados de quitosana .....                                                    | 25        |
| 4.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de $^1\text{H}$ .....                     | 26        |
| 4.4 Determinação da massa molar dos polímeros por GPC .....                                     | 32        |
| 4.5 Avaliação da capacidade de tamponamento dos polímeros .....                                 | 35        |
| 4.6 Grau de Ionização .....                                                                     | 37        |
| 4.7 Estudos dos poliplexos .....                                                                | 39        |
| 4.7.1 Tamanho dos poliplexos .....                                                              | 40        |
| 4.7.2 Potencial Zeta .....                                                                      | 44        |
| 4.7.3 Estabilidade das nanopartículas em função do tempo .....                                  | 49        |
| 4.7.4 Eletroforese.....                                                                         | 52        |
| 4.7.5 Citotoxicidade dos polímeros e dos poliplexos .....                                       | 56        |
| 4.7.6 Transfecção <i>in vitro</i> .....                                                         | 59        |
| <b>5. CONCLUSÕES .....</b>                                                                      | <b>63</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                        | <b>65</b> |
| <b>APÊNDICE .....</b>                                                                           | <b>75</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Distribuição geográfica por países dos ensaios de terapia gênica realizados pelo mundo .....                          | 1  |
| Figura 2 – Indicações de ensaios clínicos realizados com terapia gênica .....                                                    | 2  |
| Figura 3 – Gráfico com os vetores mais utilizados em terapia gênica.....                                                         | 4  |
| Figura 4 – Representação das estruturas de quitina e quitosana .....                                                             | 6  |
| Figura 5 – Representação das estruturas dos grupos DEAE e DIPEA que foram utilizados para modificar a quitosana.....             | 10 |
| Figura 6 – Esquema hipotético do mecanismo de esponja de prótons após captação da nanopartícula pela célula .....                | 10 |
| Figura 7 – Ilustração esquemática do processo de silenciamento por siRNA mediado por nanopartículas .....                        | 12 |
| Figura 8 – Esquema da reação de desacetilação da quitosana comercial .....                                                       | 23 |
| Figura 9 – Gráfico de titulação potenciométrica da quitosana comercial .....                                                     | 24 |
| Figura 10 – Gráfico de titulação potenciométrica da quitosana desacetilada (CH) .....                                            | 25 |
| Figura 11 – Esquema de reação da quitosana desacetilada com o 2-cloro-dietilaminoetil (DEAE), formando o derivado DE .....       | 25 |
| Figura 12 – Esquema da reação da quitosana desacetilada com o 2-cloro-diisopropiletilamina (DIPEA), formando o derivado DI ..... | 26 |
| Figura 13 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da quitosana desacetilada (CH) a partir da quitosana comercial (CHC).....            | 27 |
| Figura 14 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da quitosana desacetilada de alta massa (CHH) .....                                  | 28 |
| Figura 15 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para os derivados com DEAE obtidos a partir da CH (DEM, DEL1, DEL2 e DEL3) .....     | 28 |
| Figura 16 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o derivado com DEAE obtido a partir da CHH (DEH).....                           | 29 |
| Figura 17 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da CH (DIM) .....               | 30 |
| Figura 18 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da CH (DI20) .....              | 31 |

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 19 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ para o derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da CHH (DIH) .....                                         | 31 |
| Figura 20 – Sequência de espectros que demonstram a inserção do grupo DIPEA à quitosana desacetilada .....                                                      | 32 |
| Figura 21 – Diagrama com a rota de reações para obtenção de derivados de quitosana.....                                                                         | 34 |
| Figura 22 – Capacidade de tamponamento da CH e dos derivados modificados com DEAE.....                                                                          | 36 |
| Figura 23 – Detalhes das curvas de titulação para avaliação da capacidade tamponante dos polímeros CH e DEM .....                                               | 37 |
| Figura 24 – Gráfico do grau de ionização em função do pH para os polímeros CH e derivados de DEAE .....                                                         | 39 |
| Figura 25 – Valores de diâmetro hidrodinâmico para os políplexos formados pelos polímeros com o siRNA SSB em pH 6,3 .....                                       | 42 |
| Figura 26 – Valores de diâmetro hidrodinâmico para os políplexos formados pelos polímeros com o siRNA SSB em pH 7,4 .....                                       | 43 |
| Figura 27 – Gráfico com os valores de potencial zeta determinados para as razões N/P 0,5, 1, 2, 3, 5 e 10 em pH 6,3.....                                        | 45 |
| Figura 28 – Gráfico com os valores de potencial zeta determinados para as razões N/P 0,5, 1, 2, 3, 5 e 10 em pH 7,4.....                                        | 46 |
| Figura 29 – Valores de potencial zeta para os políplexos formados com DEH, DEM, DEL1, DEL2, DEL3 e siRNA SSB em pH 7,4 e razão N/P 5 ...                        | 48 |
| Figura 30 – Valores de diâmetro hidrodinâmico para os políplexos formados com CH, DEH, DEM, DEL1, DEL2, DEL3 e siRNA SSB em pH 6,3 e razão N/P 5 .....          | 49 |
| Figura 31 – Gráfico de avaliação da estabilidade das nanopartículas formadas pelos polímeros com siRNA SSB em pH 6,3, na razão N/P 3 em função do tempo.....    | 50 |
| Figura 32 – Gráfico de avaliação da estabilidade das nanopartículas formadas pelos polímeros com siRNA SSB em pH 7,4, na razão N/P 5 em função do tempo.....    | 51 |
| Figura 33 – Gráfico de avaliação da estabilidade das nanopartículas formadas pelos polímeros com o siRNA SSB em pH 7,4, na razão N/P 10 em função do tempo..... | 52 |

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 34 – Imagens de eletroforeses obtidas dos poliplexos com siRNA em pH 6,3 .....                                                                                | 54 |
| Figura 35 – Imagens de eletroforeses obtidas dos poliplexos com siRNA em pH 7,4 .....                                                                                | 55 |
| Figura 36 – Ensaio de viabilidade celular realizado com quitosana e derivados modificados com DEAE, usando células HeLa e MTS.....                                   | 56 |
| Figura 37 – Ensaio de viabilidade celular realizado com os poliplexos formados por quitosana, derivados modificados com DEAE e siRNA .....                           | 57 |
| Figura 38 – Ensaio de viabilidade celular realizado com quitosana e derivados modificados com DIPEA, usando células HeLa e MTS.....                                  | 58 |
| Figura 39 – Ensaio de viabilidade celular realizado com os poliplexos formados com quitosana, derivados de quitosana modificados com DIPEA e siRNA .....             | 59 |
| Figura 40 – Eficiência de transfecção dos ensaios <i>in vitro</i> realizados com siRNA SSB em células HeLa para os polímeros CH e CHH.....                           | 60 |
| Figura 41 – Eficiência de transfecção dos ensaios <i>in vitro</i> realizados com siRNA SSB em células HeLa para os derivados de quitosana modificados com DEAE.....  | 61 |
| Figura 42 – Eficiência de transfecção dos ensaios <i>in vitro</i> realizados com siRNA SSB em células HeLa para os derivados de quitosana modificados com DIPEA..... | 62 |
| Figura 43 – Curva de calibração com ajuste polinomial do padrão Pullulan dos cromatogramas de GPC .....                                                              | 75 |
| Figura 44 – Cromatograma da GPC da quitosana comercial (CHC) .....                                                                                                   | 75 |
| Figura 45 – Cromatograma da GPC da quitosana desacetilada de alta massa molar (CHH) .....                                                                            | 76 |
| Figura 46 – Cromatograma da GPC da quitosana desacetilada de massa molar média (CH).....                                                                             | 76 |
| Figura 47 – Cromatograma da GPC da quitosana de alta massa molar modificada com DEAE (DEH).....                                                                      | 77 |
| Figura 48 – Cromatograma da GPC da quitosana de massa molar média modificada com DEAE (DEM) .....                                                                    | 77 |
| Figura 49 – Cromatograma da GPC da quitosana modificada com DEAE degradada para obter massa molar baixa (DEL1) .....                                                 | 78 |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 50 – Cromatograma da GPC da quitosana modificada com DEAE degradada para obter massa molar baixa (DEL2) ..... | 78 |
| Figura 51 – Cromatograma da GPC da quitosana modificada com DEAE degradada para obter massa molar baixa (DEL3) ..... | 79 |
| Figura 52 – Cromatograma da GPC da quitosana de alta massa molar modificada com DIPEA (DIH) .....                    | 79 |
| Figura 53 – Cromatograma da GPC da quitosana de massa molar média modificada com DIPEA (DIM) .....                   | 80 |
| Figura 54 – Cromatograma da GPC da quitosana de massa molar média modificada com DIPEA (DI20) .....                  | 80 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Algumas aplicações para a quitosana e seus derivados.....                                                          | 7  |
| Tabela 2 – Materiais utilizados durante a pesquisa.....                                                                       | 14 |
| Tabela 3 – Massas molares dos diferentes polímeros de quitosana substituídos<br>com os grupos DEAE e DIPEA.....               | 33 |
| Tabela 4 – Dados gerais dos polímeros utilizados nesse estudo .....                                                           | 35 |
| Tabela 5 – Grau de ionização dos polímeros em pH 6,3 e 7,4 expressos em<br>porcentagens.....                                  | 39 |
| Tabela 6 – Valores de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta para os<br>poliplexos formados com os polímeros em pH 6,3 ..... | 47 |
| Tabela 7 – Valores de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta para os<br>poliplexos formados com os polímeros em pH 7,4 ..... | 47 |

## SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

**A549:** células de carcinoma de pulmão humano

**ADA:** enzima adenosina desaminase

**AR:** artrite reumatoide

**Caco-2:** células de adenocarcinoma de cólon humano

**cDNA:** DNA complementar

**CH:** quitosana desacetilada

**CHC:** quitosana comercial

**CHH:** quitosana desacetilada de alta massa

**Ct:** fluorescência gerada no primeiro ciclo

**DE:** quitosana modificado com DEAE

**DEAE:** 2-cloro-N,N-dietilaminoetil

**DEH:** derivado de quitosana de alta massa molar modificado com DEAE

**DEL1:** derivado de quitosana de massa molar baixa (1) modificado com DEAE

**DEL2:** derivado de quitosana de massa molar baixa (2) modificado com DEAE

**DEL3:** derivado de quitosana de massa molar baixa (3) modificado com DEAE

**DEM:** derivado de quitosana de massa molar média modificado com DEAE

**Dh:** diâmetro hidrodinâmico

**DI20:** derivado de quitosana de massa molar média substituído com 20% de  
DIPEA

**DIH:** derivado de quitosana de massa molar alta modificado com DIPEA

**DIM:** derivado de quitosana de massa molar média modificado com DIPEA

**DIPEA:** 2-cloro-etil-diisopropilamina

**DLS:** Espalhamento Dinâmico de Luz

**DMEM:** meio de cultura Dulbecco Mem

**FBS:** soro fetal bovino

**GD:** grau de desacetilação

**GPC:** Cromatografia de Permeação em Gel

**H1299:** células de câncer de pulmão

**HCl:** ácido clorídrico

**HEK293:** células de rim de embrião humano 293

**HeLa:** células de carcinoma cervical coletadas de Henrietta Lacks

**HT1080:** células de fibrosarcoma

**kDa:** quiloDalton

**LAD:** Ladder

**MG63:** células de osteosarcoma humano

**miRNA:** microRNA

**Mn:** massa molar numérica média

**MTS:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

**Mw/Mn:** polidispersividade

**Mw:** massa molar ponderal média

**N/P:** N corresponde ao número de aminas dos polímeros e P corresponde ao número de fosfatos dos ácidos nucleicos

**NaNO<sub>2</sub>:** nitrito de sódio

**NaOH:** hidróxido de Sódio

**NCBI:** Centro Nacional para Informação de Biotecnologia

**OV-3:** células de câncer de ovário

**PCS:** Espectroscopia de Correlação de Fótons

**Pdi:** polidispersividade

**PEG:** polietilenoglicol

**PEI:** polietilenimina

**pH:** potencial hidrogeniônico

**pKa:** negativo do logarítmo de base 10 da constante de dissociação ácida (Ka);  $pKa = -\log Ka$

**PLL:** poli-L-lisina

**PMS:** fenazina metasulfato

**PS:** penicilina-estreptomicina

**RISC:** Complexo de indução de silenciamento do RNA

**RMN de <sup>1</sup>H:** Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**RNAi:** RNA de interferência

**RNA<sub>m</sub>:** RNA mensageiro

**RT-PCR:** reação em cadeia da polimerase em tempo real

**SCID:** síndrome da imunodeficiência combinada severa

**shRNA:** grampo de RNA curto

**siRNA:** RNA de interferência curto

**SSB:** antígeno da síndrome Sjögren

**TBE:** tampão de ácido Tris-EDTA-bórico

**$\alpha$ :** grau de ionização

**$\Delta Ct(SSB)$ :** diferença entre os valores de Ct entre a amostra controle e a amostra tratada com siRNA para o cDNA do SSB

**$\Delta Ct(\beta\text{-Actin})$ :** diferença entre os valores de Ct entre a amostra controle e tratada com siRNA para o cDNA do  $\beta$ -Actin

## RESUMO

A quitosana, polímero catiônico de origem natural, biocompatível, biodegradável e de baixa toxicidade vem sendo largamente estudada e utilizada no desenvolvimento de vetores não-virais para uso em terapia gênica. Nesse estudo, derivados de quitosana foram modificados com grupos hidrofílicos dietilaminoetil (DEAE) e diisopropiletilamina (DIPEA) tendo como objetivo melhorar a eficiência de transfecção e a liberação do material genético no ambiente intracelular. Poliplexos dos derivados de quitosana com diferentes massas molares foram investigados em ensaios de transfecção *in vitro* realizados com células HeLa, utilizando siRNA SSB como agente silenciador. Os resultados obtidos mostraram bons níveis de silenciamento e bloqueio de expressão do RNAm SSB, apresentando, em algumas situações, eficiência superior aos vetores não-virais Lipofetamina<sup>®</sup>, TransIT-siQUEST<sup>®</sup> e PEI. Fatores que podem afetar a eficiência de transfecção como pH, massa molar, grau de ionização, tamanho dos poliplexos, potencial zeta e razão N/P foram avaliados. Tanto as quitosanas desacetiladas quanto os seus derivados mostraram níveis de viabilidade celular superiores a 80% em ensaios de citotoxicidade realizados com MTS-PMS. Os resultados sugerem que os derivados de quitosana sintetizados e caracterizados nesse estudo possuem características favoráveis que os habilitam como potenciais vetores não-virais para serem usados em terapia gênica.

Palavras-chave: Derivados de quitosana, siRNA, massa molar, transfecção *in vitro*.

## ABSTRACT

*Chitosan, a natural biocompatible, biodegradable and low toxicity cationic polymer has been widely studied and used in the development of non-viral vectors for use in gene therapy. In this study, chitosan derivatives were modified with hydrophilic groups diethylaminoethyl (DEAE) and diisopropylethylamine (DIPEA) aiming to improve the transfection efficiency and the release of the genetic material in the intracellular environment. Poliplexes of chitosan derivatives with different molar masses were investigated in vitro transfection assays performed with HeLa cells using SSB siRNA as the silencing agent. The results showed significant knockdown of SSB mRNA expression for chitosan and its derivatives, presenting, in some situations, superior efficiency to the non-viral vectors Lipofetamina<sup>®</sup>, TransIT-siQUEST<sup>®</sup> and PEI. Factors that could affect transfection efficiency such as pH, molar mass, degree of ionization, nanoparticle size, zeta potential and N/P ratio were evaluated. Both deacetylated chitosan and its derivatives showed cell viability above 80% in MTS-PMS cytotoxicity assays. The results suggest that the chitosan derivatives synthesized and characterized in this study have favorable characteristics that enable them as potential non-viral vectors to be used in gene therapy.*

*Keywords: Chitosan derivatives, siRNA, molar mass, in vitro transfection.*

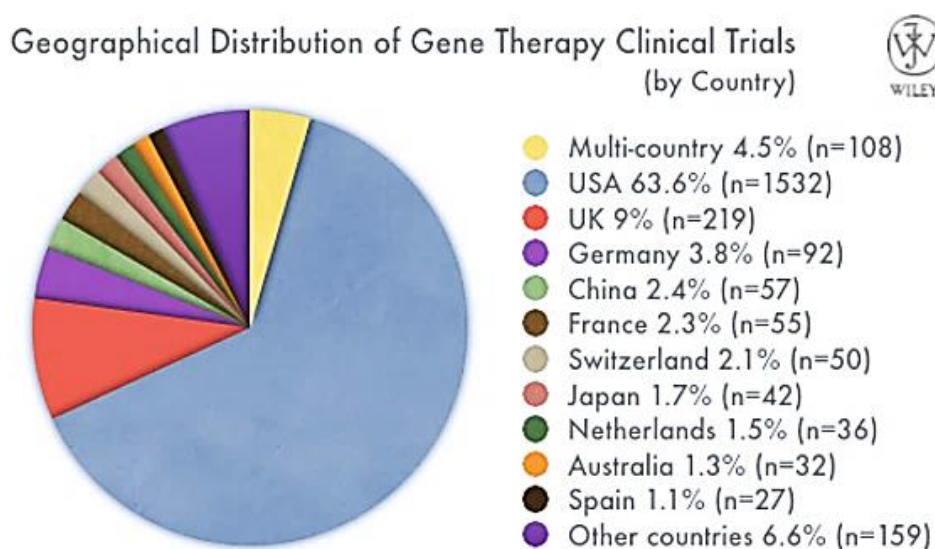
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Terapia gênica

A terapia gênica vem há muito tempo fascinando os cientistas, médicos e o público em geral, impulsionando ensaios em todo o mundo por conta do seu potencial para tratar doenças (Figura 1). Basicamente, é uma técnica utilizada para transferir material genético para células específicas com o objetivo de corrigir ou suplementar genes defeituosos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças (MANSOURI et al., 2004).

Em 1989, iniciaram-se as primeiras aplicações de terapia gênica em humanos para tratar uma doença genética, a síndrome da imunodeficiência combinada severa (SCID – *Severe Combined Immunodeficiency*), provocada pela deficiência da enzima adenosina desaminase (ADA – *Adenosine Deaminase Deficiency*) (LINDEN, 2010). Desde então, a técnica vem sendo estudada como uma potencial terapia para o tratamento de imunodeficiências combinadas, diabetes, artrite reumatoide, fibrose cística, doença de Parkinson e câncer, entre outras (Figura 2).

**Figura 1** – Distribuição geográfica por países dos ensaios de terapia gênica realizados pelo mundo

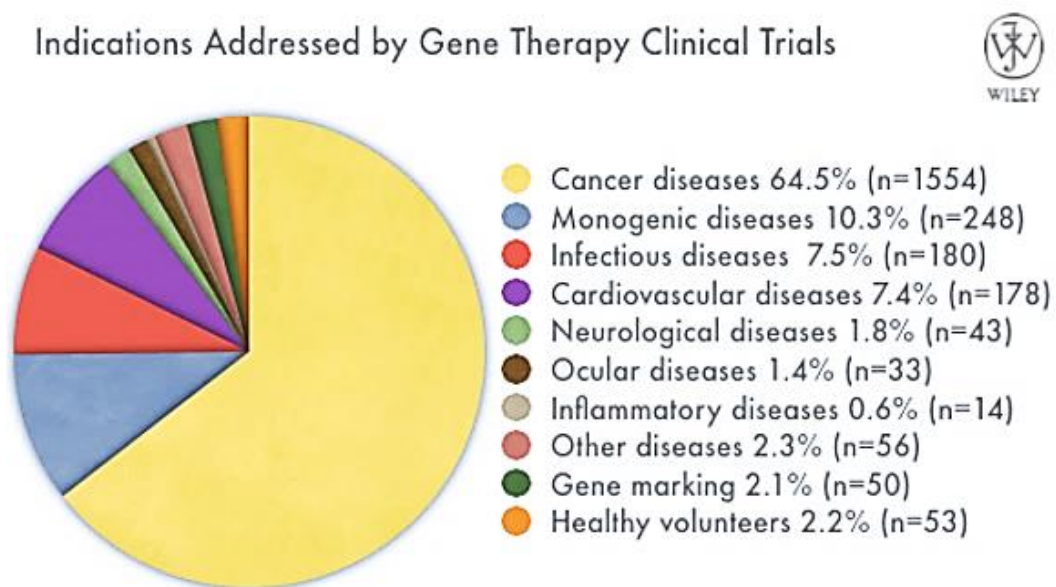


Fonte: The Journal of Gene Medicine (2016).

Esse novo método de tratamento corresponde a um novo paradigma em medicina com enorme potencial terapêutico. Entretanto, vários resultados adversos chamaram a atenção para os riscos inerentes a essa terapia (RAPER et al., 2003). O otimismo voltou em 2000 com o anúncio do primeiro tratamento bem sucedido realizado em 20 crianças com síndrome de imunodeficiência severa combinada (SCID-X1) (CAVAZZANA-CALVO, 2000). Porém, 30 meses após o início do tratamento, cinco crianças desenvolveram leucemia de células T como resultado direto do vetor viral utilizado na terapia gênica, sendo que quatro delas tiveram remissão da doença após tratamento bem sucedido com quimioterapia (HACEIN-BEY ABINA et al., 2003).

A terapia gênica também tem mostrado grande potencial de tratamento para a artrite reumatoide. A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, autoimune, que afeta as membranas sinoviais de múltiplas articulações (mãos, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos, pés, ombros, coluna cervical) e órgãos internos, como pulmões, coração e rins, de indivíduos geneticamente predispostos. A progressão do quadro está associada a deformidades e alterações das articulações (FELDMANN; MAINI, 2001; PEREIRA; PEREIRA, 2004).

**Figura 2** – Indicações de ensaios clínicos realizados com terapia gênica



Fonte: The Journal of Gene Medicine (2016).

Embora o conceito de silenciar ou substituir um gene defeituoso dentro da célula pareça simples, na prática há vários obstáculos a serem superados para efetivar a liberação do material genético dentro da célula alvo. (NALDINI, 2015). A entrada de DNA ou RNA puro através da membrana plasmática é rara em células eucarióticas (LINDEN, 2010, apud VELLAI; VIDA, 1999). Vários estudos demonstraram que o DNA livre pode ser introduzido diretamente nas células alvo utilizando técnicas de eletroporação (LAMBRICHT et al., 2015), bombardeamento de partículas (O'BRIEN; LUMMIS, 2009) ou ultrassom (SIRSI; BORDEN, 2010), mas os resultados são limitados, pois o DNA é rapidamente degradado no sangue pelas nucleases (NIVEN et al., 1998).

A transferência de genes precisa superar as complexas barreiras extracelulares e intracelulares para entregar a nova informação genética na célula alvo e gerar proficiente expressão da molécula terapêutica sem danificar o mecanismo regulatório essencial da célula (NALDINI, 2015). O desafio passa desde penetrar e manter estável o complexo formado com o material genético na corrente sanguínea até se ligar especificamente à célula alvo. Uma vez internalizado na célula, geralmente por endocitose ou pinocitose (MISLICK; BALDESCHWIELER, 1996), esse complexo precisa liberar a sua carga genética no citoplasma ou no núcleo.

Para superar esses obstáculos, veículos carreadores denominados “vetores” são empregados para realizar a inserção do material genético nas células vivas (LINDEN, 2010). Os vetores podem ser separados em duas categorias: virais e não-virais.

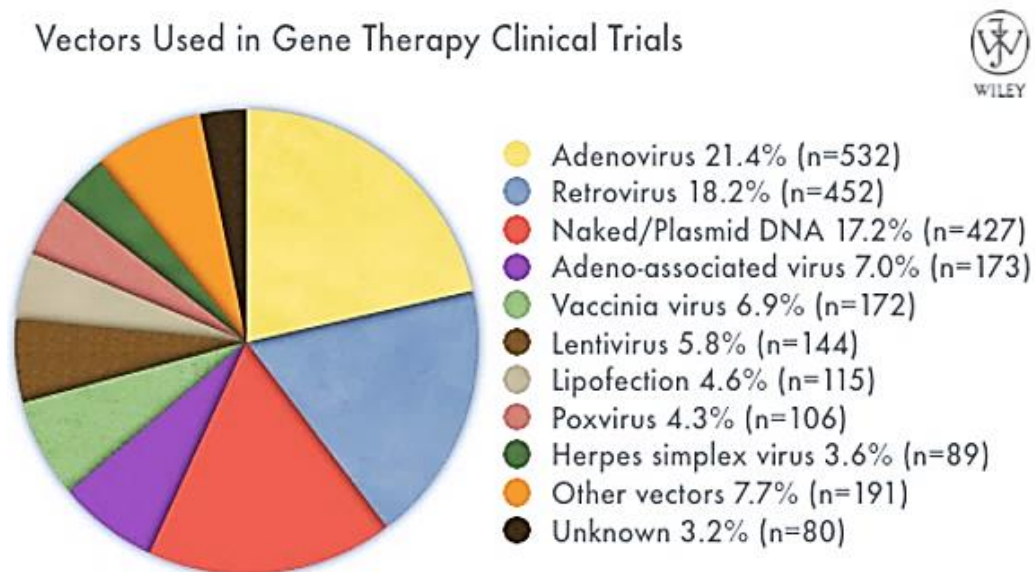
## **1.2 Vetores virais**

Os vírus representam o mais alto nível de evolução natural como vetores para inserir material genético e infectar outra célula. Devido a essa capacidade intrínseca, uma intensiva engenharia recombinante foi desenvolvida para criar vetores virais que pudessem entregar genes terapêuticos dentro de células doentes.

Desde então, diferentes tipos de vírus como adenovírus, retrovírus, lentivírus e vírus do herpes, entre outros, foram modificados para serem empregados em terapia gênica para o tratamento de diversas doenças. Na

Figura 3 é possível observar a predominância do uso de vetores virais em tratamentos gênicos.

**Figura 3** – Gráfico com os vetores mais utilizados em terapia gênica



Fonte: The Journal of Gene Medicine (2016).

Entretanto, vetores virais apresentam vários problemas, principalmente riscos relacionados à saúde do paciente, além de baixa capacidade de carga, dificuldades de produção em alta escala, alto custo de produção, risco de mutagênese (MASTORAKOS et al., 2015) e de apresentar frequentemente resposta imune a repetidas administrações (BESSIS; GARCIACOZAR; BOISSIER, 2004).

### 1.3 Vetores não-virais

Vetores não-virais tem o potencial de superar praticamente todas as limitações dos vetores virais, principalmente com respeito à segurança (YIN et al., 2014), apresentando menor imunogenicidade, melhor biocompatibilidade, maior capacidade de transporte de material genético, menor custo, maior facilidade de síntese e podem ser produzidos em larga escala (MINTZER; SIMANEK, 2009). Esses vetores sintéticos são, em geral, materiais que se

ligam eletrostaticamente ao DNA ou RNA, condensando-os em partículas de dezenas a centenas de nanômetros de diâmetro. Entre os principais vetores não-virais encontramos os polímeros e lipídios catiônicos que vão formar complexos com o material genético dando origem aos poliplexos e lipoplexos ou lipossomas, respectivamente (PACK et al., 2005).

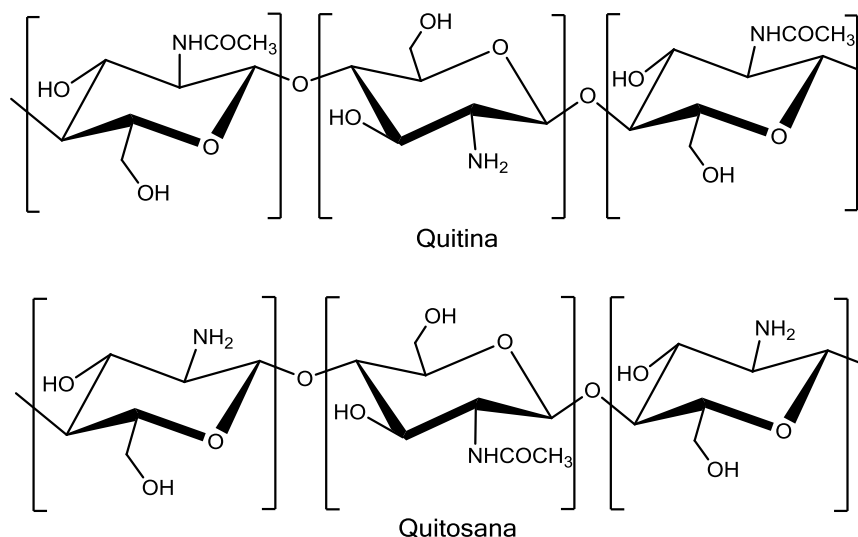
Os lipídios catiônicos são mais comumente utilizados como vetores não-virais em ensaios *in vitro* e *in vivo* devido a sua relativa maior eficiência de transfecção. Entretanto os vetores lipídicos apresentam importantes limitações como a estabilidade coloidal em administração sistêmica e, principalmente, toxicidade para vários tipos de células (FILION; PHILLIPS, 1998).

Polímeros catiônicos, além de apresentarem formulação estável e robusta, possuem flexibilidade estrutural para serem modificados pela inserção de grupos químicos, formando, por exemplo, complexos com aminas primárias, secundárias e terciárias que vão induzir o aumento do pKa e da capacidade de tamponamento do polímero. Nesse contexto, podemos citar poli-L-lisinas (PLL) (SUK et al., 2014), polietileniminas (PEI) (IHM et al., 2015), polimetacrilato, dextrana e quitosana (YIN et al., 2014).

## 1.4 Quitosana e terapia gênica

A quitosana é derivada da quitina, segundo polímero mais abundante da natureza, perdendo apenas para a celulose (Figura 4). É um polissacarídeo linear biodegradável composto por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), distribuídas randomicamente (RINAUDO, 2006).

O parâmetro para diferenciar a quitina da quitosana é o grau de desacetilação (GD), sendo esse determinado por meio de técnicas analíticas como a Potenciometria, Espectroscopia na região do Infravermelho, Condutimetria, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênios, entre outras (CAMPANA-FILHO; SIGNINI, 2001). Denomina-se quitosana quando o grau de desacetilação é maior que 50%. As vantagens de se obter quitosana com alto GD são: aumentar a sua reatividade, proporcionar modificações através de ligações de substituintes a partir dos grupos aminas livres, aumentar a capacidade tamponante e o grau de ionização.

**Figura 4** – Representação das estruturas de quitina e quitosana

Fonte: Elaborada pelo autor.

A desacetilação da quitosana comercial (CHC) para obtenção de quitosana com alto grau de desacetilação pode ser realizada em meio ácido ou alcalino, sendo o último o mais utilizado, já que as ligações glicosídicas são suscetíveis à hidrólise ácida (CAMPANA-FILHO; SIGNINI, 2001).

A quitosana é inicialmente caracterizada pela sua massa molar e pelo seu grau de desacetilação. O grau médio de desacetilação das quitosanas comerciais é de 75% e a massa molar pode variar de 30 kDa a 1000 kDa. Pode-se classificar como quitosana de baixa massa molar quando o valor é inferior a 50 kDa, de 50 kDa a 150 kDa como uma quitosana de massa molar média e acima de 150 kDa como uma quitosana de massa molar alta. É pouco solúvel em água (apresenta pKa de 6,3), mas é solúvel em soluções diluídas de ácidos, onde ocorre a protonação dos seus grupos aminas livres ( $\text{—NH}_3^+$ ), aumentando sua solubilidade (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009).

A quitosana tem sido amplamente estudada e a facilidade de criar derivados a partir da inserção de grupos químicos variados aos grupos aminas e hidroxilas livres de sua cadeia polimérica faz dela uma substância com muitas aplicações no cotidiano. Algumas aplicações para a quitosana e seus derivados são mostradas na Tabela 1, como por exemplo, controle do colesterol (MALHOTRA; KAUSHIK, 2009), tratamento de efluentes (MILHOME

et al., 2009), quelação de íons metálicos (SUN et al., 2009), biofungicida (DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013; SOUZA et al., 2013), cosméticos (JIMTAISONG; SAEWAN, 2014), conservante de alimentos (KONG et al., 2010), regenerador e reparador de tecidos (MA, 2008), tratamento de queimaduras e úlceras (BAXTER et al., 2013; ITO; BAN; ISHIHARA, 2000), carreador de drogas (WANG et al., 2014), bactericida (LU et al., 2015), entre outras.

**Tabela 1** – Algumas aplicações para a quitosana e seus derivados

| <b>Aplicações</b>                       | <b>Exemplos</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Medicina e biotecnologia</b>         | Formulações contra o colesterol; vetor de transfecção de genes; carreadora para transporte e liberação controlada de fármacos; produção de membrana para diálise; agente anticoagulante sanguíneo; regenerador e reparador de tecidos; preparação de pele artificial; tratamento de queimaduras e úlceras; combate ao câncer; agente cicatrizante de feridas e ferimentos. |
| <b>Agricultura</b>                      | Biofungicida; bactericida; tratamento de sementes para inibição de fungos.                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Alimentos e aditivos alimentares</b> | Formação de películas protetoras comestíveis para frutas e legumes; remoção de corantes em sucos cítricos; remoção de sólidos, $\beta$ -caroteno e substâncias ácidas de sucos de maçã e de cenoura; clarificação de vinhos; redução de absorção de gorduras; antioxidante, emulsificante, agente estabilizante, conservante de alimentos.                                 |
| <b>Engenharia de tecidos</b>            | Reparador de tecido ósseo e regenerador de matérias para cartilagem; estrutura porosa 3D para regeneração de ossos; cápsulas para desenvolvimento de pâncreas artificial para o tratamento de diabetes mellitus.                                                                                                                                                           |
| <b>Tratamento de água</b>               | Tratamento de efluentes, quelação de íons metálicos e pesticidas; removedor de fenol, proteínas, radioisótopos e corantes; filtração e clarificação por membranas de quitosana.                                                                                                                                                                                            |
| <b>Cosméticos</b>                       | Produtos para a pele e o cabelo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Polpa e papel</b>                    | Obtenção de papel isolante resistente ao envelhecimento; tratamento de superfícies celulósicas para aumentar a dureza sem alterar o brilho.                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Cromatografia</b>                    | Uso em cromatografia de permeação em gel; substrato de enzimas e imobilizador de enzimas.                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

Fonte: Adaptado de Zargar; Asghari; Dashti, 2015 e Campana-Filho; Signini, 2001.

Propriedades importantes da quitosana como baixa citotoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, (YOUNES; RINAUDO, 2015) e potencial catiônico a tornam um dos derivados naturais mais promissores para

ser utilizada como vetor não-viral em transferência gênica (BORCHARD, 2001; KIM *et al.*, 2007).

Assim como outros polímeros catiônicos, a quitosana pode complexar, transportar e proteger o material genético da degradação, porém, os níveis de liberação podem variar bastante dependendo das propriedades físico-químicas (PACK *et al.*, 2005; YIN *et al.*, 2014). Vários fatores como o grau de desacetilação (HU *et al.*, 2013), a massa molar (FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ *et al.*, 2016), a razão N/P (onde N corresponde ao número de grupos aminas da quitosana e P corresponde ao número de grupos fosfatos do material genético) o pH, a força iônica do meio e o tipo de célula podem afetar a eficiência de transfecção (MINTZER; SIMANEK, 2009).

Corsi *et al.* e Köping-Höggard *et al.* obtiveram bons resultados de transfecção em células HEK293, MG63, HT-1080, Caco-2 e linhagens de células tronco mesenquimais utilizando a quitosana como vetor (CORSI *et al.*, 2003; KÖPING-HÖGGARD *et al.*, 2001).

Geralmente, quitosanas com alto grau de desacetilação apresentam melhor eficiência de transfecção em ensaios *in vitro* para várias linhagens celulares. O sucesso deve-se à estabilidade adquirida pelo complexo, resultado da maior densidade de cargas. Contudo, quitosanas com graus de desacetilação moderados apresentaram melhores resultados de transfecção em estudos *in vivo* (KIANG *et al.*, 2004).

Nos anos 90, Mumper *et al.* foram os primeiros a utilizar quitosana como vetor não-viral em ensaios de terapia gênica. Seus estudos indicaram que a massa molar influenciava os resultados de eficiência de transfecção (MUMPER *et al.*, 1995). Quitosanas de alta massa molar possuem cadeias mais longas e formam complexos mais estáveis com DNA ou RNA devido a sua maior capacidade de emaranhamento quando comparadas a quitosanas com baixa massa molar (KIANG *et al.*, 2004).

Esse efeito foi observado em estudos realizados com células A549 onde a maior eficiência de transfecção foi obtida com a quitosana de maior massa molar (HUANG *et al.*, 2005). Porém, em estudos realizados com condrócitos, a avaliação de eficiência de transfecção entre quitosanas com diferentes massas molares demonstrou melhores resultados para a quitosana de 85 kDa em relação a outras de 200 kDa, 300 kDa e 800 kDa (ZHAO *et al.*, 2006).

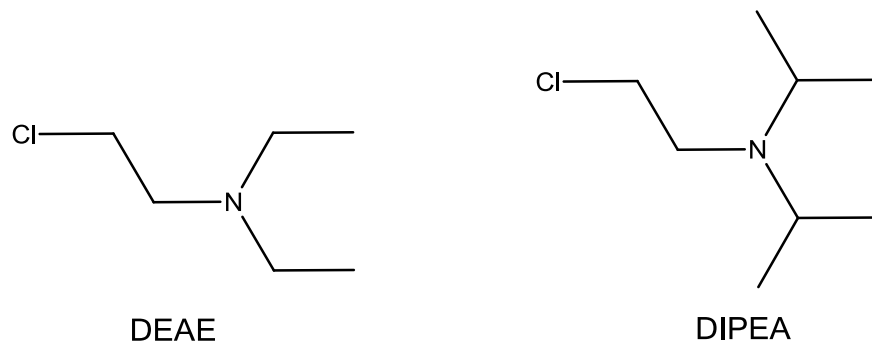
Provavelmente, a desmontagem do complexo para a liberação do material genético dentro da célula seja a causa da menor eficiência de transfecção da quitosana de alta massa molar.

Outros fatores tais como a razão N/P, o pH, o potencial zeta e capacidade de tamponamento podem estar relacionados com a eficiência de transfecção dos poliplexos. O valor ideal da razão N/P varia com a massa molar e o grau de desacetilação do polímero utilizado (KIANG et al., 2004). Valores de potencial zeta positivos e até próximos de zero proporcionam bons resultados na formação dos poliplexos e na eficiência de transfecção. O pH do meio e a massa molar dos polímeros influenciam bastante os valores de potencial zeta dos poliplexos (ZHAO et al., 2006).

Para melhorar a eficiência de transfecção, várias modificações têm sido realizadas na estrutura da quitosana. A quaternização dos grupos amina da quitosana com grupos trimetil aumenta a densidade de cargas e melhora os níveis de transfecção, mas aumenta a citotoxicidade do polímero (KEAN; ROTH; THANOU, 2005). Modificações com poli-L-lisina (PLL) foram utilizadas para aumentar a capacidade de tamponamento da quitosana, mas o baixo nível de transfecção da PLL dificulta o uso como vetor não-viral (MEYER et al., 2008). Polietileniminas (PEI) foram bastante utilizadas devido a sua alta capacidade de tamponamento, mas o alto nível de citotoxicidade praticamente inviabiliza o uso *in vivo* (YU et al., 2011). Outra estratégia bastante utilizada é a modificação com polietilenoglicol (PEG). Quitosanas com PEG aumentam a biodisponibilidade e diminuem a citotoxicidade dos poliplexos (ROGERS et al., 2014).

Para aumentar a solubilidade, a capacidade de tamponamento e obter boa eficiência de transfecção sem aumentar a citotoxicidade dos poliplexos de quitosana, modificações foram realizadas nos grupos aminas com as substâncias hidrofílicas 2-cloro-N,N-dietilaminoetil (DEAE) (OLIVEIRA et al., 2013) e 2-cloro-etil-diisopropilamina (DIPEA) (Figura 5). Esses grupos possuem aminas terciárias em sua estrutura e quando se ligam à cadeia de quitosana, resultam numa nova estrutura contendo grupos aminas primários, secundários e terciários.

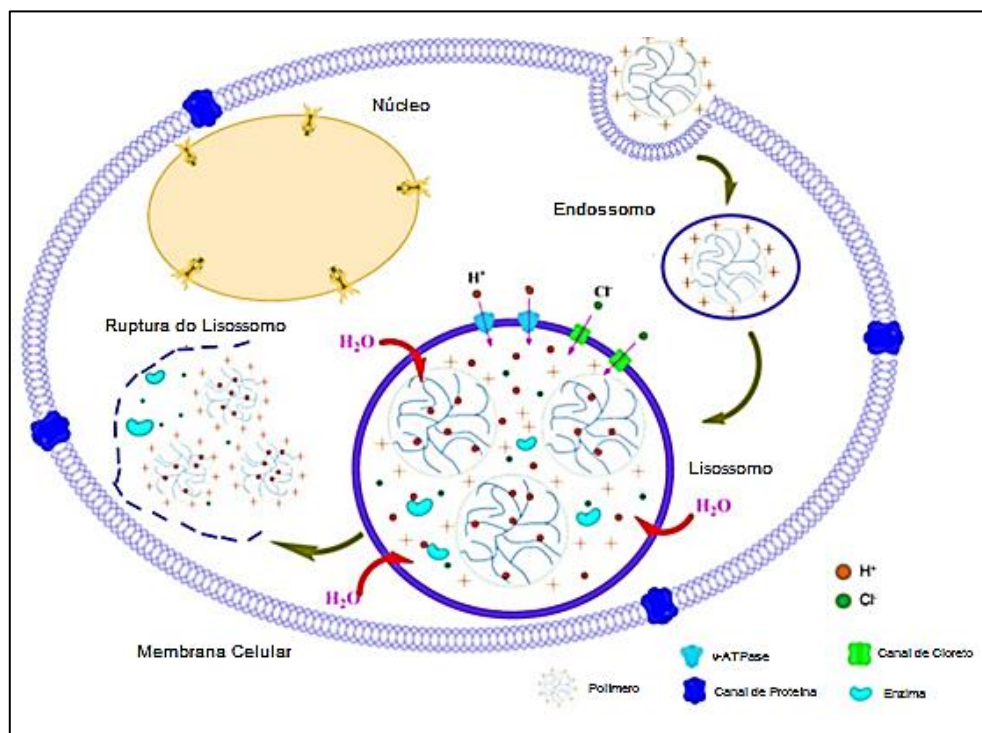
**Figura 5** – Representação das estruturas dos grupos DEAE e DIPEA que foram utilizados para modificar a quitosana



Fonte: Elaborada pelo autor.

As modificações ajudam na estabilidade do políplexo e na melhora da ação do mecanismo de esponja de prótons (Figura 6), culminando em maior eficiência de liberação do material genético dentro da célula alvo.

**Figura 6** – Esquema hipotético do mecanismo de esponja de prótons após captação da nanopartícula pela célula



Fonte: Adaptado de Jin et al., 2014.

Uma vez internalizada a nanopartícula na célula, ocorre a acidificação do lisossomo ou lisossomo pelo bombeamento de prótons, acompanhado pelo

influxo de íons cloreto. A elevação da concentração desses íons proporciona a entrada de água, aumentando a pressão osmótica dentro da vesícula. O processo culmina no inchamento e ruptura do endossomo/lipossomo, permitindo assim, a liberação do material genético antes de ser degradado (AGIRRE et al., 2014).

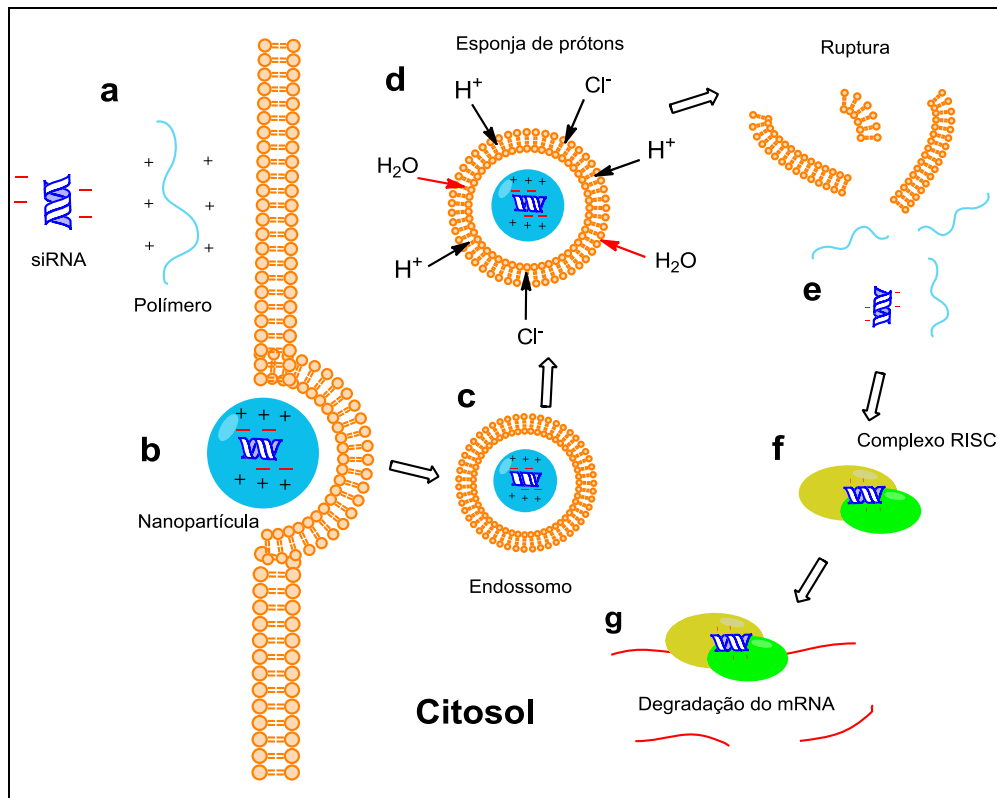
## 1.5 Transfecções com siRNA

Os efeitos silenciadores dos RNAs de dupla fita para regular funções dos genes foram descobertos em 1998 em estudos realizados com *Caenorhabditis elegans* (petúnias) (FIRE et al., 1998). Desde então, o RNA de interferência (RNAi) tornou-se rapidamente uma ferramenta poderosa e amplamente utilizada para o estudo das funções genéticas (DENG et al., 2014).

RNAi é definido como um mecanismo específico pós-transcricional silenciador de gene mediado por pequenos RNAs, incluindo endógenos microRNA (miRNA), exógenos RNA de interferência curto (siRNA – *small interfering RNA*) e grampos de RNA curto (shRNA – *short hairpin RNA*) (WANG et al., 2011).

Os RNAi vão formar o complexo silenciador induzido por RNA (RISC – *RNA-induced silencing complex*), onde as fitas são separadas para se ligar a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no RNAm alvo (Figura 7), provocando o silenciamento por inibição da tradução e/ou degradação do RNA mensageiro (FRANÇA et al., 2010).

**Figura 7** – Ilustração esquemática do processo de silenciamento por siRNA mediado por nanopartículas



A Figura representa em: a) Interação polímero-siRNA. b) Nanopartícula interagindo com a membrana da célula e sendo internalizada por endocitose. c) Formação do endossomo. d) Inchamento do endossomo provocado pelo mecanismo de esponja de prótons. e) Ruptura do endossomo e liberação do siRNA. f) Interação do siRNA com o RISC. g) Reconhecimento do RNAm e sua degradação. Fonte: Desenho do autor.

Utilizando nanopartículas preparadas com quitosana de 150 kDa de massa molar e siRNA, Liu et al. obtiveram 80% de eficiência de silenciamento do EGFP em células H1299 (LIU et al., 2007).

Bons níveis de silenciamento (77,9%) também foram obtidos utilizando complexos de quitosana e siRNA com elevada N/P (N/P 71) em ensaios *in vitro*, embora a alta concentração de quitosana em relação ao RNA tenha reduzido a viabilidade celular (HOWARD et al., 2006). Fernandes et al. modificaram quitosanas de 25 e 50 kDa com folato e PEG para melhorar a eficiência de transfecção com siRNA em células HeLa, OV-3 e MG-63 (FERNANDES et al., 2012).

Para avaliar a eficiência das transfecções *in vitro*, ensaios com células HeLa e quitosanas de diferentes massas molares modificadas com DEAE e DIPEA foram utilizadas nesse trabalho para formar nanopartículas com o siRNA SSB, que tem como alvo o antígeno do RNAm da Síndrome de Sjögren.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de vetores não-virais à base de quitosana que apresentem potencial eficiência de transfecção *in vitro* visando o uso em terapia gênica *in vivo*.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Síntese e caracterização de polímeros com diferentes massas molares derivados de quitosana modificados com DEAE e DIPEA;
- Avaliar as propriedades físico-químicas dos derivados sintetizados;
- Avaliar a citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas formadas com siRNA SSB;
- Avaliar como derivados de quitosana de diferentes massas molares modificados com DEAE e DIPEA afetam a eficiência de transfecção em ensaios *in vitro* com células HeLa.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Os materiais utilizados na pesquisa estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Materiais utilizados durante a pesquisa

| REAGENTES                        | PROCEDÊNCIA                  |
|----------------------------------|------------------------------|
| Ácido Acético                    | Synth                        |
| Ácido Clorídrico                 | Synth                        |
| Água Purificada Milli-Q          | Millipore                    |
| Cloreto de Deutério              | Aldrich Chemical Co.         |
| Cloreto de Sódio                 | Dinâmica                     |
| DEAE                             | Aldrich Chemical Co.         |
| DIPEA                            | Aldrich Chemical Co.         |
| Hidróxido de Sódio               | Dinâmica                     |
| Nitrito de Sódio                 | Synth                        |
| Óxido de Deutério                | Aldrich Chemical Co          |
| Quitosana                        | Polymar Ind. Com. Exp. Ltda. |
| Agarose                          | Invitrogen Canada Inc        |
| Brometo de Etídeo                | Invitrogen Canada Inc        |
| DNA ladder                       | Invitrogen Canada Inc        |
| Lipofectamina 2000®              | Invitrogen Canada Inc        |
| Meio de Cultura Dulbecco® (DMEM) | Invitrogen Canada Inc        |
| Penicilina-Estreptomicina (PS)   | Invitrogen Canada Inc        |
| Reagente TRIzol®                 | Invitrogen Canada Inc        |
| siRNA-RNAm SSB                   | Merck & Co Inc (USA)         |
| Soro Fetal Bovino (FBS)          | Invitrogen Canada Inc        |
| Spectra/Pore Membranas           | Spectrum                     |
| TransIT-siQUEST® MIR 2110        | Mirrus Bio LLC               |
| Tripsina-EDTA                    | Invitrogen Canada Inc        |

Fonte: Dados da pesquisa.

O siRNA utilizado foi produzido por Merck & Co Inc (West point, PA). Ele tem como alvo o RNA mensageiro (RNAm) do antígeno da síndrome Sjögren (SSB) – número de acesso à base de dados NCBI: NM 009278.

Para a análise de RNA das células através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), foram utilizados os kits de transfecção reversa QuantiTect (Qiagen) para a síntese de DNA complementar

(cDNA) e QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) para a quantificação de cDNA em tempo real.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Desacetilação da quitosana

A matéria-prima de partida foi a quitosana comercial produzida pela Polymar Ltda com grau de desacetilação de 76%, determinada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de  $^1\text{H}$  e massa molar de 338,5 kDa, determinada por Cromatografia de Permeação em Gel – GPC.

A reação de desacetilação (KURITA et al., 1993; TOLAIMATE et al., 2000) foi realizada, solubilizando-se 8,0 g (46,7 mmol) de quitosana comercial em 400 mL de água deionizada e 8,0 mL de ácido acético glacial. A solução resultante foi transferida para um balão equipado com condensador, termômetro e aquecimento, onde se acrescentaram 100 mL de uma solução concentrada de hidróxido de sódio (NaOH)  $23,5 \text{ mol L}^{-1}$ . A reação ocorreu em sistema de refluxo com atmosfera de nitrogênio por 90 minutos à temperatura de  $100^\circ\text{C}$ . Ao final, a solução foi transferida para um béquer e lavada com água deionizada duas vezes ao dia até atingir pH próximo de neutro. O polímero foi filtrado e todo o processo, repetido.

Ao final, o sólido resultante foi recuperado por filtração, lavado com acetona e colocado para secar. A água residual de todo o processo foi tratada antes do descarte.

O novo grau de desacetilação da quitosana, agora denominada quitosana desacetilada (CH) foi determinado por Titulação Potenciométrica e confirmado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de  $^1\text{H}$ .

### 3.2.2 Síntese da quitosana desacetilada com o dietilaminoetil (DEAE)

Uma amostra de 10,0 g de quitosana (61,7 mmol) com alto grau de desacetilação foi solubilizada em 610 mL de solução aquosa de ácido clorídrico (HCl)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, 3,20 g (18,6 mmol) de cloreto de 2-cloro-N,N-dietilamonietil (DEAE) foram adicionados sob agitação; o pH foi corrigido para

8,0 e a temperatura elevada para 65 °C. A reação foi mantida por 90 minutos e o pH controlado por adição de solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L<sup>-1</sup>. O produto obtido da reação foi dialisado (membrana de 3,5 kDa) por 4 dias, sendo, no primeiro dia contra solução de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> e nos outros dias, contra água deionizada (OLIVEIRA et al., 2013). O polímero resultante, quitosana desacetilada com DEAE (DE) foi recuperado por liofilização.

O mesmo procedimento foi utilizado para obtenção de quitosana de alta massa molar (236,7 kDa), sendo a quitosana de partida adquirida da Fluka Biochemika.

### **3.2.3 Degradação da dietilaminoetil-quitosana (DE)**

A reação de degradação da quitosana foi realizada por oxidação com nitrito de sódio (TØMMERAAS et al., 2001).

Três amostras de 1,0 g (6,17 mmol) de DE foram solubilizadas em 55,6 mL de solução de ácido acético 0,35 mol L<sup>-1</sup> (2% V/V). As soluções foram purgadas com gás nitrogênio por 1 hora sob agitação constante e resfriadas a 4 °C. Em seguida, 1,84 mL de soluções contendo 11,5 mg, 23,0 mg e 46,0 mg de nitrito de sódio foram adicionadas às soluções de DE. A agitação foi interrompida e os balões foram mantidos a 4 °C por 18 h protegidos da luz. Os polímeros degradados foram dialisados no primeiro dia contra água deionizada, no segundo dia contra solução de hidróxido de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup>, e no terceiro e quarto dias contra água deionizada, sendo recuperados no final por liofilização.

### **3.2.4 Síntese da quitosana desacetilada com diisopropilaminoetil (DIPEA)**

Duas amostras contendo 1,0 g (6,2 mmol) de quitosana desacetilada foram solubilizadas em duas soluções de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L<sup>-1</sup> com 62 mL cada uma. Em seguida, 186,2 mg (0,93 mmol) e 372,4 mg (1,86 mmol) de 2-cloro-etil-diisopropilamina (DIPEA) foram acrescentados às soluções de quitosana desacetilada e solubilizados sob agitação. As reações foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos da síntese com DEAE.

Os novos polímeros sintetizados com DIPEA passaram a ser denominados DI. Para obter massas diferentes, foi realizada uma nova reação com o DIPEA, utilizando-se quitosana de alta massa molar (236,7 kDa) produzida pela Fluka Biochemika.

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

Amostras de 40,0 mg de quitosana desacetilada (CH) e quitosana comercial (CCH) foram previamente secas em estufa à vácuo por 4 horas a 40 °C até atingirem valores de massa constantes. Em seguida, foram dissolvidas em, aproximadamente, 10 mL de uma solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> sob agitação até completa solubilização. A solução resultante foi titulada com uma solução padronizada de NaOH 0,0989 mol L<sup>-1</sup>.

### **3.2.6 Determinação do grau de desacetilação (GD) das quitosanas e substituição dos derivados por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN de <sup>1</sup>H**

Amostras de 15 mg das quitosanas e seus derivados foram dissolvidas em 0,7 mL de água deuterada e 10 µL de cloreto de deutério. As soluções foram mantidas sob agitação até completa solubilização e transferidas para tubos de RMN de <sup>1</sup>H. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram realizados no Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto – SP, num espectrômetro Bruker de 400 MHz à temperatura de 70 °C.

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

Medidas de cromatografia de permeação em gel foram realizadas para a determinação da massa molar numérica média (Mn), massa molar ponderal média (Mw) e da polidispersividade (Mw/Mn). Os polímeros foram preparados em solução tamponante de ácido acético (0,3 mol L<sup>-1</sup>) / acetato de sódio (0,2

mol L<sup>-1</sup>) em pH 4,5 sob agitação por 3 dias até completa solubilização e, depois, filtradas em membrana de 0,45 µm antes da análise (TIERA et al., 2006). Duas colunas em série (SB-803 HQ e SB-805- SHODEX) com tamanhos de 8 mm x 300 mm e vazão de 0,8 mL/min foram utilizadas para a análise das amostras. O padrão utilizado para calibração foi o Pullulan de massas moleculares de 805 kDa a 6,2 kDa.

As análises de cromatografia de permeação em gel foram realizadas num HPLC Shimadzu LC-20A com detector de índice de refração Shimadzu RID-10A do Laboratório de Fotoquímica da profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos – USP.

### **3.2.8 Determinação da capacidade de tamponamento dos polímeros**

As capacidades de tamponamento dos polímeros foram analisadas por titulações potenciométricas seguindo procedimentos já descritos na literatura (RICHARD et al., 2013; ZHONG et al., 2005). Os derivados foram previamente secos em estufa sob pressão reduzida a 40 °C por 4 horas. As soluções foram preparadas adicionando-se 2,5 mg (14,1 µmol) de polímero em 10,0 mL de solução de NaCl 0,15 mol L<sup>-1</sup>. Foram adicionados previamente, 0,15 mL de solução de HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> para completa solubilização dos polímeros. Logo após, o pH foi ajustado para 12 com adição de solução de NaOH 1,0 mol.L<sup>-1</sup> e a solução, titulada com alíquotas de 10 µL de solução padronizada de HCl 0,0989 mol L<sup>-1</sup> até pH 2.

### **3.2.9 Determinação do grau de ionização dos polímeros**

O grau de ionização dos polímeros foi determinado por titulação potenciométrica (SANTOS et al., 2003). Amostras de 40,0 mg dos polímeros foram previamente secas em estufa à vácuo por 4 horas a 40 °C até atingirem valores constantes de massa. Em seguida, foram dissolvidas em 10 mL de solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> sob agitação até completa solubilização. A solução resultante foi titulada com solução padronizada de NaOH 0,0989 mol L<sup>-1</sup>. Os cálculos para o grau de ionização ( $\alpha$ ) foram feitos considerando-se os volumes

de NaOH necessários para desprotonação dos grupos aminas dos polímeros, obtidos a partir dos gráficos das titulações (TIERA et al., 2006). Assim, utilizando-se a Equação 1, foi possível calcular o grau de ionização de cada um dos polímeros (OLIVEIRA et al., 2013).

$$\alpha = \left( 1 - \left( \frac{V}{\Delta V} \right) \right) * 100 \quad (1)$$

Onde: V é o volume de NaOH adicionado para cada valor de pH e  $\Delta V$  é a variação do volume de NaOH calculada entre os dois pontos de inflexão da derivada primeira obtida a partir da curva da titulação potenciométrica.

### 3.2.10 Formação das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas em soluções tamponantes de fostato pH 6,3 e pH 7,4, ambas com concentração de 50 mM e força iônica de 150 mM. Primeiramente, prepararam-se as soluções estoque, solubilizando os polímeros nas soluções tamponantes na concentração final de 9,3 mM de grupos amina. Em seguida, foram adicionadas, sob agitação, alíquotas da solução estoque do polímero à solução tamponante de pH desejado contendo 0,02 mM de siRNA SSB previamente solubilizado, de modo a obter as diferentes razões de N/P 0,5, 1, 2, 3, 5 e 10 utilizadas nesse estudo. Onde, N corresponde ao número de mol dos grupos aminas dos polímeros e P corresponde ao número de mol dos grupos fosfatos do siRNA.

### 3.2.11 Determinação do tamanho e do potencial zeta das nanopartículas

As medidas de potencial zeta e de tamanho das nanopartículas foram realizadas por Espectroscopia de Correlação de Fótons (*Photon Correlation Spectroscopy* – PCS) usando a técnica do Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS) em Zetasizer NanoSeries com laser He-Ne ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) e ângulo de  $90^\circ$  do Laboratório de Pesquisas em Ortopedia do Hospital Sacré Coeur, filiado à Universidade de Montreal (UdeM), Montreal, Canadá. A temperatura dos experimentos foi de  $25^\circ\text{C}$  e as amostras

preparadas em duplicata foram analisadas em triplicata. A concentração de siRNA foi mantida em 0,02 mM e as razões N/P variaram de 0,5 a 10.

### **3.2.12 Eletroforese em gel de agarose**

Essa técnica permitiu avaliar a estabilidade das nanopartículas formadas com os diferentes polímeros a partir dos diferentes graus de substituição, massas molares e razões N/P utilizadas.

A eletroforese foi realizada com gel de agarose 0,8 % em tampão ácido Tris-EDTA-bórico (TBE) com corrida de 15 minutos a 150 V em cuba de 8,5 cm x 6 cm x 0,5 cm (comprimento x largura x altura). A quantidade de siRNA utilizada para a preparação dos poliplexos foi de 0,5 µg por poço.

### **3.2.13 Citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas**

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados para determinação da viabilidade celular com ensaio de CellTiter96<sup>®</sup> aquoso não radioativo de proliferação celular (Promega Corporation), composto de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) e fenazina metasulfato (PMS). As soluções estoques dos polímeros foram preparadas em solução de ácido acético de concentração 60 mM para obter uma concentração inicial de 10 mg/mL. Células de carcinoma cervical HeLa FR-positivo (America Type Culture cell Collection / Rockville, MD, USA) foram cultivadas em placa de 96 poços a uma densidade de 10.000 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. No dia seguinte, o meio foi trocado por misturas de meio DMEN suplementado e soluções de polímeros devidamente ajustados para obter as concentrações finais de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL, incubando-se por mais 24 horas (cada concentração foi realizada em triplicata). No terceiro dia, o meio de cultura da placa foi trocado por meio DMEM contendo MTS e PMS, incubando-se por 30 minutos a 37 °C. O MTS é biorreduzido pelas células viáveis para formazana solúvel em meio de cultura. A absorvância foi medida em 490 nm com um leitor de microplacas EL800 universal (Molecular Devices

Corporation, Menlo Park, CA, EUA). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

Para o teste com as nanopartículas, após o cultivo das células HeLa por 24 horas, o meio de cultura foi removido e 50 µL de siRNA livre ou poliplexos (equivalente a 0,025 µg de siRNA) em diferentes razões N/P foram adicionados às células com 100 µL de meio completo, incubando-se por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio com CellTiter96® aquoso não radioativo de proliferação celular (Promega Corporation), assim como para os polímeros. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

### **3.2.14 Transfecção com siRNA – SSB**

As células HeLa foram semeadas 24 horas antes da transfecção em placas de 6 poços a uma densidade  $10^6$  células por poço com 3 mL de meio de cultura DMEM, 10% de FBS e 1% de PS a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. Após 24 horas, os poços foram lavados três vezes com meio DMEM novo, sem FBS e PS. Em seguida, 500 µL de soluções de poliplexos preparados em pH 6,3, contendo 5 µg de siRNA-SSB foram adicionados, deixando-se agir por 5 minutos (MALMO et al., 2012). Logo após, foram acrescentados 500 µL de meio DMEN sem FBS e PS e incubou-se por mais 4 horas a 37 °C. Após esse período, foram adicionados 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS, deixando-se na incubadora por mais 24 h. Ao final, os poços foram lavados com PBS 3 vezes e as células tratadas com o reagente TRIzol® para purificação de RNA, seguindo as instruções do fabricante (Ambion/RNA by life technologies). As amostras de RNA finais foram transcritas para cDNA com o kit de transcriptase reversa. A partir do cDNA de cada amostra, um kit foi utilizado para PCR em tempo real. Os primers aplicados foram: SSB, sequência senso 5'-CCA AAA TCT GTC ATC AAA TTG AGT ATT-3' e sequência anti-senso 5'-CCA GCC TTC ATC CAG TTT TAT CT-3', β-Actin sequência senso 5'-AGC CTC GCC TTT GCC GA-3' e sequência anti-senso 5'-CTG GTG CCT GGG GCG-3'. O kit para PCR em tempo real utilizado foi o Quantitect SYBR Green PCR e o método para análise foi o Mx3000P (Stratagene, La Jolla, USA). Esse método liga a molécula SYBR Green à fita

dupla de DNA, ligação não específica, e fluoresce. Dessa forma, pode-se monitorar o processo da reação de amplificação do cDNA, pois a intensidade de fluorescência aumenta proporcionalmente com o ciclo de amplificação. A fluorescência gerada no primeiro ciclo é chamada de Ct, e esse valor pode ser diretamente correlacionado com a concentração de partida da amostra. Com isso, os valores de expressão do RNAm SSB podem ser calculados a partir das mudanças relativas a células controle, sem tratamento com siRNA-SSB. A Equação 2 é utilizada para avaliar a porcentagem da expressão de RNAm SSB que foi bloqueada pelo siRNA-SSB e normalizada pelo  $\beta$ -Actin:

$$\text{Nível de expressão de RNAm SSB} = \frac{2^{-\Delta Ct(SSB)}}{2^{-\Delta Ct(\beta\text{-Actin})}} \quad (2)$$

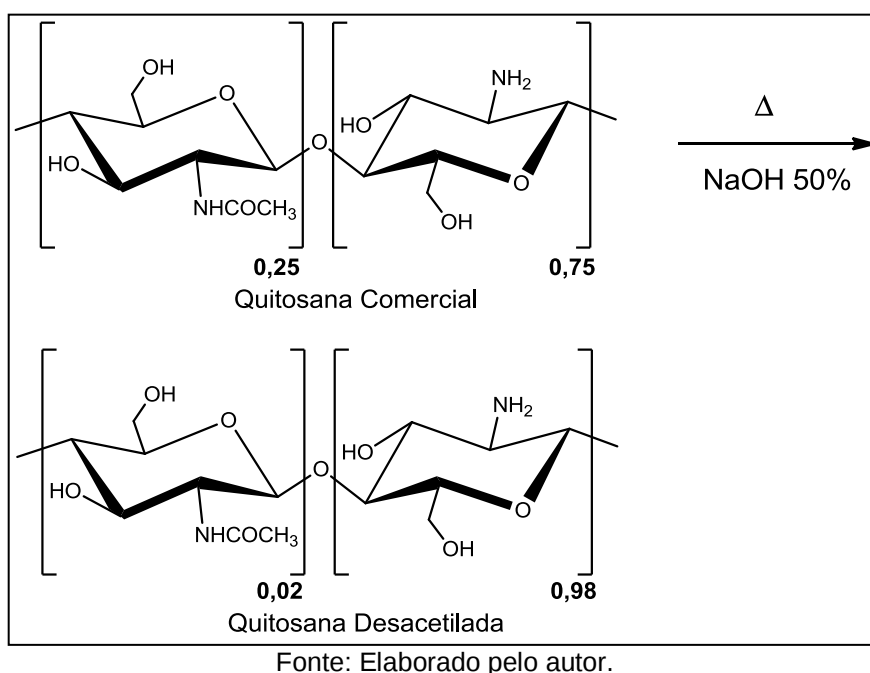
em que  $\Delta Ct(SSB)$  é a diferença dos valores de Ct entre a amostra controle e a amostra tratada com siRNA para o cDNA do SSB, e  $\Delta Ct(\beta\text{-Actin})$  é a diferença dos valores de Ct entre as amostras controle e cDNA do  $\beta$ -Actin.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desacetilação da quitosana e determinação do grau de desacetilação por potenciometria

As quitosanas utilizadas nesse trabalho foram obtidas a partir da desacetilação da quitosana comercial - CHC (Figura 8), adquirida junto à Polymar Ltda (massa molar – 338 kDa) e da compra efetuada junto à Fluka Biochemika (CHH de massa molar – 236,7 kDa). A quitosana adquirida da Fluka Biochemika foi utilizada como recebida.

**Figura 8** – Esquema da reação de desacetilação da quitosana comercial

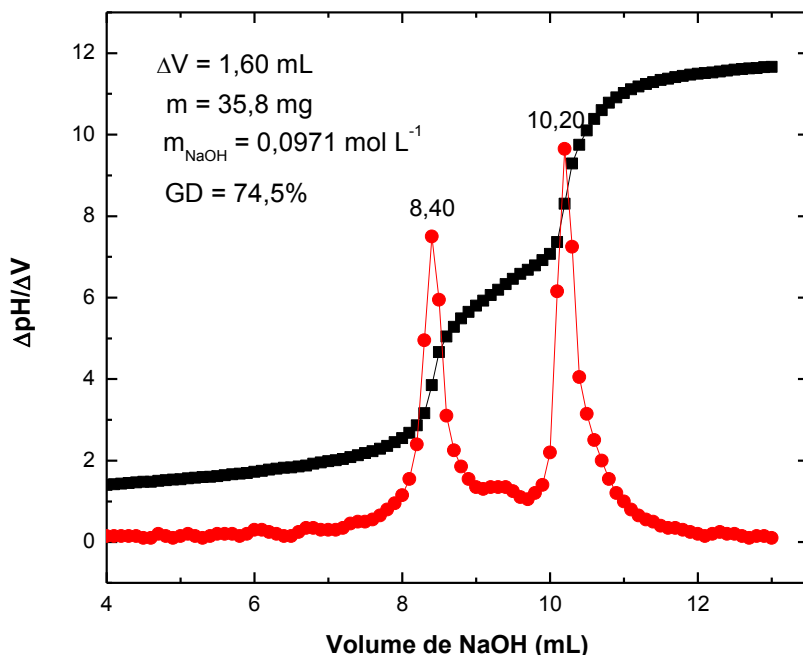


Os polímeros foram dissolvidos em solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L<sup>-1</sup> para total solubilização. A solução ácida vai promover a protonação dos grupos aminas, gerando cargas positivas (SHUKLA et al., 2013).

Com a adição de solução aquosa padronizada de hidróxido de sódio NaOH, ocorre a neutralização do ácido e obtém-se os dados da titulação (Figura 9). O primeiro ponto de equivalência da derivada primeira corresponde

à neutralização do excesso de HCl adicionado, enquanto o segundo ponto de equivalência corresponde à desprotonação total dos grupos aminas.

**Figura 9** – Curva de titulação potenciométrica da quitosana comercial (CHC)



Em preto: variação de pH em função do volume de NaOH; em vermelho: derivada primeira.

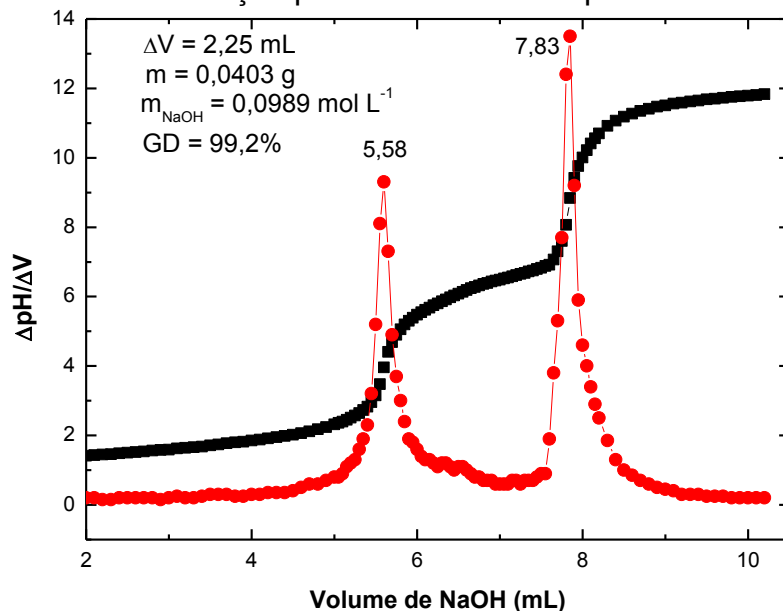
Fonte: Dados da pesquisa.

Utilizando a diferença de volume entre esses pontos, os valores da massa inicial do polímero e da concentração da base utilizada na titulação, é possível calcular o grau de desacetilação (GD) da quitosana através da Equação 3.

$$GD = \left[ \frac{V_{NaOH} \times m_{NaOH}}{(V_{NaOH} \times m_{NaOH}) + \frac{(m_{CH} - (V_{NaOH} \times m_{NaOH} \times 161,22))}{203,22}} \right] \times 100 \quad (3)$$

Onde: **V<sub>NaOH</sub>** é o volume da base, **m<sub>NaOH</sub>** é a concentração da base em mol.L<sup>-1</sup>, **m<sub>CH</sub>** é a massa de quitosana utilizada na titulação, 161,22 corresponde à massa molecular do monômero desacetilado e 203,22 corresponde à massa molecular do monômero acetilado.

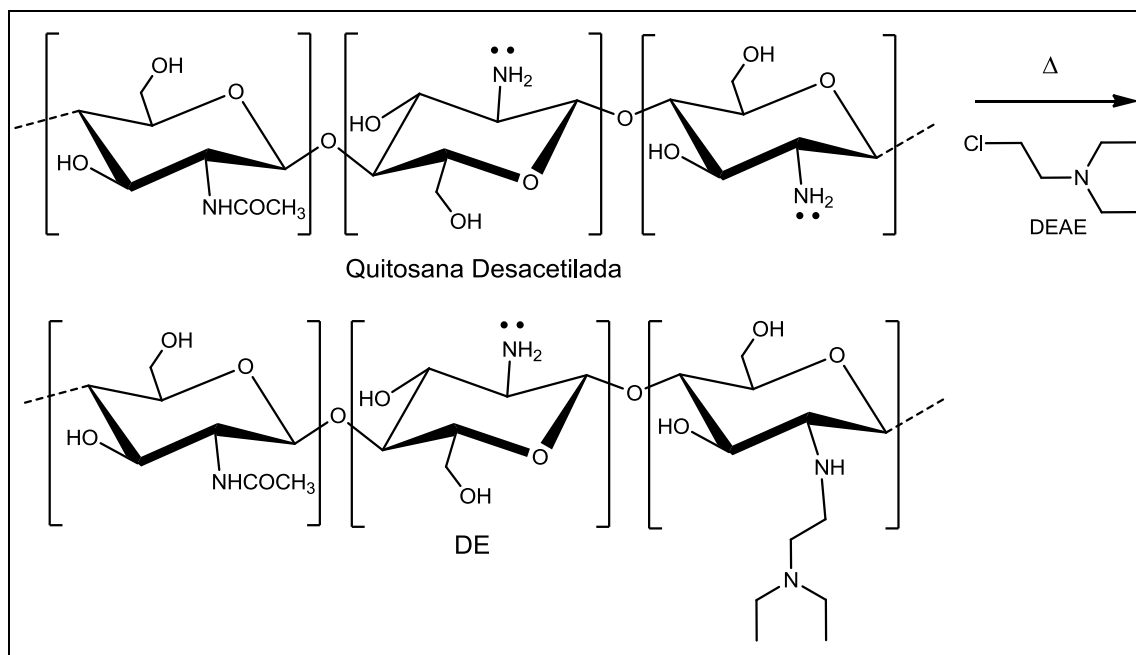
Assim, o grau de desacetilação calculado para a CHC foi de 74,5% e para a CH foi de 99,2% (Figura 10).

**Figura 10** – Curva de titulação potenciométrica da quitosana desacetilada (CH)

Em preto: variação de pH em função do volume de NaOH; em vermelho: derivada primeira.  
 Fonte: Dados da pesquisa.

## 4.2 Síntese dos derivados de quitosana

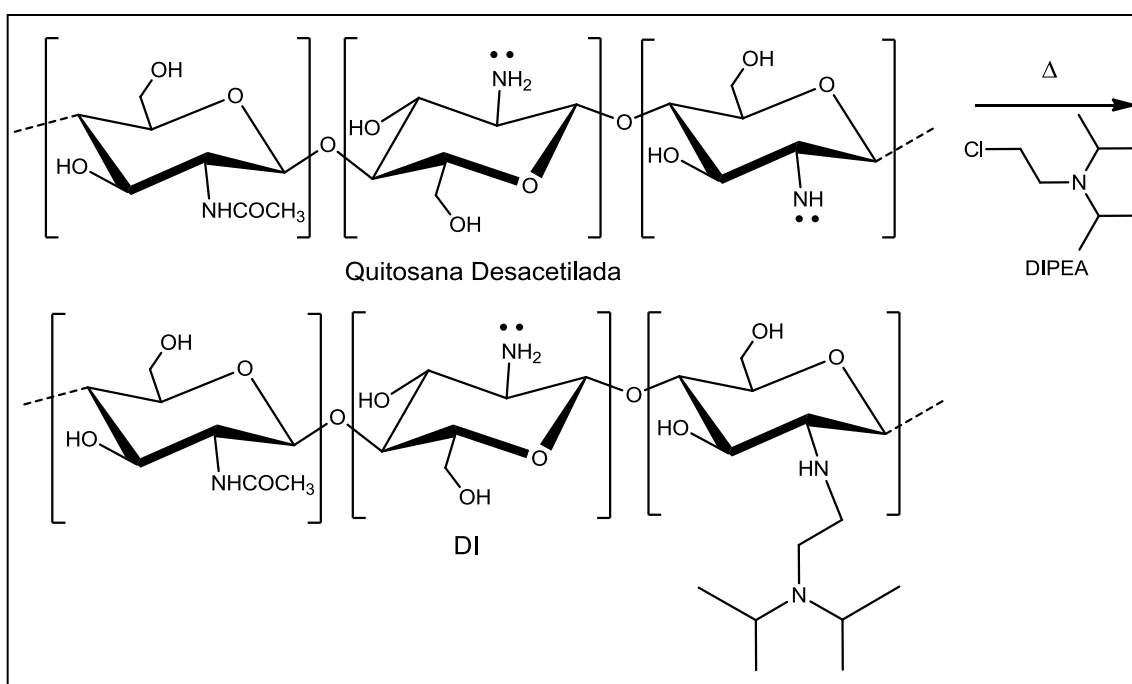
As quitosanas CH e CHH passaram por reações químicas para a adição de DEAE (Figura 11) e DIPEA (Figura 12) originando novos polímeros.

**Figura 11** – Esquema de reação da quitosana desacetilada com o 2-cloro-dietilaminoetil (DEAE), formando o derivado DE

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os derivados provenientes da quitosana desacetilada (CH) receberam a letra M (do inglês *medium*) como designação de média massa molar, dando origem aos polímeros DEM e DIM, enquanto as quitosanas desacetiladas substituídas com DEAE que sofreram degradações, receberam a letra L (do inglês *low*) para baixa massa molar, dando origem aos polímeros DEL1, DEL2 e DEL3. A quitosana com maior massa molar recebeu a letra H (do inglês *high*), dando origem a CHH. Os derivados sintetizados a partir da CHH receberam o nome de DEH e DIH.

**Figura 12** – Esquema da reação da quitosana desacetilada com o 2-cloro-diisopropiletilamina (DIPEA), formando o derivado DI



Fonte: Elaborado pelo autor.

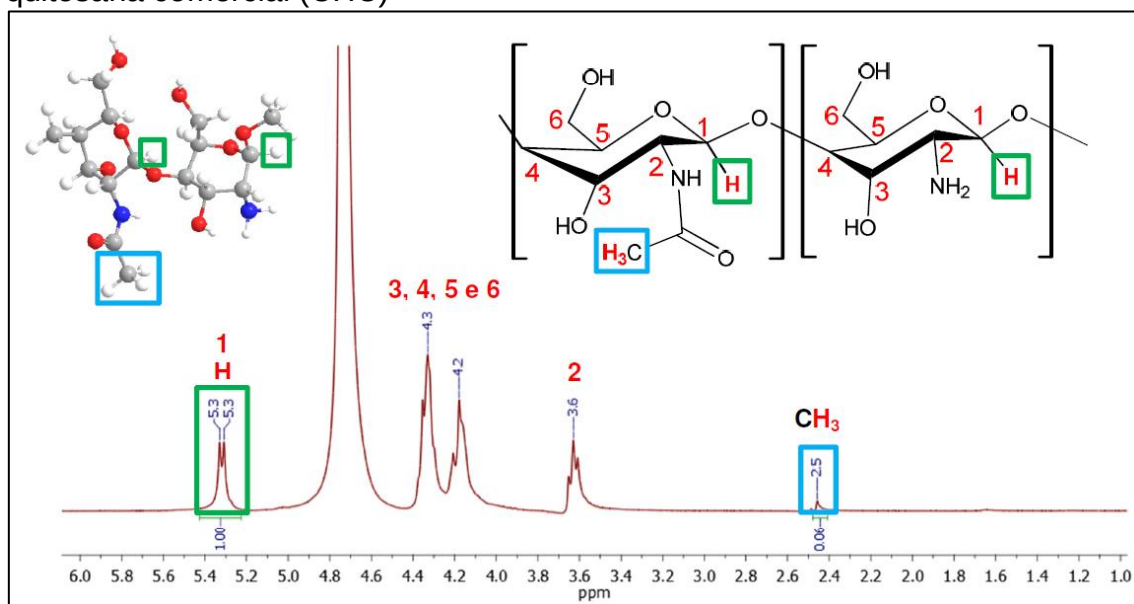
O derivado obtido da reação da CH com DIPEA cujo grau de substituição obtido foi de 19,3% recebeu o nome de DI20.

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

A Espectroscopia de Ressonância Magnética de Hidrogênio foi utilizada para determinar os graus de desacetilação das quitosanas desacetilada (CH) e desacetilada de alta massa (CHH), bem como a composição dos derivados com DEAE e DIPEA.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana desacetilada obtido a partir da quitosana comercial apresentado na Figura 13 exibe os sinais característicos da quitosana desacetilada com um sinal intenso em 5,3 ppm que corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono 1 anomérico, o hidrogênio ligado ao carbono 2 (3,6 ppm) e ao grupo acetamida (2,5 ppm), além dos sinais em 4,2 e 4,3 ppm que correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6.

**Figura 13** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana desacetilada (CH) a partir da quitosana comercial (CHC)



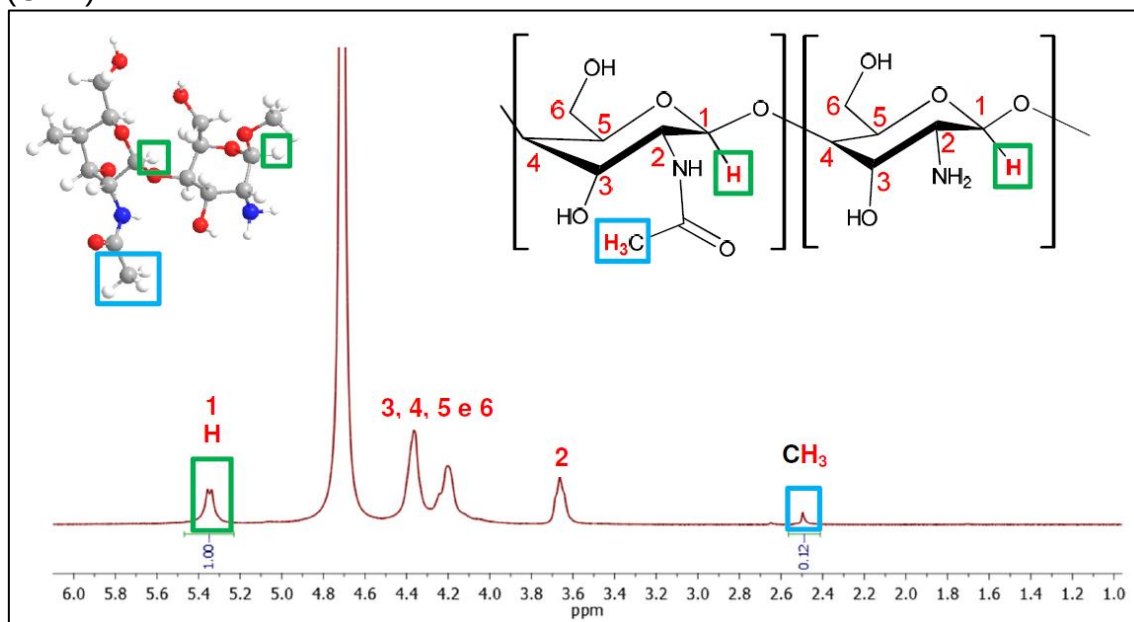
Fonte: Dados da pesquisa.

Com os valores destacados dos hidrogênios dos sinais em 5,3 (H) e 2,5 ( $\text{H}_3$ ) ppm, pode-se calcular o grau de desacetilação utilizando a Equação 4:

$$\text{GD}\% = \left[ 1 - \left( \frac{I_{\text{H}_3}}{3I_{\text{H}}} \right) \right] * 100 \quad (4)$$

O espectro da quitosana desacetilada de alta massa (CHH) é muito similar aquele obtido para CH e está mostrado na Figura 14. A diferença principal refere-se a menor resolução do espectro, que está provavelmente relacionada à maior massa molar e alta viscosidade da solução.

**Figura 14** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da quitosana desacetilada de alta massa (CHH)

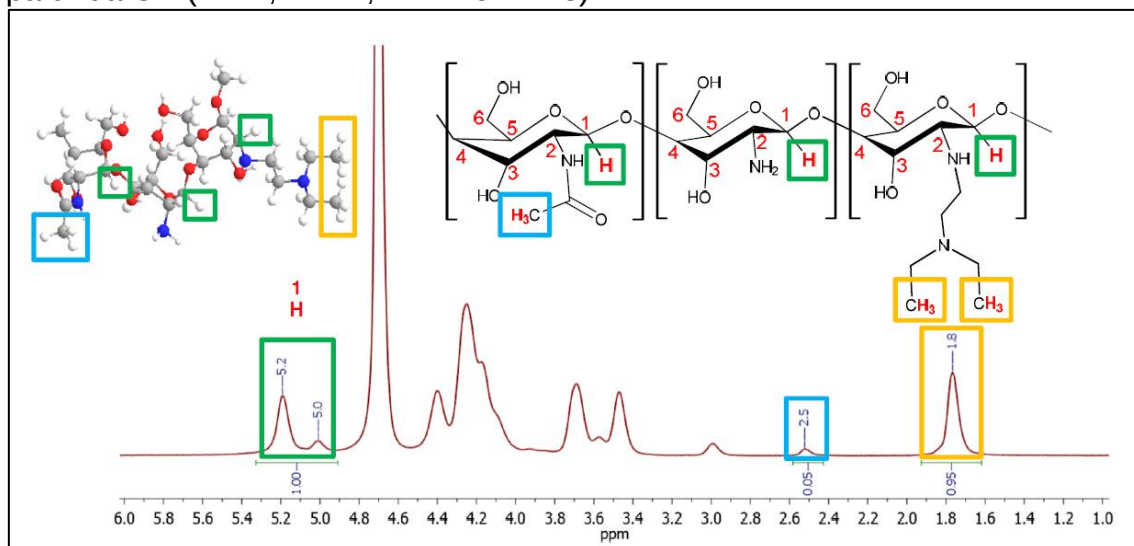


Fonte: Dados da pesquisa.

Os graus de desacetilação para a CH e CHH calculados com a Equação 3 foram de 98,0% e 96,0%, respectivamente.

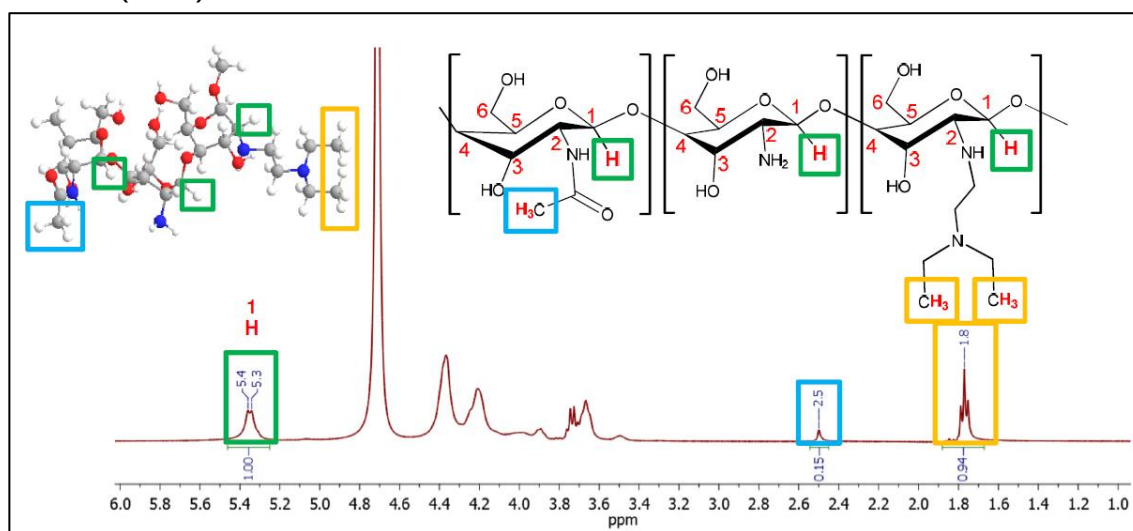
A inserção de grupos DEAE na cadeia de quitosana dá origem a novos sinais no espectro e pode induzir mudanças visíveis na absorção dos hidrogênios ligados ao carbono 1 (Figuras 15 e 16).

**Figura 15** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para os derivados com DEAE obtidos a partir da CH (DEM, DEL1, DEL2 e DEL3)



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 16** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o derivado com DEAE obtido a partir da CHH (DEH)



Fonte: Dados da pesquisa.

A análise da Figura 15 mostra claramente um novo sinal em 1,8 ppm referente aos grupos metilas do substituinte DEAE. Além disso, a substituição por DEAE provoca um desdobramento no sinal do anomérico, e os sinais em 5,0 e 5,2 ppm correspondem aos hidrogênios anoméricos dos monômeros substituídos e não substituídos, respectivamente.

O grau de substituição pode ser calculado a partir da integração dos sinais destacados, utilizando-se a Equação 5.

$$\text{GS (\%)} = \left( \frac{I_{H_6}}{6I_H} \right) * 100 \quad (5)$$

Em que  $I_{H_6}$  corresponde a integração do sinal dos grupos metila de DEAE e  $I_H$  corresponde a integração dos hidrogênios ligados ao carbono anomérico. Os mesmos sinais podem ser notados na Figura 16 para o derivado obtido de CHH e os graus de substituição foram de 15,8% e 15,7 % para DEM e DEH, respectivamente. Os valores de substituição obtidos para ambas as quitosanas desacetiladas foram muito próximos, o que demonstra a eficiência e o bom controle do procedimento de reação para inserção do grupo DEAE. Os derivados obtidos pela inserção do grupo DIPEA (DIM) foram sintetizados utilizando-se o mesmo procedimento e exibem espectros similares aqueles

obtidos com DEAE. Nas Figuras 17 - 19 são apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos derivados preparados com DIPEA (DIM, DIH e DI20).

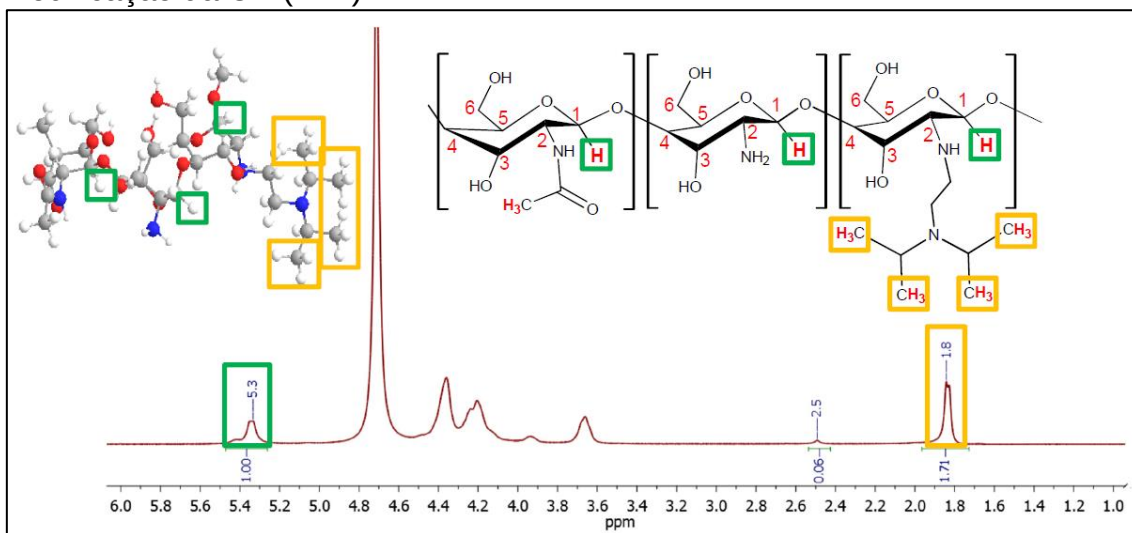
Os espectros são caracterizados pelo aparecimento de um sinal intenso em 1,8 ppm referente aos 4 grupos metila do grupo DIPEA. Além dessa mudança, o desdobramento do sinal do hidrogênio anomérico (5,3 ppm) é claramente observado em campo mais baixo em 5,5 ppm. O grau de substituição foi calculado utilizando a Equação 6.

$$\text{GS (\%)} = \left( \frac{I_{H_{12}}}{12I_H} \right) * 100 \quad (6)$$

Sendo que  $I_H$  corresponde a integral dos sinais dos grupos metila do DIPEA e  $I_{H_6}$  a integral do sinal dos anoméricos.

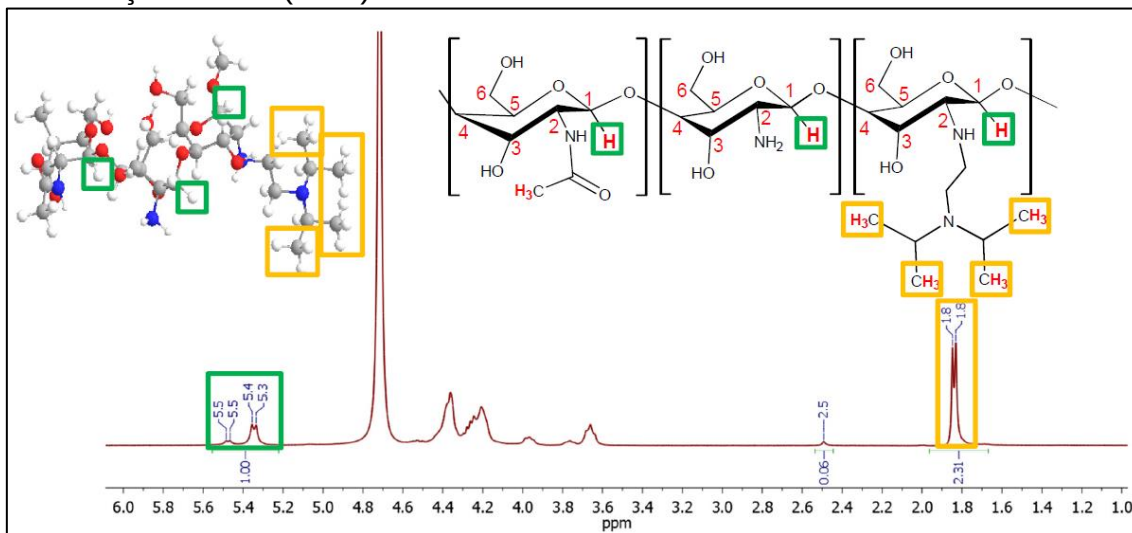
Os graus de substituição (GS) para DIM, DI20 e DIH foram de 14,3%, 19,3% e 11,2%, respectivamente.

**Figura 17** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da CH (DIM)



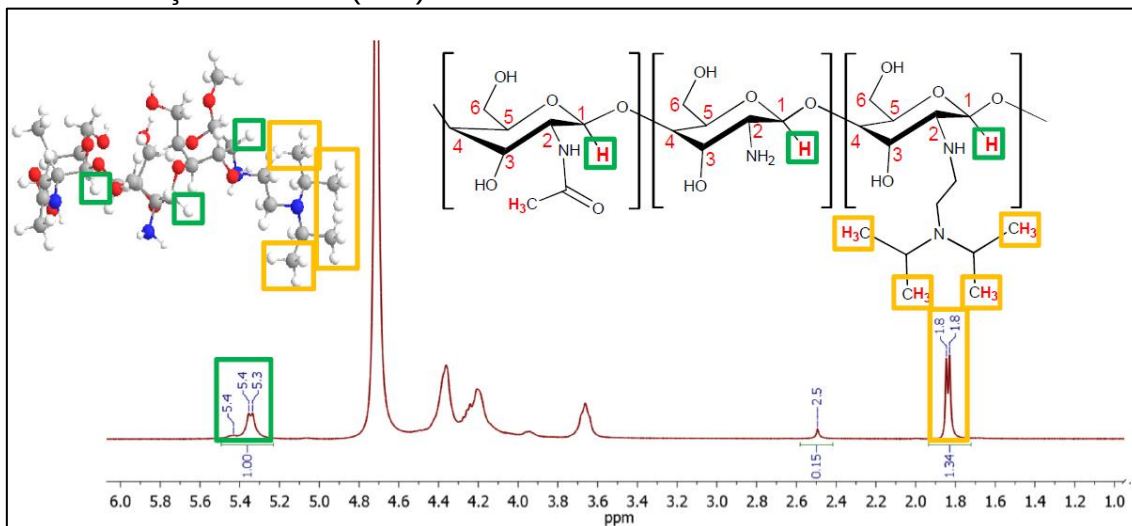
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 18** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da CH (DI20)



Fonte: Dados da pesquisa.

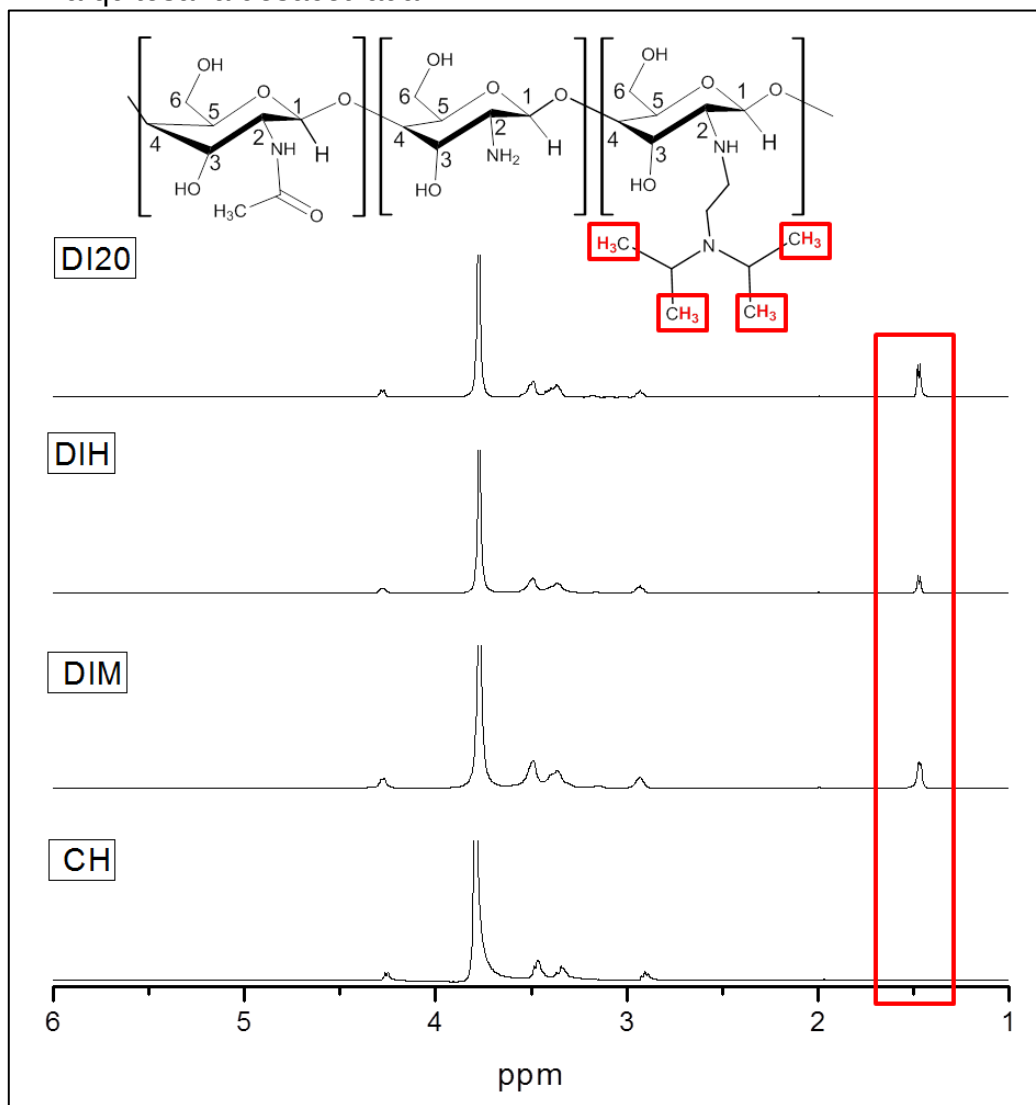
**Figura 19** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o derivado com DIPEA obtido a partir da modificação da CHH (DIH)



Fonte: Dados da pesquisa.

Observam-se na Figura 20, os espectros dos diferentes polímeros modificados com DIPEA. Os sinais em 1,8 ppm nos derivados com DIPEA e a ausência deles no espectro da quitosana desacetilada comprovam o sucesso da síntese.

**Figura 20** – Sequência de espectros que demonstram a inserção do grupo DIPEA à quitosana desacetilada



Fonte: Dados da pesquisa.

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

A massa molar desempenha um papel crucial na liberação intracelular, uma vez que controla a força de interação com o siRNA, portanto, um dos

objetivos principais desse trabalho foi avaliar derivados com diferentes massas molares.

Nesse sentido, foi preparada uma série de cinco polímeros com o substituinte DEAE (DEH, DEM, DEL1, DEL2 e DEL3) e dois polímeros com o substituinte DIPEA (DIH e DIM), além do DIM 20 com grau de substituição de 19,3 % de grupos DIPEA. Os derivados DEL1, DEL2 e DEL3 foram preparados a partir da degradação de DEM como descrito no item 3.2.3 a partir da oxidação com nitrito de sódio em meio ácido (Tabela 3).

**Tabela 3** – Massas molares dos diferentes polímeros de quitosana substituídos com os grupos DEAE e DIPEA

| Polímeros | Massa molar (kDa) |       |      |
|-----------|-------------------|-------|------|
|           | Mw                | Mn    | Pdi  |
| CHC       | 338,5             | 77,5  | 4,36 |
| CH        | 129,4             | 43,2  | 3,00 |
| CHH       | 236,7             | 139,4 | 1,70 |
| DEH       | 216,7             | 116,4 | 1,86 |
| DEM       | 122,5             | 40,4  | 3,03 |
| DEL1      | 70,0              | 26,7  | 2,62 |
| DEL2      | 45,9              | 18,7  | 2,45 |
| DEL3      | 25,3              | 10,0  | 2,52 |
| DIH       | 230,7             | 120,0 | 1,92 |
| DIM       | 115,8             | 36,0  | 3,22 |
| DI20      | 125,6             | 39,6  | 3,17 |

Fonte: Dados da pesquisa.

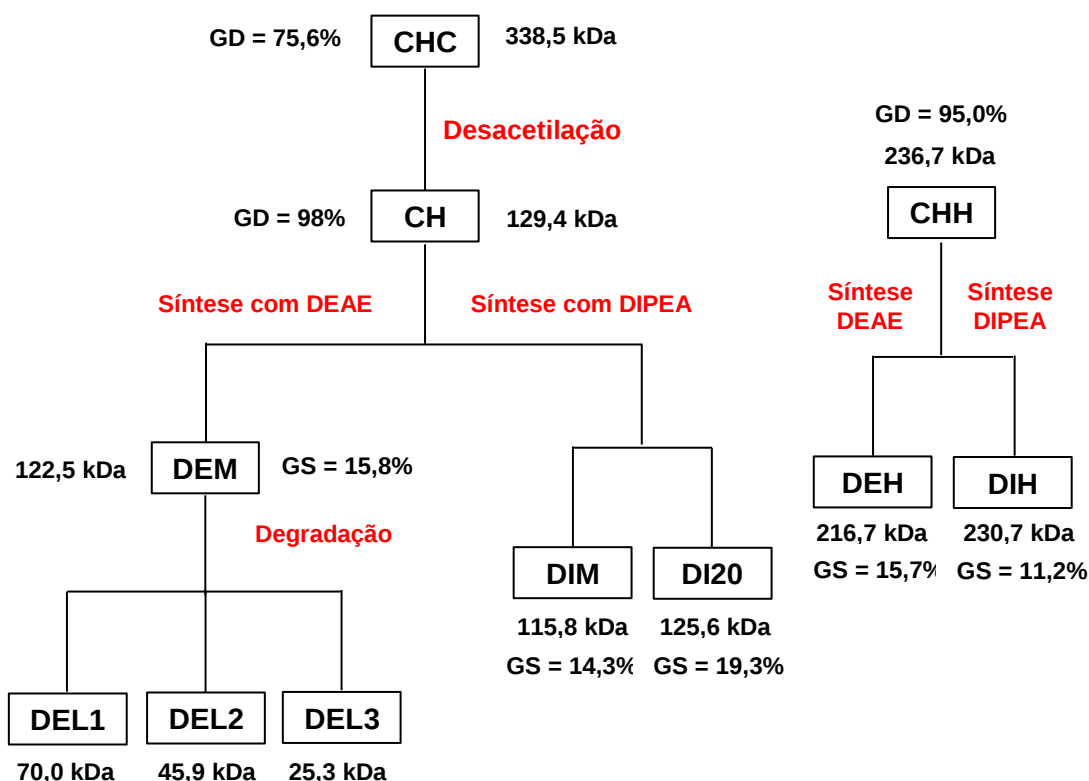
A reação de desacetilação em meio alcalino resultou num decréscimo de aproximadamente 62% da massa molar, ou seja, de 338,5 kDa da quitosana comercial (CHC) para 129,4 kDa da quitosana desacetilada (CH). Esse decréscimo deve-se principalmente a hidrólise das cadeias e, em menor extensão, à remoção dos grupos acetil. Essa diminuição ocorreu, sobretudo, devido às condições de reação, ou seja, temperatura e concentração de NaOH, ambas elevadas. Entretanto, na síntese dos derivados DEM e DIH, as condições de reação foram mais brandas, e as massas molares dos derivados permaneceram próximas àquelas das quitosanas desacetiladas de partida (CH

e CHH). Para os derivados degradados obtidos a partir de DEM (DEL1, DEL2 e DEL3), o que se nota claramente, é um decréscimo na polidispersividade das amostras, o que pode ser atribuído ao longo processo de purificação por diálise. Para os derivados com DIPEA, houve um ligeiro aumento na polidispersividade dos polímeros DIM e DI20.

Além disso, a reação de degradação do derivado DEM com diferentes quantidades de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) mostrou-se apropriada e proporcionou um decréscimo uniforme da massa molar (TØMMERAAS et al., 2001).

As rotas de sínteses dos diferentes derivados a partir da quitosana estão ilustradas no diagrama da Figura 21.

**Figura 21** – Diagrama com a rota de reações para obtenção de derivados de quitosana



Fonte: Criado pelo autor.

Os resultados obtidos com as análises de RMN de  $^1\text{H}$  e GPC para todos os polímeros são mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Dados gerais dos polímeros utilizados nesse estudo

| Polímeros   | Massa Molar (kDa) <sup>1</sup> |      | Grau de Desacetilação (%) <sup>2</sup> | Grau de Substituição (%) <sup>2</sup> |
|-------------|--------------------------------|------|----------------------------------------|---------------------------------------|
|             | Mw                             | Pdi  |                                        |                                       |
| <b>CHC</b>  | 338,5                          | 4,36 | 75,6                                   | -                                     |
| <b>CH</b>   | 129,4                          | 3,00 | 98,0                                   | -                                     |
| <b>CHH</b>  | 236,7                          | 1,70 | 96,0                                   | -                                     |
| <b>DEH</b>  | 216,7                          | 1,86 | 95,3                                   | 15,7                                  |
| <b>DEM</b>  | 122,5                          | 3,03 | 98,0                                   | 15,8                                  |
| <b>DEL1</b> | 70,0                           | 2,62 | 98,0                                   | 15,8                                  |
| <b>DEL2</b> | 45,9                           | 2,45 | 98,0                                   | 15,8                                  |
| <b>DEL3</b> | 25,3                           | 2,52 | 98,0                                   | 15,8                                  |
| <b>DIH</b>  | 230,7                          | 1,92 | 95,3                                   | 11,2                                  |
| <b>DIM</b>  | 115,8                          | 3,22 | 98,0                                   | 14,3                                  |
| <b>DI20</b> | 125,6                          | 3,17 | 98,0                                   | 19,3                                  |

<sup>1</sup> Massas molares determinadas por GPC; <sup>2</sup> Grau de desacetilação e substituição calculados a partir de dados de RMN de  $^1\text{H}$ .  
 Fonte: Dados da pesquisa.

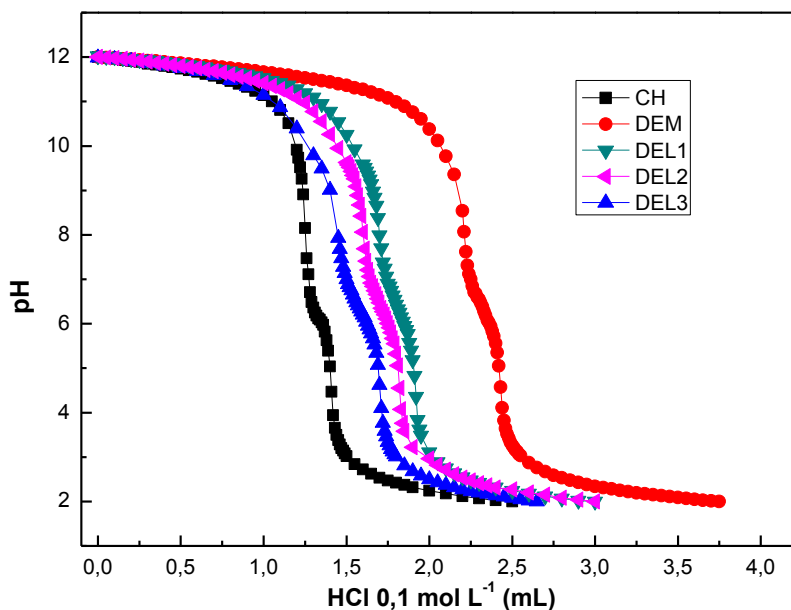
#### 4.5 Avaliação da capacidade de tamponamento dos polímeros

Capacidade de tamponamento corresponde à quantidade de íons  $\text{H}^+$  ou  $\text{OH}^-$  que uma solução tamponante é capaz de neutralizar antes do pH do meio sofrer alteração considerável. Nesse caso, analisou-se a capacidade dos polímeros de tamponar o meio quando pequenas quantidades de ácidos foram adicionadas. Analisando a Figura 22, observa-se claramente que o decréscimo do pH para os derivados contendo DEAE ocorre para maiores volumes de HCl, indicando que estes possuem maior capacidade de tamponamento.

A inserção dos grupos DEAE e DIPEA geram aminas secundárias e terciárias na estrutura da quitosana. As aminas primárias são responsáveis pela formação do complexo com o DNA ou RNA, enquanto as aminas secundárias e terciárias aumentam a capacidade de tamponamento dos polímeros (LU et al., 2008). Outro efeito da adição de aminas secundárias e terciárias à estrutura é a elevação do pKa médio do derivado (GUIBAL, 2005; OLIVEIRA et al., 2013; TIERA et al., 2006). Quando o pH do meio é inferior ao

pKa do polímero, os grupos aminas são protonados ( $-\text{NH}_3^+$ ), formando cargas positivas.

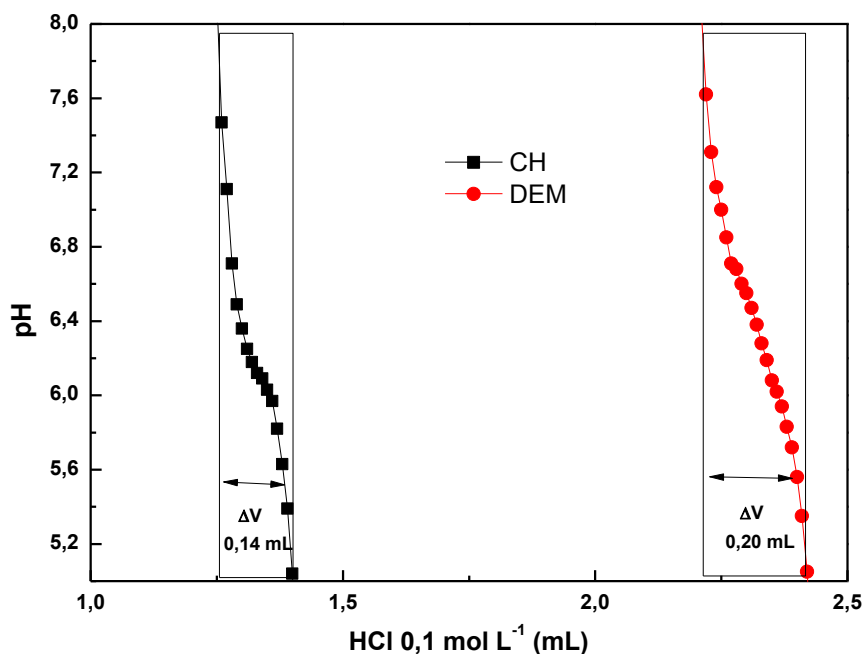
**Figura 22** – Capacidade de tamponamento da CH e dos derivados modificados com DEAE



Fonte: Dados da pesquisa.

Avaliando as curvas de titulação na faixa de pH entre 5,0 e 8,0 da Figura 23, podemos constatar que a capacidade tamponante do DEM é, aproximadamente, 43% maior que a da CH. O volume de ácido tamponado pelo DEM nessa faixa foi de 0,20 mL, enquanto para a CH foi de 0,14 mL.

**Figura 23** – Detalhes das curvas de titulação para avaliação da capacidade tamponante dos polímeros CH e DEM



O volume de ácido tamponado pelo DEM foi 0,06 mL superior ao da CH, cerca de 43% maior capacidade de tamponamento na faixa de pH entre 5,0 e 8,0. Fonte: Dados da pesquisa.

A capacidade de tamponamento fica maior à medida que a massa molar dos polímeros modificados com DEAE aumenta. Quitosanas com altas massas molares possuem cadeias maiores com mais sítios de protonação, o que gera maior densidade de cargas devido ao enovelamento (BEKALE; AGUDELO; TAJMIR-RIABI, 2015). Entre os derivados de quitosana modificados com DEAE avaliados na Figura 22, o DEM possui maior massa molar e maior capacidade de tamponamento.

#### 4.6 Grau de Ionização

O grau de ionização de um polímero expressa em porcentagem a quantidade de cargas presentes ao longo da cadeia polimérica em determinado pH. Nesse caso, corresponde à porcentagem de grupos amina carregados na faixa de pH em que ocorre o início e término da desprotonação.

Os dados de grau de ionização dos polímeros apresentados na Figura 24 mostram que a inserção de grupos DEAE aumenta o grau de ionização em pH mais elevados, principalmente acima de 6,3. Além disso, pode-se notar que

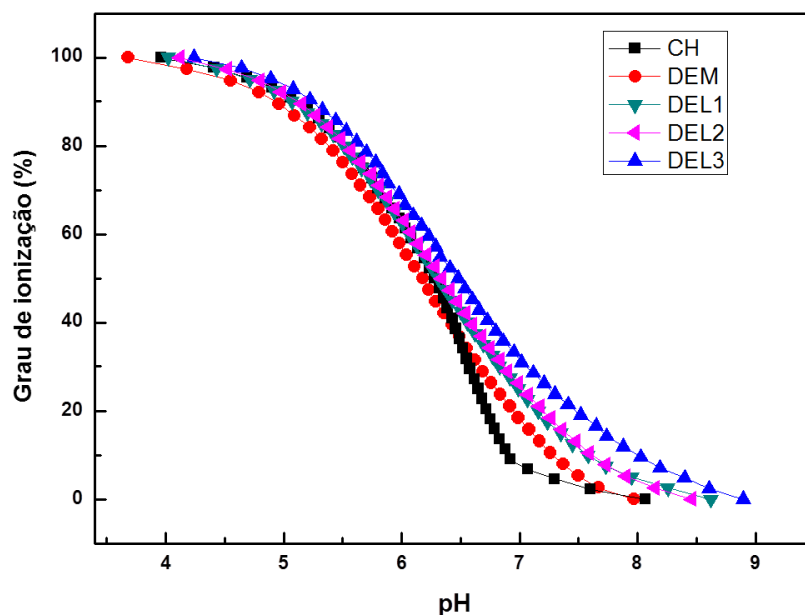
o decréscimo da massa molar afeta também o grau de ionização. O derivado de maior massa molar (DEM) que apresentou maior capacidade de tamponamento exibe menor grau de ionização entre os derivados com DEAE.

No início da titulação, próximo do pH 4, os polímeros de quitosana estão totalmente protonados com 100% de grau de ionização. À medida que se adiciona solução de hidróxido de sódio, os íons  $H^+$  são neutralizados – inicialmente o HCl em excesso na solução e depois os prótons dos grupos amina. A repulsão na cadeia polimérica é reduzida devido à desprotonação dos grupos aminas, a densidade de cargas diminui e possibilita a formação de interações entre as cadeias. A adição de sal na concentração de 150 mM aumenta esse efeito, pois rompe as ligações de hidrogênio fracas, preparando a estrutura conformacional para a formação de uma rede de ligações de hidrogênio maximizada e com estados termodinamicamente mais estáveis (FRANCA et al., 2008; MORROW; PAYNE; SHEN, 2015). A presença de sal resulta em agregados mais ordenados. Além disso, é esperado que ocorra precipitação em graus de ionização mais elevados para quitosanas de maior massa molar (FILION; LAVERTU; BUSCHMANN, 2007).

A maior densidade de cargas no DEM provoca uma leve diminuição no pKa devido a repulsão entre os grupos carregados (WANG et al., 2006), entretanto, o sal presente na solução aumenta fortemente o pKa porque diminui a repulsão através da blindagem eletrostática (SORLIER et al., 2001). Quando se inicia a desprotonação da cadeia polimérica, diminui o grau de ionização e interações intra e intermoleculares começam a se formar. Interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio são estabelecidas e a força iônica corrobora para formação de agregados mais ordenados. Ocorre, então, a precipitação dos polímeros e reduz-se o grau de ionização.

Esses fenômenos podem conferir um menor grau de ionização ao DEM quando comparado aos derivados de menor massa molar DEL1, DEL2 e DEL3. A maior solubilidade dos polímeros de menor massa molar também pode ser explicada pelos maiores valores de grau de ionização em pH mais elevado (Tabela 5).

**Figura 24** – Gráfico do grau de ionização em função do pH para os polímeros CH e derivados de DEAE



Fonte: Dados da pesquisa.

Em pH 7,4 (Tabela 5), todos os derivados tiveram valores de grau de ionização maiores do que a CH (4,1 %), sendo que o DEL3 apresentou o maior valor (21,2 %),

**Tabela 5** – Grau de ionização dos polímeros em pH 6,3 e 7,4 expressos em porcentagens

| Polímeros | Grau de ionização (%) |        |
|-----------|-----------------------|--------|
|           | pH 6,3                | pH 7,4 |
| CH        | 48,9                  | 4,1    |
| DEM       | 44,5                  | 7,8    |
| DEL1      | 50,6                  | 12,4   |
| DEL2      | 51,9                  | 13,4   |
| DEL3      | 56,7                  | 21,2   |

Fonte: Dados da pesquisa.

## 4.7 Estudos dos poliplexos

As nanopartículas foram preparadas em soluções tamponantes de fosfato com pH 6,3 e 7,4, concentração de 50 mM e força iônica de 150 mM. As soluções estoque dos polímeros foram preparadas na concentração de 9,3

mM. As razões N/P variando de 0,5 a 10 foram ajustadas mantendo-se fixa a quantidade de siRNA e variando-se a quantidade dos polímeros. Para as medidas de tamanho e potencial zeta, foram utilizados  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  de siRNA, nos experimentos de eletroforese foram utilizados  $0,6 \text{ }\mu\text{g}$  por poço e nos ensaios de citotoxicidade,  $0,025 \text{ }\mu\text{g}$  por poço. Na transfecção *in vitro*, foram utilizados  $5 \text{ }\mu\text{g}$  de siRNA por poço.

#### 4.7.1 Tamanho dos poliplexos

As medidas de tamanho das nanopartículas foram realizadas em pH 6,3 e 7,4 com razões N/P variando de 0,5 a 10.

Em pH 6,3, com o aumento da razão N/P, todos os derivados formaram nanopartículas com tamanhos inferiores a 200 nm (Figura 25). Com o decréscimo da massa molar, nanopartículas da ordem de 100 nm são obtidas somente para razões N/P maiores. Entretanto, em pH 7,4, independentemente da massa molar, as nanopartículas foram formadas somente para razões N/P maiores que 5,0 (Figura 26).

A força de interação entre siRNA e quitosana é diretamente dependente do pH do sistema. A interação eletrostática é a força dominante na formação das nanopartículas e diminui com o aumento do pH devido ao decréscimo na densidade de cargas (MAO; SUN; KISSEL, 2010). A capacidade da quitosana complexar o material genético aumenta com o decréscimo do pH devido à protonação dos grupos aminas, levando à formação de nanopartículas menores e mais estáveis (KÖPING-HÖGGÅRD et al., 2003).

A massa molar também exerce uma importante influência no tamanho dos poliplexos. Quitosanas com massas molares muito baixas não são capazes de condensar o siRNA para formar nanopartículas devido ao pequeno tamanho das cadeias. Fernandes et al. obtiveram poliplexos grandes e instáveis utilizando quitosana de 2 kDa. A formação de nanopartículas pode ser observada com quitosanas de 25 e 50 kDa (FERNANDES et al., 2012). Isto é possível somente para valores de  $\text{pH} \leq 5,5$ , uma vez que em pH 6,3 a quitosana desacetilada de partida (CH) formou partículas da ordem de micrômetros (Figura 25). Portanto, os resultados das Figura 25 e Figura 26 mostram que a modificação com grupos DEAE e DIPEA exerce um efeito

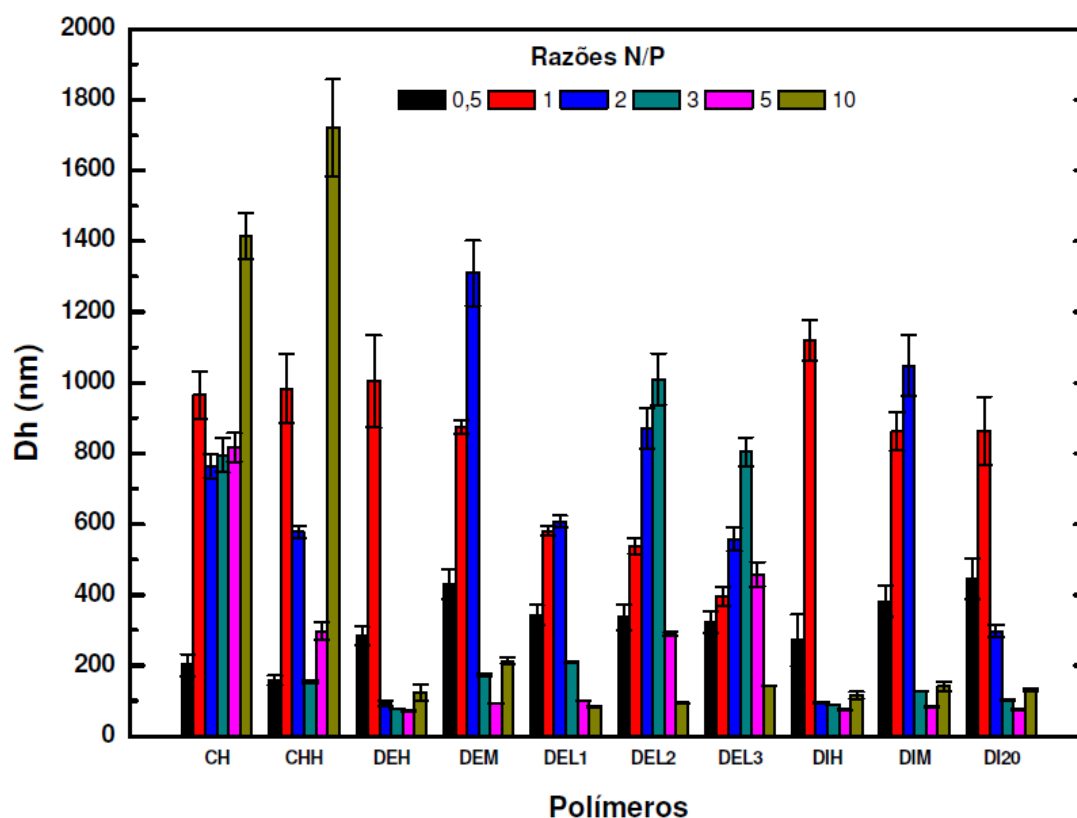
positivo na força de interação e, conseqüentemente, no tamanho das nanopartículas. As diferenças aparecem, sobretudo, quando se comparam os tamanhos das nanopartículas obtidas com as quitosanas de partida CH (129,4 kDa) e CHH (236,7 kDa) com aquelas obtidas com seus derivados DEM (122,5 kDa), DIM (115,8 kDa), DEH (216,7 kDa) e DIH (230,7 kDa), respectivamente. Nas razões N/P 2 e 3, todos os derivados formaram nanopartículas da ordem de 100 nm, enquanto as desacetiladas, nas mesmas razões, formam partículas maiores que 500 nm. Quitosanas com massas molares maiores são mais eficientes na formação de nanopartículas devido a maior densidade de cargas e a maior capacidade de condensar o ácido nucleico. Entretanto, quitosanas com altas massas molares e cadeias muito longas ( $M > 300$  kDa) podem diminuir a eficiência do silenciamento. Embora os protocolos de transfecção sejam variados, a melhor faixa tem sido indicada como variando entre 80 e 300 kDa (RAGELLE; VANDERMEULEN; PRÉAT, 2013).

Outro parâmetro que interfere na formação de nanopartículas e que depende da massa molar é a razão N/P utilizada. O termo refere-se à razão entre o número de grupos aminas (N) da quitosana e o número de grupos fosfatos (P) do DNA ou RNA.

O aumento da razão N/P favorece uma melhor complexação do siRNA, resultando em partículas menores. Kong et al. trabalhando com quitosanas de 2 a 80 kDa, obtiveram nanopartículas na faixa de 100 nm utilizando razões N/P de 50 a 100 (KONG et al., 2012), embora nanopartículas de 200 nm tenham sido obtidas com razões de 5 a 10 (LIU et al., 2007). Nanopartículas formadas com elevadas razões N/P mostraram aumento de toxicidade, pois o excesso de polímero pode interagir com componentes da membrana ou interferir nos processos celulares e, assim, reduzir a viabilidade celular (LUO et al., 2012). Nanopartículas com tamanhos inferiores a 200 nm foram obtidas em pH 5,0, utilizando-se razões N/P entre 4 e 8 com quitosanas na faixa de 40 a 140 kDa. As nanos foram utilizadas para avaliar níveis de transfecção com células H1299 no silenciamento do gene da luciferase (HOLZERNY et al., 2012). Podemos dizer que os valores ideais de razão N/P para formar nanopartículas variam de acordo com a massa molar do polímero utilizado (ROMØREN et al., 2003). Portanto, comparativamente, os derivados aqui preparados proporcionam duas vantagens adicionais às quitosanas convencionais. A

primeira diz respeito à preparação das partículas em pH mais elevado (pH 6.3) e a segunda é a redução no excesso do polímero, uma vez que os derivados de maior massa molar (DEH e DIH) formaram partículas da ordem de 100 nm na razão N/P 2. Além disso, os mesmos derivados, incluindo-se o derivado DEM (122,5 kDa), formam partículas de mesma dimensão em pH 7.4 na N/P 10. Para as quitosanas desacetiladas sem modificação (CH, CHH) houve formação de nanopartículas somente para a CHH em pH 6,3 na razão N/P 3. Em pH 7,4, as quitosanas desacetiladas são insolúveis e, portanto, não foi possível a preparação de complexos.

**Figura 25** – Valores de diâmetro hidrodinâmico para os políplexos formados pelos polímeros com o siRNA SSB em pH 6,3

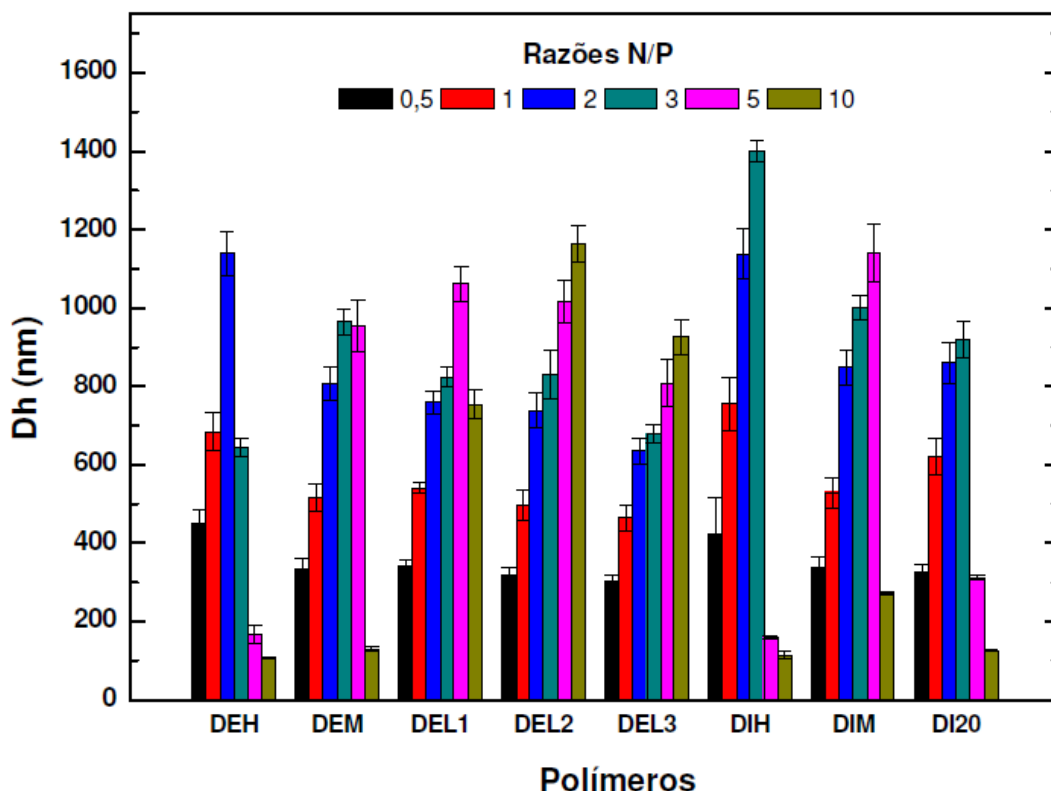


Fonte: Dados da pesquisa.

Em pH 6,3, os derivados DEL1 (70 kDa), DEL2 (45,9 kDa) e DEL3 (25,3 kDa), resultantes da degradação de DEM, formaram nanopartículas somente para razões N/P maiores que 5,0, o que se deve ao decréscimo na massa

molar. Em pH 7,4 esses mesmos derivados formaram poliplexos maiores que 500 nm na faixa de N/P estudada (Figura 26).

**Figura 26** – Valores de diâmetro hidrodinâmico para os poliplexos formados pelos polímeros com o siRNA SSB em pH 7,4



Fonte: Dados da pesquisa.

Portanto, ambos os parâmetros, pH e massa molar afetam o tamanho das nanos. Em pH levemente ácido (pH 6,3) o grau de ionização é aproximadamente de 50% e move a interação com o siRNA. As cargas positivas irão contribuir para a formação e estabilização das nanopartículas através da atração eletrostática de cargas opostas.

Os derivados com maiores massas molares possibilitam a formação de nanopartículas em razões menores, o que se deve a maior capacidade de condensação do siRNA. Quando há excesso de polímero, os derivados de massas molares maiores, formam partículas da ordem de 100 nm. Para os derivados com  $M < 100$  kDa, as interações são mais fracas e são necessárias maiores razões N/P, ou seja, maior quantidade de polímero para a formação de nanopartículas.

#### 4.7.2 Potencial Zeta

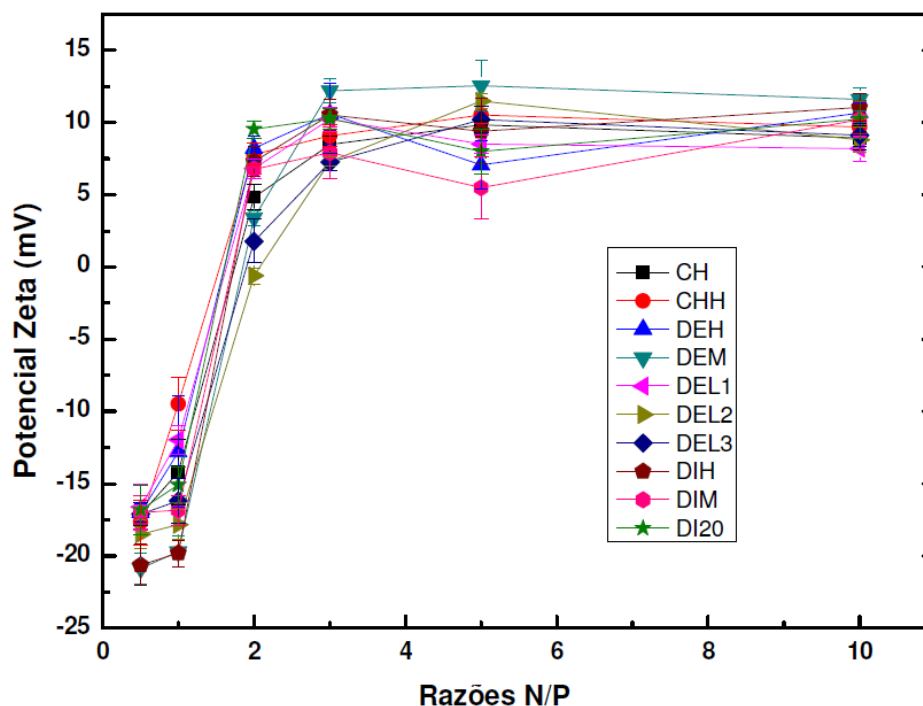
O potencial zeta das nanopartículas indica o valor da carga superficial dos poliplexos. Esse parâmetro determina a estabilidade coloidal dos poliplexos em suspensão aquosa e desempenha um papel crucial na viabilidade, na captação celular e na eficiência de transfecção dos poliplexos (NIMESH et al., 2010). O potencial zeta é altamente dependente de parâmetros estruturais como a massa molar, o grau de desacetilação, a razão N/P e o pH (LIU et al., 2007).

Em pH mais baixo, o valor do potencial zeta dos poliplexos é maior em consequência da protonação dos grupos aminas (AGIRRE et al., 2014). O aumento da razão N/P também gera valores maiores de potencial zeta. A carga superficial positiva dos poliplexos irá afetar a captação celular, pois proporciona uma interação mais eficiente com a membrana celular (FERNANDES et al., 2012; YUE et al., 2011). Por outro lado, valores neutros de potencial zeta facilitam a agregação das nanopartículas devido à redução na repulsão eletrostática entre as partículas e, geralmente, diminuem a eficiência de transfecção (NIMESH et al., 2010).

Na Figura 27 são apresentadas as medidas de potencial zeta em pH 6,3 em função da razão N/P para as diferentes quitosanas e derivados. A natureza polianiónica do siRNA é observada nas razões N/P 0,5 e 1 onde os valores de potencial zeta permanecem negativos para todos os polímeros avaliados, indicando que a “condensação” com o siRNA é parcial. Os valores tornam-se positivos a partir da razão N/P 2 e se mantêm próximos a +12 mV para razões N/P maiores que 3. Esse comportamento indica que, para razões maiores (N/P 5 e 10), parte das cadeias permanece em solução ou fracamente associadas às nanopartículas (OLIVEIRA et al., 2013).

Os valores de zeta correlacionam-se bem com as medidas de tamanho e mostraram que, em pH 6,3, a maioria dos derivados de massas maiores (DEM, DIM, DEH e DIH) forma partículas da ordem de 100 nm para razões N/P  $\geq$  2-3, ou seja, acima destas razões os valores de zeta atingem + 10 mV e favorecem a melhor compactação das partículas.

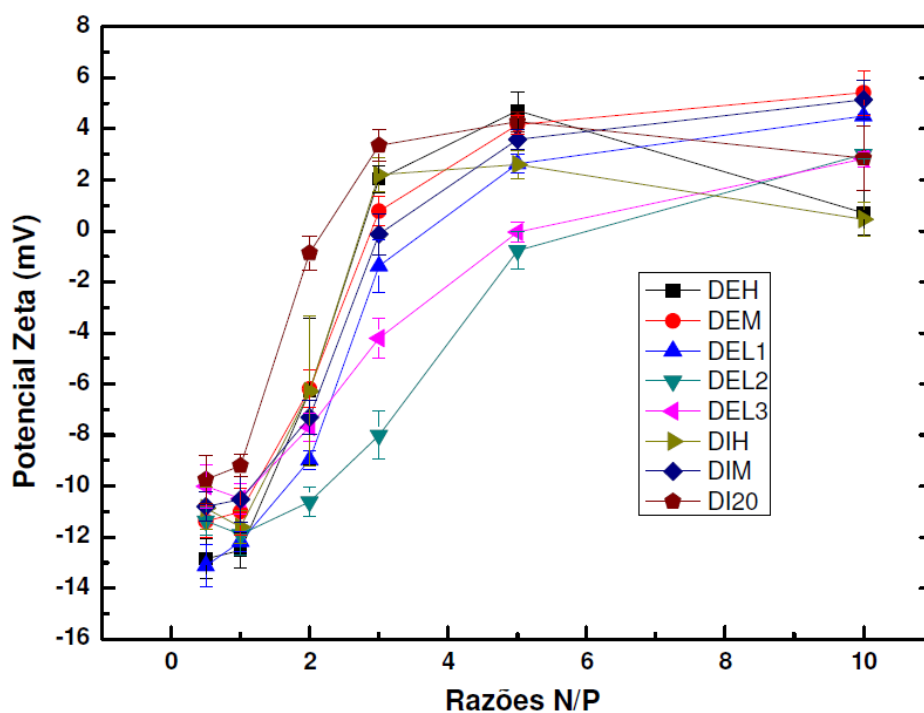
**Figura 27** – Gráfico com os valores de potencial zeta determinados para as razões N/P 0,5, 1, 2, 3, 5 e 10 em pH 6,3



Fonte: Dados da pesquisa.

Em pH 7,4, os complexos assumem potenciais zeta positivos a partir da razão N/P 5, exceto os derivados de menores massas (DEL2 e DEL3) que apresentaram potenciais ligeiramente negativos (Figura 28). Na razão N/P 10, todos os complexos possuem valores positivos, embora menores que os valores obtidos em pH 6,3. Esse comportamento se deve ao menor grau de ionização em pH 7,4, ou seja, a desprotonação dos grupos aminas resulta numa interação mais fraca e potenciais zeta menores, o que leva à formação de partículas com tamanhos maiores que 500 nm.

**Figura 28** – Gráfico com os valores de potencial zeta determinados para as razões N/P 0,5, 1, 2, 3, 5 e 10 em pH 7,4



Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de potencial zeta e tamanho dos políplexos em pH 6,3 e 7,4 estão nas Tabela 6 e 7.

Analisando os resultados de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta, observa-se que há uma razão N/P ideal para a formação da nanopartícula (ISHII; OKAHATA; SATO, 2001; ZHAO et al., 2006). Em pH 6,3, na razão N/P 2, a CHH possui diâmetro hidrodinâmico (Dh) de 578 nm, enquanto na N/P 3, o valor é de 154 nm. Nota-se, também, que, praticamente, não há diferenças significativas entre os potenciais zeta das partículas preparadas nas razões N/P 3, 5 e 10. Logo, conclui-se que a razão N/P ideal para esse polímero é a 3. Para o DEM, por exemplo, em pH 6,3, a N/P ideal é a 5 com Dh igual a 93 nm e potencial zeta de +12,5 mV.

**Tabela 6** – Valores de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta para os políplexos formados com os polímeros em pH 6,3

| N/P        | CH        |             | CHH        |             | DEH        |             | DEM       |             | DEL1      |             |
|------------|-----------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|            | Dh (nm)   | Zeta (mV)   | Dh (nm)    | Zeta (mV)   | Dh (nm)    | Zeta (mV)   | Dh (nm)   | Zeta (mV)   | Dh (nm)   | Zeta (mV)   |
| <b>0,5</b> | 202(±30)  | -17,1(±2,1) | 159(±14)   | -17,7(±1,5) | 283(±26)   | -17,0(±0,6) | 430(±43)  | -20,9(±1,1) | 343(±28)  | -16,6(±1,6) |
| <b>1</b>   | 965(±68)  | -14,2(±2,3) | 983(±98)   | -9,5(±1,8)  | 1005(±130) | -12,8(±3,9) | 874(±20)  | -19,7(±1,1) | 581(±14)  | -12(±1,0)   |
| <b>2</b>   | 763(±34)  | 4,8(±0,8)   | 578(±17)   | 7,8(±0,8)   | 94(±7,3)   | 8,2(±0,8)   | 1310(±93) | 3,4(±0,5)   | 608(±16)  | 6,8(±0,7)   |
| <b>3</b>   | 795(±49)  | 8,5(±0,6)   | 154(±04)   | 9,1(±0,8)   | 78(±1,3)   | 10,6(±2,1)  | 174(±4,8) | 12,2(±0,8)  | 209(±2,0) | 10,2(±0,8)  |
| <b>5</b>   | 817(±40)  | 9,8(±0,3)   | 297(±25)   | 10,5(±0,6)  | 71(±2,6)   | 7,1(±1,6)   | 93(±0,9)  | 12,5(±1,7)  | 102(±0,6) | 8,5(±0,6)   |
| <b>10</b>  | 1414(±65) | 8,9(±0,8)   | 1720(±137) | 9,7(±0,5)   | 124(±22)   | 10,7(±0,7)  | 214(±7,6) | 11,6(±0,8)  | 85(±2,3)  | 8,2(±0,9)   |
| N/P        | DEL2      |             | DEL3       |             | DIH        |             | DIM       |             | DI20      |             |
|            | Dh (nm)   | Zeta (mV)   | Dh (nm)    | Zeta (mV)   | Dh (nm)    | Zeta (mV)   | Dh (nm)   | Zeta (mV)   | Dh (nm)   | Zeta (mV)   |
| <b>0,5</b> | 336(±36)  | -18,5(±1,0) | 323(±31)   | -17,1(±0,7) | 272(±72)   | -20,6(±1,4) | 381(±44)  | -17,0(±1,1) | 445(±56)  | -16,8(±1,7) |
| <b>1</b>   | 538(±21)  | -17,8(±1,0) | 396(±26)   | -16,2(±1,5) | 1120(±57)  | -19,8(±0,9) | 862(±54)  | -16,8(±1,0) | 863(±97)  | -15,1(±1,2) |
| <b>2</b>   | 871(±59)  | -0,6(±0,6)  | 558(±33)   | 1,8(±1,5)   | 95(±1,8)   | 7,3(±1,0)   | 1048(±86) | 6,8(±0,4)   | 298(±17)  | 9,5(±0,6)   |
| <b>3</b>   | 1009(±74) | 7,3(±0,3)   | 805(±41)   | 7,3(±0,6)   | 90(±0,2)   | 10,5(±1,1)  | 129(±0,6) | 7,9(±1,8)   | 102(±2,1) | 10,3(±0,7)  |
| <b>5</b>   | 290(±4,3) | 11,5(±0,5)  | 457(±35)   | 10,2(±0,9)  | 76(±1,2)   | 9,4(±2,3)   | 84(±2,2)  | 5,5(±2,2)   | 76(±1,5)  | 8,0(±1,6)   |
| <b>10</b>  | 94(±2,1)  | 8,8(±0,8)   | 143(±1,5)  | 9,1(±0,8)   | 116(±9,8)  | 11,0(±0,9)  | 141(±13)  | 10,2(±1,2)  | 132(±2,5) | 10,2(±1,3)  |

Fonte: Dados da pesquisa.

Não foram realizadas medições para os polímeros CH e CHH em pH 7,4, pois não são solúveis. De forma geral, os valores de potencial zeta diminuem com o aumento do pH. Principalmente nas razões menores (0,5, 1, 2 e 3) os valores tornam-se negativos para a maioria dos polímeros.

A massa molar dos derivados influencia nos valores de potencial zeta, pois o DEH apresenta valor positivo a partir da N/P 3, enquanto o DEL3 apresenta valor positivo somente na razão 10.

**Tabela 7** – Valores de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta para os políplexos formados com os polímeros em pH 7,4

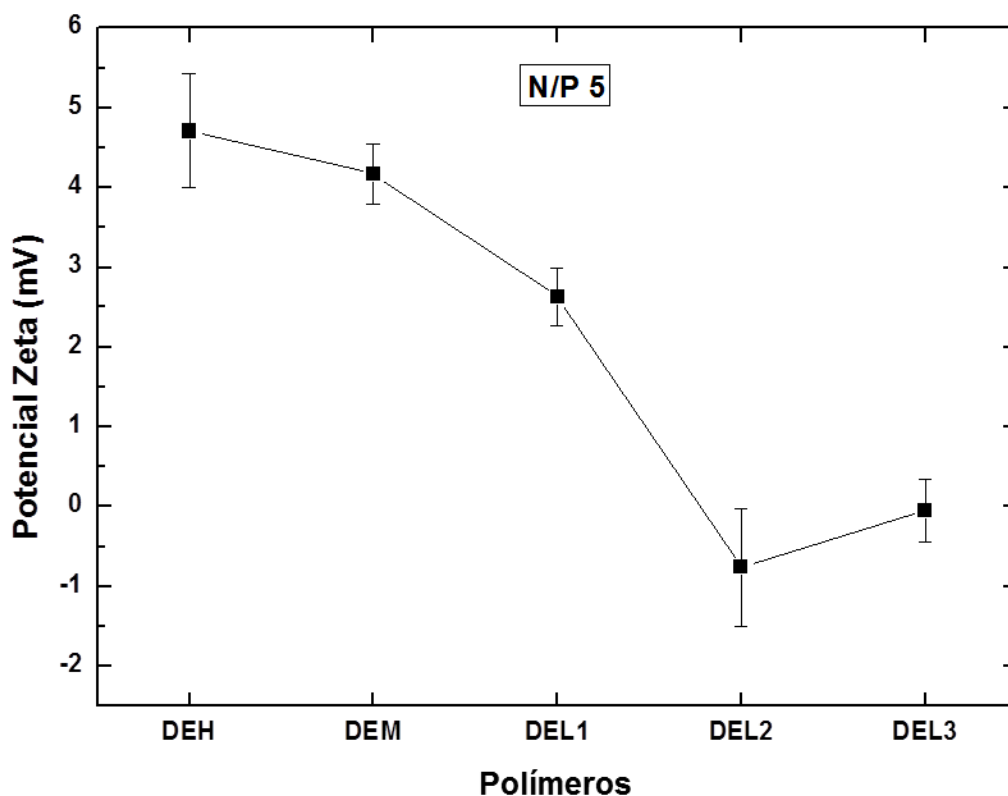
| N/P        | DEH       |             | DEM       |             | DEL1      |             | DEL2      |             |
|------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
|            | Dh (nm)   | Zeta (mV)   | Dh (nm)   | Zeta (mV)   | Dh (nm)   | Zeta (mV)   | Dh (nm)   | Zeta (mV)   |
| <b>0,5</b> | 450(±33)  | -12,9(±0,8) | 335(±25)  | -11,4(±0,6) | 344(±14)  | -13,1(±0,8) | 316(±23)  | -11,4(±0,6) |
| <b>1</b>   | 684(±49)  | -12,5(±0,7) | 516(±34)  | -11,0(±0,9) | 541(±12)  | -12,2(±0,4) | 497(±38)  | -11,9(±0,8) |
| <b>2</b>   | 1140(±58) | -6,3(±2,9)  | 807(±43)  | -6,2(±0,7)  | 759(±29)  | -9,0(±0,4)  | 739(±45)  | -10,6(±0,6) |
| <b>3</b>   | 644(±24)  | 2,0(±0,5)   | 965(±33)  | 0,8(±0,6)   | 823(±25)  | -1,4(±1,0)  | 830(±64)  | -8,0(±1,0)  |
| <b>5</b>   | 166(±23)  | 4,7(±0,7)   | 954(±67)  | 4,2(±0,4)   | 1061(±43) | 2,6(±0,4)   | 1017(±55) | -0,8(±0,7)  |
| <b>10</b>  | 108(±2,2) | 0,7(±0,9)   | 129(±5,0) | 5,4(±0,9)   | 754(±37)  | 4,5(±0,1)   | 1165(±46) | 3,0(±0,2)   |

| N/P        | DEL3       |              | DIH        |              | DIM        |              | DI20       |              |
|------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
|            | Dh<br>(nm) | Zeta<br>(mV) | Dh<br>(nm) | Zeta<br>(mV) | Dh<br>(nm) | Zeta<br>(mV) | Dh<br>(nm) | Zeta<br>(mV) |
| <b>0,5</b> | 303(±13)   | -10,0(±0,8)  | 423(±95)   | -10,9(±0,8)  | 337(±27)   | -10,8(±0,6)  | 327(±17)   | -9,8(±0,9)   |
| <b>1</b>   | 464(±32)   | -10,5(±0,6)  | 756(±68)   | -11,6(±0,7)  | 530(±39)   | -10,5(±0,9)  | 620(±47)   | -9,2(±0,4)   |
| <b>2</b>   | 636(±34)   | -7,7(±0,6)   | 1139(±63)  | -6,3(±2,9)   | 848(±44)   | -7,3(±0,7)   | 860(±52)   | -0,9(±0,7)   |
| <b>3</b>   | 679(±22)   | -4,2(±0,8)   | 1140(±27)  | 2,2(±0,7)    | 1001(±32)  | -0,1(±0,8)   | 918(±46)   | 3,3(±0,6)    |
| <b>5</b>   | 908(±60)   | 0,0(±0,4)    | 159(±4,8)  | 2,6(±0,6)    | 1140(±74)  | 3,6(±0,4)    | 312(±4,4)  | 4,3(±0,4)    |
| <b>10</b>  | 926(±44)   | 2,8(±0,3)    | 115(±10)   | 0,5(±0,7)    | 272(±2,3)  | 5,1(±0,8)    | 125(±2,1)  | 2,9(±1,3)    |

Fonte: Dados da pesquisa.

Comparando os resultados de potencial zeta e tamanho obtidos pelos polímeros derivados modificados com DEAE e a quitosana desacetilada de partida (CH) numa mesma razão N/P e em mesmo pH (Figura 29 e Figura 30), ficam evidentes os efeitos da substituição com DEAE e da massa molar. Os valores de potencial zeta ficam menores à medida que a massa molar diminui (Figura 29). Isso se deve a menor densidade de cargas dos polímeros de massa molar mais baixa.

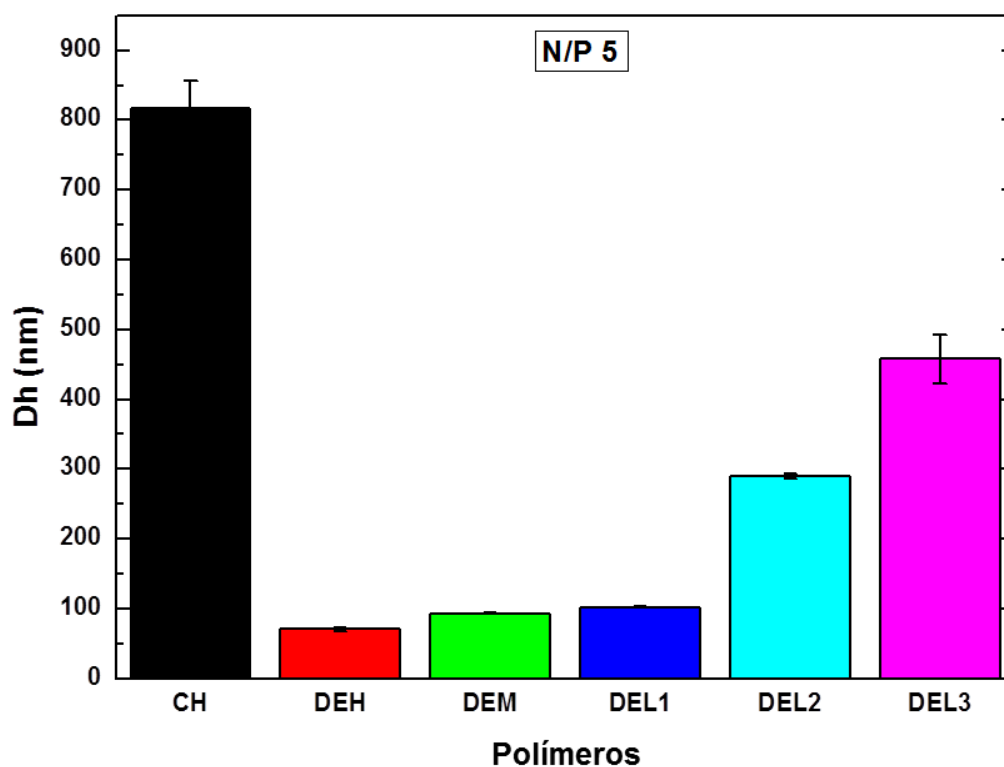
**Figura 29** – Valores de potencial zeta para os políplexos formados com DEH, DEM, DEL1, DEL2, DEL3 e siRNA SSB em pH 7,4 e razão N/P 5



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 30, observou-se que a CH apresentou tamanho da ordem de 800 nm, enquanto os derivados modificados com DEAE apresentaram tamanhos variando entre 70 nm e 490 nm. Entre os derivados modificados com DEAE, observa-se o aumento de tamanho da nanopartícula à medida que a massa molar diminui.

**Figura 30** – Valores de diâmetro hidrodinâmico para os políplexos formados com CH, DEH, DEM, DEL1, DEL2, DEL3 e siRNA SSB em pH 6,3 e razão N/P 5



Fonte: Dados da pesquisa.

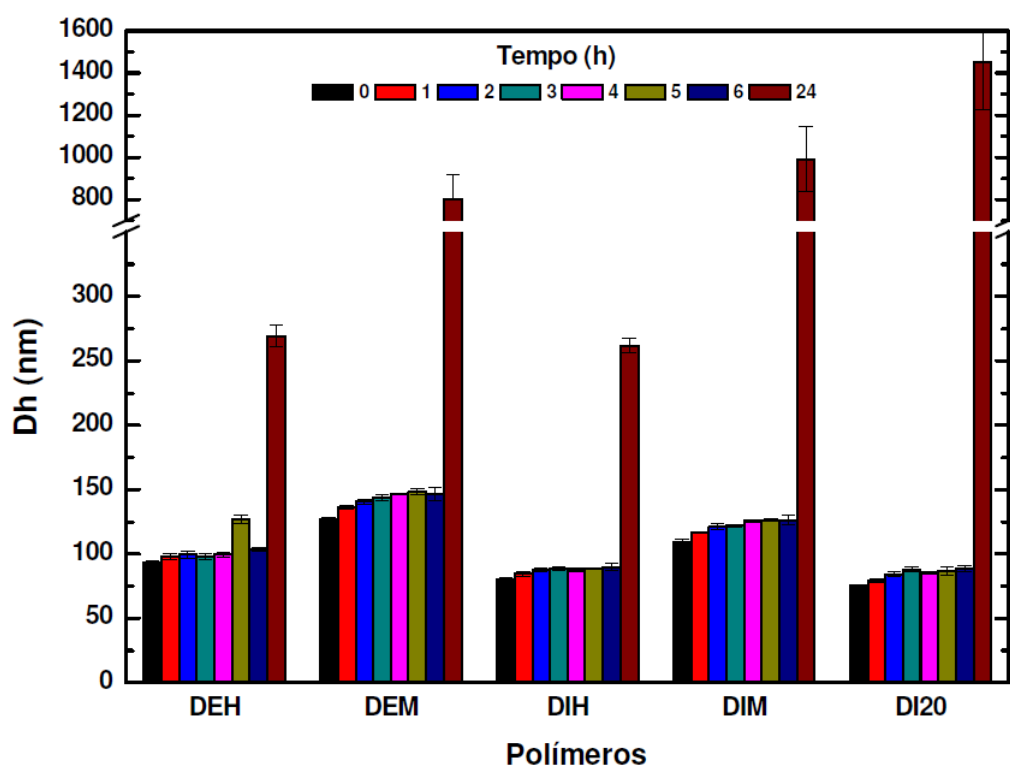
#### 4.7.3 Estabilidade das nanopartículas em função do tempo

A estabilidade das nanopartículas foi avaliada em função do tempo para ambos os valores de pH 6,3 e 7,4 por um período de 24 h. Em pH 6,3, a estabilidade foi analisada na razão N/P 3 para os polímeros DEH, DEM, DIH, DIM e DI20. Todos se mantiveram estáveis, com tamanhos menores que 100-150 nm durante o período de 6 horas (Figura 31). Os tamanhos dos políplexos formados pelos polímeros de maior massa molar (DEH e DIH) mantiveram-se relativamente estáveis após 24 h. Os demais polímeros testados (DEM, DIM e

DI20) tiveram aumento considerável de tamanho dos poliplexos após 24h. O aumento deve-se, provavelmente, à agregação das nanopartículas.

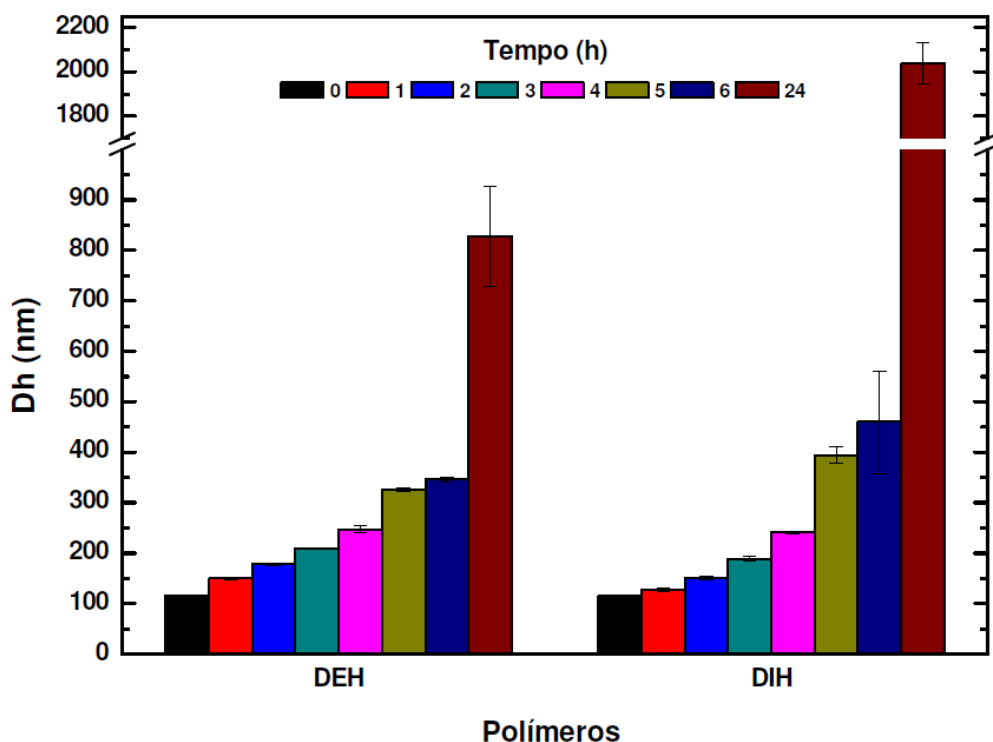
Em pH 7,4, na razão N/P 5 foram avaliados somente os polímeros DEH e DIH. Na Figura 32, observa-se que o DEH e DIH apresentaram leve aumento de tamanho durante as 6 horas iniciais, permanecendo na faixa dos 300 nm. Após 24 h, o poliplexo formado pelo DEH e siRNA alcançou a faixa dos 800 nm, enquanto o poliplexo formado pelo DIH chegou à 2000 nm.

**Figura 31** – Gráfico de avaliação da estabilidade das nanopartículas formadas pelos polímeros com siRNA SSB em pH 6,3, na razão N/P 3 em função do tempo



Fonte: Dados da pesquisa.

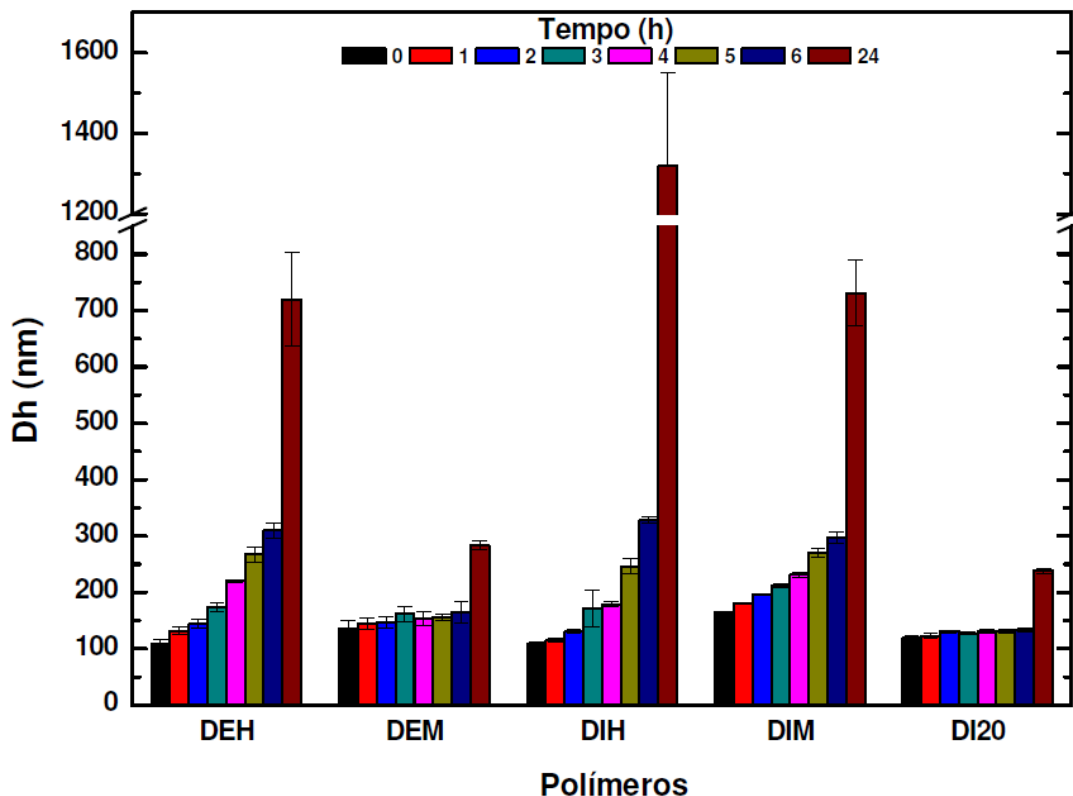
**Figura 32** – Gráfico de avaliação da estabilidade das nanopartículas formadas pelos polímeros com siRNA SSB em pH 7,4, na razão N/P 5 em função do tempo



Fonte: Dados da pesquisa.

Na razão N/P 10 foram avaliados os polímeros DEH, DEM, DIH, DIM e DI20. Na Figura 33, observa-se que as nanopartículas formadas pelos polímeros DEM e DI20 mantiveram-se estáveis com tamanho inferior a 200 nm nas primeiras 6 h e, após 24 h, os tamanhos ainda se mantiveram inferiores a 300 nm.

**Figura 33** – Gráfico de avaliação da estabilidade das nanopartículas formadas pelos polímeros com o siRNA SSB em pH 7,4, na razão N/P 10 em função do tempo



Fonte: Dados da pesquisa.

Os poliplexos formados pelos polímeros DEH, DIH e DIM mantiveram-se na faixa de 100-300 nm nas 6 primeiras horas. Após 24 horas, os poliplexos apresentaram aumento de tamanho considerável. Em pH 7,4, os derivados de maior massa molar (DEH e DIH) mostraram instabilidade na formação dos poliplexos após 24 h. Provavelmente, a massa molar maior desses polímeros facilite o entrelaçamento das cadeias e a agregação das partículas, contribuindo para o aumento de tamanho. Em contrapartida, os polímeros de média massa molar (DEM e DI20) apresentaram melhor estabilidade no período de 24 h.

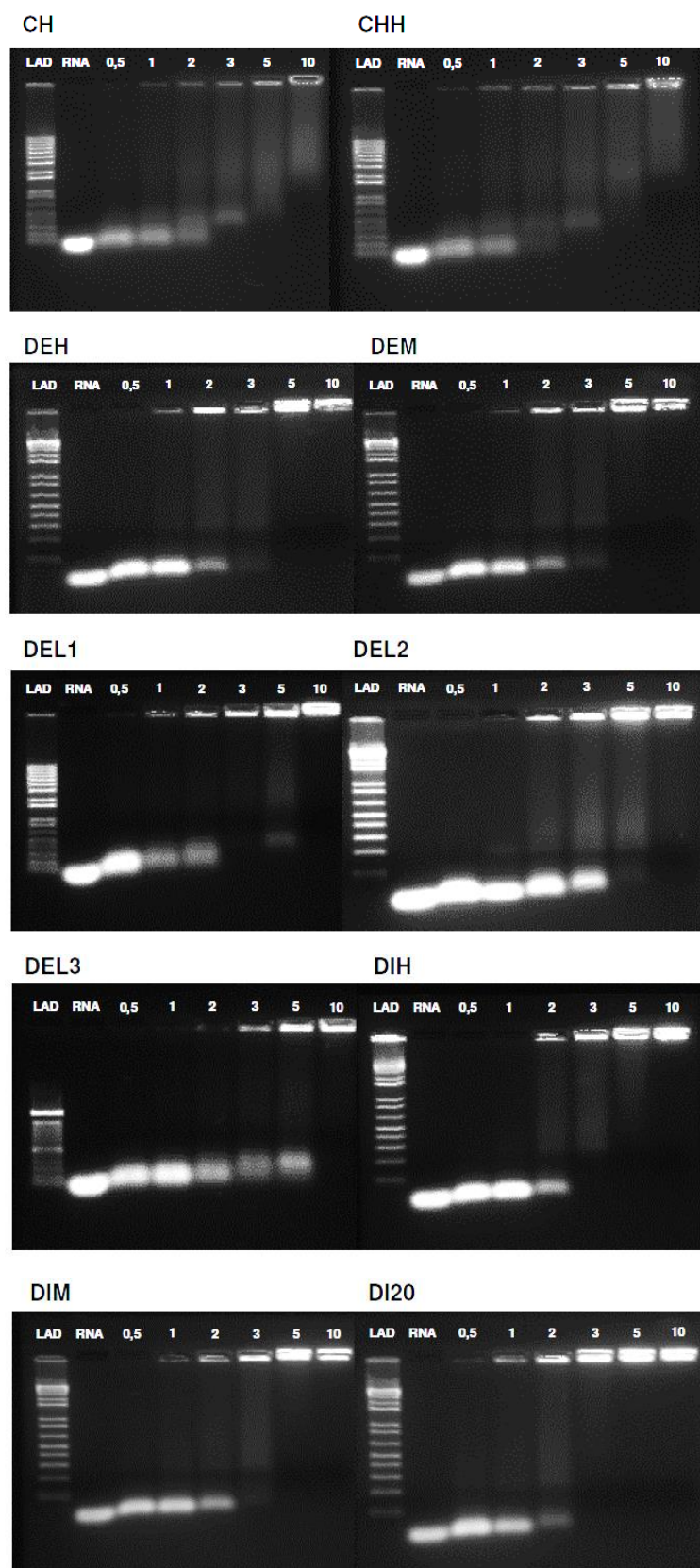
#### 4.7.4 Eletroforese

A interação entre os polímeros e o siRNA foi avaliada em gel de agarose em pH 6,3 e 7,4, sendo os resultados apresentados nas Figura 34 e 35.

Em pH 6,3, os poliplexos formados com a CH e CHH liberaram o RNA para todas as razões N/P estudadas (Figura 34). Entretanto, a análise dos poliplexos formados pelos polímeros DEH, DEM, DEL1, DEL2 e DEL3, mostraram que as interações desses derivados com o RNA são mais fortes, mas, dependentes tanto da razão N/P, quanto da massa molar. As nanopartículas preparadas com os derivados de maior massa molar (DEH, DEM, DIH e DIM e DI20) retêm praticamente todo o RNA a partir da razão N/P 3, enquanto os polímeros DEL1, DEL2 e DL3, liberam parcialmente o RNA nessa razão e retêm completamente somente na razão N/P 10 (Figura 34). O grau de substituição para os derivados DEH, DEM, DEL1, DEL2 e DEL3 é o mesmo 14,8 % (Tabela 4), assim, podemos concluir que a massa molar é responsável pelos diferentes resultados de interação e liberação do siRNA observados na eletroforese. Os polímeros CH e CHH liberaram o RNA em todas as razões N/P estudadas, o que confirma que a substituição com grupos DEAE aumenta a força de interação entre os polímeros e o RNA. Observa-se ainda que, para os derivados substituídos com DIPEA (DIH, DIM e DI20), o aumento do grau de substituição reforça a interação com o siRNA.

Embora o polímero DIH (230,7 kDa) tenha maior massa molar que DIM (115,8 kDa), os graus de substituição são 11,2% e 14,3%, respectivamente. Em consequência disso, ambos não liberaram o RNA a partir da razão N/P 5, indicando que um pequeno aumento no grau de substituição pode, em princípio, compensar uma menor massa molar. Além disso, o derivado DI20 (125,6 kDa) que possui praticamente a mesma massa molar do DIM, não libera o RNA já a partir da razão N/P 3. Esse resultado confirma o efeito da maior substituição com DIPEA (19,3% no DI20), aumentando a força de interação. Isso pode ser explicado pelo maior potencial zeta deste polímero em relação ao DIM (Tabela 6).

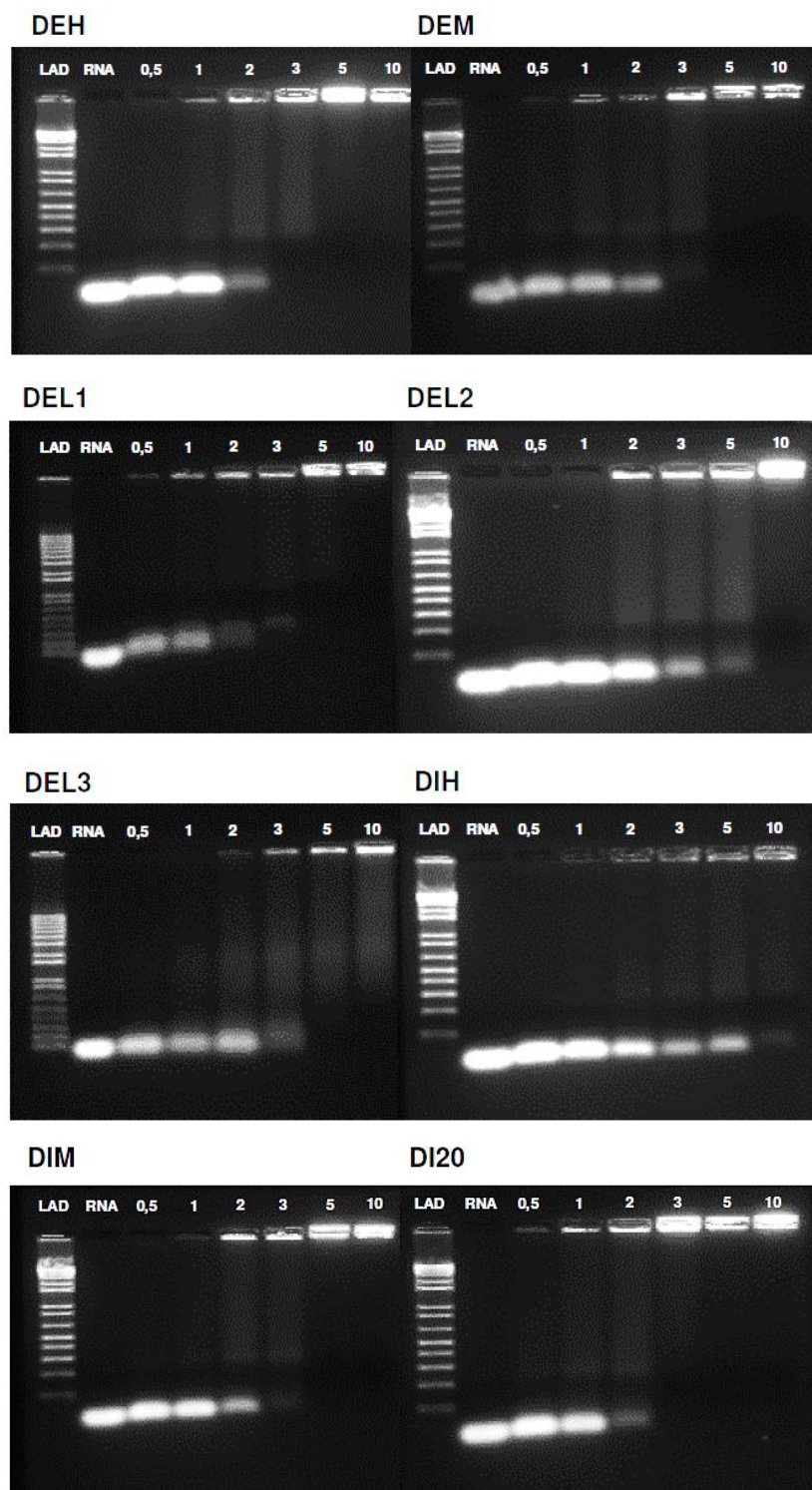
**Figura 34** – Imagens de eletroforeses obtidas dos poliplexos com siRNA em pH 6,3



As razões N/P estão indicadas acima de cada poço. LAD = Ladder; RNA = siRNA SSB.

Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 35** – Imagens de eletroforeses obtidas dos poliplexos com siRNA em pH 7,4



As razões N/P estão indicadas acima de cada poço. LAD = Ladder; RNA = siRNA SSB.

Fonte: Dados da pesquisa.

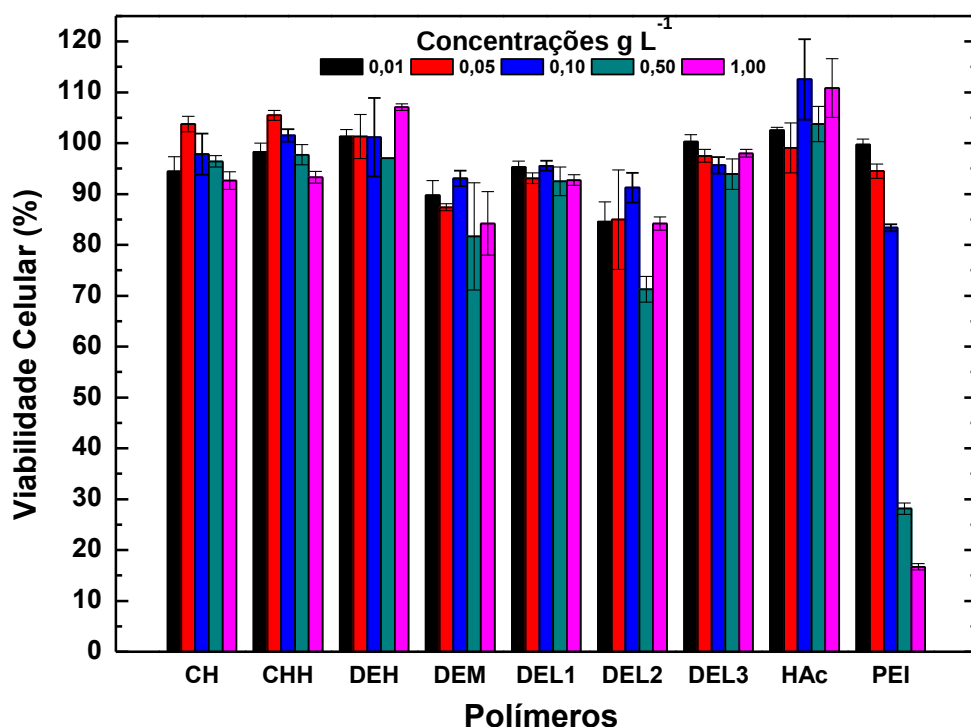
As eletroforeses dos poliplexos preparados em pH 7,4 tiveram praticamente o mesmo comportamento das eletroforeses realizadas em pH 6,3.

As partículas com DEH e DEM retiveram o RNA a partir da razão N/P 5. Os polímeros DEL1 e DEL2 deixaram de liberá-lo a partir da razão N/P 10 e o DEL3 liberou o RNA em todas as razões avaliadas. O polímero DIH deixou de liberar o RNA na razão 10, o polímero DIM deixou de liberar o RNA na razão 5 e o DI20 deixou de liberar na razão 3 (Figura 35).

#### 4.7.5 Citotoxicidade dos polímeros e dos políplexos

A citotoxicidade dos polímeros e dos políplexos foi avaliada em função da viabilidade celular em ensaios realizados com células HeLa e os resultados foram expressos em porcentagem. As células não tratadas com polímeros e políplexos foram utilizadas como controle para o cálculo.

**Figura 36** – Ensaio de viabilidade celular realizado com quitosana e derivados modificados com DEAE, usando células HeLa e MTS

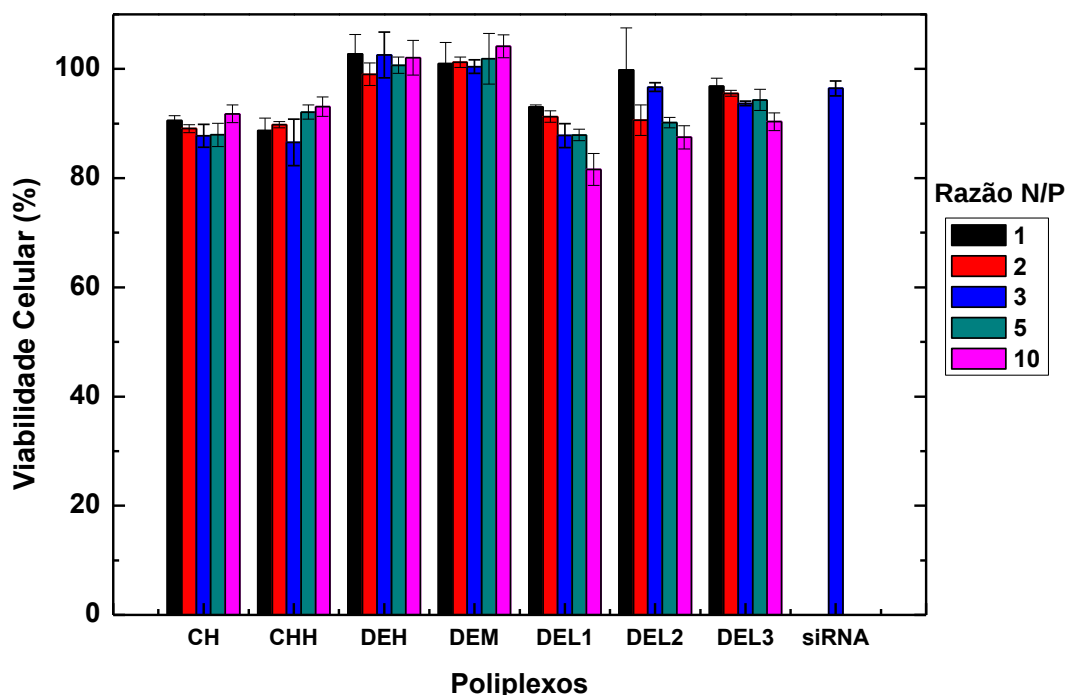


O polímero PEI foi utilizado como controle positivo e o ácido acético (HAc) como controle negativo. A absorvância foi medida em 490 nm e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

Fonte: Dados da pesquisa

Os polímeros de quitosana derivados com DEAE tiveram bons níveis de viabilidade celular com a maioria dos valores variando entre 90% e 100% para as diferentes concentrações avaliadas (Figura 36). Os resultados dos ensaios realizados com o ácido acético demonstraram não haver interferência na citotoxicidade dos polímeros. O polímero polietilenoimina (PEI) apresentou alta toxicidade nas concentrações  $0,50 \text{ g L}^{-1}$  ( $28,1\% \pm 1,12$  de viabilidade celular) e  $1,00 \text{ g L}^{-1}$  (apenas  $16,7\% \pm 0,59$  de viabilidade celular). A alta capacidade de tamponamento do PEI que influencia no efeito da esponja de prótons e promove eficiente transfecção, aqui demonstra a sua desvantagem com a elevada toxicidade (YU et al., 2011).

**Figura 37** – Ensaio de viabilidade celular realizado com os poliplexos formados por quitosana e derivados modificados com DEAE e siRNA



O ensaio foi realizado com células HeLa e MTS. A absorvância foi medida em 490 nm e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

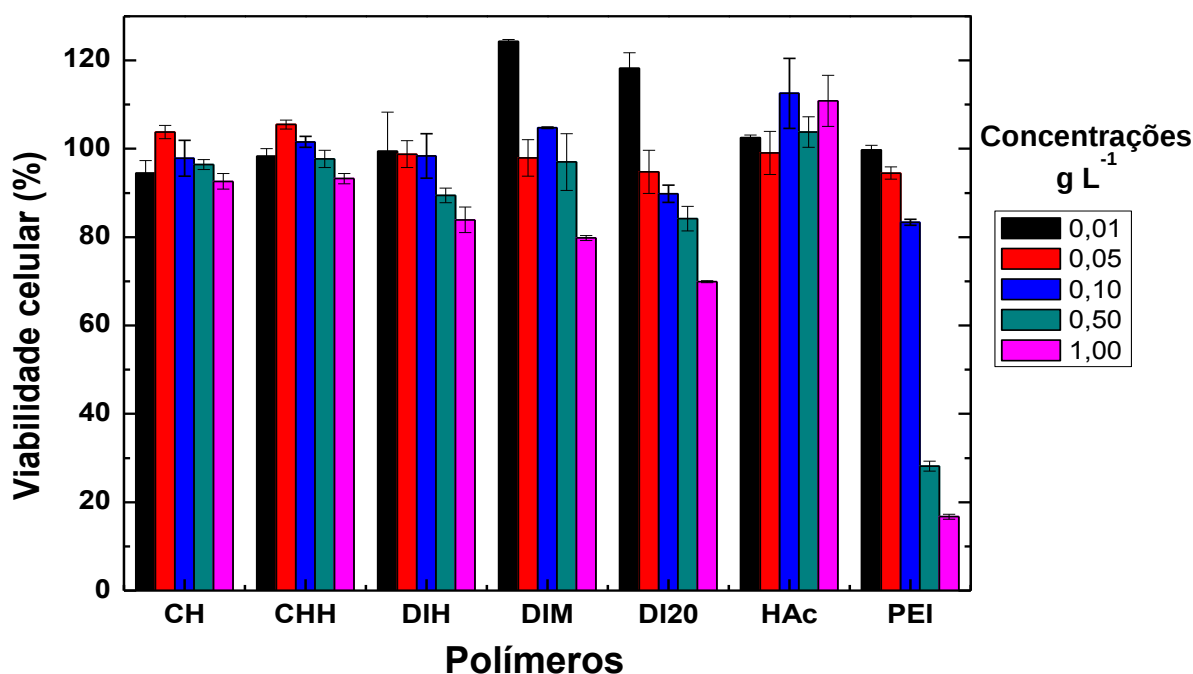
Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados demonstrados no gráfico da Figura 37 confirmaram bons valores de viabilidade celular para os poliplexos formados com os derivados de quitosana com DEAE. Os derivados apresentaram viabilidade celular acima

dos 80%, sendo que DEH e DEM tiveram valores de viabilidade celular próximos a 100% para todas as razões.

Os polímeros derivados de quitosana modificados com DIPEA apresentaram bons níveis de viabilidade celular com valores variando entre 90% e 100% na maioria das concentrações (Figura 38).

**Figura 38** – Ensaio de viabilidade celular realizado com quitosana e derivados modificados com DIPEA, usando células HeLa e MTS

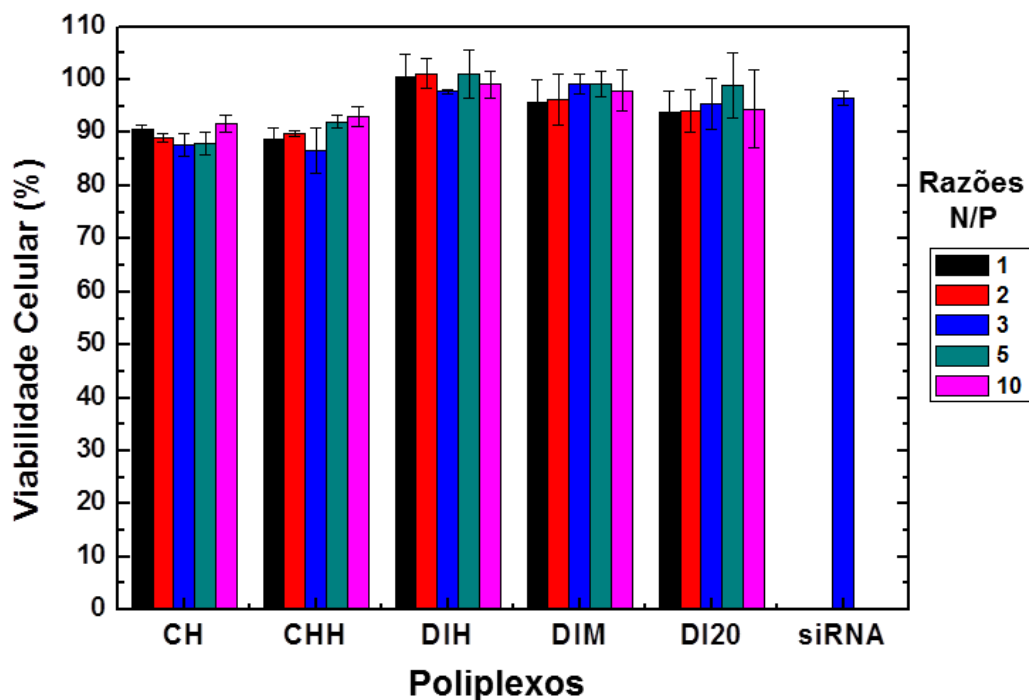


O polímero PEI foi utilizado como controle positivo e o ácido acético (HAc) como controle negativo. A absorvância foi medida em 490 nm e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os poliplexos formados com os derivados de quitosana modificados com DIPEA apresentaram valores de viabilidade celular semelhantes aos dos polímeros modificados com DEAE (Figura 39). Os poliplexos formados com DIPEA obtiveram valores de viabilidade celular acima de 90% em todas as concentrações e razões N/P estudadas.

**Figura 39** – Ensaio de viabilidade celular realizado com os poliplexos formados com quitosana, derivados de quitosana modificados com DIPEA e siRNA



O ensaio foi realizado com células HeLa e MTS. A absorvância foi medida em 490 nm e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.7.6 Transfecção *in vitro*

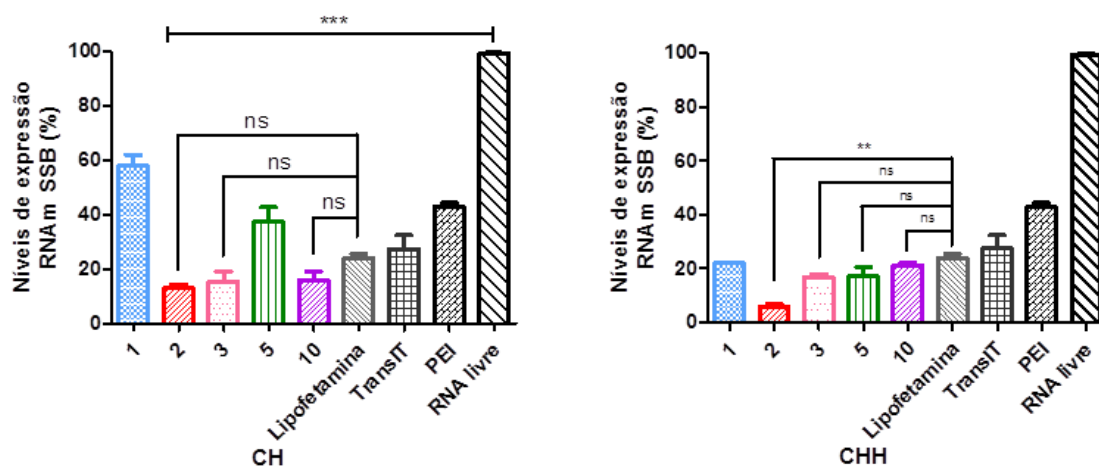
As transfecções *in vitro* foram realizadas utilizando-se células HeLa e poliplexos formados com quitosana, derivados de quitosana e siRNA SSB. O pH das transfecções foi ajustado para 6,3 e o procedimento realizado como descrito na metodologia, item 3.2.14.

Os vetores comerciais de transfecção Lipofetamina<sup>®</sup>, TransIT-siQUEST<sup>®</sup>, PEI e o siRNA livre foram utilizados como controle positivo. Foram realizadas transfecções com as quitosanas desacetiladas CH e CHH, derivados de quitosana modificados com DEAE com massas molares diferentes DEH, DEM, DEL1 e DEL2 e derivados de quitosana com DIPEA: DIH, DIM e DI20.

De modo geral, bons níveis de transfecção foram obtidos com os poliplexos de quitosana e seus derivados. Os resultados ficaram próximos ou foram melhores que os resultados de transfecção obtidos com a lipofetamina, agente de transfecção comercial reconhecidamente eficiente que apresentou

nível de bloqueio na expressão do RNAm SSB de 76%. A quitosana desacetilada obtida em laboratório através do processo de desacetilação da quitosana comercial e a quitosana desacetilada de alta massa molar adquirida junto à Fluka Biochemikal apresentaram, ambas na razão N/P 2, níveis de bloqueio da ordem de 87% e 94%, respectivamente (Figura 40). Foi possível observar a eficiência da transfecção passiva, pois ainda que a CH não tenha formado nanopartículas na razão 2 ( $D_h = 763$  nm), o nível de transfecção foi alto. Resultado semelhante foi encontrado por Lavertu et al. quando obteve boa eficiência de transfecção em células HEK 293, utilizando poliplexos de quitosana com tamanho de 770 nm e com poliplexos de 280 nm (LAVERTU et al., 2006). Esses resultados foram corroborados por estudos de Köping-Höggard et al. ao demonstrar que a eficiência de transfecção não foi afetada pelos complexos de diferentes tamanhos variando entre 200 – 600 nm (KÖPING-HÖGGARD et al., 2001).

**Figura 40** – Eficiência de transfecção dos ensaios *in vitro* realizados com siRNA SSB em células HeLa para os polímeros CH e CHH



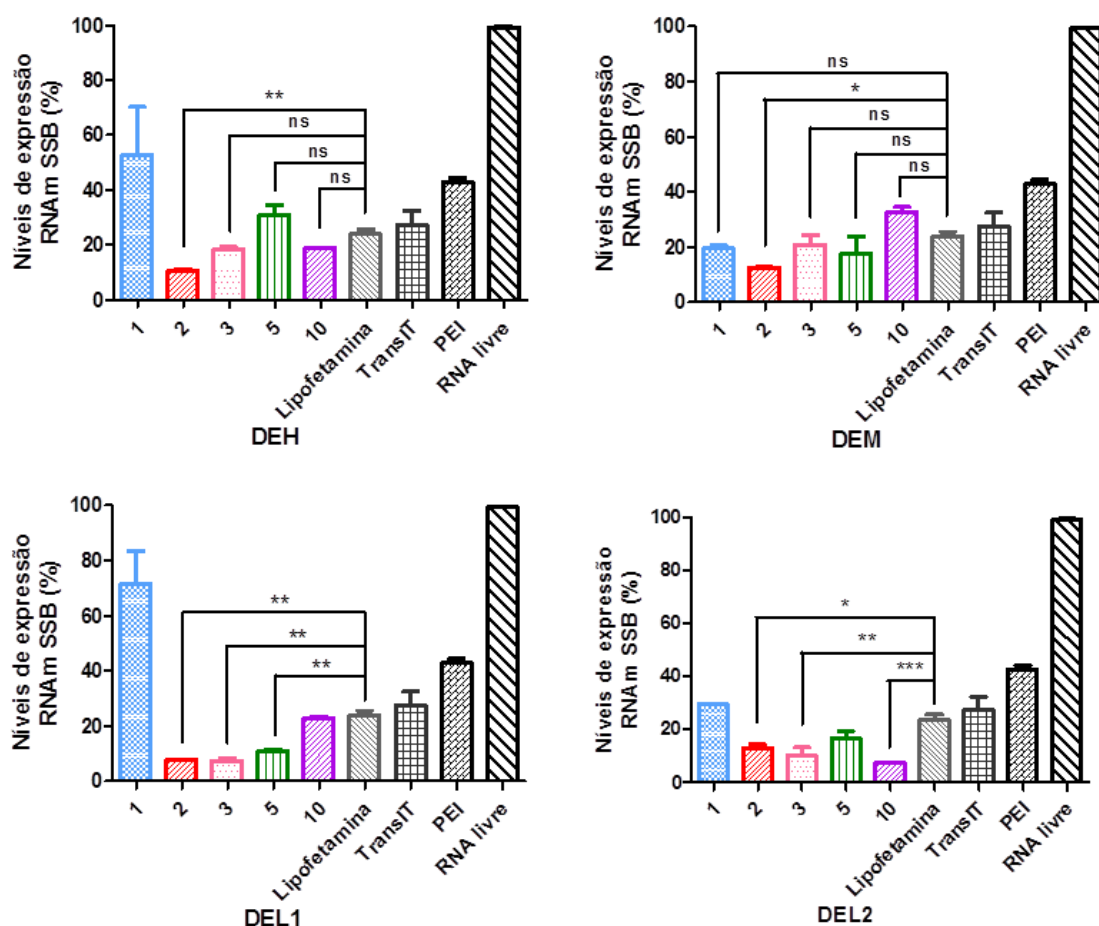
As razões N/P utilizadas nos ensaios foram 1, 2, 3, 5 e 10. Os vetores Lipofetamina, TransIT, Polietilenimina – PEI e o RNA livre foram utilizados como controle positivo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ,  $n = 3$ . ns = não significativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os poliplexos formados com os polímeros de quitosana modificados com DEAE mantiveram a eficiência de transfecção demonstrada pelas quitosanas desacetiladas e tiveram melhores resultados em algumas razões N/P (Figura 41).

Para o polímero DEH, o melhor resultado foi obtido na razão N/P 2 com 89% de bloqueio na expressão do RNAm SSB com valor  $p < 0,01$  em relação a lipofetamina, seguido das razões 3 e 10 com 81,5% e 81,2% de bloqueio, respectivamente. O DEM apresentou 87,4% de bloqueio na expressão do RNAm SSB com valor  $p < 0,05$  para N/P 2.

**Figura 41** – Eficiência de transfecção dos ensaios *in vitro* realizados com siRNA SSB em células HeLa para os derivados de quitosana modificados com DEAE



As razões N/P utilizadas nos ensaios foram 1, 2, 3, 5 e 10. Os vetores Lipofetamina, TransIT, Polietilenimina – PEI e o RNA livre foram utilizados como controle positivo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ,  $n = 3$ . ns = não significativo.

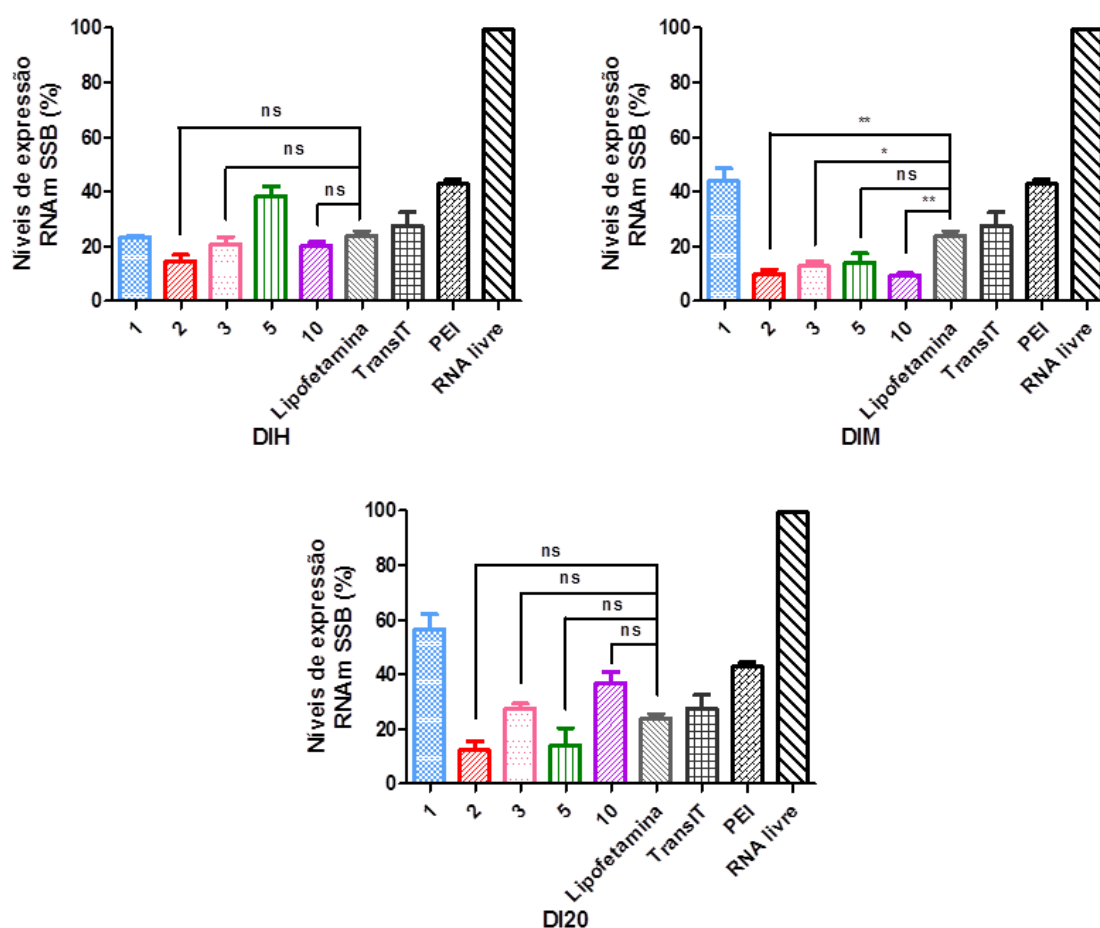
Fonte: Dados da pesquisa.

Os derivados DEL1 e DEL2 com massas molares inferiores (70 e 45,9 kDa) apresentaram melhores resultados de transfecção. Os índices de bloqueio de expressão do RNAm SSB do DEL1 nas razões N/P 2, 3 e 5 foram 92,2, 92,5 e 89% respectivamente com valor  $p < 0,01$ , e, para o DEL2 nas razões N/P 2, 3

e 10 foram 87, 90 e 92,5% respectivamente, com valor  $p < 0,001$  para a última razão.

Entre os polímeros de quitosana modificados com DIPEA, o DIM obteve os melhores resultados de transfecção. Foram 90,1%, 87,3% com e 90.9% de bloqueio na expressão do RNAm SSB para as razões N/P 2, 3 e 10, respectivamente (Figura 42). Todavia, DIH e DI20 também obtiveram bons níveis de transfecção.

**Figura 42** – Eficiência de transfecção dos ensaios *in vitro* realizados com siRNA SSB em células HeLa para os derivados de quitosana modificados com DIPEA



As razões N/P utilizadas nos ensaios foram 1, 2, 3, 5 e 10. Os vetores Lipofetamina, TransIT, Polietilenimina – PEI e o RNA livre foram utilizados como controle positivo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ,  $n = 3$ . ns = não significativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados de transfecção dos polímeros DIH e DI20 nas razões N/P 2, 3, 5 e 10 foram semelhantes aos da lipofetamina. O DIH possui massa molar

de 230,7 kDa e o DI20 tem 125,6 kDa, enquanto o DIM possui 115,8 kDa de massa molar. O DI20, embora tenha massa molar semelhante ao DIM, difere pelo maior grau de substituição, são 19,3% contra 14,3% do DIM.

Os melhores resultados de transfecção *in vitro* para os derivados modificados foram obtidos pelo DEL1 na razão N/P 3 e pelo DEL2 na razão N/P 10, ambos com 92,5% de eficiência de bloqueio na expressão do RNAm SSB. Porém, levando em consideração o potencial uso em ensaios *in vivo*, que é um dos objetivos desse trabalho, uma análise detalhada pode antever possíveis candidatos com potencial uso em terapia gênica.

Avaliando os dados obtidos com os derivados de quitosana, principalmente, o tamanho, a estabilidade dos políplexos, o potencial zeta e a possível administração em pH 7,4 observam-se que as quitosanas CH e CHH, embora tenham obtido bons resultados de transfecção *in vitro* em pH 6,3, não são solúveis em pH 7,4. Os derivados DEL1 e DEL2 que foram mais eficientes nos ensaios *in vitro* em pH 6,3, não formam nanopartícula em nenhuma das razões N/P estudada em pH 7,4, portanto, não seriam eficientes numa administração endovenosa. Na razão N/P 10, os derivados DEH, DIH, DEM, DIM, DI20 formam nanopartículas em pH 7,4, assim, se considerarmos os valores de eficiência de transfecção, os melhores resultados foram obtidos pelos polímeros DIM, DEH, DIH, DEM e DI20 com 91, 81, 80, 67 e 63% de eficiência de bloqueio na expressão do RNAm, respectivamente. São, pelo menos, cinco possíveis candidatos com potencial uso em terapia gênica, considerando uma administração endovenosa em pH 7,4.

## 5. CONCLUSÕES

As modificações realizadas na quitosana desacetilada com DEAE e DIPEA melhoraram a solubilidade, a capacidade de tamponamento e o grau de ionização dos polímeros. Os poliplexos dos polímeros modificados foram mais estáveis e formaram nanopartículas em razões N/P inferiores àqueles obtidos por poliplexos formados com as quitosanas desacetiladas. A adição de DEAE e DIPEA aumentou os valores de potencial zeta dos poliplexos devido à inserção de aminas secundárias e terciárias na estrutura da cadeia. Os derivados mantiveram os mesmos bons níveis de citotoxicidade da quitosana desacetilada e apresentaram bons níveis de eficiência de transfecção.

Os resultados de transfecção *in vitro* de todos os polímeros derivados de quitosana estudados mostraram, em algumas razões N/P, melhor eficiência de transfecção que os vetores não-virais comerciais Lipofetamina, TransIT-siQUEST e PEI.

Os derivados de maiores massas molares formaram nanopartículas e obtiveram bons níveis de transfecção em razões N/P mais baixas (2 e 3), enquanto os derivados de menores massas molares formaram nanopartículas e obtiveram eficiência de transfecção em razão N/P maior (10). Nanopartículas com menor razão N/P são desejáveis devido a menor toxicidade e melhor desmonte do complexo para liberação do material genético. Nesse sentido, analisando todas as características dos polímeros avaliadas nesse trabalho e principalmente a razão N/P, os melhores polímeros para serem utilizados em transfecções seriam DIM, DEH e DIH.

As modificações realizadas, nesse estudo, na estrutura da quitosana desacetilada melhoraram as propriedades dos polímeros e das nanopartículas, aumentando o grau de eficiência das transfecções *in vitro* e gabaritando tais polímeros como potenciais vetores não-virais para serem utilizados em terapia gênica.

## REFERÊNCIAS

- AGIRRE, M. et al. Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: From bench to bedside. **Polymers**, v. 6, n. 6, p. 1727–1755, 2014.
- BAXTER, R. M. et al. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: Gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101 A, n. 2, p. 340–348, 2013.
- BEKALE, L.; AGUDELO, D.; TAJMIR-RIABI, H. A. Effect of polymer molecular weight on chitosan–protein interaction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 309–317, 2015.
- BESSIS, N.; GARCIACÓZAR, F. J.; BOISSIER, M.-C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. **Gene therapy**, v. 11 Suppl 1, n. June, p. S10–S17, 2004.
- BORCHARD, G. Chitosans for gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 145–150, 2001.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 169–173, 2001.
- CAVAZZANA-CALVO, M. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. **Science**, v. 288, n. 5466, p. 669–672, 2000.
- CORSI, K. et al. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1255–1264, 2003.
- DE OLIVEIRA PEDRO, R. et al. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 1, p. 50–55, 2013.

DENG, Y. et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. **Gene**, v. 538, n. 2, p. 217–227, 2014.

FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Anti-TNF $\alpha$  therapy of rheumatoid arthritis : What have we learned ? **Annual Review of Immunology**, v. 1, n. 1, p. 163–196, 2001.

FERNANDES, J. C. et al. Low molecular weight chitosan conjugated with folate for siRNA delivery in vitro: Optimization studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5833–5845, 2012.

FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, E. et al. Chitosan as a non-viral co-transfection system in a cystic fibrosis cell line. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 502, n. 1–2, p. 1–9, 2016.

FILION, D.; LAVERTU, M.; BUSCHMANN, M. D. Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 10, p. 3224–3234, out. 2007.

FILION, M. C.; PHILLIPS, N. C. Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1–2, p. 159–170, 1998.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998.

FRANCA, E. F. et al. Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 12, p. 2141–2149, 2008.

FRANÇA, N. R. DE et al. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 695–702, 2010.

GOY, R. C.; BRITTO, D. DE; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v. 19, n. 3, p. 241–247, 2009.

GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: A review. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 30, n. 1, p. 71–109, 2005.

HACEIN-BEY ABINA, S. et al. A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 3, p. 255–256, 2003.

HOLZERNY, P. et al. Biophysical properties of chitosan/siRNA polyplexes: Profiling the polymer/siRNA interactions and bioactivity. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 297–304, 2012.

HOWARD, K. A. et al. RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Novel Chitosan/siRNA Nanoparticle System. **Molecular Therapy**, v. 14, n. 4, p. 476–484, 2006.

HU, F. Q. et al. Effective antitumor gene therapy delivered by polyethylenimine-conjugated stearic acid-g-chitosan oligosaccharide micelles. **Gene Therapy**, v. 20, n. 6, p. 597–606, 2013.

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

IHM, J. E. et al. Improved biocompatibility of polyethylenimine (PEI) as a gene carrier by conjugating urocanic acid: In vitro and in vivo. **Macromolecular Research**, v. 23, n. 4, p. 387–395, 2015.

ISHII, T.; OKAHATA, Y.; SATO, T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1514, n. 1, p. 51–64, 2001.

ITO, M.; BAN, A.; ISHIHARA, M. Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 218–225, 2000.

JIMTAISONG, A.; SAEWAN, N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 36, n. 1, p. 12–21, 2014.

JIN, L. et al. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. **Theranostics**, v. 4, n. 3, p. 240–255, 2014.

KEAN, T.; ROTH, S.; THANOU, M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 3, p. 643–653, 2005.

KIANG, T. et al. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. **Biomaterials**, v. 25, n. 22, p. 5293–5301, 2004.

KIM, T. H. et al. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 7, p. 726–753, 2007.

KONG, F. et al. Phosphorylatable short peptide conjugated low molecular weight chitosan for efficient siRNA delivery and target gene silencing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 422, n. 1–2, p. 445–453, 2012.

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

KÖPING-HÖGGARD, M. et al. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. **Gene therapy**, v. 8, n. 14, p. 1108–1121, 2001.

KÖPING-HÖGGÅRD, M. et al. Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. **Journal of Gene Medicine**, v. 5, n. 2, p. 130–141, 2003.

KURITA, K. et al. Squid chitin as a potential alternative chitin source. Deacetylation behavior and characteristic properties. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, p. 485–491, 1993.

LAMBRICHT, L. et al. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5247, n. December 2015, p. 295–310, 2015.

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

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 31–69, 2010.

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

LU, B. et al. Low molecular weight polyethylenimine grafted N-maleated chitosan for gene delivery: Properties and in vitro transfection studies. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2594–2600, 2008.

LU, Y. et al. S-Nitrosothiol-modified nitric oxide-releasing chitosan oligosaccharides as antibacterial agents. **Acta Biomaterialia**, v. 12, n. 1, p. 62–69, 2015.

LUO, Y. et al. An inhalable  $\beta$ 2-adrenoceptor ligand-directed guanidinylated chitosan carrier for targeted delivery of siRNA to lung. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 28–36, 2012.

MA, P. X. NIH Public Access. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 184–198, 2008.

MALHOTRA, B. D.; KAUSHIK, A. Metal oxide-chitosan based nanocomposite for cholesterol biosensor. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 2, p. 614–620, 2009.

MALMO, J. et al. SiRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 261–268, 2012.

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**, v. 57, n. 1, p. 1–8, 2004.

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

MASTORAKOS, P. et al. Highly compacted biodegradable DNA nanoparticles capable of overcoming the mucus barrier for inhaled lung gene therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 28, p. 201502281, 2015.

MEYER, M. et al. Breathing life into polycations: Functionalization with pH-responsive endosomolytic peptides and polyethylene glycol enables siRNA delivery. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 11, p. 3272–3273, 2008.

MILHOME, M. A. L. et al. Removal of phenol and conventional pollutants from aqueous effluent by chitosan and chitin. **Quimica Nova**, v. 32, n. 8, p. 2122–2127, 2009.

MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 2, p. 259–302, 2009.

MISLICK, K. A.; BALDESCHWIELER, J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 22, p. 12349–12354, 1996.

MORROW, B. H.; PAYNE, G. F.; SHEN, J. PH-responsive self-assembly of polysaccharide through a rugged energy landscape. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 40, p. 13024–13030, 2015.

MUMPER, R. J.; WANG, J. J.; CLASPELL, J. M.; et al. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. **Proceedings International Symposium Controlled Release Bioact Mater.** 22: 178–179, 1995.

NALDINI, L. Gene therapy returns to centre stage. **Nature**, v. 526, n. 7573, p. 351–360, 2015.

NIMESH, S. et al. Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: Effect of pH and serum. **Molecular Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 182–196, 2010.

NIVEN, R. et al. Biodistribution of radiolabeled lipid - DNA complexes and DNA in mice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 11, p. 1292–1299, 1998.

O'BRIEN, J. A.; LUMMIS, S. C. R. Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 977–981, 2009.

OLIVEIRA, F. P. P. et al. Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: composition effects on the in vitro transfection efficiency. **Nanotechnology**, v. 24, p. 55101, 2013.

PACK, D. W. et al. Design and development of polymers for gene delivery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 7, p. 581–93, 2005.

PEREIRA, I. A.; PEREIRA, R. M. R. Osteoporose e erosões ósseas focais na artrite reumatóide: Da patogênese ao tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 5, p. 347–354, 2004.

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

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

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**, v. 14, n. 6, p. 1732–1740, 2013.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan : Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. January, p. 603–632, 2006.

ROGERS, M.-L. et al. Non-viral gene therapy that targets motor neurons in vivo. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 7, n. October, p. 80, 2014.

ROMØREN, K. et al. The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 261, n. 1–2, p. 115–127, 2003.

SANTOS, J. E. DOS et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, v. 13, n. 4, p. 242–249, 2003.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46–58, 2013.

SIRSI, S.; BORDEN, M. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications. **Bubble Sci Eng Technol.**, v. 1, n. November, p. 3–17, 2010.

SORLIER, P. et al. Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. **Society**, v. 2, n. 3, p. 765–772, 2001.

SOUZA, R. H. F. V. et al. Hydrophobic effect of amphiphilic derivatives of chitosan on the antifungal activity against aspergillus flavus and aspergillus parasiticus. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4437–4450, 2013.

SUK, J. S. et al. Lung gene therapy with highly compacted DNA nanoparticles that overcome the mucus barrier. **Journal of Controlled Release**, v. 178, n. 1, p. 8–17, 2014.

SUN, X. et al. Chitosan(chitin)/cellulose composite biosorbents prepared using ionic liquid for heavy metal ions adsorption. **AIChE Journal**, v. 55, n. 8, p. 2062–2069, ago. 2009.

THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, Geographical distribution of gene therapy clinical trials. **John Wiley and Sons Ltd**, 2016. Disponível em <<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>> Acesso em 06 fev. 2016.

THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, Indications addressed by gene therapy clinical trials. **John Wiley and Sons Ltd**, 2016. Disponível em <<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>> Acesso em 06 fev. 2016.

THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, Vectors used in gene therapy clinical trials. **John Wiley and Sons Ltd**, 2016. Disponível em <<http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/>> Acesso em 06 fev. 2016.

TIERA, M. J. et al. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3151–6, 2006.

TOLAIMATE, A. et al. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, n. 7, p. 2463–2469, 2000.

TØMMERAAS, K. et al. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 2, p. 137–144, 2001.

VELLAI, T.; VIDA, G. The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 266, n. 1428, p. 1571–7, 1999.

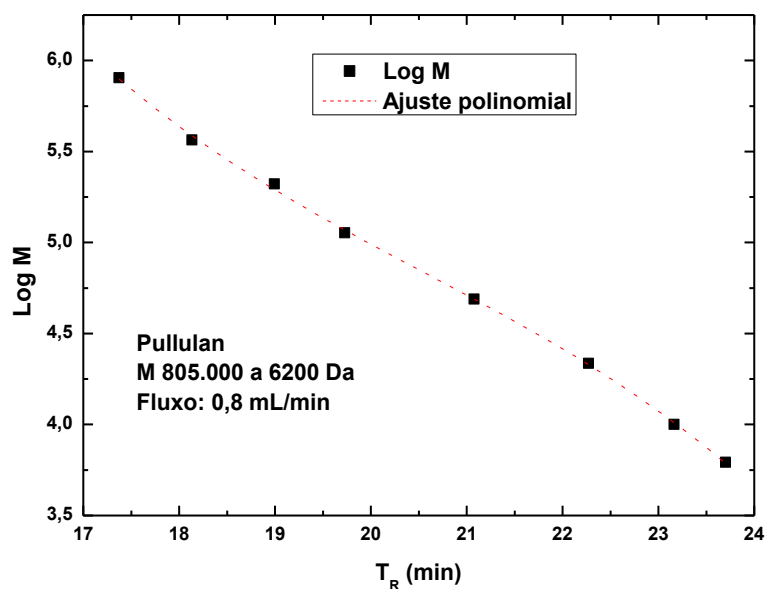
WANG, G. et al. Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–CdTe@SiO<sub>2</sub>–carboxymethyl chitosan drug nanocarriers: synergistic effect towards magnetic targeted drug delivery and cell imaging. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 700, 2014.

- WANG, Q. Z. et al. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 2, p. 194–201, 2006.
- WANG, Z. et al. RNA interference and cancer therapy. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 12, p. 2983–2995, 2011.
- YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature reviews. Genetics**, v. 15, n. 8, p. 541–555, 2014.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1133–1174, 2015.
- YU, H. et al. Chemo-Physical and Biological Evaluation of Poly(L-lysine)-Grafted Chitosan Copolymers Used for Highly Efficient Gene Delivery. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 3, p. 352–361, 2011.
- YUE, Z. G. et al. Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2440–2446, 2011.
- ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 3, p. 204–226, 2015.
- ZHAO, X. et al. Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 112, n. 2, p. 223–228, 2006.
- ZHONG, Z. et al. Low molecular weight linear polyethylenimine-b-poly(ethylene glycol)-b-polyethylenimine triblock copolymers: Synthesis, characterization, and in vitro gene transfer properties. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 3440–3448, 2005.

## APÊNDICE

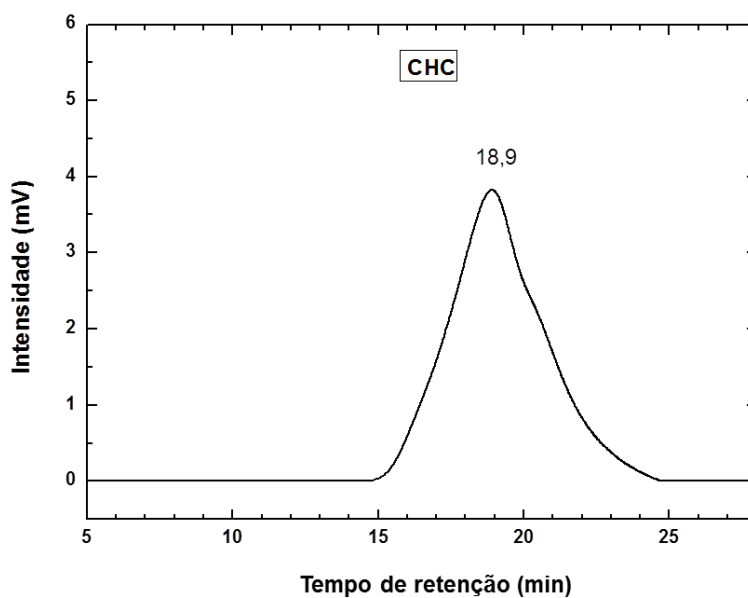
A curva de calibração com o padrão Pullulan das análises de GPC encontra-se na Figura 43. Os cromatogramas das quitosanas dos derivados de DEAE e DIPEA estão apresentados nas Figuras 44 – 54.

**Figura 43** – Curva de calibração com ajuste polinomial do padrão Pullulan dos cromatogramas de GPC



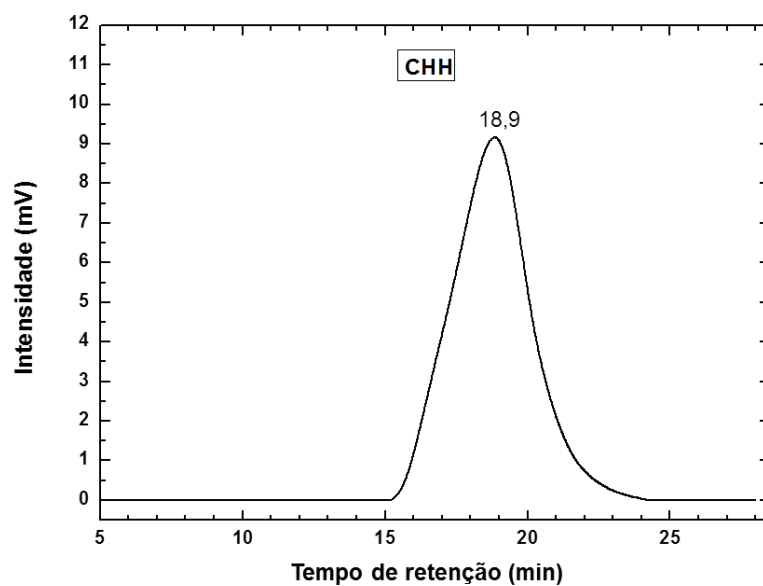
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 44** – Cromatograma da GPC da quitosana comercial (CHC)



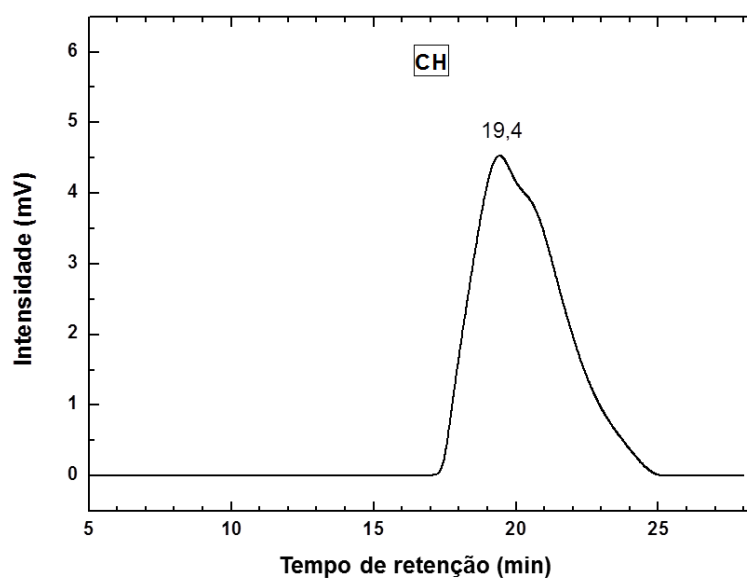
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 45** – Cromatograma da GPC da quitosana desacetilada de alta massa molar (CHH)



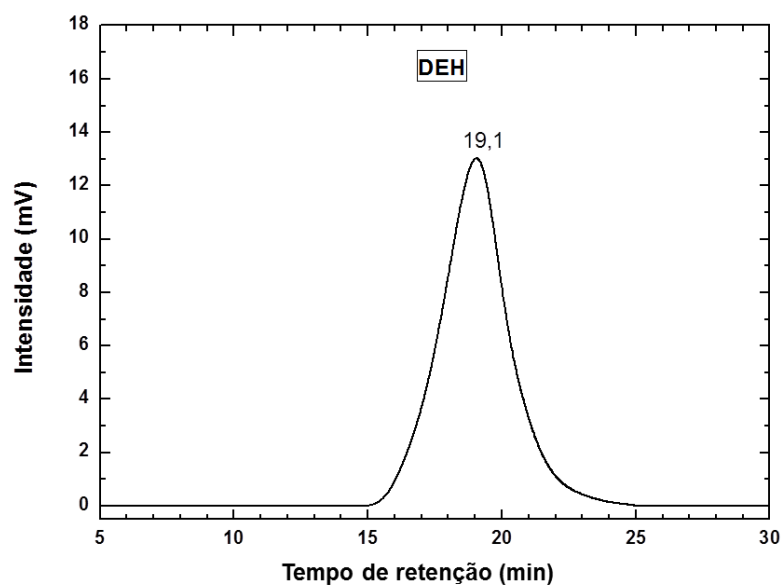
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 46** – Cromatograma da GPC da quitosana desacetilada de massa molar média (CH)



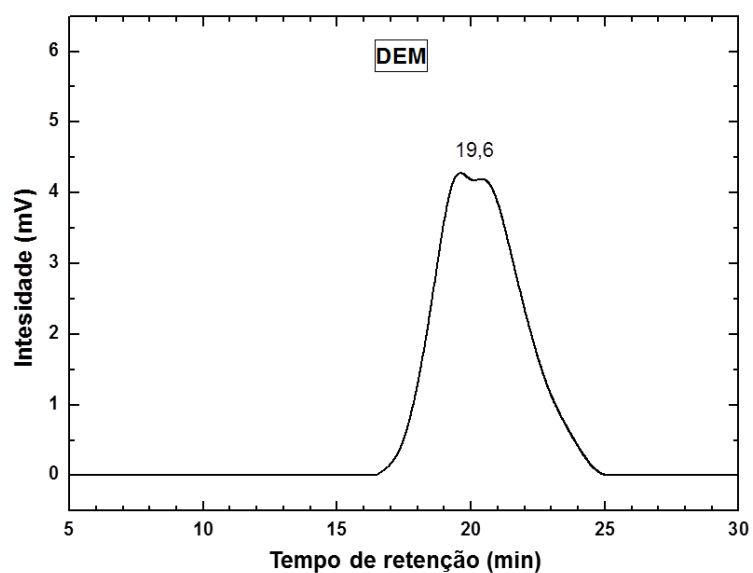
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 47** – Cromatograma da GPC da quitosana de alta massa molar modificada com DEAE (DEH)



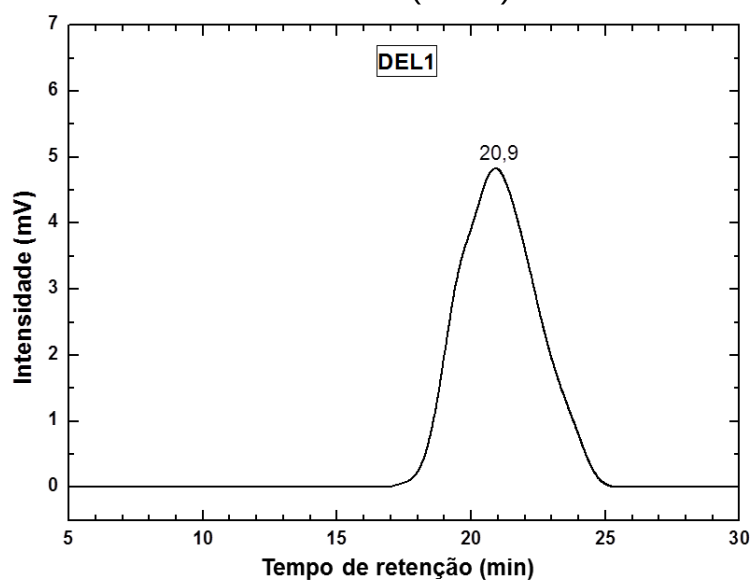
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 48** – Cromatograma da GPC da quitosana de massa molar média modificada com DEAE (DEM)



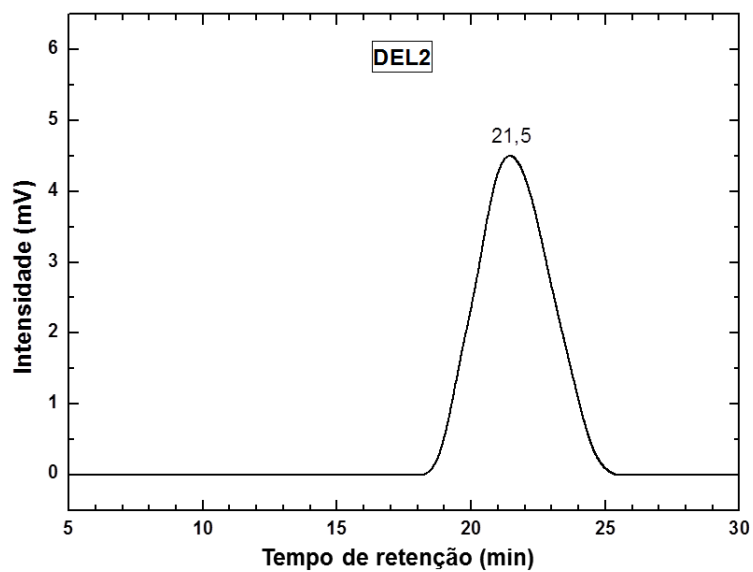
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 49** – Cromatograma da GPC da quitosana modificada com DEAE degradada para obter massa molar baixa (DEL1)



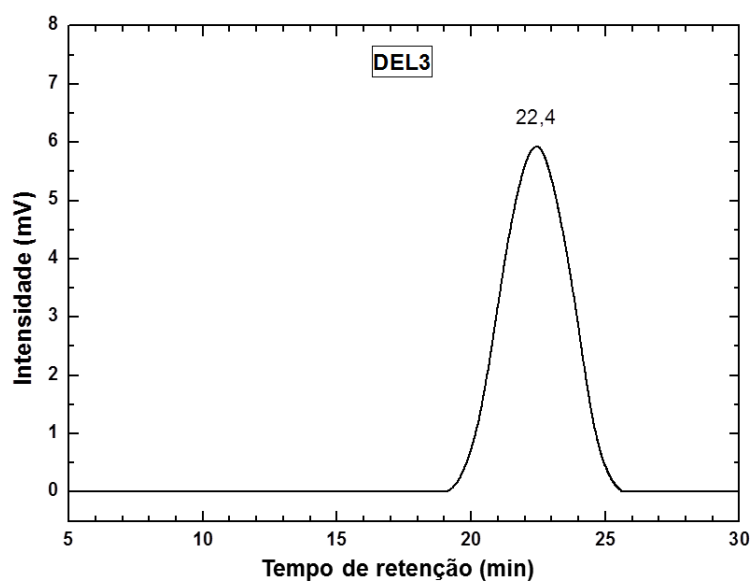
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 50** – Cromatograma da GPC da quitosana modificada com DEAE degradada para obter massa molar baixa (DEL2)



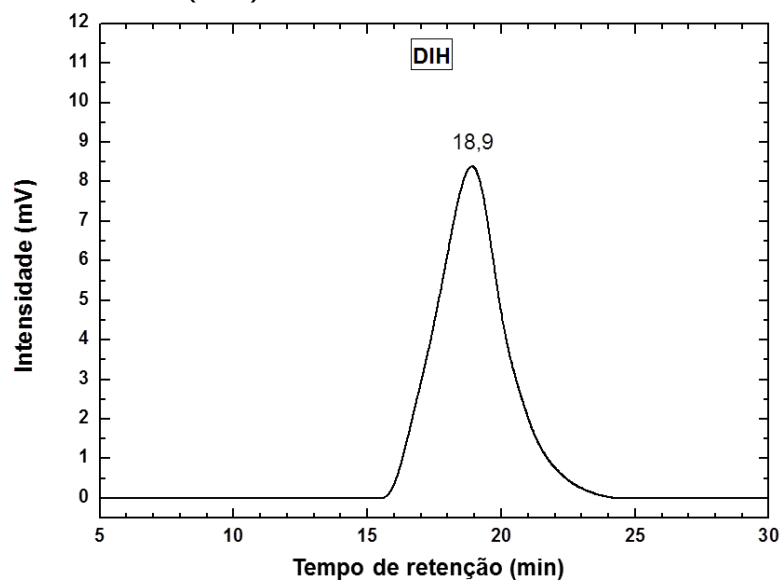
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 51** – Cromatograma da GPC da quitosana modificada com DEAE degradada para obter massa molar baixa (DEL3)



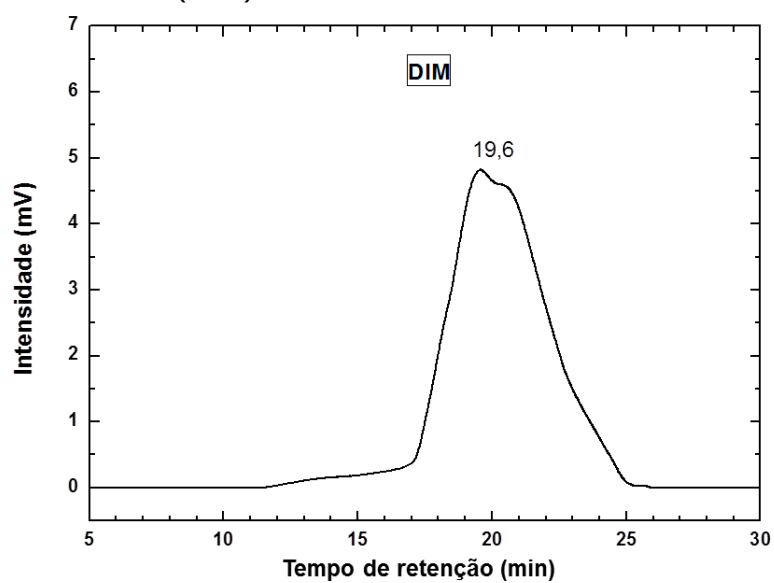
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 52** – Cromatograma da GPC da quitosana de alta massa molar modificada com DIPEA (DIH)



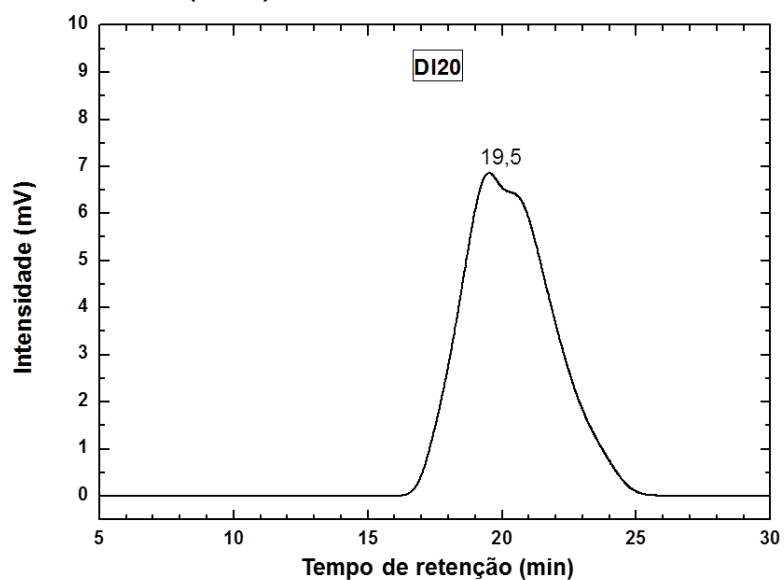
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 53** – Cromatograma da GPC da quitosana de massa molar média modificada com DIPEA (DIM)



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 54** – Cromatograma da GPC da quitosana de massa molar média modificada com DIPEA (DI20)



Fonte: Dados da pesquisa.