



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

André Miguel Martinez Junior

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIORESPONSIVAS PARA
LIBERAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA: ESTUDO *IN VITRO* DO
SILENCIAMENTO DE TNF- α**

São José do Rio Preto

2019

André Miguel Martinez Junior

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIORESPONSIVAS PARA
LIBERAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA: ESTUDO *IN VITRO* DO
SILENCIAMENTO DE TNF- α**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera

Co-orientador: Dr. Maicon Segalla Petrônio

São José do Rio Preto

2019

M385s	Martinez Junior, André Miguel Síntese e caracterização de nanopartículas bioresponsivas para liberação de RNA de interferência : estudo in vitro do silenciamento de TNF-a / André Miguel Martinez Junior. -- São José do Rio Preto, 2019 130 f. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Marcio José Tiera Coorientador: Maicon Segalla Petrônio 1. Química. 2. Terapia genética. 3. Materiais nanoestruturados. 4. Biopolímeros. 5. Quitosana. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

André Miguel Martinez Junior

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS BIORESPONSIVAS PARA
LIBERAÇÃO DE RNA DE INTERFERÊNCIA: ESTUDO *IN VITRO* DO
SILENCIAMENTO DE TNF- α**

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

Financiadora: CAPES

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro
USP – São Carlos

Prof.^a Dr.^a Patricia Simone Leite Vilamaior
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

30 de abril de 2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir minha graduação nesta excelente universidade e agora por me guiar na carreira acadêmica.

Aos meus pais, André e Eliana, por me apoiaram e acreditaram em mim.

Ao Prof. Dr. Marcio J. Tiera pela orientação, ensinamentos e confiança desde a iniciação científica. À Prof.^a Dr.^a Vera A. O. Tiera pelos ensinamentos, ajuda no desenvolvimento dos experimentos e na aquisição dos materiais.

Aos meus amigos, membros do grupo, pela amizade, ensinamentos e companheirismo. Ao meu co-orientador Maicon S. Petrônio pela amizade, ensinamentos e pelo direcionamento que deveras contribuíram para realização desse trabalho. Agradeço por tornarem essa jornada mais alegre e gratificante.

A todos os professores, técnicos e amigos que ajudaram na execução dos experimentos e na análise dos resultados. Em especial, à Prof.^a Dr.^a Marcia dos S. P. Cabrera, à Prof.^a Dr.^a Claudia R. B. Domingos e ao prof. Dr. Marcelo de F. Lima pela ajuda e acesso à instrumentação. À Prof.^a Dr.^a Patricia S. L. Vilamaior e à MSc. Grazieli O. Martins pela ajuda, disponibilidade e obtenção das imagens de microscopia confocal. Ao Dr. Fábio. R. de Moraes pela ajuda com as análises de RMN C¹³ e à Dr.^a Sylvana. C. M. Agostinho e ao MSc. André. L. Tognon pela disponibilidade em realizar as medidas de RMN H¹. À Dr.^a Aline M. F. Lima e ao Luiz F. de M. Ferraz pela obtenção das análises de microscopia eletrônica de varredura.

A UNESP/IBILCE e a todos os professores por possibilitarem minha formação acadêmica e contribuírem para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Gustavo Bonilla e à Prof.^a Dr.^a Iêda P. Fertoni que deram contribuições muito bem vindas na qualificação.

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

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

Agradeço a todos que estiveram presentes e me apoiaram ao longo do mestrado.

Muito obrigado!

RESUMO

O desenvolvimento tecnológico na síntese de ácidos nucleicos, possibilitou a obtenção de siRNAs com alta especificidade, aumentando o potencial de aplicação dessas moléculas na terapia gênica não viral. Contudo, a preparação de carreadores seguros e eficientes para entrega de siRNA é, ainda, um desafio que tem limitado suas aplicações terapêuticas. Neste estudo, foram sintetizados polímeros multifuncionais baseados em quitosana para serem aplicados como carreadores na terapia gênica não viral. Polímeros com diferentes massas moleculares e proporções crescentes de diisopropiletilamina (DIPEA), dietilaminoetil (DEAE) e polietilenoglicol (PEG) foram sintetizados e caracterizados. Os graus de substituição por DIPEA (5 – 55%), DEAE (15 – 57%) e PEG (1,8 – 2,5%) foram determinados por RMN ^1H e RMN ^{13}C . Modificações regioseletivas na hidroxila (C-6) da quitosana foram realizadas por meio da proteção dos grupos amina com anidrido ftálico, seguida pela substituição (DIPEA) e desbloqueio com hidróxido de sódio. O grau de ionização dos diferentes polímeros foi estudado em função do pH e os resultados mostraram que a carga superficial pode ser controlada por alterações na composição dos polímeros. Os derivados apresentaram capacidade de tamponamento superiores às quitosanas não modificadas. As nanopartículas foram preparadas por simples complexação e apresentaram diâmetro hidrodinâmico entre 100 e 200 nm, com potencial zeta positivo a partir da razão de amino/fosfato (N/P) 3. O potencial zeta mostrou-se dependente do conteúdo de DIPEA e PEG nos polímeros, bem como da razão N/P. O estudo de eletroforese indicou que os derivados de quitosana interagem fortemente com o siRNA, sob baixas razões N/P. A estabilidade coloidal e biológica das nanopartículas sob condições fisiológicas (pH 7,4 e força iônica de 150 mmol L $^{-1}$) foi melhorada por meio do ajuste do grau de substituição (DIPEA e PEG), e nanopartículas com 200 nm permaneceram estáveis até 24 horas após sua preparação, e em até 7 horas na presença da albumina sérica bovina (BSA). A microscopia eletrônica de varredura mostrou nanopartículas com morfologia esférica. Estudos de citotoxicidade mostraram viabilidade celular superior a 70% para todos os polímeros e superior a 75% para todos os políplexos até a razão N/P 10. A microscopia confocal e os estudos de transfecção *in vitro* por meio do silenciamento de TNF- α em macrófagos RAW 264.7, mostraram internalização eficiente do siRNA e um bloqueio de até 60% na expressão de TNF- α . Em geral os resultados apresentados, indicam que esses derivados são vetores promissores para transfecção *in vivo*.

Palavras-chave: Quitosana, siRNA, políplexos, terapia gênica, vetor não viral.

ABSTRACT

The technological development of synthetic nucleic acids has allowed to obtain siRNAs with high specificity, increasing the potential of these molecules for applications in the field of the non-viral gene therapy. However, the preparation of safe and efficient carriers for the siRNA delivery remains as a challenge that has limited the therapeutic applications. In this study, multifunctional polycations based on chitosan were synthesized for application as carriers for non-viral gene therapy. Polycations with different molecular weights and grafted with increasing proportions of diisopropylethylamine (DIPEA), diethylaminoethyl (DEAE) and polyethylene glycol (PEG) groups were synthesized and characterized. The degrees of substitution by DIPEA (5 - 55%), DEAE (16 - 57%) and PEG (1.8 - 2.5%) were determined by ^1H NMR and ^{13}C NMR. The regioselective modification on the hydroxyl groups (C-6) of chitosan, was accomplished by the protection of the amino groups with phthalic anhydride, followed of substitution (DIPEA) and unlocking with sodium hydroxide. The ionization degrees of the different polycations were studied as a function of pH and the results showed the surface charge can be adjusted by varying the polymer composition. Derivatives demonstrated improved buffering capacity compared to unmodified chitosan. Nanoparticles were prepared by the simple complexation and showed hydrodynamic diameters in the range of 100-200 nm, with positive zeta potentials for amine/phosphate (N/P) ratios higher than 3. The results from zeta potential measurements showed that this parameter depends on the contents of DIPEA and PEG content and on the N/P ratio used. The electrophoretic studies pointed out that, at low N/P ratios siRNA interacted strongly with the polymers. Dynamic Light Scattering (DLS) measurements showed that the colloidal stability of the nanoparticles under physiological conditions (pH 7.4 and ionic strength of 150 mmol L⁻¹) was improved by adjusting the degrees of substitution (DIPEA e PEG), and nanoparticles with 200 nm remained stable up to 24 hours after their preparation and up to 7 hours in the presence of bovine serum albumin (BSA). The scanning electron microscopy displayed nanoparticles with a spherical morphology. The cytotoxicity studies showed that cell viabilities were higher than 70% for all polymers and higher than 75% for all nanoparticles up to the N/P 10. Confocal microscopy and transfection study by mean of the TNF- α knockdown in RAW 264.7 macrophages presented a good efficiency for internalization of siRNA and reduction up to 60% in TNF- α expression. Overall, the results showed that these derivatives are promising vectors for *in vivo* application.

Keywords: Chitosan, siRNA, polyplexes, gene therapy, non-viral vector.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais estágios da entrega de ácidos nucleicos usando vetores nanoestruturados, desde (a) a distribuição e permeação pelos tecidos até (b) a captação, escape endossomal e silenciamento genético via RNA de interferência (siRNA).....	21
Figura 2 – Estrutura química da cloroquina e de alguns importantes polímeros aplicados na terapia gênica	26
Figura 3 – (a) Representação esquemática da preparação das nanopartículas via método de simples complexação e (b) os mecanismos envolvidos na distribuição e na liberação bioestimulada (via ação da glutathione intracelular) das nanopartículas	32
Figura 4 – Componentes estruturais das principais unidades dos polycations em estudo, com indicativo das principais funções	33
Figura 5 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados das séries I e II com indicação da lógica adotada em suas nomenclaturas.....	37
Figura 6 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados da série III com indicação da lógica adotada em sua nomenclatura	37
Figura 7 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados da série IV com indicação da lógica adotada em sua nomenclatura	41
Figura 8 – Esquema para reação de desacetilação	55
Figura 9 – Espectros de RMN ^1H da CM comercial e CM (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$).....	56
Figura 10 – Espectro de RMN ^1H da CH (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$).....	56
Figura 11 – Esquema da reação de substituição com DIPEA e indicação das principais estruturas obtidas	57
Figura 12 – Espectros de RMN ^1H dos derivados de média massa molecular (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)	59
Figura 13 – Espectros de RMN ^1H dos derivados de alta massa molecular (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)	60
Figura 14 – Esquema da reação de substituição com DEAE e indicação das principais estruturas obtidas	61
Figura 15 – Espectros de RMN ^1H dos derivados da série III (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)	62
Figura 16 – Esquema da reação de peguilação com ativação por SPDP.....	63
Figura 17 – Espectros de RMN ^1H dos derivados da série I ((DIPEA de média massa molecular) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)	64
Figura 18 – Espectros de RMN ^1H dos derivados da série II (DIPEA de alta massa molecular) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)	65

Figura 19 – Espectro de RMN ^1H do derivado da série III (DEAE e amina quaternária) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)	66
Figura 20 – Espectros de RMN ^{13}C dos polímeros de média massa molecular (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$).....	68
Figura 21 – Espectros de RMN ^{13}C dos polímeros de alta massa molecular (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$).....	69
Figura 22 – Esquema da reação de marcação com isotiocianato de rodamina B.....	70
Figura 23 – (a) Curva analítica com isotiocianato de rodamina B (RITC) e (b) espectros de absorbância do CMD34 e CMD34-RITC	70
Figura 24 – Espectro de RMN ^1H da C ($\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$).....	71
Figura 25 – Esquema da reação de bloqueio dos grupos amina da quitosana.....	72
Figura 26 – Espectro de RMN ^1H da B-C ($\text{DMSO}-d_6/\text{DCl}$)	72
Figura 27 – Esquema da reação de substituição com DIPEA nos polímeros bloqueados	73
Figura 28 – Espectros de RMN ^1H dos derivados bloqueados substituídos com DIPEA ($\text{DMSO}-d_6/\text{DCl}$).74	
Figura 29 – Esquema da reação de desbloqueio.....	75
Figura 30 – Espectros de RMN ^1H dos derivados desbloqueados ($\text{DMSO}-d_6/\text{DCl}$)	76
Figura 31 – Capacidade de tamponamento dos polímeros de (a) média e (b) alta massa molecular substituídos com DIPEA (série I e II), com (c) DEAE (série III) e polímeros (d) bloqueados e substituídos com DIPEA (série IV).....	81
Figura 32 – Grau de ionização dos polímeros de (a) média e (b) alta massa molecular substituídos com DIPEA (série I e II), com (c) DEAE (série III) e polímeros (d) bloqueados e substituídos com DIPEA (série IV) em função do pH. As entradas em (a) e (b) são fotografias dos polímeros (2 g L^{-1}) dispersos em tampão fosfato pH 7,4 ($I = 0,15\text{ mol L}^{-1}$).....	83
Figura 33 – Eletroforese dos políplexos formados pelos polímeros substituídos com DIPEA das séries (a) I e (b) II em diferentes razões N/P no pH 7,4 ($I = 0,15\text{ mol L}^{-1}$)	85
Figura 34 – Eletroforese dos políplexos formados pelos polímeros das séries (a) III e (b) IV em diferentes razões N/P no pH 7,4 ($I = 0,15\text{ mol L}^{-1}$).....	86
Figura 35 – (a, b) Diâmetro hidrodinâmico, (c, d) potencial Zeta e (e, f) polidispersividade dos políplexos formados pelos polímeros de média massa molecular substituídos com DIPEA (série I) sob diferentes razões N/P e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica ($0,15\text{ mol L}^{-1}$)	89
Figura 36 – (a, b) Diâmetro hidrodinâmico, (c, d) potencial Zeta e (e, f) polidispersividade dos políplexos formados pelos polímeros de alta massa molecular substituídos com DIPEA (série II) sob diferentes razões N/P e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica ($0,15\text{ mol L}^{-1}$)	90
Figura 37 – (direita) Diâmetro hidrodinâmico e (esquerda) polidispersividade dos políplexos formados pelos polímeros de (a, b) média e (c, d) alta massa molecular substituídos com DIPEA em função do tempo. Todas	

as nanopartículas foram preparadas na razão N/P 10 e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L ⁻¹)	93
Figura 38 – Distribuições representativas do diâmetro hidrodinâmico (baseado na intensidade de luz espalhada) das nanopartículas na presença de albumina sérica bovina (BSA; 40 g L ⁻¹) em função do tempo. Todas as nanopartículas foram preparadas na razão N/P 10 e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L ⁻¹).....	94
Figura 39 – Imagens representativas de MEV-FEG e das nanopartículas do CMD55-P _{1,3} preparadas na razão N/P 10 em pH 7,4 e I = 0,15 mol L ⁻¹	95
Figura 40 – Viabilidade celular de (a, b) fibroblastos 3T3/NIH e (c) macrófagos RAW 264.7 na presença dos polímeros de média massa molecular com DIPEA/PEG (série I)	97
Figura 41 – Viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH e na presença dos polímeros de alta massa molecular com DIPEA/PEG (série II).....	98
Figura 42 – Viabilidade celular de (a) fibroblastos 3T3/NIH e (b) macrófagos RAW 264.7 na presença de poliplexos, formados pelos polímeros com DIPEA de média massa molecular (série I) em diferentes razões N/P preparados em pH 7,4 e I = 0,15 mol L ⁻¹	99
Figura 43 – Viabilidade celular dos poliplexos, formados pelos polímeros com DIPEA de alta massa molecular (série II) em diferentes razões N/P, realizada em fibroblastos 3T3/NIH	100
Figura 44 – Microscopia confocal dos macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas de CMD34-RITC/siRNA-FAM preparadas na razão N/P 10 em pH 7,4 e I = 0,15 mol L ⁻¹	101
Figura 45 – Estudo de transfecção via monitoramento da expressão de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas formadas pelos derivados da série I com siRNA anti-TNF- α em diferentes razões N/P, na ausência e na presença de FBS. As nanopartículas foram preparadas em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L ⁻¹).	103
Figura 46 – Estudo de transfecção via monitoramento da expressão de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas formadas pelos derivados da série II com siRNA anti-TNF- α em diferentes razões N/P. As nanopartículas foram preparadas em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L ⁻¹)	104
Figura A1 – Estrutura e massa molar (mm) dos principais meros em estudo	114
Figura B1 – Espectro de RMN ¹ H de um derivado da série III, com indicação das áreas consideradas para o desenvolvimento da Equação 1	116
Figura C1 – Espectros de RMN ¹ H dos derivados de alta massa molecular com PEG com integração dos carbonos metílicos do DIPEA (H-DIPEA	119
Figura C2 – Espectros de RMN ¹ H da CM e CM-P _{1,6}	120
Figura C3 – Eletroforese dos poliplexos formados pela CM e CM-P _{1,6} (em tampão fosfato pH 7,4)	120

Figura D1 – Curva analítica com a pululana e cromatogramas CM, DMD15, CMD55, CMD _E 16 e CMD _E 57	121
Figura D2 – Curva analítica com a pululana e cromatogramas da (esquerda) CMD5 e CMD34 e (direita) CHD16, CHD32 e C*(Sigma-Aldrich)	122
Figura E1 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros de média massa molecular (série I)	123
Figura E2 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros de alta massa molecular (série II)	125
Figura E3 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros com DEAE (série III)	126
Figura E4 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros da série IV (bloqueio e DIPEA)	127
Figura F1 – Viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH e na presença dos polímeros com DEAE (série III)	129
Figura F2 – (a) Diâmetro hidrodinâmico (b) potencial Zeta e (c) polidispersividade dos poliplexos formados pelo O-CD68 (com siRNA anti-TNF- α) em diferentes razões N/P no 7,4 (I = 0,15 mol L ⁻¹ , Conc. fosfato = 0,05 mol L ⁻¹)	129
Figura G1 – (a) Diâmetro hidrodinâmico (b) potencial Zeta e (c) polidispersividade dos poliplexos formados pelo CMD34 (com siRNA anti-TNF- α) em diferentes razões N/P no pH 6,3 (I = 0,05 mol L ⁻¹ , Conc. fosfato = 0,025 mol L ⁻¹) e 7,4 (I = 0,15 mol L ⁻¹ , Conc. fosfato = 0,05 mol L ⁻¹)	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes e composição para síntese dos polímeros das séries I, II e III.....	40
Tabela 2 – Reagentes e composição para síntese dos polímeros da série IV	43
Tabela 3 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries I e II: derivados com DIPEA de média e alta massa molecular	78
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries III: derivados com DEAE e amina quaternária	78
Tabela 5 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries IV: derivados com DIPEA inseridos na quitosana com os grupos amina primária bloqueados	79
Tabela A1 – Valores de $\overline{m}m_{meros}$ e de β para os polímeros estudados	115
Tabela E1 – Grau de substituição por titulação potenciométrica (GS_T) dos derivados das séries I e II ..	128

LISTA DE ABREVIACES E SIGLAS

B-C	C* bloqueada com anidrido ftálico
B-CD52	B-C substituída com 52% de DIPEA
B-CD68	B-C substituída com 68% de DIPEA
BSA	Albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
C*	Quitosana comercial da Sigma-Aldrich
CH	Quitosana desacetilada de alta massa molecular
CHD16	CH substituída com 16% de DIPEA
CHD16-P_{1,9}	CHD16 substituída com 1,9% de PEG
CHD16-P_{2,7}	CHD16 substituída com 2,7% de PEG
CHD32	CH substituída com 32% de DIPEA
CHD32-P_{1,3}	CHD32 substituída com 1,3% de PEG
CHD32-P_{2,6}	CHD32 substituída com 2,6% de PEG
CM	Quitosana desacetilada de média massa molecular
CMD15	CM substituída com 15% de DIPEA
CMD15-P_{1,7}	CMD15 substituída com 1,7% de PEG
CMD34	CM substituída com 34% de DIPEA
CMD34-P_{1,3}	CMD34 substituída com 1,3% de PEG
CMD34-RITC	CMD34 substituído com RITC
CMD5	CM substituída com 5% de DIPEA
CMD55	CM substituída com 55% de DIPEA
CMD55-P_{1,3}	CMD55 substituída com 1,3% de PEG
CMD_E16	CM substituída com 16% de DEAE
CMD_E57	CM substituída com 57% de DEAE
CMD_E57-P_{1,5}	CMDE57 substituída com 1,5% de PEG
Conc.	Concentrao
CT	Capacidade de tamponamento
CX	Carbono número X
D₂O	xido de deutério
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol

DCI	Cloreto de deutério
DEAE	Dietilaminoetil
DEAE-Cl	Cloridrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina
Dh	Diâmetro hidrodinâmico
DIPEA	Diisopropiletilamina
DIPEA-Cl	Cloridrato de 2-cloroetil-di-isopropilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPA	2-(diisopropilamino)etil metacrilato
dsRNA	RNA dupla fita (do inglês, <i>double stranded RNA</i>)
ELISA	Ensaio imunosorvente ligado à enzima (do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FBS	Soro fetal bovino (do inglês, <i>fetal bovine serum</i>)
GA	Grau de acetilação
GB	Grau de bloqueio
GD	Grau de desacetilação
GF	Grau de ftalação
GI	Grau de ionização
GlcN	Mero ($\beta 1 \rightarrow 4$)2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose
GlcNAc	Mero ($\beta 1 \rightarrow 4$)2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose
GPC	Cromatografia de permeação em gel (do inglês, <i>Gel Permeation Chromatography</i>)
GS_{DEAE}	Grau de substituição por DEAE
GS_{DIPEA}	Grau de substituição por DIPEA
GS_{DIPEA-C}	Grau de substituição por DIPEA determinado por RMN ¹³ C
GSH	Glutaciona reduzida
GS_{OH-DIPEA}	Grau de substituição estimado de DIPEA na hidroxila
GS_{PEG}	Grau de substituição por PEG
GS_{RITC}	Grau de substituição por RITC
GS_T	Grau de substituição por DIPEA determinado por titulação
HAc	Hidrogênio metila do grupo acetila

H_{AR}	Hidrogênios aromáticos do grupo ftaloíla
H_{DEAE}	Hidrogênios metila do DEAE
H_{DIPEA}	Hidrogênios metila do DIPEA
H_{Glc}	Hidrogênios glicopiranosídeos
H-Peg	Hidrogênios metileno do PEG
H_{Q-DEAE}	Hidrogênios metila ligado à amina quaternária do DEAE
HX	Hidrogênio ligado ao carbono X
Ld	Ladder Plus DNA 1 Kb
LPS	Lipopolissacarídeo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo
MM	Massa molecular
mRNA	RNA mensageiro
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetóxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MWCO	Massa molecular de corte (do inglês, <i>Molecular Weight Cut-Off</i>)
N/P	Amina/fosfato
N/P_{nano}	Razão N/P mínima para formação nanopartículas
N/P_{zeta}	Razão N/P mínima necessária para um potencial zeta positivo
NHS	N-hidroxisuccinimida
O-CD52	B-CD52 após a reação de desbloqueio com NaOH
O-CD68	B-CD68 após a reação de desbloqueio com NaOH
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDI	Polidispersividade dos políplexos
PEG	Polietilenoglicol
PEG-SH	O-(2-mercaptoetil)-O'-metil-polietilenoglicol
PEI	Polietilenimina
PES	Etossulfato de fenazina (do inglês, <i>Phenazine Ethosulfate</i>)
PFA	P-formaldeído
Pfi	Ponto final instrumental

RISC	Complexo silenciador induzido por RNA (do inglês, <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>)
RITC	Isotiocianato de rodamina B
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	Interferência do RNA
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
siRNA anti-TNF-α	siRNA para o bloqueio da expressão de TNF α
siRNA	Pequeno RNA de interferência (do inglês, <i>small interfering RNA</i>)
siRNA-FAM	Controle negativo de siRNA marcado com 6-carboxifluoresceína amidita
SPDP	N-Succinimidil 3-(2-piridilditiol) propionato
TAE	Tampão tris-amino-EDTA
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
ζ	Zeta (potencial)

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo		Unidade
g	Unidade de medida de aceleração para força centrífuga relativa	$1\ g = 9,806\ \text{m s}^{-2}$
δ	Escala delta de deslocamento químico no espectro de ressonância magnética nuclear	ppm
I	Força iônica	mol L^{-1}
$\bar{M}_n$	Massa molecular média numérica	Da
$\bar{M}_w$	Massa molecular média ponderal	Da
$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	Índice de polisdipersão das massas moleculares	-

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 RNA de interferência aplicado à terapia gênica	22
2.2 Carreadores de ácidos nucleicos: vetores	23
2.3 Polications no desenvolvimento de vetores multifuncionais	24
2.3.1 Quitosana	24
2.3.2 Grupos amina: o estado da arte na síntese de vetores nanoestruturados	25
2.3.3 Polietilenoglicol (PEG): um agente interfacial para evitar interações indesejadas	28
2.3.4 Ligações dissulfeto: tornando reversível a ligação do PEG nos polications	29
2.3.5 Desenvolvimento polímeros anfifílicos	30
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Materiais	35
4.2 Instrumentos	36
4.3 Rota sintética para obtenção dos polímeros das séries I, II e III	36
4.3.1 Desacetilação da quitosana	38
4.3.2 Modificação com DIPEA/DEAE em meio aquoso: séries I, II e III	38
4.3.3 Modificação com PEG	39
4.3.4 Marcação fluorescente com isotiocianato de rodamina B (RITC)	40
4.4 Rota sintética para obtenção dos polímeros da série IV	41
4.4.1 Bloqueio dos grupos amina com anidrido ftálico	42
4.4.2 Modificação com DIPEA em solvente orgânico: série IV	42
4.4.3 Desbloqueio dos grupos amina	43
4.5 Caracterização dos polímeros	43
4.5.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)	43
4.5.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C)	45
4.5.3 Determinação do grau de substituição por rodamina (GS _{RITC}) via espectroscopia de absorção na região do UV-Visível	46
4.5.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC): estimativa da massa molecular dos polímeros	47

4.5.5 Capacidade de tamponamento e grau de ionização	47
4.6 Preparação e caracterização dos poliplexos	48
4.6.1 Formação das nanopartículas	48
4.6.2 Ensaio de liberação do siRNA em gel de agarose	49
4.6.3 Espalhamento de luz: determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dh) e potencial zeta das nanopartículas	49
4.6.4 Estabilidade coloidal das nanopartículas em condições fisiológicas de pH e força iônica na presença e ausência de albumina	50
4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG).....	50
4.7 Ensaio de proliferação celular com MTS: citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas.....	51
4.8 Estudo de internalização celular por meio da microscopia confocal.....	52
4.9 Estudo de transfecção <i>in vitro</i>.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Caracterização dos polímeros.....	55
5.1.1 RMN ^1H dos polímeros das séries I, II e III	55
5.1.1.1 Grau de desacetilação (GD) das quitosanas de partida (séries I, II, III).....	55
5.1.1.2 Grau de substituição de DIPEA (GS_{DIPEA}) na quitosana (séries I e II)	57
5.1.1.3 Grau de substituição de DEAE (GS_{DEAE}) na quitosana (série III).....	60
5.1.1.4 Grau de substituição por PEG (GS_{PEG}) nos derivados (séries I, II e III)	62
5.1.2 RMN ^{13}C : estimativa do grau de substituição de DIPEA na hidroxila ($\text{GS}_{\text{OH-DIPEA}}$) nos polímeros (séries I e II).....	66
5.1.3 Determinação do grau de substituição por rodamina (GS_{RITC}) via espectroscopia da absorção na região do UV-visível	69
5.1.4 RMN ^1H : polímeros da série IV	71
5.1.4.1 Grau de desacetilação (GD) e bloqueio (GB) da quitosana (série IV)	71
5.1.4.2 Grau de bloqueio (GB) e substituição por DIPEA (GS_{DIPEA}) dos polímeros (série IV).....	73
5.1.5 GPC: massa molecular dos polímeros	77
5.1.6 Capacidade de tamponamento (CT)	79
5.1.7 Grau de ionização (GI) dos polímeros em função do pH	82
5.2 Caracterização das nanopartículas.....	84

5.2.1 Ensaio de liberação do siRNA em gel de agarose	84
5.2.2 Potencial Zeta (ζ), diâmetro hidrodinâmico (Dh) e polidispersividade (PDI) das nanopartículas por meio do espalhamento de luz	88
5.2.3 Estabilidade coloidal das nanopartículas em condições fisiológicas de pH e força iônica na presença e ausência de albumina	92
5.2.4 MEV-FEG das nanopartículas	95
5.3 Ensaio de proliferação celular com MTS: citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas	96
5.4 Estudo de internalização celular por meio da microscopia confocal	100
5.5 Avaliação da eficiência de transfecção via monitoramento da expressão de TNF-α	102
6 CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE A – Razão molar e N/P: valores de $\overline{mm}_{mero}$ e de β	114
APÊNDICE B – Equação para determinar o hidrogênio de referência dos derivados da série IV e lógica envolta na determinação da quantidade de hidrogênios	116
APÊNDICE C – Polímeros com PEG: RMN 1H e sínteses adicionais	118
APÊNDICE D – Curvas analíticas e cromatogramas de GPC	121
APÊNDICE E – Titulações potenciométricas: derivadas e uma nova forma de estimar o grau de substituição.....	123
APÊNDICE F – Caracterizações adicionais para alguns polímeros das séries III e IV	129
APÊNDICE G – Efeito do pH e da força iônica na formação dos poliplexos	130

1 INTRODUÇÃO

A terapia gênica consiste no tratamento de doenças por meio da inserção de material genético em células específicas de um paciente (JAYAKUMAR et al., 2010), e tem se mostrado uma alternativa promissora para tratar várias doenças humanas (HAN, 2007; LINDEN, 2008). Uma de suas aplicações envolve silenciamento de genes, via introdução de RNAs de interferência nas células, com o intuito de evitar a síntese de proteínas que resultam na manifestação clínica de uma doença (ALBERTS et al., 2011).

Os ácidos nucleicos sem transportador dificilmente conseguem adentrar nas células e assim, não conseguem manifestar seu efeito terapêutico (DOWDY, 2017; TIERA et al, 2013). Isso ocorre porque eles são macromoléculas carregadas negativamente (em pH fisiológico, grupos fosfato dos nucleotídeos apresentam carga negativa) e, portanto, apresentam uma repulsão eletrostática contra membrana plasmática, que também possui uma densidade de carga negativa (SALCHER; WAGNER, 2010). Deste modo, torna-se necessário o uso de agentes que possibilitem a introdução dos ácidos nucleicos na célula-alvo. Na terapia gênica, esses agentes são chamados de vetores.

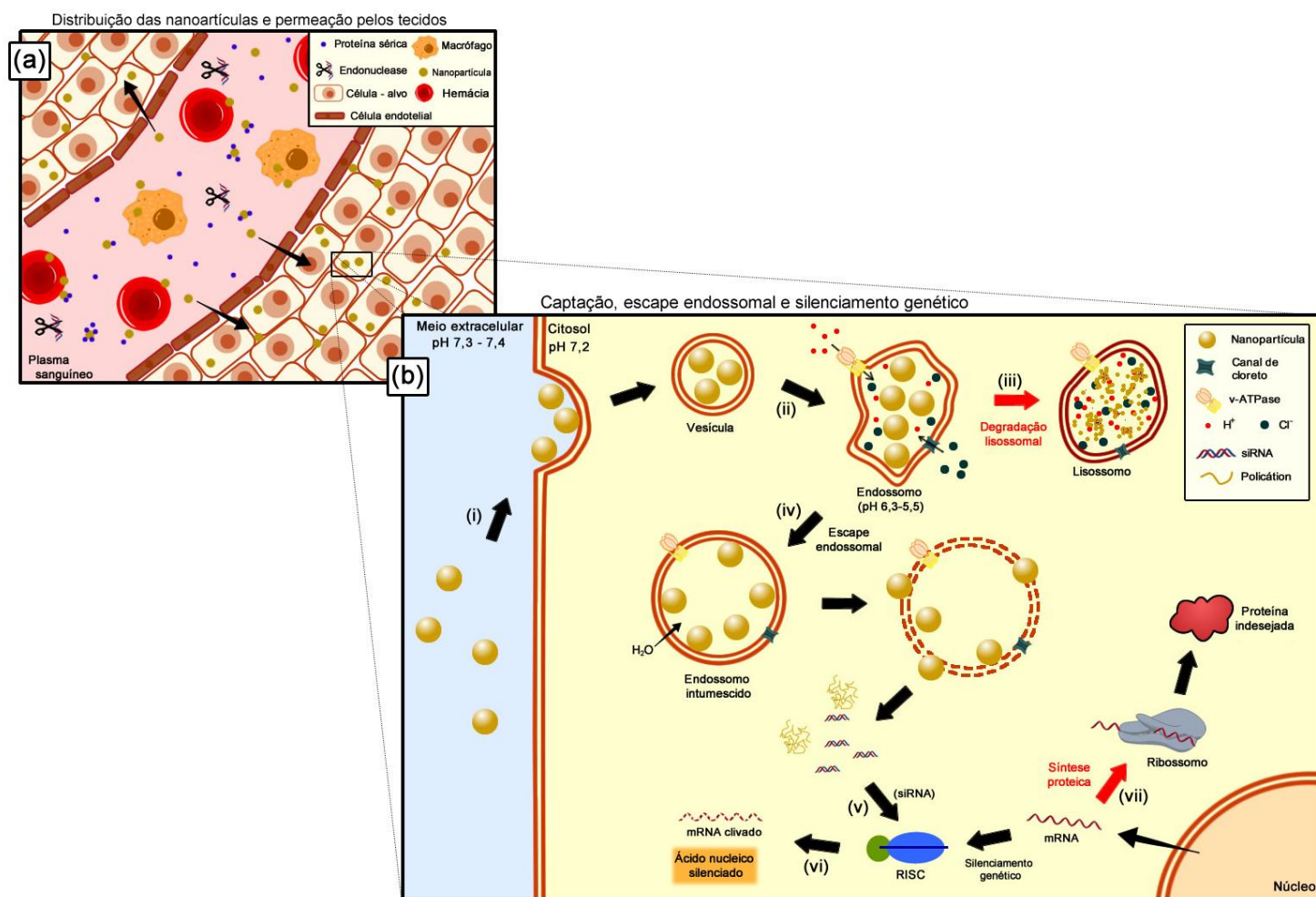
Os vetores podem ser classificados em dois grandes grupos: virais e não virais (HAN, 2007). Atualmente, os vetores virais são os mais aplicados em ensaios clínicos (GENE..., 2018) e constituem um número expressivo de medicamentos (GINN et al., 2018). Porém, a maior facilidade de produção (AIRES, 2008), a maior segurança na aplicação (CHEN et al., 2016) e a obtenção de níveis de transfecção cada vez mais elevados (HAN, 2007) são algumas vantagens dos vetores não virais que os tornam uma alternativa promissora em relação aos vetores virais.

O desenvolvimento de vetores não virais eficientes continua sendo um desafio, devido aos vários obstáculos que devem ser superados para que os ácidos nucleicos possam atingir o seu local de ação, no interior das células alvo. O primeiro grande obstáculo é a distribuição pelo organismo (Figura 1a), devido à possibilidade de ocorrer interações destrutivas com células e proteínas presentes no plasma sanguíneo (TIERA et al., 2013), depuração renal (GIACOMELLI et al., 2011) e clivagem do material genético por nucleases séricas (CHEN et al., 2016). Além de distribuírem-se pelo plasma sanguíneo, os vetores, que neste caso são nanoestruturados (nanopartículas), também precisam difundir pelos tecidos e interagir com as células-alvo (Figura 1b, i), para serem internalizados em estruturas vesiculares que posteriormente são transportadas pelo citosol (ALBERTS et al., 2010).

O principal mecanismo de internalização de vetores não virais (pelas células) é a endocitose (KHALIL et al., 2006; DOWDY, 2017). Essa via (Figura 1b, ii) apresenta diferentes destinos para os compartimentos intracelulares formados (KHALIL et al., 2006) e depende do tipo de célula-alvo e das características físico-químicas das substâncias endocitadas (AGIRRE et al., 2014; DOWDY, 2017). Porém sabe-se que em geral, há um aumento progressivo da acidez no interior desses compartimentos (via ação da enzima v-ATPase), que levam a degradação das substâncias (Figura 1b, iii) (KHALIL et al., 2006) por meio da ativação de hidrolases lisossomais (ALBERTS et al., 2010). Portanto, os vetores devem possuir a habilidade de escapar desses ambientes antes de serem degradados. Para nanopartículas sensíveis ao pH, sintetizadas a partir de polycations, o mecanismo conhecido como “esponja de prótons” é comumente referido como o processo responsável por promover essa fuga. Tal mecanismo, sugere que a protonação das cadeias poliméricas promove aumentos tanto na carga superficial das nanopartículas, como na pressão osmótica no interior do compartimento. Combinadas, essas mudanças contribuem para a desestabilização da membrana do compartimento (Figura 1b, iv) e ocasiona na liberação do ácido nucleico no citosol (AGIRRE et al., 2014; BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; KHALIL et al., 2006).

Deste modo, conclui-se que os sistemas de entrega devem possuir múltiplas características que satisfaçam as necessidades de todos os estágios de transporte dos ácidos nucleicos, desde sua encapsulação até a liberação no interior das células-alvo (ZHOU et al., 2016). Visando atender essas necessidades, neste estudo, foram sintetizados polycations bioresponsivos baseados em quitosana para formação de vetores multifuncionais. Estes vetores foram aplicados no silenciamento genético (Figura 1b vi), via ação de um pequeno RNA de interferência (siRNA) (Figura 1b, v), com o intuito de reduzir a expressão (Figura 1b, vii) de uma citocina pró-inflamatória (TNF- α) em macrófagos RAW 264.7.

Figura 1 – Principais estágios da entrega de ácidos nucleicos usando vetores nanoestruturados, desde (a) a distribuição (vaso sanguíneo) e permeação pelos tecidos até (b) a captação, escape endossomal e silenciamento genético via RNA de interferência (siRNA). As setas vermelhas indicam vias indesejadas



Fonte: Elaborado pelo autor com base em Alberts et al., 2010; Blanco; Shen; Ferrari, 2015; Casey; Grinstein; Orłowski, 2010; Elsabahy; Wooley, 2012; Layek; Singh, 2016; Tiera et al., 2013

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RNA de interferência aplicado à terapia gênica

Hoje, quase 30 anos depois do primeiro ensaio clínico associado a terapia gênica que obteve relativo sucesso (LINDEN, 2010), vários medicamentos baseados em ácidos nucleicos já estão disponíveis comercialmente, como: Gendicine, Glybera[®], Strimvelis[™], entre outros (GINN et al., 2018). O Glybera[®] é um exemplo do potencial terapêutico destes medicamentos, uma vez que, com apenas uma aplicação, promete restaurar a função normal do corpo de pessoas com deficiência na produção da lipoproteína lipase (SCOTT, 2015), ao contrário do tratamento convencional, que é apenas paliativo (NEELAMEKAM, 2017). Esse potencial é mais uma vez posto em evidência ao considerar que só nos últimos sete anos houve um aumento de quase 60% no número de ensaios clínicos envolvendo a terapia gênica. A maior parte desses ensaios (65%) estão relacionados ao câncer, contudo estudos envolvendo a aplicação de ácidos nucleicos no tratamento de doenças infecciosas, inflamatórias e neurológicas também têm sido observados (LINDEN, 2010; GENE..., 2018).

O mecanismo de destruição do RNA de dupla fita (dsRNA) nas células é conhecido como interferência do RNA (RNAi), e foi observado pela primeira vez em 1998. Ele é um importante mecanismo de defesa das células contra os vírus, e têm se tornado alvo de intenso estudo devido ao alto potencial de se tornar uma importante plataforma terapêutica. Dentre os RNAs regulatórios (ou de interferência) existentes, o siRNA tem papel de destaque por atuar, na maioria das vezes (BEREZHNA et al., 2006), no citosol e não precisar (com frequência) superar mais um obstáculo na célula, isto é, o envoltório nuclear. O siRNA é um dsRNA com 19 a 23 pares de bases nitrogenadas, no qual a fita antisenso serve como guia para o complexo silenciador induzido por RNA (RISC) na destruição de RNAs mensageiros (mRNA) complementares a mesma (Figura 1b, v). Assim que o mRNA é clivado, o RISC fica disponível para destruir novos ácidos nucleicos complementares a fita molde, deste modo, um único siRNA pode promover a destruição de várias moléculas de mRNA (ALBERTS et al., 2011; BRAMSEN; KJEMS, 2012; TORRECILLA et al., 2014). Portanto, o uso de siRNA na terapia gênica é voltado para o bloqueio da síntese de proteínas que tenham efeito indesejado no organismo.

Dentre as possíveis doenças alvo, a liberação de siRNA para o bloqueio da expressão de citocinas pró-inflamatórias têm demonstrado potencial para tratar doenças relacionadas com o sistema imunológico, como a artrite reumatoide (JAIN S. et al., 2013; PANDI et al., 2017). Nestas doenças os macrófagos desempenham papel central, pois são fonte de produção de citocinas que disparam o processo inflamatório (WYNN et al., 2013). Dentre elas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) desempenha um papel fundamental, pois além de seu próprio efeito pró-inflamatório (ADRIAANSEN; VERVOORDELDONK; TAK, 2006), ele também induz a liberação de outras citocinas que podem potencializar o quadro inflamatório, como as interleucinas (IL) 1 e 6 (ADRIAANSEN; VERVOORDELDONK; TAK, 2006; OLIVEIRA et al., 2011). Devido à importância do TNF- α na progressão de várias doenças, o seu bloqueio tem sido amplamente estudado e vários medicamentos baseados em anticorpos monoclonais e receptores de TNF- α foram desenvolvidos para este fim, como infliximabe (Remicade[®]), adalimumabe (Humira[®]) e etanercepte (Enbrel[®]), por exemplo. Entretanto, esses medicamentos apresentam vários aspectos negativos, como: alto custo, predisposição a infecções, propensão a desordens de cunho neurológico e inflamatório, auto-imunogenicidade, entre outros (ATZENI et al., 2015; PANDI et al., 2017)

Portanto, neste estudo, buscou-se o bloqueio da expressão de TNF- α via silenciamento genético ao utilizar um siRNA anti-TNF- α como agente terapêutico. Para tal, foram empregados nanocarreadores baseados em quitosana, com o objetivo de promover sua entrega no interior das células-alvo (isto é, macrófagos RAW 264.7).

2.2 Carreadores de ácidos nucleicos: vetores

Os vírus são organismos acelulares especializados em invadir e liberar seu material genéticos em células hospedeiras. Diante disso, não é surpresa que mais de 60% dos ensaios clínicos catalogados na base de dados do *The Journal of Gene Medicine* (GENE..., 2018) sejam atribuídos aos vetores virais. Entretanto, estes vetores apresentam um alto custo de produção (MORALES; LINDEN; HAN, 2008), podem ativar respostas imunológicas e inflamatórias no organismo, além de estarem limitados ao transporte de pequenas sequências de nucleotídeos (JAYAKUMAR et al., 2010).

Os vetores não virais podem ser classificados em dois subgrupos: plasmídeos e vetores nanoestruturados (LINDEN, 2010). Ambos, também contribuem com um número expressivo (21%) de ensaios clínicos (GENE..., 2018). Os vetores nanoestruturados abrangem basicamente lipídeos e polímeros catiônicos capazes de interagir eletrostaticamente com o material genético, formando complexos. Os complexos formados pelos polímeros (poliplexos) são mais estáveis que os formados pelos lipídeos (lipoplexos), além de serem capazes de condensar uma maior quantidade de material genético (JAYAKUMAR et al., 2010).

Para serem captados pela maioria das células, os poliplexos devem apresentar dimensões apropriadas. O diâmetro adequando é imposto pelas características biológicas do organismo e do alvo terapêutico. Por exemplo, partículas inferiores a 8 nm tendem a serem excretadas pelos rins, já estruturas maiores que 200 nm podem ser capturadas pelo fígado (NEL et al., 2009). O diâmetro dos poliplexos pode inclusive determinar a via endocítica adotada para sua internalização (AGIRRE et al., 2014). Em geral, os poliplexos com dimensões inferiores a 500 nm podem ser internalizados pelas células (NEL, et al., 2009). Sob essa condição, os poliplexos podem ser chamados de nanopartículas, não só por apresentarem dimensões entre 1 a 1000 nm, mas porque suas propriedades biológicas passam a ser atribuídas às suas dimensões nanométricas (SMITH; SIMON; BAKER JR, 2013).

2.3 Polications no desenvolvimento de vetores multifuncionais

2.3.1 Quitosana

A quitina é um dos polissacarídeos mais abundantes na biosfera, e a quitosana é o seu mais importante derivado. Ambas são copolímeros aleatórios de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) unidas por ligações $\beta_{1\rightarrow4}$, se diferenciando apenas pela predominância da primeira unidade (GlcN) na quitosana (GOY; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2004).

A quitosana foi usada pela primeira vez na terapia gênica em 1995 (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016) e, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (JAYAKUMAR et al., 2010), tem recebido grande atenção na preparação de nanopartículas para entrega segura de genes (CHEN et al., 2016). Parte do destaque também advém da moldabilidade físico-química do

polímero, capaz de originar derivados com propriedades biológicas diferenciadas (KEAN; THANOU, 2010; GONSALVES, 2011).

Dentre as propriedades dos poliplexos constituídos de quitosana, a massa molecular e o grau de desacetilação (GD) são alguns dos fatores de maior influência na transfecção (AGIRRE et al., 2014; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016). Em geral, graus de desacetilação mais elevados favorecem maiores taxas de captura das nanopartículas pelas células (HUANG; KHOR; LIM, 2004; DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016), enquanto que massas moleculares (MM) maiores promovem interações mais fortes entre a quitosana e os ácidos nucleicos (LAYEK; SINGH, 2016). A literatura indica que quitosanas com MM entre 40 e 150 kDa permitem a preparação de nanopartículas com tamanhos suficientes (aproximadamente 200 nm) para um alto potencial de aplicação *in vivo* (ELSABAHY; WOOLEY, 2012; LAVERTU et al., 2006). Essa faixa de MM também foi indicada por Layek e Singh (2016), que reportaram que quitosanas com MM entre 20 a 200 kDa apresentaram bons níveis de transfecção, enquanto massas moleculares maiores (460 kDa) promoveram níveis de transfecção tão baixos, que só foram superiores ao dos ácidos nucleicos não encapsulados.

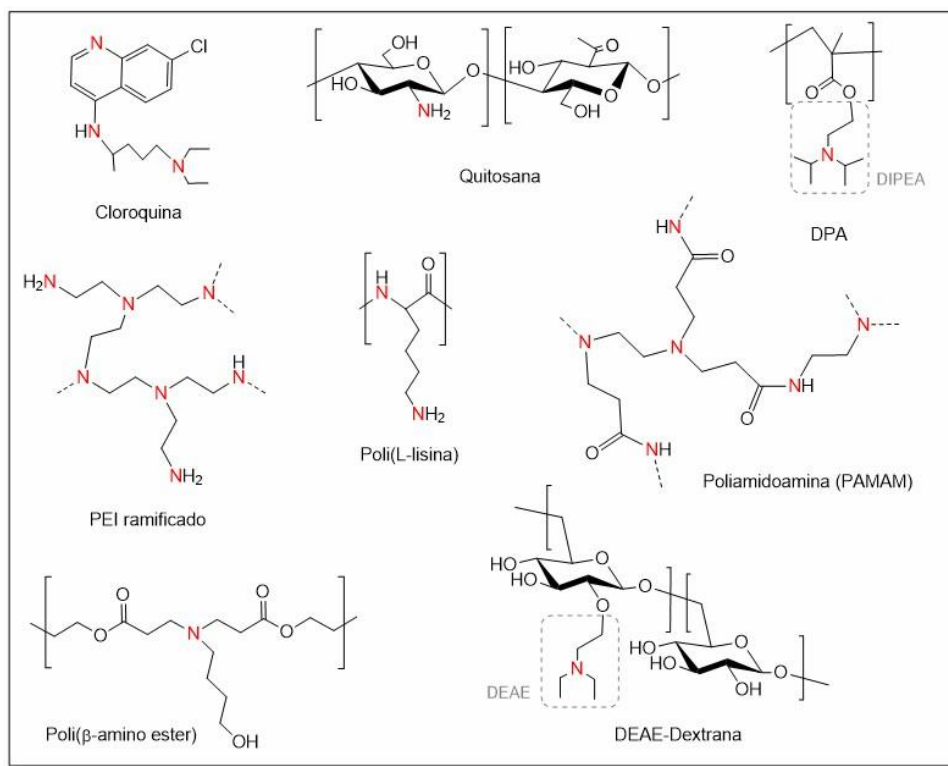
Diante disso, neste trabalho, foram sintetizados polímeros com um alto grau de desacetilação (GD > 95%) e massa molecular variando entre 80 e 200 kDa, após a realização das modificações químicas propostas. Tais modificações buscaram melhorar a estabilidade e a eficiência dos poliplexos e são revisadas nos itens subsequentes.

2.3.2 Grupos amina: o estado da arte na síntese de vetores nanoestruturados

Na busca por vetores cada vez mais eficientes, vários pesquisadores têm utilizado como estratégia a produção de carreadores que contenham grupos amina em sua estrutura (DOWDY, 2017; ELSABAHY; WOOLEY, 2012), principalmente quando esses vetores são nanopartículas baseadas em polímeros catiônicos (CHEN et al., 2016; TIERA et al., 2011). Essa estratégia é parcialmente inspirada na cloroquina (Figura 2), o principal modelo de molécula endossomolítica (especializada em promover a fuga do endossomo, por meio da lise da membrana endossomal), que apresenta três diferentes grupos amina em sua estrutura (DOWDY, 2017). Diante disso, a incorporação de diferentes proporções de grupos amina distintos (primário, secundário, terciário e quaternário) tem sido amplamente explorada, sendo considerado o estado da arte na síntese de

nanocarreadores (JONES et al., 2013; ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Devido aos distintos valores de pKa que esses grupos apresentam (OLIVEIRA et al., 2013), enquanto alguns atuam na interação eletrostática com os ácidos nucleicos, os outros podem atuar na capacidade do polímero em absorver prótons na via endocítica (JONES et al., 2013), o que confere ao polímero características multifuncionais. A capacidade do polímero em receber prótons é associada, pela literatura, com a capacidade de tamponamento, e está intimamente ligada ao mecanismo que promove a fuga endossomal (esponja de prótons), como já foi mencionado. Alguns exemplos de polications aplicados à terapia gênica são mostrados na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura química da cloroquina e de alguns importantes polímeros aplicados na terapia gênica



Fonte: Elaborado pelo autor com base em Amiji, 2004; Chen et al., 2015; Dowdy, 2017 e Tiera et al., 2011

A dextrana (polissacarídeo de unidades de D-glicose com ligações $\alpha_1\rightarrow_6$ e ramificações $\alpha_1\rightarrow_3$ (NELSON; COX, 2014)) modificada com grupos dietilaminoetil (DEAE) (Figura 2) foi um dos primeiros polications aplicados na terapia gênica e apresentaram bons níveis de transfecção em macrófagos humanos, porém, quando aplicado à uma gama maior de linhagens celulares,

apresentaram eficiências de transfecção inferiores à de outros polímeros, como a polietilenimina (PEI) (AMIJI, 2004). Em um estudo recente, mostrou que a incorporação do grupo DEAE à quitosana ampliou sua capacidade de complexar o siRNA, além de promover níveis elevados de silenciamento genético (em diferentes linhagens celulares), que foram superiores aos níveis fornecidos pela PEI (SOUZA et al., 2018). Entretanto um controle adequado no grau de substituição deve ser realizado, pois quitosanas com altas proporções de DEAE (80% e 100%) apresentaram elevada citotoxicidade, o que pode estar relacionado à maior densidade de cargas positivas (NEL et al., 2009; PICOLA et al., 2016). Outro aspecto importante relacionado à adição de DEAE é a formação de unidades (meros) com aminas quaternárias (OLIVEIRA et al., 2013; SIEWERT et al., 2019). Nas dextranas modificadas com DEAE, as aminas terciárias desses meros apresentam pKa próximo à 6, enquanto que nas aminas terciárias das unidades não quaternizadas o valor de pKa é 9,5 (AMIJI, 2004). Se a presença/quantidade de todas essas unidades no polímero puder ser controlada (isto é, controlar a presença/ausência de aminas quaternárias), é possível moldar sua atuação nos sistemas biológicos, favorecendo o escape endossomal e promovendo uma melhor interação com os ácidos nucleicos e as membranas celulares, por exemplo (JONES et al., 2013).

Ainda destacando a presença dos grupos amina, polímeros que possuem em sua estrutura unidades de 2-(diisopropilamino)etil metacrilato (DPA) (Figura 2), têm sido amplamente investigados devido à alta sensibilidade ao pH (GIACOMELLI et al., 2011; ZHOU et al., 2012). Recentemente, a formulação de um polímero constituído pelo DPA e por outros meros contendo amina primária e polietilenoglicol (PEG), resultou em um promissor sistema de entrega de siRNA (ZHOU et al., 2016). Diferentemente das modificações envolvendo DEAE, não é observada a formação de aminas quaternárias no grupo diisopropiletilamina (DIPEA), o que pode permitir um maior controle da carga superficial dos vetores, importante para evitar interações indesejadas com constituintes biológicos (TIERA et al., 2013). Diante dessas observações, a incorporação de DIPEA na quitosana pode ser uma alternativa promissora para favorecer sua capacidade de carrear material genético.

Deste modo, neste estudo, foram avaliados os efeitos da adição de grupos amina, na forma de DIPEA e DEAE, nas propriedades físico-químicas dos polímeros e das nanopartículas formadas pela interação com siRNA.

2.3.3 Polietilenoglicol (PEG): um agente interfacial para evitar interações indesejadas

Em geral, para formação das nanopartículas, é necessário um excesso de polycations em relação aos ácidos nucleicos, criando um potencial zeta positivo nas mesmas. Embora seja necessária para a captação celular, a carga superficial positiva também contribui para o surgimento de interações com constituintes dos fluidos biológicos, que podem acarretar na destruição (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015) ou na alteração de propriedades físico-químicas e biológicas dos nanocarreadores (GIACOMELLI et al., 2011). Visando a criação de nanopartículas furtivas (isto é, que se distribuam pelo organismo com o mínimo possível de interações indesejadas) ao sistema biológico, polímeros hidrofílicos neutros têm sido utilizados para revestirem as nanopartículas, sendo o PEG o polímero mais utilizado para esse fim (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). O PEG interage com água formando uma camada de hidratação na superfície das nanopartículas, que é fundamental para promover sua furtividade (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015). Além disso, as cadeias desse polímero podem ser modificadas por meio da inserção de novas moléculas que podem tornar os vetores mais seletivos à certos tipos de células, por exemplo (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

A polietilenimina (PEI) é um dos polímeros mais estudados como carreador, devido seu caráter catiônico (TIERA et al., 2011). A adição de PEG (2 kDa) na PEI (25 kDa) aumentou sua eficiência de transfecção, contudo, a adição de mais de 5 macromoléculas de PEG por PEI não resultaram em melhorias significativas na eficiência de transfecção (TANG et al., 2003). Em um outro estudo com o carreador PEI-PEG para liberação de siRNA, foi mostrado que uma baixa densidade (1-5%) de PEG (0,55 e 2 kDa) proporciona um efeito positivo na transfecção e que o aumento da densidade ou do tamanho do PEG reduz a interação do polímero com o siRNA (RHEINER; BAE, 2016).

Recentemente, mostrou-se que a adição de uma pequena fração (3,8%) de PEG (2 kDa) à quitosana possibilitou a formação de nanopartículas (com siRNA) que apresentaram uma eficiência no silenciamento genético próximo a 80%, entretanto essas nanopartículas foram preparadas com grande excesso de polycation (em relação ao siRNA). Neste mesmo estudo, foi indicado que a macropinocitose é a principal via (endocítica) adotada para internalização (em células de carcinoma cervical (HeLa)) de nanopartículas feitas a partir de quitosanas peguiladas (YANG et al., 2017). Em outro estudo, foi observado que nanopartículas (aproximadamente 250 nm) constituídas somente com quitosana são internalizadas, principalmente, via endocitose mediada por clatrina

(proteína que auxilia a formação de vesículas membranares) em macrófagos de camundongo (JIANG et al., 2017). Isso confirma a necessidade de vetores que promovam o escape endossomal, uma vez que estas vias podem levar os genes terapêuticos ao lisossomo, onde possivelmente serão degradados (KHALIL et al., 2006).

Assim, neste estudo, além da adição de novos grupos amina na cadeia de quitosana, também foram incorporadas cadeias de PEG visando a obtenção de nanopartículas coloidal e biologicamente mais estáveis.

2.3.4 Ligações dissulfeto: tornando reversível a ligação do PEG nos polícatíons

Devido as diferenças existentes entre os ambientes intracelulares, extracelulares e até mesmo entre os diferentes compartimentos dentro das células, é possível incorporar aos polícatíons estruturas que são sensíveis a estas variações ambientais, visando uma liberação bioestimulada de fármacos. Uma das estratégias mais utilizadas é a incorporação de ligações sensíveis ao pH que são clivadas durante a endocitose (LEE; KATAOKA, 2012; TIERA et al., 2011). Em exemplo elegante dessa estratégia foi o uso de ligações tioéster (sensíveis ao pH) para promover a liberação de ciclodextrina (molécula altamente desestabilizadora de membrana celulares) durante a endocitose, que culminou no escape endossomal e liberação de siRNA (anteriormente na forma de poliplexos) no citoplasma das células alvo (TAMURA; YUI, 2013).

Como mencionado anteriormente, a peguilação auxilia na manutenção da integridade dos vetores durante a biodistribuição. Entretanto, a presença de PEG pode prejudicar a fuga endossomal (TIERA et al., 2013) por promover uma menor carga superficial, dificultando a interação do poliplexo com a membrana endossomal (AGIRRE et al., 2014). Esse problema pode ser resolvido pela incorporação de ligações lábeis que permitam que as partículas liberem o PEG após a captação pela célula-alvo (ZHANG; SATTERLEE; HUANG, 2012). A alta concentração de glutathione reduzida (GSH) no interior das células, em relação ao meio extracelular, oferece subsídio à utilização de ligações dissulfeto como uma forma de ligação lábil (TIERA et al., 2013). Diante disso, o PEG pode ser incorporado aos polícatíons por meio de ligações dissulfeto que, ao interagirem com a GSH presente no endossomo (TAMURA; YUI, 2014; WANG et al., 2013), serão clivadas, liberando o PEG e propiciando uma interação mais efetiva entre os poliplexos e a membrana endossomal.

Portanto, neste estudo, o PEG (funcionalizado com um grupo tiol) foi incorporado nos derivados de quitosana (previamente modificados com DIPEA/DEAE) por meio de ligação dissulfeto, visando sua liberação bioestimulada (por GSH) no interior das células alvo. Essas modificações visam proporcionar à quitosana as propriedades necessárias para o transporte e liberação eficiente do siRNA, conforme esquematizado na Figura 3.

2.3.5 Desenvolvimento de polímeros anfifílicos

Os nanocarreadores não são estruturas com uma composição completamente homogênea, uma vez que são formados pela interação (ou ligação) de diferentes moléculas. Consequentemente eles podem apresentar domínios (regiões) com diferentes características. A presença de regiões com características mais hidrofóbicas pode auxiliar a interação com as membranas celulares (NEL et al., 2009). Deste modo, o enxerto (nos polímeros) de grupos com características hidrofóbicas pode alavancar a eficiência dos nanocarreadores na entrega do material genético.

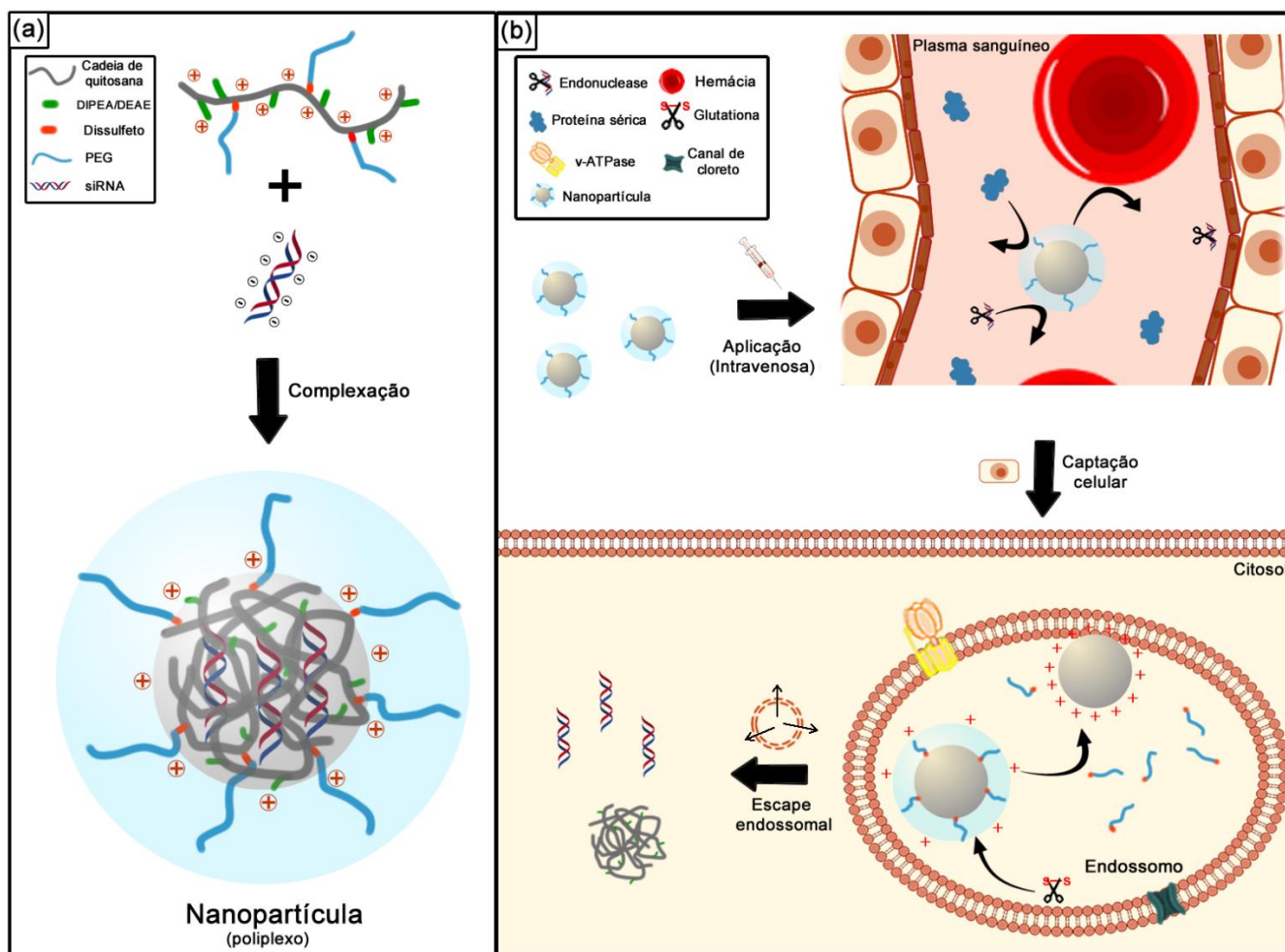
Derivados anfifílicos de quitosana também têm se mostrado uma alternativa promissora para favorecer a eficiência de transfecção (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016). Em geral, porções hidrofóbicas auxiliam na captação celular e na proteção dos genes contra o ataque enzimático, porém tendem a diminuir a interação com o ácido nucleico (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016; LAYEK; SINGH, 2016).

A incorporação de diferentes proporções de ácido hexanóico na quitosana, mostrou que uma substituição de 15% promove um grande aumento na taxa transfecção do polímero (LAYEK; SINGH, 2013). Quando esse substituinte (19%) foi associado com o PEG (3,9%; 0,75 kDa) observou-se um aumento, de quase 4 vezes, na eficiência de transfecção, se comparada com a quitosana não modificada (LAYEK et al., 2014). Quitosanas modificadas com poliamidoamina e naftalamida, também apresentaram resultados promissores, além de demonstrarem uma baixa citotoxicidade e uma boa hemocompatibilidade (SARKAR; KUNDU, 2013). Derivados contendo ftalimida e PEG apresentaram uma alta capacidade de incorporar lidocaína, formando nanopartículas de aproximadamente 200 nm (CHOOCHOTTIROS; YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2009).

Diante disso, neste trabalho, alguns polímeros apresentaram uma fração (18-27%) de ftalimida (grupo ftaloíla), visando a formação de derivados anfifílicos.

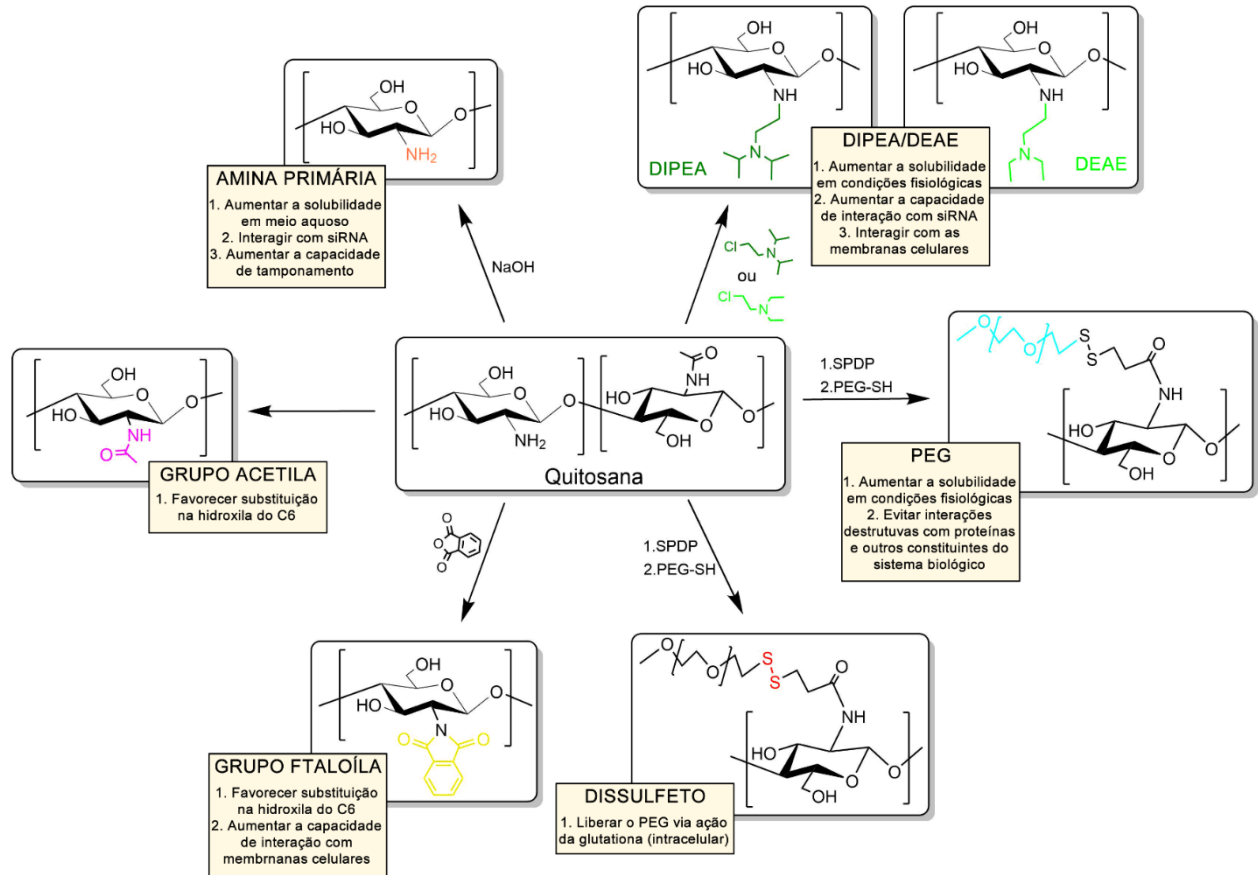
Todas as mudanças estruturais propostas, e as propriedades esperadas para as unidades constituintes dos derivados biorresponsivos estudados neste trabalho, são descritas na Figura 4.

Figura 3 – (a) Representação esquemática da preparação das nanopartículas via método de simples complexação e (b) os mecanismos envolvidos na distribuição e na liberação bioestimulada (via ação da glutathione intracelular) das nanopartículas



Fonte: Elaborado pelo autor com base em Agirre et al., 2014; Blanco; Shen; Ferrari, 2015; Elsabahy; Wooley, 2012; Jones et al., 2013; Tamura; Yui, 2014; Tiera et al., 2013; Wang et al., 2013

Figura 4 – Componentes estruturais das principais unidades dos polications em estudo, com indicativo das principais funções



Fonte: Elaborado pelo autor

3 OBJETIVOS

O objetivo principal é a síntese de nanopartículas baseadas em polímeros bioresponsivos para a liberação eficiente de RNA de interferência, visando o bloqueio da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em macrófagos da linhagem RAW 264.7, via silenciamento genético. A realização do objetivo proposto compreende as seguintes etapas:

- a) Síntese e caracterização de derivados de quitosana com avaliação do efeito da massa molecular e da composição dos polímeros nas suas propriedades físico-químicas.
- b) Preparação e caracterização das nanopartículas com siRNA anti-TNF- α , correlacionado as propriedades dos polímeros com os resultados obtidos para o tamanho, potencial zeta e estabilidade coloidal das nanopartículas em condições fisiológicas.
- c) Avaliação da citotoxicidade dos polímeros e nanopartículas e estudos de transfecção *in vitro* em macrófagos RAW 264.7, para avaliação da eficiência dos nanovetores. E correlação das eficiências de transfecção com os resultados de caracterização, visando a seleção de sistemas para estudos *in vivo*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); ácido acético glacial (Synth); ácido clorídrico (Dinâmica Ltda); agarose (Sigma-Aldrich); água deionizada (purificada por sistema GEHAKA); anidrido ftálico (Sigma-Aldrich); brometo de etídeo 10 g L^{-1} (Sigma-Aldrich); cloreto de deutério (Sigma-Aldrich); cloreto de sódio (Synth); cloridrato de 2-cloroetil-diisopropilamina (Sigma-Aldrich); dimetilacetamida (Dinâmica); dimetilsulfóxido (Synth); dimetilsulfóxido deuterado (Sigma-Aldrich); etanol; fibroblastos da linhagem 3T3/NIH; gás nitrogênio; hidróxido de sódio (Synth); isotiocianato de rodamina B (RITC) (Sigma-Aldrich); kit comercial *Murine TNF- α Standard TMB ELISA Development* (PEPROTECH®); kit de proliferação celular CellTiter96® AQueous One Solution (Promega Corporation); ladder plus DNA 1kb (invitrogen); macrófagos da linhagem RAW 264.7 (BCRJ); meio completo (Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de alta glicose, suplementado com 10-20 % (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 1% (v/v) de penicilina-spreptomycin); membrana com massa molecular de corte (MWCO) de 14 kDa (Sigma-Aldrich); membrana de MWCO de 3,5 kDa (Thermo scientific); metanol (Synth); N-Succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (Sigma-Aldrich); O-(2-mercaptoetil)-O'-metil-polietilenoglicol (Sigma-Aldrich); óxido de deutério (Sigma-Aldrich); p-formaldeído (PFA) 4% (m/v); quitosana de alta massa molecular (Sigma-Aldrich); quitosana de média massa molecular (Polymar); siRNA anti-TNF- α (sequencia senso 5'-CGUCGUAGCAAACCACCAA[dT][dT]-3' e anti-senso 3'-UUGGUGGUUUGCUACGAC G[dT][dG]-5' (Sigma-Aldrich)); siRNA marcado com 6-carboxifluoresceína amidita (Sigma-Aldrich); solução corante de carregamento para eletroforese (0,25% (m/v) azul de bromofenol; 0,25% (m/v) xileno cianol; 25% (m/v) Ficoll 400); tampão fosfato pH 7,4 (concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e força iônica ajustada em $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ com cloreto de sódio); tampão fosfato salino (PBS) 1X (cloreto de potássio $0,0027 \text{ mol L}^{-1}$; cloreto de sódio $0,1370 \text{ mol L}^{-1}$; fosfato de potássio monobásico $0,0018 \text{ mol L}^{-1}$; fosfato de sódio dibásico $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,4; tampão tris-amino-EDTA (TAE) 1X (tris base $0,04 \text{ mol L}^{-1}$; ácido acético $0,02 \text{ mol L}^{-1}$; EDTA $0,002 \text{ mol L}^{-1}$). Todos os solventes e reagentes foram utilizados tal como recebidos.

4.2 Instrumentos

Cromatógrafo Shimadzu (LC-20) com detecção por índice de refração modelo RID-10^a (Departamento de Físico-Química do IQSC); espectrômetro de ressonância magnética nuclear Agilent Technologies de 400 MHz modelo 400/54 Premium Shielded (Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC)); espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance III de 400 MHz (Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular (CMIB) do IBILCE/UNESP); leitor de placas EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc.); medidor de pH Analion; microscópio confocal da Zeiss modelo LSM 710 (software ZEN 2010; Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do IBILCE/UNESP); microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de campo JSM-6701F (JEOL, Embrapa Instrumentação de São Carlos); Zetasizer NanoZS (Malvern Instrument, Laboratório de Estudos em Peptídeos (LEPE) do IBILCE/UNESP).

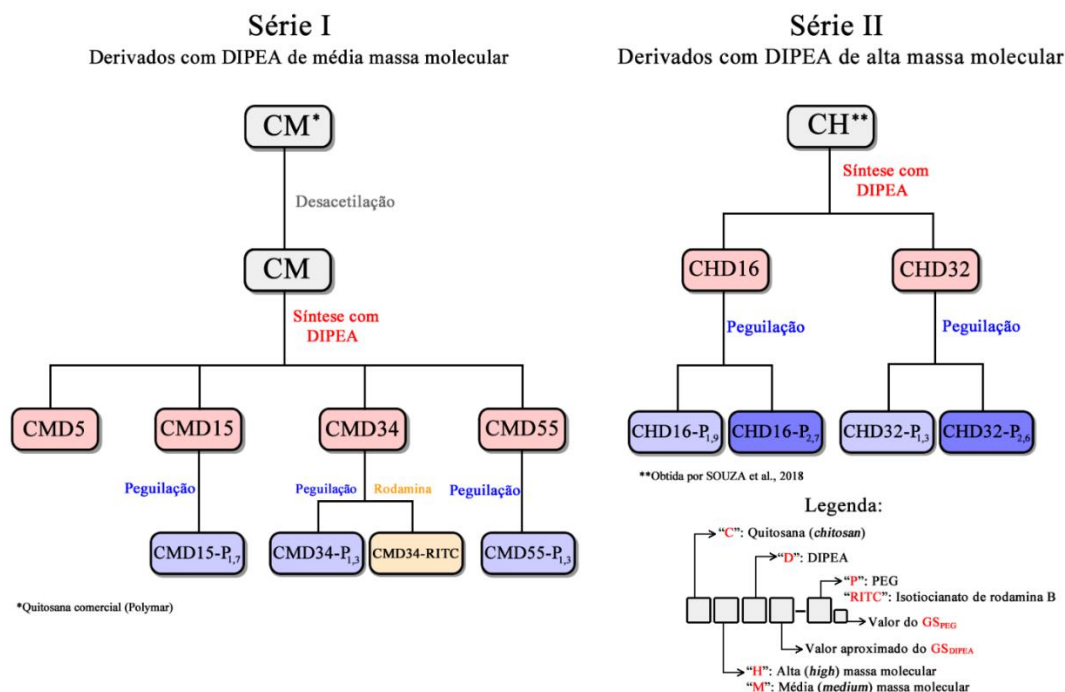
4.3 Rota sintética para obtenção dos polímeros das séries I, II e III

Foram sintetizadas duas séries de derivados modificados com DIPEA: a série I foi derivada de uma quitosana de média massa molecular (CM) e a série II teve como partida uma quitosana de alta massa molecular (CH), conforme mostra a Figura 5. Na série I, variou-se a quantidade de DIPEA (5-55%) e fixou-se a quantidade de PEG no polímero (1-2%). Já na série II, além de variar a quantidade de DIPEA (16 e 32%) também se variou a quantidade de PEG incorporado ao derivado (1-2 e 2-3%).

Além das duas séries já mencionadas, baseadas na incorporação de DIPEA à quitosana, também foi sintetizada uma terceira série que tem como substituinte grupos DEAE, incorporado em sua forma simples (isto é, somente DEAE) ou sob a forma DEAE-DEAE, sendo que esta última resulta na formação de uma amina quaternária e, portanto, confere carga positiva permanente ao polímero. Essa série, denominada série III, teve como quitosana de partida a CM, assim como a série I. Foram sintetizados dois derivados com quantidades distintas de DEAE (16 e 57%), e foi incorporado PEG (1-2%) no derivado mais substituído. A rota sintética para obtenção dos polímeros da série III e a lógica adotada para nomenclatura dos derivados são ilustradas na Figura 6. A designação de média (190-310 kDa) e alta (>310 kDa) massa molecular foi atribuída com base

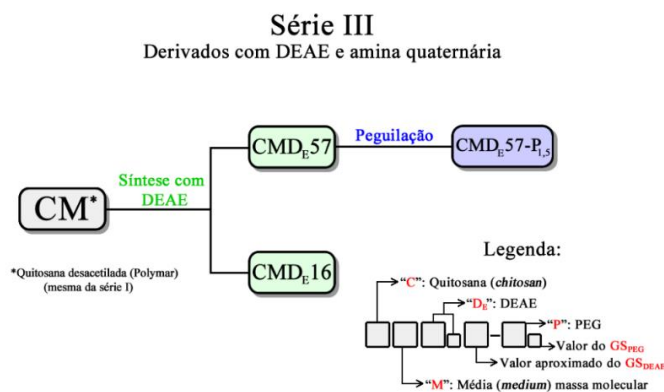
na MM das quitosanas comerciais de partida (isto é, sem passar pelo processo de desacetilação) da Sigma-Aldrich (208 kDa) e da Fluka Biochemika (400 kDa; SOUZA et al., 2018), seguindo as faixas descritas por Shuain et al., 2013.

Figura 5 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados das séries I e II com indicação da lógica adotada em suas nomenclaturas



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados da série III com indicação da lógica adotada em sua nomenclatura



Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.1 Desacetilação da quitosana

Para a desacetilação, solubilizou-se 50 g de quitosana comercial de média massa molecular em 2,5 L de ácido acético 0,35 mol L⁻¹. Em seguida, adicionou-se 0,63 L de hidróxido de sódio (NaOH) 23,5 mol L⁻¹ e aqueceu-se a mistura formada à 100 °C, em sistema de refluxo com atmosfera de nitrogênio, por 1 hora e 30 minutos. Após esse processo, separou-se a quitosana por decantação, com sucessivas trocas da solução sobrenadante por água deionizada, até que o pH da mistura atingisse a neutralidade. A quitosana foi filtrada e os processos de desacetilação e decantação foram novamente realizados. Por fim, o produto foi filtrado, seco por liofilização e nomeado quitosana desacetilada de média massa molecular (CM). Este produto foi utilizado para produção dos derivados das séries I (DIPEA de média massa molecular) e III (DEAE e amina quaternária).

A quitosana desacetilada de alta massa molecular (CH) foi obtida, utilizando-se o mesmo procedimento (SOUZA et al., 2018). A CH foi utilizada na produção dos derivados da série II (derivados com DIPEA de alta massa molecular).

4.3.2 Modificação com DIPEA/DEAE em meio aquoso: séries I, II e III

As reações foram conduzidas utilizando-se cloridrato de 2-cloroetil-diisopropilamina (DIPEA-Cl) e cloridrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina (DEAE-Cl) em procedimento adaptado ao descrito por Oliveira et al., 2013. Para a reação, a quitosana (CM ou CH) foi inicialmente solubilizada com quantidade estequiométrica ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹. A solução resultante foi aquecida a 70 °C e, sob agitação constante, teve o pH elevado para 12, por meio da adição de uma solução de NaOH 5 mol L⁻¹. A massa correspondente de DIPEA-Cl ou DEAE-Cl foi adicionada e o pH novamente ajustado em 12. O pH da solução foi monitorado ao longo da reação, adicionando-se NaOH sempre que necessário para manter o valor inicial de pH. Após 1 hora e 30 minutos, o aquecimento e a agitação foram interrompidos e a solução foi resfriada a temperatura ambiente. A mistura foi transferida para uma membrana de diálise com massa molecular de corte (MWCO) igual a 3,5 kDa e dialisada por 1 dia contra uma solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e posteriormente contra água deionizada, com sucessivas trocas do solvente até que o pH atingisse a neutralidade. Por fim, o produto (retido no interior da membrana) foi liofilizado.

Os derivados sintetizados e a razão molar do DIPEA-Cl ou DEAE-Cl em relação aos meros constituintes da quitosana (GlcN e GlcNAc) encontram-se listados na Tabela 1.

4.3.3 Modificação com PEG

O O-(2-mercaptoetil)-O'-metil-polietilenoglicol (PEG-SH) de massa molecular igual a 2 kDa foi inserido nos polímeros por meio da ativação com N-Succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP).

O procedimento foi adaptado de Kim et al., 2008, que utilizou PEG-SH para funcionalização de um siRNA modificado com uma amina primária. Solubilizou-se 0,2 g do derivado em 10 mL de ácido acético 0,03 mol L⁻¹ e adicionou-se tampão PBS 1X (pH 7,4), de modo que a concentração final do polímero fosse 10 g L⁻¹. O pH da solução foi ajustado para 7,4, com NaOH 5 mol L⁻¹. Sequencialmente, SPDP (solubilizado em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)) foi adicionado à solução polimérica, a qual foi mantida sob agitação. Após 3 horas, adicionou-se PEG-SH (solubilizado em 1 mL de PBS 1X) e manteve-se mistura reacional sob agitação à 40 °C por 16 horas. Após esse período, o produto foi mantido (sob agitação) em sistema de diálise (membrana com MWCO igual a 14 kDa) contra PBS 1X por 3 dias e depois contra uma solução de NaOH com pH entre 8-9, também por 3 dias. Durante a diálise, o PBS foi trocado uma vez ao dia e a solução de NaOH foi trocada duas vezes ao dia. Por fim, o produto (impermeável a membrana) foi recuperado por liofilização.

Os derivados modificados com PEG, assim como a quantidade (mols) de PEG-SH em relação à totalidade dos meros constituintes dos derivados (razão molar), encontram-se listados na Tabela 1. As razões molares foram determinadas com base no número de mols médio dos meros presentes no polímero. Este (número de mols), por sua vez, foi terminado com base na massa molar média dos meros ($\overline{mm}_{meros}$), cujo valor (para cada polímero) é apresentado no Apêndice A. A razão molar entre o PEG-SH e o SPDP é sempre 1.

Tabela 1 – Reagentes e composição para síntese dos polímeros das séries I, II e III

Polímero	Razão molar ^a		
	DIPEA-Cl/Mero	DEAE-Cl/Mero	PEG-SH ^b /Mero ($\times 10^{-2}$)
CMD5 ^c	0,13		
CMD15 ^c	0,42		
CMD34 ^c	0,73		
CMD55 ^c	0,93		
CMD15-P _{1,7} ^d			1,6
CMD34-P _{1,3} ^d			1,3
CMD55-P _{1,3} ^d			1,1
CHD16 ^e	0,49		
CHD32 ^e	0,93		
CHD16-P _{1,9} ^d			1,6
CHD16-P _{2,7} ^d			3,2
CHD32-P _{1,3} ^d			1,3
CHD32-P _{2,6} ^d			2,3
CMD _E 16 ^c		0,74	
CMD _E 57 ^c		1,77	
CMD _E 57-P _{1,5} ^d			2,0

^a Razão molar entre a unidade de repetição (mero) do polímero de partida e o substituinte para síntese dos derivados. DIPEA-Cl: cloridrato de 2-cloroetil-diisopropilamina; DEAE-Cl: cloridrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina; PEG-SH: O-(2-mercaptoetil)-O'-metil-polietilenoglicol.

^b A razão molar entre o PEG-SH e o SPDP, na síntese dos derivados peguilados, é sempre 1. SPDP: N-Succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato

^c Quitosana de partida de média massa molecular (CM).

^d Os derivados substituídos por PEG têm como polímero de partida os derivados já substituídos com DIPEA/DEAE.

^e Quitosana de partida de alta massa molecular (CH) (SOUZA et al., 2018).

Fonte: Dados da pesquisa

4.3.4 Marcação fluorescente com isotiocianato de rodamina B (RITC)

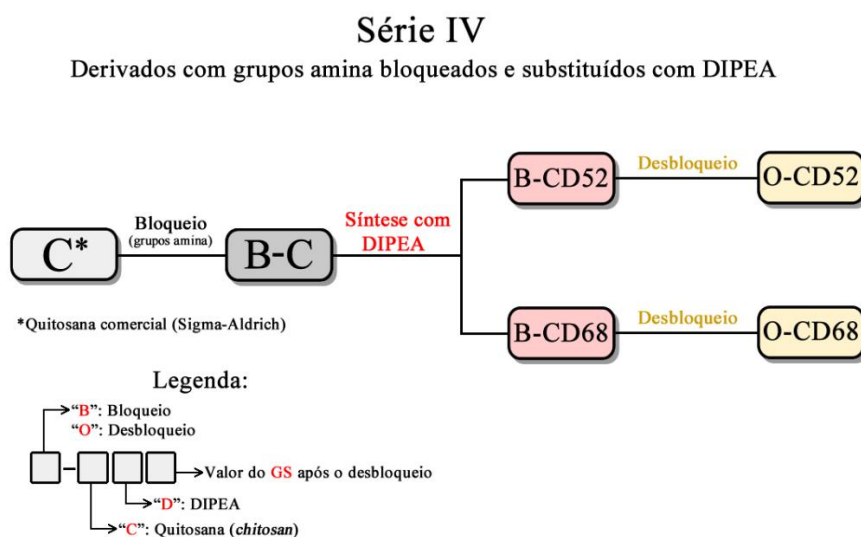
A marcação do CMD34 com isotiocianato de rodamina B (RITC) foi realizado conforme descrito por Picola et al., 2013. A presença do fluoróforo no polímero permite a observação da internalização e distribuição das nanopartículas nas células, por meio da microscopia confocal (Picola et al., 2013; item 4.8). Para reação, 0,12 g do derivado foram previamente dissolvidos em um a solução de ácido acético 0,1% (v/v), em seguida, o pH foi ajustado em 6,2 com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A solução resultante foi mantida sob agitação em atmosfera de nitrogênio por 30 minutos e então, adicionou-se (lentamente) 3,5 mL de uma solução metanólica de RITC 0,2% (m/v). A reação foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e agitação constante por 18 horas, em temperatura ambiente. Após esse período, a mistura foi transferida para uma membrana de diálise com MWCO igual a 3,5 kDa e dialisada por 1 dia contra uma solução de NaOH 0,05 mol

L⁻¹ e posteriormente contra água deionizada, por aproximadamente 10 dias com troca diária do solvente. Por fim, o produto foi recuperado por liofilização, purificado por lavagem a exaustão (soxhlet) com acetona e seco. O polímero resultante foi nomeado CMD34-RITC. Todos os procedimentos foram realizados ao abrigo da luz.

4.4 Rota sintética para obtenção dos polímeros da série IV

Diferentemente das séries tratadas até o momento, na série IV buscou-se a obtenção de derivados com grupos DIPEA inseridos majoritariamente na hidroxila ligada ao carbono 6 (C6). Devido à reatividade de ambos os grupos (amina e álcool) frente a reação de substituição, a etapa inicial envolveu o bloqueio dos grupos amina da quitosana. Assim, partindo-se da quitosana bloqueada (B-C) pôde-se obter derivados com distintas proporções de DIPEA (52 e 68%). A rota sintética para obtenção dos polímeros da série IV e a lógica adotada para nomenclatura dos derivados são apresentadas na Figura 7.

Figura 7 – Organograma da rota sintética para obtenção dos derivados da série IV com indicação da lógica adotada em sua nomenclatura



Fonte: Elaborado pelo autor

4.4.1 Bloqueio dos grupos amina com anidrido ftálico

O procedimento adotado para realização do bloqueio foi adaptado do descrito por Ifuku et al., 2011. Para a reação, 39,5 g de anidrido ftálico foram adicionados em 20 g de quitosana comercial da Sigma-Aldrich (C*), previamente solubilizada em 2 L de ácido acético 10% (v/v). A mistura reacional foi mantida sob agitação e em sistema de refluxo à 120°C. Após 24 horas, cessou-se o aquecimento e, assim que resfriada, a mistura reacional foi centrifugada por 30 minutos (900 g). O precipitado foi ressuspensionado com água deionizada e novamente centrifugado. Por fim, o produto (precipitado) foi ressuspensionado em etanol, centrifugado, purificado por lavagem a exaustão (soxhlet) com etanol e seco a temperatura ambiente. O produto obtido foi designado como quitosana comercial bloqueada com anidrido ftálico (B-C). As soluções etanólicas de anidrido ftálico foram armazenadas para descarte adequado.

4.4.2 Modificação com DIPEA em solvente orgânico: série IV

Para inserção do DIPEA na B-C utilizou-se o DIPEA-Cl, porém com procedimento distinto ao descrito anteriormente (item 4.3.2.1). Inicialmente, dispersou-se 0,75 g da quitosana bloqueada (B-C) em 40 mL de dimetilacetamida e manteve-se sob agitação por 24 horas. A temperatura da mistura foi elevada para 70 °C e então, adicionado o volume correspondente de NaOH 10 mol L⁻¹ seguido da adição do DIPEA-Cl. Após 2 horas e 30 minutos cessou-se o aquecimento e a agitação. A mistura foi transferida para uma membrana de diálise (MWCO de 14 kDa) e mantida por 1 dia contra uma solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ e posteriormente contra água deionizada, com sucessivas trocas do solvente. O produto foi mantido em diálise contra água deionizada por um período de 3 dias somado ao tempo necessário para o pH atingir a neutralidade. Por fim, o produto foi liofilizado. As primeiras soluções de diálise foram concentradas e armazenadas para o descarte apropriado.

Os derivados sintetizados, assim como a razão molar do DIPEA-Cl e do NaOH em relação aos meros constituintes da B-C, encontram-se listados na Tabela 2. A quantidade adicionada de NaOH foi calculada considerando um excesso de 3 mol, além do necessário para reagir com o próton ácido do DIPEA-Cl.

Tabela 2 – Reagentes e composição para síntese dos polímeros da série IV

Polímero	NaOH/Mero ^a	DIPEA-Cl/Mero ^a
B-CD52	4,1	1,0
B-CD68	5,1	2,0

^a Razão molar entre a unidade de repetição (mero) da quitosana bloqueada (B-C) e o NaOH ou DIPEA-Cl para síntese dos derivados. DIPEA-Cl: cloridrato de 2-cloroetil-diisopropilamina.

Fonte: Dados da pesquisa

4.4.3 Desbloqueio dos grupos amina

Para a reação, 0,7 g do derivado bloqueado já substituído com DIPEA (B-CD52 ou B-CD68) foi disperso em 0,3 L de NaOH 10 mol L⁻¹ e mantido em um reator vedado a 120°C por 48 horas. Assim que a mistura foi resfriada, adicionou-se ácido acético glacial até o pH atingir aproximadamente 5. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro quantitativo (porosidade de 11 µm) e teve seu pH elevado para 14, por meio da adição de uma solução de NaOH 10 mol L⁻¹. A mistura formada foi centrifugada por 30 minutos (900 g) e o precipitado (produto) ressuspenso com água deionizada. O mesmo, foi fracionado e mantido em diálise (membrana com MWCO igual a 14 kDa) contra uma solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ por 1 dia e posteriormente contra água deionizada, por aproximadamente 10 dias com troca diária do solvente. Por fim, o produto foi liofilizado e renomeado (O-CD52 ou O-CD68).

4.5 Caracterização dos polímeros

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

O grau de desacetilação (GD), substituição por DIPEA (GS_{DIPEA}), DEAE (GS_{DEAE}), PEG (GS_{PEG}) e o grau de bloqueio (GB) dos polímeros foram determinados por RMN ¹H. As análises foram realizadas a 70 °C em um espectrômetro Agilent Technologies de 400 MHz (modelo 400/54 Premium Shielded), com um tempo de aquisição entre 4 a 5 s e de relaxamento de 1 s. Entre 64 a 160 varreduras foram acumuladas. Para caracterização dos polímeros das séries I, II e III, as amostras foram dissolvidas em uma solução de cloreto de deutério (DCl)/óxido de deutério (D₂O) 2,8% (v/v), de modo que a concentração final do polímero fosse 10 g L⁻¹. Na análise dos polímeros

da série IV, o D₂O foi substituído por DMSO deuterado (DMSO-d₆), sendo que a concentração final de polímero foi mantida em 10 g L⁻¹. O sinal de referência utilizado para as amostras em DCl/D₂O foi o da água (4,7 ppm (GUNN; PARANJI; ZHANG, 2009)) e o para as amostras em DCl/DMSO-d₆ foi o do DMSO (2,5 ppm).

Para se determinar a fração de cada constituinte da amostra por RMN, inicialmente é necessário definir uma região do espectro, composta por um ou mais sinais, para atuar como referência e, portanto, representa uma fração conhecida do todo. Assim, a área sob essa região do espectro, quando comparada a um sinal característico de um constituinte da amostra, fornece sua composição percentual na mesma. Neste estudo, tomou-se como valor de referência a área que corresponde a um hidrogênio presente no anel glicopiranosídeo (I_H) constituinte dos polímeros. Para as análises realizadas em D₂O/DCl (séries I, II e III), este hidrogênio é o ligado ao carbono anomérico. Já para as análises realizadas em DMSO-d₆/DCl (série IV), este valor corresponde a uma média dos hidrogênios presente no anel glicopiranosídeo que podem ser observados no espectro de RMN (isto é, que não coalescem com o sinal do solvente) e é determinado pela Equação 1. Onde, I_{Tot} é a área que abrange todos os hidrogênios glicopiranosídeos analisados e, quando presente, também os hidrogênios metílicos e metilênicos do DIPEA. I_{DIPEA} é a área sob o sinal referente aos hidrogênios metila (CH₃) do DIPEA, vale ressaltar que na quitosana bloqueada (C-B) sem substituinte o seu valor é nulo. N é o número de hidrogênios glicopiranosídeos analisados, sendo que neste estudo foram atribuídos 6 hidrogênios glicopiranosídeos ao valor de N (isto é, $N = 6$), conforme indicado no item 5.1.4. O desenvolvimento dessa Equação é mostrado no Apêndice B.

$$I_H = \frac{I_{Tot} - \frac{I_{DIPEA}}{2}}{N} \quad \text{Equação 1}$$

Para determinação do GD (relação entre a quantidade de meros não acetilados e o total de meros do polímero), comparou-se a área sob o sinal referente aos hidrogênios metila do grupo acetila (I_{Ac}) com a I_H , como é mostrado na Equação 2. Por essa definição, subentende-se o conceito do grau de acetilação (GA), dado pela fração dos meros remanescentes (isto é, $GA = 100 - GD$)

$$GD = \left[1 - \frac{I_{Ac}}{3I_H} \right] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

O GS representa a relação entre a quantidade do substituinte (DIPEA ou DEAE) e a totalidade de meros do polímero. Para sua determinação, comparou-se a área sob o sinal referente

aos hidrogênios metila (CH_3) do substituinte (I_S) com I_H , como é mostrado na Equação 3. Onde, M é o número de hidrogênios metila do substituinte, ou seja, $M = 6$ para o DEAE e $M = 12$ para o DIPEA. Quando o substituinte é o DIPEA, o grau de substituição é denominado GS_{DIPEA} . Já nos polímeros em que a substituição foi feita por grupos DEAE, o GS passa a ser nomeado como GS_{DEAE} e engloba tanto os grupos DEAE não quaternizados quanto os grupos quaternizados (DEAE-DEAE). Quando o GS de DEAE refere-se somente aos grupos quaternizados, ele é denominado $\text{GS}_{\text{Q-DEAE}}$ e o I_S passa a se referir somente aos hidrogênios metila das unidades quaternizadas do substituinte.

$$GS = \frac{I_S}{MI_H} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

O GS_{PEG} é calculado pela Equação 4, onde I_{PEG} é a área sob o sinal referente aos hidrogênios metileno da unidade de repetição ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$) do PEG. O GS_{PEG} é a relação entre a quantidade de PEG (macromolécula) e a totalidade de meros do derivado de quitosana.

$$GS_{\text{PEG}} = \frac{I_{\text{PEG}}}{172I_H} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

O GB é a somatória de todos os meros constituídos com pelo menos um grupo amida (ou imida) em relação a totalidade de meros do polímero. Ou seja, é a fração percentual dos meros que não possui grupo amina para reação com DIPEA-Cl. O GB é calculado por meio da Equação 5, onde I_{AR} é a área sob o sinal referente aos hidrogênios aromáticos do anidrido fálco.

$$GB = \left[\frac{I_{\text{AR}}}{4I_H} + \frac{I_{\text{Ac}}}{3I_H} \right] \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.5.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C)

As análises de RMN ^{13}C foram realizadas a 20 °C (Série I) ou a 30 °C (Série II) com uma frequência de 150,9 MHz e largura de pulso de 12°, em um espectrômetro Bruker Avance II de 400 MHz. O tempo de aquisição foi de 0,4 s e o de relaxamento de 2 s, com acumulação de 20 000 varreduras. As amostras foram dissolvidas em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$ 5,0% (v/v) de modo que a concentração final de cada polímero da série I fosse 70 g L^{-1} e da série II fosse 22 g L^{-1} .

O grau de substituição estimado de DIPEA na hidroxila ($\text{GS}_{\text{OH-DIPEA}}$) foi calculado conforme a Equação 6. Onde I_{C1} é o valor de referência e representa a área sob o sinal do carbono anomérico (C1) e I_{C6s} é a área sob o sinal do C6 do mero que possui o substituinte na hidroxila.

$$GS_{OH-DIPEA} = \frac{I_{C6s}}{I_{C1}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

O grau de substituição de DIPEA nos derivados, também foi determinado pela análise de RMN ^{13}C ($GS_{DIPEA-C}$), conforme indicado na Equação 7. Onde $I_{C-DIPEA}$ é a área sob os sinais dos carbonos metileno do DIPEA.

$$GS_{DIPEA-C} = \frac{I_{C-DIPEA}}{2I_{C1}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

4.5.3 Determinação do grau de substituição por rodamina (GS_{RITC}) via espectroscopia de absorção na região do UV-Visível

A determinação do GS_{RITC} foi realizada conforme descrito por Picola et al., 2013. Inicialmente, preparou-se uma curva analítica com soluções de rodamina de concentração entre $0,5 \times 10^{-5}$ e $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando uma solução estoque de rodamina $7,99 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Como solvente, empregou-se uma solução de metanol/tampão acetato (ácido acético $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ / acetato de potássio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) 50% (v/v). A absorbância máxima foi medida no comprimento de onda de 554 nm.

Para determinação da absorbância do CMD34-RITC, solubilizou-se 2,5 mg do polímero em 3 mL de solvente (metanol/tampão acetato). Como branco, empregou-se uma solução do CMD34 (sem rodamina) nas mesmas condições (concentração e mesmo solvente) em que o CMD34-RITC foi preparado. O conhecimento da concentração de rodamina (via lei de Lamber-Beer) na solução polimérica, permite a determinação da quantidade de rodamina incorporada ao polímero e consequentemente, o GS_{RITC} , conforme indicado pela Equação 8. Onde, n_{RITC} é o número de mol de rodamina na amostra polimérica, m_{pol} é a massa (g) do polímero (CMD34-RITC) e $\overline{mm}_{meros}$ é a massa molar média (g mol^{-1}) dos meros presentes no derivado antes da marcação com RITC (para o CMD34 é 206 g mol^{-1} (Apêndice A)). A massa molar do isotiocianato de rodamina é $538,1 \text{ g mol}^{-1}$, conforme informação do fabricante.

$$GS_{RITC} = \frac{n_{RITC}}{\frac{(m_{pol} - n_{RITC} \times 538,1)}{\overline{mm}_{meros}}} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

4.5.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC): estimativa da massa molecular dos polímeros

Por meio da GPC estimou-se a massa molecular média numérica ($\bar{M}_n$) e a ponderal ($\bar{M}_w$) dos polímeros, em procedimento adaptado ao descrito por Kasaai et al., 1999. As medidas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (LC-20^a) com detecção por índice de refração modelo RID-10^a. Duas colunas em série: SB-803 HQ e SB-805-HQ (Shodex), com tamanhos de 0,8 cm × 30 cm, foram utilizadas para separação das cadeias poliméricas. Como eluente, empregou-se tampão acetato (ácido acético 0,3 mol L⁻¹/ acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹) com pH 4,5, em uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ a uma temperatura de 40 °C. A concentração de cada amostra foi de 5 g L⁻¹, preparada na mesma solução tamponante empregada como eluente. Os padrões utilizados para fazer a curva analítica foram soluções monodispersas (índice de polidispersão menor que 1,1) de pululana com massa molecular variando entre 6,2 a 805,0 kDa. As medidas foram realizadas no Grupo de Fotoquímica, do Instituto de Química de São Carlos-USP.

4.5.5 Capacidade de tamponamento e grau de ionização

A capacidade de tamponamento (CT) e do grau de ionização (GI) foram determinados seguindo o mesmo procedimento. Para o estudo das séries I, II e III, a massa correspondente de polímero (previamente seco) foi solubilizada em 40 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹ com a força iônica (I) ajustada em 0,15 mol L⁻¹ por meio da adição de 0,35 g de cloreto de sódio. Em seguida, a solução teve o pH monitorado durante a titulação com uma solução padronizada de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Na análise dos polímeros da série IV seguiu-se o mesmo procedimento, porém também foi adicionado DMSO à solução, em uma concentração final de 1% (v/v). Deste modo, nesta série, foi realizada a titulação de um controle de DMSO 1% (v/v) em HCl 0,01 mol L⁻¹ com I = 0,15 mol L⁻¹ (NaCl) para verificar sua influência na titulação.

A massa (g) de polímero (m_{pol}) empregada na titulação foi determinada de modo a se obter $2,36 \times 10^{-4}$ mol de aminas totais para os polímeros das séries I, II e III e $1,18 \times 10^{-4}$ mol de aminas totais para os polímeros das séries IV. A m_{pol} foi determinada conforme indicado na Equação 9, onde, n_{aminas} é o número de mol de aminas totais desejado, $\bar{m}_{meros}$ é a massa molar média (g mol⁻¹) dos meros do polímero e β é a quantidade relativa de grupos aminas (totais) por mero do mesmo (vide Apêndice A).

$$m_{pol} = n_{aminas} \times \frac{\overline{m}_{meros}}{\beta} \quad \text{Equação 9}$$

A capacidade de tamponamento é representada por uma curva de titulação, após os dados serem normalizados para que todas as curvas de titulação se iniciem em pH 2,6.

A partir dos pontos de máximos e/ou de inflexão desta mesma curva sem a normalização (visualizados pela primeira e segunda derivadas (Apêndice E)), obteve-se o volume de NaOH em cada ponto final instrumental (PFI) para determinação do **GI** (%) em função do pH. O volume no primeiro PFI (V_i) se refere ao volume necessário para neutralizar o excesso de HCl, e portanto, onde se inicia a desprotonação (**GI** = 100%, grupos amina estão protonados). O volume no ultimo PFI (V_f) trata-se do volume necessário para desprotonar os grupos amina (**GI** = 0%). O GI para os volumes (V_m) entre o primeiro e o segundo PFI é calculado por meio da Equação 10.

$$GI = [1 - \frac{(V_m - V_i)}{(V_f - V_i)}] \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

4.6 Preparação e caracterização das nanopartículas

4.6.1 Formação das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas pelo método de complexação simples (DRAGICEVIC; MAIBACH, 2016; YANG et al., 2017). Para tal, preparou-se (inicialmente) uma solução estoque de polímero por meio da solubilização de 2 a 4 mg do mesmo em 0,2 mL de HCl 0,07 mol L⁻¹, seguido da adição de 1,8 mL de tampão fosfato pH 7,4. Em seguida, fixou-se a quantidade de siRNA dependendo do tipo de caracterização realizada e adicionou-se ao mesmo, diferentes volumes da solução estoque de polímero de modo a formar poliplexos em diferentes razões N/P (N= grupos amina; P= grupos fosfato). Agitou-se a mistura vigorosamente e depois deixou-a 30 minutos em baixa rotação orbital, para estabilização dos poliplexos que foram formados.

A razão N/P é a razão entre o total de grupos aminos presentes na amostra polimérica e o total de grupos fosfato no montante de ácido nucleico (neste caso, o siRNA) empregado na análise. Uma vez fixada a quantidade de siRNA, o volume (mL) da solução polimérica (V_{pol}) que deve ser adicionado para originar as distintas razões N/P é determinado pela Equação 11. Onde, m_{pol} é a massa (g) do polímero e V_{sol} é o volume (mL) total de solvente que foi empregado em sua solubilização (soma dos volumes de HCl, tampão e outros, quando presentes), m_{siRNA} é a massa

(g) de siRNA empregada na análise e $\overline{mm}_{meros}$ é a massa molar média (g mol⁻¹) das unidades constituintes do polímero (ou seja, dos meros). β é a quantidade relativa de grupos aminas (totais) por mero do polímero e R é a razão N/P. A massa molar do siRNA e o número de grupos fosfato por macromolécula (de siRNA) são 13400 g mol⁻¹ e 42, respectivamente. Os valores de $\overline{mm}_{meros}$ e de β dependem da composição do polímero e portanto, são determinados com base nos resultados da espectroscopia de RMN ¹H, conforme é detalhado no Apêndice A.

$$V_{pol} = \frac{V_{sol} \times \left(\frac{m_{siRNA} \times 42}{13400} \right)}{\frac{m_{pol}}{\overline{mm}_{meros}} \times \beta} \times R \quad \text{Equação 11}$$

4.6.2 Ensaio de liberação do siRNA em gel de agarose

Neste estudo, para preparar a solução dos poliplexos, fixou-se a quantidade de siRNA em 0,5 µg e o volume da solução dos poliplexos em 10 µL, sendo que destes, 1,6 µL são da solução corante de carregamento (do inglês *Loading Dye Solution*, usada para facilitar o rastreamento visual da migração do siRNA durante a eletroforese), que foi adicionado aos poliplexos imediatamente antes de sua aplicação no gel de agarose. As razões N/P estudadas foram 0,1,2,3,5,7,10, 15 e 20 (dependendo da série analisada), e como padrão comparativo utilizou-se o Ladder DNA 1 Kb (Ld).

O gel de agarose foi preparado por meio da dissolução de 0,2 g de agarose em 25 mL de TAE 1X, seguido da adição de 10 µL de brometo de etídeo (10 g L⁻¹). Assim que resfriado (solidificado), aplicou-se as soluções dos poliplexos no gel, que foi deixado em corrida por 1 hora e 15 minutos sob um potencial de 80 volts. O tampão TAE 1X foi empregado como condutor elétrico durante a corrida.

O experimento foi realizado em uma cuba com dimensões: 8,5 cm × 6 cm × 0,5 cm (comprimento × largura × altura), e o gel revelado em um transiluminador UV.

4.6.3 Espalhamento de luz: determinação do diâmetro hidrodinâmico (Dh) e potencial zeta das nanopartículas

Neste estudo, a quantidade de siRNA foi fixada em 5 µg e o volume da solução dos poliplexos em 1 mL. Analisou-se o diâmetro hidrodinâmico e a polidispersividade dos poliplexos nas razões N/P 1,3,5,7 e 10. Cada razão N/P foi realizada em triplicata e cada uma mensurada 3

vezes em um Zetasizer NanoZS (Malvern Instrument). Os resultados de diâmetro hidrodinâmico (Dh) foram expressos com base na média-Z. As nanopartículas foram preparadas em triplicata e cada uma analisada 3 vezes, sendo os resultados expressos como (média $\pm$ desvio padrão).

4.6.4 Estabilidade coloidal das nanopartículas em condições fisiológicas de pH e força iônica na presença e ausência de albumina

As nanopartículas obtidas na razão N/P 10 tiveram seu Dh e polidispersividade (PDI) monitorados em função do tempo, na presença e na ausência de albumina sérica bovina (BSA). A quantidade de siRNA e volume dos poliplexos para as amostras na ausência de BSA são os mesmos descritos no item 4.6.3. Os tempos estudados foram: 0; 0,5; 2; 4; 7 e 24 horas, sendo que entre as análises as nanopartículas foram mantidas sob baixa agitação orbital a 37 °C. As nanopartículas foram preparadas em duplicata e cada uma analisada 3 vezes. Os resultados foram expressos como (média $\pm$ desvio padrão).

Para avaliar o efeito das proteínas na estabilidade, após o período de estabilização dos poliplexos (30 minutos sob agitação orbital) adicionou-se 0,2 mL de uma solução estoque de BSA 220 mg mL⁻¹ (filtrada duas vezes em um filtro de 0,22 μ m) e agitou-se vagarosamente. Assim, a concentração BSA na solução analisada foi de 40 mg mL⁻¹ (GIACOMELLI et al., 2011). Neste estudo, a quantidade de siRNA foi fixada em 5 μ g e o volume da solução dos poliplexos/BSA em 1,1 mL. Os tempos estudados foram: 0; 1; 2; 4 e 7 horas e entre as análises, as nanopartículas foram mantidas sob baixa agitação orbital a 37 °C. As nanopartículas foram preparadas em duplicata e cada uma analisada 3 vezes, porém apenas um dos dois conjuntos de análises foram representados na forma de uma curva de distribuição para promover a comparação entre os resultados obtidos.

4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG)

As nanopartículas foram previamente preparadas e analisadas conforme descrito no item 4.6.3. Sequencialmente foram fixadas, por evaporação do solvente, em uma placa de silício e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com canhão de emissão de elétrons do tipo FEG (*Field Emission Gun*) em um microscópio JSM-6701F (JEOL). As amostras foram examinadas sob uma tensão de aceleração de 2,0 kV.

4.7 Ensaio de proliferação celular com MTS: citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas

A viabilidade celular na presença dos polímeros foi determinada com o kit comercial de proliferação celular *CellTiter96® AQueous One Solution (Promega Corporation)*, composto de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetóxfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) e etossulfato de fenazina (PES).

As células utilizadas nos ensaios foram fibroblastos da linhagem 3T3/NIH e macrófagos da linhagem RAW 264.7. Para tal, as células foram inicialmente cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células/poço (em 200 μL de meio completo) e mantidas em incubação umidificada (37°C com atmosfera de 5% de CO_2) por 24 horas. Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se 200 μL das soluções poliméricas (em meio completo) nas concentrações 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 g L^{-1} . Como controles positivo e negativo para citotoxicidade empregou-se, respectivamente, dodecil sulfato de sódio (SDS) 3% (m/v) (INÁCIO et al., 2011) e células não tratadas. Novamente, as células foram mantidas em incubação por 24 horas e, então, o meio sobre elas foi retirado e adicionado 100 μL de meio incompleto (somente DMEM) seguido da adição de 20 μL de MTS/PES. Após um período de incubação de 3 horas, mediu-se a absorbância dos poços em um leitor de placas (Biotek Elx 808) no comprimento de onda de 490 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada conforme mostrado na Equação 12. Onde, A_{cel} é a absorbância do controle negativo de citotoxicidade (isto é, somente células não tratadas), A_{SDS} é a absorbância do controle positivo (de citotoxicidade) e $A_{amostra}$ é a absorbância do poço com a amostra. Os estudos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como (média $\pm$ desvio padrão).

$$Viabilidade\ ceular = \frac{(A_{amostra} - A_{SDS})}{(A_{cel} - A_{SDS})} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Para o preparo das soluções poliméricas aplicadas as células, inicialmente fez-se um estoque de polímero com concentração 2,5 g L^{-1} . Para tal, 5,0 mg dos polímeros foram solubilizados em 0,2 mL de HCl 0,1 mol L^{-1} seguido da adição de 1,8 mL de meio completo. Desde modo, um controle ácido (contendo somente HCl e meio completo) também foi empregado para averiguar possíveis efeitos sobre as células.

A viabilidade celular na presença das nanopartículas foi realizada modo análogo à viabilidade na presença dos polímeros. Para preparação dos poliplexos, a quantidade de siRNA foi fixada em 0,55 µg e o volume da solução dos poliplexos em 50 µL. Assim que estabilizadas (isto é, após 30 minutos em agitação orbital), a solução de nanopartículas (50 µL) e 150 µL de meio completo foram aplicados sobre as células. As razões N/P estudadas foram: 1, 5, 10 e 20 para os polímeros da série I e para os polímeros da série II, também foi estudada a razão N/P 50. Controles de siRNA livre e tampão fosfato pH 7,4, preparados e aplicados sob as mesmas condições dos poliplexos, também foram empregados.

Os dados foram analisados por teste-T não pareado seguindo o método de Holm-Sidak, com uma significância estatística (α) de 0,05, usando o software Prism (GraphPad software Inc.).

4.8 Estudo de internalização celular por meio da microscopia confocal

No estudo de internalização, utilizou-se nanopartículas formadas pelo polímero CMD34-RITC com um controle negativo (universal) de siRNA (isto é, não complementar às sequências de mRNA conhecidas) marcado com 6-carboxifluoresceína amidita (siRNA-FAM).

O procedimento utilizado foi adaptado do descrito por Martins et al., 2019. As células utilizadas no ensaio foram macrófagos da linhagem RAW 264.7, plaqueadas sobre lamínulas de vidro que foram previamente dispostas nos poços de uma placa de 6 poços. As células foram semeadas em uma densidade de $3,8 \times 10^5$ células/poço (em 4 mL de meio completo), e mantidas em incubação umidificada (37°C com atmosfera de 5% de CO₂) por cerca de 20 horas. Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se 1 mL da solução de nanopartículas e 3 mL de meio incompleto (sem antibióticos e FBS) sobre as células, que foram mantidas em incubação por 4 horas. Após esse período, o meio foi retirado e as células lavadas com PBS para serem fixadas com (1 mL) p-formaldeído (PFA) 4% por 15 minutos e coradas com (1 mL) 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1 mg L⁻¹ por 10 minutos. A fixação com PFA e a coloração do núcleo com DAPI foram realizadas em temperatura ambiente. Realizou-se a lavagem das células com PBS 1x após a adição de PFA e DAPI. Em seguida, as lamínulas foram dispostas sobre lâminas de vidro e as imagens capturadas usando um microscópio confocal da Zeiss modelo LSM 710 (software ZEN 2010) no Laboratório de Microscopia e Microanálise (IBILCE/UNESP).

Neste estudo, as nanopartículas (1 mL) foram preparadas na razão N/P 10 e a quantidade de siRNA-FAM foi fixada em 5 µg. Para os cálculos (Equação 11, item 4.6.1), tem-se que a massa molar do siRNA-FAM é 13853 g mol⁻¹ e assumiu-se que o número de grupos fosfato por macromolécula (de siRNA) é 40.

4.9 Estudo de transfecção *in vitro*

A eficiência de transfecção foi determinada por meio da quantificação do TNF-α (proteína) produzido pelos macrófagos RAW 264.7, usando o kit comercial *Murine TNF-α Standard TMB ELISA Development* (PEPROTECH®).

As células foram inicialmente cultivadas em placas de 24 poços a uma densidade de 1,8×10⁵ células/poço (em 1 mL de meio completo) e mantidas em incubação umidificada (37°C com atmosfera de 5% de CO₂) por cerca de 20 horas. Após esse período, o meio foi retirado e as células foram lavadas (duas vezes) com 1 mL de meio incompleto. Em seguida, adicionou-se sobre as células 0,45 mL da solução de nanopartículas (equivalente à 5 µg de siRNA anti-TNF-α) e 1,35 mL de meio (com ou sem FBS, mas sempre sem antibióticos). Novamente, as células foram mantidas em incubação por 5 horas e depois o meio que estava sobre elas foi trocado por 1 mL de meio completo. Após 24 horas do início da transfecção (isto é, da aplicação das nanopartículas sobre as células), o meio foi trocado por 0,3 mL de meio completo contendo Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* em uma concentração de 100 ng mL⁻¹, para estimular a produção de TNF-α (ROUSSELET, 2018). As células foram mantidas em incubação por um período de 4 horas (YANG et al., 2017) e em sequência o sobrenadante foi removido, centrifugado (12000 g) e estocado (-20 °C) para a posterior quantificação do TNF-α via ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), conforme as instruções do fabricante.

Neste estudo, a quantidade de siRNA anti-TNF-α foi fixada em 5 µg e o volume da solução dos poliplexos em 0,45 mL. As razões N/P estudadas foram: 1, 5 e 10. Controles de siRNA livre, células tratadas somente com LPS (Cels+LPS) e células sem nenhum tipo de tratamento (Cels) também foram avaliados.

O ensaio de ELISA envolve várias etapas, cujo o procedimento final é uma avaliação colorimétrica que, neste caso, indica a quantidade de TNF-α presente na amostra. Para a análise, as amostras (sobrenadante das células) foram previamente diluídas (1:40) em PBS e a quantidade

de TNF- α foi expressa em relação à absorbância (em 450 nm) das células tratadas somente com LPS ($A_{Cels+LPS}$), conforme mostra a Equação 13.

$$\textbf{Expressão TNF}\alpha \text{ (\%)} = \frac{A_{amostra}}{A_{Cels+LPS}} \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

Vale ressaltar, que no estudo de transfecção trabalhou-se com as mesmas concentrações do ensaio de citotoxicidade das nanopartículas (item 4.7), para que pudessem serem aplicadas, no estudo de transfecção, as condições com uma alta taxa de viabilidade celular.

Os estudos foram realizados em triplicata e os resultados de foram expressos como (média $\pm$ desvio padrão). Os dados foram analisados por teste-T não pareado seguindo o método de Holm-Sidak, com uma significância estatística (α) de 0,05, usando o software Prism (GraphPad software Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos polímeros

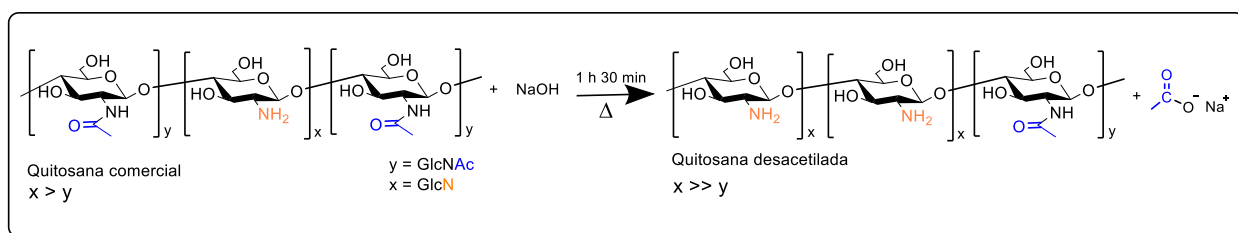
5.1.1 RMN ^1H dos polímeros das séries I, II e III

5.1.1.1 Grau de desacetilação (GD) das quitosanas de partida (séries I, II, III)

Dada a importância dos grupos amina para a entrega efetiva dos genes nas células-alvo, a quitosana obtida comercialmente foi submetida a uma reação de hidrólise básica para remoção dos grupos acetila (GlcNAc), conhecida como reação de desacetilação, para aumentar a quantidade de grupos amina (GlcN) na cadeia polimérica.

A reação de desacetilação é uma substituição nucleofílica acílica, na qual o íon acetato é eliminado ao fim da reação, conforme ilustra o esquema apresentado na Figura 8.

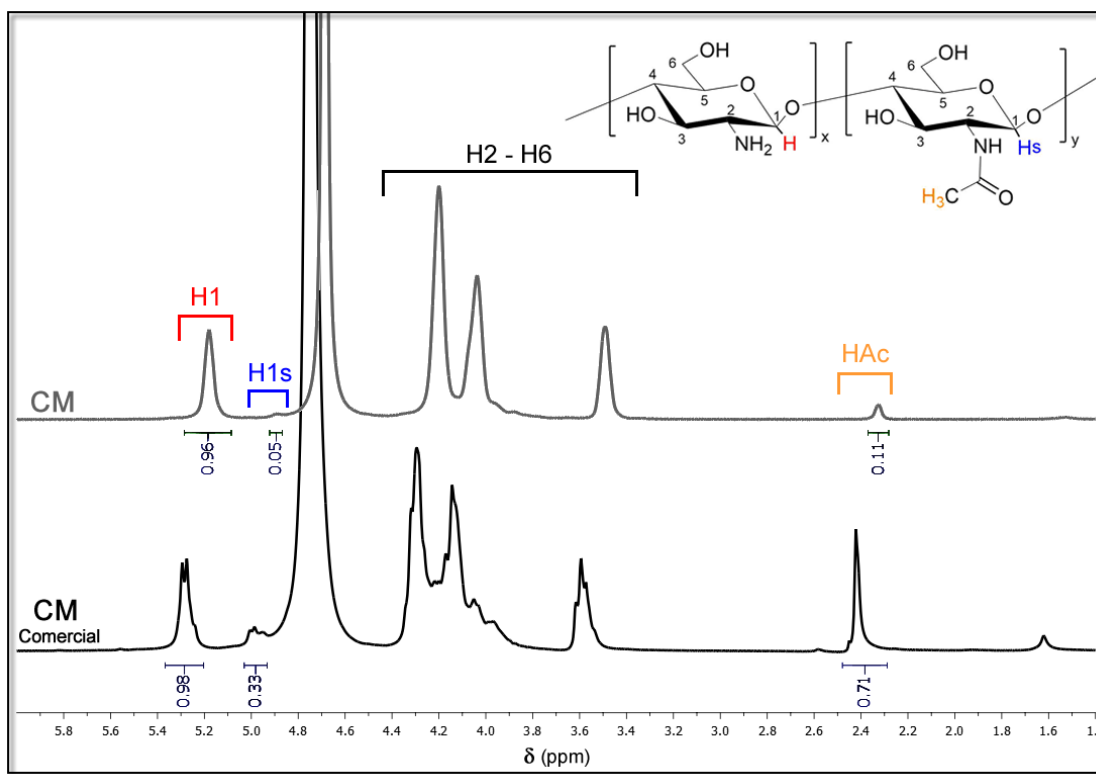
Figura 8 – Esquema para reação de desacetilação



Fonte: Elaborado pelo autor baseado em Carey, 2011.

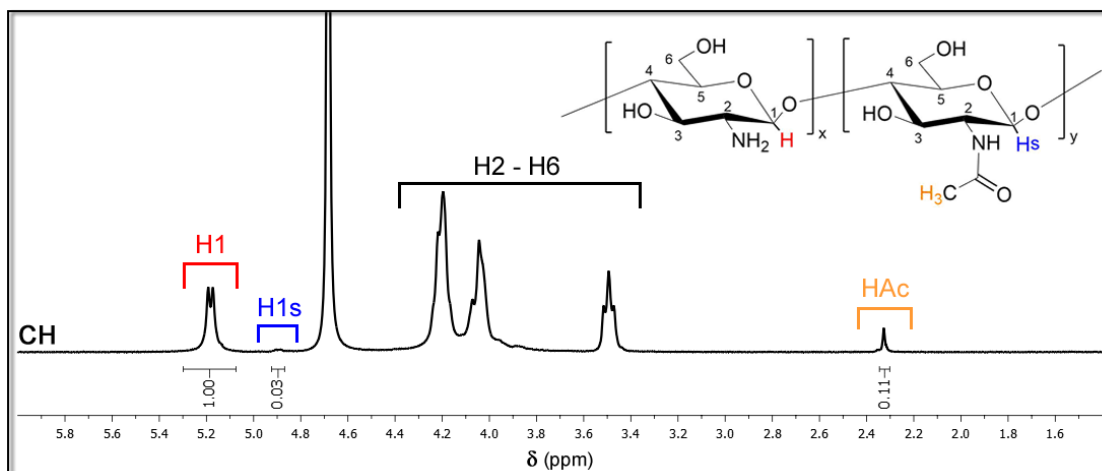
Os espectros de RMN ^1H da CM comercial e da CM (desacetilada) são apresentados na Figura 9 e o espectro da CH é mostrado na Figura 10. Analisando-se simultaneamente ambas as figuras, tem-se que os sinais na escala delta (δ) na faixa de 2,3 a 2,4 ppm referem-se aos hidrogênios metila (CH_3) do grupo acetil (HAc), os sinais δ de 3,5 a 4,4 ppm referem-se aos hidrogênios ligados nos carbonos 2 a 6 (H2-H6), sendo que na unidade GlcN o sinal do H2 aparece isolado em δ 3,5-3,6 ppm. De 5,2 a 5,3 ppm tem-se os sinais δ do hidrogênio ligado ao C1 da GlcN (H1) e de δ 4,9 a 5,0 ppm os da GlcNAc (H1s) (FIAMINGO; CAMPANA-FILHO, 2016).

Figura 9 – Espectros de RMN ^1H da CM comercial e CM (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 10 – Espectro de RMN ^1H da CH



Fonte: Dados da pesquisa

Com base nas integrais e na Equação 2, determinou-se o GD das quitosanas (Tabela 4, pag. 78), com os quais comprovou-se a eficiência da reação de desacetilação da CM comercial (aumento

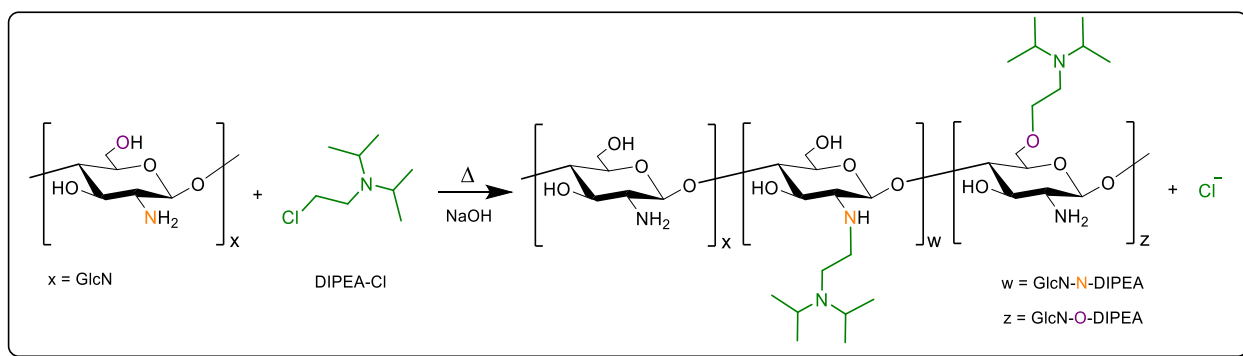
do GD). A CM e a CH apresentaram o mesmo GD, o que favorece a análise de estudos posteriores envolvendo a variação da massa molecular dos polímeros.

5.1.1.2 Grau de substituição de DIPEA (GS_{DIPEA}) na quitosana (séries I e II)

A influência das condições reacionais na regioseletividade dos substituintes incorporados a quitosana é observada na literatura. Dentre essas condições, a acidez/basicidade é um fator de grande destaque. Em geral, substituições nas hidroxilas (carbonos 3 e 6) requerem meios com elevada alcalinidade, enquanto substituições na amina ocorrem em condições neutras ou moderadamente ácidas (JAIN A. et al., 2013).

Na síntese dos derivados das séries I e II, como o sistema reacional apresenta basicidade elevada (pH 12), pode haver a inserção de frações de DIPEA na hidroxila ligada ao carbono 6 (C6), através da formação de um éter. Contudo, espera-se que o principal sítio para substituição seja a amina primária ligada ao carbono 2 (C2), uma vez que ela é o sítio reativo onde ocorre a maioria das reações químicas envolvendo a quitosana (GROSSMAN; NWABUNMA, 2013), resultando na formação de uma amina secundária. Ambas as reações são de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), cujo esquema geral é mostrado na Figura 11.

Figura 11 – Esquema da reação de substituição com DIPEA e indicação das principais estruturas obtidas

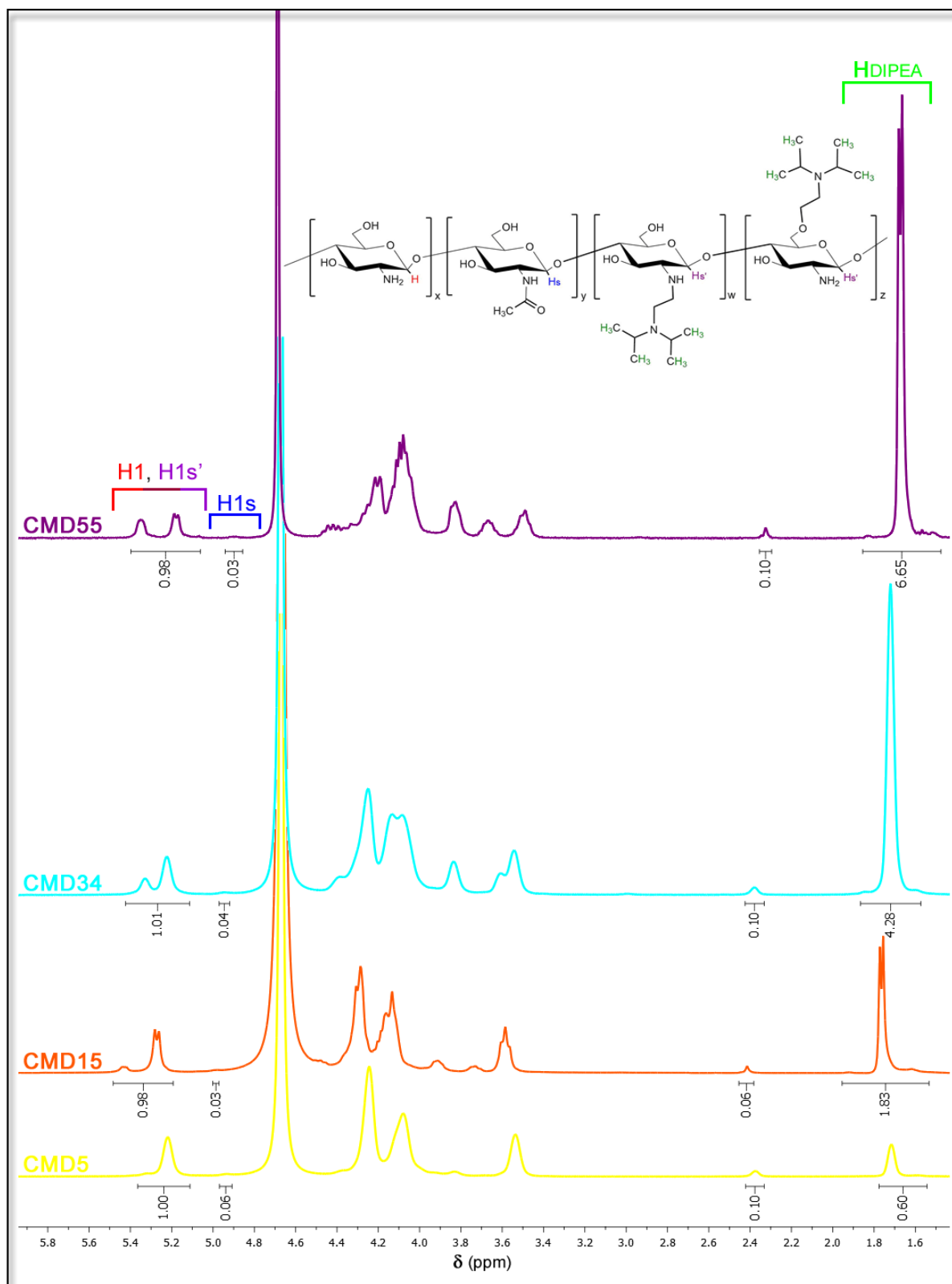


Fonte: Elaborado pelo autor

Um dos principais objetivos da síntese dos polímeros das séries I e II foi avaliar o efeito do grau de substituição nas propriedades físico-químicas e biológicas dos derivados. Deste modo, foram sintetizados derivados com proporções crescentes de DIPEA, que posteriormente foram

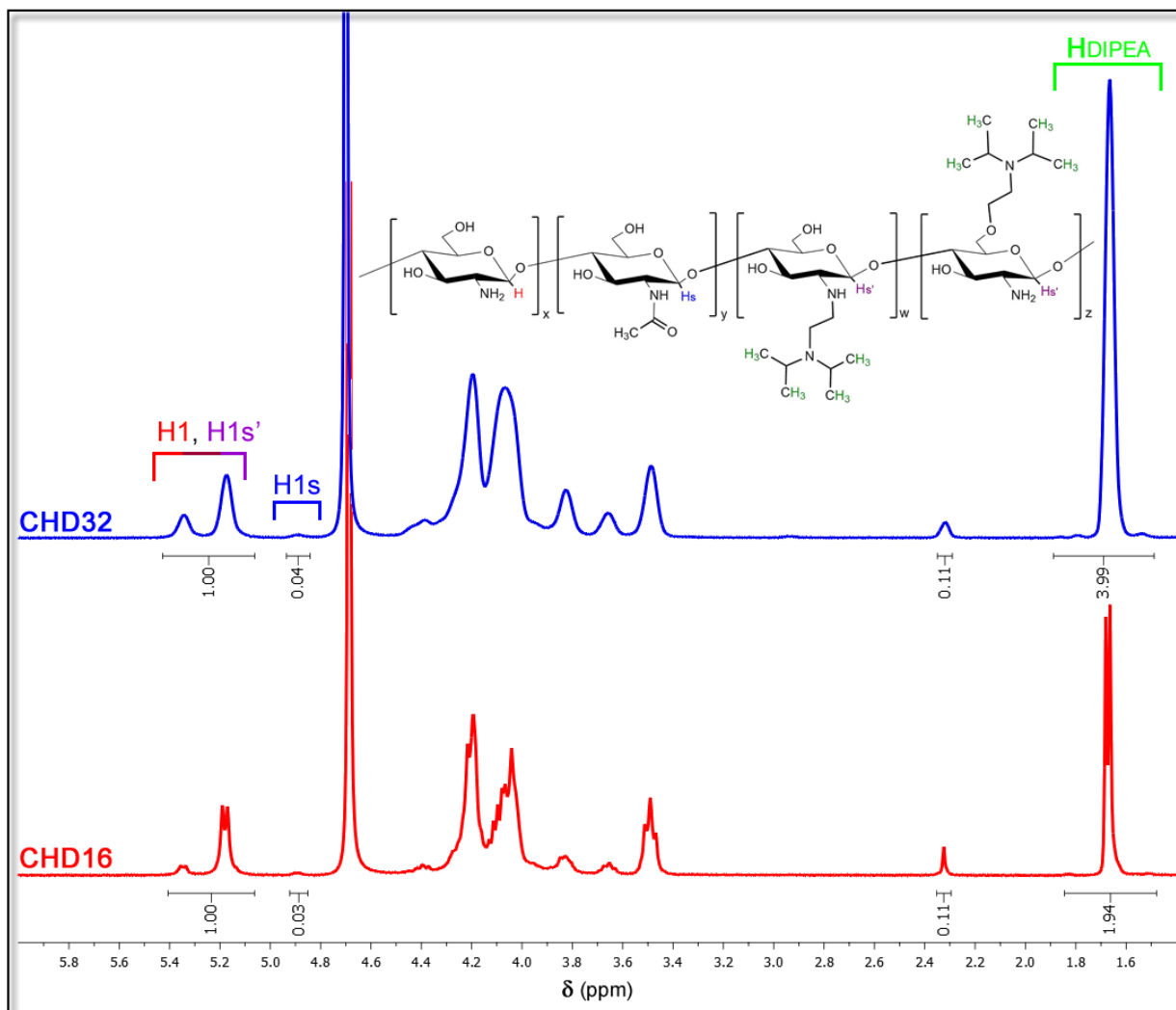
caracterizados por espectroscopia de RMN ^1H . Os espectros de RMN ^1H dos derivados de média e alta massa molecular são mostrados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. De forma semelhante às unidades GlcN e GlcNAc, nas quais os hidrogênios ligados ao C1 (H1 e H1s) apresentam deslocamentos químicos diferentes, as unidades substituídas com DIPEA também apresentam deslocamento distinto para esses hidrogênios (H1s'). Sendo assim, o deslocamento químico dos hidrogênios anoméricos nos derivados encontra-se na região δ de 4,9 a 5,5 ppm. Os sinais δ de 1,6 a 1,9 ppm são atribuídos aos hidrogênios metila do DIPEA (H_{DIPEA}), e de δ 3,5 a 4,5 ppm são encontrados os sinais dos hidrogênios H2-H6 e dos hidrogênios metileno (CH_2) e metina (CH) do substituinte. Nos espectros, também pode-se observar que o efeito estérico das metilas do DIPEA impede o ataque nucleofílico da amina terciária, ou seja, impede a formação de amina quaternária (OLIVEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2018), o que possibilita um melhor controle da densidade de cargas nos polímeros e, conseqüentemente, nas nanopartículas.

O GS_{DIPEA} , apresentado na Tabela 3, mostrou-se proporcional a quantidade de DIPEA-Cl adicionada ao meio reacional (Tabela 1). Neste ponto surge a primeira diferença entre os derivados das séries I e II: os polímeros de alta massa molecular (CHD16 e CHD32) necessitaram de maiores quantidades de DIPEA-Cl para obtenção de valores de GS_{DIPEA} próximos àqueles obtidos com os polímeros de média massa (CMD15 e CMD34). Deve-se destacar que os GS_{DIPEA} obtidos são inferiores aos teóricos, dado pela razão molar DIPEA-Cl/Mero (Tabela 1), o que pode ser explicado pela competição com o íon hidróxido no ataque ao substituinte, que consome DIPEA para formação do 2-(diisopropilamino)etanol. Entretanto, os graus de substituição puderam ser bem controlados, e menores razões DIPEA-Cl/Mero foram necessárias comparadas às utilizadas para obtenção de dietiletilamino-quitosanas por Oliveira et al., 2013.

Figura 12 – Espectros de RMN ^1H dos derivados de média massa molecular (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 13 – Espectros de RMN ^1H dos derivados de alta massa molecular (em $\text{DCl/D}_2\text{O}$)

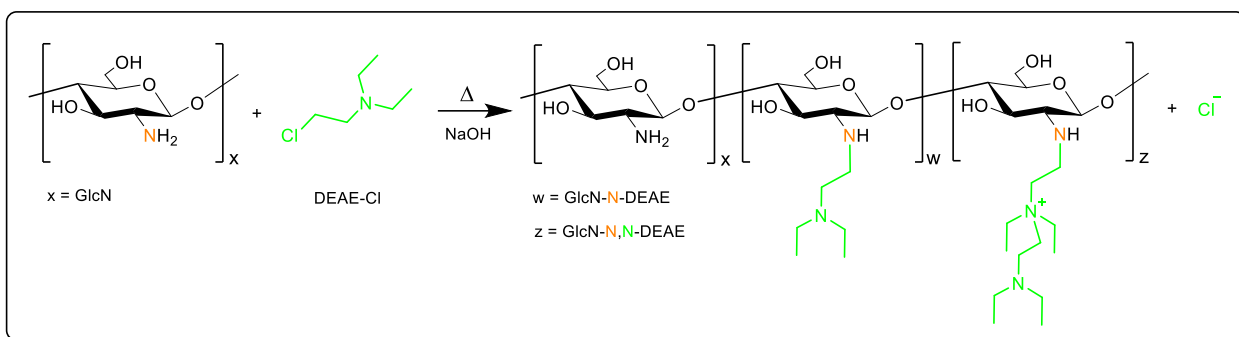


Fonte: Dados da pesquisa

5.1.1.3 Grau de substituição de DEAE (GS_{DEAE}) na quitosana (série III)

A reação de substituição por DEAE é análoga à reação de substituição por DIPEA, conforme mostra a Figura 14. Porém nessa reação, um novo sítio compete com a amina primária da quitosana no ataque nucleofílico: a amina terciária do próprio DEAE. Com isso, é observada a formação de aminas quaternárias (OLIVEIRA et al., 2013; SIEWERT et al., 2019).

Figura 14 – Esquema da reação de substituição com DEAE e indicação das principais estruturas obtidas

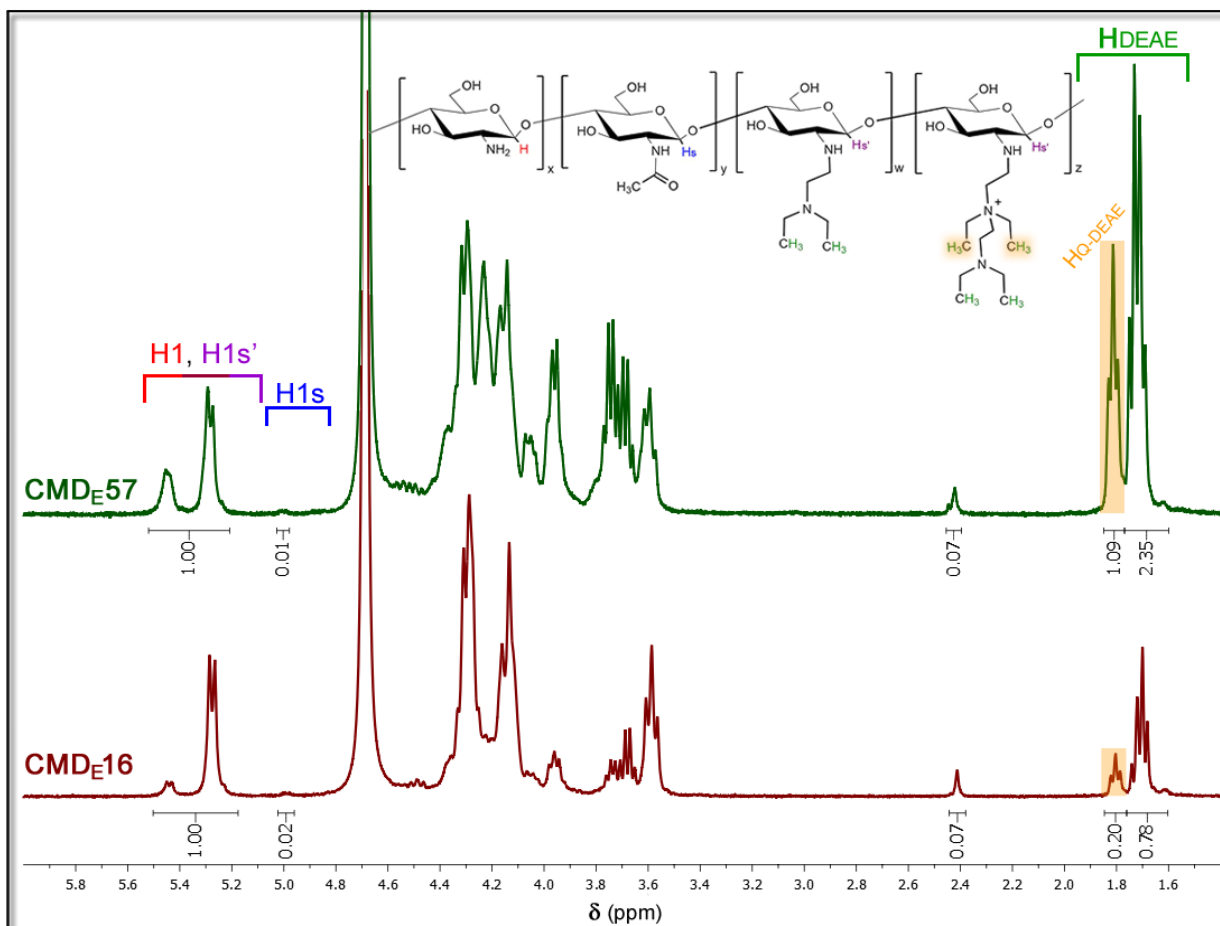


Fonte: Elaborado pelo autor

Os derivados substituídos com DEAE também foram caracterizados por espectroscopia de RMN ^1H , cujos espectros são apresentados na Figura 15. A análise e o deslocamento químico desses espectros são análogos aos apresentados para os polímeros substituindo com DIPEA. Contudo os sinais δ de 1,6 a 1,9 ppm, atribuídos aos hidrogênios metila do DEAE (H_{DEAE}), passam a corresponder a um total de 6 hidrogênios metila. Além disso, é possível observar a presença de 2 sinais bem resolvidos nessa região: (i) o sinal em campo mais alto (direita do espectro) refere-se aos H_{DEAE} das unidades não quaternizadas e (ii) o sinal que está em campo mais baixo refere-se aos hidrogênios metila (do DEAE) ligados à amina quaternária ($\text{H}_{\text{Q-DEAE}}$) (OLIVEIRA et al., 2013).

Os valores de GS_{DEAE} dos derivados são apresentados no conjunto de dados da Tabela 4 (pag. 78). A literatura (OLIVEIRA et al., 2013; PICOLA et al., 2016) e os resultados apresentados indicam que há uma proporcionalidade direta entre a quantidade de DEAE-Cl adicionado na reação e o GS_{DEAE} dos derivados. Assim como nos polímeros das séries I e II, o grau de substituição obtido por RMN ^1H é inferior aos valores teóricos, indicando perda de DEAE-Cl durante a síntese devido à reação paralela com NaOH. Isso é evidenciado ao considerar que os derivados deste estudo, sintetizados em pH 12, necessitaram de maiores quantidades de DEAE-Cl para promover graus de substituição próximos ao dos derivados encontrados na literatura, que foram sintetizados sob as mesmas condições, porém com o pH ajustado em 8 (OLIVEIRA et al., 2013). Outro aspecto importante relacionado ao pH da síntese é o seu efeito em favorecer o surgimento de unidades quaternizadas: enquanto nos derivados de Oliveira et al. (2013) não foi observada a ocorrência quaternização com um enxerto de até 25% de DEAE na quitosana, aqui foi apresentado um $\text{GS}_{\text{Q-DEAE}}$ igual a 3,3% para o derivado com apenas 16% de DEAE.

Figura 15 – Espectros de RMN ^1H dos derivados da série III (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)

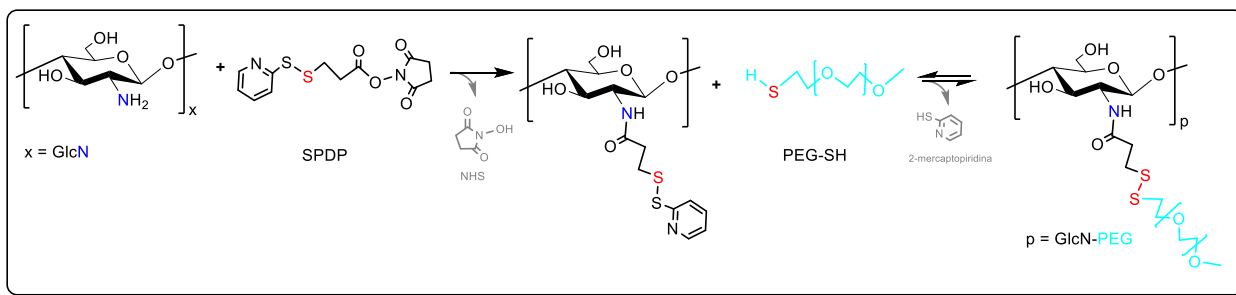


Fonte: Dados da pesquisa

5.1.1.4 Grau de substituição por PEG (GS_{PEG}) nos derivados (séries I, II e III)

Quitosanas previamente substituídas com DIPEA ou DEAE (item 4.3.3.1) foram selecionadas para serem modificadas com PEG-SH, de massa molecular igual a 2 kDa, via ligação dissulfeto (Figura 16). A adição de PEG nos polímeros envolve basicamente duas reações sequenciais: (i) a reação da amina primária (da quitosana) com o SPDP (uma substituição nucleofílica acílica) promovendo a liberação de N-hidroxisuccinimida (NHS) e (ii) a substituição do grupo piridítil do SPDP pelo PEG-SH, sendo liberada a 2-mercaptopiridina (em equilíbrio com o tautômero piridina 2-tiona).

Figura 16 – Esquema da reação de peguilação com ativação por SPDP



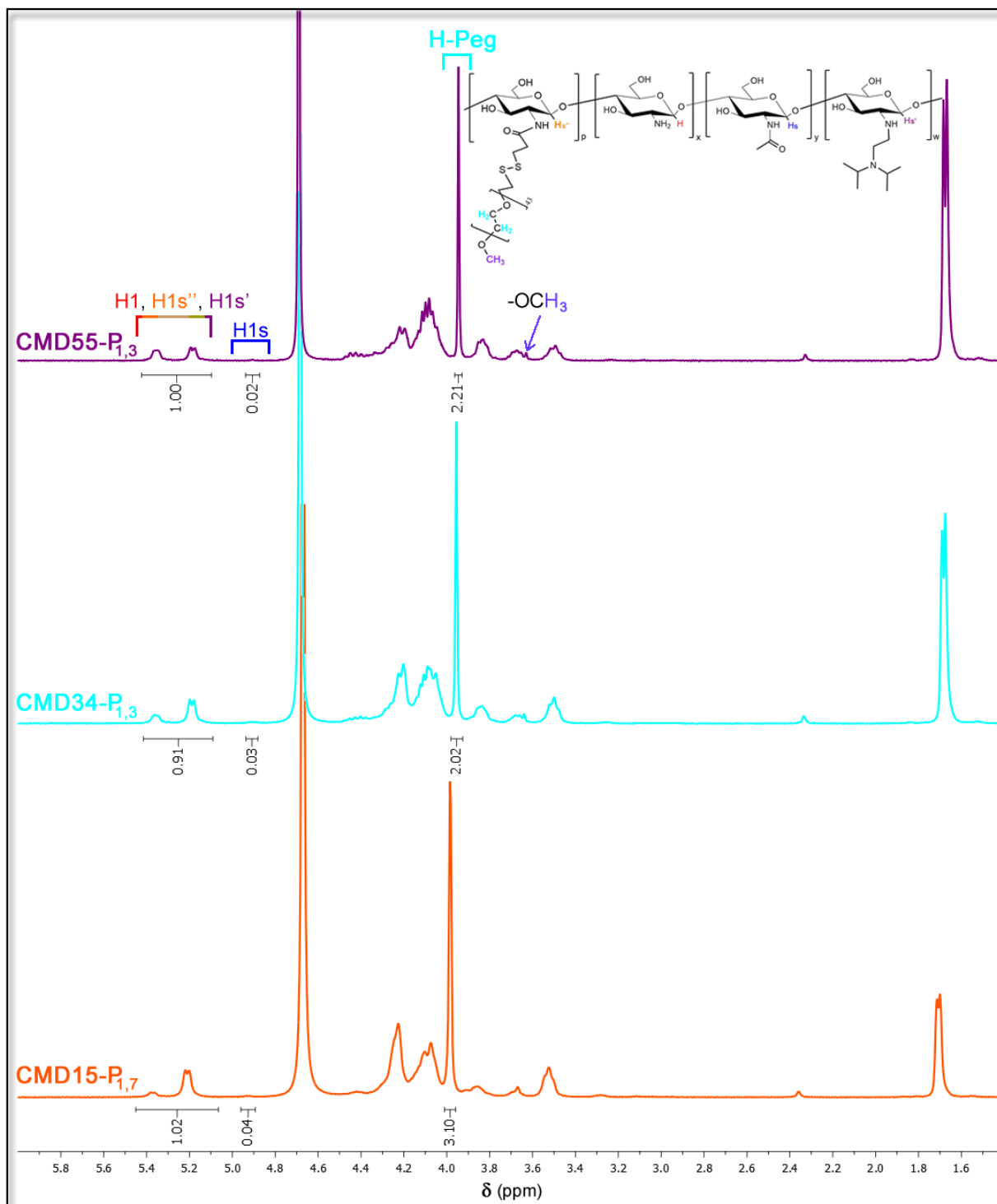
Fonte: Elaborado pelo autor com base em Kim et al., 2008.

A incorporação do PEG via dissulfeto é uma das estratégias para promover a múltipla funcionalidade das nanopartículas. Os derivados peguilados foram caracterizados por espectroscopia de RMN ^1H , e os espectros são apresentados nas Figuras 17, 18 e 19. O sinal intenso na região δ entre 3,9-4,0 ppm é atribuído aos hidrogênios do grupo metileno (H-Peg) da unidade de repetição ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) do PEG, enquanto que os hidrogênios do grupo metila ($-\text{OCH}_3$) encontram-se entre δ 3,6-3,7 ppm (YANG et al., 2017).

O GS_{PEG} dos derivados é apresentado nas Tabelas 3 e 4 (pag. 78), com os quais pôde-se comprovar a eficiência das reações de peguilação, uma vez que os valores obtidos são iguais ou muito próximos aos valores de peguilação teóricos, dado pela razão estequiométrica PEG-SH/Mero (Tabela 1). O GS_{PEG} dos polímeros permaneceu entre 1 e 3%, portanto encontra-se dentro do intervalo que a literatura indica como promissor para a entrega de genes (RHEINER; BAE, 2016; JIANG et al., 2017). Essas porcentagens permitem estimar que os derivados das séries I e III têm, em média, de 2 a 4 macromoléculas de PEG por cadeia de quitosana (modificada com DIPEA ou DEAE), enquanto que os derivados de alta massa molecular (série II) apresentam de 4 a 10 PEGs por cadeia de quitosana.

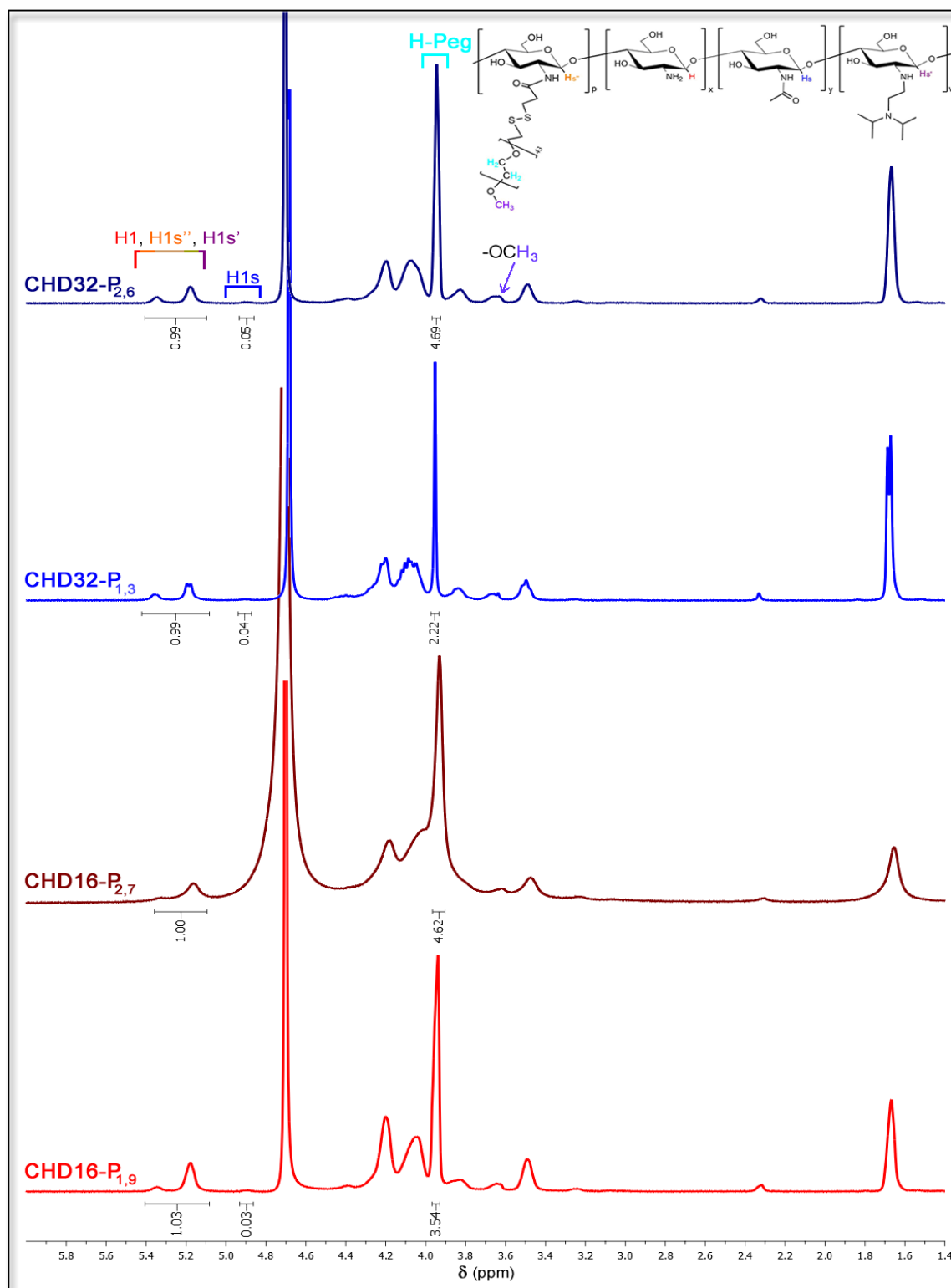
Com esses resultados, outro objetivo nas sínteses dos derivados foi cumprido: a inserção de PEG nos derivados, com variação do GS_{PEG} nos polímeros de alta massa molecular (série II).

Figura 17 – Espectros de RMN ^1H dos derivados da série I ((DIPEA de média massa molecular) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em $\text{DCl/D}_2\text{O}$)



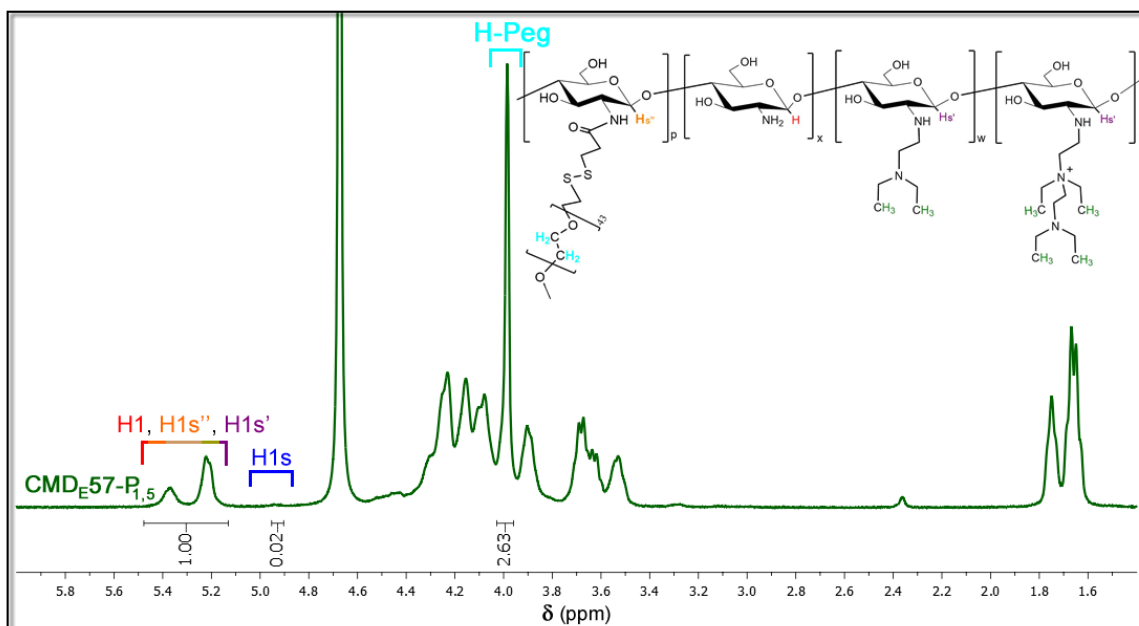
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 18 – Espectros de RMN ^1H dos derivados da série II (DIPEA de alta massa molecular) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em $\text{DCl/D}_2\text{O}$)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 19 – Espectro de RMN ^1H do derivado da série III (DEAE e amina quaternária) substituídos com PEG via ligação dissulfeto (em $\text{DCl/D}_2\text{O}$)



Fonte: Dados da pesquisa

5.1.2 RMN ^{13}C : estimativa do grau de substituição de DIPEA na hidroxila ($\text{GS}_{\text{OH-DIPEA}}$) nos polímeros (séries I e II)

A substituição nos diferentes grupos funcionais da quitosana (isto é, amina ou hidroxila) pode resultar em polímeros com propriedades e aplicações distintas (JAIN A. et al., 2013; ZHANG et al., 2010). Deste modo, torna-se necessário determinar a quantidade do substituinte presente nos diferentes grupos funcionais. Uma forma de estimar o GS na hidroxila ligada ao carbono 6 (C6) é por meio da espectroscopia de RMN ^{13}C (ZHANG et al., 2010). Essa análise foi realizada para os polímeros de média e alta massa molecular substituídos com DIPEA (séries I e II).

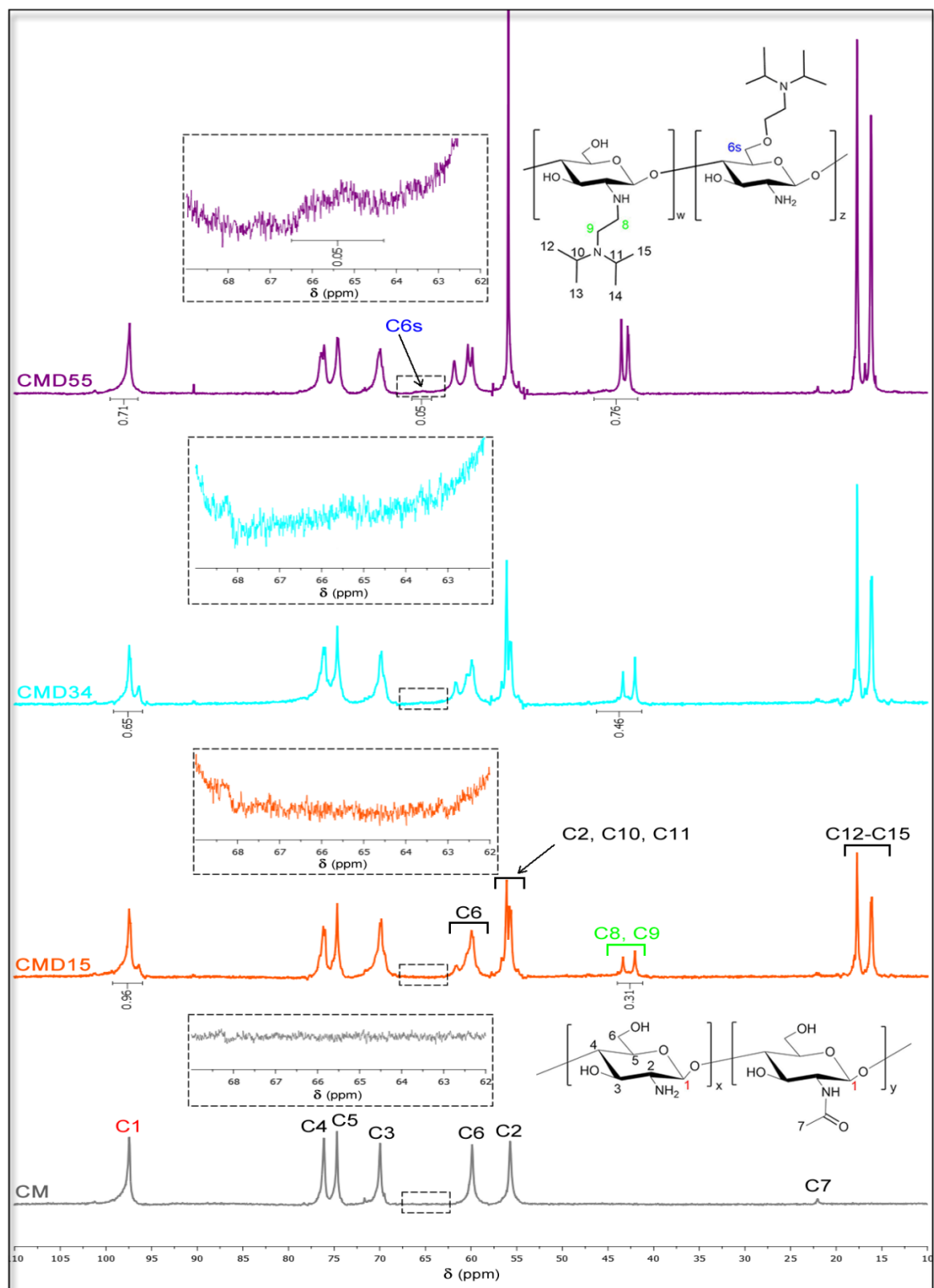
Os espectros de RMN ^{13}C das quitosanas e dos derivados são apresentados nas Figuras 20 e 21. Os sinais da CM e CH foram atribuídos de acordo com Fujita e Sakairi (2016): δ 97,5 ppm (C1), δ 77 ppm (C4), δ 75 ppm (C5), δ 70 ppm (C3), δ 60 ppm (C6) e δ 56 ppm (C2). Nos derivados, os carbonos metílicos (C12-C15) do DIPEA encontram-se na região δ de 16 a 18 ppm, os carbonos metilênicos (C8 e C9) de 42 a 44 ppm e os carbonos metínicos (C10 e C11) de 55,5 a 57 ppm. Como observado, o sinal dos carbonos metínicos coalesceram com o sinal do C2 do anel

glicopiranosídeo e, de forma semelhante ao H1 nos espectros de RMN ^1H , nos espectros de RMN ^{13}C a substituição causa desdobramento no sinal do C1. A substituição também causa um desdobramento no sinal do C6, e quando a substituição ocorre na hidroxila, o desdobramento fica mais evidente com o surgimento de um sinal em 65 ppm (C6s), conforme mostrado por Zhang e colaboradores (2010) para quitosanas sulfatadas e por Fiamingo e Campana-Filho (2016) para carboximetilquitosanas. Portanto, esse desdobramento torna-se característico para substituições na hidroxila do carbono 6.

Tendo como base as integrais dos sinais do C6s e a Equação 6, estimou-se o grau de substituição de DIPEA na hidroxila ($\text{GS}_{\text{OH-DIPEA}}$) dos derivados. Como um indicativo da eficiência desse método, também se determinou o GS_{DIPEA} por meio da RMN ^{13}C ($\text{GS}_{\text{DIPEA-C}}$), conforme é listado na Tabela 3 (pag. 78).

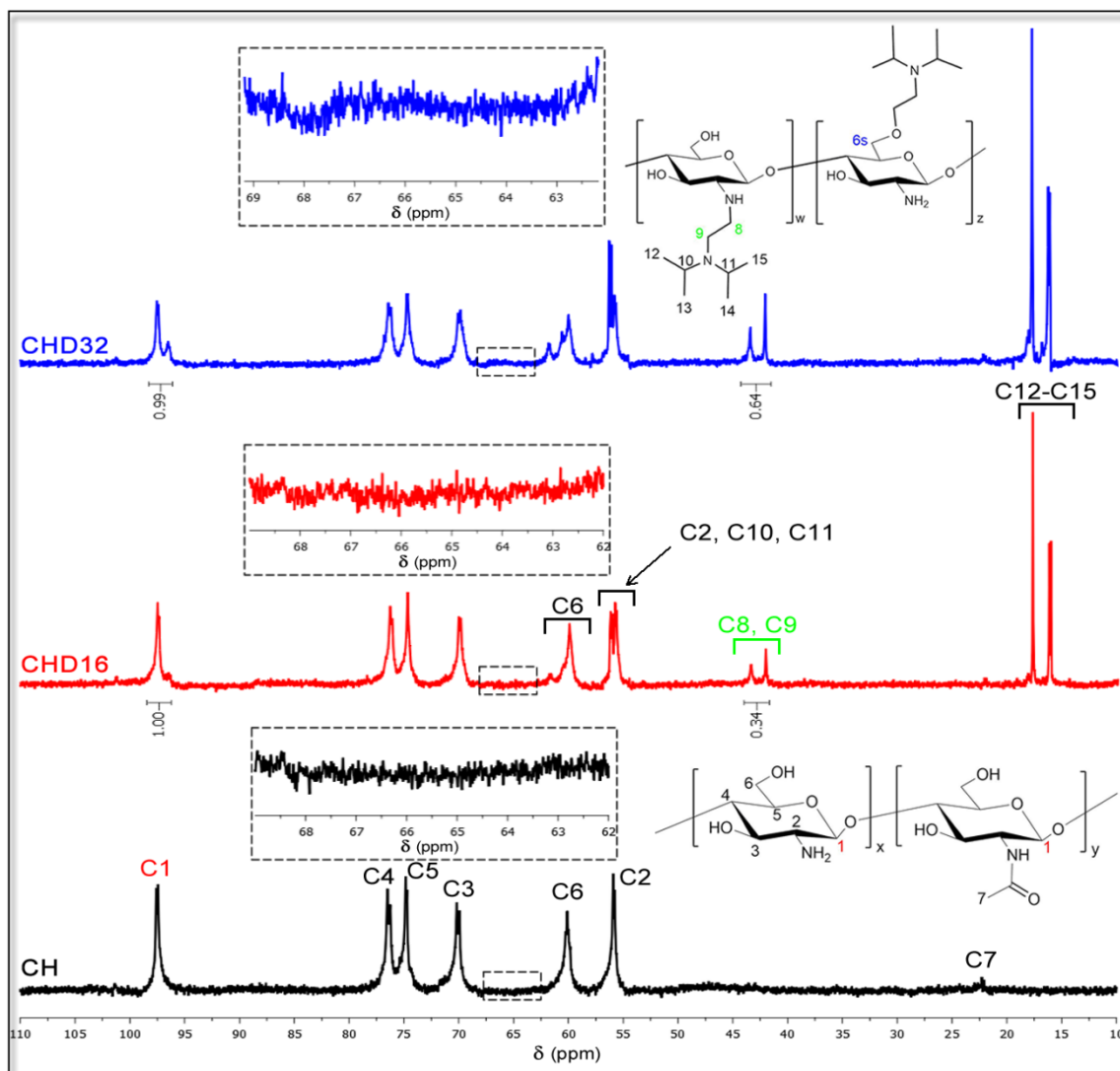
Foi observada uma concordância entre os graus de substituição calculados com base na espectroscopia de RMN ^1H e de RMN ^{13}C . Além disso, estima-se que apenas uma pequena fração do DIPEA foi inserida na hidroxila do derivado mais substituído (CMD55), observado pelo surgimento do sinal na região do C6s (Figura 20), o que era esperado devido a maior reatividade dos grupos amina primários (GONSALVES, 2011). Para os demais derivados, não foi observado o sinal correspondente a formação do éter.

Figura 20 – Espectros de RMN ^{13}C dos polímeros de média massa molecular (em $\text{DCl/D}_2\text{O}$)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 21 – Espectros de RMN ^{13}C dos polímeros de alta massa molecular (em $\text{DCl}/\text{D}_2\text{O}$)

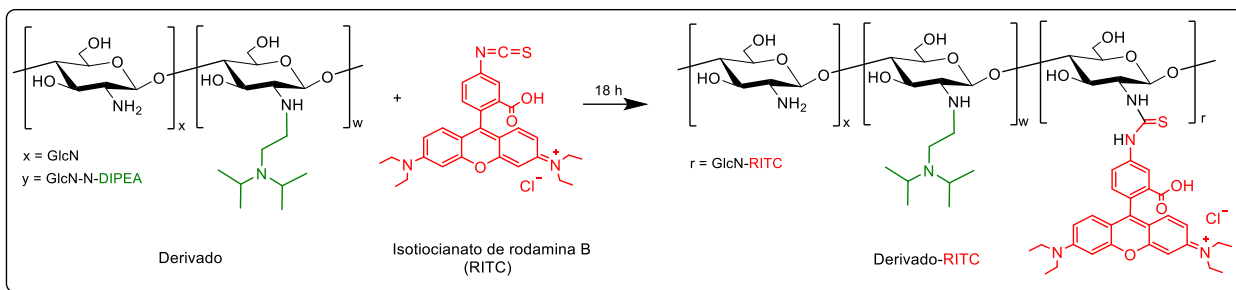


Fonte: Dados da pesquisa

5.1.3 Determinação do grau de substituição por rodamina (GS_{RITC}) via espectroscopia da absorção na região do UV-visível

A reação de marcação com rodamina é uma reação de adição nucleofílica na qual os grupos amina primários do polímero (desprotonados conforme o equilíbrio ácido/base) atacam o carbono do grupo isotiocianato presente na rodamina, levando à formação de uma tiouréia e, portanto, a incorporação da rodamina na estrutura do polímero, conforme mostra a Figura 22 (Ma et al., 2008).

Figura 22 – Esquema da reação de marcação com isotiocianato de rodamina B

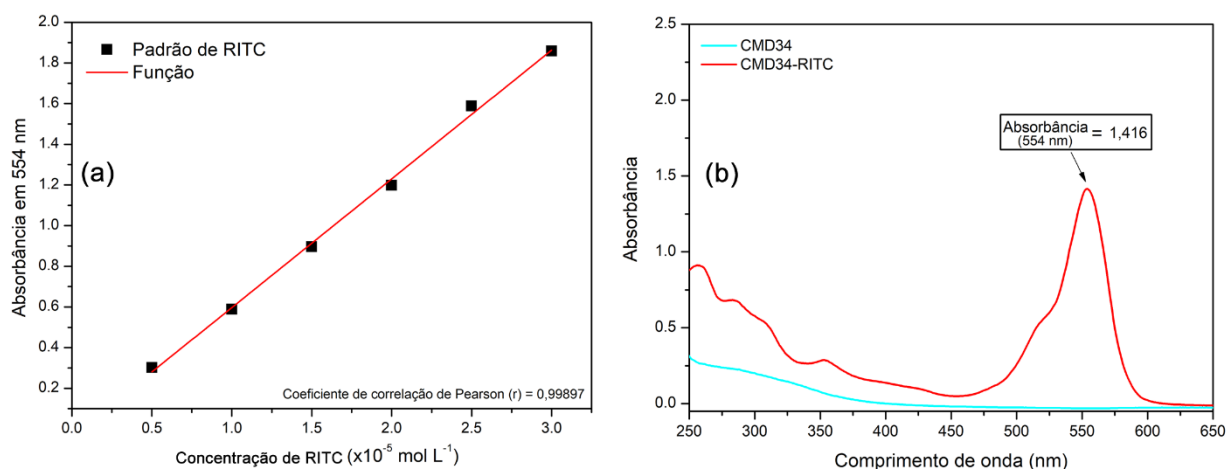


Fonte: Elaborado pelo autor com base em Ma et al., 2008

O espectro de absorvância do CMD34-RITC (e CMD34) e a curva analítica são mostrados na Figura 23, em que é possível observar que a absorvância da amostra ($Abs_{amostra}$) em 554 nm foi igual a 1,416. Por meio da curva analítica obteve-se a Equação 14, com a qual determinou-se que a concentração (mol L^{-1}) de rodamina (C_{RITC}) na amostra polimérica é $2,294 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e portanto, o número de mols de RITC (n_{RITC}) na amostra analisada é $6,882 \times 10^{-8} \text{ mol}$. Deste modo, com base na Equação 8, tem-se que GS_{RITC} do CMD34-RITC é 0,58%.

$$C_{RITC} = \frac{Abs_{amostra} + 0,036}{63309} \quad \text{Equação 14}$$

Figura 23 – (a) Curva analítica com isotiocianato de rodamina B (RITC) e (b) espectros de absorvância do CMD34 e CMD34-RITC



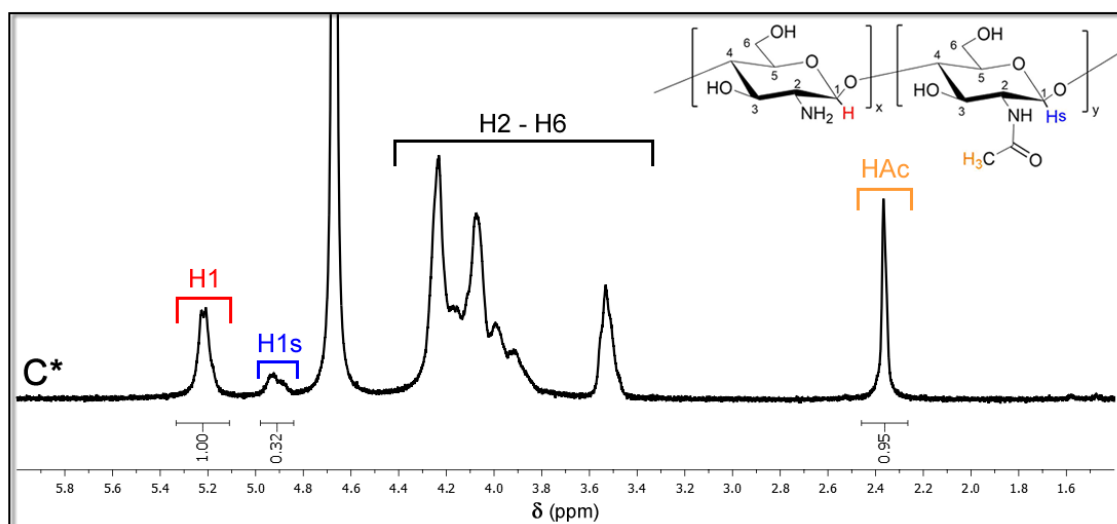
Fonte: Dados da pesquisa

5.1.4 RMN ^1H : polímeros da série IV

5.1.4.1 Grau de desacetilação (GD) e bloqueio (GB) da quitosana (série IV)

Devido à possibilidade de despolimerização ao longo das sínteses envolvendo os derivados bloqueados, nesta etapa optou-se por ter como polímero de partida uma quitosana de alta massa molecular, na forma comercial (isto é, sem passar pelo processo de desacetilação). Além disso, a maior quantidade de grupos acetamida contribui intrinsecamente com o bloqueio. O espectro de RMN ^1H da quitosana de partida (C*) para o bloqueio é mostrado na Figura 24, cujas integrais associadas à Equação 2, fornecem um GD de 76% (GA= 24%).

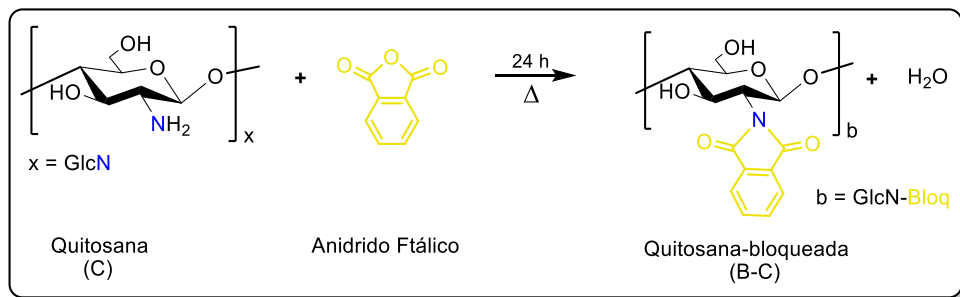
Figura 24 – Espectro de RMN ^1H da C (DCl/D $_2\text{O}$)



Fonte: Dados da pesquisa

O bloqueio dos grupos amina foi realizado com anidrido ftálico. Essa reação foi inicialmente descrita por Kurita e colaboradores (KURITA et al., 2002; KURITA et al., 2007) e, sob as condições reacionais utilizadas, tem-se como produto principal uma imida (IFUKU et al., 2011), como mostrado na Figura 25. O meio ácido utilizado na síntese possibilita a ativação do anidrido ftálico para uma reação de adição nucleofílica, pela protonação do oxigênio carbonílico. Deste modo, tanto sua hidrólise (formando ácido ftálico) quanto a formação da amida (e depois, imida) são favorecidas (CAREY, 2011).

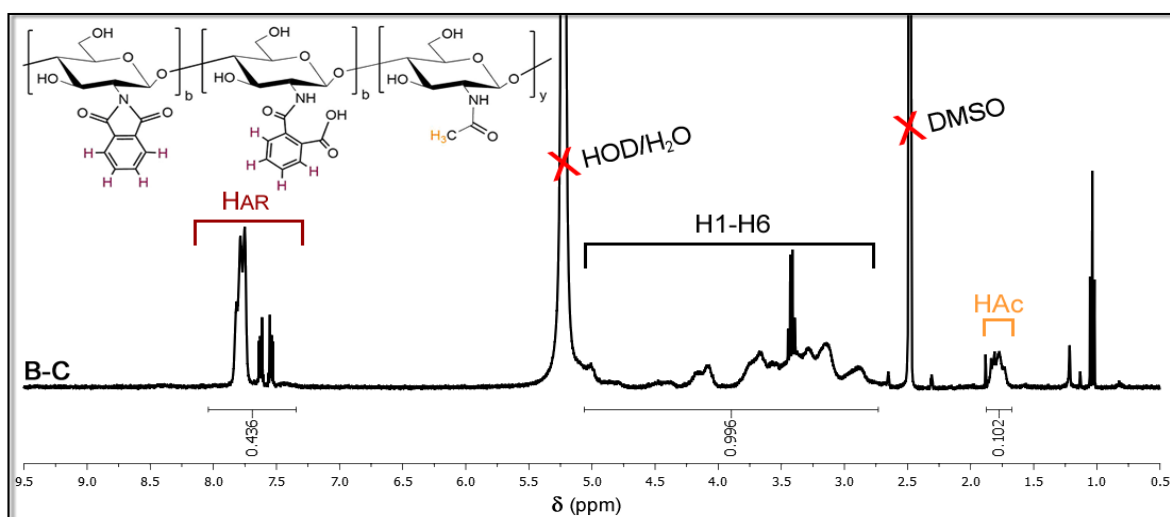
Figura 25 – Esquema da reação de bloqueio dos grupos amina da quitosana



Fonte: Elaborado pelo autor baseado em Carey, 2011 e Kurita et al., 2007

A quitosana bloqueada (B-C) foi analisada por espectroscopia de RMN ¹H para determinação do grau de bloqueio (GB), sendo o espectro mostrado na Figura 26. O sinal δ em 1,8 ppm refere-se aos hidrogênios do grupo acetila (HAc) e os sinais de 7,3 a 8,0 ppm são atribuídos aos hidrogênios aromáticos (H_{AR}) do grupo ftaloíla, nas formas amida ou imida. Na região entre o sinal do DMSO (δ 2,5 ppm) e da água (δ 5,2 ppm), estão os sinais dos sete hidrogênios (H1-H6) glicopiranosídeos, cuja integração, fornece o valor de referência (*I_H*) necessário para determinação do GB (Equação 1). Assim, o GB da B-C foi de aproximadamente 100%, o que confirma a eficiência da reação na obtenção da B-C. Observa-se também, que o uso do ácido acético não promoveu a hidrólise do grupo acetila (GlcNAc), uma vez que o grau de acetilação (GA) do polímero se manteve em 24%.

Figura 26 – Espectro de RMN ¹H da B-C (DMSO-d₆/DCl)

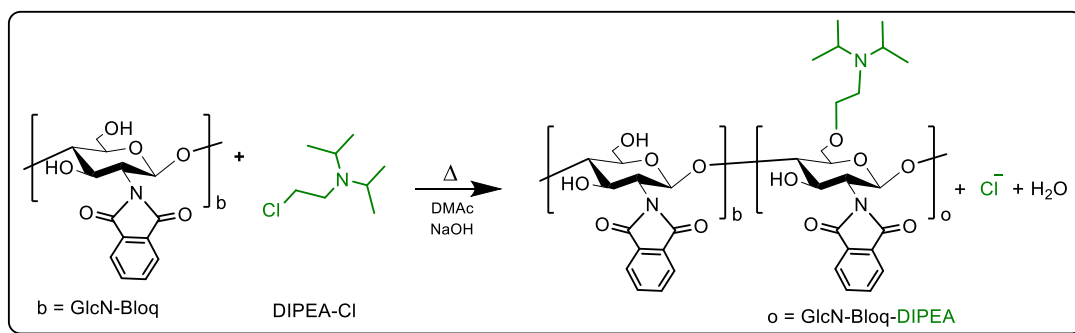


Fonte: Dados da pesquisa

5.1.4.2 Grau de bloqueio (GB) e substituição por DIPEA (GS_{DIPEA}) dos polímeros (série IV)

Devido a presença dos grupos ftalimida, que inviabilizam o ataque nucleofílico das aminas da quitosana, a reação ocorre preferencialmente na hidroxila ligada ao carbono 6 do anel glicopiranosídeo da quitosana (Figura 27). A substituição (de DIPEA) foi realizada em dimetilacetamida (DMAc) visando: (i) aumentar a solubilidade do polímero durante a síntese (KURITA et al., 2007), (ii) favorecer a reação de S_N2 com DIPEA-Cl e (iii) evitar a hidrólise da imida (CAREY, 2011).

Figura 27 – Esquema da reação de substituição com DIPEA nos polímeros bloqueados



Fonte: Elaborado pelo autor baseado em Carey, 2011 e Kurita et al., 2007

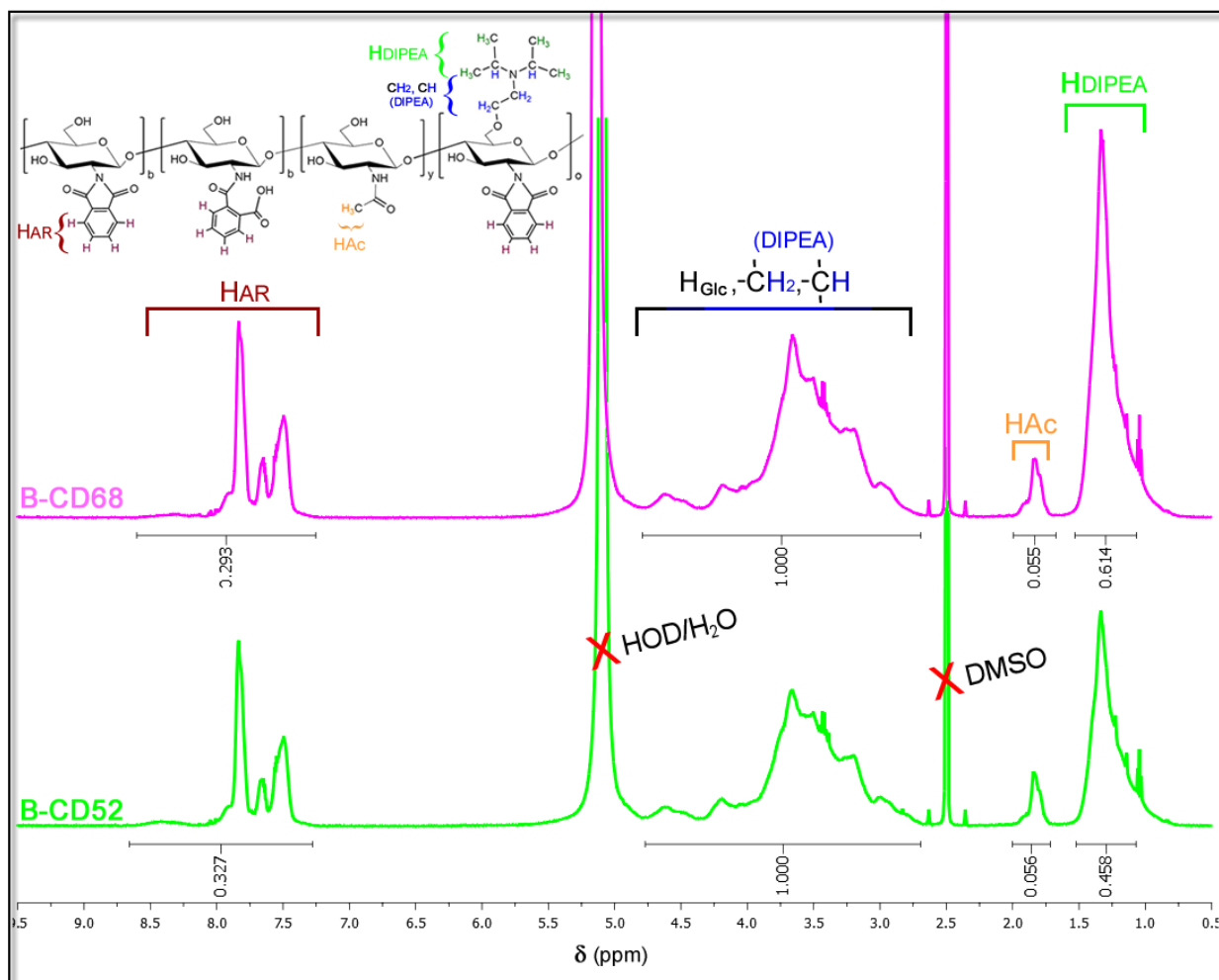
Após a substituição, os derivados bloqueados substituídos com DIPEA apresentaram baixa solubilidade em meio aquoso (neutro e ácido), portanto também foram solubilizados em DMSO-d₆/DCl para serem caracterizados pela espectroscopia de RMN ¹H. Os espectros são apresentados na Figura 28. O sinal que surge na região δ de 1,1 a 1,6 ppm é atribuído aos hidrogênios metila (CH₃) do DIPEA, sendo que esse sinal coalesce com parte dos sinais dos hidrogênios alcóolicos (vistos com mais detalhes no espectro da B-C (Figura 26)), visíveis mesmo com a adição do DCl. A substituição promoveu um alargamento da região δ correspondente aos H_{AR}, que passou a ser de δ 7,3 a 8,7 ppm. A região entre os sinais da água e do DMSO são atribuídos aos hidrogênios glicopiranosídeos (H_{Glc}) e aos hidrogênios dos grupos metileno (CH₂) e metina (CH) do DIPEA.

Os resultados apresentados até o momento mostram que a adição de substituintes altera o deslocamento químico dos hidrogênios (e carbonos) glicopiranosídeos, em especial o sinal do H1, para um campo mais baixo (esquerda do espectro). Deste modo, o leve deslocamento no sinal da água (em relação aos derivados não bloqueados) para um campo mais alto (direita do espectro)

quando é associada ao deslocamento do H1, pode levar uma sobreposição dos dois sinais. Assim, neste trabalho, foi considerada sobreposição total do H1 pelo sinal da água (H_{Glc} corresponde a 6 hidrogênios) na determinação do GB. Este é o pior cenário na determinação do GB, ou seja, os menores valores de GB para os derivados (após a substituição com DIPEA) são obtidos quando é considerada a sobreposição total do H1 (Apêndice B).

As condições básicas da reação, necessária para substituição na hidroxila, causou uma diminuição do GB nos derivados. Entretanto ele manteve-se, pelo menos, em 79% (Apêndice B), ou seja, valores de GS_{DIPEA} superiores a 21% evidenciam o sucesso da reação em produzir derivados O-substituídos.

Figura 28 – Espectros de RMN 1H dos derivados bloqueados substituídos com DIPEA (DMSO- d_6 /DCl)

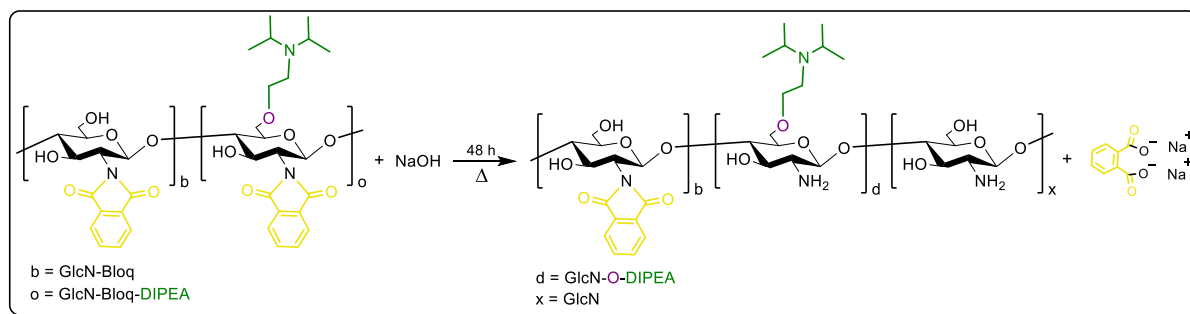


Fonte: Dados da pesquisa

Uma vez substituído com DIPEA, os derivados foram submetidos à uma hidrólise básica de amida (ou imida) que promove a eliminação do íon ftalato ao final da reação, conforme ilustra a Figura 29. Os produtos dessa reação (de desbloqueio) têm seus espectros de RMN ^1H mostrados na Figura 30. Após o desbloqueio, o sinal do H1 foi observado à esquerda do sinal da água. Assim, tem-se que os sinais δ de 2,7 a 4,5 ppm referem-se aos 6 hidrogênios glicosídeos e aos hidrogênios dos grupos metileno e metina do DIPEA.

O GS estimado de DIPEA nos derivados foi, para ambos os polímeros, superior a 50%, o que indica êxito na sequência de reações empregada na produção de derivados, prioritariamente, O-substituídos.

Figura 29 – Esquema da reação de bloqueio



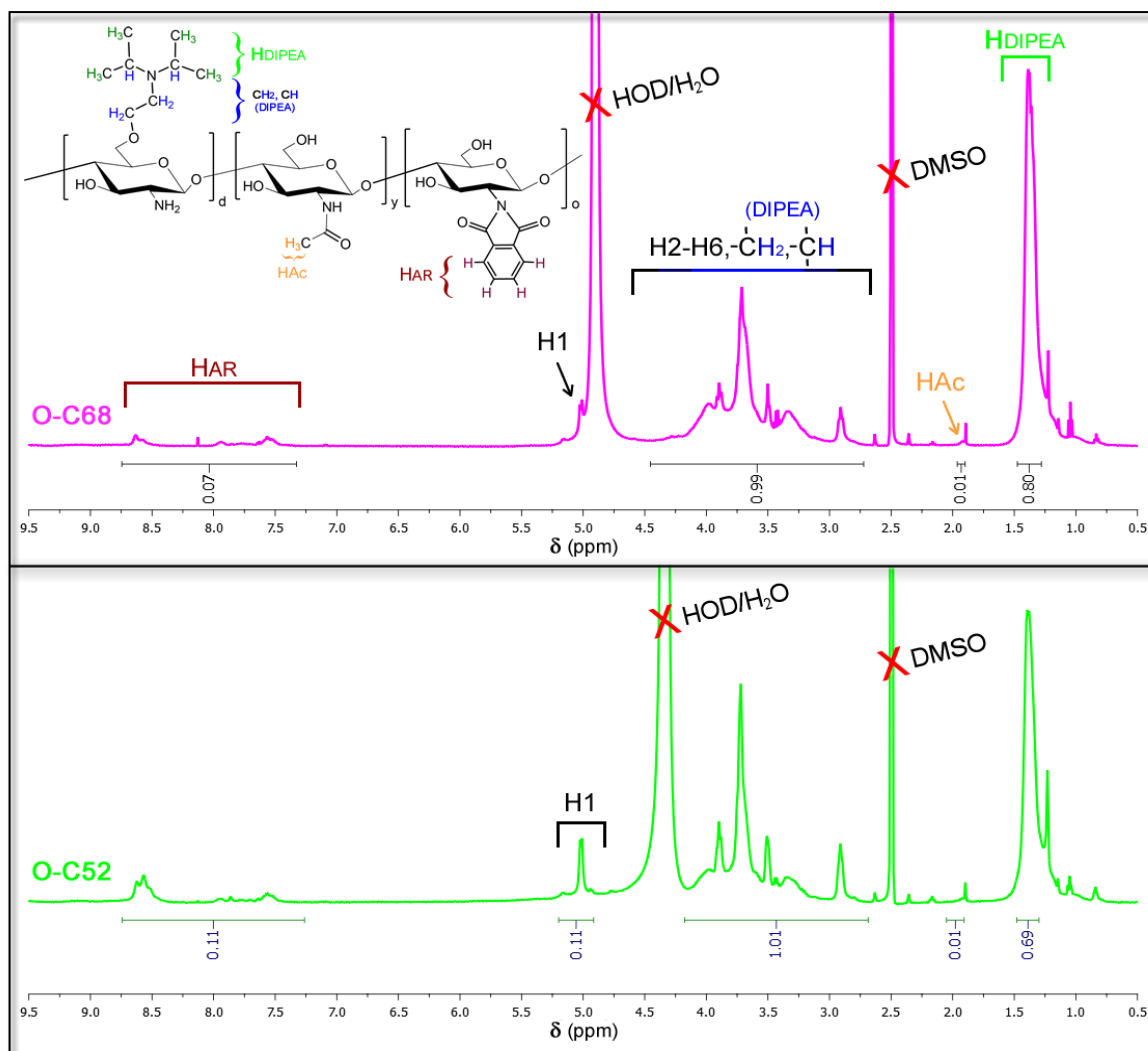
Fonte: Elaborado pelo autor

O valor do grau de acetilação (GA) subtraído do valor do GB, fornece o grau de ftalação (GF). O grupo ftaloila confere ao polímero hidrofobicidade, que pode auxiliar na interação dos poliplexos com a membrana celular. O GF obtido para o O-CD68 foi de 18% e para o O-CD52 foi de 27%. Esses valores são próximos as frações (15 e 25%) hidrofóbicas (ácido hexanóico) dos polímeros estudados por Layek e Singh (2013), que indicaram que o polímero mais promissor à terapia gênica foi o que continha 15% de ácido hexanóico. Contudo, a composição de seus polímeros incluía apenas quitosana e ácido hexanóico, e esse resultado pode estar relacionado à menor interação entre polímero com a maior densidade hidrofóbica (25% de substituição) e o material genético (LAYEK; SINGH, 2013).

A solubilidade dos derivados desbloqueados em meio aquoso acidificado é um pré-requisito do próprio procedimento adotado em sua preparação: se o derivado não for solúvel na solução de ácido acético (pH 5) de elevada força iônica, ele é retido no papel de filtro. Mesmo possuindo esse

requisito inicial, depois de liofilizado os polímeros apresentaram baixa solubilidade em meio aquoso. Isso pode ser devido a interações inter e intramoleculares, que promovem diferenças na estrutura cristalina do composto em relação a quitosana. Na literatura, essa baixa solubilidade é atribuída ao aumento da cristalinidade do polímero devido a ftalação (IFUKU et al., 2013; KURITA et al., 2002). Deste modo, visando possibilitar o estudo desses derivados, a solubilização dos polímeros, para avaliação individual ou sob a forma de políplexos (com siRNA), foi realizada sob baixas proporções de DMSO. No produto a ser caracterizado (polímero ou políplexos) a concentração de DMSO sempre foi igual ou inferior à 2% (v/v), visando sua aplicação biológica (BROWN; BÖGER-BROWN, 1999).

Figura 30 – Espectros de RMN ^1H dos derivados desbloqueados (DMSO- d_6 /DCI)



Fonte: Dados da pesquisa

5.1.5 GPC: massa molecular dos polímeros

A massa molecular (MM) dos polímeros pode influenciar as características físico-químicas e biológicas dos políplexos (LAYEK; SINGH, 2016). Assim, neste trabalho, foram sintetizadas duas séries (I e II) de derivados de quitosanas com o mesmo substituinte (DIPEA), mas que com diferentes MM, visando avaliar a influência deste parâmetro nas propriedades das nanopartículas.

Uma mesma amostra polimérica pode ser constituída de cadeias com diferentes quantidades de meros. Deste modo, a massa molecular de um dado polímero é, na verdade, um valor médio obtido a partir de uma curva de distribuição de dados (nesse caso, de massas moleculares). Dentre os diferentes tipos de massas moleculares médias abordadas pela literatura, a $\bar{M}_w$ e a $\bar{M}_n$ foram utilizadas neste trabalho. Enquanto a $\bar{M}_n$ é a média aritmética das massas moleculares das cadeias, $\bar{M}_w$ é a média ponderal desse valor, atribuindo maior importância as cadeias de massa molecular maior. Como ambas tem posições diferentes na curva de distribuição, a razão entre elas ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) indica a heterogeneidade no tamanho das cadeias poliméricas, e é conhecida como índice de polidispersão (CANEVAROLO, 2002).

As massas moleculares médias e o índice de polidispersão dos polímeros são listados no conjunto de dados das Tabelas 3, 4 e 5. Observa-se que as reações de desacetilação e de substituição causaram despolimerização e promoveram uma maior heterogeneidade no tamanho cadeias dos derivados, em relação às quitosanas de partida (CM comercial e CH). O que era esperado, uma vez que condições de alcalinidade elevada frequentemente causam a degradação das cadeias de quitosana (STEPHEN.; PHILLIPS, 2006) e um aumento nos valores de $\bar{M}_w/\bar{M}_n$.

Tabela 3 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries I e II: derivados com DIPEA de média e alta massa molecular

Polímero	GD (%) ^a	GS _{DIPEA} (%) ^a	GS _{DIPEA-C} (%) ^b	GS _{OH-DIPEA} (%) ^b	GS _{PEG} (%) ^a	GS _{RITC} (%) ^c	$\bar{M}_w$ (kDa) ^d	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$ ^d
CM comercial	82						208,2 ^e	1,92 ^e
CM ^f	96						141,1	3,02
CMD5		4,7					113,6	3,26
CMD15		15	16	NO ^g			98,3	2,74
CMD34		34	35	NO ^g			83,0	2,45
CMD55		55	54	7,0			90,6	2,71
CMD15-P _{1,7}		15 ^h			1,7			
CMD34-P _{1,3}		34 ^h			1,3			
CMD55-P _{1,3}		55 ^h			1,3			
CMD34-RITC						0,58		
CH ^f	96						236,7 ⁱ	1,70 ⁱ
CHD16		16	17	NO ^g			191,6	2,98
CHD32		32	32	NO ^g			186,0	2,77
CHD16-P _{1,9}		16 ^h			1,9			
CHD16-P _{2,7}		16 ^h			2,7			
CHD32-P _{1,3}		32 ^h			1,3			
CHD32-P _{2,6}		32 ^h			2,6			

^a Determinado por RMN ¹H. GD: Grau de desacetilação; GS_{DIPEA}: Grau de substituição por DIPEA; DS_{PEG}: Grau de substituição por PEG.

^b Determinado por RMN ¹³C. GS_{DIPEA-C}: Grau de substituição por DIPEA estimado via RMN ¹³C; DS_{OH-DIPEA}: Grau de substituição estimado por DIPEA na hidroxila ligada ao carbono 6 do anel glicopiranosídeo da quitosana.

^c Determinado via espectroscopia UV-Visível. GS_{RITC}: Grau de substituição por RITC.

^d Determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC). $\bar{M}_n$: Massa molecular média numérica; $\bar{M}_w$: Massa molecular média ponderal; $\bar{M}_w/\bar{M}_n$: índice de polidispersão das cadeias poliméricas.

^e Grupo de biomateriais e nanotecnologia (IBILCE/UNESP)

^f Quitosanas desacetiladas de média (CM) e alta (CH) massa molecular usada para síntese dos derivados.

^g NO: Não Observado por RMN ¹³C.

^h Determinado para os derivados não peguilados.

ⁱ Souza et al., 2018

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries III: derivados com DEAE e amina quaternária

Polímero	GD (%) ^a	GS _{DEAE} (%) ^a	GS _{Q-DEAE} (%) ^a	GS _{PEG} (%) ^a	$\bar{M}_w$ (kDa) ^b	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$ ^b
CM ^c	96				141,1	3,02
CMD _E 16		16	3,3		113,2	2,67
CMD _E 57		57	18		81,2	2,28
CMD _E 57-P _{1,5}		57 ^d	18	1,5		

^a Determinado por RMN ¹H. GD: Grau de desacetilação; GS_{DEAE}: Grau de substituição total por DEAE; GS_{Q-DEAE}: Grau de substituição por DEAE na forma quaternizada (DEAE-DEAE); DS_{PEG}: Grau de substituição por PEG.

^b Determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC). $\bar{M}_n$: Massa molecular média numérica; $\bar{M}_w$: Massa molecular média ponderal; $\bar{M}_w/\bar{M}_n$: índice de polidispersão das cadeias poliméricas.

^c Quitosana desacetilada (CM) usada como polímero de partida para síntese dos derivados.

^d Determinado para o derivado não peguilado.

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 5 – Propriedades físico-químicas dos polímeros das séries IV: derivados com DIPEA inseridos na quitosana com os grupos amina primária bloqueados

Polímero	GD (%) ^a	GA (%) ^a	GB (%) ^a	GS _{DIPEA} (%) ^{a,b}	$\bar{M}_w$ (kDa) ^c	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$ ^c
C* ^d	76	24			275,4	1,17
B-C		24	101			
B-CD52		15	79			
B-CD68		16	79			
O-CD52		3,1	30	52		
O-CD68		3,4	21	68		

^a Determinado por RMN ¹H. GD: Grau de desacetilação GA: Grau de acetilação; GB: Grau de bloqueio (engloba o GA); GS_{DIPEA}: Grau de substituição por DIPEA.

^b Determinado após a reação de desbloqueio com NaOH.

^c Determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC). $\bar{M}_n$: Massa molecular média numérica; $\bar{M}_w$: Massa molecular média ponderal; $\bar{M}_w/\bar{M}_n$: índice de polidispersão das cadeias poliméricas.

^d Quitosana comercial (C*) usada como polímero de partida para síntese dos derivados.

Fonte: Dados da pesquisa

Os polímeros da série II apresentaram MM duas vezes maior que polímeros da série I. Como partiram da mesma quitosana (CM), os derivados com DEAE (série III) e os derivados com DIPEA da série I exibiram massas moleculares e índices de polidispersividade próximos, o que permite uma melhor comparação entre os diferentes substituintes. A quitosana de partida para síntese dos derivados da série IV apresentou uma elevada massa molecular (necessária para as síntese subsequentes, como já foi mencionado) com um baixo $\bar{M}_w/\bar{M}_n$. Deste modo, no que diz respeito ao tamanho das cadeias, todos os polímeros foram obtidos com êxito. As curvas analíticas e os cromatogramas de GPC são apresentados no Apêndice D.

A MM para CM foi próxima as obtidas em outros trabalhos recentes do grupo (DIAS et al., 2018; SOUZA et al., 2018) que partiram da quitosana comercial fornecida pelo mesmo fabricante. Também é possível observar que os valores de polidispersividade dos derivados com DEAE, sintetizados nestes mesmos trabalhos, mantiveram próximas a polidispersividade dos derivados aqui apresentados (Tabela 3 e 4).

5.1.6 Capacidade de tamponamento (CT)

A capacidade do polímero em absorver prótons mostrou-se importante para favorecer o escape endossomal via esponja de prótons, como já mencionado. Essa capacidade é denominada pela literatura como capacidade de tamponamento, sendo que quanto maior for seu valor, mais o polímero será eficiente em absorver prótons. Sua magnitude é qualitativamente indicada pela

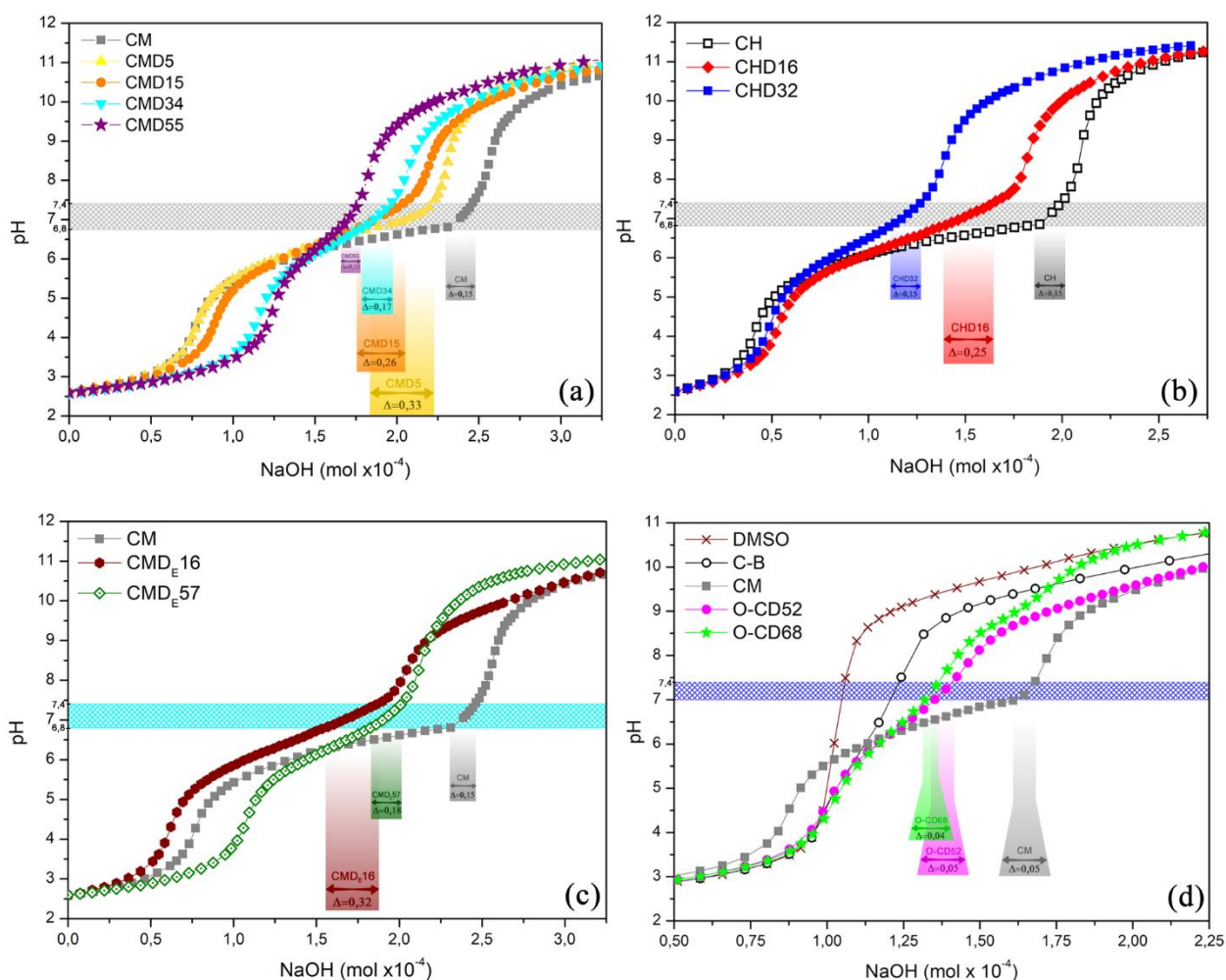
quantidade de NaOH consumido por um polímero, cujos grupos ácidos/básicos foram previamente protonados, em um dado intervalo de pH (XUN et al., 2013).

Na Figura 31 é apresentada a curva de titulação dos polímeros. Na faixa de pH situada entre 7,4-6,8 (nos polímeros das séries I, II e III) ou 7,4-7,0 (nos polímeros da série IV), observa-se que a maioria dos derivados apresentaram uma maior ou igual capacidade de absorver prótons em relação as quitosanas não modificadas. Essa faixa corresponde a um intervalo inicial de decaimento do pH durante a endocitose, que começa em pH 7,4 e pode chegar até pH 5,5 (no endossomo tardio) e é o responsável pela ativação de enzimas que causam degradação das substâncias endocitadas (ALBERTS et al., 2010; CASEY; GRINSTEIN; ORLOWSKI, 2010). Assim, essa ampliação na capacidade do polímero em absorver prótons logo no começo da via endocítica pode ser promissora, ao favorecer que o escape endossomal ocorra mais rapidamente (isto é, no início da via). Contudo, essa ampliação foi inversamente proporcional a quantidade de substituinte presente no polímero. Deste modo, em princípio, políplexos constituídos pelo CMD15 aceitará mais prótons no início da via endocítica que políplexos constituídos pelo CMD55, por exemplo.

O mesmo efeito do grau de substituição na capacidade de tamponamento dos polímeros foi observado por Layek e Singh (2013) ao adicionar diferentes proporções de ácido hexanóico na quitosana. Nestes derivados, a capacidade de tamponamento é ser atribuída as aminas primárias, uma vez que não há a presença de outros grupos ionizáveis na faixa de pH estudada.

Como foi mostrado para os derivados substituídos com DIPEA, o principal local de substituição são os grupos amina primários da quitosana (item 5.1.2). O DIPEA tem uma amina terciária, porém seu pKa elevado (aproximadamente 9,5 (Apêndice E)) é um indicio que ela não atua absorvendo prótons nessa faixa de pH (7,4-6,8). Além disso, não há evidencias que as aminas secundárias foram protonadas/desprotonadas nesta análise (Apêndice E). Sendo assim, a diminuição do tamponamento dos polímeros aqui estudados pode ser explicada de forma semelhante à mencionada anteriormente (para os polímeros de Layek e Singh). Entretanto, essa explicação não é válida para as quitosanas de partida, uma vez que estas apresentaram uma menor CT em relação aos derivados, nessa faixa de pH, mesmo contendo uma maior taxa de aminas primárias. Esse fato pode ser explicado com base na repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas, como será explicado pelos resultados de ionização.

Figura 31 – Capacidade de tamponamento dos polímeros de (a) média e (b) alta massa molecular substituídos com DIPEA (série I e II), com (c) DEAE (série III) e polímeros (d) bloqueados e substituídos com DIPEA (série IV). As áreas reticuladas nos gráficos indicam a faixa de pH em que a maioria dos derivados apresentaram maior ou igual capacidade de absorver prótons em relação à quitosana não modificada.



Nota: Os valores em quantidade de matéria de NaOH, indicados na figura acima, para (a) série I: CM (0,15), CMD5 (0,33), CMD15 (0,26), CMD34 (0,17) e CMD55 (0,10); para (b) série II: CH (0,15), CHD16 (0,25) e CHD32 (0,15); para (c) série III: CM (0,15), CMD_E16 (0,32) e CMD_E57 (0,18); e para (d) série IV: O-CD52 (0,05), O-CD68 (0,04) e CM (0,05). Todos os valores indicam o número de mols de NaOH elevado a quarta potência da base 10.

Fonte: Dados da pesquisa

Os polímeros de alta massa molecular (Figura 31 b) apresentaram uma CT que tende a ser ligeiramente menor, se comparada a dos polímeros de média MM (Figura 31 a). Esse mesmo efeito

da MM na CT também é relatada na literatura para a PEI ramificado de diferentes MM (MADY et al., 2011).

Além disso, os derivados com DEAE apresentaram uma CT que tende a ser maior que os derivados com DIPEA com graus de substituição (e massas moleculares) próximos (CMD₁₅ vs CMD₁₆; CMD₅₅ vs CDM₅₇). Esse fato pode ser explicado por dois motivos: (i) como ocorre a quaternização, o grau de substituição total por DEAE é próximo ao do DIPEA, porém a quantidade de substituintes inseridos nos grupos amina primários é menor (ver GS_{Q-DEAE}) e/ou (ii) quando o DEAE está ligado a uma amina quaternária é observada uma redução no pKa da amina terciária (do DEAE), que pode fazer com que ela absorva prótons na faixa de pH estudada (AMIJI, 2004).

Os derivados bloqueados não apresentaram uma CT eficiente quanto os derivados das outras séries, em relação a uma quitosana desacetilada de média massa molecular (CM). Apenas o derivado O-CD52 teve uma CT similar a indicada para CM, porém em uma faixa de pH mais reduzida (7,4-7,0). Vale ressaltar que devido à pequena quantidade obtida dos derivados, foi necessário fixar um número de mols de grupos amina inferior as outras séries estudadas (item 4.5.5). Deste modo, nos resultados apresentados na Figura 31 (d), a CM também apresenta esse mesmo número de mols de grupos amina, possibilitando sua utilização como referência.

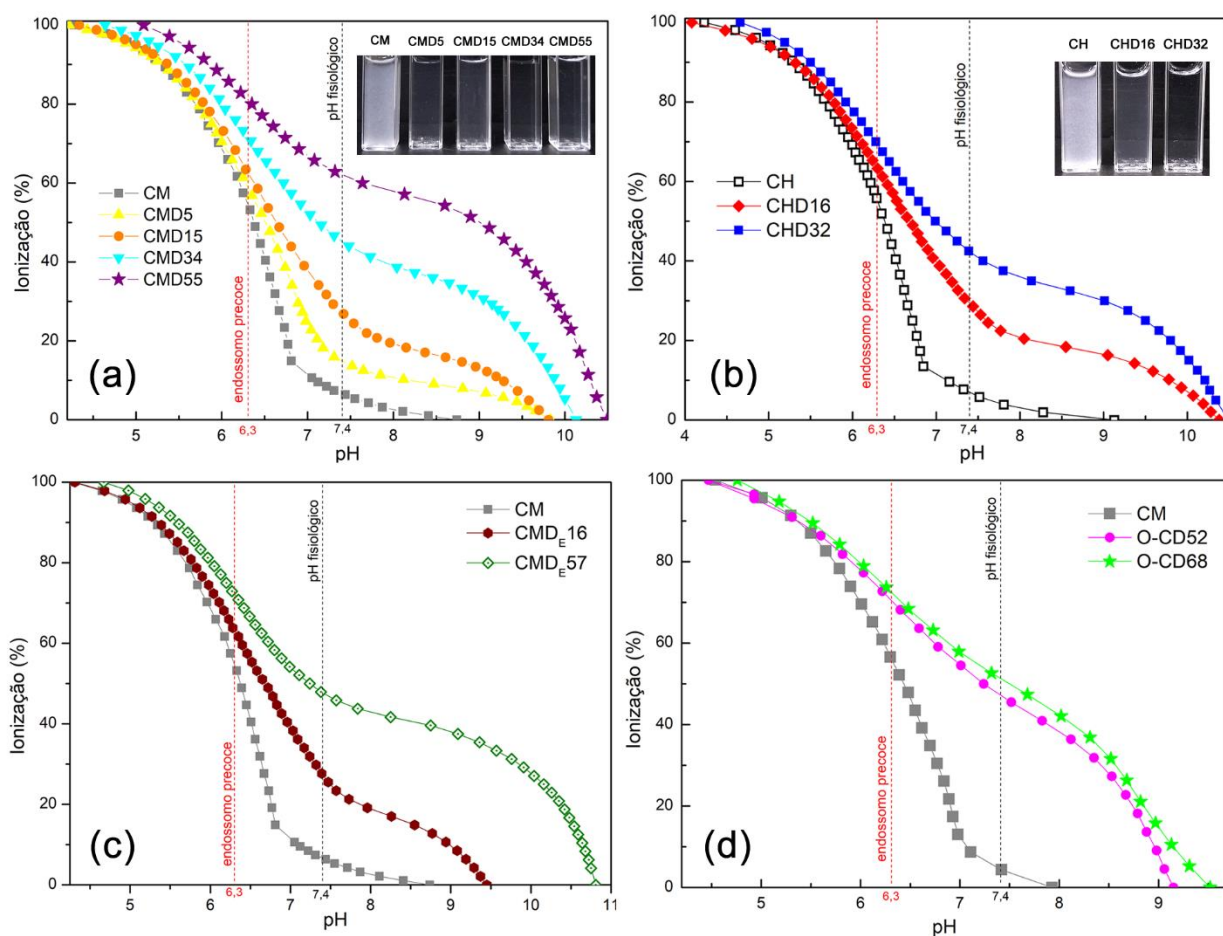
5.1.7 Grau de ionização (GI) dos polímeros em função do pH

O grau de ionização dos polications tem um papel importante na formação e nas propriedades dos poliplexos. Como os polímeros estudados apresentam basicamente grupos amina em sua estrutura, o GI refere-se à densidade de cargas positivas nos mesmos. Portanto, o GI está diretamente relacionado com a intensidade de interação com o ácido nucleico (que é carregado negativamente, em pH fisiológico) e com a carga superficial dos poliplexos, parâmetros que estão intimamente relacionados à eficiência de transfecção.

O efeito do pH na ionização dos grupos protonáveis (na faixa de pH 2-11) dos polímeros é mostrado na Figura 32. Próximo ao pH 6,3 as quitosanas (CM e CH) encontram-se cerca de 50% ionizadas, em concordância com o valor de pKa dos grupos amina primários reportados na literatura (GONSALVES et al., 2011). O decréscimo contínuo da porcentagem de ionização com o aumento do pH é consistente com a desprotonação dos grupos amina (primário e terciário). A inserção dos substituintes (DIPEA ou DEAE) promoveu um nítido aumento no GI dos derivados

em valores de pH mais elevados. O GI dos derivados mostrou-se proporcional ao GS, deste modo, o derivado CMD55 (GI 62%; pH 7,4), em princípio, complexará mais eficientemente o siRNA em pH fisiológico que o CMD5 (GI 15%; pH 7,4), oferecendo maior proteção ao mesmo. Os derivados mais substituídos também apresentaram maiores GI em pH 6,3 (pH do endossomo precoce, isto é, o endossomo do início da via endocítica), o que favorece à interação das nanopartículas com a membrana interna do endossomo, contribuindo com sua desestabilização e, conseqüentemente, com o escape endossomal.

Figura 32 – Grau de ionização dos polímeros de (a) média e (b) alta massa molecular substituídos com DIPEA (série I e II), com (c) DEAE (série III) e polímeros (d) bloqueados e substituídos com DIPEA (série IV) em função do pH. As entradas em (a) e (b) são fotografias dos polímeros (2 g L^{-1}) dispersos em tampão fosfato pH 7,4 ($I = 0,15 \text{ mol L}^{-1}$)



Fonte: Dados da pesquisa

Os derivados de alta massa molecular (série II) apresentaram um GI que tende a ser ligeiramente menor que os derivados de média massa molecular (série I) em 7,4 (Figura 32 a, b). Contudo, a comparação entre as duas séries mostra que o aumento da massa molecular proporciona graus de ionização maiores em valores de pH mais elevados (CMD15 versus CHD16 em pH 10, por exemplo). Isso pode ser atribuído a uma maior interação entre essas macromoléculas, o que dificulta a desprotonação dos grupos amina presentes em regiões mais internas do novelo polimérico.

Em relação aos diferentes substituintes, é possível observar nos derivados mais substituídos (CMD55 versus CMD_E57) que a quaternização (do DEAE) causa um menor GI em função do pH. O que é esperado, uma vez que aminas quaternárias não podem se protonadas por já possuem uma carga positiva permanente.

Os derivados da série IV (Figura 32 d) não apresentaram uma diferença visualmente significativa entre si, porém, ambos apresentaram um GI mais elevado que a CM em pH 6,3 e 7,4.

A repulsão eletrostática tende a diminuir a interação entre as cadeias poliméricas, o que possibilita que a protonação/desprotonação dos grupos aminas presentes nos polímeros ocorra mais facilmente. As quitosanas desacetiladas (CM e CH) apresentaram os menores valores de GI na faixa de pH de 7,4 a 6,8 e, portanto, suas cadeias tendem a interagir mais entre si do que as cadeias dos derivados. Esse fato explica a menor capacidade da CM e CH em absorver prótons (item 5.1.6) nessa faixa de pH, embora possuam maiores quantidades de grupos amina primários. Esse comportamento também afeta a solubilidade dos derivados em condições próximas às fisiológicas, como é mostrado nas entradas da Figura 32 (a, b): as quitosanas são insolúveis em pH 7,4, contudo a adição de uma pequena quantidade de DIPEA (5%) melhorou visivelmente sua solubilidade.

5.2 Caracterização das nanopartículas

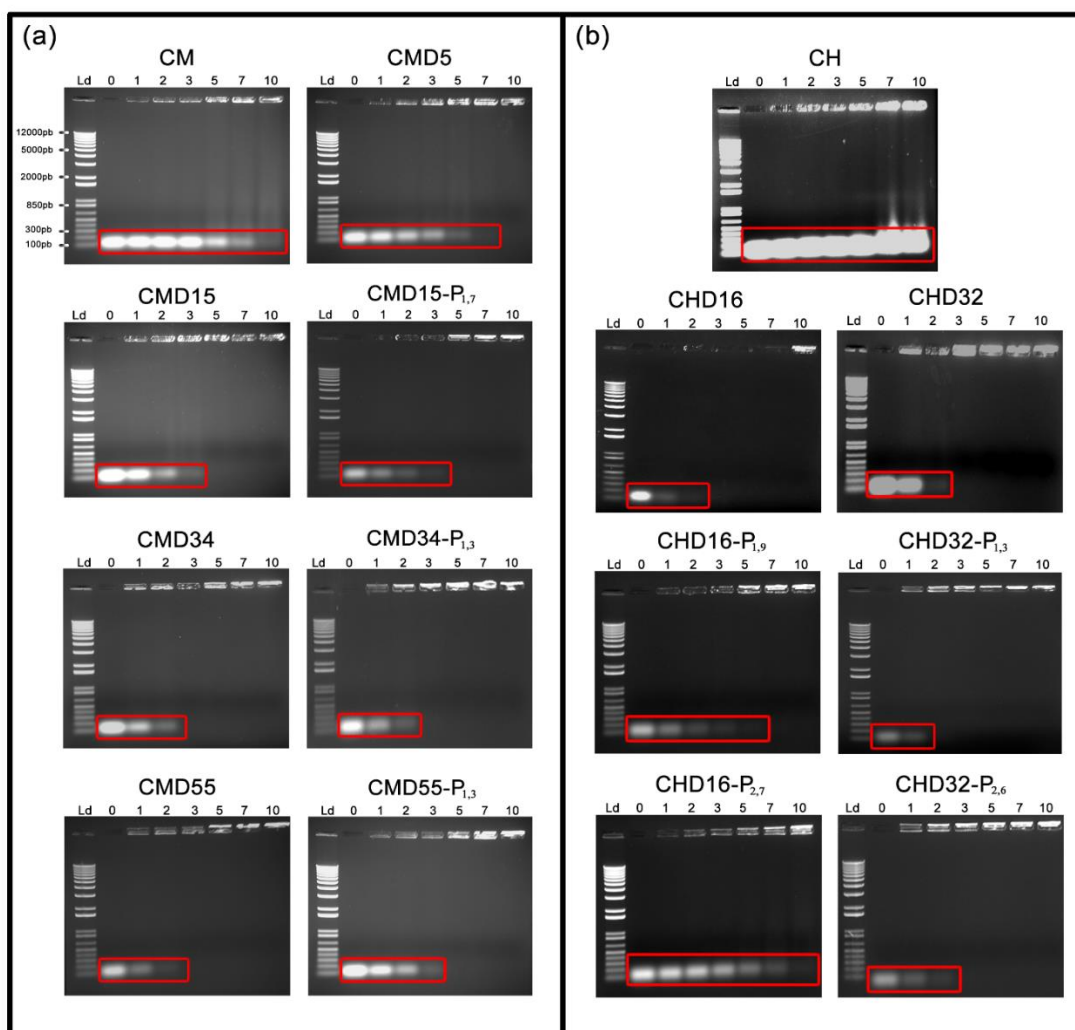
5.2.1 Ensaio de liberação do siRNA em gel de agarose

Na terapia gênica não viral, algumas das principais funções dos polycations são: (i) promover a neutralização das cargas negativas do siRNA, evitando a repulsão eletrostática contra a membrana plasmática (SALCHER; WAGNER, 2010), e (ii) fornecer proteção ao material genético, evitando a degradação enzimática (ALBERTS et al., 2010; CHEN et al., 2016). A

eletroforese das nanopartículas permite avaliar qualitativamente ambas as funções. Neste experimento, quando o siRNA não é liberado em uma determinada razão N/P, pode-se inferir que: (i) há uma forte interação entre o siRNA e o polícatión, o que indica uma alta capacidade de fornecer proteção ao material genético (AGIRRE et al., 2014) e (ii) houve a neutralização (completa ou parcial) da carga negativa do siRNA (LAYEK; SINGH, 2013).

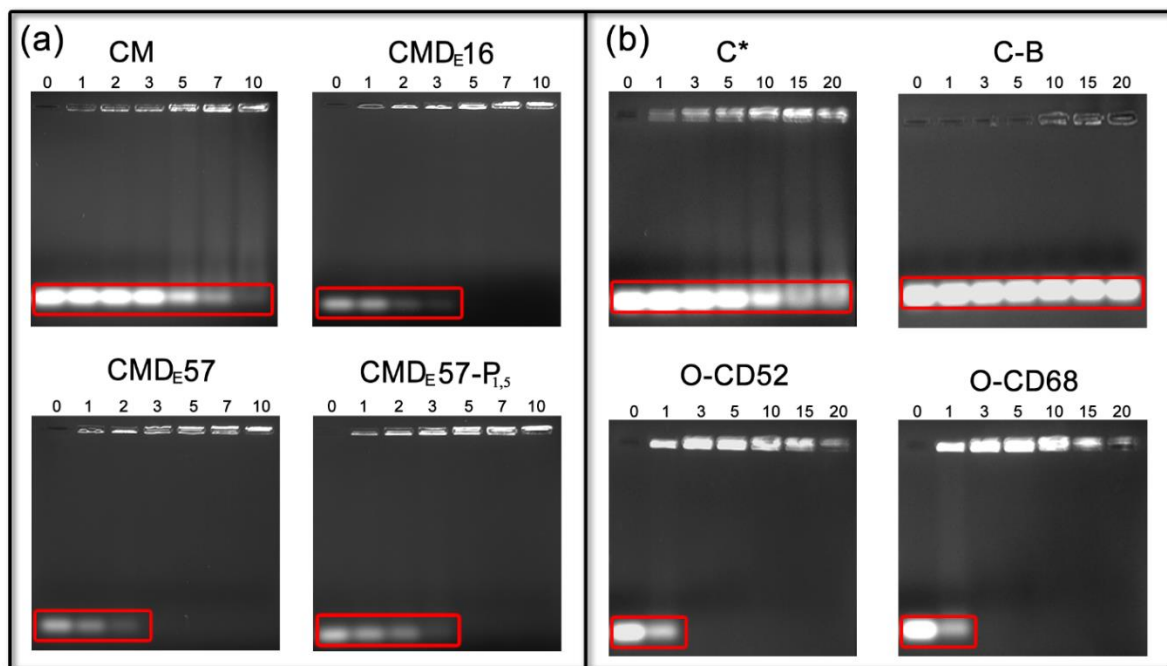
Os resultados apresentados nas Figuras 33 e 34, mostram diferenças significativas nos padrões de corrida, que se correlacionam com a composição e MM dos polímeros. Vale ressaltar, que este estudo foi realizado em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica ($0,15 \text{ mol L}^{-1}$).

Figura 33 – Eletroforese dos poliplexos formados pelos polímeros substituídos com DIPEA das séries (a) I e (b) II em diferentes razões N/P no pH 7,4 ($I = 0,15 \text{ mol L}^{-1}$)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 34 – Eletroforese dos políplexos formados pelos polímeros das séries (a) III e (b) IV em diferentes razões N/P no pH 7,4 ($I = 0,15 \text{ mol L}^{-1}$)



Nota: Devido à ausência de grupos amina livres no polímero C-B, a quantidade de matéria utilizada na preparação de seus políplexos, em distintas razões N/P, foi a mesma empregada para originar os políplexos da quitosana de partida (C*) para síntese dos derivados da série IV.

Fonte: Dados da pesquisa

Os políplexos preparados com as quitosanas de partida (CM, CH e C*) liberaram o siRNA em todas as razões N/P estudadas, indicando uma baixa capacidade desses polímeros (não modificados) em atuarem como vetores nas condições (fisiológicas) do estudo.

Inicialmente, nos derivados de média MM, observa-se (Figuras 33a e 34a) um aumento na retenção do siRNA com o aumento do GS, o que pode ser atribuído ao crescente GI (em pH 7,4) dos polímeros. Entretanto, esse comportamento não é observado nos derivados mais substituídos (CMD34 e CMD55), uma vez que o padrão de corrida para ambos foi similar, o que indica que eles apresentam a mesma capacidade de complexar o siRNA, apesar dos diferentes GS_{DIPEA} .

A comparação dos derivados de mesma composição, mas com diferentes MM (CMD15 e CMD34 versus CHD16 e CHD32), mostram claramente que o aumento da massa molecular promove um aumento na força de interação com o siRNA. Entretanto, a comparação das quitosanas de partida mostra um resultado distinto, a CH apresentou menor interação com os ácidos nucleicos

quando comparada à CM. Devido ao baixo GI (Figura 32), ambos os polímeros estão agregados (pH 7,4), porém a CH tem uma MM maior e, portanto, a interação entre suas cadeias tende a ser maior que à CM, o que pode diminuir a superfície de contato para interação com siRNA.

Em relação aos diferentes substituintes (DIPEA e DEAE), não foi observada uma diferença nos padrões de corrida.

Os derivados da série IV substituídos com DIPEA apresentaram uma forte interação com o siRNA, similar aos polímeros mais substituídos das séries I e III (CMD55 e CMD_E57), cuja a porcentagem de substituinte (GS entre 52-68%) é similar a destes derivados (série IV). A eletroforese dos complexos formados pela C-B (com siRNA) confirma o bloqueio, pois como não há grupos amina livres (para interação eletrostática com o siRNA), ocorre a liberação dos ácidos nucleicos em todas as razões estudadas, com retenção mínima nos poços (a partir da razão 10) que pode ser atribuída a outras interações intermoleculares de menor intensidade.

É conhecido que a inserção de cadeias de PEG nos polications diminui a sua capacidade de interagir com o material genético (RHEINER; BAE, 2016). Assim, baseando-se nos estudos de eletroforese, os derivados que apresentaram maior interação com o siRNA (CMD15, CMD34, CMD55, CHD16, CHD32 e CMD_E57) foram selecionados para modificação com PEG. As eletroforeses dos poliplexos peguillados mostram que nos polímeros da série II, apenas o CHD16 teve sua interação (com o siRNA) reduzida com a adição de PEG, sendo que quanto maior o GS_{PEG}, mais fraca foi a interação. Já nos derivados da série I, após a peguilação, apenas o derivado de maior GS_{DIPEA} (CMD55) teve uma menor interação com o siRNA. Este último efeito também foi observado no polímero da série III com elevado GS_{DEAE} (CMD_E57).

Portanto, tem-se que os derivados das séries III e IV, assim como a maioria dos derivados das séries I e II, apresentam um bom potencial para serem aplicados como vetores na terapia gênica, sobretudo devido à alta capacidade de interagir com o siRNA e características que podem favorecer o escape endossomal, via o mecanismo de “esponja de prótons”. Neste sentido, os derivados das séries I e II foram selecionados para estudar melhor a relação estrutura-atividade dos polications na constituição dos vetores multifuncionais. Algumas caracterizações adicionais para alguns polímeros das séries III e IV são apresentadas no Apêndice F.

5.2.2 Potencial Zeta (ζ), diâmetro hidrodinâmico (Dh) e polidispersividade (PDI) das nanopartículas por meio do espalhamento de luz

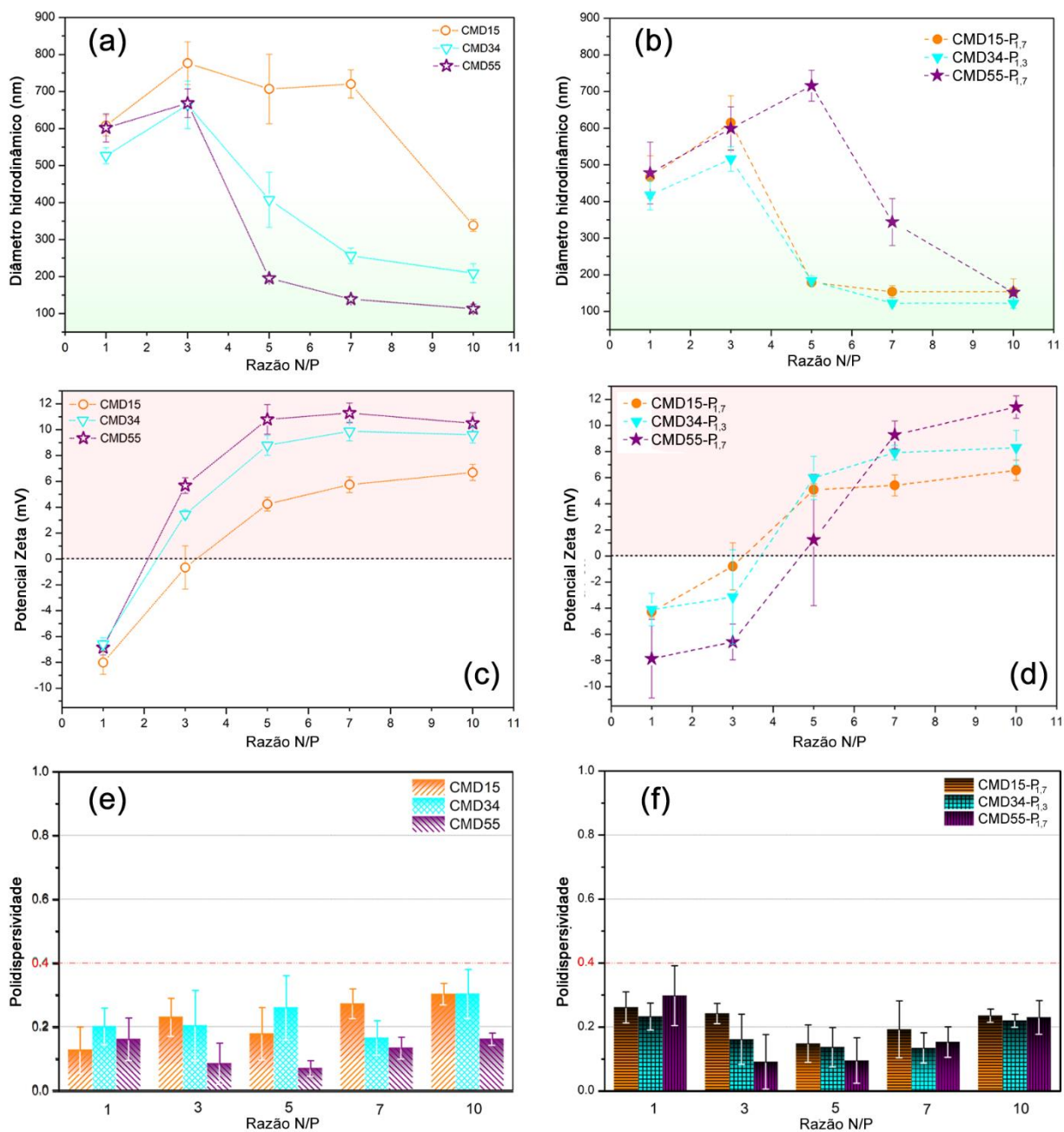
As nanopartículas, além de um tamanho adequado (geralmente inferiores a 500 nm), necessitam de um potencial zeta (ζ) mínimo positivo (em pH 7,4) para favorecer a captação celular e, conseqüentemente, a eficiência de transfecção. O diâmetro hidrodinâmico (Dh), potencial ζ e a polidispersividade (PDI) dos poliplexos formados pelos polímeros das séries I e II, em função da razão N/P, são apresentados nas Figuras 35 e 36. Em geral, observa-se que quanto maior é o GS_{DIPEA} , menor é a razão N/P necessária para formação de nanopartículas (razão N/P_{nano}) e maior é o potencial ζ dos poliplexos. Nota-se também, que a formação de nanopartículas (menores que 400 nm) só ocorre nas razões N/P em que o potencial ζ é positivo, o que indica que o empacotamento só é eficiente quando a carga (negativa) do siRNA é completamente neutralizada.

A proporcionalidade do GS_{DIPEA} com a carga superficial (positiva) dos poliplexos corrobora com o GI dos derivados em pH 7,4. Além disso, os resultados de potencial zeta também entram em concordância com os estudos de eletroforese, principalmente para os derivados da série I. Em geral, a retenção completa do siRNA nos poços só ocorreu nas razões N/P em que o potencial zeta foi positivo.

A massa molecular (MM) também se mostrou um parâmetro importante na diminuição da razão N/P_{nano}. Por exemplo, enquanto o CMD34 formou nanopartículas com Dh de aproximadamente 200 nm apenas na razão N/P 10, o CHD32 formou nanopartículas com o mesmo Dh na razão N/P 5. Isso reforça a presença de outras interações, além da eletrostática, na formação dos poliplexos, em concordância com a literatura (SOUZA et al., 2018). A comparação dos derivados das séries I e II, mostra que o aumento da MM afetou a polidispersão dos poliplexos: os polímeros de média MM apresentam PDI inferiores (menor que 0,4) se comparados aos polímeros de alta MM (PDI menores que 0,6).

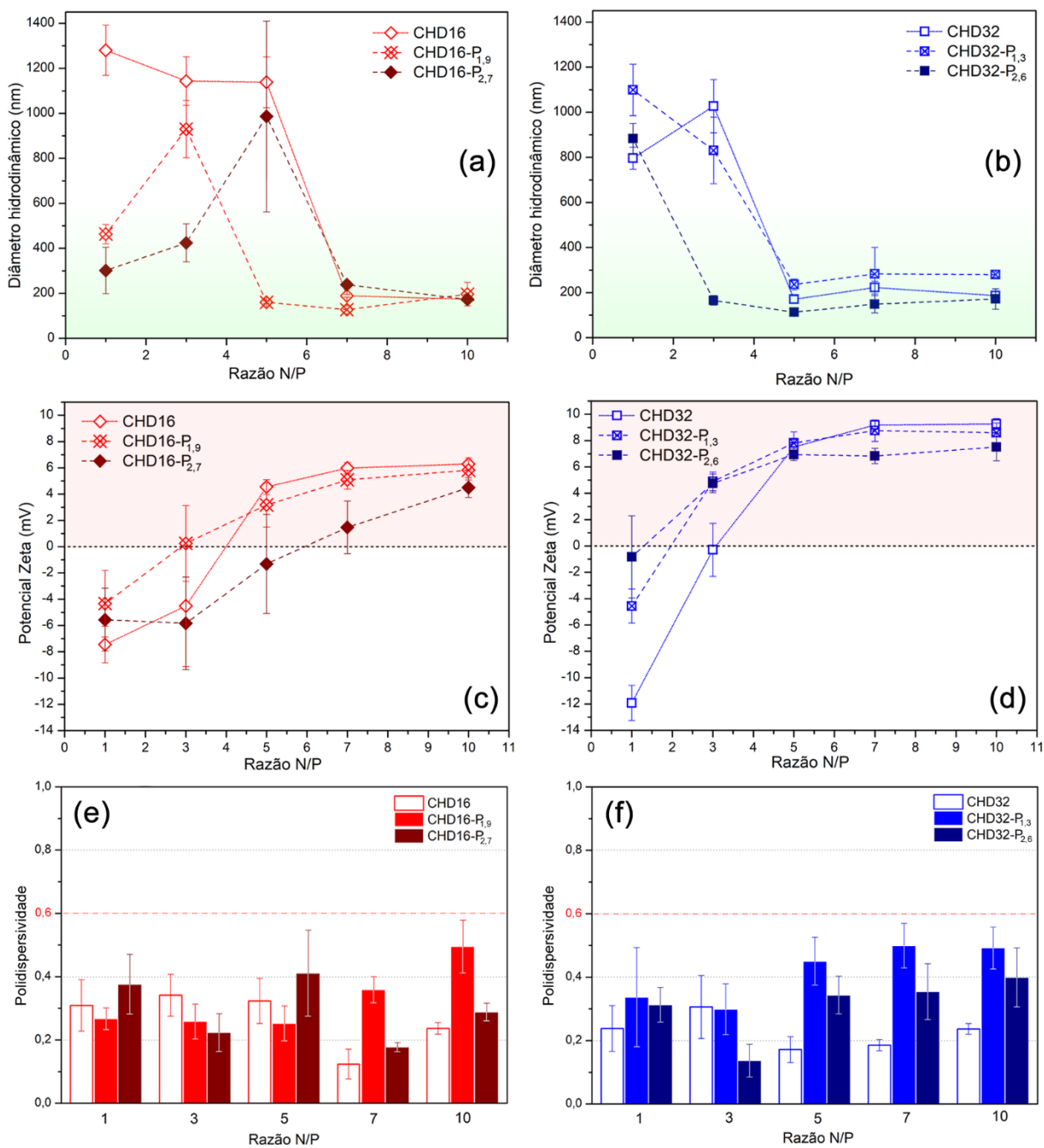
A presença e a densidade de PEG nos derivados afetaram tanto o Dh quanto o potencial ζ dos poliplexos. Com a peguilação, os derivados menos substituídos da série I formaram nanopartículas (entre 150 e 200 nm) com 50% menos polímero. Enquanto para o CMD55, a adição de PEG tem efeito exatamente contrário, ou seja, a razão N/P_{nano} aumentou em 50%. Esse efeito é corroborado pela eletroforese, que indica um decréscimo na força de interação deste polícatión (CMD55-P_{1,3}) com o siRNA.

Figura 35 – (a, b) Diâmetro hidrodinâmico, (c, d) potencial Zeta e (e, f) polidispersividade dos políplexos formados pelos polímeros de média massa molecular substituídos com DIPEA (série I) sob diferentes razões N/P e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L⁻¹)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 36 – (a, b) Diâmetro hidrodinâmico, (c, d) potencial Zeta e (e, f) polidispersividade dos políplexos formados pelos polímeros de alta massa molecular substituídos com DIPEA (série II) sob diferentes razões N/P e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L⁻¹)



Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados indicam que, nos derivados com GS_{DIPEA} de 15 e 34%, a adição de PEG é favorável à formação de nanopartículas, e que o aumento da massa molecular reduz a razão N/P_{nano} . Assim, visando a produção de vetores cada vez mais promissores, variou-se o GS_{PEG} nos derivados CHD16 e CHD32. A adição de PEG nestes derivados, causou um aumento da PDI dos poliplexos (Figuras 36e,f) em razões N/P maiores. O aumento no GS_{PEG} do CHD32 reduziu a razão N/P_{nano} de 5 para 3. Já para o CHD16, o GS_{PEG} intermediário (1,9%) foi o que se mostrou mais promissor na obtenção das nanopartículas.

Na maioria das razões N/P, a peguilação causou uma diminuição no módulo dos valores de potencial ζ dos poliplexos. Isso promoveu, nos polímeros da série I, um aumento na razão N/P mínima necessária para um potencial positivo (razão N/P_{zeta}). Já nos polímeros da série II, esse comportamento só foi observado para o CHD16- $P_{2,7}$, já que nos demais derivados a adição de PEG reduziu a razão N/P_{zeta} . Esses resultados corroboram com a literatura ao indicar que o PEG proporciona uma camuflagem (devido ao efeito estérico e a camada de hidratação) das propriedades superficiais das nanopartículas, neste caso, sua carga superficial (NEL et al., 2009).

Na literatura, boa parte das nanopartículas (de quitosana ou de derivados de quitosana) aplicadas para entrega de siRNA nas células são preparadas e analisadas em condições diferentes das fisiológicas, no que se refere ao pH (geralmente menor que 7) e/ou a força iônica (ALAMEH et al., 2017; CORBET et al., 2016; MOBARAKE et al., 2019; RUDZINSKI et al., 2016; SHI et al., 2018; SOUZA et al., 2018; YANG et al., 2017). Isso se deve, principalmente, à solubilidade limitada e a baixa ionização da quitosana pH fisiológico, o que limita sua interação com os ácidos nucleicos. Portanto, por meio deste estudo, fica evidente a importância da adição de DIPEA e PEG na quitosana, uma vez que foram obtidas nanopartículas com Dh em torno de 200 nm e potencial zeta positivo em condições fisiológicas de pH e força iônica. Além disso, o Dh das nanopartículas formadas pelo polímero CMD34 com siRNA na razão N/P 10 foram minimamente alteradas pela diminuição do pH e da força iônica, contudo, houve uma tendência de aumento do potencial ζ (em relação as condições fisiológicas) em cerca de 80%, em conformidade com o GI (Apêndice G).

5.2.3 Estabilidade coloidal das nanopartículas em condições fisiológicas de pH e força iônica na presença e ausência de albumina

A estabilidade coloidal das nanopartículas foi avaliada pelo monitoramento do Dh em função do tempo. Este estudo, além de indicar quanto tempo as nanopartículas permanecem estáveis (em solução) após sua preparação, também estima sua estabilidade nos sistemas biológicos. Na razão N/P 10, todos os derivados apresentam nanopartículas com bons resultados de Dh, potencial zeta e capacidade de proteção do siRNA, assim, essa razão N/P escolhida para os estudos de estabilidade.

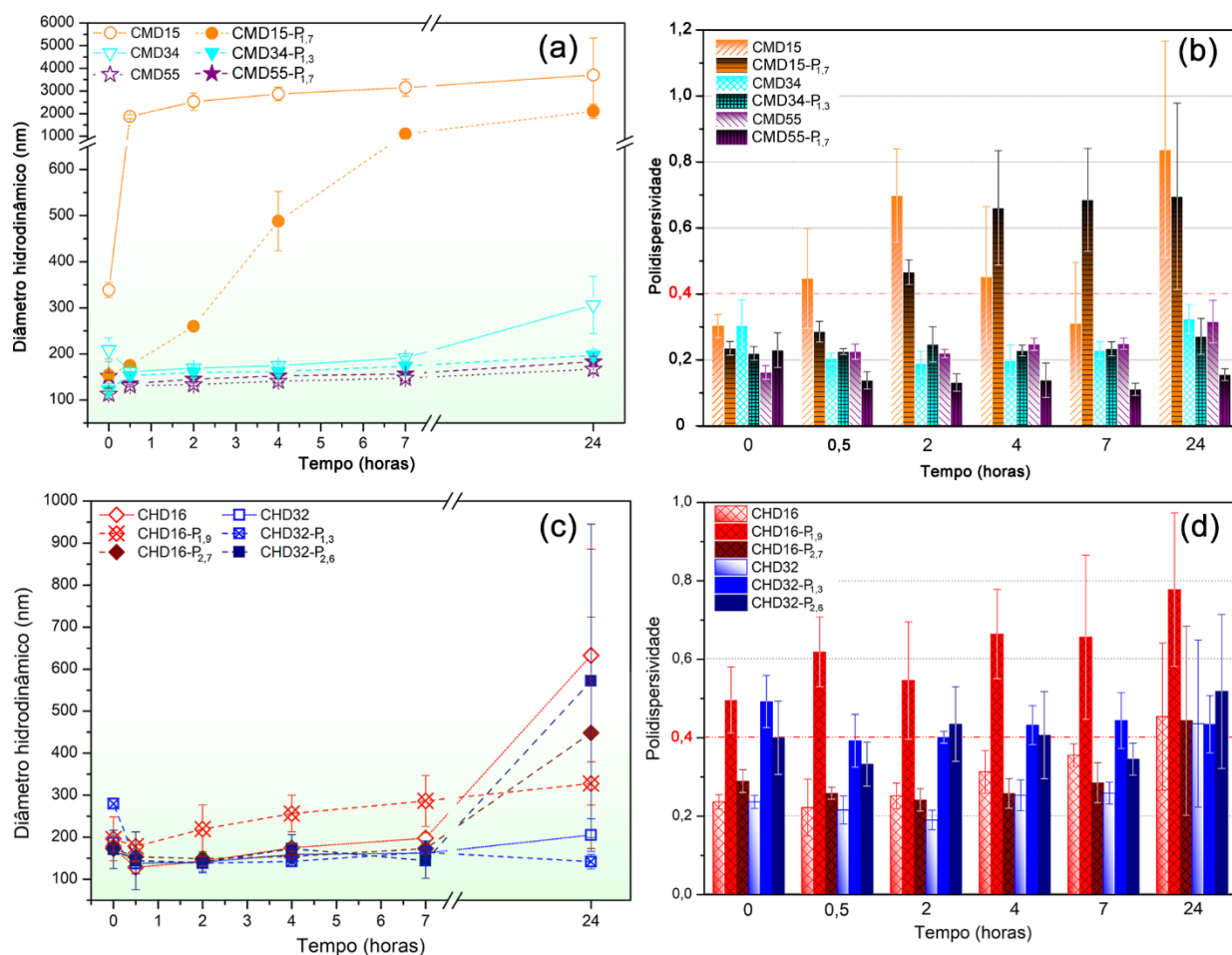
Como pode ser observado (Figuras 37), a variação do Dh (na ausência de albumina) com o tempo mostrou-se dependente do GS_{DIPEA}, da presença de PEG e da MM. O aumento do GS_{DIPEA} e da MM promoveram uma maior estabilidade nos poliplexos, com destaque para as nanopartículas obtidas pelo CMD55 e pelo CHD32 que, após 24 horas ainda apresentaram Dh em torno de 200 nm. Nos derivados de média MM, a adição de PEG ampliou a estabilidade coloidal dos poliplexos, com destaque para os derivados com GS_{DIPEA} de 15% (CMD15 versus CMD15-P_{1,7}). Porém nos derivados de alta MM, a presença de PEG e o GS_{PEG} praticamente não alteraram a estabilidade coloidal na ausência de proteína, em relação aos derivados não peguilados.

Em geral, a PDI de todos os poliplexos aumentou com o passar do tempo e, considerando o CMD15 e o CMD55 (Figura 37 b), tem-se que esse aumento é inversamente proporcional ao GS_{DIPEA}. Os poliplexos formados pelos polications de média MM, com exceção do CMD15 e CMD15-PEG, mantiveram a PDI inferior a 0,4 até 24 horas de estudo. Já as nanopartículas dos derivados alta MM, com exceção do CHD16-P_{1,3}, mantiveram a PDI inferior a 0,6 somente até as primeiras 7 horas de estudo.

Em geral, a adsorção de proteínas na superfície das nanopartículas (durante sua biodistribuição pelo organismo) representam um grande obstáculo que pode diminuir a eficiência do agente de transfecção devido, principalmente: (i) a ocorrência de opsonização, isto é, a adsorção de proteínas específicas (chamadas opsoninas) que marcam as nanopartículas para serem fagocitadas por células especializadas (ii) a desestabilização da estrutura físico-química dos vetores, fazendo com que liberem o siRNA antes de atingirem as células alvo. A albumina é uma das proteínas de maior concentração no organismo e é um exemplo de opsonina (ELSABAHY;

WOOLEY, 2012; NEL et al., 2009). Em pH fisiológico, a albumina apresenta um potencial zeta negativo (LI et al., 2016), o que favorece sua interação com superfícies carregadas positivamente.

Figura 37 – (esquerda) Diâmetro hidrodinâmico e (direita) polidispersividade dos poliplexos formados pelos polímeros de (a, b) média e (c, d) alta massa molecular substituídos com DIPEA em função do tempo. Todas as nanopartículas foram preparadas na razão N/P 10 e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica ($0,15 \text{ mol L}^{-1}$)



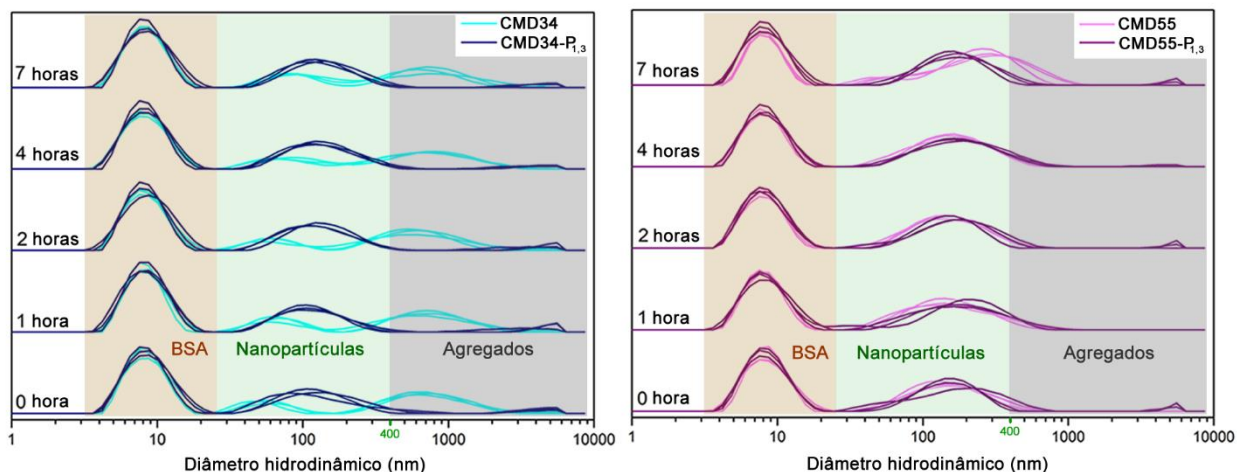
Fonte: Dados da pesquisa

As nanopartículas dos derivados da série I com maior estabilidade coloidal (Figura 37), tiveram seu Dh monitorado em função do tempo na presença de albumina sérica bovina (BSA). As curvas de distribuição do Dh baseado na intensidade de luz espalhada (em função do tempo) pelos constituintes da amostra são apresentadas na Figura 38. A BSA apresentou um Dh em torno de 8 nm, consistente com o tamanho encontrado na literatura (LI et al., 2016). Quando as nanopartículas

interagem com BSA, ocorre uma nítida mudança na distribuição Dh (isto é, surgem sinais referentes a estruturas maiores), sugerindo a formação de agregados.

O GS_{DIPEA} e a adição de PEG influenciaram a formação de agregados políplexo/BSA. Para as nanopartículas formadas pelo CMD55, não foi observada a presença de agregados (com Dh superiores a 400 nm) em até 4 horas de estudo. Já os políplexos obtidos com CMD34, formaram agregados com a BSA imediatamente após a mistura (Figura 38). Entretanto, quando as nanopartículas foram preparadas com a versão peguilada desse derivado (CMD34-P_{1,3}), observou-se uma inibição na formação de agregados durante as 7 horas do estudo. Em relação ao derivado mais substituído, a presença de PEG também indicou uma tendência na diminuição da formação de agregados no período de 7 horas após o início do estudo. Em concordância com a literatura, este estudo evidencia o efeito positivo que o PEG tem sobre as nanopartículas ao evitar interações indesejadas com as proteínas séricas.

Figura 38 – Distribuições representativas do diâmetro hidrodinâmico (baseado na intensidade de luz espalhada) das nanopartículas na presença de albumina sérica bovina (BSA; 40 g L⁻¹) em função do tempo. Todas as nanopartículas foram preparadas na razão N/P 10 e em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L⁻¹)

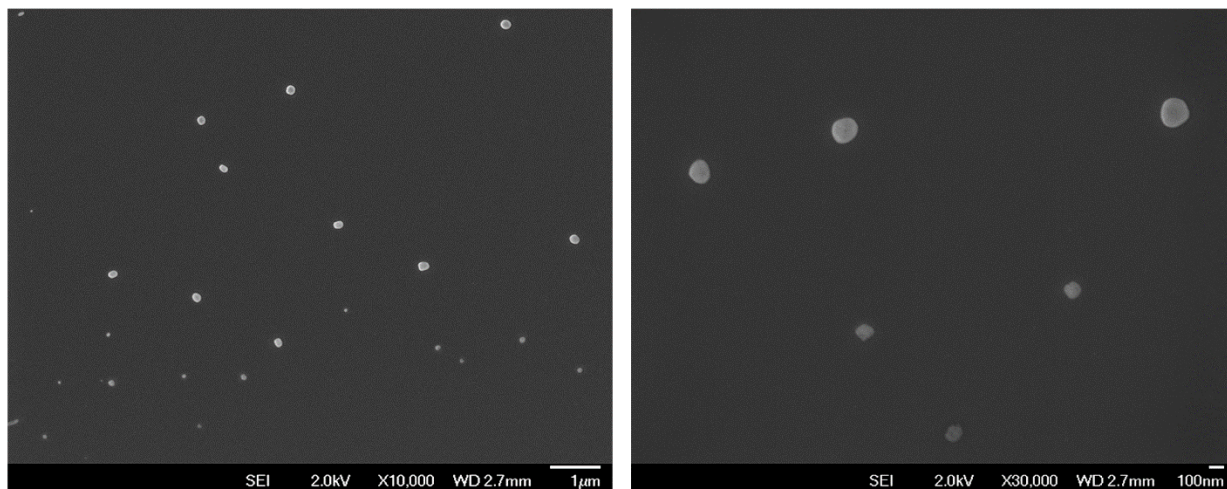


Fonte: Dados da pesquisa

5.2.4 MEV-FEG das nanopartículas

A forma física dos políplexos pode exercer influência na terapia gênica, em especial, na internalização celular. Foi encontrado, que nanopartículas esféricas são melhor internalizadas pelas células do que nanopartículas mais alongadas (ELSABAHY; WOOLEY, 2012), uma vez que estas acumulam-se mais nos compartimentos endo-lisossômicos (LAYEK; SINGH, 2016), tendo maiores chances de serem degradadas. Os políplexos de quitosana podem assumir diferentes morfologias, por exemplo, esférica, toroidal e bastônica (AGIRRE et al., 2014). A forma obtida depende, principalmente, das características do polímero e do meio em que as nanopartículas se encontram ou foram preparadas, e é usualmente observada pela MEV (LAYEK; SINGH, 2016). As nanopartículas obtidas pelo polímero CMD55-P_{1,3} na razão N/P 10 e em pH 7,4, apresentaram formato esférico (Figura 39) e tamanhos coerentes com os obtidos pelo espalhamento dinâmico de luz (100-150 nm).

Figura 39 – Imagens representativas de MEV-FEG e das nanopartículas do CMD55-P_{1,3} preparadas na razão N/P 10 em pH 7,4 e I = 0,15 mol L⁻¹. Ampliação de (esquerda) 10 000 e (direita) 30 000 vezes



Fonte: Dados da pesquisa

5.3 Ensaio de proliferação celular com MTS: citotoxicidade dos polímeros e das nanopartículas

Neste trabalho, os estudos de proliferação celular foram realizados com MTS e expressos em termos de porcentagem de viabilidade celular. A citotoxicidade é frequentemente abordada pela literatura para fazer referência ao inverso da viabilidade celular, analogia que também é adotada neste trabalho. Uma vez dentro da célula, o MTS é presumidamente reduzido por NADH e NADPH (sintetizados por enzimas desidrogenases em células metabolicamente ativas) à formazana, que tem coloração distinta do MTS (CELLTITER..., 2012). Deste modo, a concentração de formazana no meio é diretamente proporcional a quantidade de células metabolicamente ativas, também chamada de viáveis.

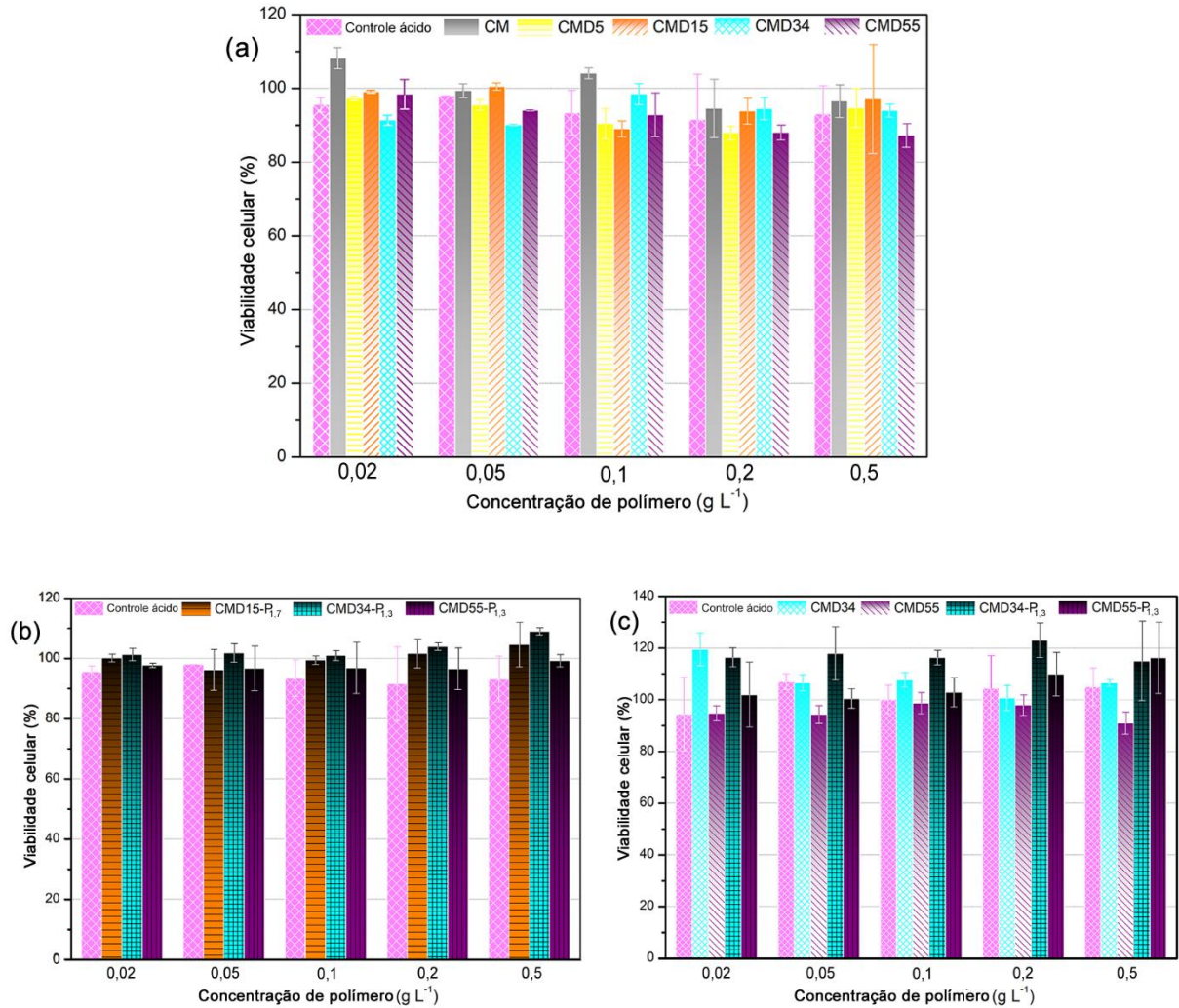
Duas linhagens celulares foram empregadas neste estudo: fibroblastos 3T3/NIH e macrófagos RAW 264.7. Os fibroblastos sintetizam componentes da matriz extracelular dos tecidos e, devido à sua grande abundância no organismo, são células que têm grande chance de entrarem em contato com os polímeros. Já os macrófagos, são células de defesa do organismo que atuam na fagocitose de corpos estranhos, assim, também apresentam uma alta probabilidade de interagirem com os polímeros aplicados *in vivo* (GORMLEY; GHANDEHARI, 2009). Além disso, os macrófagos RAW 264.7 são as células utilizadas nos estudos de transfecção (*in vitro*) para o bloqueio da expressão do TNF- α , por meio do silenciamento genético.

A viabilidade das células foi avaliada diante a presença de concentrações crescentes dos polímeros das séries I e II, conforme é apresentado nas Figuras 40 e 41. Observa-se que para todos os polímeros estudados, a viabilidade celular se apresentou acima de 80%, independente da concentração e da linhagem celular. O controle ácido demonstrou não causar efeito no ensaio.

Esses resultados indicam que mesmo com as modificações químicas, os derivados mantiveram as características não citotóxicas da quitosana (JAYAKUMAR et al., 2010). As viabilidades relatadas para os polímeros foram próximas as de derivados de quitosana com DEAE (com GS similares à deste estudo) encontradas na literatura (PICOLA et al., 2016; SOUZA et al., 2018) e neste mesmo trabalho (Apêndice F). Conforme foi indicado por Lin e Hsu (2015), que avaliaram a citotoxicidade de quitosanas modificadas com galactose e PEG, a pegulação não promoveu alterações na viabilidade celular dos polímeros. Além disso, na concentração mais elevada (0,5 g L⁻¹), os derivados de quitosana (desse estudo) apresentaram viabilidades celulares

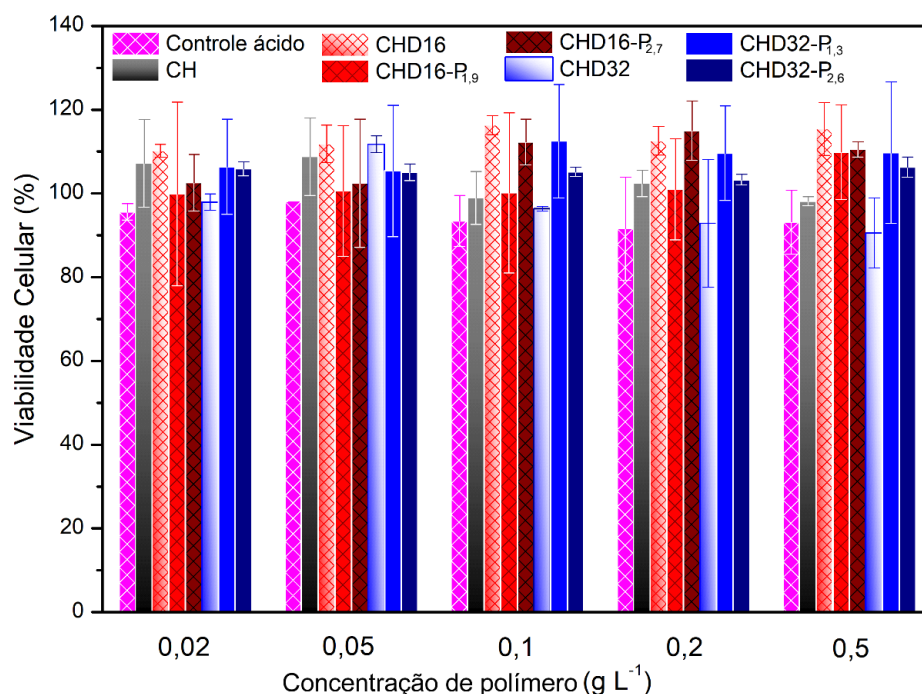
pelo menos 8 vezes maior que a PEI (ramificada) de 25 kDa (TANG et al., 2003), um dos polímeros mais estudados para formação de políplexos, devido ao seu alto caráter catiônico (TIERA et al., 2011).

Figura 40 – Viabilidade celular de (a, b) fibroblastos 3T3/NIH e (c) macrófagos RAW 264.7 na presença dos polímeros de média massa molecular com DIPEA/PEG (série I)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 41 – Viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH e na presença dos polímeros de alta massa molecular com DIPEA/PEG (série II)



Fonte: Dados da pesquisa

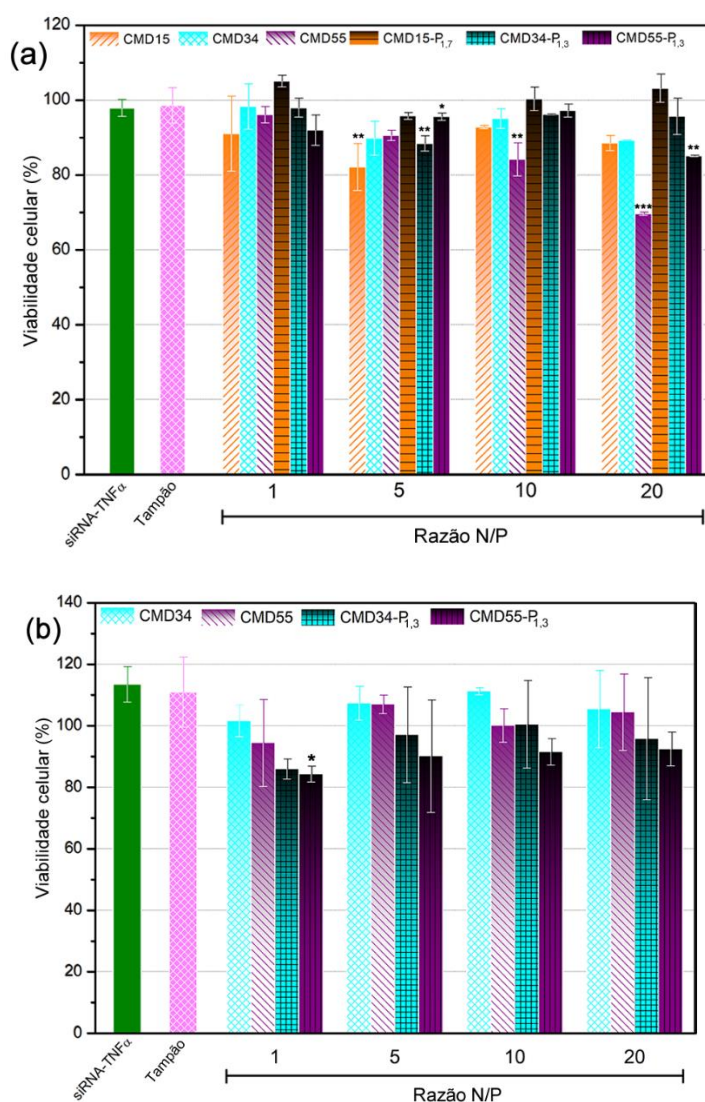
Os estudos de viabilidade celular na presença das nanopartículas são apresentados nas Figuras 42 e 43. Nos fibroblastos, até a razão N/P 10, todos os poliplexos derivados dos polímeros da série I apresentaram viabilidade igual ou superior a 80%. Entretanto, na razão N/P 20 é possível observar uma diminuição da viabilidade celular (para 70%) quando nanopartículas derivadas do CMD55 foram aplicadas sobre as células. Para esse mesmo polímero (razão N/P e linhagem celular), é possível observar que a adição de PEG (CMD55-P_{1,3}) promove uma diminuição da citotoxicidade dos poliplexos (a viabilidade celular é superior a 80%). Esses resultados são corroborados por Picola e colaboradores (2016), que demonstraram uma diferença maior na viabilidade celular com o aumento da razão N/P nos derivados com um alto grau de substituição por DEAE.

Nos macrófagos, todos os poliplexos (originados da série I) estudados apresentaram viabilidade celular igual ou superior a 80%, independentemente da razão N/P.

A viabilidade celular dos fibroblastos (3T3/NIH) na presença de nanopartículas derivadas dos polímeros de alta massa molecular (Figura 43) foi superior a 85%, independentemente da razão N/P, do GS_{DIPEA} e GS_{PEG}.

É relatado que nanopartículas constituídas somente de quitosana apresentam uma alta viabilidade celular (maior que 80%), mesmo em concentrações mais elevadas (JIANG et al., 2017). Mais uma vez, neste estudo, foi indicado que os derivados (desta vez, na forma de nanopartículas) apresentaram uma propensão em manter as características biocompatíveis da quitosana.

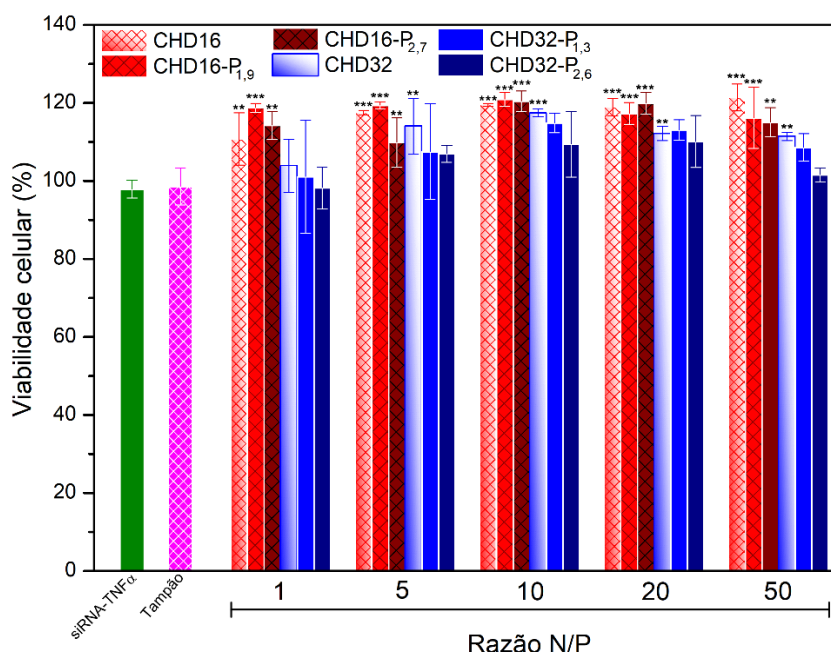
Figura 42 – Viabilidade celular de (a) fibroblastos 3T3/NIH e (b) macrófagos RAW 264.7 na presença de políplexos, formados pelos polímeros com DIPEA de média massa molecular (série I) em diferentes razões N/P preparados em pH 7,4 e $I = 0,15 \text{ mol L}^{-1}$



Nota: Considerou-se um nível de significância de 0,05. As médias populacionais são consideradas significativamente diferentes em relação às células tratadas com tampão com valor-p (***) <0,0001; (**) <0,01 e (*) <0,05. A ausência de símbolos indica que as médias populacionais não são significativamente diferentes.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 43 – Viabilidade celular dos políplexos, formados pelos polímeros com DIPEA de alta massa molecular (série II) em diferentes razões N/P, realizada em fibroblastos 3T3/NIH



Nota: Considerou-se um nível de significância de 0,05. As médias populacionais são consideradas significativamente diferentes em relação às células tratadas com tampão com valor-p (***) <0,0001; (**) <0,01 e (*) <0,05. A ausência de símbolos indica que as médias populacionais não são significativamente diferentes.

Fonte: Dados da pesquisa

5.4 Estudo de internalização celular por meio da microscopia confocal

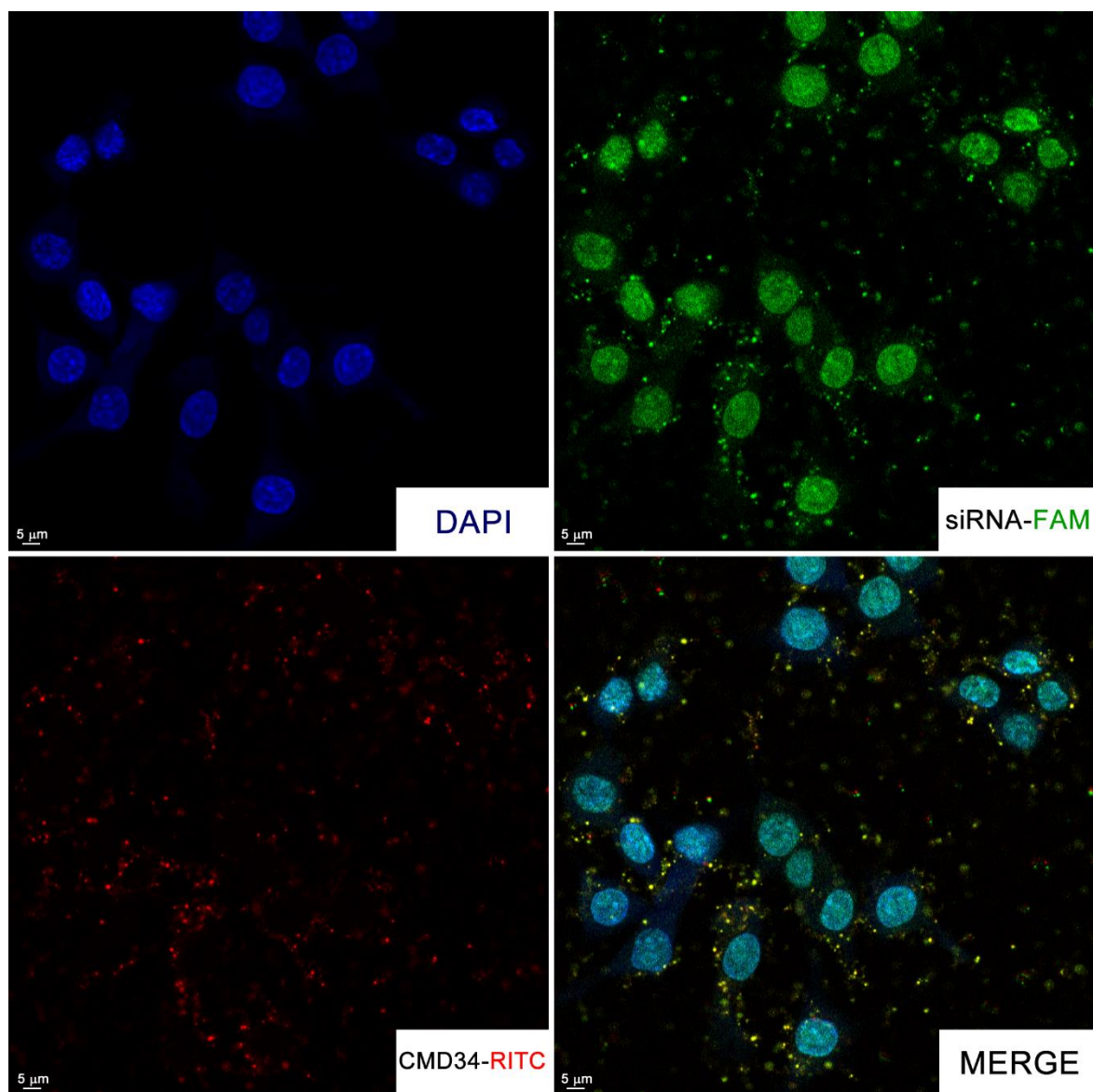
A captura dos políplexos formados pelo CMD34-RITC e siRNA-FAM por macrófagos RAW 264.7 foi avaliada usando a microscopia confocal. Os resultados mostram uma acumulação de siRNA na região nuclear, como foi indicado para políplexos formados por PEI e oligonucleotídeos (ODNs) (REHMAN; HOEKSTRA; ZUHORN, 2013). Rehman, Hoekstra e Zuhorn (2013) mostraram que, após uma liberação abrupta do endossomo, os ODNs difundiam-se pelo citosol e, em apenas alguns minutos, começavam a se acumular no núcleo. Esse direcionamento de siRNA para região nuclear também foi reportado para siRNAs complexados por Lipofectamina® 2000 e mostrou-se que a localização do siRNA depende de onde está o RNA complementar (isto é, que será silenciado) (BEREZHNA et al., 2006).

Este resultado também indica uma liberação contínua de siRNA, uma vez que há pontos verdes isolados (siRNA livre) e co-localizados pontos vermelhos fluorescentes (polímero) ao

mesmo tempo. Os pontos fluorescentes de maior diâmetro podem indicar a contenção das nanopartículas em compartimentos endossômicos (REHMAN; HOEKSTRA; ZUHORN, 2013).

Em resumo, esse estudo de internalização indica uma boa eficiência do nanocarreador (formado pelo CMD34) como agente de transfecção, ao mostrar (qualitativamente) a internalização de uma elevada quantidade de siRNA nas células.

Figura 44 – Microscopia confocal dos macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas de CMD34-RITC/siRNA-FAM preparadas na razão N/P 10 em pH 7,4 e $I = 0,15 \text{ mol L}^{-1}$



Fonte: Dados da pesquisa

5.5 Avaliação da eficiência de transfecção via monitoramento da expressão de TNF- α

A expressão de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas formadas pelos polímeros das séries I e II com siRNA anti-TNF- α , é apresentada nas Figuras 45 e 46. Quanto maior a expressão relativa de TNF- α , menor é a eficiência de transfecção do poliplexo estudado. Os resultados mostraram-se dependentes da razão N/P, do GS_{DIPEA}, da MM e da presença/ausência de PEG.

Conforme há um aumento da razão N/P, ocorre uma diminuição na expressão de TNF- α . O que era esperado, uma vez que há o surgimento de características favoráveis à transfecção gênica com o aumento da razão N/P, tais como: formação de uma carga superficial positiva e a diminuição do Dh nas nanopartículas, além de aumentar a capacidade do polícatión em oferecer proteção ao siRNA. Assim, a razão N/P 10 apresentou as maiores taxas de transfecção sendo, portanto, a razão estabelecida para avaliação do efeito das outras variáveis (GS_{DIPEA}, MM e peguilação).

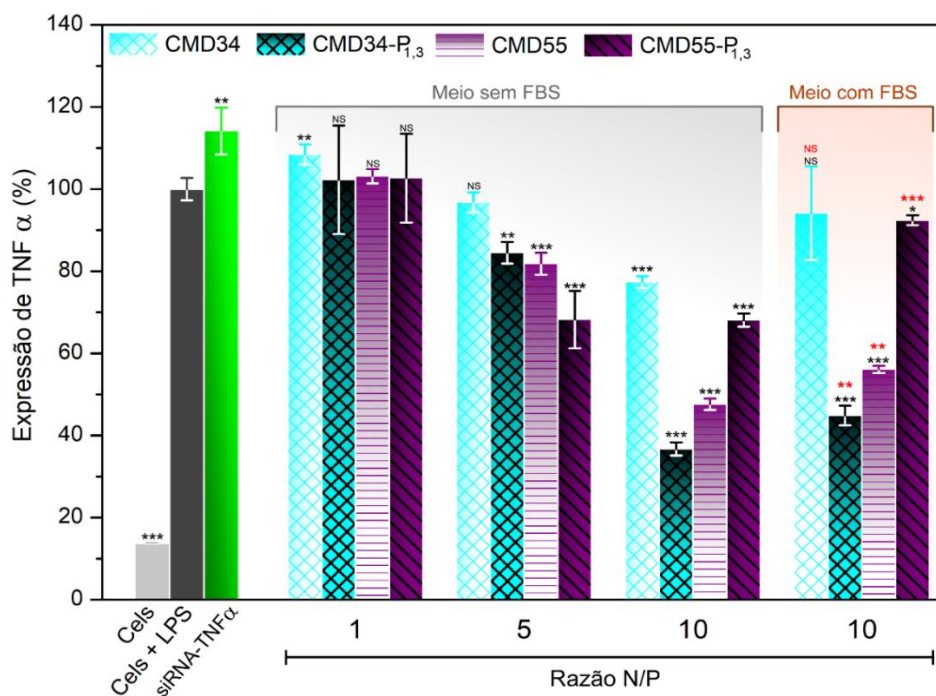
Para os polímeros de mesma MM, observa-se uma proporcionalidade entre o GS_{DIPEA} e a eficiência de transfecção. Por exemplo, nos polímeros da série II (CHD16 versus CHD32), o dobro da quantidade de DIPEA na quitosana fez com que o nível de expressão do TNF- α fosse reduzido pela metade. Um efeito similar foi observado nos polímeros de mesma composição, mas com diferentes MM (CMD34 versus CHD32). Dobrando-se a MM do derivado, dobrou-se a eficiência de transfecção das nanopartículas. Mais uma vez, esses resultados concordam com as características das nanopartículas obtidas até o momento. O aumento do GS_{DIPEA} e/ou da MM levaram a formação de nanopartículas mais compactas, estáveis e com potenciais zeta positivos, atributos que são desejáveis aos nanocarreadores baseados em polímeros catiônicos.

Com exceção do CMD55, a adição de PEG aumentou (CMD34 e CHD16) ou não alterou (CHD32) a eficiência de transfecção dos poliplexos. Vale ressaltar que a peguilação do CMD34 dobrou sua eficiência como agente de transfecção. Nos polímeros de alta MM, a variação do GS_{PEG} praticamente não causou alterações entre os derivados peguilados.

Também é possível observar que, mesmo na presença de FBS, os derivados CMD34-P_{1,3} e CMD55 constituíram nanopartículas que reduziram entre 50 e 60% a expressão de TNF- α , quando comparada as células com LPS. O que confirma os resultados de estabilidade na presença da BSA (item 5.2.3).

Embora os macrófagos sejam células difíceis de serem transfectadas, uma vez que são especializados em reconhecer e neutralizar ácidos nucleicos exógenos as células (ROUSSELET, 2018), neste estudo foram apresentados polímeros que atuaram na formação de nanopartículas com uma alta capacidade de promover a transfecção gênica em macrófagos. Com isso, o principal objetivo deste estudo (silenciamento de TNF- α em macrófagos RAW 264.7) foi cumprido com êxito. Portanto, os resultados obtidos demonstram potencial promissor dos vetores e embasam futuros estudos de transfecção *in vivo* com os polímeros que apresentaram os melhores resultados *in vitro*, sendo eles: CMD34-P_{1,3}, CMD55 e CHD32 mais suas versões peguizadas.

Figura 45 – Estudo de transfecção via monitoramento da expressão de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas formadas pelos derivados da série I com siRNA anti-TNF- α em diferentes razões N/P, na ausência e na presença de FBS. As nanopartículas foram preparadas em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L⁻¹).

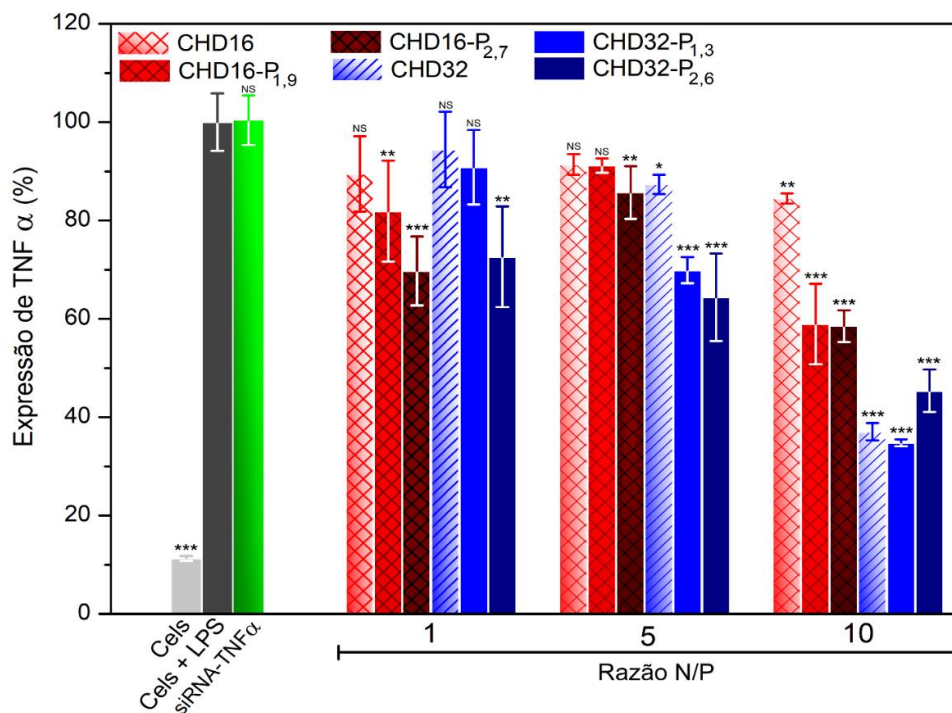


Nota₁: Considerou-se um nível de significância de 0,05. As médias populacionais são consideradas significativamente diferentes com valor-p (***) <0,0001; (**) <0,01 e (*) <0,05. NS = as médias populacionais não são significativamente diferentes. Os símbolos pretos referem-se à comparação com as Cels+LPS e os símbolos vermelhos referem-se a comparações entre os poliplexos (constituídos do mesmo polímero) na presença e na ausência de FBS.

Nota₂: Abreviaturas. FBS: Soro Fetal Bovino; Cels: Células; LPS: Lipopolissacarídeo de Escherichia coli.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 46 – Estudo de transfecção via monitoramento da expressão de TNF- α por macrófagos RAW 264.7 tratados com nanopartículas formadas pelos derivados da série II com siRNA anti-TNF- α em diferentes razões N/P. As nanopartículas foram preparadas em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica (0,15 mol L⁻¹).



Nota₁: Considerou-se um nível de significância de 0,05. As médias populacionais são consideradas significativamente diferentes em relação à Cels+LPS com valor-p (***) <0,0001; (**) <0,01 e (*) <0,05. NS = as médias populacionais não são significativamente diferentes.

Nota₂: Abreviaturas. Cels: Células; LPS: Lipopolissacarídeo de Escherichia coli.

Fonte: Dados da pesquisa

6 CONCLUSÕES

A preparação dos derivados foi realizada com êxito e permitiu a obtenção de polímeros com diferentes composições e MM. O sucesso das sínteses foi confirmado por meio de caracterizações realizadas pelas espectroscopias de RMN ^1H . A CM e CH apresentaram altos níveis de desacetilação, e seus derivados apresentaram GS proporcionais à quantidade de substituinte utilizado nas sínteses. O GS_{PEG} se manteve entre 1-2% nos polímeros da série I e III e foi variado nos derivados da série II. Nos polímeros da série III foram obtidos derivados com DEAE que apresentaram elevados graus de quaternização. A reação de bloqueio da quitosana para iniciar os derivados da série IV, também se mostrou eficiente, com o bloqueio de todos os grupos amina do polímero. A adição de DIPEA na hidroxila da quitosana bloqueada foi realizada com êxito, evidenciado pelo elevado GS após a reação de desbloqueio, que originou polímeros anfifílicos com um potencial de aplicação na terapia gênica.

Nos derivados das séries I e II, foi possível estimar o grau de substituição na hidroxila por meio do RMN ^{13}C . Essa técnica, também apresentou porcentagens de substituição muito próximas às baseadas na RMN ^1H , confirmando os valores obtidos.

A CPG permitiu estimar as massas moleculares e os resultados mostram que as reações em meio alcalino promoveram a degradação das cadeias poliméricas.

A inserção do DIPEA e DEAE ampliaram a CT e o GI dos polímeros em relação as quitosanas, entretanto, na CT essa ampliação não foi proporcional ao GS dos derivados. A elevação do GI indicou uma maior proteção do siRNA em pH fisiológico, o que foi corroborado pelos ensaios de liberação em gel de agarose. Os padrões na liberação do siRNA dos poliplexos nas eletroforeses indicaram que a elevação do GS promove uma complexação mais eficiente com o siRNA, enquanto que GS_{PEG} maiores podem diminuir a intensidade desta interação.

Neste trabalho, foi indicado o potencial de aplicação dos derivados das séries III e IV na formação de vetores não virais. Estudos mais aprofundados relacionados ao tamanho, potencial zeta, citotoxicidade e eficiência no silenciamento genético foram restritos aos derivados das séries I e II.

Nanopartículas com Dh entre 100-200 nm e potencial zeta positivo foram obtidas a partir da razão N/P 3 em condições fisiológicas de pH (7,4) e força iônica ($0,15 \text{ mol L}^{-1}$). No monitoramento do Dh com o tempo, observou-se a presença de nanopartículas com Dh entre 100-

200 nm, mesmo após 24 horas de estudo na ausência de albumina e até 7 horas na presença de BSA. Derivados com GS_{DIPEA} e MM maiores, formaram nanopartículas (com potencial zeta positivo) em razões N/P menores e apresentaram maior estabilidade coloidal. Em geral, a peguilação aumentou a estabilidade biológica dos poliplexos, porém seus efeitos mostraram-se dependentes do GS_{DIPEA} (série I). Nanopartículas com morfologia esférica foram obtidas na razão N/P 10.

Estudos de citotoxicidade com MTS em macrófagos (RAW 264.7) e fibroblastos (3T3/NIH), comprovam a aplicabilidade *in vitro* dos sistemas propostos, indicando uma viabilidade celular superior a 70% para todos os polímeros e superior a 75% para os todos os poliplexos até a razão N/P 10.

A microscopia confocal, indicou uma alta eficiência na liberação de siRNA na célula-alvo. Nos estudos de transfecção foi inserido siRNA anti-TNF- α em macrófagos RAW 264.7 via poliplexos, e o resultados comprovaram a eficiência dos nanocarreadores desenvolvidos, pela diminuição de até 60% na expressão de TNF- α . Esses resultados também indicaram uma concordância com as características físico-químicas dos poliplexos, uma vez que foi possível estabelecer relações entre a razão N/P, Dh, potencial zeta e estabilidade biológica das nanopartículas com a eficiência de transfecção.

Diante dos resultados apresentados, tem-se como perspectivas futuras a realização de estudos de transfecção *in vivo* (para o bloqueio da expressão TNF- α) dos polímeros (na forma de poliplexos) que apresentaram os melhores resultados de transfecção *in vitro* (CMD34-P_{1,3}, CMD55 e CHD32 mais suas versões peguiladas), além de estudos de silenciamento genético utilizando esses derivados visando o tratamento de outras patologias.

REFERÊNCIAS

- ADRIAANSEN, J.; VERVOORDELDONK, M. J. B. M.; TAK, P. P. Gene therapy as a therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis: innovative vectors and therapeutic genes. **Rheumatology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 656-668, 2006.
- AGIRRE, M. *et al.* Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: from bench to bedside. **Polymers**, Basel, v. 6, p. 1727-1755, 2014.
- ALAMEH, M. *et al.* siRNA delivery with chitosan: influence of chitosan molecular weight, degree of deacetylation, and amine to phosphate ratio on in vitro silencing efficiency, hemocompatibility, biodistribution, and in vivo efficacy. **Biomacromolecules**, Washington, v. 19, n. 1, p. 112-131, 2017.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da biologia celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- AMIJI, M. M. **Polymeric gene delivery**: principles and applications. New York: CRC Press, 2004.
- ATZENI, F. *et al.* Investigating the potential side effects of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis: cause for concern? **Immunotherapy**, London, v. 7(4), p. 353-361, 2015.
- BEREZHNA, S. Y. *et al.* siRNA in human cells selectively localizes to target RNA sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 20, p. 7682-7687, 2006.
- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticles design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015.
- BRAMSEN, J. B.; KJEMS, J. Development of therapeutic-grade small interfering RNAs by chemical engineering. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 3, n. 154, p. 1-22, 2012.
- BROWN, R.; BÖGER-BROWN, U. **Cytotoxic drug resistance mechanisms**. Springer Science & Business Media, 1999.
- CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2. ed. São Paulo: Arliber, 2002.
- CASEY, J. R.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. Sensors and regulators of intracellular pH. **Nature reviews: molecular cell biology**, London, v. 11, p. 50-61, 2010.
- CELLTITER 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay: instructions for use of products G3580, G3581 and G3582. **Technical Bulletin**, Madison, 2012.

CHEN, J. *et al.* Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. **Molecular Therapy: methods & clinical development**, London, v. 3, n. 16023, p. 1-8, 2016.

CHOOCHOTTIROS, C.; YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Amphiphilic chitosan nanospheres: factors to control nanospheres formation and its consequent responsive performance. **Polymer**, London, v. 50, p. 1877-1886, 2009.

CORBET, C. *et al.* Delivery of siRNA targeting tumor metabolism using non-covalent PEGylated chitosan nanoparticles: identification of an optimal combination of ligand structure, linker and grafting method. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 223, p. 53-63, 2016.

DOWDY, S. F. Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 35, n. 3, p. 222-229, 2017.

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

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

FIAMINGO, A; CAMPANA-FILHO, S. P. Structure, morphology and properties of genipin-crosslinked carboxymethylchitosan porous membranes. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 143, p. 155-163, 2016.

FUJITA, S.; SAKAIRI, N. Water soluble EDTA-linked chitosan as a zwitterionic flocculant for pH sensitive removal of CU(II) ion. **RSC Advances**, Cambridge, v. 6, p. 10385-10392, 2016.

GENE therapy clinical trials worldwide. **The Journal of Gene Medicine**, Hoboken, c2017. Available in: <http://www.abedia.com/wiley/index.html>. Access in: 30 aug. 2018.

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

GINN, S. L. *et al.* Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: an update. **Journal of Gene Medicine**, Hoboken, v. 20, p. 1-16, 2018.

GONSALVES, A. D. A. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

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

GOY, R. C.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 29-33, 2004.

GROSSMAN, R. F.; NWABUNMA, D. **Biopolymer nanocomposites**: processing, properties, and applications. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013. p. 115-159.

GUNN, J.; PARANJI, R. K.; ZHANG, M. A simple and highly sensitive method for magnetic nanoparticle quantitation using ^1H -NMR spectroscopy. **Biophysical Journal**, New York, v. 97, p. 2640-2647, 2009.

HAN, S. W. Introdução: história da terapia gênica, estado da arte, técnicas e ética. In: MORALES, M. M. **Terapias avançadas**: células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 105-119.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 21, n. 2, p. 344-353, 2004.

IFUKU, S. *et al.* Preparation of highly chemoselective N-phthaloyl chitosan in aqueous media. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 13, p. 1499-1502, 2011.

INÁCIO, A. S. *et al.* In vitro surfactant structure-toxicity relationships: implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 5, p.1-15, 2011.

JAIN, A. *et al.* A new horizon in modifications of chitosan: syntheses and applications. **Clinical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Danbury, v. 30, n. 2, p. 91-181, 2013.

JAIN, S. *et al.* Multifunctional nanoparticles for targeting cancer and inflammatory diseases. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, n. 10, p. 888-903; 2013.

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

JIANG, L. Q. *et al.* Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intracellular transport. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 12, p. 6383-6398, 2017.

JONES, C. H. *et al.* Overcoming nonviral gene delivery barriers: perspective and future. **Molecular Pharmaceutics**, Wasington, v. 10, n. 11, p. 4082-4098, 2013.

KASAAI, M. *et al.* The use of intense femtosecond laser pulses for the fragmentation of chitosan. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 120, p. 201-205, 1999.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 69, p. 3-11, 2010.

KHALIL, I. A. *et al.* Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. **Pharmacology Reviews**, [s. l.] v. 58, n. 1, p. 32-45, 2006.

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

KUMIRSKA, J. *et al.* Biomedical activity of chitin/chitosan based materials: influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation. **Polymers**, n. 3, Basel, p. 1875-1901, 2011.

KURITA, K. *et al.* Chemoselective protection of the amino groups of chitosan by controlled phthaloylation: facile preparation of a precursor useful for chemical modifications. **Biomacromolecules**, Washington, v. 3, n. 1, 2002.

KURITA, K. *et al.* N-Phthaloylated chitosan as an essential precursor for controlled chemical modifications of chitosan: synthesis and evaluation. **Polymer Journal**, [s. l.] v. 39, n. 9, p. 945-952, 2007.

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

LAYEK, B.; SINGH J. Caproic acid grafted chitosan cationic nanocomplexes for enhanced gene delivery: effect of degree of substitution. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 447, p. 182-181, 2013.

LAYEK, B.; SINGH, J. Chitosan for DNA and gene therapy. In: JENNINGS J. A; BUMGARDNER J. D. **Chitosan based biomaterials: tissue engineering and therapeutics**. v. 2. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 209-244.

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

LEE, Y.; KATAOKA, K. Delivery of nucleic acid drugs. In: **Nucleic Acid Drugs**. Berlin: Springer, 2011. p. 95-134.

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

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

LINDEN, R. **Genes contra doenças: terapia gênica: uma nova era na genética**. Rio de Janeiro: Vieira & Lent, 2008.

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

MADY, M. M. *et al.* Effect of polymer molecular weight on the DNA/PEI polyplexes properties. **Romanian Journal of Biophysics**, Bucharest, v. 21, n. 2, p. 151-165, 2011.

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

MOBARAKEH, V. I. *et al.* Optimization of chitosan nanoparticles as an anti-HIV siRNA delivery vehicle. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 129, p. 305-315, 2019.

MORALES, M. M.; LINDEN, R.; HAN, S. W. Bases fisiológicas da terapia gênica. In: AIRES, M. de M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. p. 1189-1199.

NEELAMEKAM, S. *et al.* The impact of lipoprotein lipase deficiency on health-related quality of life: a detailed structured, qualitative study. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, London, v. 12, n. 156, p. 1-9, 2017.

NEL, A. E. *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, London, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, F. D. P. P. *et al.* Synthesis and evaluation of diethylethylamine-chitosan for gene delivery: composition effects on the *in vitro* transfection efficiency. **Nanotechnology**, Bristol, v. 24, p. 1-11, 2013.

PANDI, P. *et al.* Therapeutic approaches for the delivery of TNF- α siRNA. **Therapeutic Delivery**, London, v. 8, n. 5, p. 343-355, 2017.

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

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

REHMAN, Z. U.; HOEKSTRA, D.; ZUHORN, I. S. Mechanism of polyplex-and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis. **ACS Nano**, Washington, v. 7, n. 5, p. 3767-3777, 2013.

RHEINER, S.; BAE, Y. Increased poly(ethylene glycol) density decreases transfection efficacy of siRNA/poly(ethylene imine) complexes. **Bioengineering**, Wiesbaden, v. 3, n. 4, p. 454-467, 2016.

ROUSSELET, G. **Macrophages: methods and protocols**. 5. ed. New York: Humana Press, 2018.

RUDZINSKI, W. E. *et al.* Targeted delivery of small interfering RNA to colon cancer cells using chitosan and PEGylated chitosan nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, Barking, v. 147, p. 323-332, 2016.

SALCHER, E. E.; WAGNER, E. Chemically programmed polymers for targeted DNA and siRNA transfection. *In*: **Nucleic acid transfection**. Berlin: Springer, 2010. p. 227-250.

SARKAR, K.; KUNDU, P. P. PAMAM conjugated chitosan through naphthalimide moiety for enhanced gene transfection efficiency. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 98, p. 495-504, 2013.

SCHERMAN, D. *et al.* Genetic pharmacology: progress in siRNA delivery and therapeutic applications. **Gene Therapy**, London, v. 24, p. 151-156, 2017.

SCOTT, L. J. Alipogebe tiparvevoc: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. **Drugs**, Auckland, v. 75, n. 2, p. 175-182, 2015.

SHI, Q. *et al.* In vivo therapeutic efficacy of TNF α silencing by folate-PEG-chitosan-DEAE/siRNA nanoparticles in arthritic mice. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 13, p. 387, 2018.

SHUAI, H. *et al.* Using surfaces to modulate the morphology and structure of attached cells—a case of cancer cells on chitosan membranes. **Chemical Science**, Cambridge, v. 4, n. 8, p. 3058-3067, 2013. Supplementary Information.

SIEWERT, C. *et al.* Investigation of charge ratio variation in mRNA–DEAE–dextran polyplex delivery systems. **Biomaterials**, Surrey, v. 192, p. 612-620, 2019.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; BAKER JR, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. **Nature Reviews: immunology**, London, v. 13, p. 592-605, 2013.

SOUZA, H. F. V. de *et al.* Diethylaminoethyl-chitosan as an efficient carrier for siRNA delivery: Improving the condensation process and the nanoparticles properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 119, p.186-197, 2018.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O. **Food polysaccharides and their applications**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

TAMURA, A.; YUI, N. A supramolecular endosomal escape approach for enhancing gene silencing of siRNA using acid-degradable cationic polyrotaxanes. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 1, n. 29, p. 3535-3544, 2013.

TAMURA, A.; YUI, N. Lysosomal-specific cholesterol reduction by biocleavable polyrotaxanes for ameliorating Niemann-Pick type C disease. **Scientific Reports**, London, v. 4, n. 4356, p. 1-8, 2014.

TANG, G. P. *et al.* Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent. **Biomaterials**, Surrey, v. 24, p. 2351-2362, 2003.

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

TIERA, M. J. *et al.* Polymeric systems as nanodevices for siRNA delivery. **Current Gene Therapy**, Sharjah, v. 13, n. 5, p. 358-369, 2013.

TORRECILLA, J. *et al.* Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 1-17, 2014.

WANG, X. *et al.* Glutathione-triggered “off-on” release of anticancer drug from dendrimer-encapsulated gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 135, p. 9805-9810, 2013.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Origins and hallmarks of macrophages: development, homeostasis, and disease. **Nature**, London, v. 496, p. 445-455, 2013.

XUN, M. *et al.* Low molecular weight PEI-based biodegradable lipopolymers as gene delivery vectors. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 11, p. 1242-1250, 2013.

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

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

ZHANG, K. *et al.* NMR and FT Raman characterization of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfonate groups and the degree of substitution. **Polymer**, London, v. 51, p. 4698-4705, 2010.

ZHOU, G. *et al.* Tumor-penetrating peptide modified and pH-sensitive polyplexes for tumor targeted siRNA delivery. **Polymer Chemistry**, Cambridge, v. 7, p. 3857-3863, 2016.

ZHOU, K. *et al.* Multicolored pH-tunable and activatable fluorescence nanoplateform responsive to physiologic pH stimuli. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 134, p. 7803-7811, 2012.

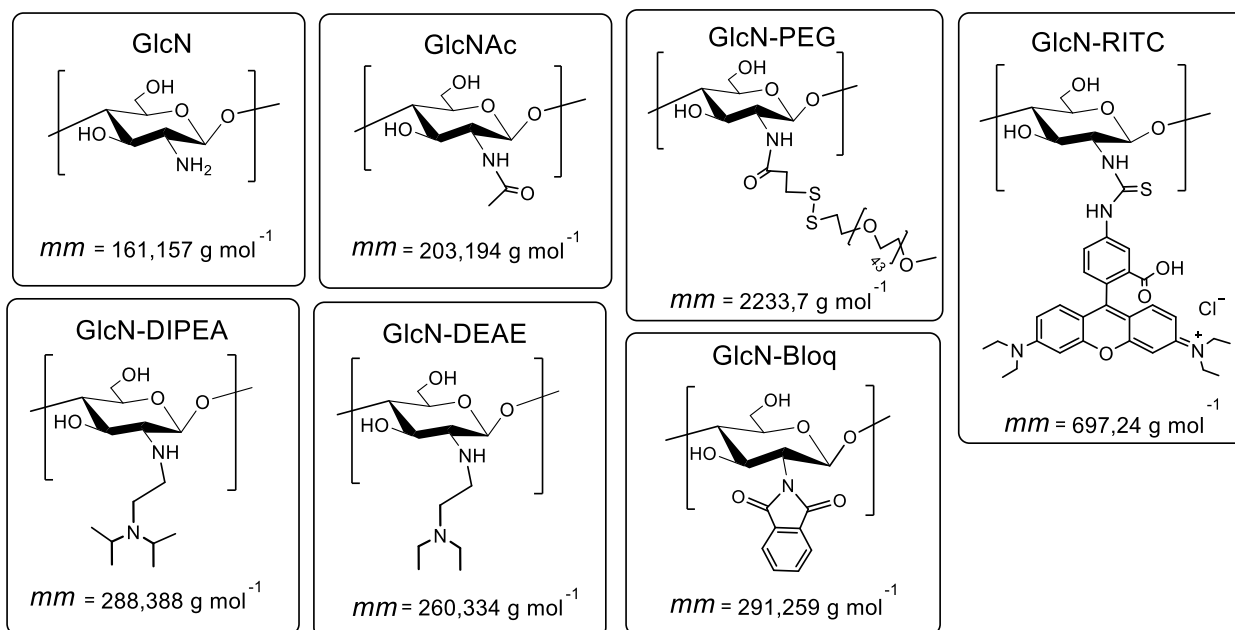
APÊNDICE A – Razão molar e N/P: valores de $\overline{mm}_{mero}$ e de β

Na síntese dos derivados, para determinar as razões molares (itens 4.3 e 4.4) entre os meros dos polímeros e os substituintes (DIPEA-Cl, DEAE-Cl e PEG-SH) é necessário o conhecimento da massa molar média dos meros ($\overline{mm}_{meros}$) presentes no polímero para sua expressão em número de mols. A $\overline{mm}_{meros}$ é dada pela combinação da massa molar de todas as unidades formadoras do polímero considerando sua porcentagem no mesmo, conforme mostra a Equação A1. Onde P_i é a porcentagem do mero i (determinada pelo espectro de RMN 1H) e mm_i é a sua massa molar.

$$\overline{mm}_{meros} = \sum_i \frac{P_i}{100} \times mm_i \quad \text{Equação A1}$$

A massa molar e a estrutura dos principais meros deste estudo são mostradas na Figura A1.

Figura A1 – Estrutura e massa molar (mm) dos principais meros em estudo



Fonte: Elaborado pelo autor

Quando é necessário a expressão do resultado em termos de grupos aminos totais, seja para igualá-los nos diferentes polímeros (item 4.5.5) ou para formação dos poliplexos em diferentes razões N/P (item 4.6), faz-se necessário a aplicação de um fator de correção sobre o número de mols de meros para converte-los em número de mols de grupos aminos. Neste estudo, esse fator de correção foi denominado β e representa a quantidade relativa de grupos aminos (totais) por mero

do polímero, conforme mostra a Equação A2. Onde, GS é o grau de substituição por DIPEA ou DEAE (GS é igual a zero se não houver substituinte) e P_{GlcN} é a porcentagem de unidades desacetiladas (GlcN) não modificadas. Para exemplificar, um polímero hipotético com $GS_{DIPEA} = 30\%$, $GS_{PEG} = 2\%$ e $GA = 10\%$, tem P_{GlcN} igual a 58% e portanto, $\beta = 1,18$.

$$\beta = \frac{GS \times 2 + P_{GlcN}}{100} \quad \text{Equação A2}$$

Os valores de $\overline{mm}_{meros}$ e de β para os polímeros estudados, encontram-se listados na Tabela A1.

Tabela A1 – Valores de $\overline{mm}_{meros}$ e de β para os polímeros estudados

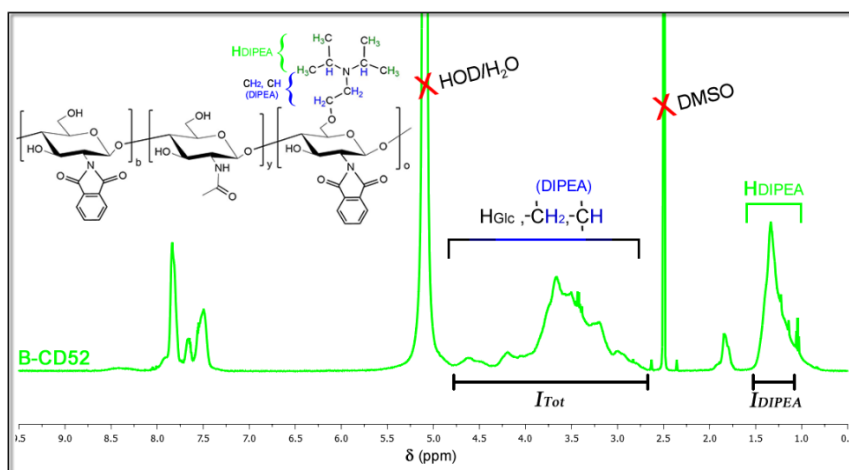
Séries I e II			Séries III e IV		
Polímero	$\overline{mm}_{meros}$ (g mol ⁻¹)	β	Polímero	$\overline{mm}_{meros}$ (g mol ⁻¹)	β
CM	163	0,964	CM	163	0,964
CMD5	168	1,016	CMD _E 16	182	1,139
CMD15	181	1,131	CMD _E 57	237	1,548
CMD34	206	1,308	CMD _E 57-P _{1,5}	268	1,533
CMD55	232	1,516	C*	171	0,760
CMD15-P _{1,7}	216	1,114	B-C	273	0,000
CMD34-P _{1,3}	233	1,295	O-CD52	264	1,220
CMD55-P _{1,3}	259	1,503	O-CD68	272	1,470
CMD34-RITC	209	1,302			
CH	163	0,964			
CHD16	183	1,118			
CHD32	203	1,282			
CHD16-P _{1,9}	222	1,099			
CHD16-P _{2,7}	238	1,091			
CHD32-P _{1,3}	230	1,269			
CHD32-P _{2,6}	257	1,256			

Fonte: Elaborado pelo autor

APÊNDICE B – Equação para determinar o hidrogênio de referência dos derivados da série IV e lógica envolta na determinação da quantidade de hidrogênios

Para exemplificar do desenvolvimento da Equação 1, é apresentado um espectro de RMN ^1H de um derivado da série III (Figura B1).

Figura B1 – Espectro de RMN ^1H de um derivado da série III, com indicação das áreas consideradas para o desenvolvimento da Equação 1



Fonte: Elaborado pelo autor

A região entre o sinal do DMSO e o sinal da água, tem a área (I_{Tot}) composta por N hidrogênios glicopiranosídeo (H) e por 6 hidrogênios do substituinte (H-DIPEA), sendo 4 hidrogênios metileno (CH_2) e 2 hidrogênios metina (CH), portanto:

$$I_{Tot} = N \times I_H + 6 \times I_{H-DIPEA} \quad \text{Equação B1}$$

Onde, I_H corresponde a área de um hidrogênio glicopiranosídeo e $I_{H-DIPEA}$ a área de um hidrogênio do DIPEA.

A área indicada como I_{DIPEA} corresponde à área de 12 H-DIPEA, logo:

$$I_{H-DIPEA} = \frac{I_{DIPEA}}{12} \quad \text{Equação B2}$$

Substituindo-se A2 em A1, tem-se a Equação 1:

$$I_{Tot} = N \times I_H + 6 \times \frac{I_{DIPEA}}{12}$$

$$I_{Tot} = N \times I_H + \frac{I_{DIPEA}}{2}$$

$$N \times I_H = I_{Tot} - \frac{I_{DIPEA}}{2}$$

$$I_H = \frac{I_{Tot} - \frac{I_{DIPEA}}{2}}{N}$$
Equação 1

Como foi explicado (item 5.1.4.2), nos derivados bloqueados substituídos com DIPEA, o valor de **N** pode representar 6 ou 7 hidrogênios glicopiranosídeos. Quando é considerado que todos os 7 hidrogênios glicopiranosídeos estão entre o sinal da água e do DMSO (isto é, **N** = **7**), o GB dos derivados após a substituição de DIPEA na C-B fica em torno de 92%. Já quando **N** assume o valor de apenas 6 hidrogênios o GB desses mesmos derivados é tido como 79%. Esse último caso, representa o pior cenário para a série IV e é o mais justificável pelos resultados das outras séries de derivados, como também é explicado no item 5.1.4.2. Visando resultados que indique certeza na porcentagem de DIPEA incorporado na hidroxila desses derivados (principal objetivo da série IV), assumiu-se que **N** = **6**, deste modo, porcentagens de substituição por DIPEA acima de 21% indicam com segurança que ocorreu a substituição de DIPEA na hidroxila.

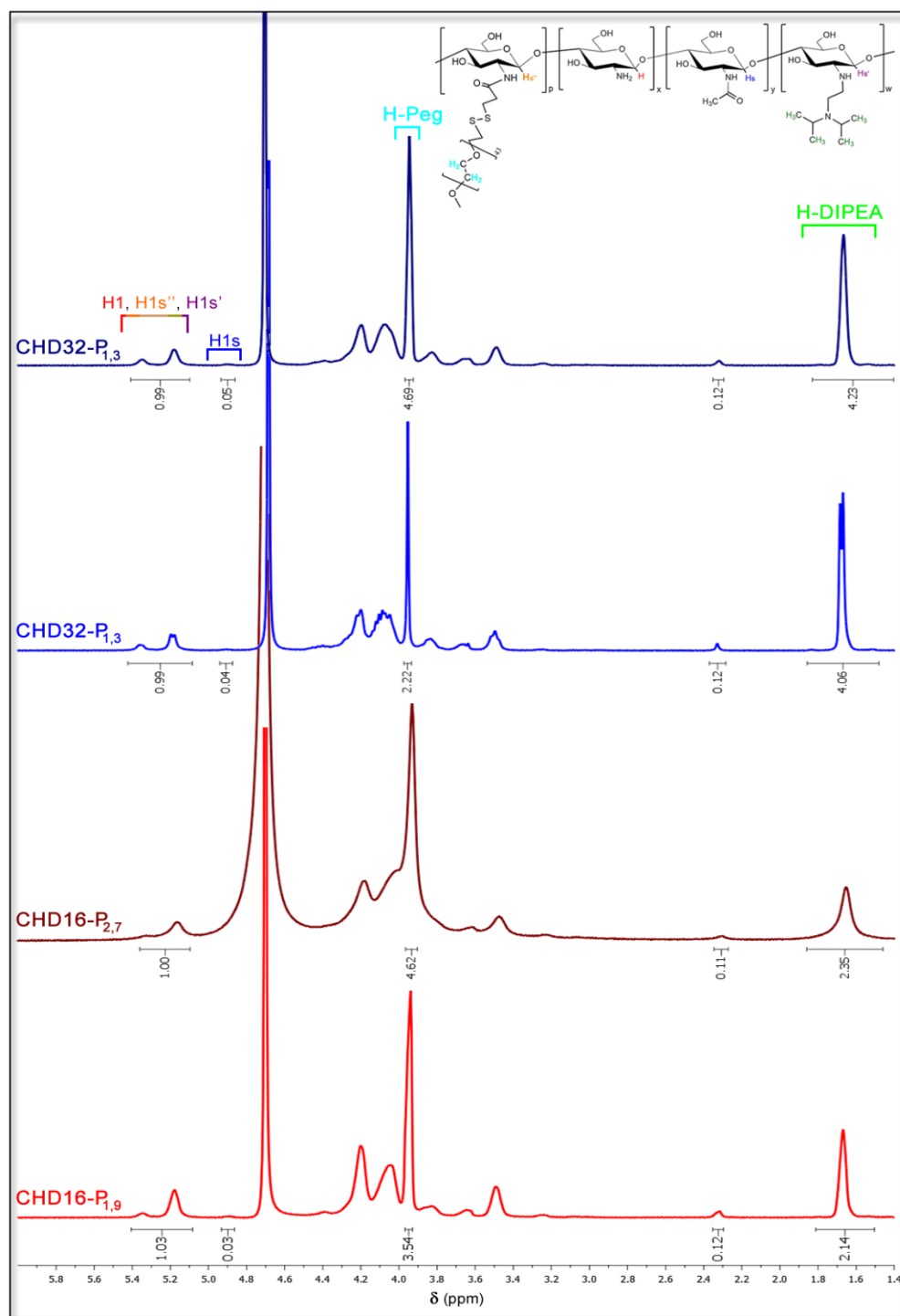
APÊNDICE C – Polímeros com PEG: RMN ^1H e sínteses adicionais

O GS_{DIPEA} e o GS_{PEG} são obtidos a partir de espectros de RMN ^1H separados pois, de alguma forma, a incorporação de PEG promoveu um aumento na intensidade dos sinais dos hidrogênios metila (CH_3) do DIPEA. Para exemplificar, a integral dos H_{DIPEA} nos espectros dos derivados peguilados da série II é mostrada na Figura C1. Se esses valores forem aplicados na Equação 3, é observado um aumento entre 1 a 4% no GS_{DIPEA} em relação ao valor obtido por meio dos espectros dos polímeros não peguilados. Em adicional, para os polímeros de alta massa, tem-se que esse aumento é proporcional ao GS_{PEG} .

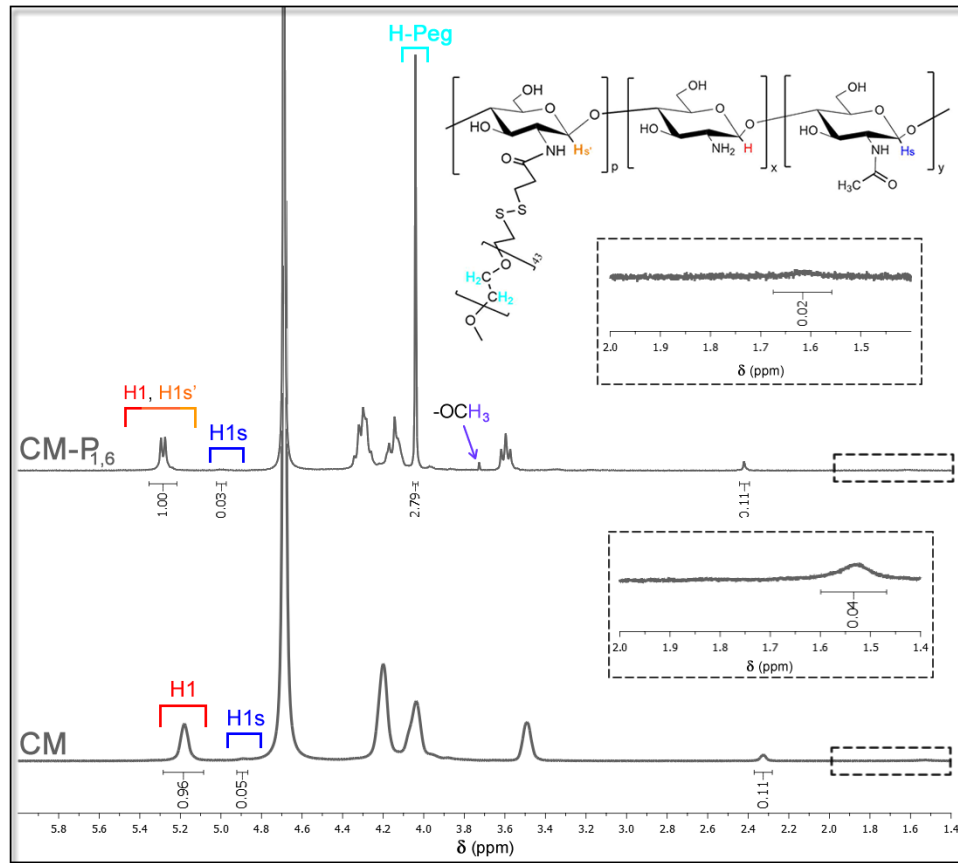
Diante das observações feitas, verificou-se a presença de possíveis sinais oriundos da adição do PEG na região do espectro correspondente aos H_{DIPEA} . Para tal, incorporou-se PEG na CM seguindo o mesmo procedimento descrito para os derivados (item 4.3.2.2), com a razão estequiométrica SPDP/mero igual a $1,9 \times 10^{-2}$. O derivado foi denominado CM-P_{1,6} e analisado por espectroscopia de RMN ^1H , cujo espectro é mostrado na Figura C2. Não é observado nenhum novo sinal que possa ser atribuído a adição de PEG, sendo visualizado apenas um sinal em δ 1,6 ppm que pode ser atribuído ao(s) álcool(is) da cadeia polimérica. Vale ressaltar, que a intensidade desse sinal (δ 1,6 ppm) na CM-P_{1,6} é inferior à sua intensidade na CM. O GS_{PEG} obtido foi de 1,6%.

O derivado CM-P_{1,6} também avaliado, por meio do ensaio de liberação de siRNA em gel de agarose (item 4.4.2). Para os cálculos, tem-se que para esse polímero, a $\overline{m}_{\text{meros}}$ é 195,8 g mol⁻¹ e β vale 0,948. Como pode-se observar (Figura C4), a CM-P_{1,6} tem uma capacidade de complexar o siRNA inferior à da CM, evidenciado pelo aumento da intensidade de fluorescência das bandas nas razões estudadas.

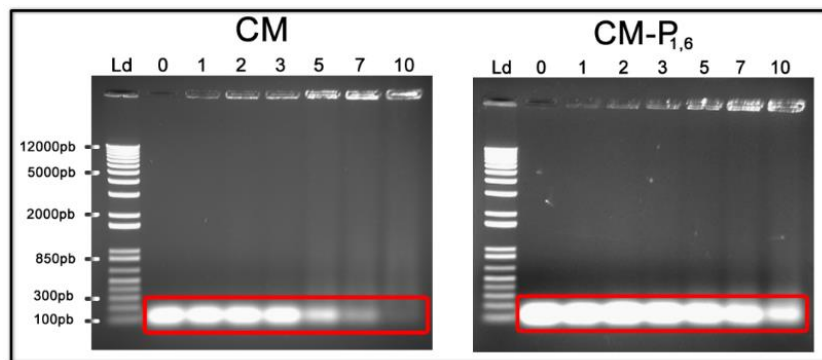
Figura C1 – Espectros de RMN ^1H dos derivados de alta massa molecular com PEG com integração dos carbonos metílicos do DIPEA (H-DIPEA)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura C2 – Espectros de RMN ^1H da CM e CM-P_{1,6}

Fonte: Dados da pesquisa

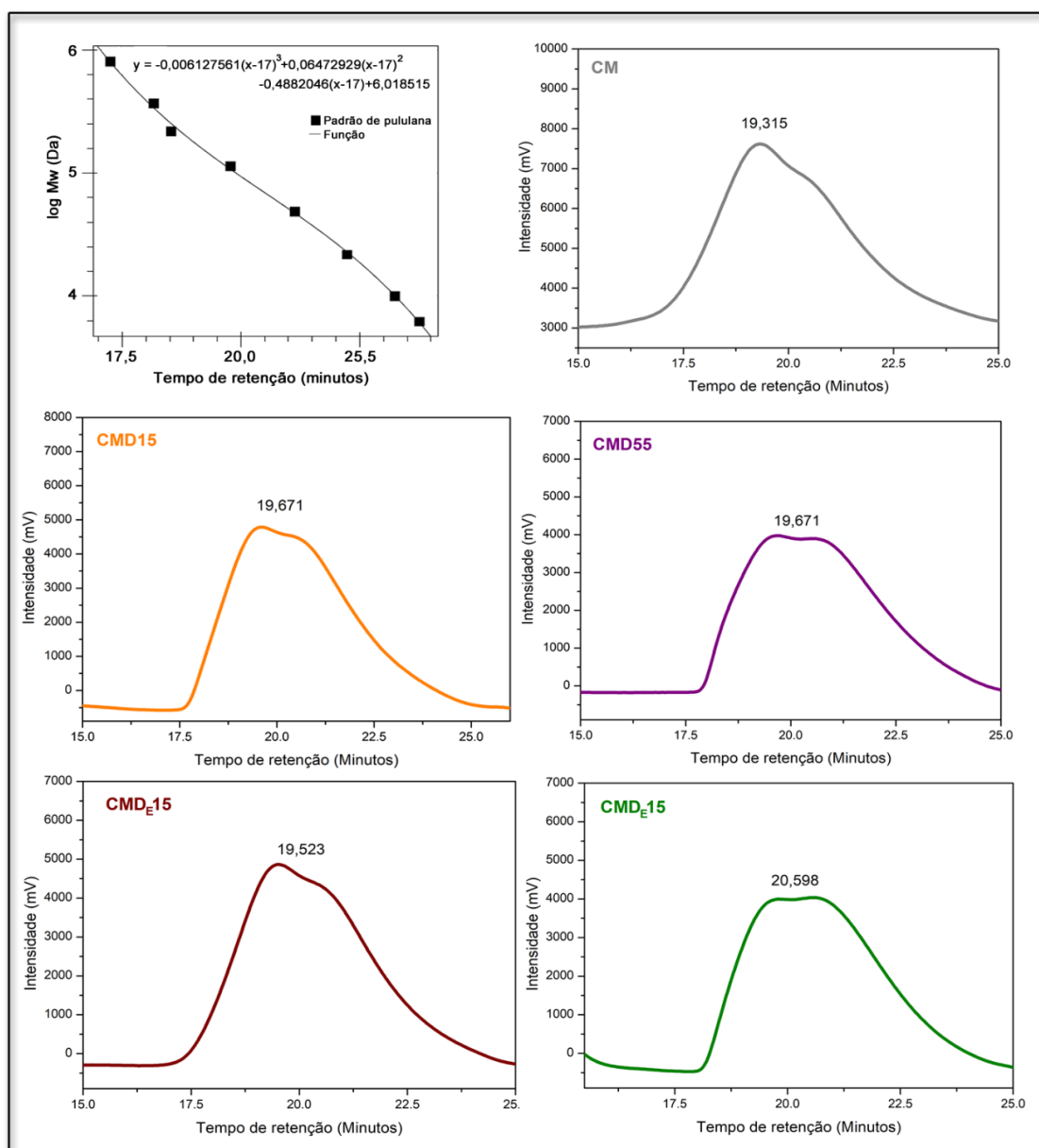
Figura C4 – Eletroforese dos poliplexos formados pela CM e CM-P_{1,6} (em tampão fosfato pH 7,4)

Fonte: Dados da pesquisa

APÊNDICE D – Curvas analíticas e cromatogramas de GPC

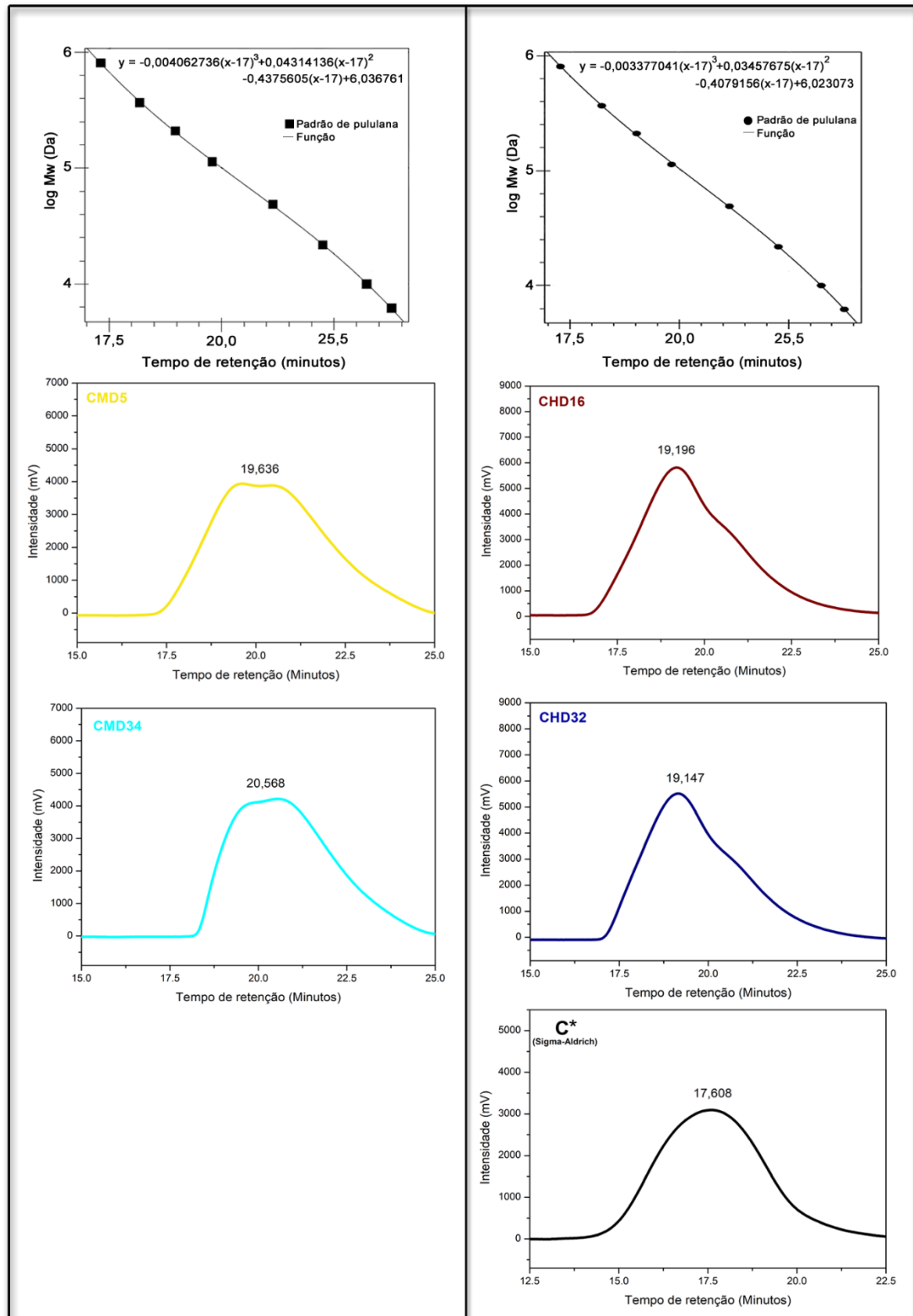
As curvas analíticas e os cromatogramas de GPC são mostrados nas Figuras D1, D2 e D3. Cada Figura representa a análise de um conjunto aleatório de amostras poliméricas mais as respectivas curvas analíticas.

Figura D1 – Curva analítica com a pululana e cromatogramas CM, CMD15, CMD55, CMD_E16 e CMD_E57



Fonte: Dados da pesquisa

Figura D2 – Curva analítica com a pululana e cromatogramas da (esquerda) CMD5 e CMD34 e (direita) CHD16, CHD32 e C*(Sigma-Aldrich)

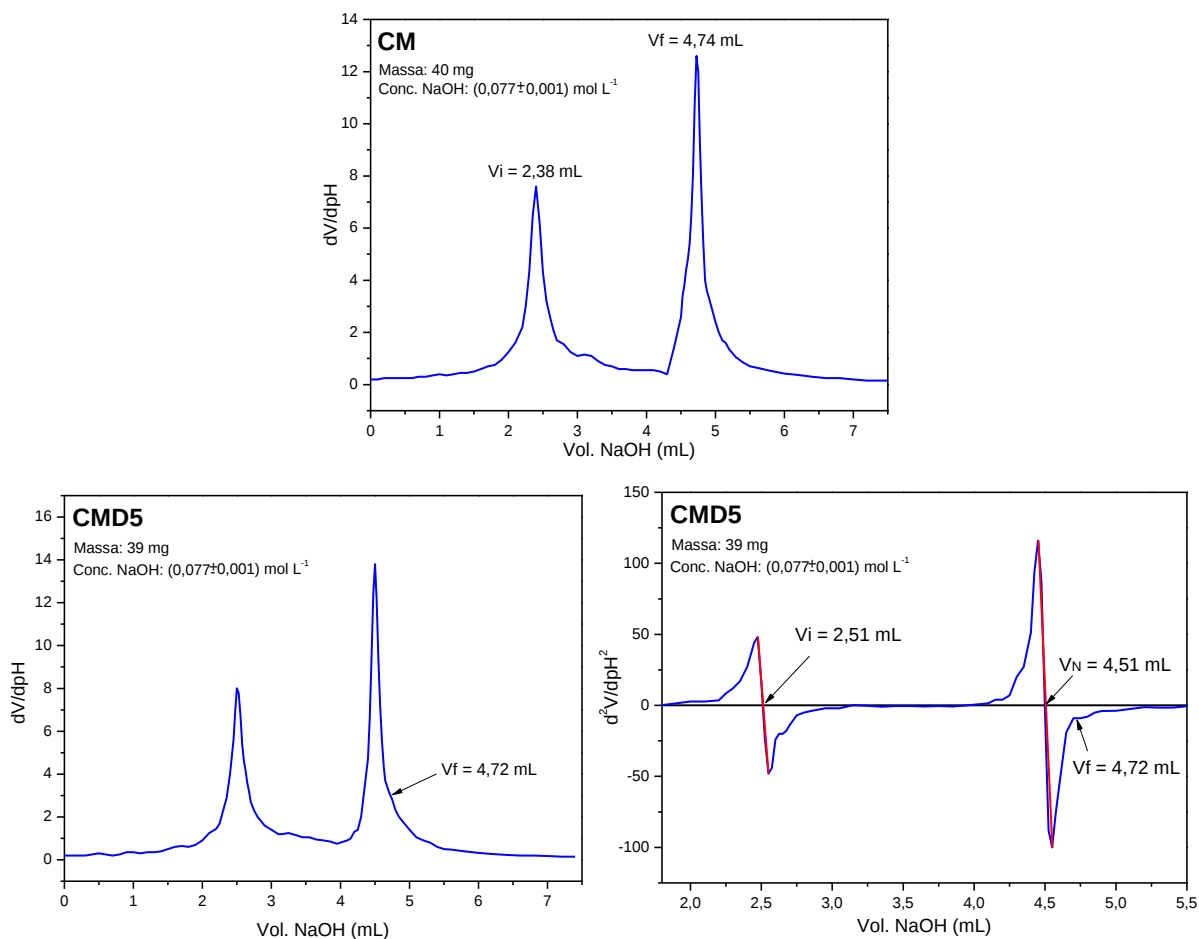


Fonte: Dados da pesquisa

APÊNDICE E – Titulações potenciométricas: derivadas e uma nova forma de estimar o grau de substituição

As derivadas de primeira e segunda ordem das titulações potenciométricas, utilizadas para determinar o GI, são mostradas nas Figuras E1, E2, E3 e E4. Para a CM e CH são observados dois pontos de máxima inclinação que representam o início (V_i) e o fim (V_f) da titulação dos grupos amina primários (GlcN). Nos polímeros com DIPEA ou DEAE, além desses dois valores, é observado um terceiro sinal (V_f), que representa o fim da desprotonação das aminas terciárias ou secundárias dos meros com DIPEA/DEAE. Neste último caso, a junção das derivadas de primeira e segunda ordem possibilitam uma melhor determinação do terceiro sinal.

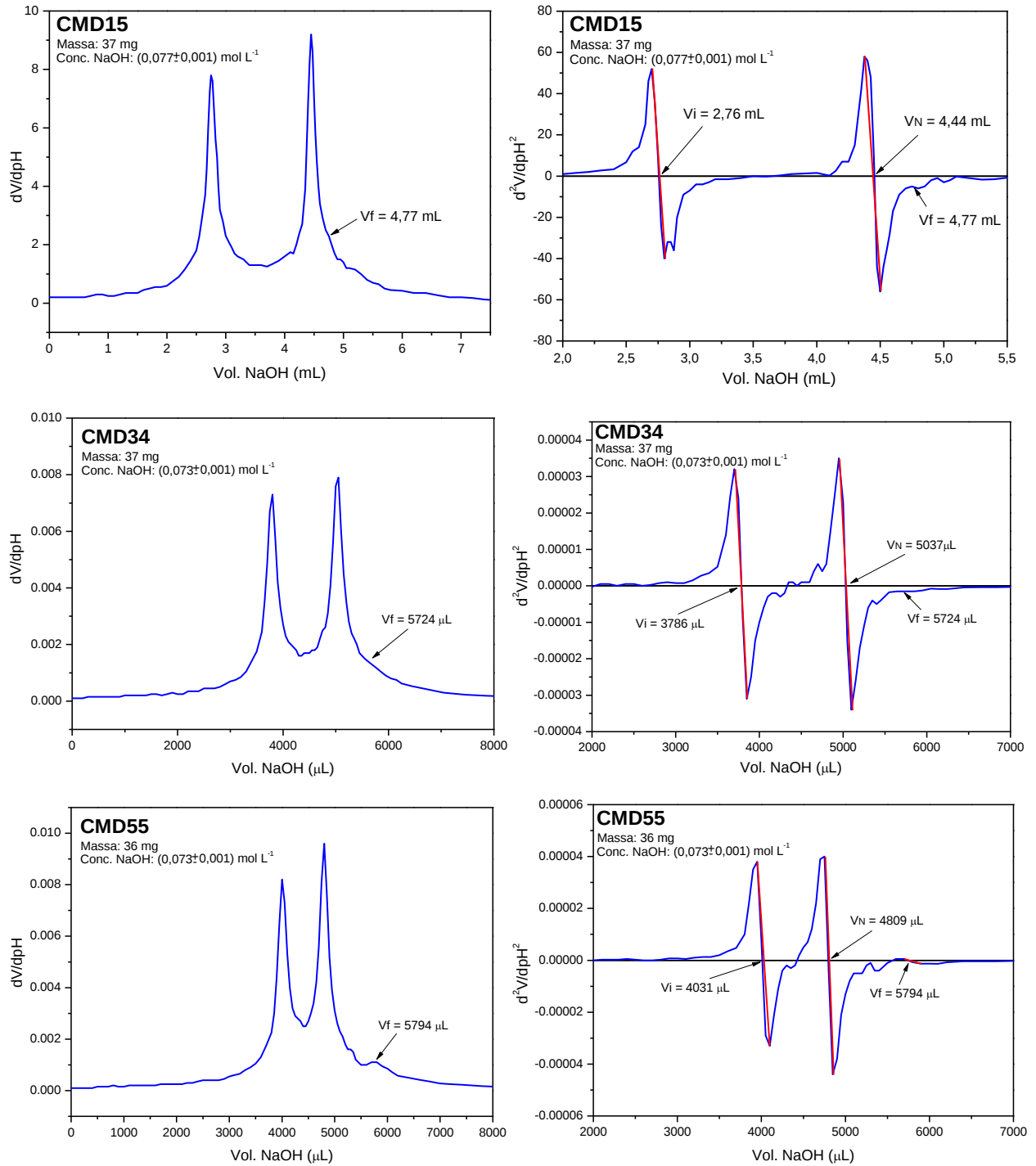
Figura E1 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros de média massa molecular (série I)



(Continua)

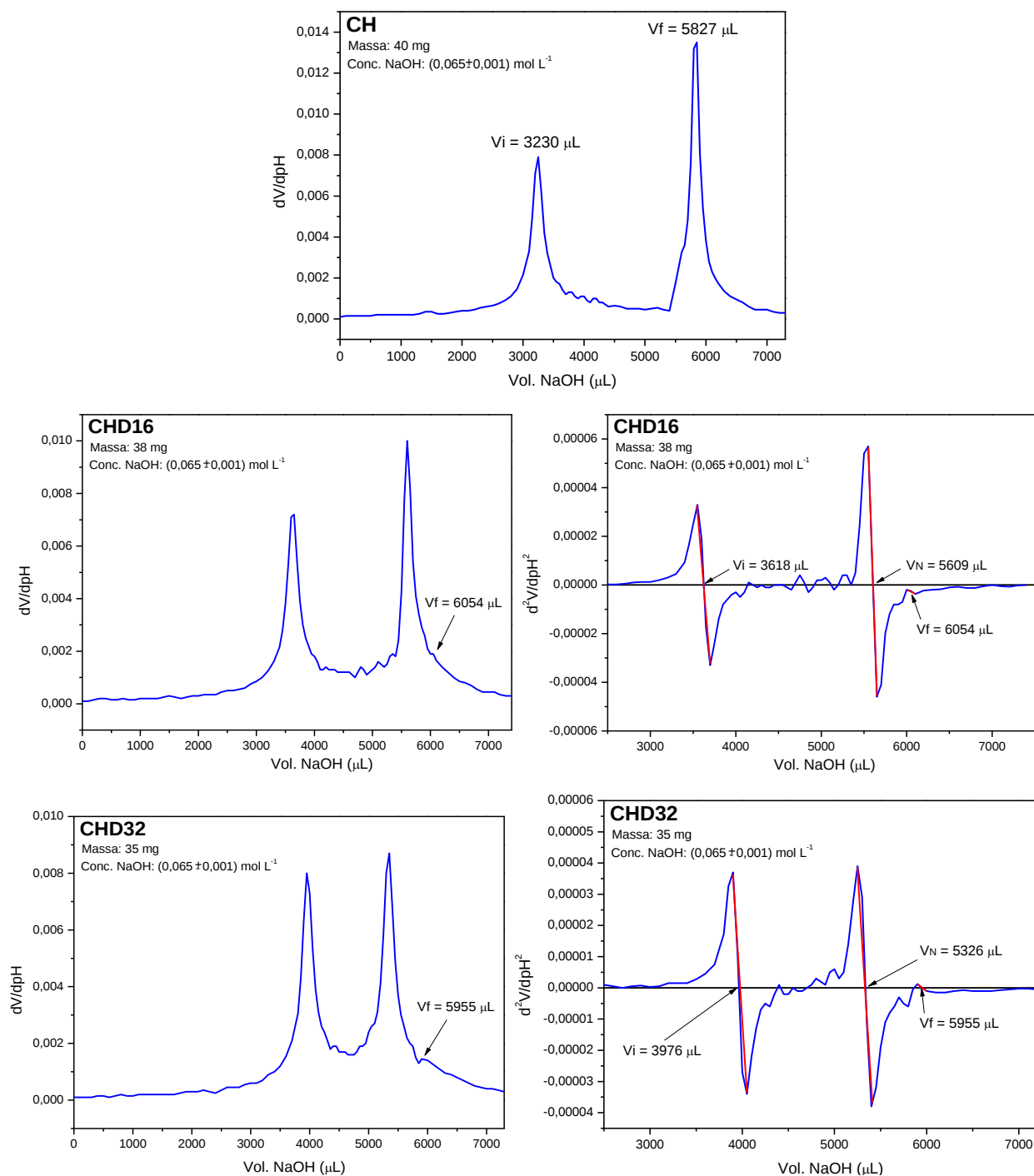
Figura E1 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros de média massa molecular (série I)

(Continuação)



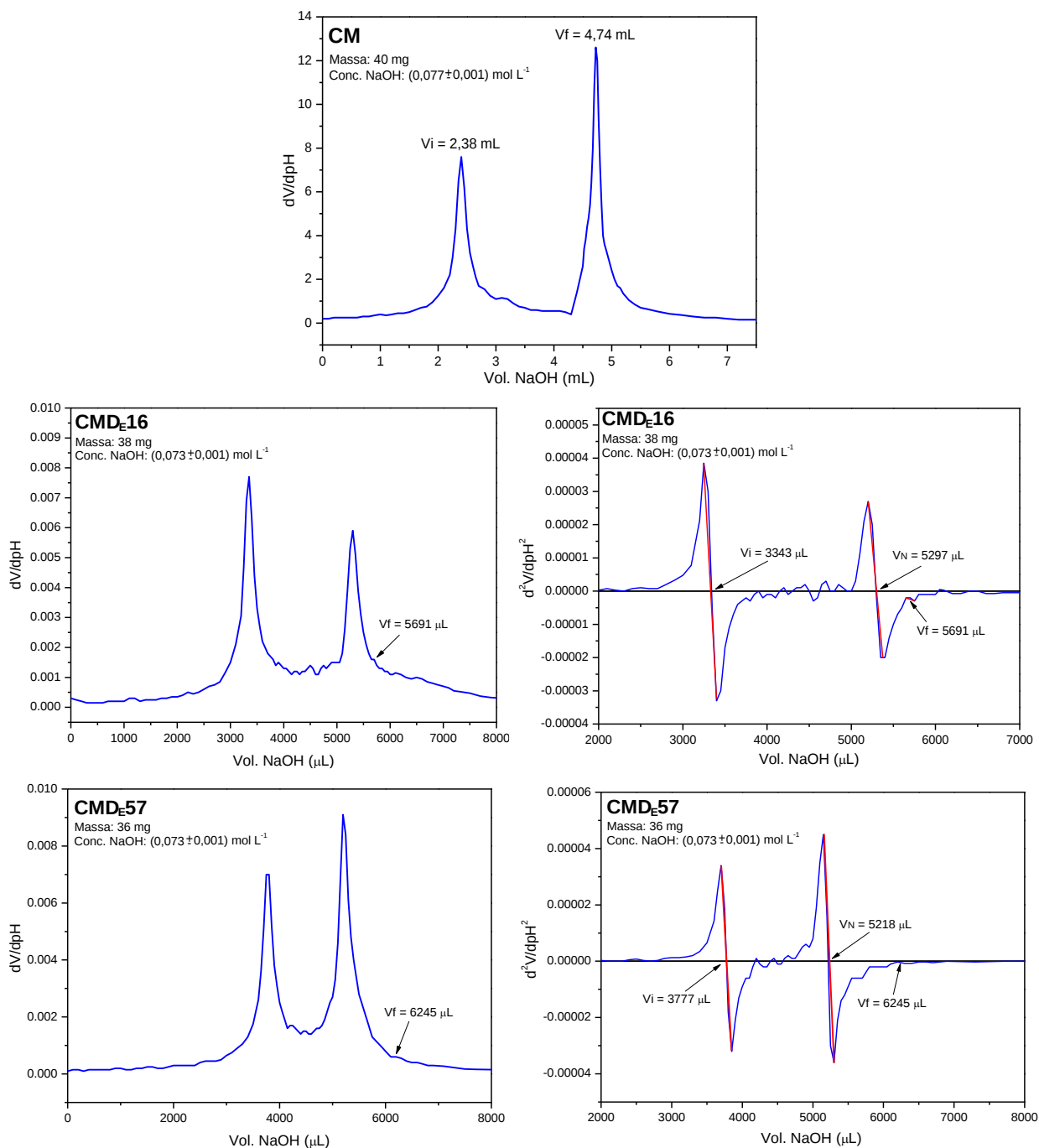
Fonte: Dados da pesquisa

Figura E2 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros de alta massa molecular (série II)



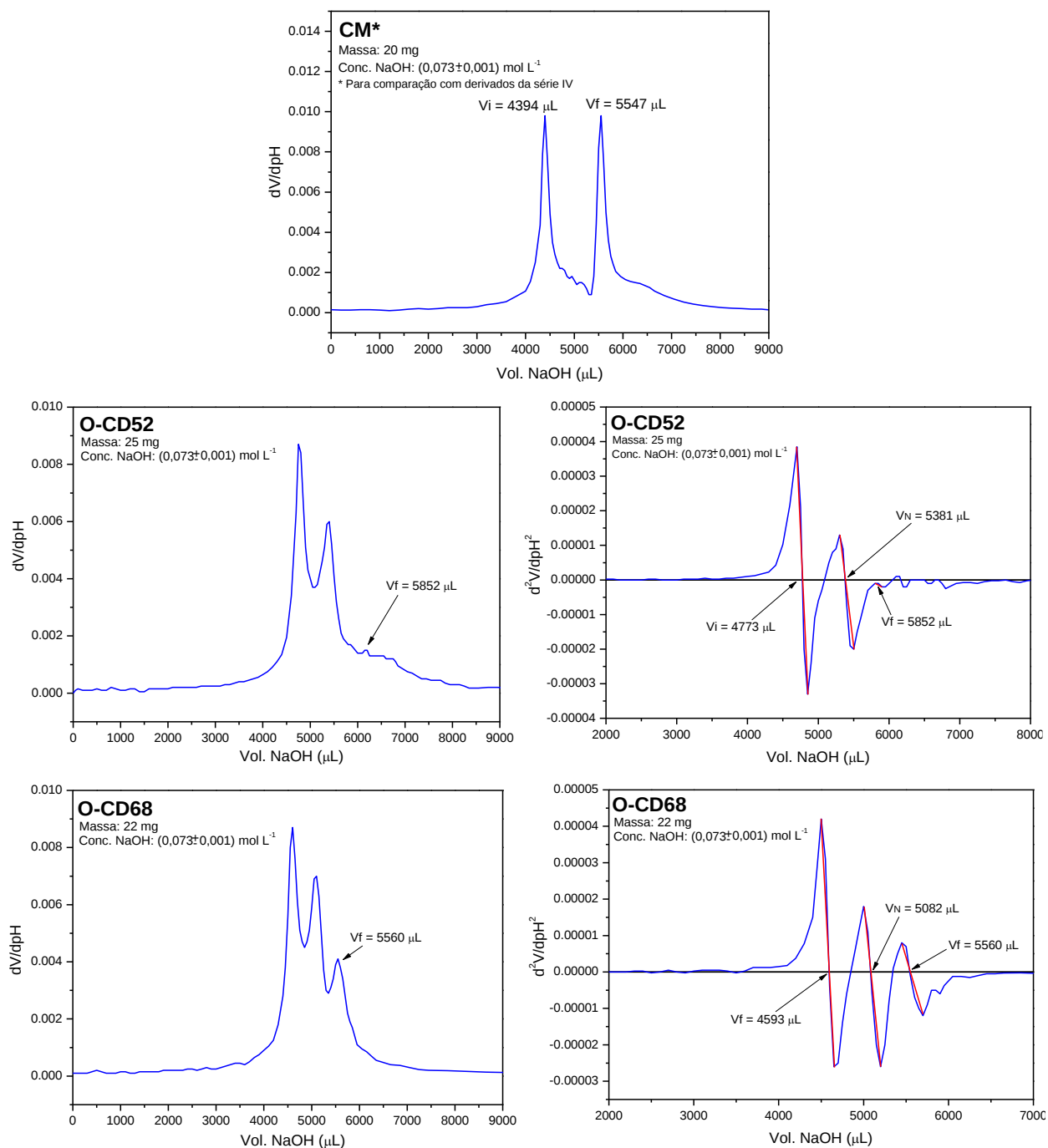
Fonte: Dados da pesquisa

Figura E3 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros com DEAE (série III)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura E4 – Primeira e segunda derivadas das titulações dos polímeros da série IV (bloqueio e DIPEA)



Fonte: Dados da pesquisa

O terceiro PFi é visto com menor intensidade devido à proximidade do pH do ponto de inflexão com pH máximo alcançado na titulação, dado pela adição de NaOH. Assim, não é possível uma variação tão evidente de pH, o que implica em uma derivada com sinal menos intenso.

Como um indicativo de eficiência na determinação do Vf, para os polímeros com DIPEA, é possível estimar o valor do GS pela titulação (GS_T) baseando-se nos volumes das derivadas, conforme mostra a Equação E1. Onde, **V_i**, **V_N** e **V_f** são os volumes do primeiro, segundo e terceiro sinais, respectivamente. Nesta Equação, assume-se que o grau de desacetilação da quitosana de partida é 100%, ou seja, que o valor de **V_f – V_i** representa todos os meros do polímero (não é considerada a presença de grupos acetil (GlcNac), que não possuem grupos ionizáveis). Os valores do GS_T são listados na Tabela E1.

$$GS_T = \frac{(V_f - V_N)}{(V_f - V_i)} \quad \text{Equação E1}$$

Tabela E1 – Grau de substituição por titulação potenciométrica (GS_T) dos derivados das séries I e II

Polímero	GS _T (%)	GS _{DIPEA} (%) ^a
CMD15	16	15
CMD34	37	34
CMD55	57	55
CHD16	18	16
CHD32	32	32

^a Determinado via espectroscopia de RMN ¹H

Fonte: Dados da pesquisa

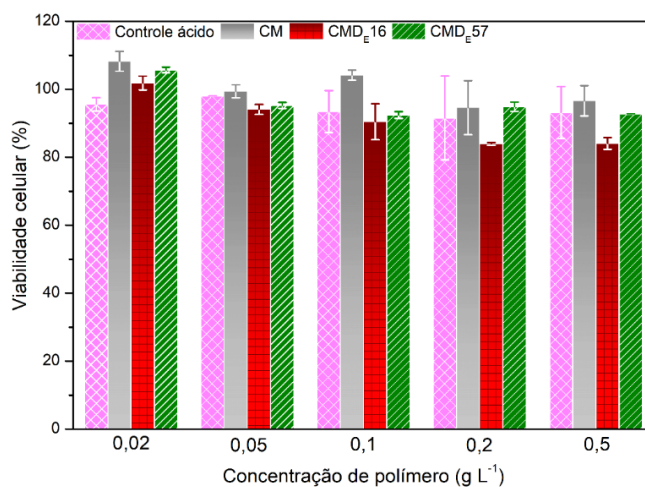
Em geral, houve uma concordância nos valores de GS e GS_T, uma vez que os polímeros apresentam uma baixa quantidade de meros acetilados (GA < 4%, por RMN ¹H) e, portanto, torna-se viável a aproximação ao assumir valor nulo para o GA. Esses valores indicam acurácia na titulação, considerando que os valores de GS obtidos pelo RMN ¹H são os tidos como verdadeiros.

Com base nas derivadas, também é possível obter-se informações sobre o pKa dos grupos ionizáveis. O pKa desses grupos pode ser definido como o valor do pH na metade do volume de equivalência. Deste modo, observou-se que tanto o grau de substituição quanto a massa molecular não influenciaram o valor do pKa dos grupos amina primários (GlcN) dos polímeros, que se manteve entre 6,3 e 6,4, valor de acordo ao encontrado pela literatura (KUMIRSKA et al., 2011). O pKa dos grupos amina terciários ou secundários pode ser estimado ente 9-10, valor distante ao encontrado na literatura para polímeros com o grupo DIPEA na forma do mero 2-(diisopropilamino)etil metacrilato (DPA), com pKa 6,80 (GIACOMELLI et al., 2011), mas próximo ao encontrado para as unidades não quaternizadas de DEAE-Dextranas, com pKa 9,5 (AMIJI, 2004).

APÊNDICE F – Caracterizações adicionais para alguns polímeros das séries III e IV

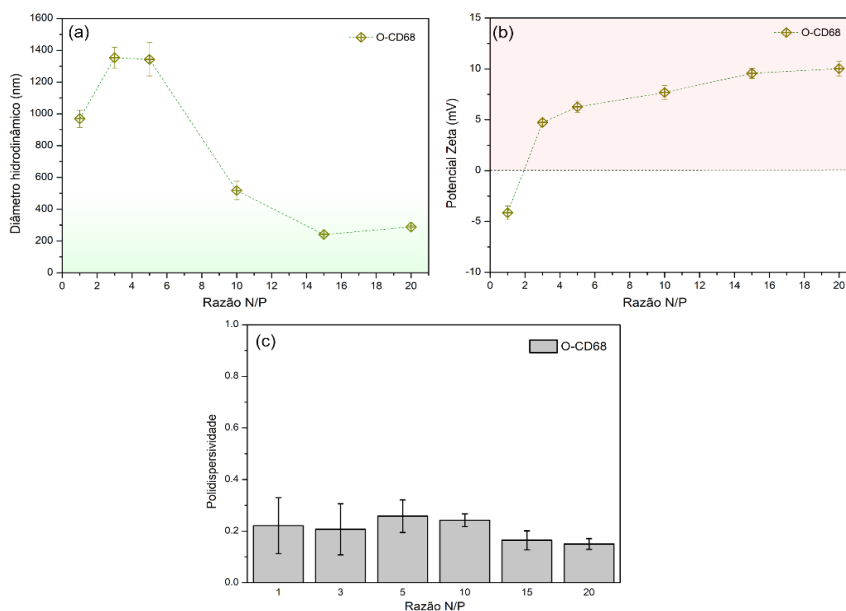
A citotoxicidade dos derivados $\text{CMD}_{\text{E}16}$ e $\text{CMD}_{\text{E}57}$ foram realizadas conforme descrito no item 4.7 e são apresentados na Figura F1. O Dh, potencial zeta e polidispersividade dos políplexos formados pelo O-CD68, em função da razão N/P, são apresentados na Figura F2

Figura F1 – Viabilidade celular de fibroblastos 3T3/NIH e na presença dos polímeros com DEAE (série III)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura F2 – (a) Diâmetro hidrodinâmico (b) potencial Zeta e (c) polidispersividade dos políplexos formados pelo O-CD68 (com siRNA anti-TNF α) em diferentes razões N/P no 7,4 (I = 0,15 mol L⁻¹, Conc. fosfato = 0,05 mol L⁻¹)

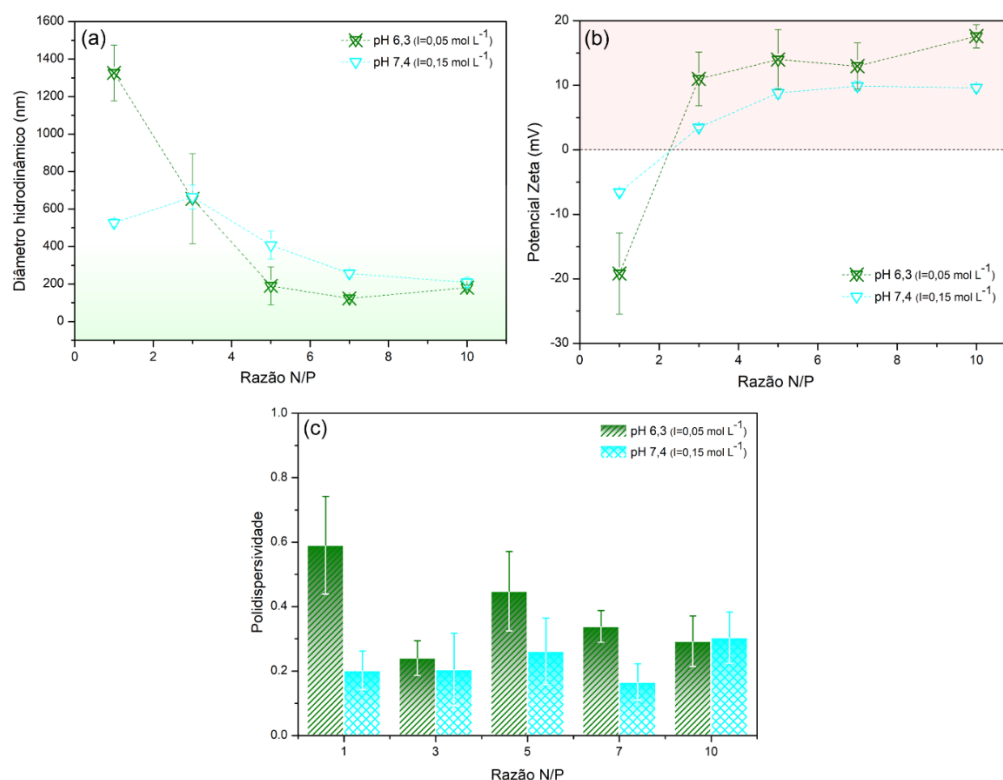


Fonte: Dados da pesquisa

APÊNDICE G – Efeito do pH e da força iônica na formação dos poliplexos

Nanopartículas formadas pelo CMD34 com siRNA também foram preparadas em pH 6,3 (com força iônica ajustada em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e tiveram seu diâmetro hidrodinâmico (Dh) e potencial zeta avaliados em diferentes razões N/P (Figura F1), seguindo o mesmo procedimento já descrito nesse trabalho (item 4.6.3). Observa-se que razão N/P 10 (razão de referência deste trabalho) o Dh não foi alterado pela diminuição do pH e da força iônica, contudo, houve uma tendência de aumento do potencial ζ (em relação as condições fisiológicas) em cerca de 80%.

Figura G1 – (a) Diâmetro hidrodinâmico (b) potencial Zeta e (c) polidispersividade dos poliplexos formados pelo CMD34 (com siRNA anti-TNF α) em diferentes razões N/P no pH 6,3 ($I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, Conc. fosfato = $0,025 \text{ mol L}^{-1}$) e 7,4 ($I = 0,15 \text{ mol L}^{-1}$, Conc. fosfato = $0,05 \text{ mol L}^{-1}$). $n = 6$ (pH 6,3) e $n = 9$ (pH 7,4)



Fonte: Dados da pesquisa

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

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

São José do Rio Preto, 30 / 04 / 19

André M. Martinez Jr.

Assinatura do autor