



ISADORA PFEIFER DALLA PICOLA

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DE NANOPARTÍCULAS DE
DNA COM DERIVADOS DE QUITOSANA CONTENDO
GRUPOS FOSFORILCOLINA**

ISADORA PFEIFER DALLA PICOLA

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DE NANOPARTÍCULAS DE
DNA COM DERIVADOS DE QUITOSANA CONTENDO
GRUPOS FOSFORILCOLINA**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Tiera

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2009

ISADORA PFEIFER DALLA PICOLA

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DE NANOPARTÍCULAS DE
DNA COM DERIVADOS DE QUITOSANA CONTENDO
GRUPOS FOSFORILCOLINA**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio José Tiera
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen
Professor Associado
Universidade de São Paulo – São Carlos

Prof^a. Dr^a. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal
Professora Doutora
Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

São José do Rio Preto, 09 de outubro de 2009

Agradecimentos

Por essa grande etapa da minha vida, muitas pessoas estiveram presentes e devo a elas esse pequeno agradecimento.

A primeira pessoa a quem eu gostaria de agradecer é ao prof. Dr. Márcio José Tiera por toda a minha formação acadêmica, pelas orientações desde minha iniciação científica até agora nesse trabalho de mestrado e por me engrandecer durante esse período pelas conversas e discussões.

A todos os professores do Departamento de Física do Ibilce por todos os ensinamentos durante o curso de mestrado.

Aos alunos e colegas da pós-graduação em Biofísica Molecular, em especial à Tabata, Tamára, Kuririn, Natália e Gabriel por estarem presentes em vários momentos, desde o início ao fim do curso.

Quero agradecer ao prof. Dr. João Ruggiero Neto e todo o seu grupo de pesquisa pelas discussões e empréstimos de aparelhos e materiais.

A todos os colegas do laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia que fazem desse um ótimo ambiente de trabalho. Entre esses, Fábio, Vitor, Priscila e Karen pela ajuda, conversas e discussões sempre bem vindas.

Ao Ronaldo Júnio de Oliveira pelo companheirismo, compreensão, amor e carinho durante todos os momentos que estamos juntos e que sem ele ficaria muito mais difícil a conclusão do mestrado. A todos os meus amigos Aline, Gustavo, Leandro, Mary, Juliana, Cesinha, Sidney, Ézio que estiveram presentes nos momentos de diversão, alegria e relax.

Aos meus queridos avôs, Paulina Biacchi Pfeifer e Eduardo Marques Pfeifer, que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida e que, mesmo morando muito longe, sempre deram um jeitinho para estarem mais próximos.

À minha queridíssima mãe, Rejane Biacchi Pfeifer, e lindíssima irmã, Jéssica Pfeifer Dalla Picola, pelo amor, carinho, compreensão, companheirismo e dedicação por mim nos momentos mais difíceis e também nos melhores momentos da minha vida.

E também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas concedidas e apoio financeiro em minha iniciação científica (processo nº 2006/04635-7) e no meu mestrado (processo nº 2007/06066-2), possibilitando a aquisição de materiais, participação a congressos e ao desenvolvimento e conclusão do trabalho, o que também proporcionou meu engrandecimento profissional.

Resumo

Na presente dissertação, foram preparadas quitosanas com diferentes massas molares, 16 kDa, 18 kDa e 29 kDa, e com diferentes graus de substituição de fosforilcolina (PC). As quitosanas de baixa massa molecular foram obtidas pela degradação de quitosana desacetilada. Essas quitosanas foram purificadas com membranas de diálise de tamanho de exclusão apropriadas e caracterizadas por meio de titulação potenciométrica, H-RMN e Cromatografia de permeação em gel (GPC). O estudo físico-químico da interação das quitosanas com DNA foi realizado utilizando-se as técnicas de fluorescência, eletroforese, microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico. As propriedades avaliadas foram a eficiência de interação, a estabilidade dos complexos, potencial zeta e tamanho de poliplexos. Os experimentos foram conduzidos variando-se a força iônica, pH do meio, massa molar de polycation e razão de cargas para quitosanas com diferentes conteúdos de grupos PC. Além das quitosanas preparadas durante o projeto, também se utilizou quitosanas de diferentes massas molares, de 5 e 150 kDa, para estudo dos poliplexos em diferentes forças iônicas.

Os resultados mostraram que a eficiência de interação entre quitosana e DNA é reduzida com a presença do grupo PC. Nos estudos de DLS, verificou-se que, em baixos valores de pH, o método de coacervação permite a obtenção de nanopartículas de 150 a 300 nm. A força de interação, o tamanho e a estabilidade das nanopartículas dependem do pH do meio, da força iônica da solução, da massa molar e do conteúdo de fosforilcolina. Em pHs mais elevados, os poliplexos são mais estáveis quanto maior a massa molar ou quando há a presença de grupo fosforilcolina. O trabalho permitiu ampliar os estudos sobre os efeitos da força iônica, do pH, da massa molar e conteúdos de PC e como, tais parâmetros, afetam a estabilidade das nanopartículas, sendo essa, uma propriedade importante, não muito considerada na literatura.

PALAVRAS-CHAVE: Quitosana, DNA, terapia gênica, vetor não-viral, nanopartículas, fosforilcolina.

Abstract

In this work chitosans with different molecular weights and their derivatives containing different amounts of phosphorylcholine (PC) were prepared. The low molecular weights chitosans were obtained by degradation of deacetylated chitosan. These chitosans were purified by dialysis membranes of appropriate sizes of exclusion and characterized by potentiometric titration, ¹H-NMR and gel permeation chromatography (GPC) techniques. The physico-chemical study of the interaction between chitosan and DNA was performed using the ethidium bromide fluorescence assay, gel electrophoresis, optical microscopy, transmission electron microscopy and dynamic light scattering techniques. The experiments were carried out at varying experimental conditions as ionic strength, pH, and charge ratio with chitosans of different molecular weights and phosphorylcholine contents.

The results showed that the efficiency of the interaction between chitosan and DNA was reduced with the incorporation of PC on the chitosan chain. The results showed that at low pH values the sizes of the nanoparticles obtained by the coacervation method varied from 150 to 300 nm. The strength of the interaction and the size of the nanoparticles were shown to be dependent of pH, ionic strength, chitosan molecular weight and of the phosphorylcholine contents. The study at high pH values showed that more stable nanoparticles were formed with chitosans having the higher molecular weights. The attaching of phosphorylcholine groups to the chitosan main chain allows obtaining more stable particles at high pH values. In this work we provide new insights on the effects of molecular weight, pH, ionic strength and PC contents on both the chitosan-DNA interaction and the stability of formed nanoparticles.

KEYWORDS: Chitosan, DNA, gene therapy, non-viral vector, nanoparticles, phosphorylcholine.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da formação de nanopartículas de poliplexos.....	2
Figura 2. Esquema das estruturas dos polímeros quitina, quitosana e o processo de desacetilação.	4
Figura 3. Esquema estrutural da molécula de fosforilcolina gliceraldeído.	6
Figura 4. Viscosímetro tipo Ostwald utilizado para a determinação da massa molar da quitosana.	13
Figura 5. (a) Estrutura dos derivados de quitosana-fosforilcolina: Hidrogênio utilizados na determinação do grau de acetilação e substituição (vermelho). (b) Espectro de H-RMN representativo de quitosana-fosforilcolina (Tiera, et al., 2006).	17
Figura 6. Gráfico de viscosidade reduzida em função da concentração de quitosana, para cálculo da massa molecular viscosimétrica média.	22
Figura 7. Titulação Potenciométrica da CHPC44% 29 kDa, para determinação do grau de substituição.....	23
Figura 8. Titulação Potenciométrica da CHPC47% 29 kDa, para determinação do grau de substituição.....	24
Figura 9. Titulação Potenciométrica da CHPC26% 29 kDa, para determinação do grau de substituição.....	24
Figura 10. Titulação Potenciométrica da CHPC22% 29 kDa, para determinação do grau de substituição.	25
Figura 11. Espectros de H-RMN das quitosanas CH 29 kDa, CHPC 22% 29 kDa e CHPC47% 29 kDa.....	26
Figura 12. Titulação do complexo DNA-EtBr por quitosanas desacetiladas e quitosanas com grupos PC em pH 4,0, força iônica 10mM a 25 ⁰ C.....	28
Figura 13. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por quitosanas desacetiladas e quitosanas com grupos PC em pH 7,0, força iônica 10mM a 25 ⁰ C.....	28

Figura 14. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CH 29 kDa em diferentes pHs, força iônica 10mM e a 25 ⁰ C.....	29
Figura 15. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CHPC44% 29 kDa em diferentes pHs, força iônica 10mM e a 25 ⁰ C.	29
Figura 16. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CH 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 7,0 e a 25 ⁰ C.....	30
Figura 17. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CHPC44% 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 7,0 e a 25 ⁰ C.	31
Figura 18. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CHPC26% 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 7,0 e a 25 ⁰ C.	31
Figura 19. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CH 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 4,0 e a 25 ⁰ C.....	32
Figura 20. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CHPC44% 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 4,0 e a 25 ⁰ C.	32
Figura 21. Titulação do complexo DNA-EtBr por (a) quitosanas desacetiladas em pH 4,0, (b) quitosanas desacetiladas em pH 6,2 e força iônica 10mM a 25 ⁰ C e (c) CH 150 kDa em pH 6,2 em diferentes forças iônicas.	34
Figura 22. Fotomicrografias de partículas de quitosana/DNA em Tampão acetato 10 mM, pH 4,0; Força iônica 10 mM, razão N/P 5: Figuras (a) e (b); Força iônica 150 mM: Figuras (c) e (d) e Força iônica 500 mM: Figuras (e) e (f).	36
Figura 23. Fotomicrografias de partículas de quitosana/DNA em Tampão acetato 5 mM, pH 6,2; Força iônica 10 mM, razão N/P 5: Figuras (a) e (b); Força iônica 150 mM: Figuras (c) e (d) e Força iônica 500 mM: Figuras (e) e (f).	37
Figura 24. Potencial zeta das nanopartículas formadas com quitosana 5 kDa e 150 kDa em função da razão N/P em pH 6,2, força iônica 10 e 150 mM.	38
Figura 25. Fotomicrografia em Microscópio Eletrônico de Transmissão das partículas de CH 29 kDa/DNA em tampão acetato 10 mM, pH 4,0 e força iônica de 10 mM.....	39

Figura 26. Fotomicrografias de TEM de nanopartículas de CH 5kDa-ctDNA (a, c and f) e CH 150 kDa-ctDNA (b, d and g) em pH 6,2 em diferentes forças iônicas (a) e (b) 10 mM; (c) e (d) 150 mM; (e) e (f) 500 mM.	40
Figura 27. Distribuições de tamanho das nanopartículas na razão N/P 3 das diferentes quitosanas em pH 4,0.	41
Figura 28. Distribuição de tamanhos das nanopartículas de DNA e CH 29 kDa na razão N/P 7, pH 6,2 e 10 mM de força iônica.....	42
Figura 29. Tamanho das nanopartículas de quitosana/DNA em função da razão N/P em tampão acetato 10 mM, pH 4,0, força iônica de 10 mM, temperatura de 25°C.....	43
Figura 30. Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para as nanopartículas de ct-DNA com a) CH 5 kDa, b) CH 16 kDa, c) CH 29 kDa e d) CH 150 kDa em pH = 6,2 e força iônica 10 mM.	44
Figura 31. Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para as nanopartículas de ct-DNA com CHPC22% 29 kDa em pH = 6,2 e força iônica 10 mM.....	45
Figura 32. Tamanho das nanopartículas de DNA em função do tempo preparadas com a) CH 5 kDa, b) CH 16 kDa, c) CH 29 kDa e d) CH 150 kDa na razão N/P 7,0 em diferentes forças iônicas e pH 6,2.....	47
Figura 33. Tamanho das nanopartículas de DNA em função do tempo preparadas com CHPC22% 29 kDa na razão N/P 7,0 em diferentes forças iônicas e pH 6,2.....	48
Figura 34. Eletroforeses em gel de agarose de complexos ctDNA e quitosanas (a) CH 16 kDa, (b) CH 29 kDa, (c) CHPC26% 29 kDa, (d) CHPC47% 29 kDa e (e) CHPC22% 29 kDa em tampão acetato pH 4,0. As bandas fluorescentes indicam o deslocamento do ctDNA. As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese.....	51
Figura 35. Eletroforeses dos poliplexos de ctDNA e CH 5kDa (a, c, e, g) e CH 150 kDa (b, d, f, h) em pH 6,2 e diferentes forças iônicas: (a) e (b) 10 mM, (c) e (d) 150 mM, (e) e (f) 500 mM e (g) e (h) 1 M. As razões N/P estão indicadas acima de cada eletroforese.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1. Quitosanas desacetiladas de diferentes massas molares marcadas com corante fluorescente rodamina e 98% de desacetilação.	9
Tabela 2. Quitosanas desacetiladas de baixa massa molecular e com substituição de grupo PC.	11
Tabela 3. Graus de desacetilação e de substituição determinados a partir dos métodos de potenciometria e H-RMN.	27
Tabela 4. Análise dos tamanhos das partículas preparadas de ctDNA e quitosana em pH 6,2.	45
Tabela 5. Análise do tamanho das partículas preparadas de ctDNA e quitosana com variação da força iônica, depois de 3 horas da preparação.	48
Tabela 6. Propriedades das quitosanas desacetiladas e degradadas.	67

Lista de Símbolos e Abreviaturas

- [η]. Viscosidade intrínseca
- a. Constante de Mark-Houwink relacionada à flexibilidade do polímero
- c. Concentração da amostra
- CH. Quitosana
- CHPC. Quitosana com grupos fosforilcolina
- ctDNA. DNA de Timo de Bezerro
- D₂O. Deuterium oxide
- DCl. Deuterium chloride
- DLS. Espalhamento de Luz Dinâmico
- DNA. Ácido Desoxirribonucleico
- EtBr. Brometo de Etídeo
- GD. Grau de desacetilação
- GlcN. 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose
- GlcNAc. 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose
- GPC. Cromatografia de Permeação em Gel
- GS. Grau de Substituição
- H-RMN. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
- I_{CH₃}. Área do sinal de H-RMN referente aoCH₃
- I_{H1} e I_{H1s}. Área do sinal de H-RMN referente aos hidrogênios anoméricos
- k_H. Coeficiente de Huggins
- K_m. Constante de Mark-Houwink
- k_T. Constante de Boltzmann
- M. Massa molar viscosimétrica média
- MM_{Des}. Massa Molecular dos monômeros desacetilados de quitosana
- MM_{PC}. Massa Molecular do grupo fosforilcolina
- Mn. Massa Molar numérica Média
- Mw. Massa Molar Ponderal Média
- Mw/Mn. Índice de Polidispersividade
- N. Grupos amina de quitosana
- N/P. Razão de grupos amina de quitosana e grupos fosfato de DNA
- NaNO₂. Nitrito de sódio

NaOH. Hidróxido de Sódio

n_d . Número de moles de monômeros desacetilados

n_{pc} . Números de moles de monômeros com grupos fosforilcolina

P. Grupos fosfato de DNA

PC. Fosforilcolina

PEI. polietilenamina

t. tempo de escoamento da solução polimérica

TEM. Microscopia eletrônica de Transmissão

t_o . Tempo de escoamento do tampão

UV. Radiação Ultravioleta

α . grau de dissociação

$\Delta\psi$. Diferença de potencial eletrostático

ϵ . Carga do elétron

η_{sp} . Viscosidade específica, Viscosidade específica

Sumário

CAPÍTULO 1 **1**

INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>BIOPOLÍMERO QUITOSANA</i>	4
1.2. <i>O GRUPO FOSFORILCOLINA E SUA IMPORTÂNCIA</i>	6
1.3. <i>A DEPENDÊNCIA COM A MASSA MOLECULAR</i>	7
1.4. <i>OBJETIVOS</i>	8

CAPÍTULO 2 **9**

MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1. <i>MATERIAIS</i>	9
2.2. <i>DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA</i>	11
2.3. <i>DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA DA QUITOSANA DESACETILADA</i>	12
2.4. <i>DEGRADAÇÃO DA QUITOSANA</i>	13
2.5. <i>PREPARAÇÃO DE FOSFORILCOLINA GLICERALDEÍDO</i>	14
2.6. <i>PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS QUITOSANAS CONTENDO GRUPOS FOSFORILCOLINA</i>	15
2.7. <i>DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO (GD) E DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (GS) UTILIZANDO-SE H-RMN</i>	16
2.8. <i>DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (GS) UTILIZANDO-SE POTENCIOMETRIA.</i>	17
2.9. <i>ENSAIO COM BROMETO DE ETÍDEO (EtBr)</i>	18
2.10. <i>MICROSCOPIA ÓTICA DE FLUORESCÊNCIA</i>	20
2.11. <i>ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA</i>	20
2.12. <i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)</i>	21

CAPÍTULO 3 **22**

RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
3.1. <i>DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR VISCOSIMÉTRICA MÉDIA DA QUITOSANA DESACETILADA</i>	22
3.2. <i>CARACTERIZAÇÃO DAS QUITOSANAS MODIFICADAS</i>	23
3.3. <i>ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA COM BROMETO DE ETÍDEO (EtBr)</i>	27
3.4. <i>ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FORÇA IÔNICA E DA MASSA MOLECULAR NA INTERAÇÃO ENTRE QUITOSANA E DNA</i>	33
3.5. <i>MICROSCOPIA ÓPTICA</i>	35
3.6. <i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</i>	38
3.7. <i>ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO</i>	41
3.8. <i>ELETROFORESE</i>	49

<u>CAPÍTULO 4</u>	<u>53</u>
CONCLUSÃO	53
<u>CAPÍTULO 5</u>	<u>56</u>
PERSPECTIVAS FUTURAS	56
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>57</u>
<u>APÊNDICE A</u>	<u>66</u>
<u>APÊNDICE B</u>	<u>68</u>

Capítulo 1

Introdução

Nas últimas décadas, a tecnologia do DNA recombinante permitiu inúmeros avanços na análise da molécula de DNA, como, por exemplo, a descoberta de genes específicos de determinadas proteínas, e, conseqüentemente, no diagnóstico de doenças ligadas ao código genético. Com essa tecnologia, que nos traz a capacidade de descrever doenças em termos moleculares, podemos intervir clinicamente para o tratamento das mesmas (Mulligan, 1993). Essa estratégia clínica é denominada terapia gênica, que essencialmente é o transporte, transferência e expressão de um ou mais genes à célula alvo (Crystal, 1995; Roth & Cristiano, 1997).

O maior obstáculo para a aplicação da terapia gênica é a eficiência dos vetores para o transporte do gene e são dois os tipos: virais e não-virais. Existem muitas controvérsias sobre quais vetores são mais apropriados para a aplicação *in vivo*. Os vetores virais são muito eficientes para a terapia, já que a sua função é exatamente expressar sua informação genética nas células infectadas. No entanto, a utilização de vírus pode induzir mutagênese, respostas imunes e ocasionar riscos à saúde dos pacientes (Crystal, 1995; Roth & Cristiano, 1997; Baker, Kritz, Work, & Nicklin, 2004). Já, os vetores não-virais são menos eficientes na transferência de genes à célula, mas são muito mais seguros à saúde do paciente (Crystal, 1995), fator muito importante para a aplicação da terapia na prática da medicina (Anderson, 1992).

Entre os possíveis vetores não-virais, uma atenção maior é dada aos polímeros catiônicos e lipídeos catiônicos devido à interação com as cargas negativas do DNA e à capacidade de complexar um grande número de genes em uma pequena estrutura. A interação é principalmente dirigida pela interação eletrostática e, em um ambiente de baixa força iônica, a interação leva à separação de fase e formação de um complexo polication-DNA. A partir de uma concentração crítica, o DNA condensa em uma estrutura compacta e densa e pode levar a formação de poliplexos com a forma de esferas, bastões ou toróides (Figura 1). Devido à importância dos complexos DNA-

policações para a terapia gênica, o processo de formação de complexos tem atraído um considerável interesse e tem sido estudado utilizando-se uma grande variedade de técnicas tal como microscopia de força atômica (Hansma, et al., 1998; Fang & Hoh, 1998), espectroscopia de fluorescência (Trubetskoy, Slattum, Hagstrom, Wolff, & Budker, 1999; Kidoaki & Yoshikawa, 1999), microscopia eletrônica (Perales, et al., 1997), espalhamento de raios X (Rau & Parsegian, 1992) e espalhamento de luz (Rungsardthong, et al., 2003).

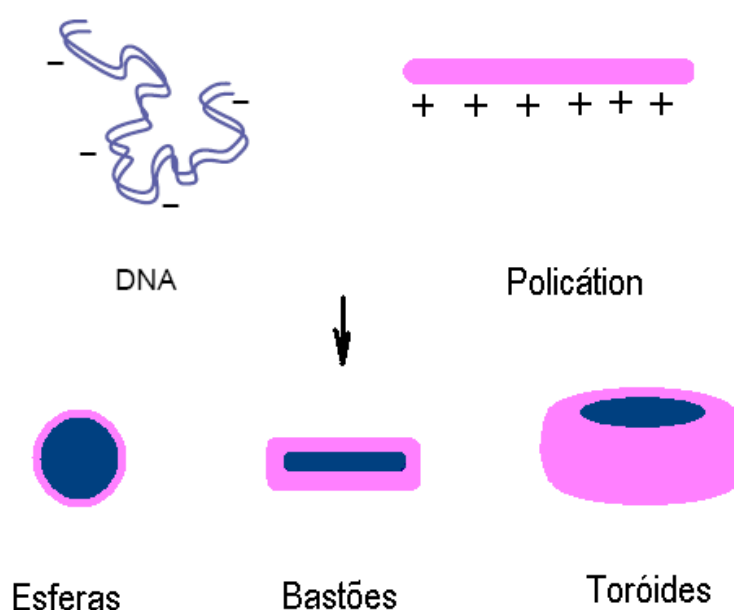


Figura 1. Representação esquemática da formação de nanopartículas de poliplexos.

O tamanho e forma das nanopartículas pode depender da massa molar do policação, da concentração e tipo do DNA e plasmídeo, bem como da razão de cargas policação:DNA (+ : -) (Fernandes, Tiera, & Winnik, 2006). O tamanho da partícula é reconhecido como um parâmetro importante, pois pode afetar o tempo de circulação na corrente sanguínea e o processo de captação celular. Em geral, tem sido reportado que poliplexos entram na célula principalmente por endocitose ou pinocitose, e que o tamanho deveria ser inferior a 100 nm (Mao, et al., 2001; Wolfert & Seymour, 1996). Entretanto, os resultados experimentais disponíveis são contraditórios e alguns trabalhos afirmam que a transfecção (processo de passagem da partícula do meio extracelular para o meio intracelular) pode ocorrer para partículas com tamanhos variando de 100 nm

(Erbacher, et al., 1998) a 2,0 μm (Akbuga, Ozbas-Turan, & Erdogan, 2004). Recentemente, estudos utilizando microscopia de força atômica indicaram que poliplexos quitosana-DNA com tamanhos de algumas centenas de nanômetros podem ser transferidos para dentro das células por meio da endocitose (Liu, et al., 2003).

Outro fator que deve ser considerado é que após a administração o sistema transportador contendo o DNA deve ser capaz de se manter na corrente sanguínea por um tempo significativo para alcançar o tecido alvo. Portanto, o tempo de circulação é um dos fatores mais importantes e proeminentes em terapia gênica, especialmente em casos de injeção intravenosa. Dependendo das características da superfície as nanopartículas são em geral removidas pelo fígado, baço e outras partes do sistema retículo endotelial. Partículas com superfícies mais hidrofóbicas são removidas preferencialmente pelo fígado, seguido pelo baço e pulmões (Peppas & Blanchett, 2004). A obtenção de novos polímeros com camadas protetoras na superfície das nanopartículas pode evitar interações com proteínas e fagócitos, prolongando, portanto, o tempo de circulação na corrente sanguínea (Leong, et al., 1998).

A interação é muito dependente das condições experimentais utilizadas, tais como: pH, densidade de carga, força iônica e das massa moleculares dos polímeros (Sato, Ishii, & Okahata, 2001; Richardson, Kolbe, & Duncan, 1999). Além disso, a morfologia dos poliplexos pode mudar dependendo da técnica de preparação da amostra (Tang & Szoka, 1997).

Estudos realizados sobre a liberação de DNA de complexos não-virais na célula têm levado a aceitação da hipótese denominada “esponja de prótons”. Essa hipótese propõe que o complexo entra na célula por meio de endocitose e, devido ao decréscimo do pH endossomal, ocorre o aumento do grau de ionização do complexo. Isso favorece o deslocamento de íons para o interior do endossomo aumentando a força iônica do meio e, conseqüentemente, facilitando a liberação da partícula e do DNA (Boussif, et al., 1997). Portanto, a análise dos poliplexos em diferentes condições experimentais se torna essencial para avanços nessa área.

1.1. Biopolímero Quitosana

Um polímero catiônico com grande potencial para terapia gênica é o polissacarídeo quitosana, por esse ser atóxico, biocompatível e biodegradável (MacLaughlin, et al., 1998; Tiera, et al., 2006). A quitosana pode ser obtida da carapaça de crustáceos é rica em um polissacarídeo chamado quitina e sua abundância chega próxima a da celulose. Esse polímero é constituído por monômeros de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, sendo que o primeiro é mais predominante que o segundo. A partir do processo de desacetilação da quitina obtém-se a quitosana, que contém maior quantidade de monômeros 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (GlcN) que 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) (Figura 2) (Azevedo, et al., 2007; Kumar, 2000).

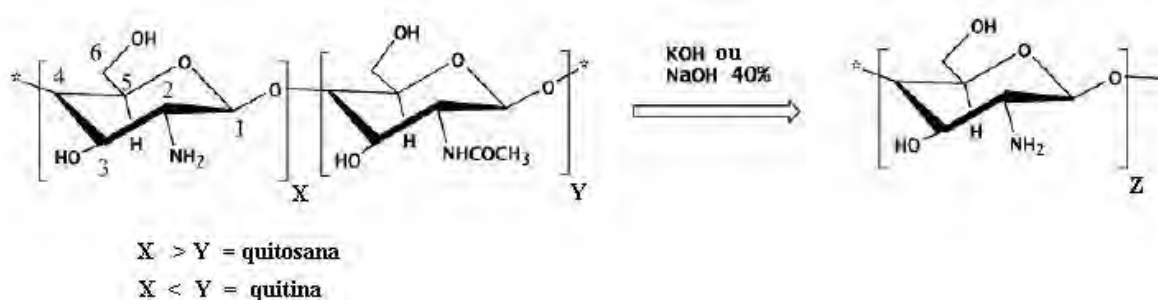


Figura 2. Esquema das estruturas dos polímeros quitina, quitosana e o processo de desacetilação (Fernandes, Tiera, & Winnik, 2006).

A quitosana apresenta uma diversidade de aplicações como no tratamento de efluentes, na indústria de cosméticos, na medicina por meio de formulações para a reconstituição óssea e no transporte de drogas (Azevedo, et al., 2007; Kumar, 2000). Esse polímero é catiônico devido à presença de grupos amina em sua cadeia polimérica que em meios ácidos são passíveis de protonação aumentando sua solubilidade. Além de interagir muito facilmente com o DNA formando nanopartículas, proporciona uma boa proteção contra a degradação por endonucleases, o que tem motivado sua utilização como vetor não-viral para a terapia gênica (Mao, et al., 2001; Sato, Ishii, & Okahata, 2001; Roy, et al., 1999; Chae, et al., 2005; Bowman & Leong, 2006; Corsia, et al., 2003).

Esse polímero é uma base fraca com valor de pKa para os grupos de glucosamina variando de 6,2 à 7,0. Como todos os polieletrólitos a constante de dissociação ácida (Ka) é dependente do grau de dissociação. Então, o pKa pode ser calculado com a equação de Katchalsky:

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

onde α é o grau de dissociação, k é a constante de Boltzmann, $\Delta\psi$ é a diferença de potencial eletrostático entre a superfície do poli(íon) e a referência, ϵ é a carga do elétron e T é a temperatura. Quando o polímero está sem cargas o potencial eletrostático se torna zero, assim se pode encontrar o valor intrínseco do valor da constante de dissociação dos grupos ionizados pK_0 (Fernandes, Tiera, & Winnik, 2006).

Como o pKa dos monômeros desacetilados de quitosana fica em torno de 6,5, esse se torna insolúvel em pH fisiológico (pH 7,2-7,4). Estudos mostram que nanopartículas de quitosana, quando administradas in vivo, são rapidamente removidas acumulando-se no fígado (Richardson, Kolbe, & Duncan, 1999; Heller, et al., 1996; Carreño-Gómez & Duncan, 1997). A modificação de quitosana para introdução de unidades ou polímeros hidrofílicos pode ser usada para criar uma camada protetora na superfície das nanopartículas, as quais podem evitar interações com proteínas e fagócitos. Várias alternativas vêm sendo utilizadas para evitar essas interações prolongando o tempo de circulação na corrente sanguínea (Kim, et al., 2007).

Galactose (Murata, Ohya, & Ouchi, 1996; Kim, et al., 2004; Park, et al., 2001), poli(etileno glicol) (PEG) (Zhang, et al., 2007; Chan, et al., 2007; Zahr, Davis, & Pishko, 2006; Bodnar, Hartmann, & Borbely, 2006), poli(vinil pirrolidona) (Park, et al., 2003) e dextrana (Park, et al., 2000) são grupos que vem sendo ligados à cadeia de quitosana ou a nanopartículas pré-formadas para melhorar suas propriedades físico-químicas. A conjugação de PEG na superfície de nanoesferas tem se mostrado eficiente na minimização da agregação em solução aquosa (Mao, et al., 2001; Jiang, et al., 2006). Entretanto, a força de ligação com o DNA pode depender da massa molar de quitosana bem como da composição e natureza do grupo hidrofílico (Danielsen, et al., 2005).

1.2. O grupo fosforilcolina e sua importância

Tendo como objetivo a aplicabilidade dos vetores não-virais para a terapia gênica, muitos trabalhos que buscam uma maior hemocompatibilidade vêm sendo feitos com vetores modificados com grupos fosforilcolina (Murphy, et al., 2000; Lam, et al., 2004; Goreish, et al., 2003; Palmer, et al., 2004). Esse grupo é encontrado em grande quantidade nas bicamadas lipídicas de células eucarióticas, como em eritrócitos de humanos (Holde, 1990).

A principal característica da fosforilcolina é o grupo zwitteriônico (Figura 3), que, quando presente em polímeros, aumenta a solubilidade dos mesmos em água, mesmo em meios com altas forças iônicas (Miyazawa & Winnik, 2003). Além disso, a presença do grupo fosforilcolina se mostra importante no transporte de drogas devido à redução na adsorção de proteínas (Murphy, et al., 2000; Palmer, et al., 2004), a não indução de respostas inflamatórias (Goreish, et al., 2003) e a estabilidade estérica de complexos formados com o DNA (Lam, et al., 2004).

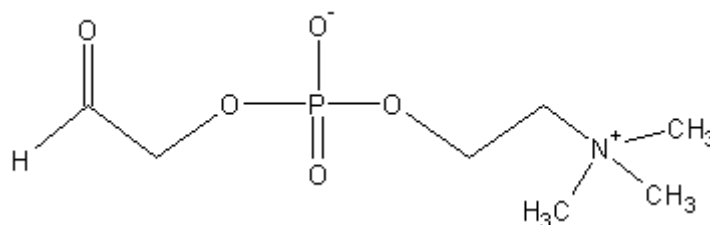


Figura 3. Esquema estrutural da molécula de fosforilcolina gliceraldeído.

A adição de grupos fosforilcolina à cadeia do biopolímero quitosana já foi realizada com o intuito de aumentar a solubilidade da quitosana em água (Tiera, et al., 2006) e a hemocompatibilidade (Zhu, Zhang, & Shen, 2003). Esse processo pode ser feito por meio da formação da base de Schiff entre derivado fosforilgliceraldeído (Figura 3) e o grupo amino do polímero quitosana, seguido da redução com cianoboro hidreto de sódio (Tiera, et al., 2006).

1.3. *A dependência com a massa molar*

Muitos parâmetros são importantes para a formação de poliplexos, mas a dependência com a massa molecular dos polímeros é um fator que se destaca. Muitos estudos foram realizados para avaliar o efeito da massa molar de polímeros na interação e proteção do DNA, na eficiência de transfecção e na citotoxicidade (Richardson, Kolbe, & Duncan, 1999; Hoggard, et al., 2003; Lee, et al., 2001; Kunath K. , et al., 2003; Godbey, Wu, & Mikos, 1998).

Estudos feitos com o polímero polietilenamina (PEI), com massas molares de 5 kDa e 48 kDa, demonstraram que menor citotoxicidade e maior eficiência no processo de transfecção são obtidos com o polímero de massa molar menor (Kunath K. , et al., 2003). No entanto, experimentos realizados com massas molares menores que 2 kDa não demonstraram boa eficiência na transfecção (Godbey, Wu, & Mikos, 1998).

Outros estudos com quitosanas de baixas massas molares revelaram eficiência ao complexar e ao proteger o DNA contra degradações por DNase I e II, e melhores resultados foram obtidos quando comparados com a poli-L-lisina (Richardson, Kolbe, & Duncan, 1999; Lee, et al., 2001), um polímero muito utilizado nos estudos de vetores não-virais. Além disso, quitosanas com pequenos comprimentos de cadeia têm maior solubilidade em meios fisiológicos, menor viscosidade e formam poliplexos de forma homogênea, com pouca agregação entre complexos, fatores que podem facilitar na aplicação farmacêutica (Hoggard, et al., 2003).

1.4. Objetivos

O trabalho teve como objetivo o preparo e caracterização de quitosanas com diferentes massas molares e com diferentes conteúdos de grupos fosforilcolina, bem como o estudo da interação desses polissacarídeos com DNA. A caracterização das quitosanas modificadas é feita através das técnicas de H-RMN, titulação potenciométrica e cromatografia de permeação em gel. Nos estudos de formação de poliplexos, procura-se avaliar os efeitos da massa molar, composição dos polímeros, razão de cargas, força iônica e pH na força de interação, tamanho e estabilidade das nanopartículas. Para a realização desses estudos, propôs-se a utilização de diferentes técnicas, tais como: fluorescência, eletroforese, espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Várias quitosanas foram utilizadas para a realização do trabalho. Primeiramente, utilizou-se de quitosanas (Wako. Pure Chemical Industries, Ltda.) de diferentes massas molares que foram previamente marcadas com rodamina B isotiocianato (Tabela 1) e sintetizadas pelo nosso grupo. A rodamina B isotiocianato é uma sonda fluorescente muito usada para marcar proteínas. Essa sonda foi ligada covalentemente à quitosana (Figura 4) e sua fluorescência é monitorada para verificar as nanopartículas formadas com DNA em microscópio óptico de fluorescência.

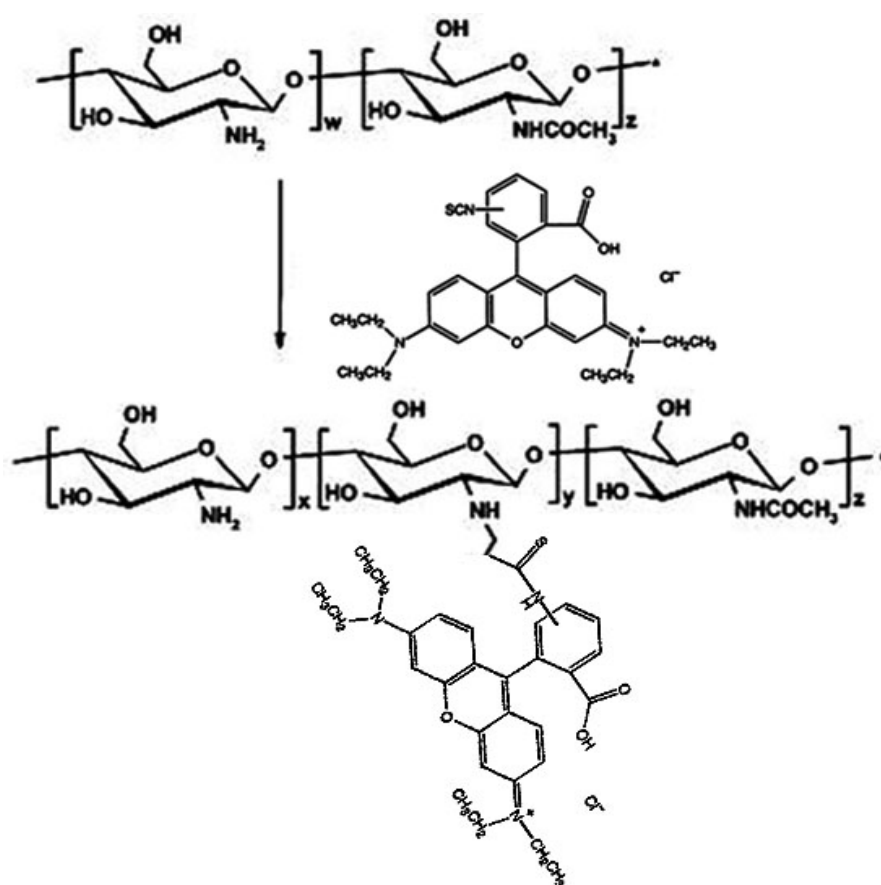


Figura 4. Estrutura de rodamina ligada covalentemente à quitosana.

Tabela 1. Quitosanas desacetiladas de diferentes massas molares marcadas com corante fluorescente rodamina e 98% de desacetilação.

Polímero	Mw (g.mol ⁻¹)	% rodamina
CH 5 kDa	5.38 x10 ³	1,403
CH 10 kDa	9.29 x10 ³	1,043
CH 57 kDa	5.67x10 ⁴	0,830
CH 150 kDa	1.475 x10 ⁵	1,451

Quitosanas de baixa massa molar com alto grau de desacetilação (GD) e substituídas com fosforilcolina (PC) (Tabela 2) foram sintetizadas após processo de desacetilação (Zhang, et al., 2004; Tolaimate, et al., 2000) e degradação (Tømmerraas, et al., 2001) de quitosana comercial (Polymar). Na figura 5, tem-se o esquema da estrutura de quitosana modificada com PC. O preparo de quitosanas com diferentes graus de substituição de PC (GS) foram feitas segundo o procedimento de Tiera et al. (Tiera, et al., 2006). Todas as amostras foram purificadas por diálise após degradação com membranas de diálises de diferentes tamanhos de exclusão (1000 Da, 2000 Da, 3500 Da e 6-8000 Da; Spectra/Por® Dialysis).

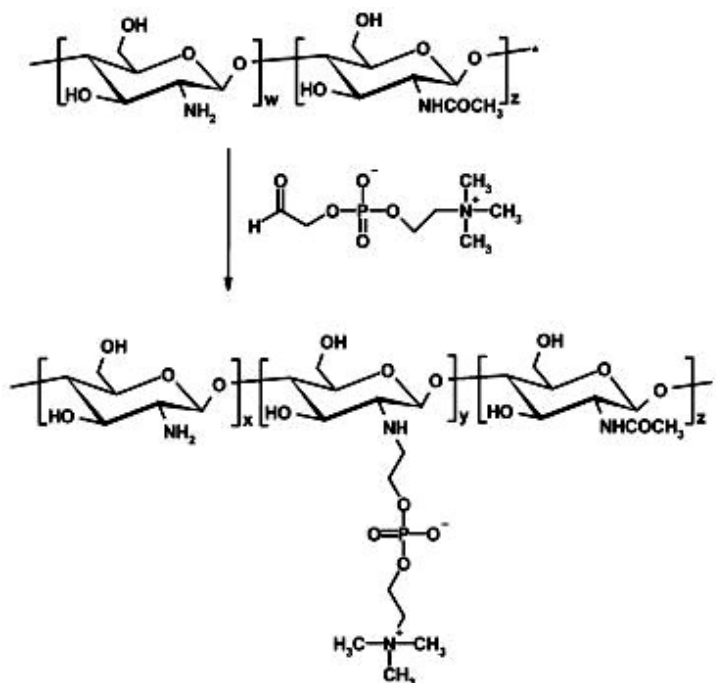


Figura 5. Representação estrutural de quitosana contendo grupo fosforilcolina

Tabela 2. Quitosanas desacetiladas de baixa massa molar e com substituição de grupo PC.

Polímero	GD (%)	GS (%)	Mw (kDa)	Mw/Mn
CH 16 kDa	99,20	—	15,6	1,52
CH 18 kDa	99,20	-	18,4	1,59
CH 29 kDa	97,78	—	29,4	1,56
CHPC26% 29 kDa	—	26,0	-	-
CHPC20% 29 kDa	—	21,6	-	-
CHPC44% 29 kDa	—	44,3	-	-
CHPC47% 29 kDa	—	46,7	-	-

O DNA utilizado foi o de timo de bezerro de 10-15 kpb obtido pela Sigma Aldrich (St Louis, MO), sem tratamento adicional. A razão entre as absorbâncias em 260 nm (A_{260}) e em 280 nm (A_{280}) foi determinada e obteve-se um valor de 1,9, indício de amostra de DNA sem contaminação por proteínas (Vijayanathan, Thomas, Shirahata, & Thomas, 2001).

2.2. Desacetilação da Quitosana

O processo de desacetilação da quitosana foi feito por hidrólise básica (Zhang, et al., 2004; Tolaimate, et al., 2000). Para isso, uma solução de 8 g de quitosana (Polymar) em 400 mL de ácido acético 2% foi adicionada lentamente sobre 200 mL de NaOH (50 % em massa) e mantida sobre intensa agitação, em um balão de fundo redondo. Essa mistura foi, então, aquecida a 100 °C em banho de óleo, mantida sobre agitação magnética e em ambiente de nitrogênio por 90 minutos. Logo após, o conteúdo final do balão foi transferido para 3,5 litros de água destilada mantidos a 80 °C por 20 minutos sob agitação. O precipitado foi lavado com água deionizada até pH neutro e depois isolado por filtração.

O procedimento foi repetido por mais duas vezes para obtenção de elevado grau de desacetilação. Depois de realizado todo esse processo, o polímero foi lavado com acetona, filtrado e seco em estufa a 40 °C por 48 horas.

2.3. *Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana desacetilada*

As medidas de viscosidade foram feitas com viscosímetro tipo Ostwald (Figura 6) em solução tampão de 0,3 M de ácido acético-0,2 M de acetato de sódio. A temperatura foi mantida constante, a 25°C, e o tempo de escoamento de cada solução foi marcado cinco vezes, para obtenção da média dos tempos. O tempo de escoamento do tampão foi de 104,85 segundos (t_0) e da solução polimérica (t) foi medido em diferentes concentrações (c), diluindo-se a solução inicial.

Com os tempos de escoamento, calculou-se a viscosidade específica (η_{sp}) para cada concentração da amostra (Huggins, 1942; Santos, et al., 2003):

$$\eta_{sp} = \frac{t-t_0}{t_0} \quad 2$$

A partir de um gráfico de $\frac{\eta_{sp}}{c} \times c$, pode-se encontrar a viscosidade intrínseca da solução polimérica $[\eta]$, através de equação de Huggins:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + B \times C \quad 3$$

onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca e B é o coeficiente de Huggins (k_H) vezes a viscosidade intrínseca ao quadrado.

A massa molar da quitosana (M) foi calculada pela equação de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K_m \times M^a \quad 4$$

onde $K_m=0,074$ e $a=0,76$ (Brugnerotto, et al., 2001) que dependem dos tipos do polímero, solvente e temperatura.

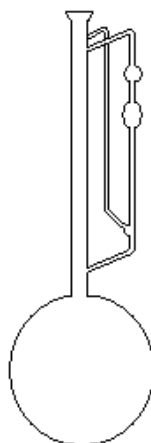


Figura 6. Viscosímetro tipo Ostwald utilizado para a determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana.

2.4. Degradação da quitosana

Quitosanas de baixa massa molar foram obtidas utilizando-se o processo de degradação da quitosana desacetilada, segundo Tommeraas et al. (Tømmeraas, et al., 2001; Tømmeraas, et al., 2002) (Figura 7). No presente trabalho, foram realizadas duas degradações.

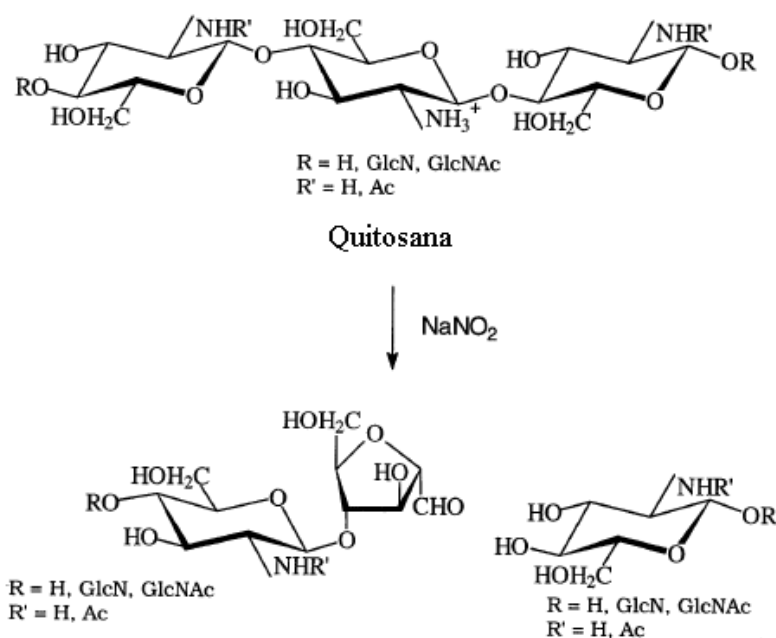


Figura 7. Esquema de reação com nitrito de sódio para obtenção de quitosanas de baixas massas molares contendo 2,5-anidro-D-manose (Adaptado de Tommeraas et al., 2001).

Primeiramente, dissolveu-se 3 gramas de quitosana em 180 mL de solução de ácido acético 2%. O oxigênio foi removido da solução, injetando-se nitrogênio durante 1h, e, em seguida, a solução foi resfriada à temperatura de 4 °C. Utilizando-se uma seringa, adicionou-se 12 mL de uma solução contendo 48 mg de NaNO₂ à solução de quitosana, e a reação foi mantida em repouso na geladeira durante 24 horas.

Após a reação, o polímero foi purificado por meio de diálise, com membrana de 12000 Da de exclusão, contra NaOH 0,05 M durante 24 horas e, em seguida, contra água destilada por 5 dias (trocando-se a água 2 vezes ao dia). O produto da diálise foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado congelado para liofilização (SNL108B - Novalyphe® Freeze Drying System – Thermo - Electron Corporation) por 48 horas, aproximadamente.

Para diminuir a polidispersividade da amostra, realizou-se diálise em meio de ácido acético 0,05 M por 24 horas em membrana de 1000 Da de exclusão. A fração de baixa massa molar que saiu dessa membrana de diálise foi precipitada com NaOH, deixou-se decantar a amostra e a água foi trocada por sifonação várias vezes, até a neutralização do pH. O precipitado foi centrifugado e liofilizado. A fração de quitosana que ficou retida dentro da membrana de diálise foi colocada em diálise contra NaOH 0,05 M durante 24 horas e, logo após, contra água destilada por 5 dias (trocando-se a água 2 vezes ao dia).

Com o objetivo de se obter massas molares diferentes, seguindo o mesmo procedimento descrito acima, a segunda degradação foi feita com menos nitrito de sódio, 38 mg. Para diminuir a polidispersividade, fizeram-se várias diálises em diferentes membranas de diálise (2000 Da, 3500 Da e 6-8000 Da de exclusão), contra ácido acético, NaOH e água, como descrito anteriormente.

2.5. *Preparação de fosforilcolina gliceraldeído*

A obtenção dos derivados de quitosana com grupos fosforilcolina depende da presença de grupo aldeído para a formação de base de Schiff com os grupos amina de quitosana. O intermediário contendo o grupo fosforilcolina foi preparado pela oxidação de sn-glicero-3-fosfocolina com periodato de sódio para a formação de grupo aldeído (Liberda, et al., 1999).

Uma solução de 100 mL de sn-glicero-3-fosfocolina (0,07 g/mL) foi resfriada em banho de gelo e, mantendo-a sob agitação, gotejou-se 50 mL de solução de periodato de sódio (47,8 mmol). A solução resultante foi deixada sob agitação por 5 horas. O produto da reação foi congelado e, em seguida, passou por processo de liofilização. O sólido resultante desse processo foi disperso em 100 mL de metanol e o sólido insolúvel no solvente foi retirado através de filtração. O metanol foi removido da solução por destilação a pressão reduzida em rotaevaporador por 90 minutos à temperatura de 30 °C.

O produto do rotaevaporador continha 5,6 g de PC. Adicionou-se 15 mL de metanol e 8 mL de água, resultando em 25,6 mL de solução. Sendo assim, obteve-se uma solução estoque de fosforilcolina gliceraldeído de 1,037 M.

2.6. *Preparo e Caracterização das quitosanas contendo grupos fosforilcolina*

A preparação de quitosanas de baixa massa molar contendo grupos fosforilcolina foi realizada a partir do procedimento descrito por Tiera et al. (Tiera, et al., 2006). Uma massa de 0,5 g de quitosana foi solubilizada em 20 mL de solução aquosa de ácido acético (2% em massa) e a temperatura foi ajustada para 0 °C. A solução de PC em metanol (10 mL) foi gotejada sobre a solução de quitosana, sob agitação vigorosa, e mantida sob agitação por 30 minutos. Logo após, o pH da mistura foi ajustado para 6,5 com solução diluída de NaOH e mantida à temperatura ambiente por 1 hora, sob agitação magnética.

A solução foi novamente resfriada a 0 °C e uma solução de cianoborohidreto de sódio (8 mmol) em 10 mL de água foi adicionada sob agitação à solução inicial. Depois, a reação foi mantida a temperatura ambiente por 20 horas sob agitação. O produto da reação foi dialisado, em membrana apropriada, contra água por dois dias, NaOH 0,01 M por 1 dia e novamente contra água por dois dias, trocando a água três vezes ao dia. Após a diálise, a solução final foi congelada e liofilizada.

No presente trabalho, foram preparadas quatro quitosanas com diferentes porcentagens de grupos fosforilcolina 20% e 50%, aproximadamente. Para cada caso, utilizaram-se quantidades adequadas de PC na reação. A caracterização das quitosanas modificadas foi feita através de H-RMN e titulação potenciométrica.

2.7. Determinação do grau de desacetilação (GD) e do grau de substituição (GS) utilizando-se H-RMN

As medidas de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (H-RMN) foram realizadas em um instrumento da Bruker de 400 MHz na USP de Ribeirão Preto/SP. Para isso, preparou-se uma solução de 20 mg de quitosana em 1 mL de D₂O (Deuterium oxide) e 10 µL de DCl (Deuterium chloride). Os espectros de H-RMN foram obtidos a 70 °C e os graus de desacetilação (GD) e de substituição (GS) (em porcentagem) foram calculados utilizando-se as áreas dos sinais referentes ao CH₃ (I_{CH3}) do monômero acetilado e aos hidrogênios anoméricos H₁ (I_{H1}) e H_{1s}(I_{H1s}) (Figura 7), e as equações 4 e 5 (Tiera, et al., 2006; Tolaimate, et al., 2000). Os valores das áreas, I_{H1}, I_{H1s} e I_{CH3}, foram obtidos através do software Spinworks-3.

$$GS = \frac{I_{H_{1s}}}{I_{H_1} + I_{H_{1s}}} \times 100\% \quad 4$$

$$GD = 100\% - \frac{I_{CH_3}}{3I_{H_1}} \times 100\% \quad 5$$

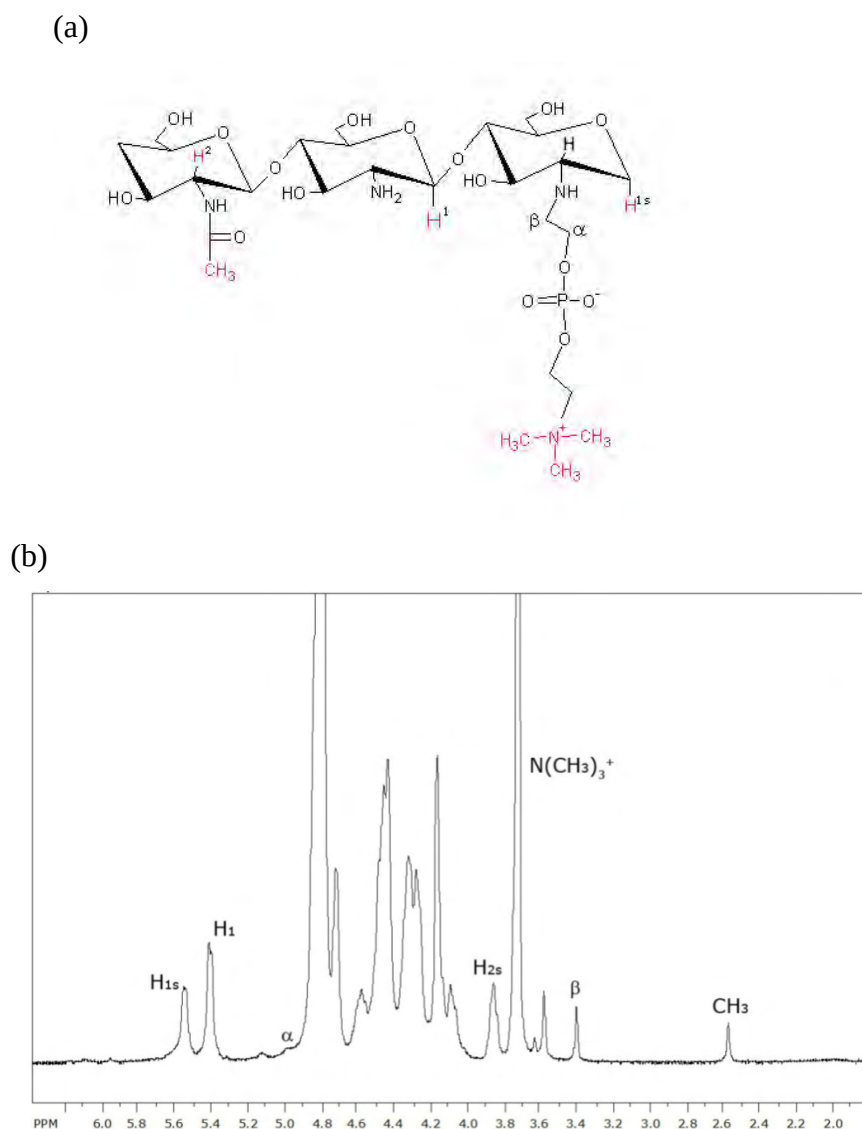


Figura 8. (a) Estrutura dos derivados de quitosana-fosforilcolina: Hidrogênio utilizados na determinação do grau de acetilação e substituição (vermelho). (b) Espectro de H-RMN representativo de quitosana-fosforilcolina (Tiera, et al., 2006).

2.8. Determinação do grau de substituição (GS) utilizando-se potenciometria.

Um dos métodos de caracterização das quitosanas modificadas é o de potenciometria (Tolaimate, et al., 2000). O grau de substituição dos grupos amina substituídos, para todos os derivados substituídos com PC, foi determinado utilizando-se o mesmo procedimento geral descrito abaixo.

Uma determinada massa de quitosana-PC (~40 mg) foi solubilizada em 10 mL de HCl 0,1 M, que corresponde a um excesso em relação ao número de mols de monômeros de quitosana, para que houvesse total protonação dos grupos amina do polímero. Essa solução foi titulada com NaOH 0,1 M, previamente padronizado, registrando-se o pH para cada alíquota de NaOH adicionada. A titulação, exibe dois aumentos bruscos no pH, o primeiro devido à neutralização de H^+ em excesso no meio e o segundo devido à total desprotonação dos grupos amina de quitosana. Sendo assim, o número de mols de NaOH utilizado para a desprotonação dos grupos amina é igual ao número de mols de monômeros desacetilados ($MM_{Des} = 161,22 \text{ g.mol}^{-1}$, massa molar dos monômeros desacetilados). A diferença entre a massa utilizada na titulação e aquela determinada pela titulação potenciométrica é utilizada para calcular o número de mols de monômeros protonáveis. Nessa determinação, utilizou-se a informação prévia do grau de desacetilação das quitosanas de partida determinado por RMN (~98-99%). Desta forma, o número de mols de monômeros acetilados foi desconsiderado para efeito dos cálculos. Sabendo-se a massa utilizada na titulação, encontra-se o número de mols de monômeros com fosforilcolina ($MM_{PC} = 211 \text{ g.mol}^{-1}$, massa molar do grupo fosforilcolina). Dessa forma, teremos que o grau de substituição será:

$$GS = \left(\frac{n_{PC}}{n_d} \right) \times 100\% \quad 6$$

onde n_{pc} é o número de mols de monômeros com grupo fosforilcolina e n_d é o número de mols de monômeros desacetilados.

2.9. Ensaio com Brometo de Etídeo (EtBr)

Um dos métodos utilizados para a análise da interação entre quitosana e DNA de timo de bezerro (ctDNA) foi a supressão de fluorescência do fluoróforo EtBr (Figura 9). O EtBr é uma sonda catiônica que emite fluorescência quando intercalada entre as bases da cadeia de DNA. A interação de quitosana com ctDNA desloca as moléculas de EtBr e a fluorescência decresce devido a sua transferência para o meio aquoso (Figura 10).

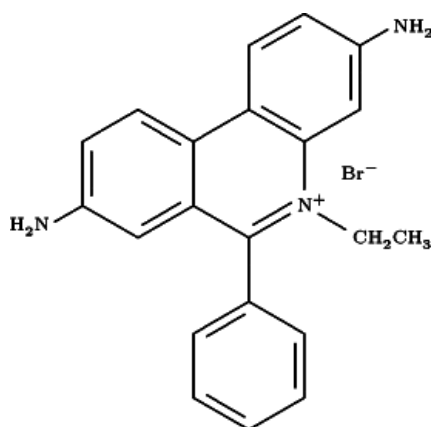


Figura 9. Representação da estrutura da molécula de EtBr.

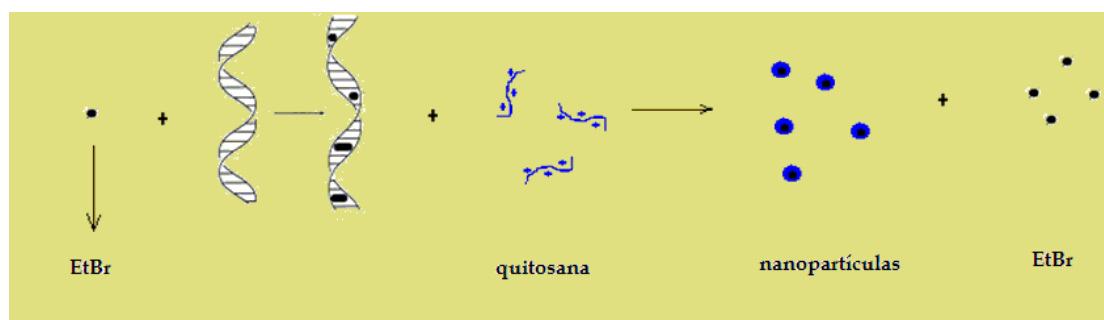


Figura 10. Representação do deslocamento do EtBr para o meio aquoso devido à formação de partículas entre DNA e quitosana.

Os comprimentos de onda utilizados na realização desse experimento foram de 560 nm de excitação e 605 nm de emissão. Para esse estudo, prepararam-se soluções de ctDNA a 16 μM com EtBr a 4 μM em tampão de pH e força iônica desejados. Essas soluções foram deixadas em repouso por 24 horas e logo após foram tituladas com alíquotas de quitosana a 0,64 mM preparadas no mesmo tampão. Nos experimentos em pHs mais elevados, 7,0, 7,4 e 8, as soluções de quitosana foram mantidas em tampão fosfato 5 mM, pH 6,2 e 10 mM de força iônica, devido ao problema de solubilidade das quitosanas desacetiladas nesses pHs.

Os resultados desse estudo estão apresentados como porcentagem de fluorescência relativa em função da razão de grupos amina de quitosana (N) e grupos fosfato de DNA (P) (N/P). Utilizou-se o fluorímetro Hitachi F4500 a 25°C, mantido em um banho termostatzado. As medidas foram feitas com três acumulações e repetidas com preparo de novas soluções. A concentração de ctDNA foi determinada pela absorção no UV em 260 nm com o espectrofotômetro UV-visível Cary modelo 100Bio, utilizando-se a relação 1A (unidade de absorbância) = 50 mg/mL = 0,146 mM de grupos fosfato (Felgner, et al., 1997).

2.10. Microscopia ótica de fluorescência

Soluções preparadas de ctDNA e quitosana marcada com rodamina na razão N/P 5, tampão acetato pH 4,0, tampão fosfato pH 6,2, e forças iônicas de 10, 150 e 500 mM foram analisadas em microscópio óptico no Laboratório de Microscopia e Microanálise, em colaboração com o Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga do Departamento de Biologia (Ibilce-UNESP), para a verificação das partículas formadas. As fotomicrografias foram tiradas após 1 hora do preparo das partículas.

2.11. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e determinação do Potencial Zeta

Para análise do tamanho das partículas, utilizou-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico com o aparelho Zetasizer nano-ZS90, laser de 633 nm e ângulo de espalhamento de 90°, do Laboratório de polímeros (Ibilce-UNESP) em colaboração com o Prof. Dr. João Ruggiero Neto. As nanopartículas de quitosana/DNA foram preparadas em diferentes razões de N/P (0,5, 1, 2, 3, 5, 7 e 10) em tampão acetato 10 mM a pH 4,0 e força iônica 10 mM, por meio da titulação da solução de ctDNA (70 µM) com as soluções das diferentes quitosanas. As medidas foram feitas com três acumulações e repetidas com preparo de novas soluções. As mesmas soluções foram utilizadas nas medidas de potencial zeta, realizadas somente com a quitosana CH 29 kDa.

Medidas de tamanho em função do tempo foram feitas com políplexos formados entre ctDNA (25 µM) e as quitosanas CH 5 kDa, CH 16 kDa, CH 29 kDa, CH 150 kDa e CHPC22% 29 kDa em diferentes razões de N/P (3, 5, 7 e 10) e tampão fosfato 5 mM a pH 6,2 e força iônica 10 mM. Também se verificaram o tamanho dos políplexos em função do tempo em diferentes forças iônicas (10, 150 e 500 mM) na razão de N/P 7.

2.12. *Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)*

Preparou-se soluções de ctDNA com quitosana em tampão acetato 10 mM, pH 4,0 e força iônica de 10 mM na razão N/P 5, e em tampão fosfato 5 mM, pH 6,2 em diferentes forças iônicas (10, 150 e 500 mM) na razão N/P 10, onde a concentração de DNA foi de 8 μ M. Essas soluções ficaram em repouso por 4 horas e, então, uma gota foi colocada sobre uma grade de cobre de 200 mesh (FCF200-Cu, Formvar/Carbon film, Cu, 200 Mesh; E.M.S.: Electron Microscopy Sciences) e deixada em repouso por 20 minutos. Retirou-se o excesso de solução e adicionou-se uma gota de acetato de uranila (marcador para contraste no TEM) sobre a grade, e deixou-se, novamente, em repouso por 30 minutos. O excesso de acetato de uranila foi retirado, e deixou-se a grade secar por 10 minutos. As medidas de microscopia foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Microanálise com a colaboração da Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga do Departamento de Biologia-IBILCE-UNESP, utilizando-se um microscópio Zeiss EM-906.

Capítulo 3

Resultados e Discussões

3.1. Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana desacetilada

A massa molar viscosimétrica média da quitosana desacetilada foi calculada a partir dos tempos de escoamento da amostra em diferentes concentrações (C) pelo viscosímetro de Ostwald. Os tempos de escoamento foram utilizados na elaboração do gráfico de η_{sp}/C em função de C (Figura 11) e obteve-se as constantes $[\eta] = 190,067$ e $B = 37379,4$ da equação 3, onde o valor do coeficiente de correlação da reta foi de 0,98. Com isso, utilizando-se a equação 4, a massa molar viscosimétrica média da quitosana desacetilada foi de 30,65 kDa.

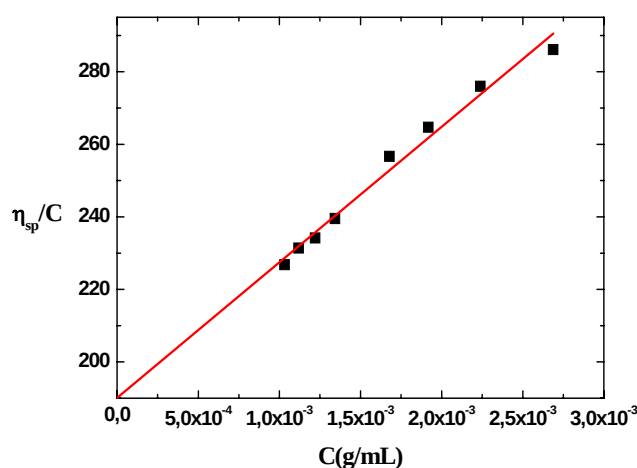


Figura 11. Gráfico de viscosidade reduzida em função da concentração de quitosana em tampão acetato pH 4,5, para cálculo da massa molar viscosimétrica média.

3.2. Caracterização das quitosanas modificadas

A caracterização das quitosanas preparadas foi feita por titulação potenciométrica (Figuras 12 a 15) e H-RMN (Figura 16). Os resultados dos graus de desacetilação e de substituição de fosforilcolina estão organizados na tabela 3. Os volumes de NaOH, concentração de $0,0994 \text{ mol.L}^{-1}$, necessários para desprotonar os grupos amino de quitosana das curvas de titulação foram utilizados juntamente com a equação 6 da seção 3.8 para a realização dos cálculos. Nessa tabela, estão também apresentados os resultados utilizando os espectros de H-RMN, pelas equações da seção 3.7.

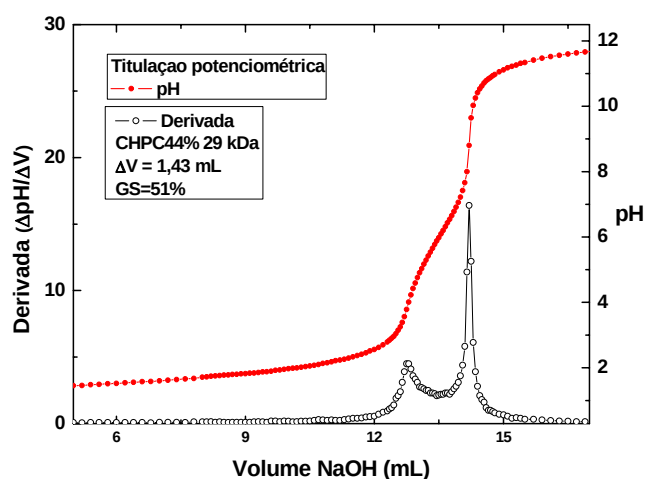


Figura 12. Titulação Potenciométrica da CHPC44% 29 kDa, para determinação do grau de substituição.

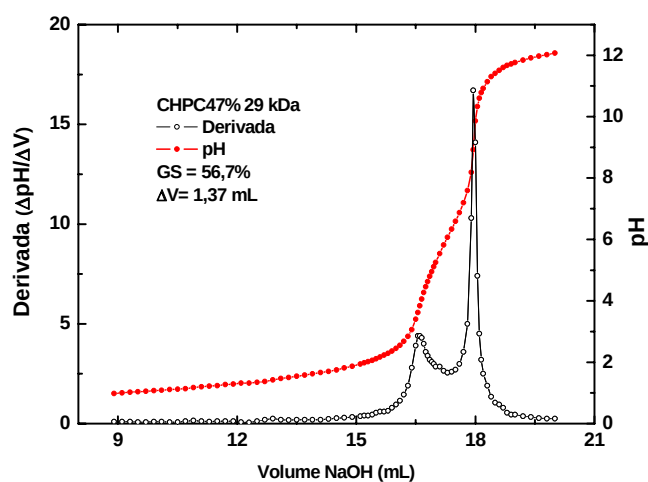


Figura 13. Titulação Potenciométrica da CHPC47% 29 kDa, para determinação do grau de substituição.

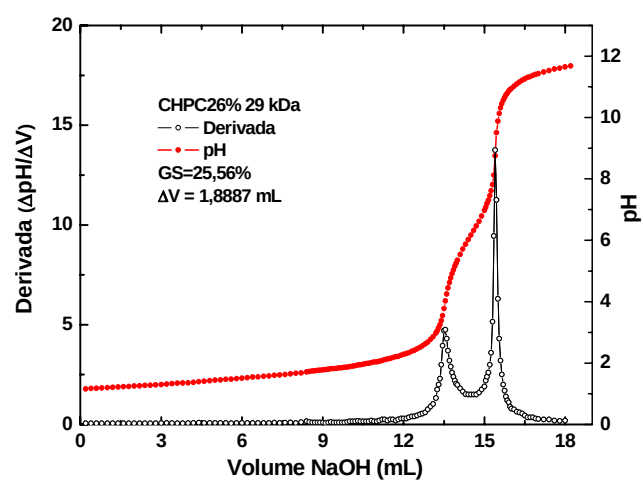


Figura 14. Titulação Potenciométrica da CHPC26% 29 kDa, para determinação do grau de substituição.

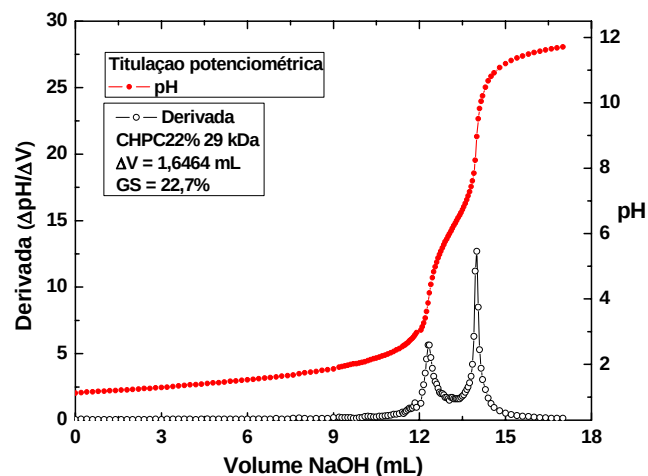


Figura 15. Titulação Potenciométrica da CHPC22% 29 kDa, para determinação do grau de substituição.

A Figura 16 mostra claramente os picos característicos do grupo fosforilcolina. O pico mais proeminente aparece em 3,7 ppm e corresponde aos Hidrogênio dos grupos metilas do trimetilamônio. O pico correspondente ao próton anomérico observado em 5,5 ppm para as quitosanas desacetiladas, aparece como dupletes nos espectros das quitosanas substituídas com PC, o que comprova a reação de substituição. Outra característica que deve ser ressaltada é que somente os picos característicos da quitosana aparecem no espectro, o que indica um alto grau de pureza.

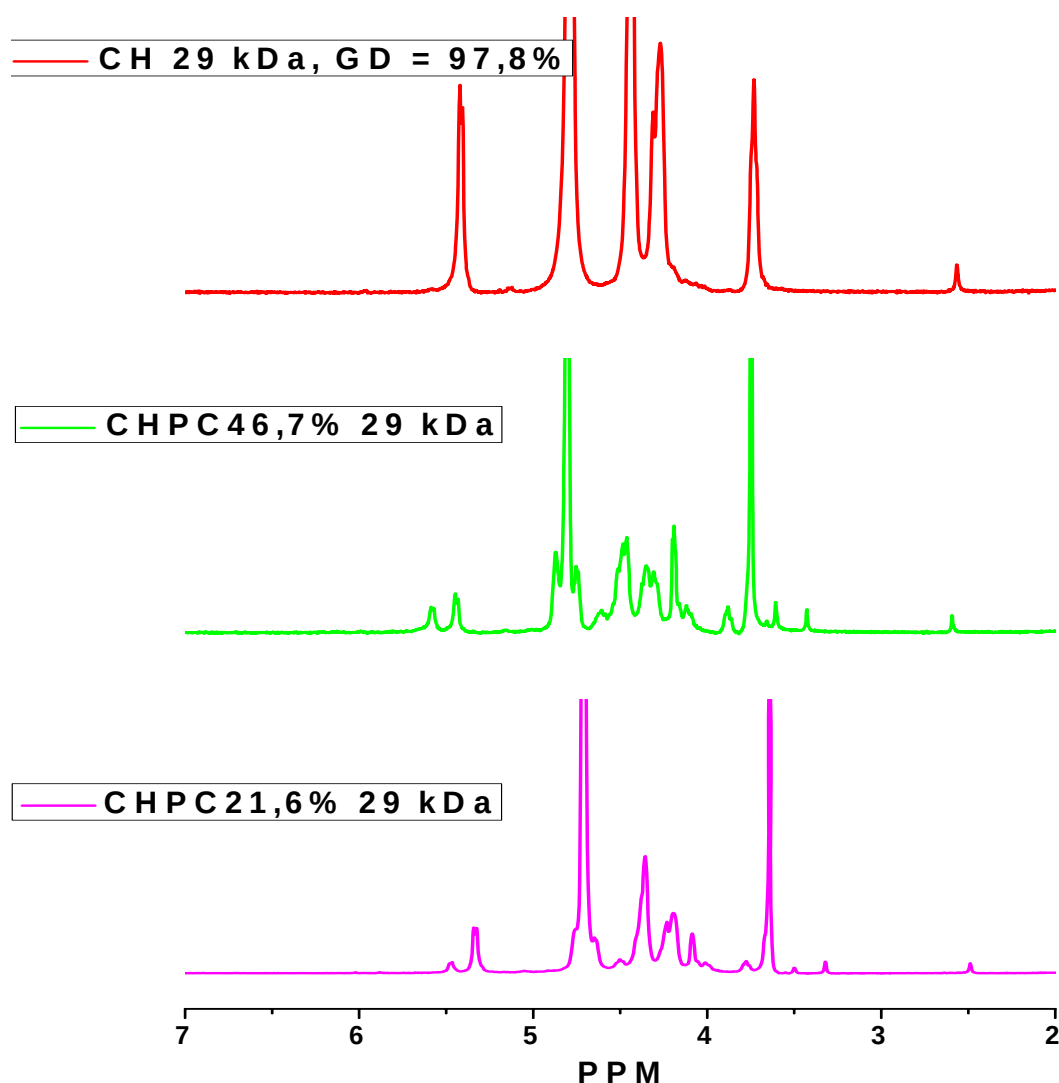


Figura 16. Espectros de H-RMN das quitosanas CH 29 kDa, CHPC 22% 29 kDa e CHPC47% 29 kDa.

Comparando-se os graus de substituição obtidos pelos dois métodos (Tabela 3), nota-se que há discrepância nos valores encontrados para altos graus de substituição. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que as quitosanas mais substituídas são mais hidrofílicas que as quitosanas desacetiladas e com baixo GS, o que torna difícil a secagem completa dessas quitosanas.

A caracterização utilizando-se as integrações e as equações exibidas no item 3.7 tem sido amplamente utilizadas na determinação do grau de desacetilação e de substituição (Tolaimate, et al., 2000; Santos, et al., 2003). Portanto, os graus de

substituição determinados por H-RMN foram utilizados para os cálculos das razões N/P para todos os demais experimentos.

Tabela 3. Graus de desacetilação e de substituição determinados a partir dos métodos de potenciometria e H-RMN.

Quitosana	GS (%)		GD (%)
	Método		
	Potenciometria	H-RMN	H-RMN
CH 29 kDa*	-	-	97,8
CH 16 kDa	-	-	99,2
CHPC22% 29 kDa	22,7	21,6	-
CHPC26% 29 kDa	28,5	26,0	
CHPC44% 29 kDa	55,0	44,0	
CHPC47% 29 kDa	56,7	46,7	-

*Quitosana desacetilada de partida para formação das quitosanas CHPC .

3.3. Ensaio de Fluorescência com Brometo de Etídeo (EtBr)

Estudos de eficiência para a formação de poliplexos, variando-se as condições experimentais, tais como pH, força iônica e razão de cargas, foram feitos utilizando-se o ensaio com EtBr. Nas figuras 17 a 25 são apresentados os resultados desses estudos. Para todas as amostras utilizadas o comportamento é similar, ou seja, com a adição de quitosana a fluorescência de EtBr diminui, devido ao seu deslocamento para o meio aquoso. Entretanto, a eficiência se mostra dependente tanto da massa molar, quanto da composição da quitosana. Para a quitosana de 57 kDa, a fluorescência decresce rapidamente e atinge um mínimo para razão N/P próximo de 1,0 com um mínimo de fluorescência de 20% em pH 4,0. Para as demais quitosanas, o decréscimo da fluorescência é mais suave e atinge o mínimo de fluorescência (~25%) somente para razões N/P (~2,0) maiores (Figura 17). Um efeito similar é observado com o aumento do pH para 7,0, o qual diminui a força de interação entre DNA e as quitosanas utilizadas (Figura 18).

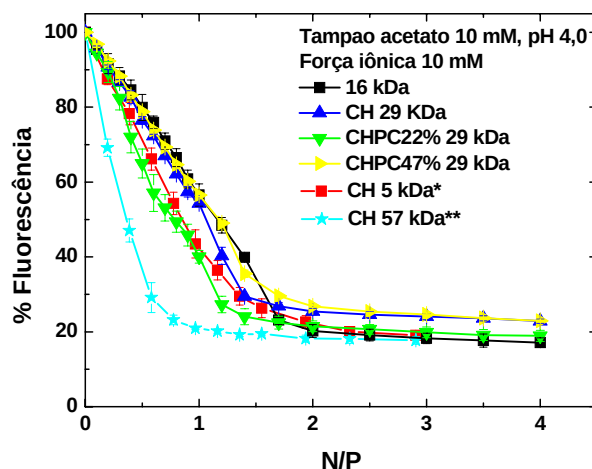


Figura 17. Titulação do complexo DNA-EtBr por quitosanas desacetiladas e quitosanas com grupos PC em pH 4,0, força iônica 10mM a 25°C.

* e ** quitosanas desacetiladas da Tabela 1, sem rodamina.

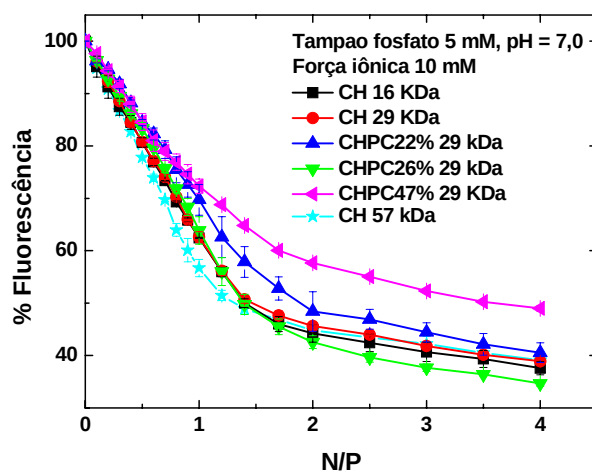


Figura 18. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por quitosanas desacetiladas e quitosanas com grupos PC em pH 7,0, força iônica 10mM a 25°C.

Em pH 7,0, a interação entre os polieletrólitos é mais fraca devido ao baixo grau de ionização dos policátions, e, nesse pH, o máximo de supressão de fluorescência fica em torno de 40% para as quitosanas desacetiladas e, em torno de 50 %, para quitosana com grau de substituição 47%, como mostra a Figura 18. A quitosana com grau de substituição (GS) de 26% foi a que apresentou a maior supressão de fluorescência de EtBr, ligeiramente menor que 40% e muito próximo das quitosanas desacetiladas. Esse

comportamento é uma indicação de que quitosanas com graus de substituição moderados (20-25%) são bons candidatos para a formação de partículas com o ctDNA no pH neutro, já que complexos preparados com as quitosanas não modificadas podem agregar em pHs acima de 6,2. O efeito do pH na eficiência da interação pode também ser notado nas figuras 19 e 20, onde são apresentados os gráficos comparativos da quitosana desacetilada CH 29 kDa com a quitosana substituída com fosforilcolina (CHPC44% 29 kDa).

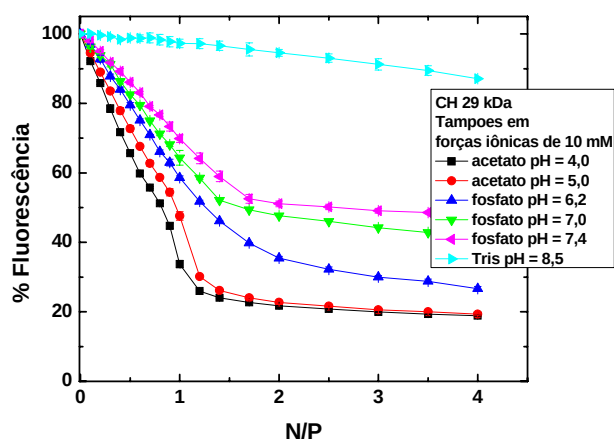


Figura 19. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CH 29 kDa em diferentes pHs, força iônica 10mM e a 25⁰C.

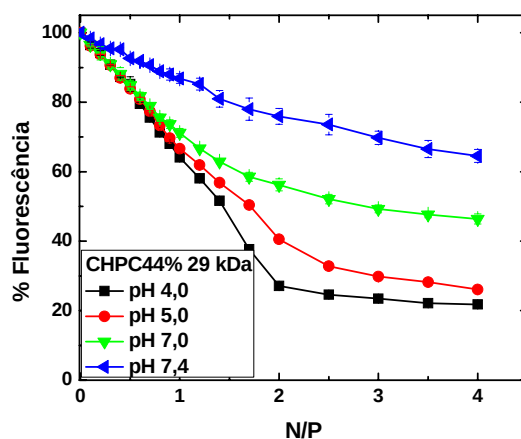


Figura 20. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CHPC44% 29 kDa em diferentes pHs, força iônica 10mM e a 25⁰C.

O decréscimo na fluorescência de EtBr se torna menos expressivo com o aumento do pH. Isso indica que a formação de partículas de quitosana/ctDNA é devida, principalmente, à interação eletrostática, já que o grau de ionização da quitosana varia de 1,0, em pH 4,0, e 0,5, em pH 6,2 (Ikeda, et al., 1995).

Em pHs elevados, 7,0, 7,4 e 8,5, não se esperava a interação entre os polieletrólitos, principalmente para as quitosanas desacetiladas. Isso porque nesses pHs, o grau de ionização é próximo de zero para essas quitosanas (Ikeda, et al., 1995). Portanto, a supressão de fluorescência nos pHs 7,0 e 7,4, e, conseqüentemente, a interação entre os polieletrólitos, indica um possível aumento no pKa dos grupos amino de quitosana na presença de um poliânion forte, DNA, como já evidenciado com outros polímeros (Zelikin, et al., 2003).

O efeito da força iônica pode ser verificado a partir da Figura 21 à 25. Para todas as quitosanas, a interação entre os polieletrólitos diminui com o aumento da força iônica devido à blindagem de cargas. Em pH 7,0, a interação entre ctDNA e CH 29 kDa parece da mesma ordem quando comparadas as forças iônicas de 10 mM e 150 mM. Entretanto, para as quitosanas com PC a interação é desfavorecida mesmo na força iônica de 150 mM, que é a força iônica mais próxima do meio fisiológico.

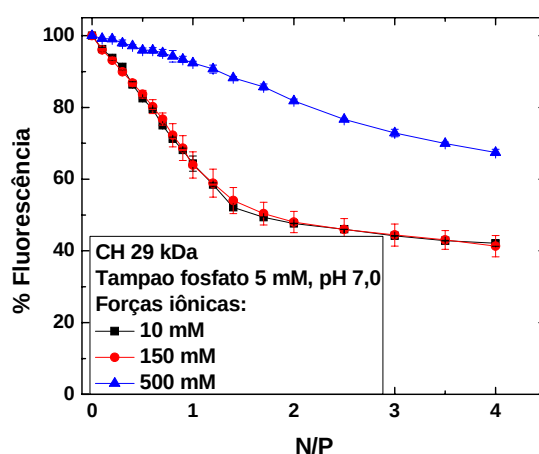


Figura 21. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CH 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 7,0 e a 25°C.

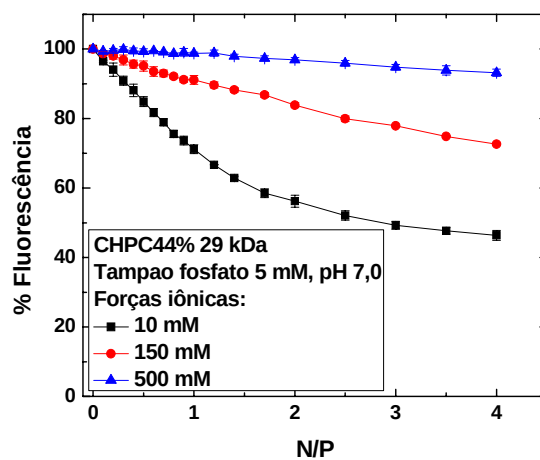


Figura 22. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CHPC44% 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 7,0 e a 25⁰C.

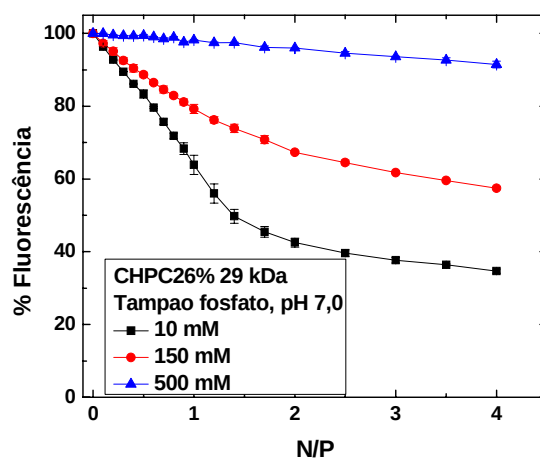


Figura 23. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CHPC26% 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 7,0 e a 25⁰C.

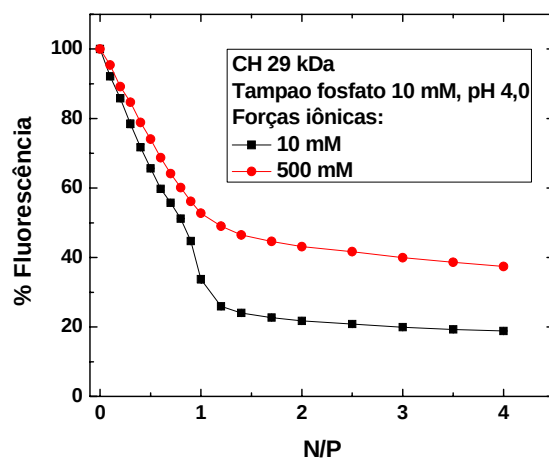


Figura 24. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CH 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 4,0 e a 25⁰C.

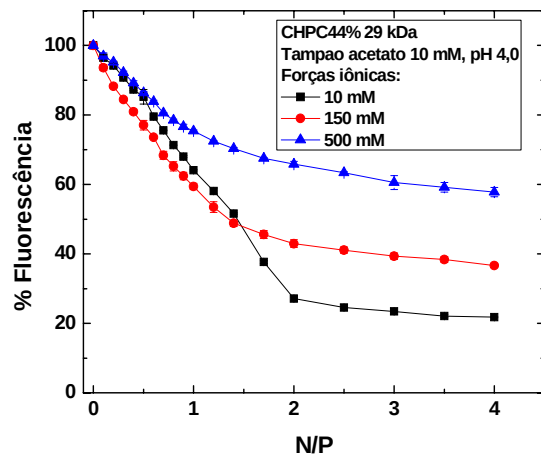


Figura 25. Titulação do complexo ctDNA-EtBr por CHPC44% 29 kDa em diferentes forças iônicas, pH 4,0 e a 25⁰C.

3.4. Estudo da influência da força iônica e da massa molar na interação entre quitosana e DNA.

As Figuras 26 a, b e c mostram os experimentos de fluorescência de EtBr em presença de quatro quitosanas com diferentes massas molares. Em pH 4,0, a eficiência para o deslocamento de EtBr aumenta com a massa molar de quitosana, indicando um aumento da cooperatividade na interação com DNA nas baixas razões N/P (Figura 26a). Neste pH, fica claro que, para as quitosanas de 5 e 10 kDa, maiores razões N/P (2,0-3,0) são necessárias para atingir o mínimo de fluorescência, o qual estabiliza por volta de 25%. Em pH 6,2, o grau de ionização para a quitosana é de 0,5, tornando a dissolução de quitosanas de alta massa molar (CH 150 kDa) mais demorada e suas soluções são mais propensas à agregação, resultando numa menor eficiência no deslocamento de EtBr do ctDNA quando comparado com a CH 57 kDa (Figura 26b). Nesse grau de ionização, o mínimo de fluorescência é atingido para valores N/P próximos a 2,0, o que confirma a natureza predominantemente eletrostática da interação. Com o aumento da força iônica, verifica-se menor eficiência no deslocamento de EtBr indicando decréscimo na interação entre CH 150 kDa e DNA, devido à blindagem de cargas (Figuras 26c).

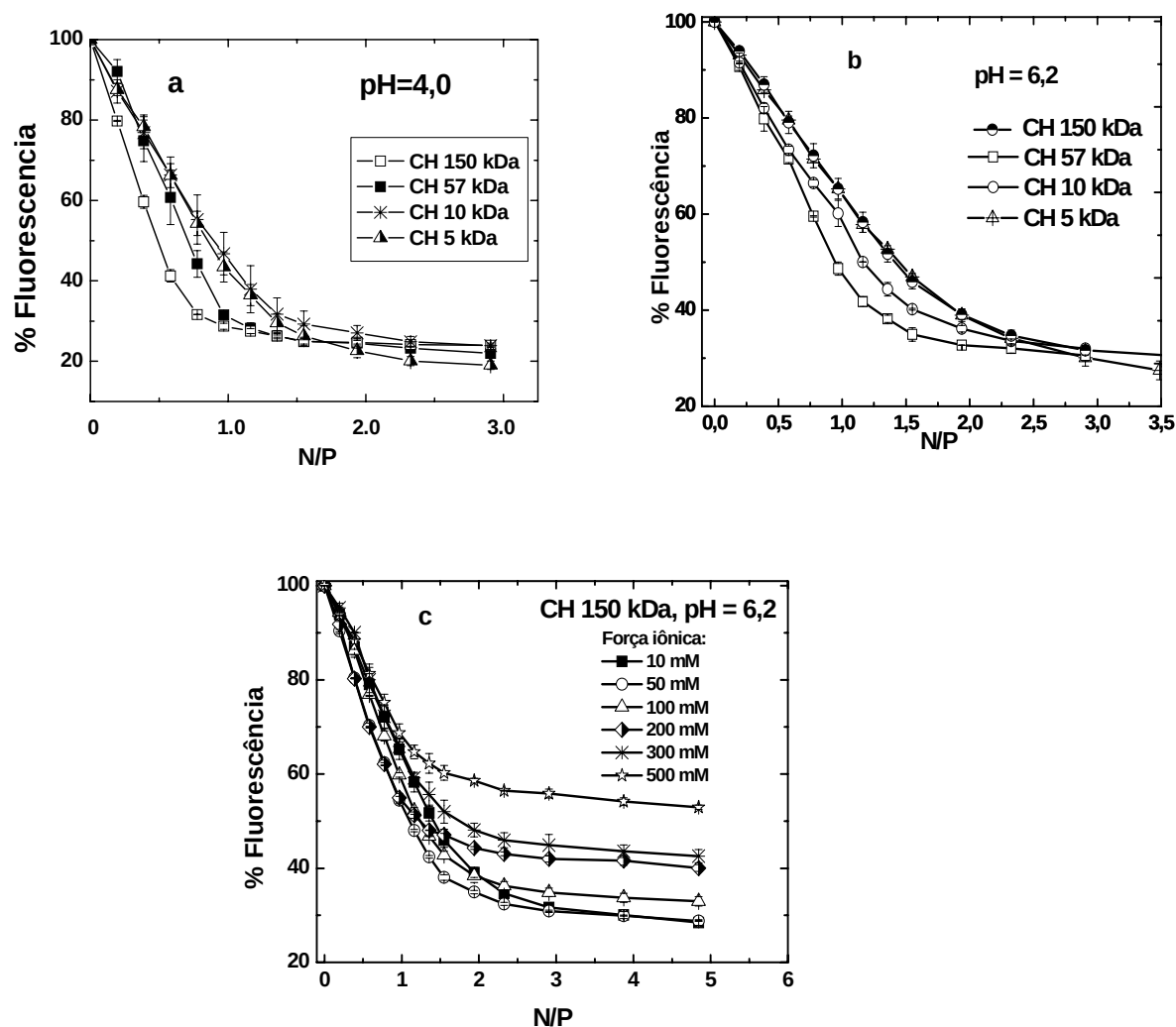


Figura 26. Titulação do complexo DNA-EtBr por (a) quitosanas desacetiladas em pH 4,0, (b) quitosanas desacetiladas em pH 6,2 e força iônica 10mM a 25⁰C e (c) CH 150 kDa em pH 6,2 em diferentes forças iônicas.

3.5. *Microscopia Óptica*

Em geral, quando o pH e força iônica são baixos, as nanopartículas se apresentam, principalmente, como pontos luminosos menores que 1 micrômetro, independente da massa molar. Em pH 4,0, nota-se que, para baixa força iônica (10 mM), as fotomicrografias são similares para as duas quitosanas testadas (5 e 150 kDa), predominando pontos luminosos pequenos (Figura 27 (a) e (b)). Entretanto, o aumento na força iônica para 150 e 500 mM induz uma agregação significativa das partículas preparadas com quitosana 5 kDa, e os tamanhos aumentam para valores próximos a 5 micrometros (Figura 27 (c) e (e)).

O mesmo se verifica em pH 6,2 para CH 5 kDa, Figura 28, mas nesse pH o aumento do tamanho ocorre com maior intensidade devido ao baixo grau de ionização do polycation e à diminuição das cargas na superfície dos poliplexos. Nessa condição as partículas tornam-se mais hidrofóbicas e, portanto, propensas a agregação. Entretanto, para CH 150 kDa, nota-se uma maior uniformidade nos tamanhos das partículas, e as dimensões permanecem inferiores a 1 micrometro nas duas forças iônicas (10, 150). Em 500 mM, as nanopartículas maiores da ordem de 2 micrometros podem ser observadas ainda que em menor proporção.

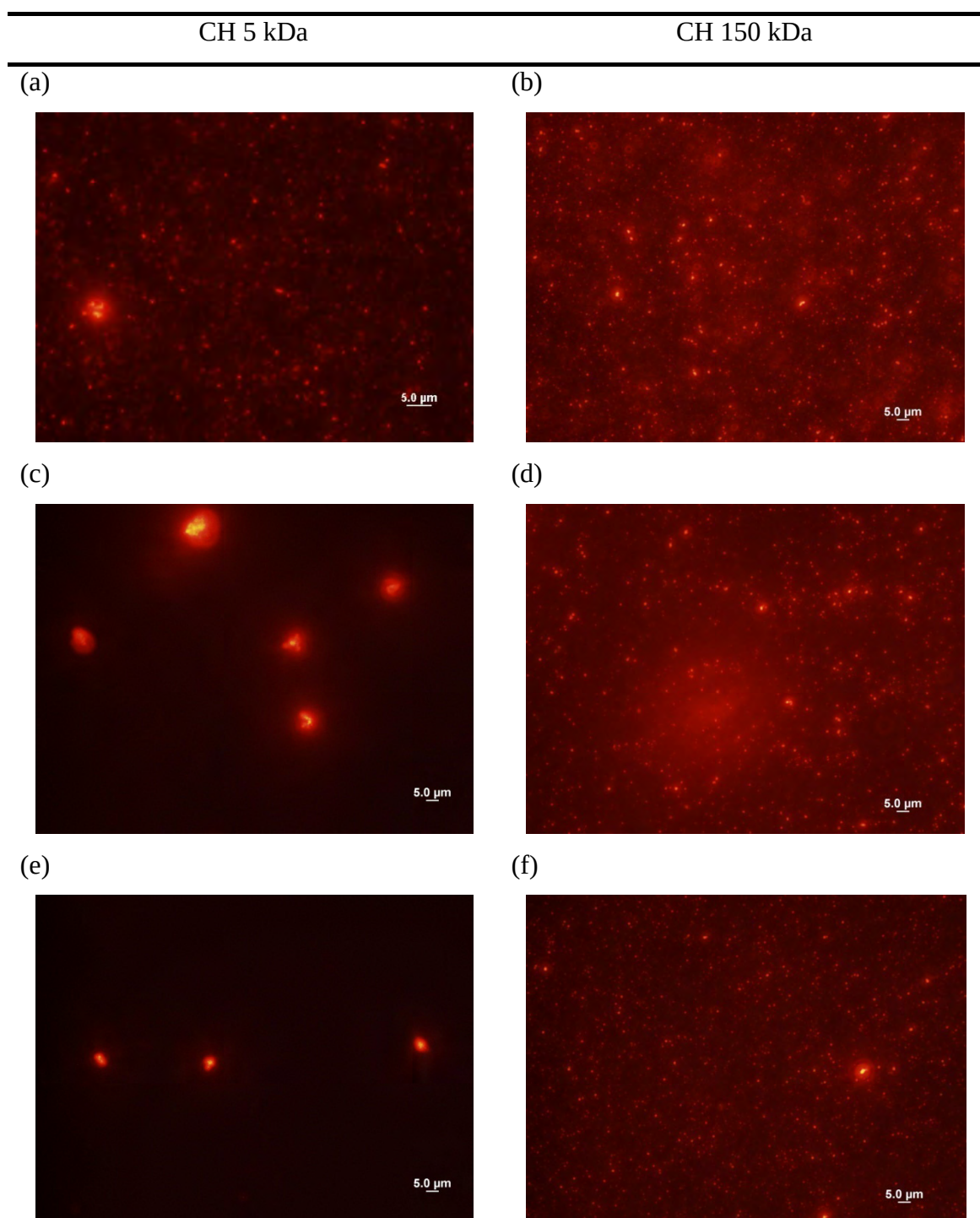


Figura 27. Fotomicrografias de partículas de quitosana-rodamina/DNA em Tampão acetato 10 mM, pH 4,0; Força iônica 10 mM, razão N/P 5: Figuras (a) e (b); Força iônica 150 mM: Figuras (c) e (d) e Força iônica 500 mM: Figuras (e) e (f).

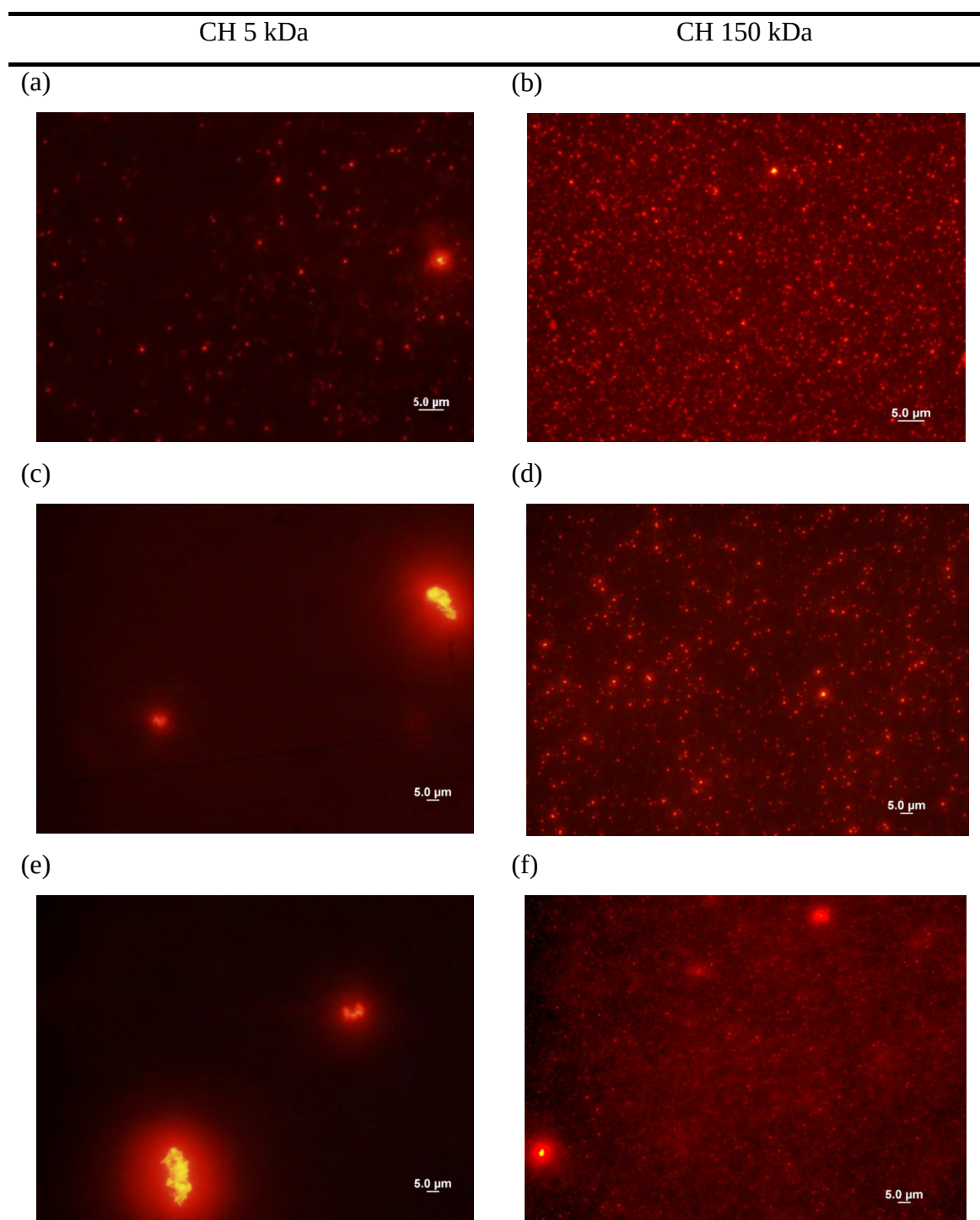


Figura 28. Fotomicrografias de partículas de quitosana-rodamina/DNA em Tampão acetato 5 mM, pH 6,2; Força iônica 10 mM, razão N/P 5: Figuras (a) e (b); Força iônica 150 mM: Figuras (c) e (d) e Força iônica 500 mM: Figuras (e) e (f).

O comportamento das nanopartículas preparadas com quitosana 150 kDa pode ser explicado com base na diferença de força de interação com DNA e pelo potencial zeta. Na Figura 29, é mostrado comparativamente o potencial zeta para quitosana 5 kDa e 150 kDa em pH 6,2 e 10 mM de força iônica. Da figura, observa-se que a quitosana de 5 kDa forma partículas com potenciais positivos somente para razões N/P maiores que 3,0, o que explica sua maior tendência para formar agregados. Como polímeros de alta massa molar interagem cooperativamente com o DNA, espera-se que os políplexos formados por esses polímeros tenham maior carga na sua superfície que os formados por polímeros de baixa massa molar. Assim, a blindagem de cargas deve ocorrer mais facilmente nas partículas com quitosanas de baixa massa molar, aumentando a agregação entre essas.

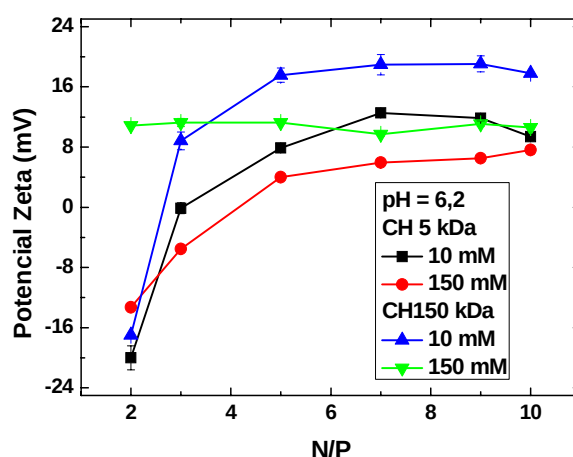


Figura 29. Potencial zeta das nanopartículas formadas com quitosana 5 kDa e 150 kDa em função da razão N/P em pH 6,2, força iônica 10 e 150 mM.

3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As nanopartículas obtidas da interação de DNA com CH 29 kDa, na razão N/P 5, em pH 4,0 e força iônica de 10 mM, foram avaliadas com a microscopia eletrônica de transmissão. A partir das fotomicrografias nota-se que as nanopartículas apresentam tamanhos em torno de 100 nm e forma aproximadamente esférica (Figura 30).

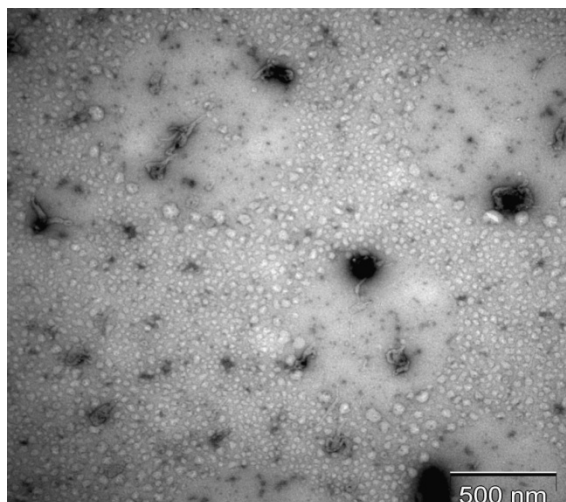


Figura 30. Fotomicrografia em Microscópio Eletrônico de Transmissão das partículas de CH 29 kDa/DNA em tampão acetato 10 mM, pH 4,0 e força iônica de 10 mM.

As fotomicrografias de TEM dos poliplexos de ctDNA e as quitosanas CH 5 kDa e CH 150 kDa em função da força iônica são apresentadas na Figura 31. Os resultados mostraram que em baixas forças iônicas, 10 mM, os poliplexos apresentam tamanhos em torno de 150 nm, independente da massa molar. Entretanto, com o aumento da força iônica, ocorre agregação entre partículas somente com a quitosana de baixa massa molar, havendo partículas de 500 nm em força iônica de 150 mM e em 500 mM grandes aglomerados podem ser observados (Figura 31f). O aumento da força iônica diminui a repulsão eletrostática entre as partículas e favorece a agregação, e os dados são concordantes com os resultados observados nas micrografias ópticas das partículas fluorescentes.

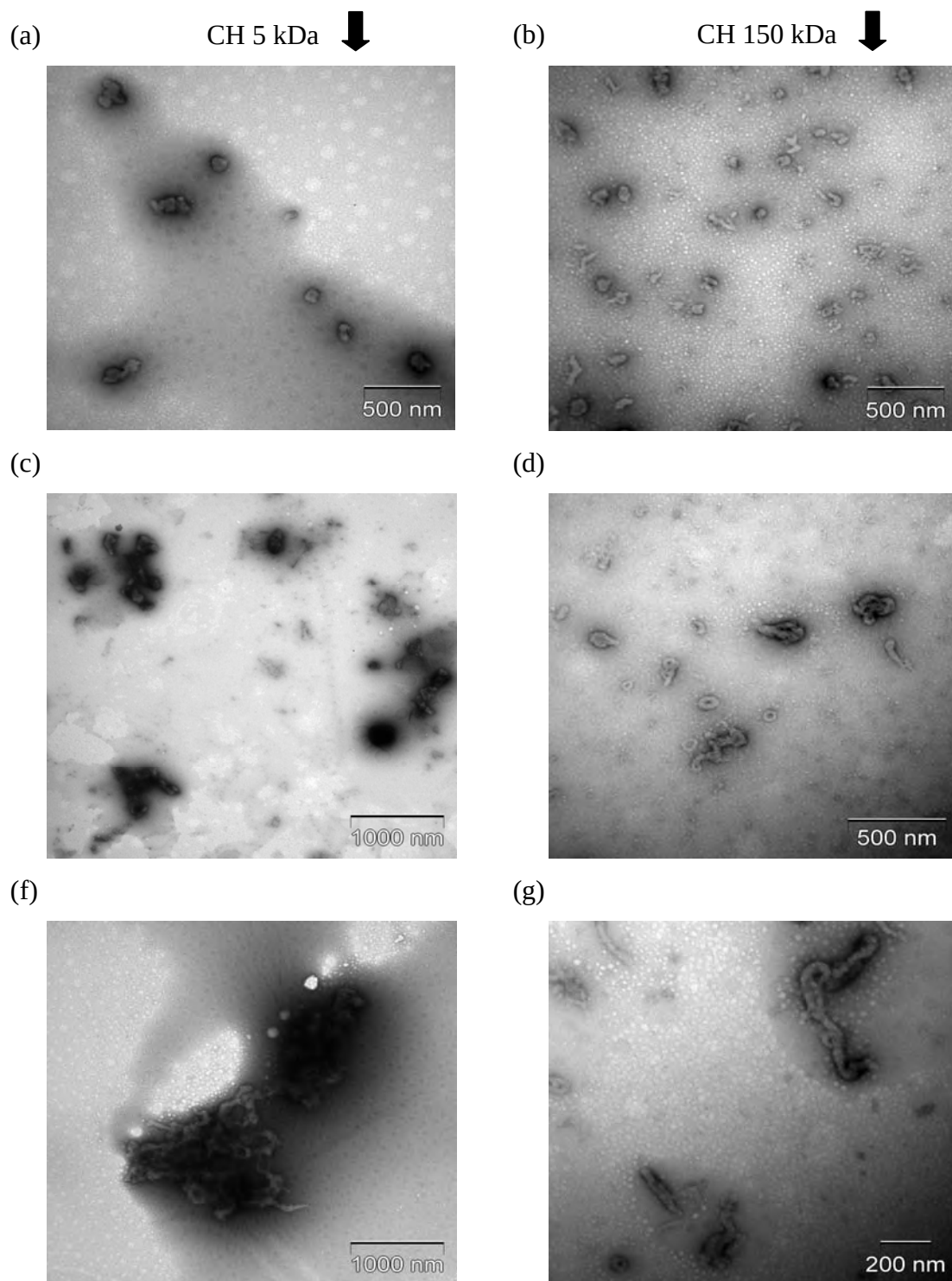


Figura 31. Fotomicrografias de TEM de nanopartículas de CH 5kDa-ctDNA (a, c and f) e CH 150 kDa-ctDNA (b, d and g) em pH 6,2 em diferentes forças iônicas (a) e (b) 10 mM; (c) e (d) 150 mM; (e) e (f) 500 mM.

3.7. Espalhamento de Luz dinâmico

Os tamanhos das nanopartículas foram obtidas por espalhamento de luz, e, nas Figuras 32 e 33, são apresentadas distribuições típicas obtidas nos experimentos. De forma geral, foram obtidas curvas monomodais e índices de polidispersividade baixos (em torno de 0,1), indicando que as amostras contêm tamanhos homogêneos de poliplexos, assim como observado nas fotomicrografias de TEM dos poliplexos de ctDNA e quitosana CH 29 kDa. Índices de polidispersividade acima de 0,5 são considerados altos e indicam amostra de alta polidispersividade [Manual do aparelho Zetasizer nano-ZS90].

Com o aumento da força iônica, pode-se verificar o deslocamento da distribuição de tamanhos dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas formadas com CH 29 kDa e curvas monomodais em pH 6,2, indicando boa homogeneidade no tamanho das nanopartículas (Figura 33).

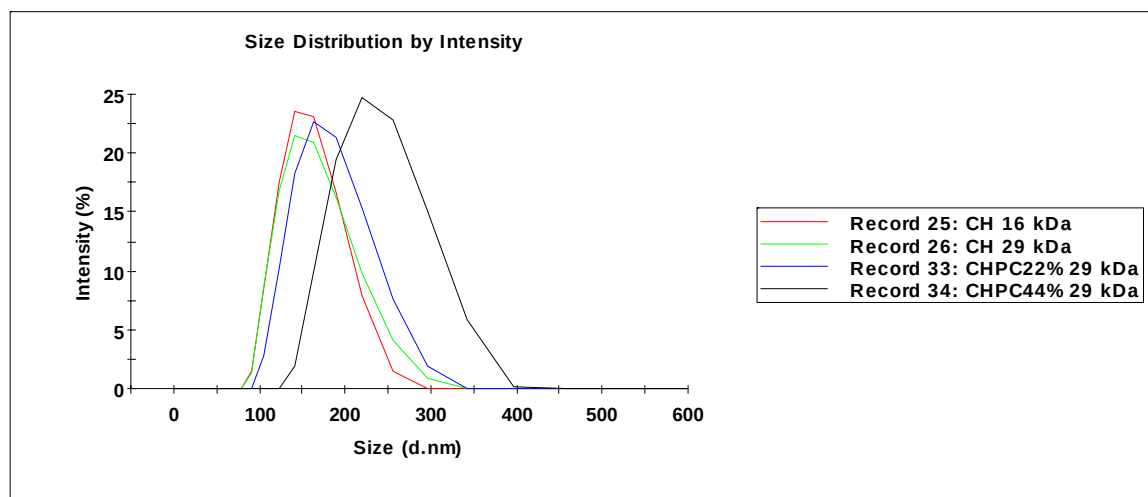


Figura 32. Distribuições de tamanho das nanopartículas na razão N/P 3 das diferentes quitosanas em pH 4,0.

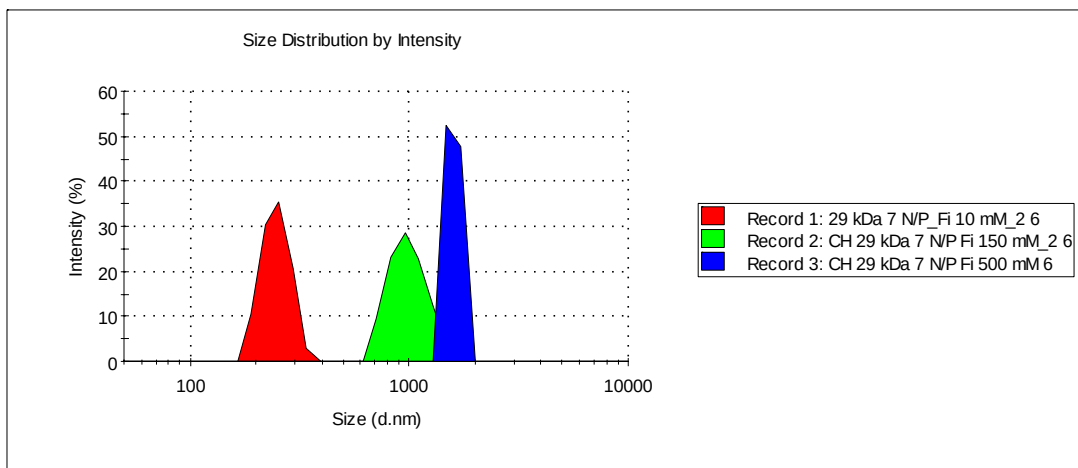


Figura 33. Distribuição de tamanhos das nanopartículas de DNA e CH 29 kDa na razão N/P 7, pH 6,2 e 10 mM de força iônica.

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas para avaliar o tamanho das nanopartículas hidratadas, bem como verificar o efeito da razão N/P sobre o tamanho das mesmas (Figura 34). Em geral, os resultados mostraram que o tamanho diminuiu com o aumento da razão N/P, para as quitosanas desacetiladas. Para razão N/P 1, o diâmetro das partículas obtidas com as quitosanas desacetiladas é maior em relação às demais razões. Isso se deve à baixa repulsão eletrostática entre as partículas, indicando uma possível agregação. Nas razões de N/P acima de 1, o tamanho das nanopartículas se manteve em torno de 150 nm de diâmetro e não variou, significativamente, com relação às duas quitosanas desacetiladas (16 e 29 kDa), concordando com os resultados de TEM. O comportamento é similar para as quitosanas modificadas com fosforilcolina. Entretanto, para CHPC44% 29 kDa, o tamanho das nanopartículas diminuiu com o aumento da razão N/P até 3, atingindo um tamanho médio de 220 nm e volta a aumentar, chegando a 350 nm na razão N/P igual a 10. Porém, para a quitosana CHPC22% 29 kDa, o tamanho das partículas começa de 210 nm na razão N/P 0,5 e decai para 160 nm, aproximadamente, a partir da razão N/P igual a 2. Esse resultado mostra que as partículas formadas com CHPC22% 29 kDa são mais estáveis e muito próximas das nanopartículas feitas com quitosanas sem adição de grupos fosforilcolina.

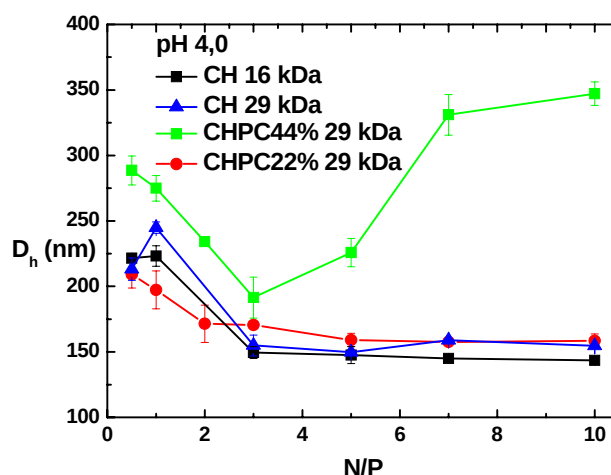


Figura 34. Tamanho das nanopartículas de quitosana/DNA em função da razão N/P em tampão acetato 10 mM, pH 4,0, força iônica de 10 mM, temperatura de 25°C.

Os tamanhos dos políplexos preparados com as quitosanas de CH 5 kDa, 16 kDa, 29 kDa e 150 kDa foram também estudados em função do tempo em tampão fosfato 5 mM, pH 6,2 e 10 mM de força iônica (Figura 35). Os resultados mostraram que, para as nanopartículas preparadas com CH 5 kDa, os tamanhos aumentam drasticamente de 500 nm para 2000 nm para baixas razões N/P, e o tamanho permanece constante somente a partir da razão N/P 7 (Figura 35a), assim como para todas as quitosanas de baixa massa molar (Figura 35b e c). Esses experimentos mostram claramente que somente para razões N/P maiores de 7 a repulsão eletrostática entre os políplexos impede a formação de agregados para quitosanas de baixa massa molar. Entretanto, para quitosana com alta massa molar, nota-se esse efeito a partir de uma razão menor (N/P = 5) (Figura 35d) e, para essas razões (5, 7 e 10 N/P), o tamanho das partículas permanece em torno de 230 nm (Tabela 4).

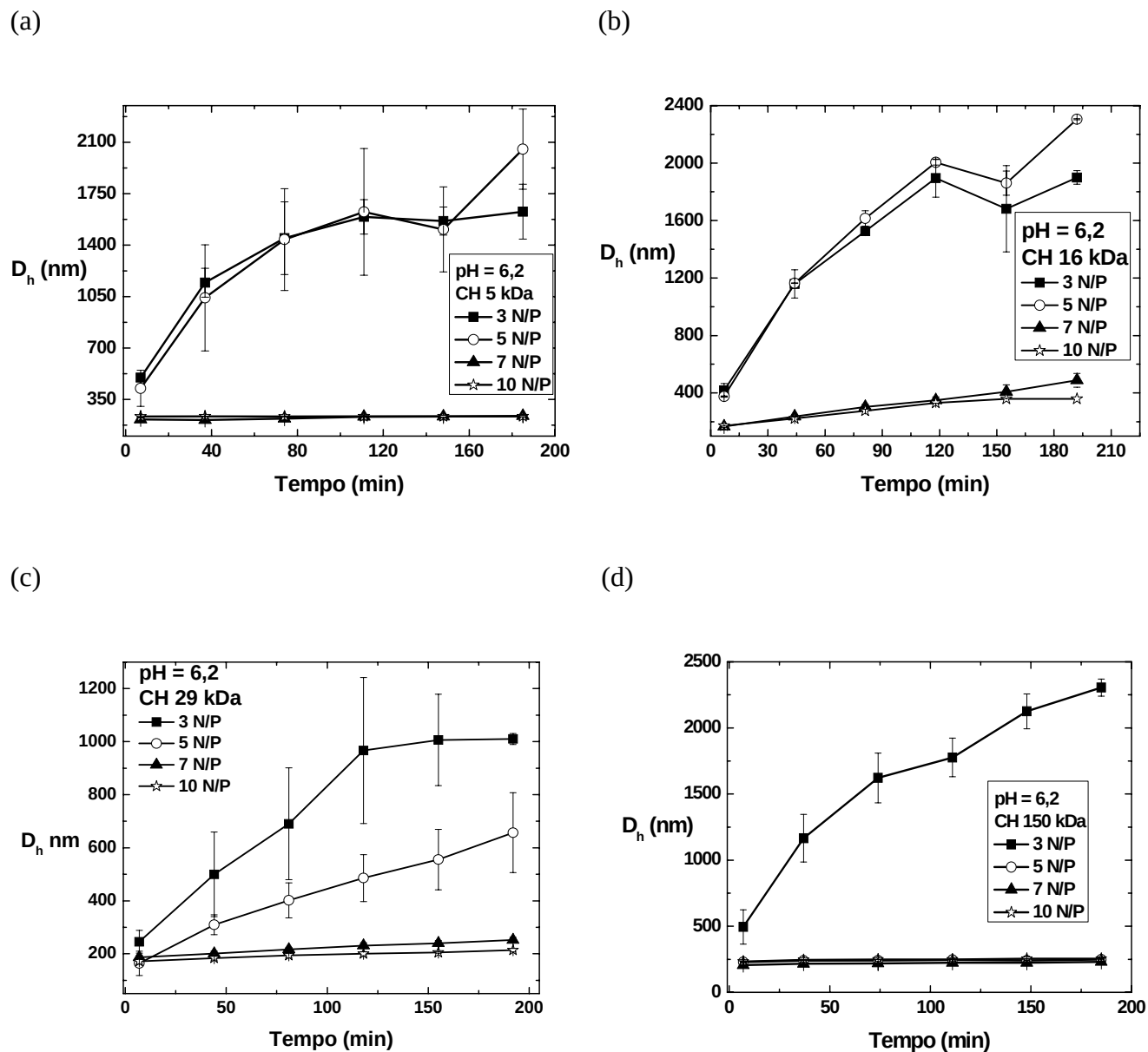


Figura 35. Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para as nanopartículas de ct-DNA com a) CH 5 kDa, b) CH 16 kDa, c) CH 29 kDa e d) CH 150 kDa em pH = 6,2 e força iônica 10 mM.

Tabela 4. Análise dos tamanhos das partículas preparadas de ctDNA e quitosana em pH 6,2.

(N/P) Ratio	CH-5 kDa	CH 29 kDa	CH-150 kDa	CHPC22% 29 kDa
3:1	1600 ($\pm$ 200)	1010 ($\pm$ 30)	2300 ($\pm$ 70)	177 ($\pm$ 3)
5:1	2100 ($\pm$ 300)	600 ($\pm$ 200)	250 ($\pm$ 10)	-
7:1	237 ($\pm$ 6)	250 ($\pm$ 10)	230 ($\pm$ 3)	175,5 ($\pm$ 0,2)
10:1	234 ($\pm$ 5)	210 ($\pm$ 10)	254 ($\pm$ 5)	190 ($\pm$ 4)

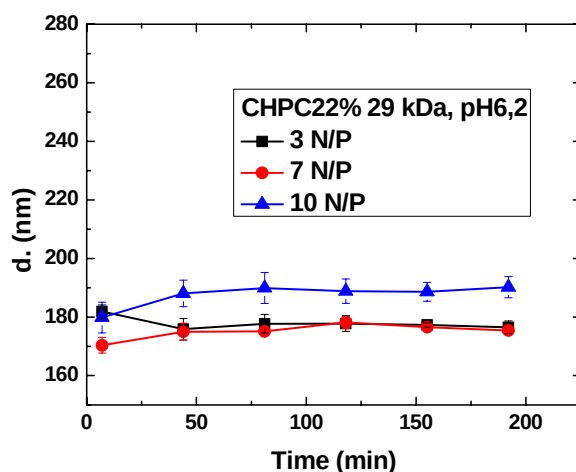


Figura 36. Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para as nanopartículas de ct-DNA com CHPC22% 29 kDa em pH = 6,2 e força iônica 10 mM.

Na Figura 36, é mostrado o efeito da presença do grupo fosforilcolina na estabilidade das nanopartículas. Nesta figura, são apresentados os diâmetros hidrodinâmicos (Dh) para as nanopartículas obtidas com a quitosana modificada com 22% de PC em função do tempo. Para a quitosana não modificada (Figura 35c), a agregação é impedida somente quando a razão N/P é maior que 5, devido ao excesso de cargas positivas e, conseqüentemente, à repulsão eletrostática. Para a quitosana modificada (CHPC22% 29 kDa) (Figura 36), uma razão N/P 3 é suficiente para evitar a agregação, e o tamanho das partículas permanece constante em torno de 180 nm (Tabela 4). Esse resultado mostra, claramente, que nanopartículas com estabilidade similar

àquela observada com CH 150 kDa podem ser preparadas com quitosanas de baixa massa molar pela introdução do grupo fosforilcolina.

A partir da razão N/P igual a 7, os tamanhos dos poliplexos ficaram constantes para todas as quitosanas utilizadas, CH 5 kDa, CH 16 kDa, CH 29 kDa e CH 150 kDa. Para essa razão, foram realizados experimentos de espalhamento de luz dinâmico para avaliar o efeito do aumento da força iônica no tamanho das nanopartículas. O efeito de blindagem de cargas para os poliplexos formados com quitosana de baixa massa molar é muito mais expressivo que para quitosana de alta massa molar, pois, com o aumento da força iônica, somente os poliplexos de CH 150 kDa não formaram agregados (Figura 37d). Inicialmente, as partículas de DNA e CH 5 kDa tinham em torno de 230 nm (10 mM de força iônica) e aumentaram para cerca de 2300 nm com o aumento da força iônica para 500 mM (Figura 37a). Para quitosana de alta massa molar, houve um pequeno aumento no tamanho das nanopartículas de 230 nm em 10 mM de força iônica para 300 nm em 500 mM de força iônica (Figura 37d). Portanto, em 500 mM de força iônica, a repulsão eletrostática ainda permanece efetiva para os poliplexos preparados com CH 150 kDa, impedindo a agregação das partículas (Tabela 5). Todos os resultados de DLS concordam com as fotomicrografias de TEM.

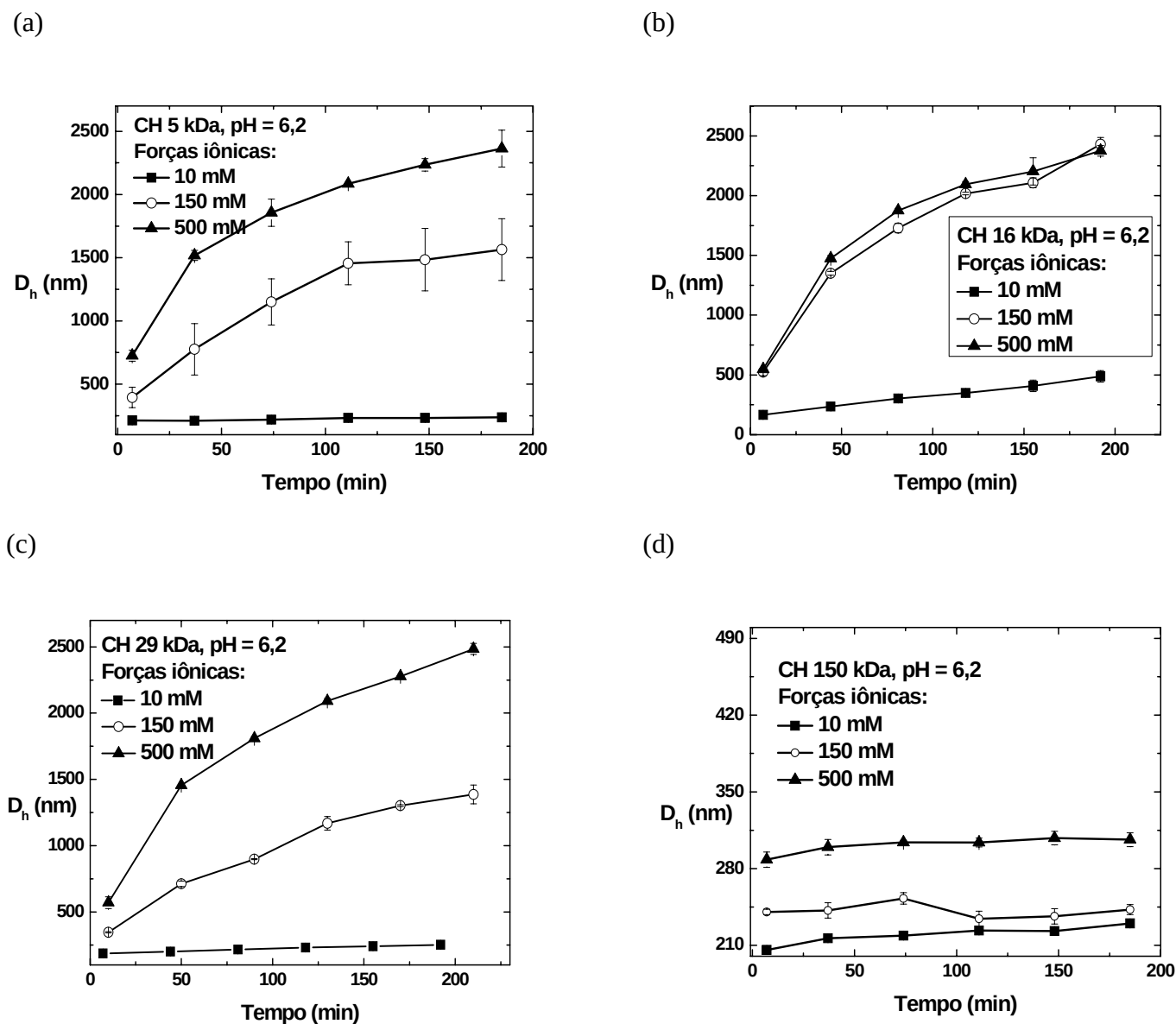


Figura 37. Tamanho das nanopartículas de DNA em função do tempo preparadas com a) CH 5 kDa, b) CH 16 kDa, c) CH 29 kDa e d) CH 150 kDa na razão N/P 7,0 em diferentes forças iônicas e pH 6,2.

Nanopartículas de DNA com quitosana de baixa massa molar contendo o grupo PC, CHPC22% 29 kDa, não agregam em função do tempo, os tamanhos permanecem constantes com o aumento da força iônica. Entretanto, ocorre um ligeiro aumento no tamanho hidrodinâmico de 180 nm para 240 nm, quando a força iônica foi aumentada de 10 mM para 500 mM (Figura 38). Esse comportamento é similar àquele observado

para a quitosana de alta massa molar (Figura 37d). Na tabela 5, são apresentados os diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas em função da força iônica.

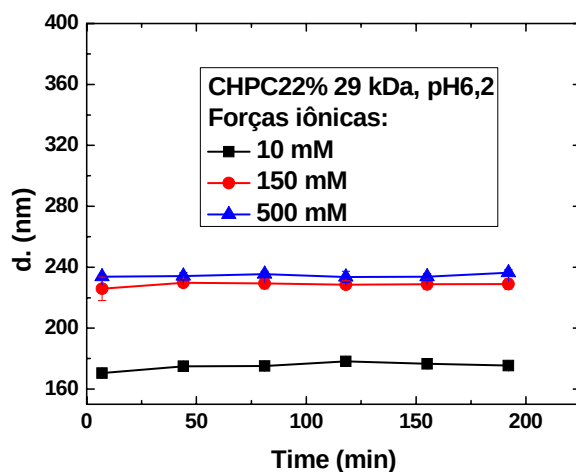


Figura 38. Tamanho das nanopartículas de DNA em função do tempo preparadas com CHPC22% 29 kDa na razão N/P 7,0 em diferentes forças iônicas e pH 6,2.

Tabela 5. Análise do tamanho das partículas preparadas de ctDNA e quitosana com variação da força iônica, depois de 3 horas da preparação.

Amostra Quitosana	Força Iônica (mM)	Dh ₁ nm	Dh ₂ nm
CH 5 kDa (pH 6,2)	10	237±9 (100%)	-
	150	3100±400 (79,3%)	300±100 (20,7%)
	500	1580±30 (100%)	-
CH 29 kDa (pH 6,2)	10	250±10 (100%)	-
	150	1380±70 (100%)	-
	500	2480±40 (100%)	-
CH 150 kDa (pH 6,2)	10	239±4 (100%)	-
	150	240±20 (100%)	-
	500	321±6 (100%)	-
CHPC22% 29 kDa (pH 6,2)	10	175,5±0,2 (100%)	-
	150	229±3 (100%)	-
	500	236±2 (100%)	-

3.8. Eletroforese

A eletroforese permitiu avaliar comparativamente a estabilidade dos complexos preparados. Na Figura 39, são apresentados os experimentos realizados com complexos quitosana/ctDNA preparados com quitosanas desacetiladas em pH 4,0 em diferentes razões N/P e força iônica de 10 mM. O primeiro poço a esquerda corresponde à amostra de ctDNA e verifica-se uma mancha larga, resultado da alta polidispersividade da amostra de ctDNA. Embora os complexos tenham sido preparados em pH 4,0, a eletroforese é realizada em pH 8,0 e, nessa situação, a força de interação é diminuída. Na comparação entre as quitosanas CH 16 kDa e CH 29 kDa, nota-se uma pequena diferença no deslocamento do ctDNA. Para a CH 16 kDa até a razão N/P igual a 1, nota-se uma banda bem acentuada e ainda uma liberação leve para a razão 2. Para a quitosana CH 29 kDa, a interação é mais eficiente e na razão N/P 1,0 não ocorreu liberação de ctDNA. Esses resultados confirmam os obtidos com o ensaio de fluorescência utilizando EtBr, ou seja, quanto maior a massa molar mais eficiente fica a interação entre os polieletrólitos.

Para os complexos formados com quitosanas contendo grupos PC, a interação é mais fraca, pois houve deslocamento de ctDNA para razões de N/P maiores, com um fraco deslocamento a partir da razão N/P 2. Comparando-se com os resultados de fluorescência em pH 4,0 e força iônica 10 mM (Figura 17), todas as quitosanas parecem interagir quase que igualmente com o DNA. No entanto, quando se analisa as eletroforeses das amostras, uma diferença significativa é observada entre quitosanas com e sem grupos PC.

O mesmo estudo foi realizado com quitosanas de diferentes massas molares (5 kDa e 150 kDa), variando-se a força iônica do meio e mantendo-se a concentração de grupos fosfato de ctDNA em 50 μ M (Figura 40). A liberação de DNA ocorre somente até a razão N/P igual a 2 para nanopartículas com a quitosana de baixa massa molar (5 kDa) em 10 mM de força iônica (Figura 40a). Para maiores forças iônicas (150 mM e 500 mM), não há liberação de ctDNA nessa razão (Figuras 40c e 40e). Esse comportamento pode ser devido à agregação entre partículas, verificado também através de DLS e TEM. No entanto, quando se aumenta ainda mais a força iônica (1 M), a banda de ctDNA na razão N/P 2 reaparece, o que indica um enfraquecimento da interação DNA-quitosana (Figura 40g). Já, para a quitosana de alta massa molar

(Figuras 40b, 40d, 40f e 40h), verifica-se que a força iônica não afeta, significativamente, a força de interação. Os resultados indicam que a agregação e a alta cooperatividade da interação impedem a liberação de DNA (Figura 40h).

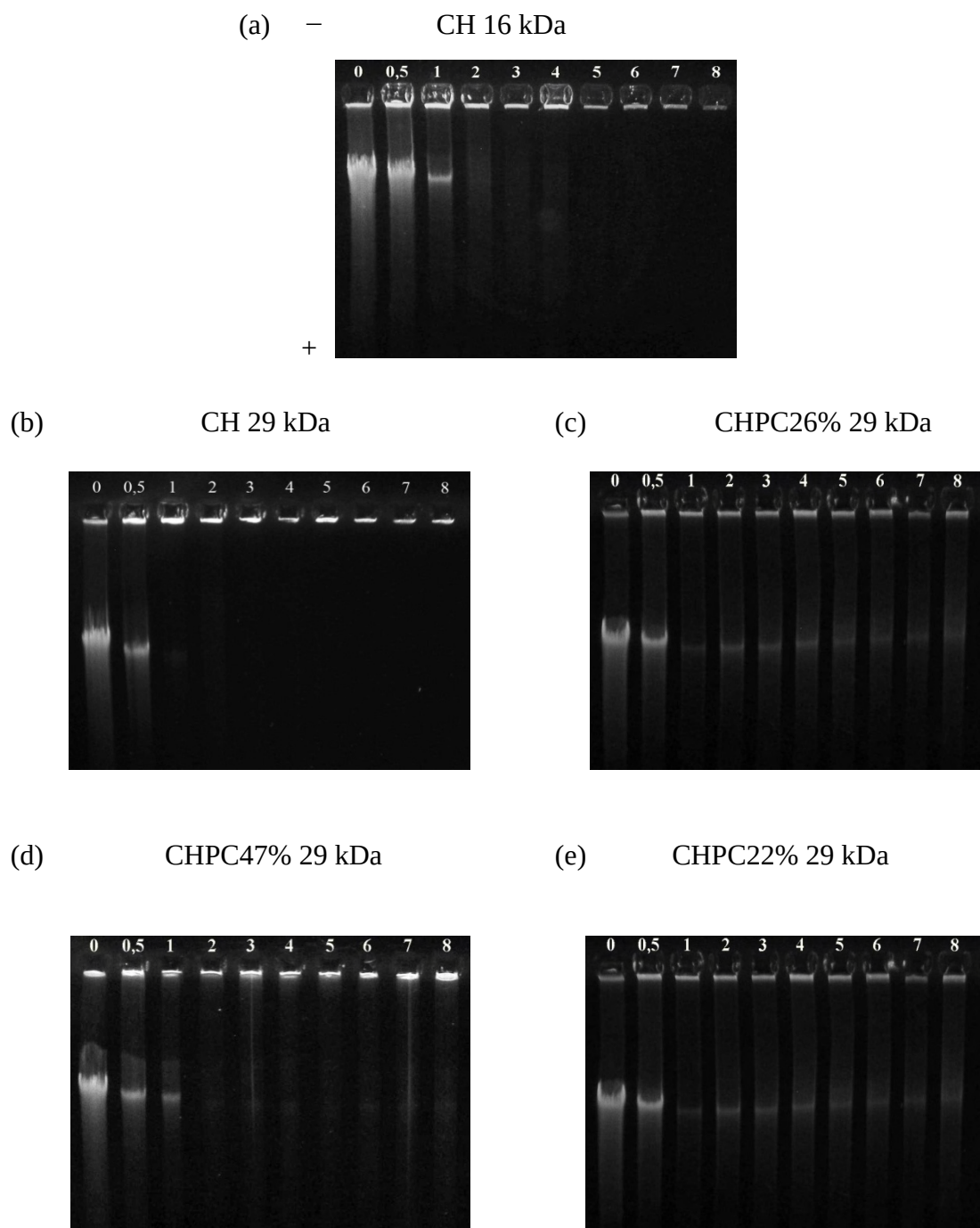


Figura 39. Eletroforeses em gel de agarose de complexos ctDNA e quitosanas (a) CH 16 kDa, (b) CH 29 kDa, (c) CHPC26% 29 kDa, (d) CHPC47% 29 kDa e (e) CHPC22% 29 kDa em tampão acetato pH 4,0. As bandas fluorescentes indicam o deslocamento do ctDNA. As razões N/P estão indicadas acima de cada fotografia de eletroforese.

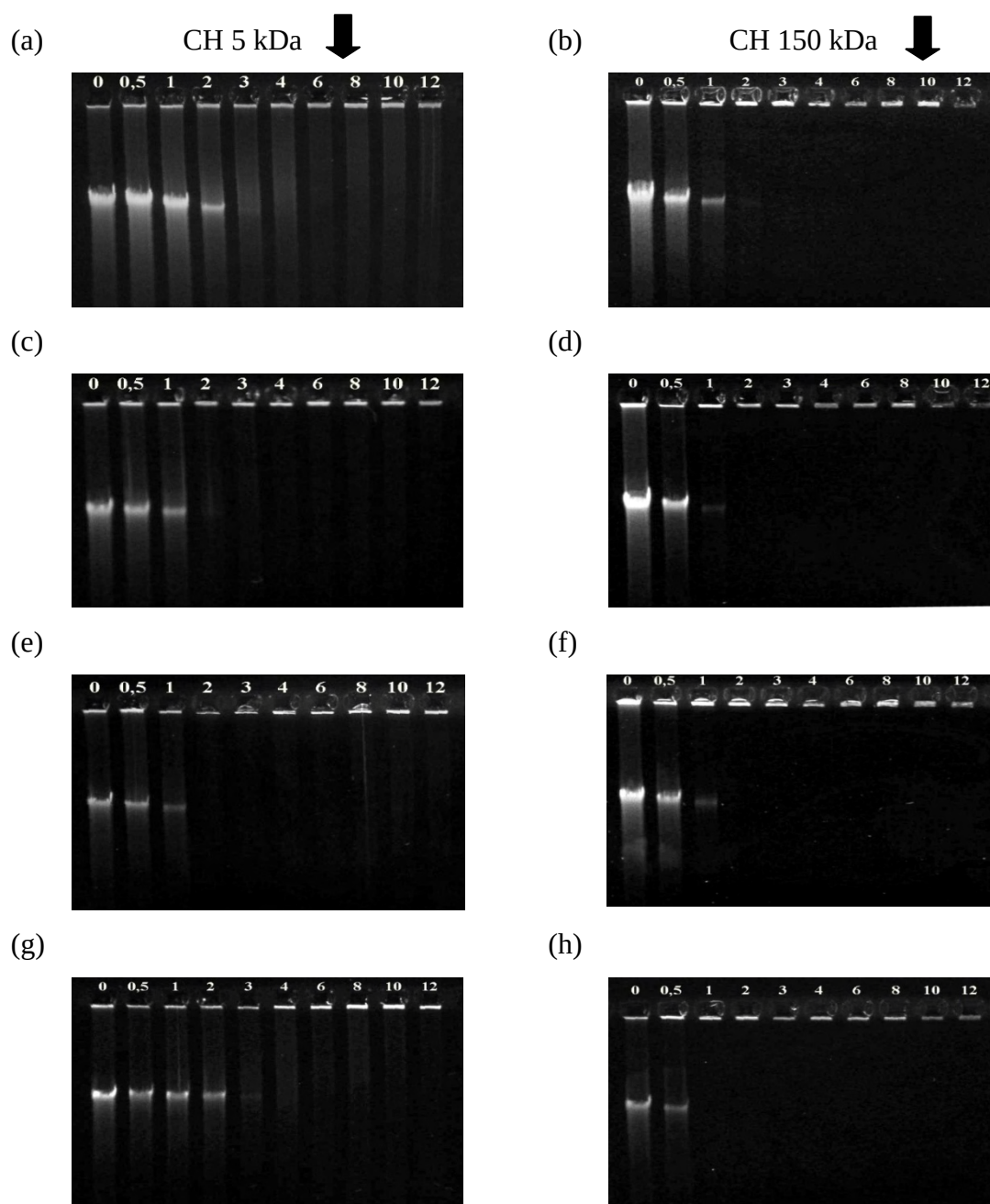


Figura 40. Eletroforeses dos poliplexos de ctDNA e CH 5kDa (a, c, e, g) e CH 150 kDa (b, d, f, h) em pH 6,2 e diferentes forças iônicas: (a) e (b) 10 mM, (c) e (d) 150 mM, (e) e (f) 500 mM e (g) e (h) 1 M. As razões N/P estão indicadas acima de cada eletroforese.

Capítulo 4

Conclusão

Os processos de desacetilação foram muito eficientes e as quitosanas preparadas atingiram 98 e 99 % de desacetilação, aproximadamente. As reações de substituição permitiram a obtenção de quitosanas com diferentes conteúdos de PC, obtendo-se uma alta solubilidade em ampla faixa de pH (1-12), mostrando um substancial efeito nas características físico-químicas em relação à quitosana comercial.

Os estudos empregando a fluorescência mostraram que quitosanas de baixa massa molar são eficientes na interação com o DNA em todas as condições estudadas, entretanto o aumento do pH ou força iônica diminui a força da interação. Este comportamento está relacionado com o grau de ionização, que diminui com o aumento do pH, e com a maior blindagem das cargas dos polieletrólitos, respectivamente. Outro resultado obtido desses experimentos foi que quitosanas com baixos graus de substituição são mais eficientes na formação de nanopartículas que as quitosanas desacetiladas e com alto grau de substituição em pH próximo do fisiológico (pH 7,0).

As fotomicrografias ópticas de fluorescência, em pH 4,0 e 6,2, mostraram que ocorre agregação dos poliplexos com o aumento da força iônica de 10 para 500 mM para CH 5 kDa. Esses resultados concordaram com os experimentos de TEM e DLS, em pH 6,2. Com o aumento da força iônica, o tamanho das nanopartículas formadas com quitosanas de baixa massa molar aumentou de 200 nm para 1500 nm, aproximadamente, comprovando a agregação dos poliplexos nessas condições.

A verificação da homogeneidade no tamanho dos poliplexos formados em pH 4,0, força iônica 10 mM ficou evidenciada nos experimentos de DLS. No entanto, os tamanhos das partículas se mostraram dependentes da quitosana e das condições do meio (pH e força iônica). Quitosanas com alto GS formaram poliplexos maiores que aqueles formados com quitosana desacetilada, como visto por DLS. Os experimentos de

microscopia eletrônica de transmissão mostraram partículas de CH 29 kDa e DNA com tamanhos em torno de 100 nm, concordando com os valores encontrados em DLS. A partir dos experimentos de potencial zeta, pode-se verificar o efeito de inversão de cargas nas superfícies dos poliplexos de DNA com CH 5 kDa e CH 150 kDa, em pH 6,2 e força iônica 10 mM. O potencial zeta começa a ficar positivo mais rapidamente para quitosana com massa molar maior. Além disso, com o aumento da força iônica, a blindagem de cargas dos poliplexos formados com quitosana de baixa massa molar (CH 5 kDa) ocorre mais facilmente quando comparadas com a quitosana de alta massa molar (CH 150 kDa), o que explica a formação de agregados de poliplexos com quitosanas de baixa massa molar (CH 5, 16 e 29 kDa).

Os efeitos da massa molar de quitosana e da substituição com fosforilcolina, na formação de poliplexos com ctDNA, foram claramente observados nas análises de espalhamento de luz dinâmico. Os complexos com quitosanas de baixa massa molar são menos estáveis que aqueles com alta massa molar. Somente a partir da razão N/P igual a 7, não ocorre agregação entre as partículas com quitosana de baixa massa molar, enquanto que para quitosana CH 150 kDa a agregação é observada para razões N/P menores que 5. Pelo potencial zeta, fica clara a tendência em formar agregados para razões N/P menores que 7 para quitosana de 5 kDa, devido à formação de partículas com potenciais positivos somente para razões N/P maiores que 3,0. Além disso, com o aumento da força iônica na razão N/P 7, de 10 mM para 500 mM, não ocorre agregação entre poliplexos preparados com CH 150 kDa, verificando-se o contrário para quitosanas de baixa massa molar (CH 5, 16 e 29 kDa). Para quitosana modificada de baixa massa molar CHPC22% 29 kDa, verificou-se que a estabilidade das nanopartículas é, significativamente, melhorada e torna-se muito parecida com a quitosana de alta massa molar CH 150 kDa.

As eletroforeses permitiram avaliar qualitativamente a força de interação policação-DNA, e os resultados mostraram que quitosanas com alto GS têm interação mais fraca com o DNA quando comparadas com as quitosanas desacetiladas. Esse resultado não pôde ser visto nos experimentos de fluorescência onde todas as quitosanas mostraram um efeito similar no deslocamento de EtBr (pH 4,0 e força iônica 10 mM). Os experimentos de eletroforese, variando-se a força iônica, mostraram que a agregação dos poliplexos obtidos com a quitosana de baixa massa molar inibe a liberação do DNA. Por outro lado, os resultados obtidos para os poliplexos preparados com CH 150 kDa

mostram que a dissociação do complexo, ou seja, a liberação do DNA é muito difícil mesmo em alta força iônica. Por outro lado, a interação mais fraca com os derivados substituídos bem como a maior estabilidade das partículas, pode ser favorável para a liberação do DNA dentro da célula, uma vez que dentro do endossomo, é uma das etapas limitantes do processo de transfecção.

Os resultados obtidos em todos os experimentos realizados mostraram que as quitosanas preparadas são eficientes na interação e formação de poliplexos com o DNA e que, para os derivados de baixos graus de substituição, permitem a interação e são estáveis em pHs próximos do fisiológico. Além disso, o trabalho permitiu ampliar os estudos sobre os efeitos da força iônica e da massa molar e como, tais parâmetros, afetam a estabilidade das nanopartículas, sendo essa, uma propriedade importante, não muito considerada na literatura.

Capítulo 5

Perspectivas Futuras

Para complementar o trabalho realizado até então, futuramente, pretende-se utilizar poli-L-lisina e quitosanas de baixas massas molares, em torno de 2 kDa e 10 kDa, com ligação de grupos fosforilcolina para a formação de poliplexos e introduzir modificações estruturais que permitam a obtenção de nanocarreadores com alta capacidade tamponante, a fim de aumentar o escape endossomal, seguido do acoplamento de moléculas ligantes como ácido fólico, galactose, manose, lactose e outras moléculas de interesse do Insituto Nacional. Para isso, será feito o preparo e a caracterização de derivados desses policações e a avaliação da estabilidade, proteção contra degradações por Dnases, integridade do gene após a formação de complexos e da citotoxicidade dos poliplexos formados com DNA plasmidial. Além disso, pretende-se estudar a transdução *in vitro* e *in vivo* utilizando os modelos pré-clínicos já estabelecidos dentro da rede de terapia gênica.

Referências Bibliográficas

AKBUGA, J.; OZBAS-TURAN, E. & ERDOGAN, N. (2004). **Plasmid-DNA loaded chitosan microspheres for in vitro IL-2 expression.** *Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , 58, p. 501.

ANDERSON, W. F. (1992). **Human Gene Therapy.** *Science* , 256, pp. 808-813.

AZEVEDO, V. V.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. & M.COSTA, A. C. (2007). **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais.** *Revista Eletrônica de Materiais e Processos* , pp. 27-34.

BAKER, A. H.; KRITZ, A.; WORK, L. M. & NICKLIN, S. A. (2004). **Cell-selective viral gene delivery vectors for the vasculature.** *Experimental Physiology* , 90, pp. 27-31.

BODNAR, M.; HARTMANN, J. F. & BORBELY, J. (2006). **Synthesis and Study of Cross-Linked Chitosan-N-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles.** *Biomacromolecules* , pp. 3030-3036.

BOUSSIF, O.; LEZOUALCH, F.; ZANTA, M.; MERGNY, M.; SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., et al. (1997). **A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine.** *Biochemistry* , pp. 7297-7301.

BOWMAN, K. & LEONG, K. W. (2006). **Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery.** *International Journal of Nanomedicine* , pp. 117-128.

BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, J.; ROBERTS, G. & RINALDO, M. (2001). **Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography.** *Polymer* , pp. 9921-9927.

CARREÑO-GÓMEZ, B. & DUNCAN, R. (1997). **Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres.** *International Journal of Pharmaceutics* , 148, pp. 231-240.

CHAE, S. Y.; SON, S.; LEE, M.; JANG, M. & NAH, J. (2005). **Deoxycholic acid-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for efficient gene carrier.** *Journal of Controlled Release* , 109, pp. 330– 344.

CHAN, P.; KURISAWA, M.; CHUNG, J. E. & YANG, Y. Y. (2007). **Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery.** *Biomaterials* , 28, pp. 540-549.

CORSIA, K.; CHELLATA, F.; YAHIAA, L. & FERNANDES, J. C. (2003). **Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles.** *Biomaterials* , pp. 1255–1264.

CRYSTAL, R. G. (1995). **Transfer of Genes to Humans: Early Lessons and Obstacles to Success.** *Science* , 270, pp. 404-410.

DANIELSEN, S.; STRAND, S.; DAVIES, C. L. & STOKKE, B. T. (2005). **Glycosaminoglycan destabilization of DNA–chitosan polyplexes for gene delivery depends on chitosan chain length and GAG properties.** *Biochimica et Biophysica Acta* , pp. 44-54.

ERBACHER, P.; ZOU, S.; BETTINGER, T.; STEFFAN, A.-M. & REMY, J.-S. (1998). **Chitosan-Based vector/DNA Complexes for Gene Delivery: Biophysical Characteristics and Transfection Ability.** *Pharmaceutical Research* , 15 (9).

FANG, Y. & HOH, J. H. (1998). **Early Intermediates in Spermidine-Induced DNA Condensation on the Surface of Mica.** *Journal of American Chemistry Society* , 120, pp. 8903-8909.

FELGNER, P.; BARENHOLZ, Y.; BEHR, J.; CHENG, S.; CULLIS, P.; HUANG, L., et al. (1997). **Nomenclature for Synthetic Gene Delivery Systems.** *Human Gene Therapy* , pp. 511-512.

FERNANDES, J. C.; TIERA, M. J. & WINNIK, F. M. (2006). **Chitosan nanoparticles for non-viral gene therapy**. In: ACS book series : Polysaccharides in Drug Delivery and Pharmaceutical Applications.

GODBEY, W. T.; WU, K. K. & MIKOS, A. G. (1998). **Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle**. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* , pp. 268 - 275.

GOREISH, H. H.; LEWIS, A. L.; ROSE, S. & LLOYD, A. W. (2003). **The effect of phosphorylcholine-coated materials on the inflammatory response and fibrous capsule formation: In vitro and in vivo observations**. *Wiley Periodicals* , pp. 1-9.

HANSMA, H. G.; GOLAN, R.; HSIEH, W.; LOLLO, C. P.; MULLEN-LEY, P. & KWOH, D. (1998). **DNA condensation for gene therapy as monitored by atomic force microscopy**. *Nucleic Acids Research* . , 26, p. 2481.

HELLER, J.; LIU, L.; DUNCAN, R. & RICHARDSON, S. (1996). **Alginate/chitosan microporous microspheres for the controlled release of proteins and antigens**. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* , pp. 269-270.

HOGGARD, M.; MELNIKOVA, Y. S.; VARUM, K. M.; LIDMAN, B. & ARTURSSON, P. (2003). **Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo**. *The Journal of Gene Medicine* , pp. 130–141.

VAN HOLDE, C. K. M. (1990). **Lipids, Membranes and Cellular Transport**. In Mathews van Holde, *Biochemistry* (pp. 298-336). Redwood: The Benjamin/Cummings Publishing Company.

HUGGINS, M. L. (1942). **The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration**. *Journal of the American Chemical Society* , pp. 2716-2718.

IKEDA, S.; KUMAGAI, H.; SAKIYAMA, T.; CHU, C. H. & NAKAMURA, K. (1995). **Method for analyzing pH-sensitive swelling of amphoteric hydrogels-application to a polyelectrolyte complex gel prepared from xanthan and chitosan.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* , pp. 1422-1427.

JIANG, X.; DAI, H.; LEONG, K. W.; GOH, S. H.; MAO, H. Q. & YANG, Y. (2006). **Chitosan-g-PEG/DNA complexes deliver gene to the rat liver via intrabiliary and intraportal infusions.** *Journal of Gene Medicine* , pp. 477-487.

KIDOAKI, S. & YOSHIKAWA, K. (1999). **Folding and unfolding of a giant duplex-DNA in a mixed solution with polycations, polyanions and crowding neutral polymers.** *Biophysical Chemistry* , 76, p. 133.

KIM, T. H.; JIANG, H. L.; JERE, D.; PARK, I. K.; CHO, M. H.; NAH, J. W., et al. (2007). **Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo.** *Progress in Polymer Science* , pp. 726-753.

KIM, T. H.; PARK, I. K.; NAH, J. W.; CHOI, Y. J. & CHO, C. S. (2004). **Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier.** *Biomaterials* , 25, pp. 3783–3792.

KUMAR, M. N. (2000). **A review of chitin and chitosan applications.** *Reactive & Functional Polymers* , pp. 1-27.

KUNATH, K.; HARPE, A.; FISCHER, D.; PETERSEN, H.; BICKEL, U.; VOIGT, K., et al. (2003). **Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine.** *Journal of Controlled Release* , pp. 113-125.

LAM, J.; MA, Y.; ARMES, S.; LEWIS, A.; BALDWIN, T. & STOLNIK, S. (2004). **Phosphorylcholine–polycation diblock copolymers as synthetic vectors for gene delivery.** *Journal of Controlled Release* , pp. 293–312.

LEE, M.; NAH, J.; KWON, Y.; KOH, J. J.; KO, K. S. & KIM, S. W. (2001). **Water-Soluble and Low Molecular Weight Chitosan-Based Plasmid DNA Delivery.** *Pharmaceutical Research* , pp. 427-431.

LEONG, K.; MAO, H.-Q.; TRUONG-LE, V. L.; ROY, K.; WALSH, S. M. & AUGUST, J. T. (1998). **DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles.** *Journal of Controlled Release* , 53, pp. 183-193.

LIBERDA, J.; TRNKA, T.; SEJBAL, J.; JONAKOVA, V.; KRAUS, M. & TICHA, M. (1999). **Preparation of Biotinylated and FITC-Labelled Phosphorylcholine Poly(acrylamide) Derivatives and Their Application for Protein Ligand-Binding Studies.** *Chimia* , pp. 528-532.

LIU, W. G.; ZHANG, X.; SUN, S. J.; SUN, G. J. & YAO, K. D. (2003). **N-Alkylated Chitosan as a Potential Nonviral Vector for Gene Transfection.** *Bioconjugate Chemistry* , 14, pp. 782-789.

MACLAUGHLIN, F. C.; MUMPER, R. J.; WANG, J.; TAGLIAFERRI, J. M.; GILL, I.; HINCHCLIFFE, M., et al. (1998). **Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery.** *Journal of Controlled Release* , 56, pp. 259–272.

MAO, H.; ROY, K.; TROUNG-LE, V. L.; JANES, K. A.; LIN, K. Y., et al. (2001). **Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency.** *Journal of Controlled Release* , 70, pp. 399–421.

MIYAZAWA, K. & WINNIK, F. M. (2003). **Solution Properties of Hydrophobically-Modified Phosphorylcholine-Based Polymers in Water and in the Presence of Surfactants.** *Journal of Physical Chemistry* , pp. 10677-10682.

MULLIGAN, R. C. (1993). **The Basic Science of Gene Therapy.** *Science* , 260, pp. 926-932.

MURATA, J. I.; OHYA, Y. & OUCHI, T. (1996). **Possibility of application of quaternary chitosan having pendant galactose residues as gene delivery tool.**

Carbohydrate polymers , 29, pp. 69-74.

MURPHY, E. F.; LU, J. R.; LEWIS, A. L.; BREWER, J.; RUSSELL, J. & STRATFORD, P. (2000). **Characterization of Protein Adsorption at the Phosphorylcholine Incorporated Polymer–Water Interface.** *Macromolecules* , pp. 4545-4554.

PALMER, R. R.; LEWIS, A. L.; KIRKWOOD, L. C.; ROSE, S. F.; LLOYD, A. W.; VICK, T. A., et al. (2004). **Biological evaluation and drug delivery application of cationically Biological evaluation and drug delivery application of cationically.** *Biomaterials* , pp. 4785–4796.

PARK, I.; IHM, J.; PARK, Y.; CHOI, Y.; KIM, S.; KIM, W., et al. (2003). **Galactosylated chitosan (GC)-graft-poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) as hepatocyte-targeting DNA carrier Preparation and physicochemical characterization of GC-graft-PVP/DNA complex (1).** *Journal of Controlled Release* , 86, pp. 349-359.

PARK, I.; KIM, T.; PARK, Y.; SHIN, B.; CHOI, E. & CHOWDHURY, E. (2001). **Galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier.** *Journal of Controlled Release* , 76, pp. 349-362.

PARK, Y.; PARK, Y.; SHIN, B.; CHOI, E.; PARK, Y.; AKAIKE, T., et al. (2000). **Galactosylated chitosan–graft–dextran as hepatocyte-targeting DNA carrier.** *Journal of Controlled Release* , 69, pp. 97-108.

PEPPAS, L. B. & BLANCHETT, J. O. (2004). **Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy.** *Advanced Drug Delivery Reviews* , 56, p. 1649.

PERALES, J. C.; GROSSMANN, G. A.; MOLAS, M.; LIU, G.; FERKOL, T.; HARPST, J., et al. (1997). **Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor.** *The Journal of biological chemistry* , 272, p. 7398.

RAU, D. C. & PARSEGIAN, V. A. (1992). **Direct measurement of temperature-dependent solvation forces between DNA double helices.** *Biophysical Journal* , 61, p. 246.

RICHARDSON, S. C.; KOLBE, H. V. & DUNCAN, R. (1999). **Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA.** *International Journal of Pharmaceutics* , pp. 231-243.

ROTH, J. A. & CRISTIANO, R. J. (1997). **Gene Therapy for Cancer: What Have We Done and Where Are We Going?** *Journal of the National Cancer Institute* , 89, pp. 21-39.

ROY, K.; MAO, H.; HUANG, S. & LEONG, K. W. (1999). **Oral gene delivery with chitosan–DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy.** *Nature Medicine* , 5, pp. 387-381.

RUNGSARDTHONG, U.; EHTEZAZI, T.; BAILEY, L.; ARMES, S. P.; GARNETT, M. C. & Stolnik, S. (2003). **Effect of polymer ionization on the interaction with DNA in nonviral gene delivery systems.** *Biomacromolecules* , 4, p. 683.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA, S. P. & CAVALHEIRO, E. T. (2003). **Caracterização de Quitosanas Comerciais.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia* , pp. 242-249.

SATO, T.; ISHII, T. & OKAHATA, Y. (2001). **In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency.** *Biomaterials* , pp. 2075-2080.

TANG, M. X. & SZOKA, F. C. (1997). **The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes.** *Gene Therapy* , pp. 823-832.

TIERA, M. J.; QIU, X.; BECHAOUCH, S.; SHI, Q.; FERNANDES, J. C. & WINNIK, F. M. (2006). **Synthesis and Characterization of Phosphorylcholine-Substituted Chitosans Soluble in Physiological pH Conditions.** *Biomacromolecules* , 7, pp. 3151-3156.

TOLAIMATE, A.; DESBRIERES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A.; VINCENDON, M. & VOTTERO, P. (2000). **On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin.** *Polymer* , pp. 2463–2469.

TØMMERAAS, K.; HOGGARD, M. K.; VARUM, K. M.; CHRISTENSEN, B. E.; ARTURSSON, P. & SMIDSRØD, O. (2002). **Preparation and characterisation of chitosans with oligosaccharide branches.** *Carbohydrate Research* , pp. 2455–2462.

TØMMERAAS, K.; VARUM, K. M.; CHRISTENSEN, B. E. & SMIDSRØD, O. (2001). **Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans.** *Carbohydrate Research* , pp. 137-144.

TRUBETSKOY, V. S.; SLATTUM, P. M.; HAGSTROM, J. E.; WOLFF, J. A. & BUDKER, V. G. (1999). **Quantitative assessment of DNA condensation.** *Analytical Biochemistry* , 267, p. 309.

VIJAYANATHAN, V.; THOMAS, T.; SHIRAHATA, A. & THOMAS, T. (2001). **DNA condensation by polyamines: a laser light scattering study of structural effects.** *Biochemistry* , 40, pp. 13644-13651.

WOLFERT, M. A. & SEYMOUR, L. W. (1996). **Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA.** *Gene Therapy* , 3, p. 269.

ZAHR, A. S.; DAVIS, C. A. & PISHKO, M. V. (2006). **Macrophage Uptake of Core-Shell Nanoparticles Surface Modified with Poly(ethylene glycol).** *Langmuir* , 22, pp. 8178-8185.

ZELIKIN, A. N.; TRUKHANOVA, E. S.; PUTNAM, D.; IZUMRUDOV, V. A. & LITMANOVICH, A. A. (2003). **Competitive Reactions in Solutions of Poly-L-histidine, Calf Thymus DNA, and Synthetic Polyanions: Determining the Binding Constants of Polyelectrolytes.** *Journal of American Chemistry Society* , 125, pp. 13693-13699.

ZHANG, H.; OH, M.; ALLEN, C. & KUMACHEVA, E. (2004). **Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery.** *Biomacromolecules* , pp. 2461-2468.

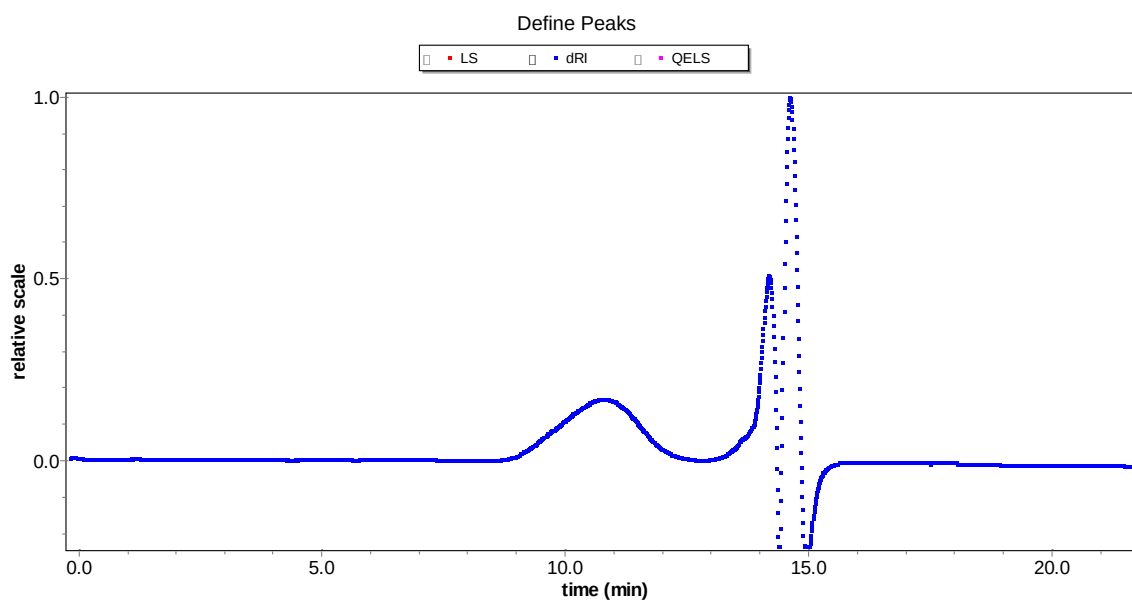
ZHANG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; PAN, Y.; ZHAO, J.; REN, L., et al. (2007). **A novel PEGylation of chitosan nanoparticles for gene delivery.** *Biotechnology and Applied Biochemistry* , 46, pp. 197-204.

ZHU, A.; ZHANG, J. & SHEN, J. (2003). **Preparation and Anticoagulant Property of Phosphorylcholine-Terminated o-Benzoylchitosan Derivative.** *Journal of Applied Polymer Science* , pp. 489–493.

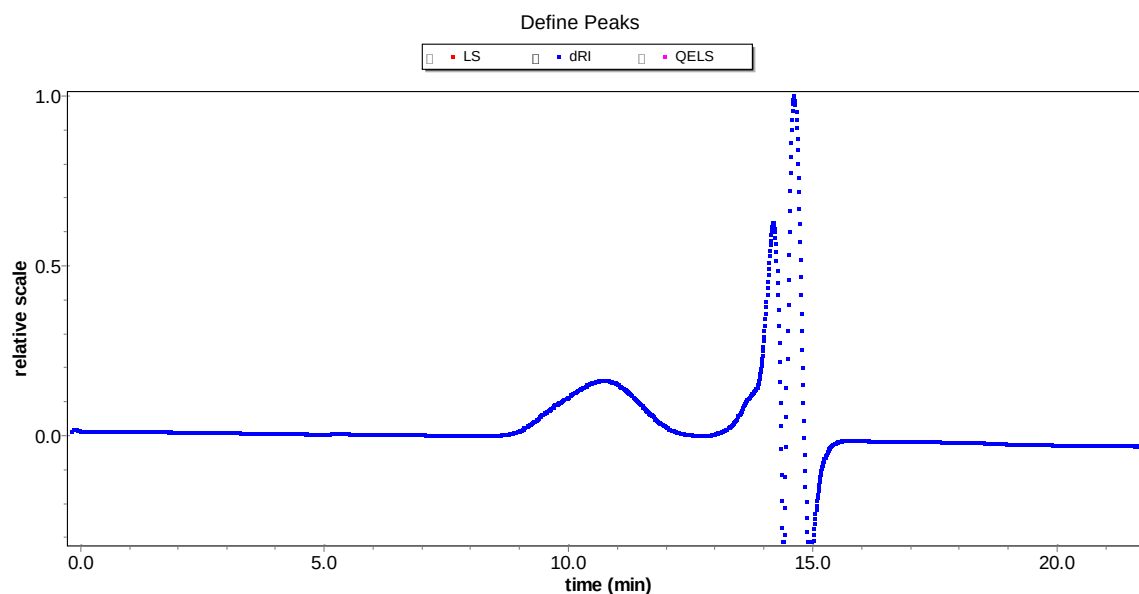
Apêndice A

- *Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)*

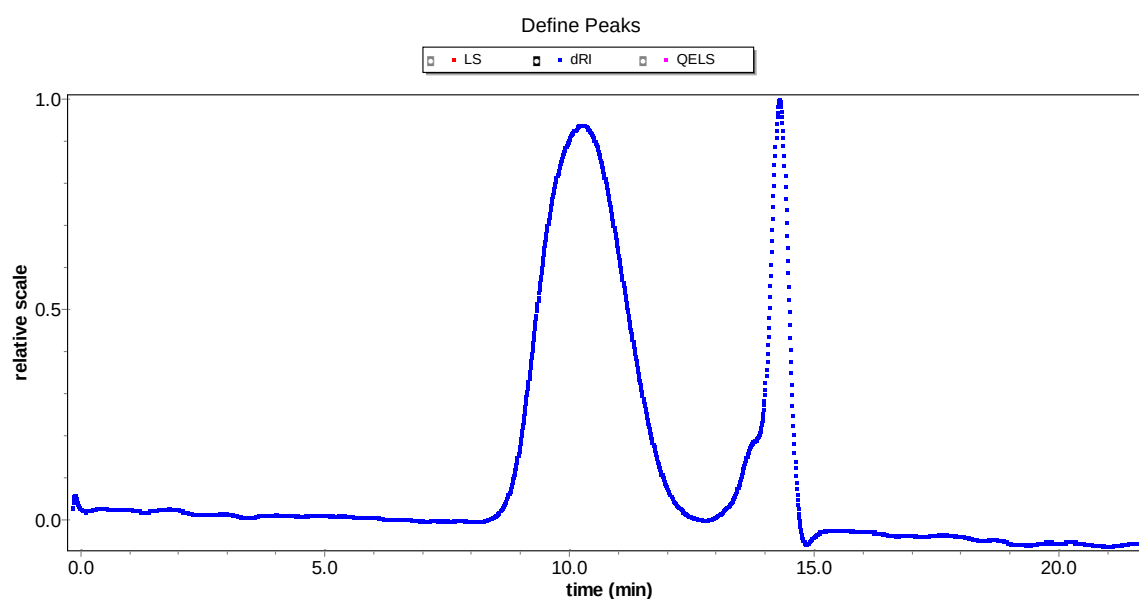
As quitosanas preparadas no decorrer do projeto foram caracterizadas através de cromatografia de permeação em gel realizado pela prof. Dra. Françoise M. Winnik na Faculdade de Farmácia e Departamento de Química da Universidade de Montreal. Os cromatogramas de cada amostra de quitosana estão apresentados abaixo.



Cromatograma 1. CH 16 kDa em tampão acetato pH 4,5 ($M_w = 15,6$ kDa).



Cromatograma 2. CH 18 kDa em tampão acetato pH 4,5 ($M_w = 18,4$ kDa).



Cromatograma 3. CH 29 kDa em tampão acetato pH 4,5 ($M_w = 29,4$ kDa).

Tabela 6. Propriedades das quitosanas desacetiladas e degradadas.

Amostra	M_w (kDa)	M_n (kDa)	M_w/M_n
CH 16 kDa	15,6	10,3	1,52
CH 18 kDa	18,4	11,6	1,59
CH 29 kDa	29,4	18,9	1,56

Apêndice B

Artigos preparados no período do curso de mestrado:

1. A. H. Casé, I. P. D. Picola, M. E. D. Zaniquelli, J. C. Fernandes, S. R. Taboga, F. M. Winnike, M. J. Tiera, Physicochemical characterization of nanoparticles formed between DNA and phosphorylcholine substituted chitosans, *Journal of Colloid and Interface Science* 336 (2009) 125-133.

2. Picola, I.P.D., Busson, K., Casé, A.N., Nasario, F.D., Taboga, S.R., Ruggiero, J., Tiera, M.J.; Solution ionic strength effect on chitosan-DNA nanoparticles Stability. Artigo submetido ao *Journal of Nanoparticle Research*.



Physicochemical characterization of nanoparticles formed between DNA and phosphorylcholine substituted chitosans

Ana Helena Casé^{a,1}, Isadora Pfeifer Dalla Picola^{a,1}, Maria Elisabete Darbello Zaniquelli^b, Júlio Cesar Fernandes^c, Sebastião Roberto Taboga^d, Françoise M. Winnik^e, Marcio José Tiera^{f,*}

^a Department of Physics, Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences, IBILCE, São Paulo State University, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

^b Department of Chemistry, School of Philosophy, Sciences and Humanities, FCL, São Paulo University, USP, Ribeirão, São Paulo, Brazil

^c Orthopedic Research Laboratory, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Montreal, Canada

^d Department of Biology, Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences, IBILCE, São Paulo State University, UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

^e Faculty of Pharmacy and Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal, Canada

^f Department of Chemistry and Environmental Sciences, Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences, IBILCE, São Paulo State University, UNESP, Cristovão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, 15054-000 São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2008

Accepted 27 February 2009

Available online 10 April 2009

Keywords:

Chitosan

Nanoparticles

Gene therapy

DNA

Phosphorylcholine

Derivatives

ABSTRACT

The interactions between phosphorylcholine-substituted chitosans (PC-CH) and calf-thymus DNA (ct-DNA) were investigated focusing on the effects of the charge ratio, the pH, and phosphorylcholine content on the size and stability of the complexes using the ethidium bromide fluorescence assay, gel electrophoresis, dynamic light scattering, and fluorescence microscopy. The size and colloidal stability of deacetylated chitosan (CH/DNA) and PC-CH/DNA complexes were strongly dependent on phosphorylcholine content, charge ratios, and pH. The interaction strengths were evaluated from ethidium bromide fluorescence, and, at N/P ratios higher than 5.0, no DNA release was observed in any synthesized PC-CH/DNA polyplexes by gel electrophoresis. The PC-CH/DNA polyplexes exhibited a higher resistance to aggregation compared to deacetylated chitosan (CH) at neutral pH. At low pH values highly charged chitosan and its phosphorylcholine derivatives had strong binding affinity with DNA, whereas at higher pH values CH formed large aggregates and only PC-CH derivatives were able to form small nanoparticles with hydrodynamic radii varying from 100 to 150 nm. Nanoparticles synthesized at low ionic strength with PC-CH derivatives containing moderate degrees of substitution (DS = 20% and 40%) remained stable for weeks. Photomicroscopies also confirmed that rhodamine-labeled PC₄₀CH derivative nanoparticles presented higher colloidal stability than those synthesized using deacetylated chitosan. Accordingly, due to their improved physicochemical properties these phosphorylcholine-modified chitosans provide new perspectives for controlling the properties of polyplexes.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chitosan (CH) is a linear biopolymer composed of 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose and 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranose, β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked. It is obtained by de-N-acetylation of chitin, which is the second most abundant natural polysaccharide after cellulose. In recent years, chitosan has emerged as a promising carrier for drug delivery due to biodegradation, biocompatibility, non-immunogenicity, and low toxicity [1]. Chitosan is able to condense DNA efficiently [2] and the resulting nanoparticles have received great attention for their potential applications in nonviral gene therapy by intravenous [3–5] and oral/mucosal administration [6,7]. Numerous methodologies have been published on the preparation of chitosan micro- and nanoparticles; for gene therapy, however, complex coacervation is usually employed [8]. The complexation is driven mainly by the electrostatic interaction between the amino groups of chitosan and the charged phosphate groups of DNA [9,10]. The process is a spontaneous phase separation that occurs when the two oppositely charged polyelectrolytes are mixed in an aqueous solution. The electrostatic interaction between two macromolecules results in the separation of a coacervate (polymer-rich phase) from the supernatant (polymer-poor phase). Various parameters including molecular weight, charge (+/–) ratio, pH, polyelectrolyte structure, and ionic strength have been shown to affect the interaction and consequently the size and stability of nanoparticles. The interaction is fully favored in slightly acidic medium when all the amine groups are charged. It has been reported that, depending on the chitosan molecular weight and degree of deacetylation, chitosan–DNA complexes with mean sizes between 50 and 6000 nm form by simple mixing and

* Corresponding author. Fax: +55 17 32212356.

E-mail addresses: mjt@ibilce.unesp.br, marciotiera@hotmail.com (M.J. Tiera).

¹ These two authors contributed equally to this work.

incubation [11–13]. In general, the complexes are stable only when chitosan is added in molar excess relative to DNA, and the particles have a zeta potential between 10 and 20 mV, depending on the degree of excess.

It is important to control the size and stability of nanoparticles since the mechanism of crossing of the cell membrane depends on both size and charge ratio of the chitosan nanoparticles [12,14,16]. The particle size is recognized as a key parameter since it may affect the blood circulation time and the cellular uptake [15–18]. Several strategies have been employed aiming to enhance the efficiency of chitosan–DNA nanoparticles as vectors in gene therapy by decreasing their interaction with blood components and their uptake by the reticuloendothelial system. Adequate circulation time is a necessary and fundamental factor for the particles to reach the target cells especially in the case of intravenous injection [19–21]. However, it has been reported that after internal administration chitosan shows a rapid clearance and liver accumulation which may limit the targeting of tissues other than liver [22,23]. It is therefore important to modify chitosan by introducing hydrophilic units or grafted polymers to avoid interactions with proteins and phagocytes, thus prolonging the circulation time in the bloodstream [24]. Galactose [25–27], poly(ethylene glycol) [28–31], poly(vinyl pyrrolidone) [32], and dextran [33] have been linked to the chitosan backbone or to the preformed nanoparticles to improve their physicochemical properties. The conjugation of PEG on the surface of the preformed nanospheres was reported to minimize aggregation in solution [13,34]. However, the binding strength for DNA was shown to be dependent on the chitosan's molecular weight and hydrophilic chain composition [35].

We recently described a facile preparation of phosphorylcholine-substituted chitosans (PC-CH) (Scheme 1), which exhibit a remarkable solubility in water under physiological pH conditions and demonstrated that the introduction of zwitterionic phosphorylcholines moieties onto chitosan, even with modest degrees of substitution, provides a new and effective route toward nontoxic chitosan, while remaining soluble under neutral and even slightly alkaline conditions [36]. The polymers were obtained through reductive amination of PC-CHO by the amine groups of de-*N*-acetylated chitosan. Moreover, the cytotoxicity of the polymers was evaluated, confirming the nontoxic nature of chitosan and its PC derivatives. The modification resulted in conversion of the primary amines of chitosan into a secondary amino group, whose pK_a value was estimated around 7.0. These amine groups retain their ability to interact with DNA under neutral conditions.

The work reported here was aimed at assessing the formation and strength of interaction of complexes between various PC-CH and DNA. The effects of the charge ratio, pH, and the phosphorylcholine content on the formation, size, and stability of the polyplexes were investigated. The results show that the composition of these hybrids may be tailored to control the binding

strength as well as to improve the colloidal stability of the nanoparticles, thus opening new perspectives of controlling the chitosan–DNA polyplex properties.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosans (57 K and 150 K), used as starting materials were purchased from Wako Chemical Co. Water was deionized using a Milli-Q water purification system (Millipore). L-Glycerolphosphorylcholine cadmium dichloride was obtained from Sigma Chemical Co. Rhodamine isothiocyanate, sodium periodate, sodium cyanoborohydride, sodium hydroxide, sodium acetate, and acetic acid were purchased from Aldrich Chemical Co. The ion-exchange resins AG 501-X8 (D) and DOWEX 2X8-400 were obtained from Bio-Rad Laboratories and Supelco, respectively. All solvents were reagent grade and used as received. Spectra/pore membranes (Spectrum) were employed for dialysis. The sodium salt of highly polymerized calf-thymus DNA (10–15 kbp) was purchased from Sigma (St. Louis, MO) and used without further treatment. The protein contamination was determined to be negligible since $A_{280}/A_{260} = 1.90$ is an indication of the DNA purity [37].

2.2. Instrumentation

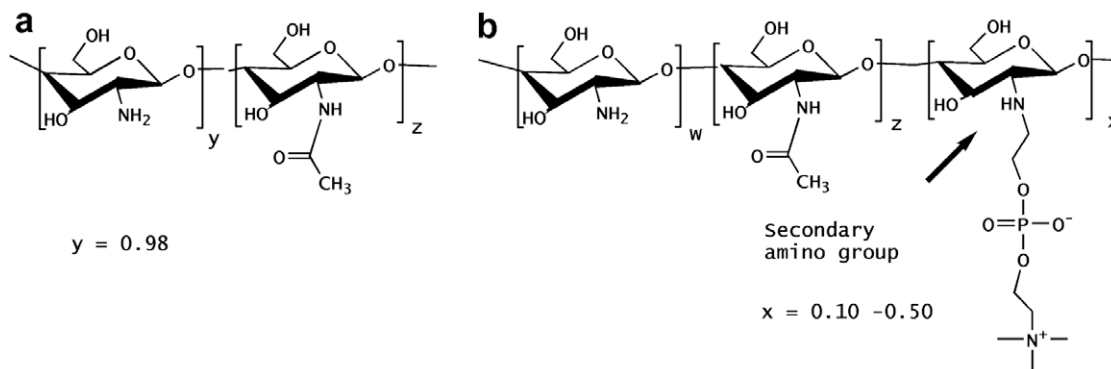
^1H NMR spectra were recorded on a Bruker ARX-400 400 MHz spectrometer. Infrared spectra were recorded on a Perkin–Elmer MIR instrument. UV/vis spectra were measured with a Cary 100 spectrometer.

2.3. Deacetylation of chitosan

A solution of chitosan (4.0 g, 2.45×10^{-3} mol of monosaccharide units) in aqueous acetic acid (200 ml, 2 wt%) was added dropwise to aqueous NaOH (100 ml, 50 wt%) at room temperature under magnetic stirring in a nitrogen atmosphere. At the end of the addition, the suspension was refluxed for 1 h. It was poured into stirred water (4 L) preheated to 80 °C. The precipitate was decanted, washed five times with water, and separated by filtration. The solid was dissolved in acetic acid (200 ml, 2 wt%) and subjected to the same procedure once more to achieve a higher degree of deacetylation. The resulting polymer was purified by dialysis against water for 3 days and isolated by lyophilization.

2.4. Degradation of CH 57 kDa

First, 0.51 g of chitosan was dissolved in acetic acid solution (30 ml, 2%). After complete dissolution, dissolved oxygen was



Scheme 1. (a) Chitosan and (b) phosphorylcholine-modified derivatives.

removed by bubbling N_2 gas in the solution for 1 h. The mixture was then cooled to 4 °C using an ice-water bath. A freshly prepared solution of $NaNO_2$ (2 ml, 0.06 M) was poured into the solution and the reaction was allowed to continue in darkness, at 4 °C for 24 h. The polymer was purified by dialysis (MW 6000–8000 cutoff, Spectra/pore) against deionized water for 2 days, 1 day against NaOH 0.05 M, and 2 days in water (water was changed three times a day) and isolated by lyophilization. The reaction yielded 0.334 g of product. The same procedure was employed to obtain 5-kDa chitosan, increasing the $NaNO_2$ concentration (2 ml, 0.18 M) and using an MWCO 3000 dialysis membrane.

2.5. Phosphorylcholine-substituted chitosans and rhodamine-labeled chitosans

The phosphorylcholine-substituted chitosans (PC_xCH) were prepared as described in Ref. [36]. The labeled chitosans were prepared using the rhodamine isothiocyanate derivative. The procedure is illustrated below for the synthesis of rhodamine-labeled chitosan. Chitosan 57 kDa (218 mg) was dissolved overnight in acetic acid solution (20 ml 0.02 M). Thereafter, the pH of the solution was adjusted to 6.0 by adding aqueous NaOH (0.05 M) and the solution was degassed and kept under N_2 atmosphere. Next, rhodamine isothiocyanate (12 mg) was dissolved in methanol (5 ml) and injected dropwise into the chitosan solution under stirring. The solution was protected from light throughout the experiment and the reaction time was 24 h. The reaction mixture was dialyzed (membrane of MWCO 12,000–14,000 or MWCO 3000) first against water for 3 days, then against aqueous NaOH (0.05 M) for 1 day, and finally against water for 3 days. To determine the labeling efficiency, solutions of the rhodamine-labeled chitosans were prepared in acetic acid buffer/methanol (v/v) at pH 4.5 and the absorbance was measured at 554 nm. A calibration curve was prepared with solutions of 3.5×10^{-6} – 2×10^{-5} mol/L using a stock solution of rhodamine derivative (0.93 mg/10 ml). The other rhodamine-labeled chitosans were prepared under identical conditions to yield from 0.8 to 1.45% substituted amino groups (Table 1).

2.6. dn/dc and molecular-weight measurements

Molecular-weight characteristics were obtained using a GPC system consisting of an Agilent 1100 isocratic pump, a TSK-GELPW (Tosoh Biosep) column, a Dawn EOS multiangle laser light scattering detector (Wyatt Technology Corp.), and an Optilab DSP interferometric refractometer (Wyatt Technology Corp.); injection volume, 100 μ l; flow rate, 0.5 ml min^{-1} ; eluent, acetic acid (0.3 M)/sodium acetate(0.2 M) buffer, pH 4.5, 25.0 °C. The samples were prepared by weighing the exact amount to obtain solutions varying from 0.5 to 1.0 mg/ml followed by stirring for 3 days and filtering (0.45 μ m) immediately before the injection.

For dn/dc measurement experiments, a stock solution of each PC-CH was prepared by dissolution of 1.0 mg/ml in 5 ml of acetic

acid (0.3 M)/sodium acetate(0.2 M) buffer at pH 4.5. Then, the stock solution was diluted in the buffer to yield five final polymer concentrations varying between 1.0 and 0.2 mg/ml. These solutions were stirred for 3 days. A part of each solution was filtered in a 0.45- μ m filter, and the refractive index increments were measured consecutively using a differential Optilab DSP interferometric refractometer (Wyatt Technology Corp.). All data were acquired, stored, and processed with the software Astra V 5.1.5.

2.7. Ethidium bromide displacement assay

A stock solution of ethidium bromide (EtBr, 2.5×10^{-3} M) was prepared in water and this solution (2.5 μ l) was added to the cuvettes containing the appropriate buffers (2 ml of 10 mM, pHs 4.0, 6.3, and 7.0), and was mixed by gentle agitation. A stock solution of calf-thymus DNA was added to the solution to obtain a concentration of 1.5×10^{-5} mol of phosphate. The solution was left to rest for 15 min. The solutions containing the DNA-ethidium bromide (DNA-EtBr) complex were titrated into the cells to reach a predetermined monomer:nucleotide molar ratio (N/P ratio) using microsyringes. After each addition, the solution was briefly stirred prior to measurement of the fluorescence (five readings). The excitation wavelength (λ_{ex}) was set at 560 nm and the emission wavelength (λ_{em}) at 605 nm. Steady-state fluorescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse spectrometer. The temperature control of the samples was achieved using a water-jacketed cell holder connected to a Cary circulating water bath. All measurements were carried out at 25.0 ± 0.1 °C unless otherwise stated and the slit settings were 5 nm for both excitation and emission. The total chitosan solution added to the DNA solution did not exceed 5% of the total volume of the solution, and hence no correction was made for sample dilution.

2.8. Chitosan and PC-chitosan/DNA nanoparticle formation

PC-CH samples were dissolved in the appropriate buffer at room temperature. A stock solution of calf-thymus DNA was added to test tubes containing 2 ml of the appropriate buffer to adjust the concentration of phosphate groups to 3.0×10^{-5} M as determined by the UV absorption at 260 nm, using a molar extinction coefficient, $6600 M^{-1} cm^{-1}$. Chitosan solutions were then injected into the tubes to obtain different N/P ratios. Stock solutions (1.0–1.5 mg/ml) of the PC-CH samples were used to titrate DNA solutions, which were vortexed briefly, kept at room temperature for 30 min, and analyzed by dynamic light scattering without further treatment. Measurements as a function of time (days) were carried out using the same solutions stored at 4 °C.

2.9. Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a CGS-3 goniometer (ALV GmbH) equipped with an ALV/LSE-5003

Table 1
Properties of the deacetylated and phosphorylcholine-modified chitosans.

Polymer	DS ^a (degree of substitution)	M_w (g mol^{-1})	M_w/M_n	Rhodamine (mol% of glucosamine)
CH 5 kDa	–	5.38×10^3	1.14	1.25
CH 10 kDa	–	9.29×10^3	1.07	
CH 57 kDa	–	5.67×10^4	1.29	0.86
CH 150 kDa	–	1.475×10^5	1.69	
PC ₁₀ CH	11 ± 1	5.14×10^4	1.32	
PC ₂₀ CH	22 ± 1	6.21×10^4	1.65	
PC ₄₀ CH	40 ± 2	6.00×10^4	2.17	1.45
PC ₅₀ CH	53 ± 1	3.98×10^4	1.62	

^a Data from Ref. [36].

multiple- τ digital correlator (ALV GmbH), a He–Ne laser ($\lambda = 632$ nm), and a C25P circulating water bath (Thermo Haake). The temperature was 25 °C unless otherwise stated. Prior to preparation the Milli-Q water and all buffers were filtered through 0.2- μ m filters, the test tubes having previously been washed with Milli-Q water. In DLS experiments, one measures the normalized time autocorrelation function of the scattered intensity, which can be expressed in terms of the autocorrelation function of the concentration fluctuations. A cumulant analysis was applied to obtain the diffusion coefficient (D) of the scattering objects in solution. Extrapolation of the first reduced cumulant $(\tau q^2)^{-1}$ to $q = 0$ yields the value of D . The hydrodynamic radius (R_h) of the nanoparticles was obtained using the equation

$$D = k_B T / 6\pi\eta_s R_h$$

where k_B is the Boltzmann constant, η_s the viscosity of the solvent, and T is the absolute temperature.

2.10. Gel electrophoresis

Gel electrophoresis was performed with a 0.75% agarose gel in 40 mM Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer at pH 7.4. The ct-DNA–chitosan nanoparticles of N/P ratios of 1–10 were prepared at a constant DNA concentration and incubated for 30 min at room temperature. Next, complex solution (8 μ l, 30 μ g/ml of DNA) was loaded into the agarose gel wells. After electrophoresis (80 V, 1.5 h), the DNA was stained by incubating the gels in TAE buffer of pH 7.4 containing 15 μ l EtBr (1.0 mg/ml) for 20 min.

2.11. Zeta potential and photomicroscopy of the chitosan–DNA polyplexes

The zeta potential of nanoparticles was determined by photon correlation spectroscopy (PCS) using the dynamic light scattering technique, on a Zetasizer 3000 apparatus from Malvern Instrument (Worcestershire, UK), equipped with a 10-mW He–Ne 633-nm laser beam, at 25 °C, using a scattering angle of 90°. The polyplexes were prepared at an N/P of 5 and final ct-DNA concentration of 25 μ g/ml in 10 mM HAC/NAc buffer at pH 4.0 or 10 mM phosphate of pH 6.3, both with an ionic strength of 10 mM. All measurements were carried out at 25 °C. Photomicrographs of the chitosan–DNA nanoparticles were performed on a Zeiss-Jenaval (Jena, Germany) fluorescence photomicroscope equipped with a fluorescence filter for rhodamine.

3. Results and discussion

3.1. Chitosan characterization

The molecular characteristics of the all chitosans samples used for the preparation of PC-CH-DNA and CH-DNA nanoparticles are presented in Table 1. The deacetylation procedure, repeated twice, provided a deacetylation degree of 98% without significant degradation of the chitosan as judged by GPC analysis. The two chitosan samples employed (MW = 57 kDa and MW = 150 kDa) were deacetylated efficiently and had similar deacetylation degrees determined from potentiometric titration. The chromatograms

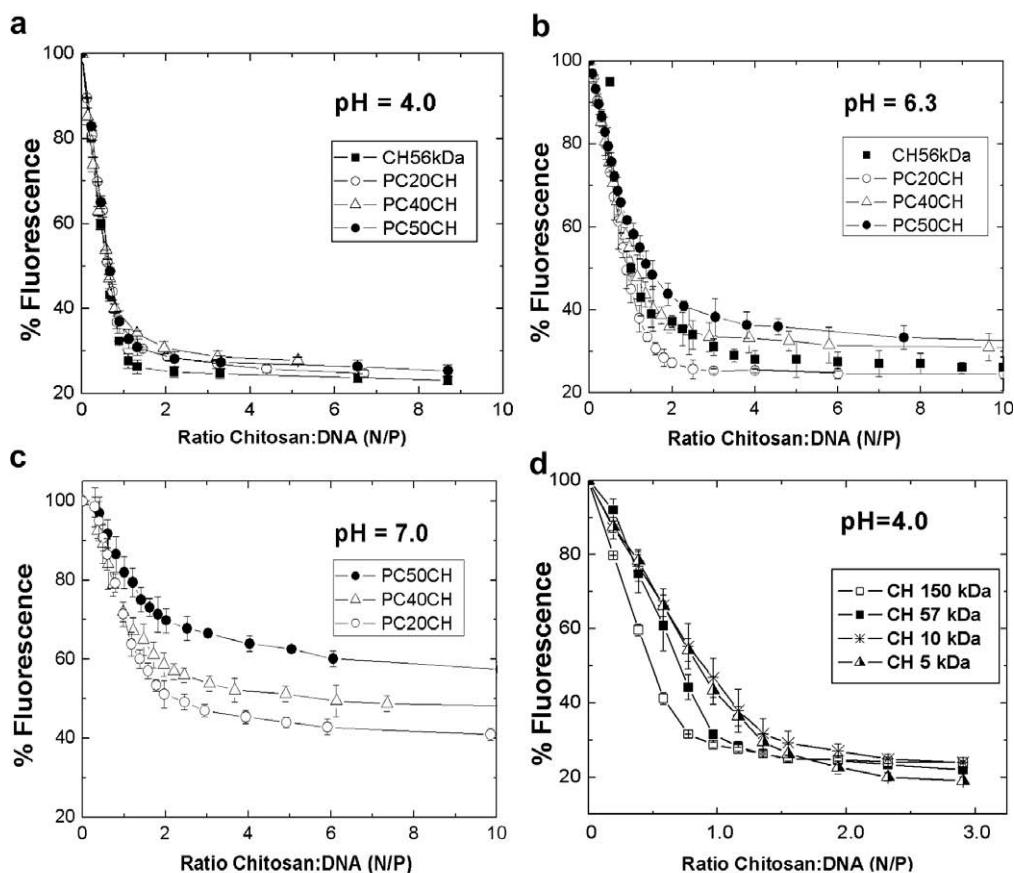


Fig. 1. (a)–(c) Titration of ct-DNA–EtBr solution by deacetylated chitosan and PC-CH with different fractions of phosphorylcholine units (PC) at different pH values (a–c). The fluorescence intensity relative to the fluorescence of ct-DNA–EtBr in the absence of polycation is plotted as a function of nitrogen/phosphate (N/P) ratio. Data points represent the mean (SD (n 3)). The following buffers were used: (a) HAC/NAc, pH 4.0, (b) phosphate, pH 6.3, and (c) phosphate, pH 7.0; ionic strength 10 mM. (d) Molecular effect of chitosan on ct-DNA–EtBr fluorescence.

for chitosan samples having different molecular weights exhibited a highly distinct Gaussian shape for all traces (data not shown). Also for chitosans of 10 kDa and 5 kDa both traces, IR and light scattering detectors, show that the degradation procedure and purification were successful at obtaining homogeneous samples presenting good polydispersities. Table 1 shows the molecular characteristics for the PC-CH of various degrees of substitution (DS), which were prepared from 57-kDa CH as described in Ref. [36].

3.2. Ethidium bromide assay

The interaction of PC-CH and CH with calf-thymus DNA was monitored by a fluorescence quenching technique using the cationic dye ethidium bromide. The fluorescence quantum yield (Φ_f) of EtBr in aqueous solution is negligible, whereas in the presence of native double-stranded DNA, Φ_f increases due to intercalation of the dye between base pairs and formation of DNA–EtBr complexes. Addition of polycations to aqueous solutions of the DNA–EtBr complex results in a pronounced decrease of fluorescence intensity due to the competitive displacement of the dye by the polycation polyelectrolyte to form a DNA complex. Titrations of DNA–EtBr aqueous solutions with chitosan solutions were conducted for different pH values (4.0, 6.3, and 7.0). The data are presented in Fig. 1 as relative fluorescence intensity in the absence of polycations vs. nitrogen/phosphate (N/P) ratio. All titration curves are presented as a function of the overall N content of the PC-substituted and unsubstituted amino groups. A decrease of ethidium fluorescence was observed for all mixtures, indicating that DNA–chitosan complexes form at all pH values.

The quenching was more pronounced for solutions of lower pH values (Fig. 1). At pH 4.0 the addition of CH had a higher efficiency and the leveling off of the EtBr fluorescence occurred for 25% of the initial fluorescence when the charge ratio was close to 1. However, a comparison between CH with phosphorylcholine chitosans (PC-CH) (Fig. 1a) shows that at low pH almost the same efficiency was observed for all PC-CH. At pH 4.0 and 5.0 almost all amino groups (substituted and unsubstituted) are involved in formation of ion pairs with phosphate groups of DNA and this result can be rationalized by taking into account that negative charges from phosphorylcholine groups are counter-balanced by the charged substituted amino groups, making the PC tertiary amino groups able to interact with the DNA phosphate groups.

Increasing the pH from 4 to 6.3 resulted in only minor changes in EtBr fluorescence. For CH at pH 6.3 a level of 25% was reached only at N/P ratio 2.0, which corresponds to half-ionized amino

groups and reflects the electrostatic nature of the interaction. At pH 6.3 the interaction is weaker for most substituted chitosans and shifts toward higher fluorescence levels for PC₂₀CH, PC₄₀CH, and PC₅₀CH (Fig. 1b). Further increase in pH to 7.0 significantly decreased the interaction between PC-CH and DNA while the fluorescence decreased only to 70% of the initial fluorescence for PC₅₀CH and to about 50% for PC₄₀CH and PC₂₀CH (Fig. 1c). At this pH (discussed in greater detail below) the interactions are still sufficiently strong to obtain nanoparticles, which makes these hybrids more appropriate for utilization near the physiological pH. This can be explained by the higher pK_a of the PC-substituted amine groups (pK_a 7.20) compared to the pK_a of CH [35]. At pH 7.0 ionization degrees (α) of PC₄₀CH and PC₂₀CH were estimated to be 25% of the available amino groups, enabling electrostatic interaction with DNA [36].

The effect of molecular weight of CH on chitosan–DNA interaction is clearly noted only for N/P ratios below 2.0. This effect is discernable in Fig. 1d, where we compare titrations of the DNA–EtBr complex at pH 4.0 with four deacetylated chitosans (150, 57, 10, and 5 kDa). The chitosans 57 and 150 kDa displaced EtBr more efficiently, thus indicating that the chitosan–DNA interaction is dependent on molecular weight. A comparison between 5- and 10-kDa chitosans shows no difference within experimental error. For N/P ratios higher than 2 the leveling off of EtBr fluorescence was the same for all tested chitosan samples, i.e., for 5- and 10-kDa chitosans a higher concentration was needed to displace the same amount of EtBr from the ct-DNA–EtBr complex.

3.3. Gel electrophoresis

The stability of the complexes formed between DNA and chitosans of varying composition and molecular weights was assessed also by gel electrophoresis (Fig. 2). Uncomplexed ct-DNA is loaded in the first lane on the left, while ct-DNA–CH complexes prepared at pH 4.0 with 5, 10, 57, and 150 kDa, PC₁₀CH and PC₅₀CH of increasing N/P ratios were loaded in the other lanes. As expected the ct-DNA shows a long trail due to the high size polydispersity of the DNA sample. Polyplexes formed at pH 4.0 with nonmodified CH exhibited no DNA release when the N/P ratios were higher than 1.0, except in the case of 5-kDa chitosan, which releases DNA for N/P ratio 1.0. This result confirms the observations from the ethidium bromide assay, which indicated that for N/P ratio 1.0 the 5-kDa CH is able to displace only about 50% of EtBr from DNA. Also, the polyplexes prepared with modified chitosans PC₁₀CH and PC₅₀CH remained stable for N/P ratios higher than 1.0 and 4.0, respectively. The tendency to release DNA by PC₁₀CH is higher than that

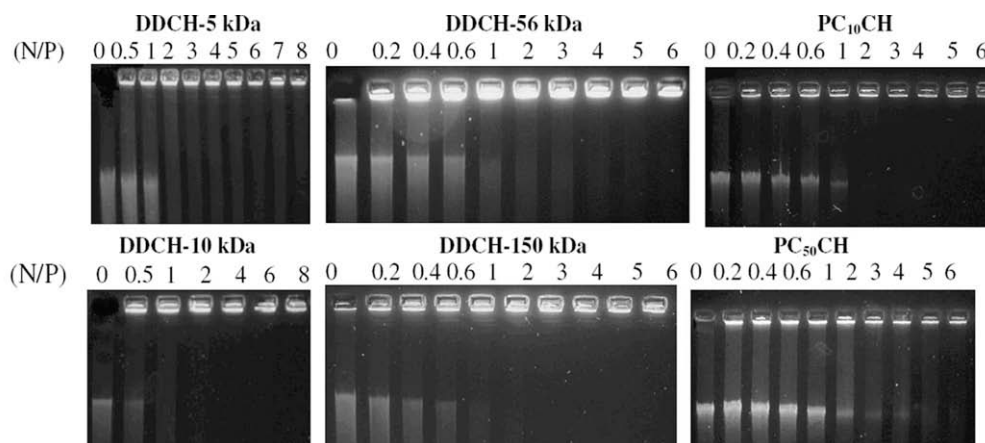


Fig. 2. Electrophoresis of chitosan–DNA nanoparticles to determine the physical stability of chitosan-based polyplexes in gel retardation assay at pH 4.0. The N/P ratios are indicated on top of the lanes.

observed for 57-kDa CH but similar to that observed for the lower molecular weight 5-kDa CH. These results may be attributed to the voluminous phosphorylcholine groups, which can prevent the polymer chains from getting close to each other, weakening electrostatic and possible hydrogen bond interactions. Hydrogen bonding between hydroxyl groups of chitosan and the DNA base pairs could also be affected by the presence of PC groups. The importance of hydrogen bonds in the polycation–DNA interaction has been recently postulated to explain the differences between the binding strengths observed in poly(glycoamidoamine)s bearing different hydroxyl stereochemistries of the carbohydrate moieties [38].

3.4. Zeta potential of the polyplexes

The zeta potential of free DNA was found to be around -30 mV. The zeta potentials at low pH were very similar for all chitosan–DNA complexes and, as can be seen from Fig. 3 with increasing N/P ratios, the zeta potential gradually increased reaching a plateau value of around 30 mV for an N/P ratio of 4–6. These results confirm that at low pH the strength of the PC–CH–DNA interaction is similar to that exhibited by 57-kDa CH. The increase in zeta potential with increased N/P ratios can be ascribed to a gradual neutralization of the negatively charged DNA by the positively charged chitosan. For high N/P ratio, the zeta potential remains constant implying that the added CH does not participate in complexation but remains dissolved in the aqueous media as free polymer chains. The zeta potential of the DNA/PC_xCH complexes also increases with increasing N/P ratios, until attaining a plateau value. The zeta potential was molecular-weight dependent at pH 6.3 (see Fig. 3b). Also, at this pH, the incorporation of phosphorylcholine in the chitosan had a similar effect, i.e., N/P ratio at which the plateau value was reached increased with PC content. However, at pH 6.0 the zeta potential gradually rose to a plateau value of around 15 mV at an N/P ratio of 4–6, thus indicating that a smaller amount of the polymer was condensed on the polyplexes. This result agrees closely with the ethidium bromide fluorescence assay which showed a reduced displacement of EtBr with increasing pH.

3.5. Dynamic light scattering

Dynamic light scattering measurements were performed to evaluate the effect of the phosphorylcholine moieties on the size and stability of the chitosan–DNA nanoparticles. The polycation–DNA interaction is driven mainly by the electrostatic interaction between polycations and the charged phosphate groups leading

to reversible linear-to-globule transition of DNA. It is well known that at a certain critical polycation:DNA ratio, DNA undergoes localized bending or distortion, which facilitates the formation of nanoparticles that present different shapes including rods, toroids [42–44], and spheroids [45].

In general at low pH (pH 4.0) deacetylated chitosan and all PC–CH derivatives induced the formation of small nanoparticles at ratios higher than 1.0. However, the DNA transition from linear to globule occurs even at ratios (N/P) as low as 0.5. Typical DLS intensity autocorrelation functions, at a scattering angle of 90° and T of 25°C , are displayed in Fig. 4 for PC₂₀CH at pH 4.0. It can be seen that even for low N/P ratios, the correlation function shifts to shorter times as N/P increases, indicating that the conformational transition starts to occur at low ratios. The same shift to shorter times was observed for the correlation functions obtained for PC₂₀CH/DNA mixtures at pHs 5.0 and 6.3, when dissociation degrees (α) for PC₂₀CH are 0.90 and 0.51, respectively (data not shown). These results confirm that conformational transition of DNA is also induced by the partially charged chitosan. All measured nanoparticle sizes are collected in Table 2. This change in the DNA conformation was also detected by circular dichroism. The ct-DNA spectrum exhibited initially both a positive and a negative cotton effect at 274 and 246 nm, respectively [38]. The addition of CH from 0 to 8 N/P ratio produced a red shift in the DNA spectrum and a loss of rotational strength of the positive band (data not shown).

Increasing the solution pH from 4 to 5.0 did not affect drastically the nanoparticle sizes in this pH range and the hydrodynamic radius (R_h) for CH/DNA and all PC–CH/DNA ranged from 90 to 130 nm, except those nanoparticles formed with CH 5 kDa at pH 4.0 whose R_h s remained around 65 nm for N/P ratios higher than 2.0 (Table 2). Since at these pH values almost all amino groups are charged, the sizes distributions were not significantly affected by the N/P ratio. However, in solution of pH 6.3 the nanoparticle formation was highly influenced by the N/P ratio and the presence of PC moieties. CH/DNA complexation formed smaller nanoparticles (R_h 205 nm) only for N/P ratios higher than 4.0. Large aggregates formed at lower N/P ratios and it was necessary to add a large excess of chitosan to avoid aggregation of the nanoparticles. In contrast complexation of DNA and PC₂₀CH and PC₄₀CH at pH 6.3 occurred at lower ratios such as 2.0 or 3.0 resulting in nanoparticles having R_h s of 110–160 nm. This result can be seen in Fig. 5a where the hydrodynamic radii as a function of the N/P ratio are presented for the complexation of DNA with CH-57 kDa, PC₂₀CH, and PC₄₀CH. As can be seen in Fig. 5a for N/P ratios smaller than 4.0 only large aggregates are formed because CH is half ionized

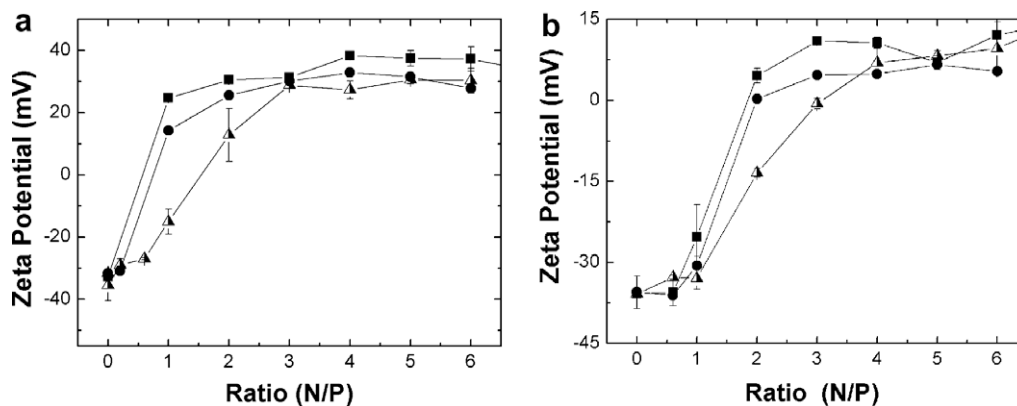


Fig. 3. Zeta potentials of ct-DNA–chitosan polyplexes as a function of N/P ratio. Polyplexes were prepared with ■, CH-57 kDa; ●, PC₅₀CH; and △, CH-5 kDa in 10 mM HAc/NaAc of pH 4.0 (a) or phosphate buffer pH 6.3 (b), with a constant ionic strength of 10 mM. Results are expressed as the mean (SD of three samples, with at least two readings of each).

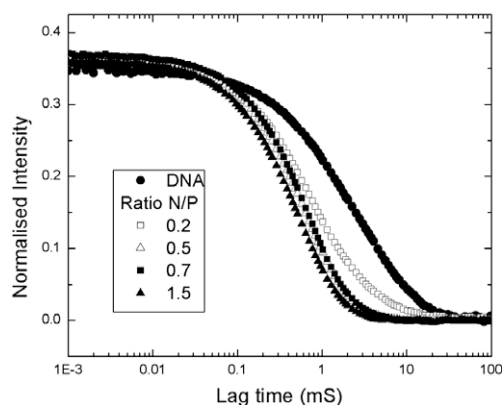


Fig. 4. Normalized intensity correlation functions for ct-DNA and for PC₂₀CH/DNA nanoparticles at pH 4.0 for increasing N/P ratios.

and the nanoparticles present only slightly positive zeta potentials (see Fig. 3). On contrary PC₂₀CH and PC₄₀CH formed nanoparticles with radii of 110–160 nm at N/P ratio equal or higher than 2.0. The changes in size distribution of the nanoparticles as a function of the composition are shown in Fig. 5b. A broad size distribution was obtained for CH/DNA at pH 6.3, indicating the formation of large aggregates even for high N/P ratios. However, the size distributions were narrower for the complexes of DNA with PC-CH. This suggests that the presence of the PC group provides more homogeneous nanoparticle sizes compared to CH/DNA, i.e., narrower polydispersities. This result can be attributed to the presence of the hydrophilic PC groups which may create a hydrophilic shell on the nanoparticle surface, leading to a lesser tendency to aggregation.

In solutions of pH 7.0, only PC₂₀CH and PC₄₀CH were able to form nanoparticles with DNA for N/P ratios higher than 3.0 and 4.0, respectively (see Table 2). CH itself is insoluble under these conditions. The explanation for this difference is once more based on both the electrostatic interaction and the presence of PC

moieties. As reported previously, the substituted glucopyranose rings present higher pK_a values than those of unsubstituted ones [36]. Nanoparticles for PC₂₀CH and PC₄₀CH are formed due to protonation of the substituted amino groups. For PC₂₀CH and PC₄₀CH the ionization degree is approximately 0.3, which provides sufficient electrostatic interaction needed to induce the collapse of DNA and consequently the formation of nanoparticles. The overall view of the effect of PC content and pH on nanoparticle radii is that PC-CH is less affected by pH increase than CH (Table 2). At pH values 6.3 and 7.0, the nanoparticle size increases more for chitosan, compared to those formed by PC-CH. The nanoparticle sizes for PC₂₀CH and PC₄₀CH at pH 7.0 and ionic strength of 10 mM were also measured as a function of time up to 30 days and remained stable (see Fig. 6). However, the interaction of DNA with PC₅₀CH at pH 7.0 and N/P ratios from 1 to 6 resulted in the formation of large aggregates (Table 2). At this pH all nonsubstituted amino groups are deprotonated and the ionization degree (α) of PC₅₀CH is about 0.28; however, the high number of phosphorylcholine groups combined with the low charge density on the polymer chain leads to aggregation of PC₅₀CH–DNA nanoparticles.

It has been shown that the sizes of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation with triphosphosphate anions (TPP) or by interaction with DNA may be affected by both the pH and the ionic strength of the solution [10,39–41]. The diameters of the nanoparticles increase with the salt concentration; however, the effect is dependent on the molecular weight of chitosan [10,39] and may lead to the swelling and disintegration of the nanoparticles [40]. The hydrodynamic radii were also measured at increasing ionic strengths from 10 to 300 mM for PC₁₀CH/DNA and PC₄₀CH/DNA nanoparticles at pH 7.0 after 24 h of preparation (Table 3). In this period of time our results showed that R_h increased modestly with ionic strength for nanoparticles prepared with PC₁₀CH and PC₄₀CH at pH 7.0. At an ionic strength of 150 mM PC₄₀CH/DNA nanoparticles exhibited a main distribution of nanoparticles with hydrodynamic radii (R_h) of about 110 nm and volume fraction of 90% and only a small contribution of 10% of larger aggregates with hydrodynamic radii (R_h) of 1200 nm, while PC₁₀CH/DNA nanoparticles increases with ionic strength from 110 to 125 nm in the range

Table 2

Particle size analysis of complexes prepared from chitosan–phosphorylcholine with calf-thymus DNA (10 mM buffers at varying pH).

pH	(N/P) ratio	Hydrodynamic radii $R_h \pm SD$ (nm)				
		CH-5 kDa	CH-57 kDa	PC ₂₀ CH	PC ₄₀ CH	PC ₅₀ CH
4.0	0.5:1.0	297.6 (± 15)	118 (± 6)	114 (± 2)	96 (± 9)	130 (± 17)
	1:1	193.5 (± 24)	151 (± 30)	130 (± 5)	104 (± 11)	–
	2:1	117 (± 5)	92 (± 2)	113 (± 9)	90 (± 4)	95 (± 9)
	3:1	65 (± 8)	89 (± 2)	105 (± 2)	93 (± 7)	94 (± 5)
	5:1	64 (± 4)	76 (± 2)	118 (± 1)	108 (± 8)	98 (± 2)
	6:1	67 (± 5)	113 (± 13)	116 (± 13)	128 (± 11)	111 (± 9)
5.0	0.5:1.0	–	144 (± 4)	131 (± 4)	216 (± 36)	146 (± 16)
	1:1	–	343 (± 17)	–	–	137 (± 1)
	2:1	–	124 (± 11)	103 (± 9)	116 (± 3)	87 (± 2)
	3:1	–	111 (± 7)	105 (± 2)	108 (± 15)	95 (± 10)
	5:1	–	117 (± 2)	122 (± 10)	110 (± 15)	110 (± 15)
	6:1	–	115 (± 6)	130 (± 10)	113 (± 12)	100 (± 5)
6.3	0.5:1.0	–	200 (± 18)	159 (± 3)	215.5 (± 36)	368 (± 8)
	1:1	–	1598 (± 264)	284 (± 130)	–	284 (± 22)
	2:1	–	1300 (± 75)	164 (± 16)	115.5 (± 3)	768 (± 18)
	3:1	–	893 (± 249)	123 (± 3)	108 (± 15)	922 (± 102)
	5:1	–	205 (± 10)	126 (± 2)	110 (± 15)	173 (± 36)
	6:1	–	157 (± 12)	152 (± 19)	113 (± 12)	149 (± 5)
7.0	0.5:1.0	–	–	–	816 (± 75)	410 (± 85)
	1:1	–	–	144 (± 3)	126 (± 7)	851 (± 36)
	2:1	–	–	1130 (± 19)	713 (± 38)	336 (± 3)
	3:1	–	–	217 (± 2)	882 (± 165)	1041 (± 129)
	5:1	–	–	138 (± 20)	154 (± 8)	1080 (± 120)
	6:1	–	–	134 (± 5)	135 (± 3)	1258 (± 42)

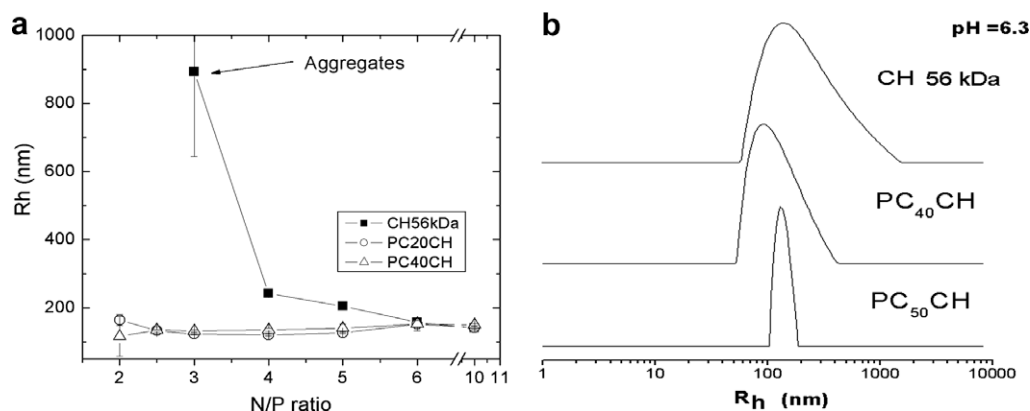


Fig. 5. (a) Nanoparticle sizes as a function of N/P ratio for complexes of ct-DNA with CH-57 kDa; PC₂₀CH and PC₄₀CH at pH 6.3. (b) Nanoparticle size distributions at N/P ratio 5.0 and pH 6.3.

studied here (10–300 mM) (Table 3). On the contrary deacetylated chitosan CH forms large particles with DNA even at pH 6.3, showing the higher tendency of these complexes to aggregation compared to PC-CH/DNA nanoparticles. However, after 1 week at ionic strength of 150 mM, nanoparticles prepared using both PC₁₀CH and PC₄₀CH formed a mixture of small particles and large aggregates of around 5 μ m (data not shown).

The nanoparticle sizes were qualitatively assessed by fluorescence microscopy using rhodamine-labeled chitosan derivatives. The imaging observation correlated well with the data obtained from light scattering measurements. At low pH nanoparticles obtained with CH are seen as well separated red dots (smaller than 1 μ m) even for solutions kept for 3 weeks (Fig. 7a). However, at pH 6.3 and N/P ratio 5.0, large aggregates varying from 3 to 5 μ m were observed for nanoparticles synthesized with CH (Fig. 7c). This result also agrees with light scattering data obtained for solution at this pH whose nanoparticle size distributions at pH 6.3 varied more widely than those obtained for nanoparticles synthesized with PC derivatives (see Fig. 5b). A similar result was also obtained from microscopy of the nanoparticles obtained with CH 5 kDa, which also exhibited the formation of large aggregates at pH 6.3 (data not shown). On the contrary the photomicrographs from PC₄₀CH/DNA recorded in solution of pH 7.0 revealed that nanoparticles synthesized are more uniform in size as seen in Fig. 7d. These results clearly support the hypothesis that polyplexes synthesized using unmodified chitosan [32,34,46] and other cationic polymers [46,47] may aggregate when stored for long periods due to their

high hydrophobicity or by bridging between the complexes caused by extended polymer chains or loops [48].

4. Summary

Phosphorylcholine-substituted chitosans form complexes with DNA, which vary in properties according to PC content, pH, and charge ratio. At low pH both the deacetylated chitosan and the PC-CH bind efficiently to DNA, which can be attributed to the electrostatic interaction between charged amino groups and the DNA phosphate groups. The interaction of PC-CH with DNA at neutral pH leads to formation of stable nanoparticles, which is attributed to the higher pK_a value of PC-substituted amine groups. For PC-CH the N/P ratio must be increased to accomplish total DNA binding as phosphorylcholine increases. At low pH values the size and zeta potential of nanoparticles did not vary significantly among the different degrees of PC-CH samples. In solutions of pH 6.3 the formation of small nanoparticles for CH occurred only for N/P ratios higher than 5.0. In contrast in pH 6.3 PC-CH were able to form stable particles for N/P of 2.0. At pH 7.0 nanoparticles synthesized with PC₂₀CH and PC₄₀CH were stable for 1 month with no sign of aggregation at 10 mM of ionic strength. An increase in ionic strength had minor effects on size and polydispersity of PC-CH/DNA nanoparticles, while the sizes of CH/DNA nanoparticles were

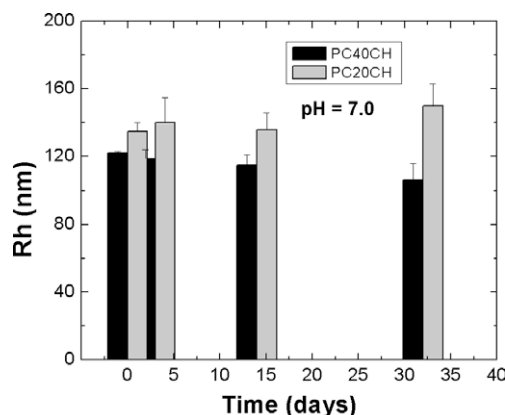


Fig. 6. Nanoparticle size as a function of time for complexes of PC₂₀CH and PC₄₀CH with calf-thymus DNA at N/P 5.0 (10 mM buffers at pH 7.0).

Table 3

Particle size analysis of complexes prepared from chitosan and chitosan-phosphorylcholine with calf-thymus DNA at varying ionic strengths (N/P = 5.0).

Chitosan sample	Ionic strength (mM)	R_{h1} (nm)	R_{h2} (nm)
CH (pH 6.3)	10	130 $\pm$ 6 (11.0)	450 $\pm$ 18 (89.0)
	50	131 $\pm$ 2 (24.0)	685 $\pm$ 7 (76.0)
	100	125 $\pm$ 5 (82.0)	842 $\pm$ 25 (19.0)
	150	124 $\pm$ 3 (73.0)	750 $\pm$ 13 (27.0)
	300	123 $\pm$ 3 (100.0)	
PC ₁₀ CH (pH 7.0)	10	101 $\pm$ 5 (100)	–
	50	117 $\pm$ 1 (100)	–
	100	104 $\pm$ 4 (100)	–
	150	118 $\pm$ 1 (100)	–
	300	125 $\pm$ 4 (100)	–
PC ₄₀ CH (pH 7.0)	10	105 $\pm$ 2 (100)	–
	50	110 $\pm$ 3 (100)	–
	100	101 $\pm$ 3 (90.5)	1188 $\pm$ 40 (9.5)
	150	102 $\pm$ 2 (88.5)	1117 $\pm$ 6 (11.4)
	300	140 $\pm$ 3 (88.5)	

The measurements were performed after 24 h of preparation (volume fractions are shown in parentheses).

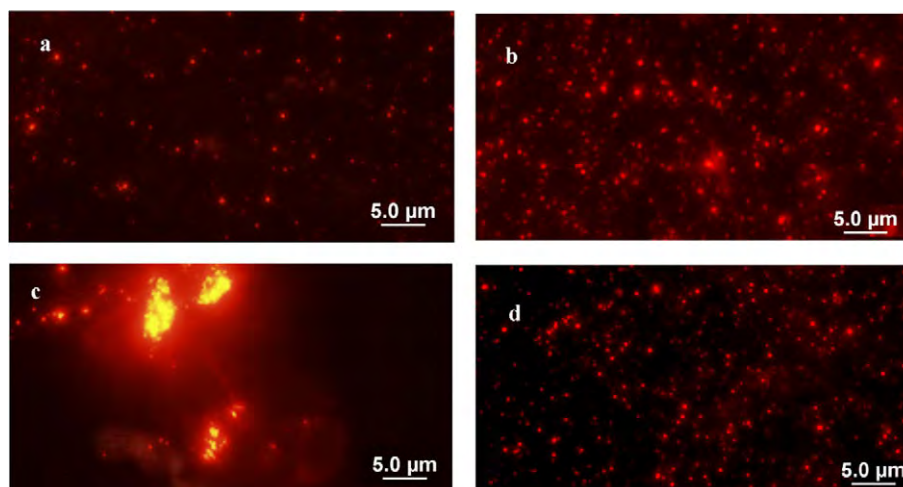


Fig. 7. Photomicrographs of the rhodamine-labeled chitosan–DNA nanoparticles at different pH values with a constant ionic strength of 10 mM, after storage at 4 °C for 3 weeks: CH-57 kDa at (a) pH 4.0 and (c) pH 6.3; and PC₄₀CH at (b) pH 4.0 and (d) pH 7.0.

substantially increased forming large particles. Therefore, the nanoparticles synthesized using PC-CH polymers provide new perspectives for controlling the properties of polyplexes.

Acknowledgments

This work was supported by a Grant (2007/00339-7) from Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) to M.J.T, by a Ph.D. scholarship from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) program to A.H.C., and by a scholarship from Fapesp to I.P.D.P.

References

- [1] M. Thanou, B.I. Florea, M. Geldof, H.E. Junginger, G. Borchard, *Biomaterials* 23 (2002) 153.
- [2] K. Corsi, F. Cellat, L. Yahia, J.C. Fernandes, *Biomaterials* 24 (2003) 1255.
- [3] L. Qi, Z. Xu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 4243.
- [4] H. Dai, X. Jiang, G.C. Tan, Y. Chen, M. Torbenson, K.W. Leong, H.-Q. Mao, *Int. J. Nanomed.* 1 (2006) 507.
- [5] S.C.W. Richardson, H.V.J. Kolbe, R. Duncan, *Int. J. Pharm.* 178 (1999) 231.
- [6] K. Roy, H.-Q. Mao, S.-K. Huang, K.W. Leong, *Nat. Med.* 5 (1999).
- [7] I.M. van der Lubben, J.C. Verhoef, G. Borchard, H.E. Junginger, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52 (2001) 39.
- [8] R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Claspell, A.P. Rolland, *Proc. Int. Sympos. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22 (1995) 178–179.
- [9] J.C. Fernandes, M.J. Tiera, F.M. Winnik, in: C.S.S.R. Kumar (Ed.), *Biological and Pharmaceutical Nanomaterials*, Wiley, New York, 2005, p. 200.
- [10] F.R.J. MacLaughlin, J. Wang, J.M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe, A.P.J. Rolland, *J. Control. Release* 56 (1998) 259.
- [11] T. Sato, T. Ishii, Y. Okahata, *Biomaterials* 22 (2001) 2075.
- [12] T. Ishii, Y. Okahata, T. Sato, *Biochim. Biophys. Acta* 1514 (2001) 51.
- [13] H.-Q. Mao, K. Roy, V.L. Troung-Le, K.A. Janes, K.Y. Lin, J.T. August, K.W. Leong, *J. Control. Release* 70 (2001) 399.
- [14] V. Chan, H.Q. Mao, K.W. Leong, *Langmuir* 17 (2001) 3749.
- [15] M.A. Wolfert, L.W. Seymour, *Hum. Gene Ther.* 3 (1996) 269.
- [16] P. Erbacher, S. Zou, T. Bettinger, A.-M. Steffan, J.-S. Remy, *Pharm. Res.* 15 (1998) 332.
- [17] J. Akbuga, E. Ozbas-Turan, N. Erdogan, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 501.
- [18] W.G. Liu, X. Zhang, S.J. Sun, G.J. Sun, K. De Yao, *Bioconj. Chem.* 14 (2003) 782.
- [19] S.C. De Smedt, J. Demeester, W.E. Hennink, *Pharm. Res.* 17 (2000) 13.
- [20] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 649.
- [21] A. des Rieux, V. Fievez, M. Garinot, Y.-J. Schneider, V.J. Préat, *J. Control. Release* 116 (2006) 1.
- [22] B. Carreno-Gomez, R. Duncan, *Int. J. Pharm.* 148 (1997) 231.
- [23] J. Heller, L.S. Liu, R. Duncan, S. Richardson, *Proc. Int. Sympos. Control. Release Bioact. Mater.* 23 (1996) 269–270.
- [24] T.-H. Kim, H.-L. Jiang, D. Jere, I.-K. Park, M.-H. Cho, J.-W. Nah, Y.-J. Choi, T. Akaike, C.-S. Cho, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 726.
- [25] J.-I. Murata, Y. Ohya, T. Ouchi, *Carbohydr. Polym.* 29 (1996) 69.
- [26] T.H. Kima, I.K. Parka, J.W. Nahb, Y.J. Choia, C.S. Cho, *Biomaterials* 25 (2004) 3783.
- [27] I.K. Park, T.H. Kim, Y.H. Park, B.A. Shin, E.S. Choi, E.H. Chowdhury, T. Akaike, C.S. Cho, *J. Control. Release* 76 (2001) 349.
- [28] Y.Q. Zhang, J.J. Chen, Y.D. Zhang, Y.F. Pan, J.F. Zhao, L.F. Ren, M.M. Liao, Z.Y. Hu, L. Kong, J.W. Wang, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 46 (2007) 197.
- [29] P. Chan, M. Kurisawa, J.E. Chung, Yi-Yan. Yang, *Biomaterials* 28 (2007) 540.
- [30] A.S. Zahr, C.A. Davis, M.V. Pishko, *Langmuir* 22 (2006) 8178.
- [31] M. Bodnar, J.F. Hartmann, J. Borbely, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3030.
- [32] I.K. Park, J.E. Ihm, Y.H. Park, Y.J. Choi, S.I. Kim, W.J. Kim, T. Akaike, C.S. Cho, *J. Control. Release* 86 (2003) 349.
- [33] Y.K. Park, Y.H. Park, B.A. Shin, E.S. Choi, Y.R. Park, T. Akaike, C.S. Cho, *J. Control. Release* 69 (2000) 97.
- [34] X. Jiang, H. Dai, K.W. Leong, S.-H. Goh, H.-Q. Mao, Y.-Y. Yang, *J. Gene Med.* 8 (2006) 477.
- [35] S. Danielsen, S. Strand, C.L. Davies, B.T. Stokke, *Biochim. Biophys. Acta* 1721 (2005) 44.
- [36] M.J. Tiera, X.-P. Qiu, S. Bechaouch, Q. Shi, J.C. Fernandes, F.M. Winnik, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3151.
- [37] V. Vijayanathan, T. Thomas, A. Shirahata, T.J. Thomas, *Biochemistry* 40 (2001) 13644.
- [38] L.E. Prevette, T.E. Kodger, T.M. Reineke, M.L. Lynch, *Langmuir* 23 (2007) 9773.
- [39] Y. Wu, W. Yang, C. Wang, J. Hu, S. Fu, *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 235.
- [40] T. López-León, E.L.S. Carvalho, B. Seijo, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-Gonzalez, *J. Colloid Interface Sci.* 283 (2005) 344.
- [41] M. Lavertu, S. Méthot, N. Tran-Khanh, M.D. Buschmann, *Biomaterials* 27 (2006) 4815.
- [42] S. Danielsen, K.M. Varum, B.T. Stokke, *Biomacromolecules* 5 (2004) 928.
- [43] D.D. Dunlap, A. Maggi, M.R. Soria, L. Monaco, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3095.
- [44] R. Golan, L.I. Pietrasanta, W. Hsieh, H.G. Hansma, *Biochemistry* 38 (1999) 14069.
- [45] G. Liu, M. Molas, G.A. Grossmann, M. Pasumathy, J.C. Perales, M.J. Cooper, R.W. Hanson, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34379.
- [46] K.W. Leong, H.-Q. Mao, V.L. Truong-Le, K. Roy, S.M. Walsh, J.T. August, *J. Control. Release* 53 (1998) 83.
- [47] D.Y. Kwok, C.C. Coffin, C.P. Lollo, J. Jovenal, M.G. Banaszczuk, P. Mullen, A. Phillips, A. Amini, J. Fabrycki, R.M. Bartholomew, S.W. Brostoff, D.J. Carlo, *Biochim. Biophys. Acta* 1444 (1999) 71.
- [48] M. Koping-Hoggard, Y.S. Mel'nikova, K.M. Varum, B. Lindman, P. Artursson, *J. Gene Med.* 5 (2003) 130.

Editorial Manager(tm) for Journal of Nanoparticle Research
Manuscript Draft

Manuscript Number: NANO2373

Title: Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan-DNA nanoparticles

Article Type: Original research

Keywords: Chitosan, Nanoparticles, Gene Therapy, DNA, colloidal stability, aggregation, ionic strength effect,

Corresponding Author: Dr. Marcio José Tiera, PhD

Corresponding Author's Institution: São Paulo State University

First Author: Isadora P Picola, Master Degree in Biophysics

Order of Authors: Isadora P Picola, Master Degree in Biophysics; Karen A Bussom, Graduated in Chemistry; Ana H Casé, Master Degree in Biophysics; Fábio D Nasário, Graduated in Chemistry; Sebastião R Taboga, Associate Professor; João R Neto, Full Professor; Marcio José Tiera, PhD

Abstract: ABSTRACT

The effect of ionic strength on the interaction and colloidal stability of nanoparticles prepared by interaction of increasing molecular weights chitosans (5, 10, 16, 29, 57 and 150 kDa) with calf thymus DNA was studied at varied charge ratios. The physicochemical properties of polyplexes were investigated by means of dynamic light scattering (DLS), static fluorescence spectroscopy, optic microscopy, transmission electronic microscopy (TEM) and gel electrophoresis. Results showed that upon interacting with chitosan, DNA nanoparticles sizes depended on time, N/P ratio and pH. At pH 4.0, nanoparticles sizes increased with both ionic strength and N/P ratio but remained constant as a function of time. At pH 6.3 and low ionic strength (10 mM), nanoparticle sizes increased as a function of time for all chitosan samples at N/P ratios smaller or equal to 5.0. At N/P ratio 7.0, the nanoparticles synthesized using all chitosan samples showed increasing sizes when ionic strength was adjusted to 150 and 500 mM. Fluorescence spectroscopy of ethidium bromide revealed that chitosan binding to DNA is dependent on the ionic strength but takes place even at elevated ionic strength. The morphology of chitosan/DNA at elevated ionic strength is a mixture of large spherical aggregates, toroids and rods. Electrophoresis carried out at N/P ratios higher than 2.0 showed no DNA release from nanoparticles prepared with the lower (5 kDa) and the higher (150 kDa) chitosan molecular weight, even at the highest solution ionic strength studied (1.0 M). These results indicated that the strong interaction of chitosan-DNA combined with aggregation of nanoparticles hinder the release of DNA from chitosan nanoparticles.

Keywords: Chitosan, Nanoparticles, Gene Therapy, DNA

Effect of ionic strength solution on the stability of chitosan-DNA nanoparticles

**Isadora Pfeifer Dalla Picola[†], Karen Andressa Nunes Busson[‡], Ana Helena Casé[†],
Fábio Domingues Nasário[‡], Sebastião Roberto Taboga[§], João Ruggiero Neto[†],
Marcio José Tiera^{‡*}**

‡Department of Chemistry and Environmental Sciences, †Department of Physics, §Department of Biology – Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences – IBILCE, São Paulo State University – UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

***Author for Correspondence: Email: mjt@ibilce.unesp.br**

ABSTRACT

The effect of ionic strength on the interaction and colloidal stability of nanoparticles prepared by interaction of increasing molecular weights chitosans (5, 10, 16, 29, 57 and 150 kDa) with calf thymus DNA was studied at varied charge ratios. The physicochemical properties of polyplexes were investigated by means of dynamic light scattering (DLS), static fluorescence spectroscopy, optic microscopy, transmission electronic microscopy (TEM) and gel electrophoresis. Results showed that upon interacting with chitosan, DNA nanoparticles sizes depended on time, N/P ratio and pH. At pH 4.0, nanoparticles sizes increased with both ionic strength and N/P ratio but remained constant as a function of time. At pH 6.3 and low ionic strength (10 mM), nanoparticle sizes increased as a function of time for all chitosan samples at N/P ratios smaller or equal to 5.0. At N/P ratio 7.0, the nanoparticles synthesized using all chitosan samples showed increasing sizes when ionic strength was adjusted to 150 and 500 mM. Fluorescence spectroscopy of ethidium bromide revealed that chitosan binding to DNA is dependent on the ionic strength but takes place even at elevated ionic strength. The morphology of chitosan/DNA at elevated ionic strength is a mixture of large spherical aggregates, toroids and rods. Electrophoresis carried out at N/P ratios higher than 2.0 showed no DNA release from nanoparticles prepared with the lower (5 kDa) and the higher (150 kDa) chitosan molecular weight, even at the highest solution ionic strength studied (1.0 M). These results indicated that the strong interaction of chitosan-DNA combined with aggregation of nanoparticles hinder the release of DNA from chitosan nanoparticles.

Keywords: Chitosan, Nanoparticles, Gene Therapy, DNA

INTRODUCTION

Chitosan has been recognized in the last decade as a good candidate for gene delivery due to its properties of low toxicity, biodegradability and versatility as a carrier for intravenous and oral administration (Bhattarai et al 2008, Kim et al. 2007; Zheng et al 2007). Also the ability to condense efficiently with DNA forming tight polyplexes is important to avoid degradation by DNases (Richardson et al. 1999). Chitosan-DNA interaction is driven mainly by the electrostatic interaction between the amino groups of chitosan and the charged phosphate groups of DNA (Liu et al. 2005; Kiang et al. 2004), and in a slightly acid medium this interaction is fully favored since the most of the amine groups will be charged. In this respect, many advances have been made on the effects of various parameters, such as molecular weight, charge (+/-) ratio, pH, and particle size, on transfection efficiency. Many studies carried out at low pH showed that polyplexes made from mixing DNA with chitosans samples varying from 8 to 200 kDa yielded a blend of stable nanoparticles formed from toroids and rods (MacLaughlin et al 1998; Danielsen et al. 2004). The amount of chitosan required to fully compact DNA into well-defined toroidal and rodlike structures were found to be strongly dependent on the chitosan molecular weight, and thus its total charge. A higher charge ratio (+/-) was needed for the shorter chitosans, showing that an increased concentration of the low DP chitosan could compensate for the reduced interaction strength of the individual ligands with DNA (Danielsen et al. 2004). Well defined oligomers of completely deacetylated chitosan ranging in molecular weight from 1.2 to 2.8 kDa were also shown to form more stable nanoparticles at lower pH values. The longer chitosan oligomers formed soluble globules with DNA at lower charge ratios. The authors concluded that when the chain length of chitosan increases, the binding with DNA occurs in a more cooperative manner, and soluble chitosan-DNA globules are formed at lower charge ratios (Koping-Höggard et al. 2003, Koping-Höggard et al. 2004). Liu et al have show that the charge density is an important parameter by studying the formation of polyplexes in different pH values (Liu et al. 2005). Chitosan-DNA nanoparticles formed with 5 kDa deacetylated chitosan indicated that, upon interacting with DNA, the strength of binding was dependent on pH of media. At pH 5.5 the charged chitosan had a

strong binding affinity with DNA; whereas in pH 12.0 medium, only weak interactions existed. The authors also reported that no typical toroid patterns were observed, which was attributed to the compact form of DNA caused by highly charged chitosan.

Besides the progress about the DNA-chitosan interaction, much less attention has been paid to the stability of the nanoparticles as a function of ionic strength and chitosan molecular weight. This parameter is particularly important for transfection efficiency since the particle size may be affected by ionic strength, decreasing blood circulation time and cellular uptake (Mao et al. 2001; Wolfert et al 1996; Erbacher et al. 1998). Jiang et al. have also shown that chitosan/DNA complexes challenged with fetal calf serum started to aggregate rapidly and that complexes with a size above 1000 nm were detected after 10 minutes, which could affect the gene transfection (Jiang et al. 2006). Köping-Höggart et al. have shown that molecular weight of chitosan is not important for transfection efficiency in the molecular weight interval of 31–200 kDa (Köping- Höggard et al 2001). However, an increased ionic strength showed that complexes of T4DNA with chitosan oligomers formed aggregates at NaCl concentrations smaller than 100 mM, and at higher NaCl concentrations (up to 100 mM) the aggregates dissociated and formed elongated coils, which were attributed to free T4 DNA. Therefore, the background of these previous studies clearly showed that the stability of the chitosan-DNA polyplexes is dependent on the molecular weight, ionic strength and charge ratio (N/P).

In this work we provide new insights on the effects of molecular weight, pH and ionic strength on both the chitosan-DNA interaction and the stability of formed nanoparticles. We used purified deacetylated chitosan samples, ranging in molecular weight from 5 to 150 kDa (5, 10, 15, 28, 50 and 150 kDa), and light scattering technique to study the stability of complexes formed between chitosan and calf thymus DNA as a function of time. This technique allowed us to evaluate carefully how the stability of the polyplexes is affected by the solution ionic strength and its dependence on molecular weight and charge ratio (N/P). The shapes of the complexes were examined by transmission electronic microscopy at varying salt concentrations and pH values, in order to evaluate if toroids could be formed under increasing salt conditions. The formation of soluble aggregates was also monitored by fluorescence microscopy using rodamine-labelled chitosan samples for polyplexes synthesis.

Electrophoresis and the ethidium bromide assay of the polyplexes were also used to assess the effect of added salt on the strength of interaction and dissociation of the complexes.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Chitosans (57K and 150K), used as starting materials were purchased from Wako Chemical Co. Water was deionised using a Milli-Q water purification system (Millipore). Rhodamine isothiocyanate, sodium hydroxide, sodium acetate and acetic acid, sodium nitrite, were purchased from Aldrich Chemical Co. All solvents were reagent grade and used as received. Spectra/ Pore membranes (Spectrum) were employed for dialysis. Sodium salt of highly polymerized calf thymus DNA (10-15k base pairs) was purchased from Sigma (St.Louis, USA) and used without further treatment. Protein contamination was determined to be negligible since $A_{280}/A_{260} = 1.90$, an indication of the DNA purity (Vijayanathan et al. 2001).

Instrumentation. ^1H -NMR spectra were recorded on a Bruker ARX-400 400 MHz spectrometer. UV/vis spectra were measured with a Cary 100 spectrometer. Measures of fluorescence were obtained using the Fluorimeter Hitachi F4500.

Deacetylation of Chitosan. Deacetylated chitosan was prepared as reported before (Case et al., 2009). Briefly, a solution of chitosan (CH) (4.0 g, 2.45×10^{-3} mol of monosaccharide units) in aqueous acetic acid (200 mL, 2 wt %) was added dropwise to aqueous NaOH (100 mL, 50 wt %) at room temperature under magnetic stirring in a nitrogen atmosphere. At the end of the addition, the suspension was refluxed for 1 h. It was poured into stirred water (4 L) preheated to 80°C. The precipitate was decanted, washed five times with water, and separated by filtration. The solid was dissolved in acetic acid (200 mL, 2 wt %) and subjected to the same procedure once more to achieve a higher deacetylation degree. The resulting polymer was purified by dialysis against water for 3 days and isolated by lyophilisation.

Degradation of CH 57 kDa . First, 0.51 g of chitosan (CH) was dissolved in acetic acid solution (30 mL, 2%). After complete dissolution, dissolved oxygen was removed by bubbling N₂ gas in the solution for 1h. The mixture was then cooled to 4°C using a water and ice bath. A freshly prepared solution of NaNO₂ (2 mL, 0.06 M) was poured into the solution and the reaction was allowed to continue in darkness, at 4°C for 24 hours. The polymer was purified by dialysis (Mw 6000-8000 cut off, Spectra/pore) against deionised water for 2 days, one day against NaOH 0.05 M and 2 days in water (water was changed three times a day) and isolated by lyophilisation. The reaction yielded 0.334 g of product. The same procedure was employed to obtain 5 kDa chitosan, increasing the NaNO₂ concentration (2ml, 0.18 M) and using an MWCO 3000 dialysis membrane.

Rhodamine-labelled chitosans. Labelled chitosans were prepared using the rhodamine isothiocyanate derivative. The procedure is illustrated below for the synthesis of rhodamine-labelled chitosan. Chitosan 57 kDa (218 mg) was dissolved overnight in acetic acid solution (20 mL 0.02 M). Thereafter, the pH of the solution was adjusted to 6.0 by adding aqueous NaOH (0.05 M) and the solution was degassed and kept under N₂ atmosphere. Next, rhodamine isothiocyanate (12 mg) was dissolved in methanol (5 ml) and injected dropwise into the chitosan solution under stirring. The solution was protected from light throughout the experiment and the reaction time was 24 h. The reaction mixture was dialysed (membrane of MWCO 12000-14000 or MWCO 3000) first against water for 3 days, then against aqueous NaOH (0.05 M) for 1 day, and finally against water for 3 days. To determine the labelling efficiency, solutions of the rhodamine-labelled chitosans were prepared in acetic acid buffer/methanol (v/v) at pH = 4.5 and the absorbance measured at 554 nm. A calibration curve was prepared with solutions of 3.5×10^{-6} to 2×10^{-5} mol/l using a stock solution of rhodamine derivative (0.93 mg /10 ml). Other rhodamine-labelled chitosans were prepared under identical conditions to yield from 0.8 to 1.45 % substituted amino groups (Table 1).

dn/dC and Molecular-weight Measurements. Molecular-weight characteristics were obtained using a GPC system consisting of an Agilent 1100 isocratic pump, a TSK-GELPW (Tosoh Biosep) column, a

Dawn EOS multi-angle laser light scattering detector (Wyatt Technology Corp.) and an Optilab DSP interferometric refractometer (Wyatt Technology Corp.); injection volume: 100 μL ; flow rate: 0.5 mL min^{-1} ; eluent: acetic acid (0.3M)/sodium acetate (0.2M) buffer pH 4.5, 25.0 $^{\circ}\text{C}$. Samples were prepared by weighing the exact amount to obtain solutions varying from 0.5 to 1.0 mg/ml followed by stirring for three days and filtering (0.45 μm) immediately before the injection.

For dn/dC measurement experiments, a stock solution of each chitosan was prepared by dissolution of 1.0 mg/mL in 5 mL of acetic acid (0.3M)/sodium acetate (0.2M) buffer at pH 4.5. Then, the stock solution was diluted in the buffer to yield five final polymer concentrations varying between 1.0 and 0.2 mg/mL . These solutions were stirred for three days. A part of each solution was filtered in a 0.45 μm filter, and the refractive index increments were measured consecutively using a differential Optilab DSP interferometric refractometer (Wyatt Technology Corp.). All data were acquired, stored, and processed with the software Astra V 5.1.5.

Chitosan/DNA nanoparticle formation for dynamic light scattering as a function of time. Prior to preparation, the milli-Q water and all buffers were filtered through a 5 μm membrane; test tubes having previously been washed with milli-Q water. CH samples were dissolved in the appropriate buffers (acid acetic/acetate, pH4.0 and phosphate pH 6.3) at room temperature. A stock solution of calf thymus DNA was added to test tubes containing 1 mL of the appropriate buffer to adjust the concentration of phosphate groups to 2.5×10^{-5} M as determined by the UV absorption at 260 nm , using a molar extinction coefficient, $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Stock solutions of the CH samples were used to titrate DNA solutions, which were briefly vortexed (30 seg.) to obtain different N/P ratios. Nanoparticles for light scattering measurements were prepared at ionic strengths of 10, 150 and 500 mM . Nanoparticles were prepared inside the cuvettes by titration of ct-DNA solution with stock solutions of the chitosan samples to obtain increasing N/P ratios. Dynamic light scattering (DLS) experiments were performed on a Zetasizer nano-ZS90, a He-Ne laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) and 90° scattering angle. Temperature was 25 $^{\circ}\text{C}$ unless otherwise stated. Measurements were prepared in triplicate and average sizes were used.

Ethidium Bromide Displacement Assay. A stock solution of ethidium bromide (EtBr, 2.5×10^{-3} M) was prepared in water and this solution (2.5 μ l) was added to the cuvettes containing the appropriate buffers (2 mL of ionic strength of 10 mM, 150 mM and 500 mM at pH 4.0 and 6.3) and was mixed by gentle agitation. A stock solution of Calf thymus DNA was added to the solution to obtain a concentration of 1.6×10^{-5} M of phosphate. The solution was left to rest for 24 hours. Then solutions containing the DNA-ethidium Bromide (DNA-EtBr) complex were titrated into the cells to reach a predetermined monomer:nucleotide molar ratio (N/P ratio) using micropipette. After each addition, the solution was briefly stirred prior to measurement of the fluorescence (three readings). The excitation wavelength (λ_{ex}) was set at 560 nm and the emission wavelength (λ_{em}) at 605 nm. Steady-state fluorescence spectra were recorded on a Hitachi 4500 spectrofluorimeter. Temperature control of the samples was achieved using a water-jacketed cell holder connected to a Fisher circulating water bath. All measurements were carried out at 25.0 ± 0.1 °C unless otherwise stated and the slit settings were 5 nm for both excitation and emission. The total chitosan solution added to the DNA solution did not exceed 5% of total volume of the solution, and hence no correction was made for sample dilution. In the experiments performed at higher pH values, samples of calf thymus DNA solutions were prepared using 10 mM phosphate (7.0, 7.4) buffers. The stock chitosans solutions were kept at pH 6.3 to avoid precipitation and the absence of phase separations in these dilute mixtures were confirmed by visual inspection of the titrated solutions.

Gel electrophoresis. Gel electrophoresis was performed with a 0.75% agarose gel in 40 mM Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer at pH 7.4. The ct-DNA-chitosan nanoparticles of N/P ratios of 1-12 were prepared at a constant DNA concentration and incubated for 120 min at room temperature. Next, a complex solution (8 μ l, 30 μ g/ml of DNA) was loaded into the agarose gel wells. After electrophoresis (90 V, 1.17 h), the DNA was stained by incubating the gels in TAE buffer of pH 7.4 containing 15 μ l EtBr (1.0 mg/mL) for 30 min.

Photomicroscopy of the chitosan-DNA polyplexes. The polyplexes were prepared at an N/P of 5 and final ct-DNA concentration of 25 µg /mL in 5 mM phosphate of pH 6.3, with ionic strength of 10, 150 and 500 mM. All measurements were carried out at 25⁰ C. Photomicrographs of the chitosan-DNA nanoparticles were performed on a Zeiss-Jenaval (Jena, Germany) fluorescence photomicroscope equipped with a fluorescence filter for rhodamine.

Transmission electronic microscopy (TEM). Nanoparticles were prepared with 70 µM of phosphate groups of DNA and chitosans CH 5 kDa and CH 150 kDa at an N/P ratio of 10 in 10 mM phosphate buffer at pH 6.3 and different ionic strengths (10, 150 and 500 mM). Samples were incubated at room temperature for 4 hours. One drop of the complex solution was deposited on the copper grid (carbon-coated copper grid, 200 mesh). The grids were allowed to dry for 30 minutes, post-stained with uranyl acetate, and then images recorded using a LEO – Zeiss 906 Transmission Electron Microscope operating at 80 Kv.

RESULTS AND DISCUSSION

Dynamic Light Scattering. The molecular characteristics of the all chitosan samples used for the preparation of CH-DNA nanoparticles are presented in Table 1. The chitosan samples employed (Mw 5 kDa, 10 kDa, 16 kDa, 28 kDa, 57kDa and Mw =150 kDa) were deacetylated efficiently and had similar deacetylation degrees (98-99%) determined from potentiometric titration and HNMR. The chromatograms for chitosan samples having different molecular weights exhibited a highly distinct Gaussian shape for all traces (data not shown).

Initially, dynamic light scattering measurements were performed to evaluate the effect of ionic strength on the sizes and stability of nanoparticles formed by the interaction between DNA and chitosans of different molecular weights. As expected, in general when pH and ionic strength were kept low (pH 4.0, ionic strength 10 mM) nanoparticle sizes remained smaller than 250 nm as can be seen from table II, independently of the chitosan molecular weight and N/P ratio. However, the lower molecular weight sample (5 kDa) formed smaller nanoparticles with diameters ranging from 120 to 140

nm and higher molecular weight chitosan (CH 150 kDa) exhibited nanoparticle sizes ranging from 200 to 240 nm, which is in agreement with results previously published on calf thymus DNA using the same range of chitosan molecular weight (Strand et al. 2005).

The effect of an increasing ionic strength on the nanoparticle properties may appear in two ways, first, the screening effect of the added salt can induce nanoparticle aggregation and second, the dissociation of the complexes may take place due to the decreased electrostatic interaction between DNA and chitosan (Strand et al. 2005). In general, at pH 4.0, results showed that nanoparticle sizes remained constant during weeks independently of the chitosan molecular weight; however nanoparticle diameters prepared with CH 57 kDa varied from 150 nm to 250 nm when ionic strength was increased from 10 mM to 500 mM (Table II). A similar result was also obtained for all chitosan samples, which showed that, even at low pH, the screening effect of the added salt influenced nanoparticle sizes.

At higher pH values the ionisation degree of chitosan decreased and the screening effect of the added salt were more pronounced. Figure 1 shows the nanoparticle sizes vs. time prepared at pH 6.3 in solutions of increasing ionic strengths. At ionic strength 10mM and N/P ratios lower than 7.0, nanoparticles synthesised with all chitosan samples (CH 5 kDa, CH 16 kDa, CH 29 kDa and CH 57 kDa) exhibited increasing sizes as a function of time, except those prepared with CH 150 kDa, which exhibited a constant size around 250 nm for N/P 5.0 (Figure 1c). For instance, hydrodynamic diameters (Dhs) of nanoparticles prepared with CH 5 kDa, 29 kDa and 150 kDa at N/P ratio 3.0 increased from values around 200 nm to 1000-1500 nm after three hours. However, at N/P ratio 7.0, Dhs remained constant for all nanoparticles, and to evaluate the effect of the added salt on the stability of the nanoparticles at this ratio, Dh was monitored during 3 hours in solutions of ionic strengths 10 mM, 150 mM and 500 mM. As the ionic strength was increased from 10 to 500 mM, the hydrodynamic diameters (Dhs) increased continuously for nanoparticles prepared with the lower molecular weight chitosans (CH 5 and CH 29) (Figure 2a,b). This result is in agreement with those obtained by Jiang et al. showing that nanoparticles prepared with deacetylated chitosan 47 kDa aggregate even in an acetate buffer 25 mM at pH 5.5, forming complexes with sizes above 1000 nm using a DNA concentration of 50 µg/ml (Jiang et al. 2006). On the other hand, with nanoparticles prepared with CH 150 kDa, the

hydrodynamic diameters increased from 210 to 280 nm in the same range of ionic strength (10 to 500 mM), but their sizes remained constant as a function of time (Figure 2c). These results clearly show that nanoparticles prepared at N/P ratios lower than 7.0 achieve stable sizes only after a period of time, which can vary from minutes to hours after preparation and is dependent on molecular weight and pH. Stability of nanoparticles is particularly important when concentrated chitosan-DNA nanoparticles are required for in-vivo delivery (Bivas-Benita et al 2003). The aggregation verified in the light scattering measurements is closely related to the zeta potential measurements obtained at pH 6.3 (Figure 3). At low ionic strength (10mM), nanoparticles synthesised with CH 5 kDa reached positive zeta potential values only for N/P ratios higher than 5.0 (+4.0 mV) while those synthesised with CH 150 kDa exhibited positive potentials at N/P 3.0 (+ 8 mV). At ionic strength 150 mM the zeta potentials of nanoparticles obtained with both chitosans, CH 5 kDa and CH 150 kDa were greatly decreased and at N/P ratio 7.0 these values were around +4 mV and + 10 mV respectively. Generally, at N/P ratios higher than 5.0-6.0, the zeta potential reached a plateau that implies that the added chitosan does not participate in complexation, remaining dissolved in solution as free polymer chains.

The nanoparticle sizes were qualitatively assessed by fluorescence microscopy using rhodamine-labelled chitosan derivatives for their preparation. Measurements were taken after 3 hours at N/P ratio 5.0 and pH 4.0 and 6.3. Imaging observation correlated well with the data obtained from light scattering measurements. Figure 4 shows the photomicrographies taken at pH 6.3 and at lower ionic strength, 10 mM, the photomicrographies from nanoparticles synthesised with CH 5 kDa and 150 kDa, were similar and sizes smaller than 1000 nm were mainly observed as red dots (Figure 4a,b 10 mM). The nanoparticles formed with CH 150 kDa showed no aggregation with increasing ionic strength as observed in the light scattering measurements (Figure 2c). However, in buffered higher ionic strength solutions, 150 and 500 mM, large aggregates were observed for nanoparticles prepared with CH 5 kDa, whose sizes varied from 3 to 5 μ m (Figure 4a, 150mM and 500 mM). A similar result was observed at pH 4.0 and, for nanoparticles prepared with CH 5 kDa, large aggregates were observed in solutions of high ionic strength (150 and 500 mM, data not shown). The same experiments performed

at pH 7.4 using phosphate buffer for both chitosans, 5 and 150 kDa, formed large aggregates at all ionic strengths studied (10 M, 150 and 500 mM).

Aiming to determine if ionic strength could affect the shapes and stability of nanoparticles, transmission electronic microscopy (TEM) was employed. Fig. 5 shows TEM images taken after three hours of preparation of the chitosan-DNA nanoparticles synthesized with CH 5 and 150 kDa, at pH 6.3, N/P ratio 7.0 in different ionic strengths. At 10 mM of ionic strength the nanoparticles prepared with CH 5 and CH 150 kDa appeared mainly as spheroids or rods, Fig 5a (yellow arrows). However, toroids were observed for nanoparticles prepared with 150 kDa at 150 mM of ionic strength (Fig. 5 b, bottom). At 500 mM of ionic strength the images of the particles showed a clear increase in size mainly for nanoparticles prepared with CH 5kDa. The observed aggregates in Fig 5c are an indication that dissociation of the complexes does not occur in this period of time even for the highest ionic strength studied, which can contribute to make more difficult the DNA releasing from polyplexes.

Ethidium Bromide Assay. The interaction of CH with calf thymus DNA was also monitored by the fluorescence quenching ethidium bromide (EtBr) assay to evaluate the effect of ionic strength and molecular weight on the strength of interaction. The fluorescence quantum yield (Φ_f) of EtBr in aqueous solution is negligible, whereas in the presence of native double stranded DNA, Φ_f increases due to intercalation of the dye between base pairs and formation of DNA-EtBr complexes. Addition of polycations to aqueous solutions of the DNA-EtBr complex results in a pronounced decrease of fluorescence intensity due to the competitive displacement of the dye by chitosan to form a complex with DNA. Titrations of DNA-EtBr aqueous solutions with chitosan solutions were carried out at different pH values (4.0, 6.3, and 7.0). Data presented in Figure 6 (a, b) is the relative fluorescence intensity of EtBr vs. nitrogen/ phosphate (N/P) ratio. A decrease of ethidium fluorescence was observed for all mixtures, indicating that DNA-chitosan complexes were formed at all pH values.

Quenching was more pronounced for solutions of lower pH and ionic strength values (Figure 6). The effect of molecular weight of CH on chitosan-DNA interaction is clearly noted only for N/P ratios below 2.0. This effect is discernable in Figure 6a, where we compare titrations of the DNA-EtBr

complex at pH =4.0 with four deacetylated chitosans (150 kDa, 57, 10 and 5 kDa) (Figure 6a). The chitosans 57 and 150 kDa displaced EtBr more efficiently, thus indicating that chitosan-DNA interaction is dependent on molecular weight. A comparison between 5kDa and 10kDa chitosans showed no difference within the experimental error. For N/P ratios higher than 2, the levelling off of EtBr fluorescence was the same for all tested chitosan samples, i.e., for 5kDa and 10kDa chitosans a higher concentration was needed to displace the same amount of EtBr from ct-DNA-EtBr complex. Increasing the pH from 4 to 6.3 resulted in a decreased interaction between chitosan and DNA since the ionization degree was decreased from 1.0 to 0.5 (Figure 6b). However, at pH 6.3 the same quenching efficiency at higher N/P ratios, i.e. the plateau of 20% was reached at N/P about 6.0 (data not shown in Fig. 6b). The screening effect from the added salt affected the interaction of DNA with both chitosans, CH 5 kDa and CH 150 kDa, however it can be seen that the fluorescence quenching is more efficient for higher Mw, CH 150 kDa (Fig. 6c, 6d). On the other hand at highest ionic strength studied (500 mM) the interaction between DNA and CH 150 kDa was less favoured, which is probably due to the aggregation of chitosan chains induced by the screening effect of the added salt, since at pH 6.3 only half of the amino groups are charged. However, it is worth mentioning that, even at higher ionic strengths, interaction is strong enough to decrease almost 50% of the EtBr fluorescence, indicating that the screening effect of the added salt is not able to hinder the complex formation. The same experiments carried out at pH 7.0 also showed that chitosan-DNA interaction takes place even at pH 7.0. This can be attributed to unprotonated, neutral chitosan units abstracting protons from the buffer in order to interact with the anionic phosphate groups of the DNA, resulting in proton exchange between the buffer and chitosan (Rungsardthong et al. 2003). The interaction between DNA and chitosan is exothermic in sodium phosphate buffer (Ma et al 2009) and the polyanionic nature of DNA increases the ionization of chitosan by reducing its surface potential and thereby increasing the polycation pKa (Zelikin et al 2003).

Gel Electrophoresis.

Stability of the complexes formed between DNA and chitosans of different molecular weights were assessed by gel electrophoresis aiming to evaluate if polyplexes could dissociate more easily when submitted to a high ionic strength. At pH 4.0, gel electrophoresis from

nanoparticles formed with CH 10 kDa, CH 16 kDa, CH 29 kDa and CH 57 kDa exhibited no DNA release at N/P ratios higher than 2.0 (data not shown). Fig. 7 shows the electrophoresis of polyplexes formed with CH 5 kDa and CH 150 kDa at increasing N/P ratios. Uncomplexed ct-DNA is loaded in the first lane on the left, while ct-DNA-CH complexes prepared at pH 6.3 and different ionic strength with 5kDa and 150 kDa of increasing N/P ratios were loaded in the other lanes. As expected, the ct-DNA shows a long trail due to the high size polydispersity of the DNA sample. Polyplexes formed at 10 mM of ionic strength with CH 5 kDa exhibited no DNA release when the N/P ratios were higher than 2.0 and for CH 150 kDa no DNA release was observed at N/P ratios higher than 1.0. This result agrees with those obtained from the ethidium bromide assay, which showed that, at N/P ratio 1.0, the fluorescence quenching of EtBr-DNA complex by CH 5kDa reached only 50%, indicating a partial complexation of DNA. Increasing the ionic strength of the solution from 10 mM to 500 mM, the DNA release progressively decreased for polyplexes prepared with CH 5 kDa and only at 1 M did the DNA release increase again. This result may be attributed to polyplexes aggregation as detected in light scattering and microscopy measurements, indicating that large aggregates may hinder DNA releasing although the electrostatic attraction is decreased. On the other hand, polyplexes formed with CH 150 kDa exhibited no change in this range of ionic strength, on the contrary, the DNA release was progressively decreased indicating that for higher molecular weight chitosans, stronger interaction combined with aggregation observed even at lower N/P ratios decreases even more the DNA release from polyplexes. These results indicate that DNA cannot be released from polyplexes by only increasing ionic strength. An efficient DNA release is a required ability to obtain efficient transfecting agents that could be favoured by an increasing buffering capacity of the polycation. Therefore, the strength of interaction must be controlled to allow DNA delivery since decreasing the chitosan molecular weight itself may not be enough to achieve an efficient DNA delivery, since the aggregation takes place for nanoparticles prepared with both, low and high Mws.

CONCLUSIONS

Our data showed that polydisperse deacetylated chitosans from 5 to 150 kDa form nanoparticles with DNA whose sizes and stabilities depend on molecular weight, pH, and charge ratio. When ionic strength and pH are kept low all deacetylated chitosans bind efficiently to DNA, and nanoparticles sizes are slightly increased in the ionic strength range from 10 to 500 mM. Stability is provided at N/P ratios higher than 2.0 by the electrostatic repulsion between the charged chitosan chains adsorbed on the nanoparticles surface. The interaction of deacetylated chitosans with DNA at pH 6.3 and low ionic strength leads to formation of stable nanoparticles only at N/P ratio 7.0. Nanoparticles prepared at N/P ratio 7.0 with lower molecular weights (57, 27, 16 and 5 kDa) aggregates over a period of time of three hours when challenged by added salt even at 150 mM of ionic strength. Only chitosan 150 kDa formed nanoparticles with stable sizes in the range of 10 to 500 mM of ionic strength. Evidence from optic microscopy and TEM images also pointed to the formation of larger aggregates. The fluorescence and electrophoresis measurements showed that, at increasing salt concentration, the strength of interaction decreased, however, for nanoparticles prepared with the lower molecular weight (5 kDa) results showed that complex dissociation is achieved only in the presence of a higher salt concentration (500 mM). Therefore, strong electrostatic interaction combined with nanoparticle aggregation make the dissociation of the polyplexes, and accordingly the DNA release, more difficult to take place.

Acknowledgments. This work was supported by a grant (2007/00339-7) from Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) to A.H.C, by a PhD scholarship from the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) program to A.H.C., and by a scholarship from Fapesp to I.P.D.P. The Authors would like to thank Dr. Françoise M. Winnik and Dr. Xing Ping Qiu from Department of Chemistry and Faculty of Pharmacy, University of Montreal for their assistance and support to this work.

References

- Bhattarai SR, KC Bahadur R, Aryal S, Bhattarai N, Kim SY, Yi HK, Hwang PH, Kim HY, Hydrophobically modified chitosan /gold nanoparticles for DNA delivery (2008) *J Nanopart Res* 10:151-162.
- Bivas-Benita M, Laloup M, Versteheyhe S, Dewit J, De Braekeleer J, Jongert E, Borchard G, Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies (2003) *Int J Pharm* 266:17-27.
- Casé A H, Picola IPD, Zaniquelli MED, Fernandes JC, Taboga SR, Winnik FM, Tiera MJ, Physicochemical characterization of nanoparticles formed between DNA and phosphorylcholine substituted chitosans (2009) *J Coll Int Sci* 336:125-133.
- Danielsen S, Varum KM, Stokke BT Structural analysis of chitosan mediated DNA condensation by afm: influence of chitosan molecular parameters (2004) *Biomacromolecules* 5: 928-936.
- Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan A-M, Remy J-S (1998) Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: Biophysical characteristics and transfection ability, *Pharm Res* 15:1332 - 1339.
- Jiang X, Dai H, Leong KW, Goh S-H, Mao H-Q, Yang Y-Y Chitosan-g-PEG/DNA complexes deliver gene to the rat liver via intrabiliary and intraportal infusions (2006) *J Gene Med* 8:477-487.
- Kiang T, Wen J, Lim HW, Leong KW, The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection (2004) *Biomaterials* 25:5293-5301.
- Kim T-H, Jiang H-L, Jere D, Park I-K, Cho M-H, Nah J-W, Choi Y-J, Akaike T, Cho C-S (2007) Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo, *Prog Polym Sci* 32: 726-753.
- Koping- Höggard M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Vårum KM, Artursson P (2001) Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethyleneimine in vitro and after lung administration in vivo, *Gene-Ther* 8:1108-1121.
- Koping- Höggard M, Vårum KM, Issa M, Danielsen S, Christensen BE, Stroke BT, Artusson P (2004) Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers *Gene Therapy* 11:441-1452.
- Koping-Höggard M, Melnikova YS, Vårum KM, Lindman B, Artursson P, Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo (2003) *J Gene Med* 5:130-141.
- Liu W, Sun S, Cao Z, Zhang X, Yao K, Lu WW, Luk KDK, An investigation on the physicochemical properties of chitosan/DNA polyelectrolyte complexes (2005) *Biomaterials* 26: 2705-2711.
- Ma PL, Lavertu M, Winnik FM, Buschmann MD New Insights into Chitosan-DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry (2009) *Biomacromolecules* 10:1490-1499.

MacLaughlin FR, Mumper J, Wang J, Tagliaferri JM, Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP, Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery (1998) *J Control Rel* 56: 259-272.

Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW, Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency (2001) *J. Control. Rel.* 70:399-421.

Richardson SCW, Kolbe HVJ, Duncan R, Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA (1999) *Int. J. Pharm.* 178:231-243.

Rungsardthong U, Ehtezazi T, Bailey L, Armes SP, Garnett MC, Stolnik S Effect of Polymer Ionization on the Interaction with DNA in Nonviral Gene Delivery Systems (2003) *Biomacromolecules* 4:683-690.

Strand SP, Danielsen S, Christensen BE, Vårum KM Influence of Chitosan Structure on the Formation and Stability of DNA-Chitosan Polyelectrolyte Complexes (2005) *Biomacromolecules* 6:3357-3366.

Vijayanathan V, Thomas T, Shirahata A, Thomas TJ (2001) DNA condensation by polyamines: a laser light scattering study of structural effects *Biochemistry* 40: 13644-13651.

Wolfert MA, Seymour LW, Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers (1996) *Human Gene Ther* 3: 269-273.

Zelikin AN, Trukhanova ES, Putnam D, Izumrudov VA, Litmanovich AA Competitive Reactions in Solutions of Poly-L-histidine, Calf Thymus DNA, and Synthetic Polyanions: Determining the Binding Constants of Polyelectrolytes (2003) *J Amer Chem Soc* 125:13693-13699.

Zheng F, Shib X-W, Yang G-F, Gong L-L, Yuan H-Y, Cui Y-J, Wang Y, Du Y-M, Li Y (2007) Chitosan nanoparticle as gene therapy vector via gastrointestinal mucosa administration: Results of an in vitro and in vivo study, *Life Sciences* 80: 388-396.

Figure Captions

Figure 1. Nanoparticle sizes as a function of time for complexes of ct-DNA with a) CH-5 kDa and b) CH-150 kDa at pH = 6.3 and ionic strength 10 mM.

Figure 2. Nanoparticle sizes as a function of time for complexes of ct-DNA with a) CH-5 kDa b)CH 29 kDa c) CH-150 kDa at pH = 6.3 and increasing ionic strengths.

Figure 3. Zeta potentials of nanoparticles prepared with CH 5 kDa (squares) and CH 150 kDa (triangles) at pH = 6.3 and ionic strengths of 10 mM (closed symbols) and 150 mM (open symbols)

Figure 4. Photomicrographies of nanoparticles prepared with of rhodamine labeled CH 5 kDa and CH 150 kDa at pH 6.3 and increasing ionic strengths at N/P 5.0.

Figure 5. TEM images of CH 5 kDa-DNA (top) and CH 150 kDa-DNA (bottom) nanoparticles synthesized at pH 6.3 and at varying ionic strengths : a) 10 mM b) 150 mM and c) 500 mM and N/P ratio 7.0.

Figure 6. a, b, c, d) Titration of ct-DNA-EtBr solution by deacetylated chitosan at different pH values (a,b) and different ionic strength in phosphate buffer pH 6.3 (c,d). The fluorescence intensity relative to the fluorescence of ct-DNA-EtBr in the absence of polycation is plotted as a function of nitrogen/phosphate (N/P) ratio. Data points represent the mean (SD of 2 samples, with at least 3 readings of each). (a,b) Molecular weight effect of chitosan on ct-DNA- EtBr fluorescence and the following buffers were used: (a) HAc/NaAc pH 4.0, (b) Phosphate pH 6.3, ionic strength 10 mM. (c,d) Ionic strength effect on the chitosan-DNA interaction (c) CH-5 kDa and (d) CH-150 kDa and ct-DNA-EtBr.

Figure 7. Gel electrophoresis of nanoparticles prepared at increasing ionic strengths with CH 5kDa and CH 150 kDa : from left to right 10 mM, 150 mM, 500 mM and 1 M respectively. N/P ratios are indicated on top of the figures.

Table 1. Properties of the Deacetylated Chitosans.

Polymer	Mw (g mol ⁻¹)	Mw/Mn	DDA*	Rhodamine (mol % of glucosamine)
CH 5 kDa	5.38 x10 ³	1.14	98.7	1.25
CH 10 kDa	9.29 x10 ³	1.07	98.7	1.043
CH 16 kDa	15.6x10 ³	1.52	97.8	-
CH 28 kDa	29.4 x 10 ³	1.56	99.2	-
CH 57kDa	56.7x10 ³	1.29	98.7	0.86
CH 150 kDa	147.5 x10 ³	1.69	97.8	1.451

*Determined from ¹H NMR spectra

Table 2: Hydrodynamic diameters (Dh) of the complexes prepared from chitosan with Calf-Thymus DNA at pH 4.0 and ionic strength of 10 mM.

	Chitosan Sample (kDa)	CH-5	CH-16	CH-28	CH-57	CH 150
(N/P) Ratio						
3:1		130 (±9)	153(±2)	155 (±8)	152(±1)	205((±15)
5:1		128(±6)	152(±3)	149 (±2)	160(±8)	210(±12)
7:1		134 (±12)	153(±1)	159(±3)	170 (±9)	238(±14)
10:1		143 (±10)	153(±5)	155 (±5)	168(±12)	240(±18)

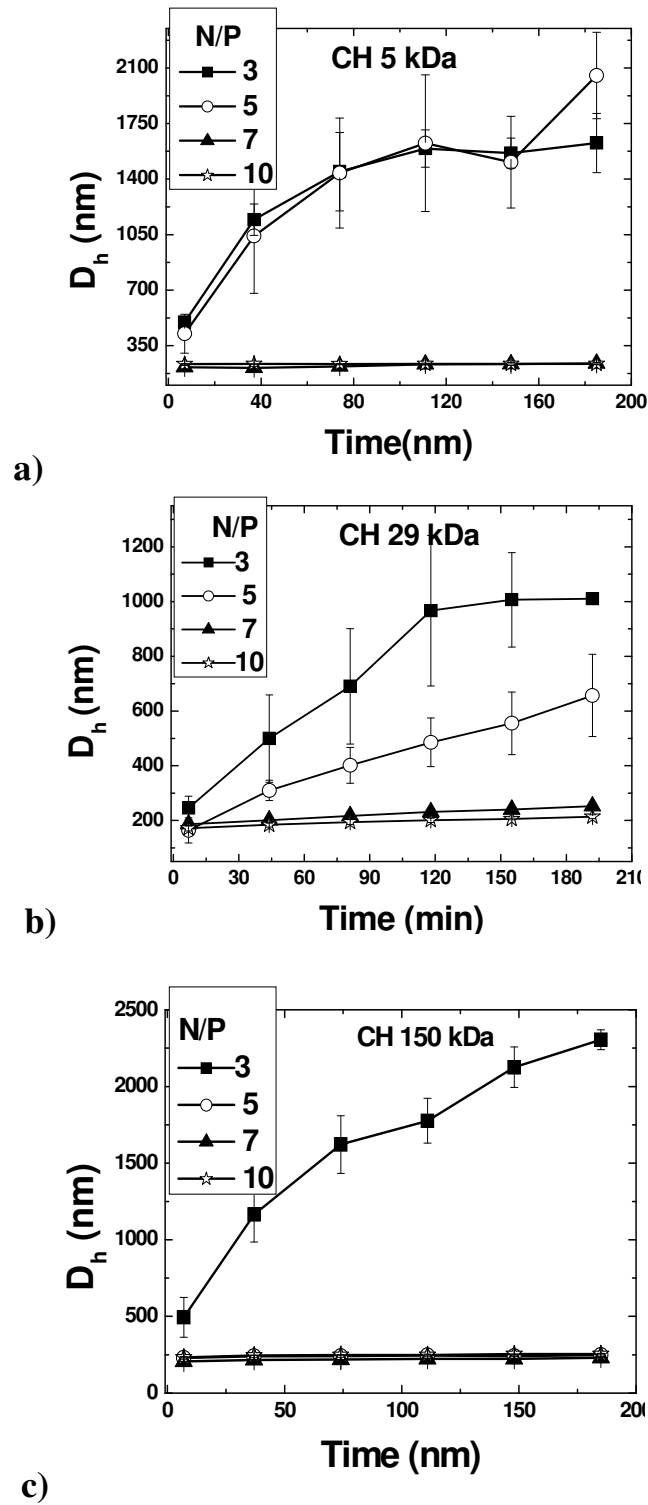


Figure 1. Nanoparticle sizes as a function of time for complexes of ct-DNA with a) CH-5 kDa and b) CH-150 kDa at pH = 6.3 and ionic strength 10 mM.

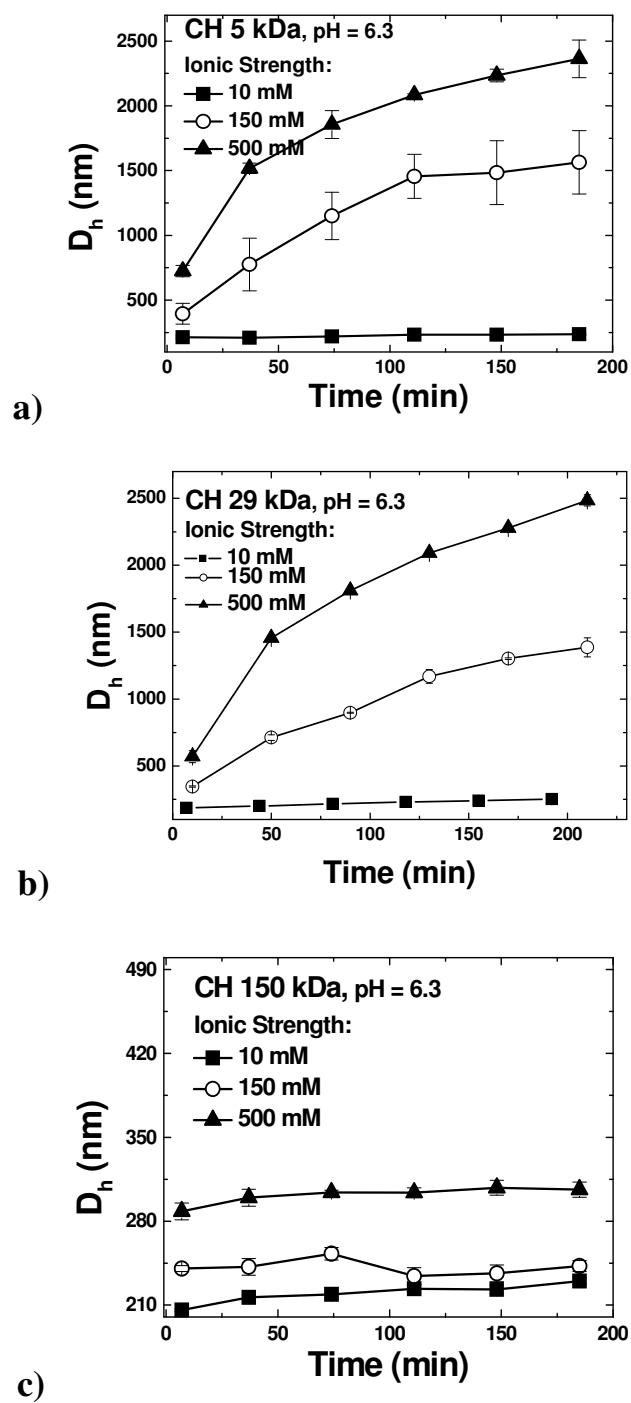


Figure 2. Nanoparticle sizes as a function of time for complexes of ct-DNA with a) CH-5 kDa b)CH 29 kDa c) CH-150 kDa at pH = 6.3 and increasing ionic strengths N/P ratio 7.0.

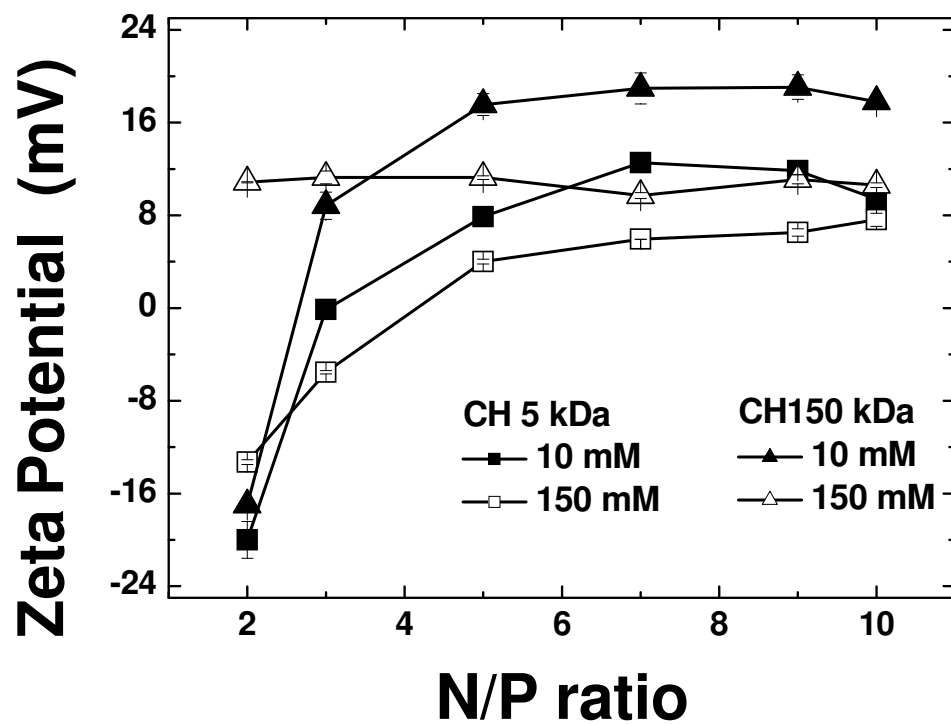


Figure 3. Zeta potentials of nanoparticles prepared with CH 5 kDa (squares) and CH 150 kDa (triangles) at pH = 6.3 and ionic strengths of 10 mM (closed symbols) and 150 mM (open symbols)

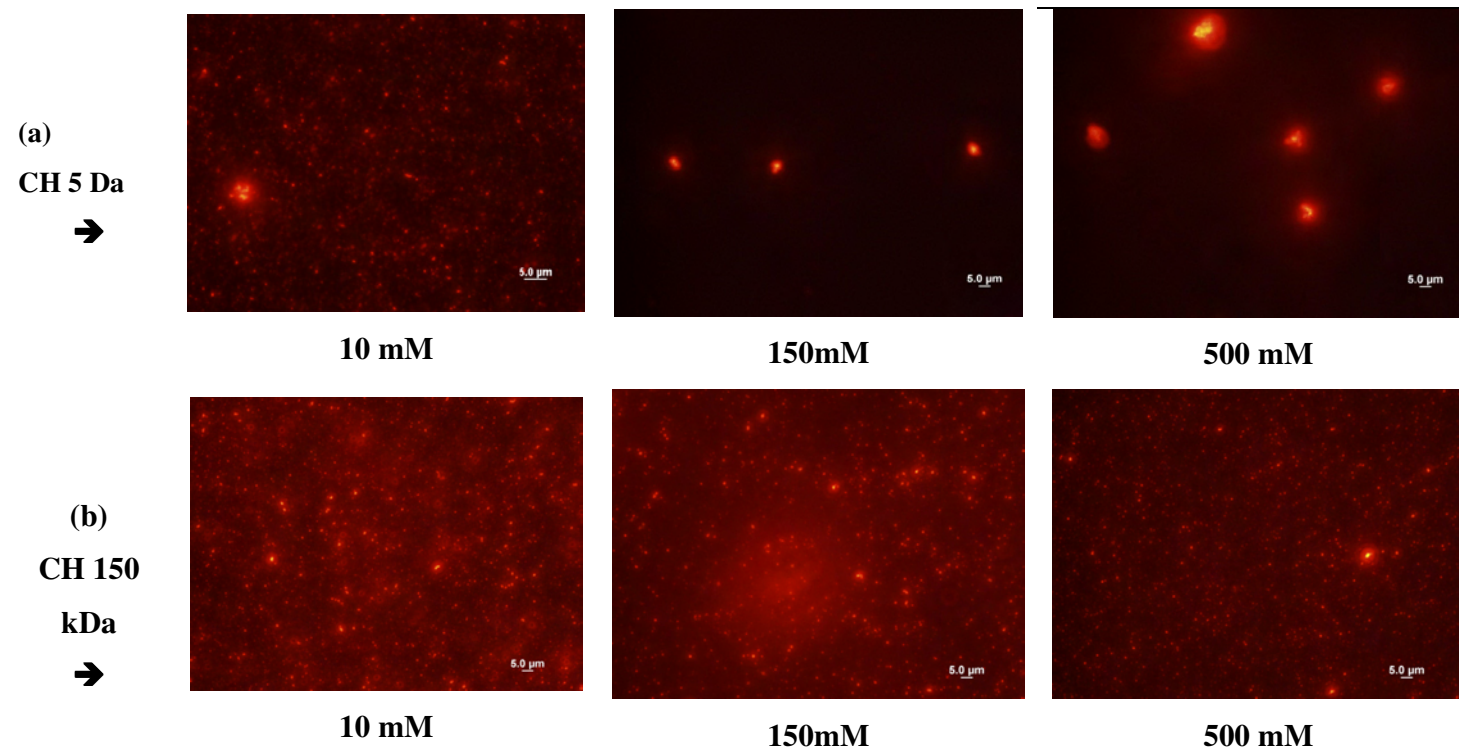


Figure 4. Photomicrographies of nanoparticles prepared with of rhodamine labeled CH 5 kDa and CH 150 kDa at pH 6.3 and increasing ionic strengths and N/P 5.0

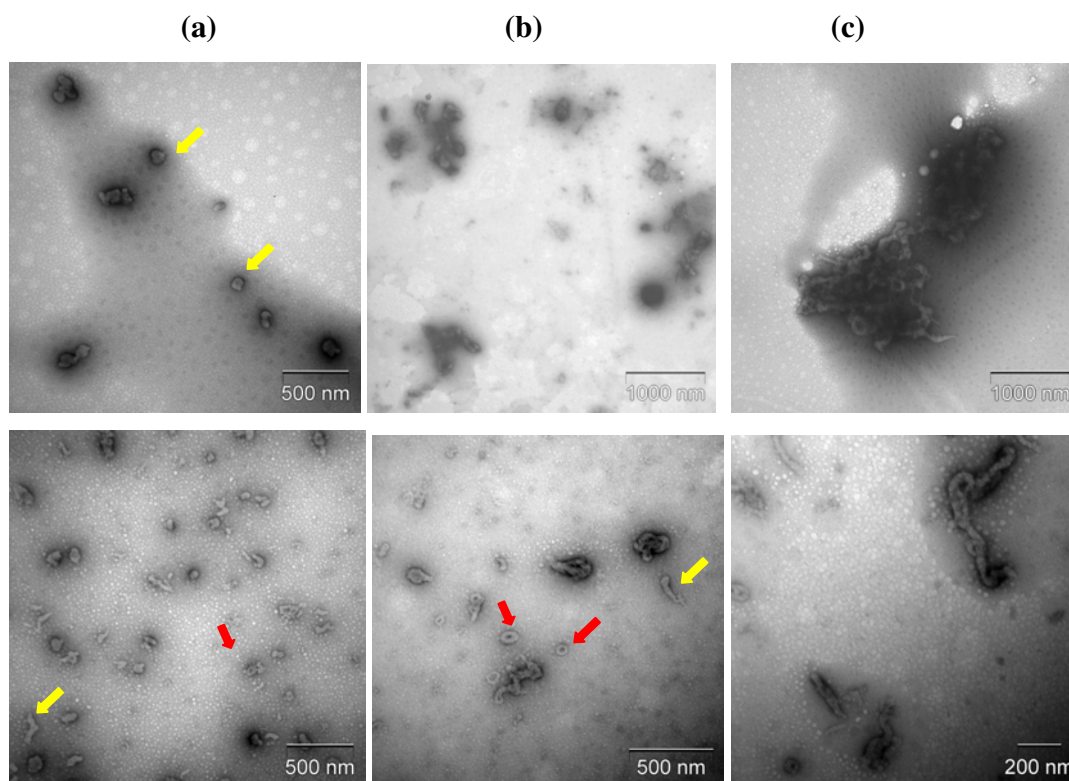


Figure 5. TEM images of CH 5 kDa-DNA (top) and CH 150 kDa-DNA (bottom) nanoparticles synthesized at pH 6.3 and at varying ionic strengths: a) 10 mM b) 150 mM and c) 500 mM and N/P ratio 7.0.

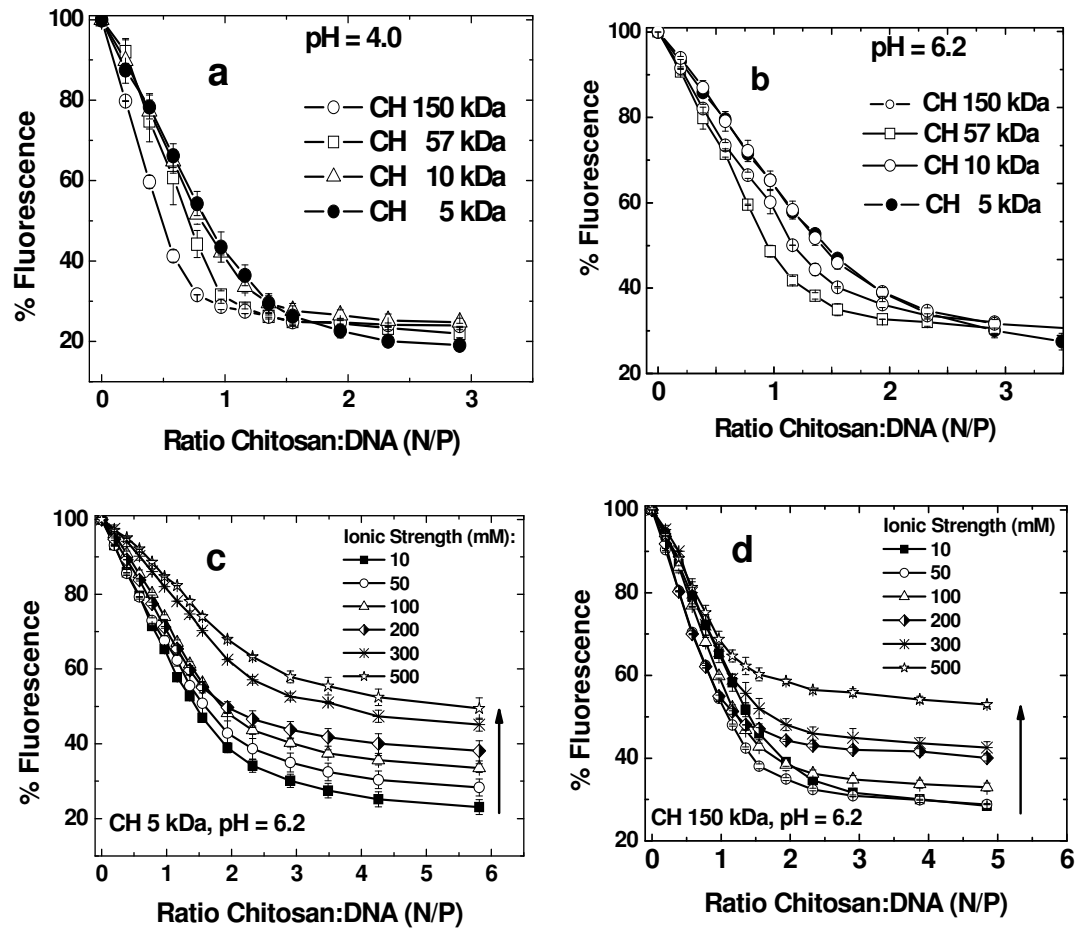


Figure 6. a, b, c, d) Titration of ct-DNA-EtBr solution by deacetylated chitosan at different pH values (a,b) and different ionic strength in phosphate buffer pH 6.3 (c,d). The fluorescence intensity relative to the fluorescence of ct-DNA-EtBr in the absence of polycation is plotted as a function of nitrogen/phosphate (N/P) ratio. Data points represent the mean (SD of 2 samples, with at least 3 readings of each). (a,b) Molecular effect of chitosan on ct-DNA- EtBr fluorescence and the following buffers were used: (a) HAc/NaAc pH 4.0, (b) Phosphate pH 6.3, ionic strength 10 mM. (c,d) Ionic strength effect on the chitosan-DNA interaction (c) CH-5 kDa and (d) CH-150 kDa and ct-DNA-EtBr.

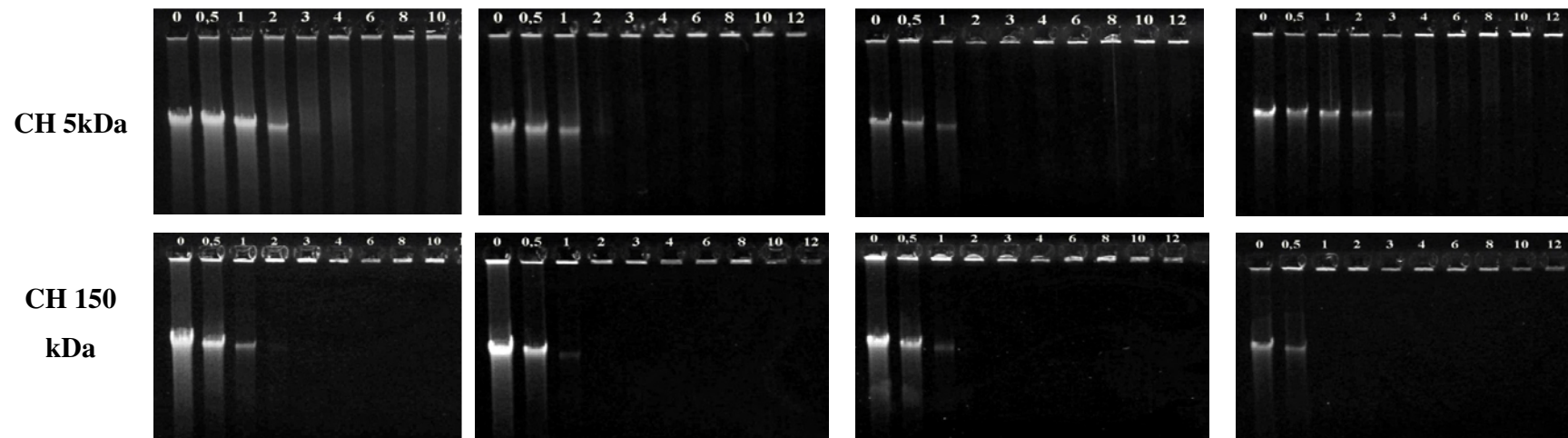


Figura 7. Gel electrophoresis of nanopartilcles prepared at increasing ionic strengths with CH 5kDa and CH 150 kDa : from left to right 10 mM, 150 mM, 500 mM and 1 M respectively. N/P ratios are indicated on top of the figures.

