

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
METALÚRGICA, MATERIAS E DE MINAS

Tese de Doutorado

**“Acilação da Quitosana e da *N,N,N*-Trimetilquitosana para
Aplicação Potencial em Diagnóstico e Terapia Gênica”**

Aluna: Joyce Cristina da Cruz Santos
Orientador: Prof. Dr. Herman Mansur
Co-Orientador: Prof. Dr. Ana Paula Pêgo

Fevereiro/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA,
MATERIAS E DE MINAS

Joyce Cristina da Cruz Santos

**ACILAÇÃO DA QUITOSANA E DA N,N,N-TRIMETILQUITOSANA PARA
APLICAÇÃO PONTENCIAL EM DIAGNÓSTICO E TERAPIA GÊNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Co-Orientador: Prof. Dr. Ana Paula Pêgo

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG

2015

Aos meus pais, João e Márcia, pelo incentivo,
carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida e por me oferecer força e proteção em todos os momentos.

À minha família, meus avós, pais e meu irmão. Em especial, aos meus pais, João e Márcia, por sempre incentivarem os meus estudos, pelo apoio constante, pela presença mesmo na ausência física, por sempre me oferecerem um porto seguro.

Ao meu orientador, Herman Sander Mansur, pela confiança, dedicação e incentivo oferecidos a mim nestes muitos anos de trabalho juntos. Sou imensamente grata por toda experiência acadêmica e científica que pude receber em nosso grupo de pesquisa.

À minha co-orientadora, Ana Paula Pêgo, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa no INEB (Porto, Portugal) durante meu período de doutorado sanduíche. Pelas reuniões, ensinamentos e discussões tão valiosas.

Ao Pedro Moreno, INEB (Porto, Portugal), que me acompanhou e, especialmente, transferiu a mim tanto conhecimento com muita paciência e dedicação.

A todos os amigos do INEB (Porto, Portugal) pela ajuda, apoio e incentivo. Em especial, a Carla Gomes e Victoria Leiro, por todas as discussões científicas, auxílios e grande amizade.

Aos meus amigos do Lasmat, em especial a Alexandra Mansur, pelos ensinamentos durante estes anos de pesquisa e ao Fábio, João, Marys e Otávio por todas nossas conversas, apoio e incentivo.

À Sandhra pela amizade, companheirismo e por toda ajuda acadêmica.

Aos amigos que a vida me ofereceu e que tornam sempre os momentos mais doces, alegres e divertidos. Em especial, agradeço a Larissa, Camila Grossi, Camila Ribeiro, Agda, Carol, Tadeu Henrique, Alysson Martins, Fernanda Dalto, Ângelo e Daniela Gomes.

Aos funcionários do PPGEM, Programa de Pós Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e Minas por disponibilizem infraestrutura para realização dos ensaios, auxílio financeiro e amizade quando era necessário. Em especial, a Cida, Nelson e Patrícia Azevedo.

Aos professores Marivalda Pereira e Rodrigo Oréfice por toda colaboração e ensinamentos.

À grandiosa Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, por ter sido, além da minha fonte de conhecimento e saber, minha segunda casa e minha segunda mãe durante toda minha vida acadêmica.

A todos os contribuintes brasileiros, que me proporcionaram uma educação pública e de qualidade.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e aos órgãos de fomento CAPES/FAPEMIG pelos auxílios concedidos.

Ao programa Ciências Sem Fronteiras, pela bolsa de doutorado sanduíche.

A FCT, Fundação para Ciência e Tecnologia, por fomentar as pesquisas durante o período de doutorado sanduíche em Portugal.

*“O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa, sossega e depois
desinquieta.*

*O que ela quer da gente é coragem.
O que Deus quer é ver a gente aprendendo a
ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da
alegria, e inda mais alegre ainda no meio da
tristeza!*

A vida inventa! (...)

*O mais importante e bonito, do mundo, é isto:
que as pessoas não estão sempre iguais,
ainda não foram terminadas, mas que elas vão
sempre mudando.*

Afinam ou desafinam.

Verdade maior

Viver é muito perigoso; e não é não.”

(João Guimarães Rosa)

SUMÁRIO

	Lista de figuras	ix
	Lista de tabelas	xiv
	Lista de notações	xv
	Resumo	xvii
	Abstract	xviii
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivo geral	6
2.2	Objetivos específicos	6
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1	Quitina e Quitosana	8
3.1.1	<i>Aspectos Gerais</i>	8
3.1.2	<i>Propriedades físico-químicas</i>	9
3.2	Modificações Químicas	14
3.2.1	<i>Quitosana Quaternizada – N,N,N-trimetilquitosana</i>	16
3.2.2	<i>Hidroxialquil quitosana</i>	17
3.2.3	<i>Carboxialquil quitosana</i>	18
3.2.4	<i>N-Acilação da quitosana</i>	19
3.2.5	<i>O-Acilação da quitosana</i>	21
3.2.6	<i>Derivados de quitosana anfífilicos</i>	22
3.2.7	<i>Reatividade Quitosana x TMC</i>	24
3.3	Caracterização da Quitosana e seus Derivados	26
3.3.1	<i>Caracterização físico-química</i>	27
3.3.1.1	<i>Espectroscopia FTIR</i>	27
3.3.1.2	<i>Espectroscopia Raman</i>	30
3.3.1.3	<i>Espectroscopia RMN</i>	31
3.3.1.4	<i>Análise Térmica</i>	34
3.3.2	<i>Caracterização biológica</i>	35

3.3.2.1	<i>Biodegradação</i>	35
3.3.2.2	<i>Toxicidade</i>	37
3.4	Quitosana e derivados como estabilizantes de pontos quânticos	38
3.4.1	<i>Pontos Quânticos</i>	40
3.5.	Quitosana e derivados em aplicações como Vetores não Virais para Entrega de Ácidos Nucleicos	46
3.5.1.	<i>Terapia Gênica</i>	46
3.5.2.	<i>Quitosana e derivados como vetores na entrega de ácidos nucleicos</i>	48
3.5.3.	<i>Terapia Gênica com Oligonucleotídeos de Cadeia Simples (ON)</i>	51
4.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	54
4.1	Etapas de desenvolvimento do trabalho	54
4.2	Materiais	55
4.3	Métodos	56
4.3.1	<i>Modificação química da quitosana com grupos palmitoil</i>	56
4.3.2.	<i>Caracterização da quitosana modificada com grupos palmitoil</i>	56
4.3.3	<i>Síntese e caracterização das nanopartículas CdS em soluções de Quitosana e Palmitoil-quitosana</i>	57
4.3.3.1	<i>Síntese das nanopartículas de CdS estabilizadas com CHI e C-Pal</i>	57
4.3.3.2	<i>Caracterização das nanopartículas de CdS estabilizadas com CHI e C-Pal</i>	58
4.3.4	<i>Purificação da TMC</i>	59
4.3.5	<i>Modificação química da TMC com grupos pentanoil (TMC-VA)</i>	60
4.3.6	<i>Modificação química da TMC com grupos decanoil (TMC-DA)</i>	61
4.3.7	<i>Modificação química da TMC com grupos estearil (TMC-SA)</i>	62
4.3.8	<i>Caracterização das TMCs modificadas</i>	63
4.3.9	<i>Determinação da Concentração de Agregação Crítica dos TMCs modificados</i>	64
4.3.10	<i>Preparação e quantificação das soluções de TMC₄₃, TMC-VA, TMC-DA e TMC-SA</i>	65
4.3.11	<i>Preparação e caracterização dos complexos TMC/ON</i>	66

4.3.12	<i>Avaliação da estabilidade dos complexos TMC/ON em meio de cultura celular</i>	69
4.3.13	<i>Transfecção dos poliplexos em células HeLa/Luc705</i>	70
4.3.14	<i>Estudo de eficiência de transfeção dos poliplexos</i>	70
4.3.15	<i>Estudo da citotoxicidade das amostras de TMCs e dos poliplexos TMC/ON</i>	71
4.3.16	<i>Citometria de Fluxo</i>	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1	Síntese e caracterização da quitosana modificada com grupos palmitoil	73
5.1.1	<i>Membranas de Quitosana e Palmitoil-Quitosana</i>	82
5.2	Síntese e Caracterização das nanopartículas de CdS estabilizadas com CHI e C-Pal	88
5.2.1	<i>Espectroscopia de fotoluminescência (PL)</i>	93
5.2.2	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)</i>	95
5.2.3	<i>Análise do espalhamento dinâmico de luz (DLS)</i>	96
5.2.4	<i>Pontos quânticos biofuncionalizados para potenciais bioaplicações</i>	97
5.3	Síntese e caracterização do TMC modificado com ácidos graxos	99
5.4	Preparação e caracterização dos complexos TMC/ON	105
5.4.1.	<i>Preparação das soluções de TMCs</i>	105
5.4.2	<i>Determinação da Concentração de Agregação Crítica das TMCs modificadas</i>	107
5.4.3	<i>Preparação e caracterização dos poliplexos TMC/ON</i>	110
5.4.3.1.	<i>Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos poliplexos preparados</i>	112
5.4.3.2.	<i>Ensaio de retardação em gel de poliacrilamida</i>	120
5.4.4	<i>Avaliação da estabilidade dos poliplexos</i>	122
5.4.5	<i>Estudo de eficiência de transfecção dos poliplexos TMC/ON</i>	126
5.4.6	<i>Estudo da citotoxicidade dos complexos TMC/ON e dos polímeros</i>	129
5.4.7	<i>Citometria de Fluxo</i>	132
6	CONCLUSÕES	135

7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	137
8	CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO	138
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Representação das estruturas químicas da quitina e da quitosana.	8
Figura 3.2	Arranjos paralelo e antiparalelo na cadeia polimérica da quitina.	12
Figura 3.3	Estrutura química da TMC.	16
Figura 3.4	Reações de acilação da quitosana.	20
Figura 3.5	Estruturas tridimensionais para a quitosana e para a TMC.	25
Figura 3.6	Representação do mecanismo da reação de acilação da quitosana com cloretos de acila.	26
Figura 3.7	Espectros FTIR para amostras de quitosana aciladas. Adaptado de TIEN <i>et al.</i> , 2003.	30
Figura 3.8	Espectro ¹ H RMN típico para uma amostra de quitosana e de quitosana modificada com cadeias carbônicas saturadas (<i>N</i> -acilquitosana) (adaptada de LAYEK & SINGH, 2012).	33
Figura 3.9	Desenho mostrando um ponto quântico com estrutura núcleo/casca (SCHATKOSKI, 2011).	42
Figura 3.10	Representação esquemática da interação do QD de CdS com a quitosana (adaptada de LI <i>et al.</i> , 2003).	46
Figura 3.11	Representação das estruturas das moléculas de DNA e ON.	53
Figura 4.1	Fluxograma representando as etapas de desenvolvimento do trabalho.	54
Figura 4.2	Representação do procedimento de síntese das nanopartículas de CdS e quitosana ou quitosana modificada com grupos palmitoil (SANTOS <i>et al.</i> , 2013).	58
Figura 4.3	Esquema de síntese da TMC-VA.	61
Figura 4.4	Esquema de síntese da TMC-DA.	62
Figura 4.5	Esquema de síntese da TMC-SA.	63
Figura 5.1	Esquema de síntese da quitosana conjugada com grupos palmitoil.	73
Figura 5.2	Espectro FTIR obtido para o ácido palmítico.	74
Figura 5.3	Espectro FTIR obtido para a quitosana não modificada.	75

Figura 5.4	Espectro FTIR da quitosana conjugada ao ácido palmítico.	76
Figura 5.5	Gráfico de barras mostrando a intensidade da banda referente ao estiramento dos grupos amina nas amostras de quitosana e quitosana modificada.	76
Figura 5.6	(a) Espectros FTIR para a quitosana e palmitoil-quitosana (b) ampliação do espectro na região de 1800 a 1400cm ⁻¹ .	77
Figura 5.7	Análise termogravimétrica obtida para a amostra de ácido palmítico sob atmosfera de N ₂ .	79
Figura 5.8	Análise termogravimétrica obtida para a amostra de quitosana em pó sob atmosfera de N ₂ .	80
Figura 5.9	Análise termogravimétrica obtida para a amostra de quitosana conjugada ao ácido palmítico sob atmosfera de N ₂ .	81
Figura 5.10	Imagem das membranas (a) quitosana e (b) palmitoil-quitosana.	83
Figura 5.11	Imagens obtidas por MEV a um aumento de 5000x das amostras de filmes de quitosana (a) e de palmitoil-quitosana (b).	83
Figura 5.12	Intumescimento das amostras de membranas de quitosana e palmitoil-quitosana.	84
Figura 5.13	Esquema de interação das cadeias de quitosana e palmitoil-quitosana durante o intumescimento.	85
Figura 5.14	Ângulo de contato para as amostras de quitosana e palmitoil-quitosana.	86
Figura 5.15	Termograma obtido para a amostra de filme de quitosana.	87
Figura 5.16	Termograma obtido para a amostra de filme de palmitoil-quitosana.	88
Figura 5.17	(A) Espectros de absorção UV-visível e (B) espectros de absorção óptica das nanopartículas de CdS estabilizadas com soluções poliméricas após 4 dias de preparação, (a) quitosana e (b) <i>N</i> -palmitoil quitosana (C-Pal).	90
Figura 5.18	Representação esquemática do mecanismo de interação entre os pontos quânticos de CdS e os grupos químicos de cadeias poliméricas de quitosana e <i>N</i> -palmitoilquitosana.	94

- Figura 5.19** Espectros de PL obtidos para as amostras de (A) CdS_CHI e (B) CdS_C-Pal. 95
- Figura 5.20** Imagem obtida por TEM para CdS_CHI (A) e CdS_C-Pal (B); (Detalhe: espaçamento do plano nanocristalino detalhado por difração de elétrons e desenho representativo). 96
- Figura 5.21** Pontos quânticos bioativos de CdS cobjugados com *N*-palmitoilquitosana projetados para potenciais bioaplicações que envolvem interações lipofílicas no trato digestivo. 99
- Figura 5.22** Representação da reação de modificação química da TMC com ácidos graxos. 100
- Figura 5.23** Espectros ^1H NMR obtidos para as amostras de TMC sem modificação e modificados com ácidos graxos. 102
- Figura 5.24** (A) Espectros FTIR obtidos para as amostras de TMC modificadas e não modificada. (a) TMC₄₃, (b) TMC-VA3 (c) TMC-VA 9, (d) TMC-DA2 e (e) TMC-SA2. (B) Evolução das bandas Amida II e da banda referente ao estiramento do grupo C-H para as TMCs modificadas e não modificada. 104
- Figura 5.25** Curva padrão obtida para a amostra de TMC₄₃ após o ensaio de Cibacron. 106
- Figura 5.26** Curva padrão obtida para a amostra de TMC-SA2 após o ensaio de Cibacron. 107
- Figura 5.27** Razão entre as intensidades (I_1/I_3) para as amostras de TMCs modificados em solução 20 mM HEPES (pH 7,40) em função da concentração. 109
- Figura 5.28** Estudo do efeito da adição de sal na formação dos complexos TMC-SA2/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glucose, pH 7,4. 111
- Figura 5.29** Diâmetro médio das nanopartículas obtidas para as amostras de TMC₄₃/ON TMCs modificados com cadeias hidrofóbicas/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 113

- mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4.
- Figura 5.30** Índices de polidispersividades (Pdi) obtidos para nanopartículas de TMC₄₃/ON e TMC-SA/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glucose, pH 7,4. **113**
- Figura 5.31** Diâmetro médio das nanopartículas obtidas para as amostras de TMC-VA3/ON e TMC-VA9/ON modificadas com grupos valeroil. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4. **115**
- Figura 5.32** Diâmetro médio das nanopartículas obtidas para as amostras de TMC/ON em relação a altas razões N/P. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4. **116**
- Figura 5.33** Comparação entre os potenciais zeta obtidos para as amostras de polímeros e políplexos na razão N/P 80. **119**
- Figura 5.34** Esquema mostrando a estabilização de carga e variação do potencial zeta do polímero modificado com ácidos graxos com a adição do oligonucleotídeo e formação dos políplexos. **120**
- Figura 5.35** Efeito da razão N/P na capacidade de condensar o ON para as amostras de complexos TMC/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4. **121**
- Figura 5.36** Efeito da razão N/P na liberação de ON para as amostras de complexos TMC/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4. **122**
- Figura 5.37** Efeito da incubação, em diferentes soluções, no tamanho e na condensação do ON pelas nanopartículas TMC₄₃/ON e TMCs modificados/ON para a razão N/P 80. **125**
- Figura 5.38** Esquema mostrando a correção do defeito da luciferase pela atuação do ON, GUTERSTAM *et al.*, 2008. **126**
- Figura 5.39** Avaliação da atividade da luciferase para os complexos TMCs/ON. **128**

- Figura 5.40** Avaliação da atividade da luciferase para a o complexo TMC-SA2 /ON razão N/P 80 na presença de cloroquina. **129**
- Figura 5.41** Ensaio de resazurina após 24h de contato com as amostras de polímeros em duas diferentes concentrações. **130**
- Figura 5.42** Ensaio de resazurina após 24h de contato com as amostras de poliplexos nas razões N/P 80 e 160. **131**
- Figura 5.43** Morfologia das células HeLa após contato com a amostra de polímero e poliplexo. (A) Condição controle (barra = 10 μm , aumentos de 10 e 20X), (B) Condição tratada com poliplexo TMC₄₃/ON (aumentos de 10 e 20X) e (C) condição tratada com o polímero TMC₄₃ (aumentos de 10 e 20X). **132**
- Figura 5.44** Citometria de fluxo mostrando a internalização celular dos complexos TMC/ON em células HeLa a razões N/P 80, 120 e 160. **134**

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Números de onda e grupos químicos característicos da quitosana (ν = estiramento; δ = dobramento (deformação)), BRUGNEROTTO, 2001; WANG, 2004; COSTA JR, 2008	29
Tabela 4.1	Soluções usadas na realização da curva padrão para a quantificação da concentração da solução de TMC ₄₃ e TMCs modificadas pelo método do <i>cibacron red</i>	66
Tabela 4.2	Valores utilizados na complexação do TMC ₄₃ (solução com concentração de 0,27% p/v) com ON (concentração 0,3 μ M)	67
Tabela 4.3	Valores utilizados na complexação do TMC-SA2 (solução com concentração de 0,25% p/v) com ON (concentração 0,3 μ M)	68
Tabela 5.1	Principais bandas de absorções na região do IV associadas aos ácidos graxos, quitosana e quitosana acilada	78
Tabela 5.2	Resultados de TG e DSC para a decomposição térmica da amostra de quitosana em atmosfera de N ₂	79
Tabela 5.3	Resultados de TG e DSC para a decomposição térmica das amostras de membranas de quitosana e de <i>N</i> -palmitoil-quitosana em atmosfera de N ₂	87
Tabela 5.4	Parâmetros obtidos para os pontos quânticos, energia de <i>Band gap</i> , <i>blue-shift</i> e tamanho estimado das nanopartículas	91
Tabela 5.5	Graus de substituição determinados por ¹ H NMR obtidos para as amostras de TMCs modificadas	102
Tabela 5.6	Concentração de agregação crítica obtida para os diferentes TMCs	108
Tabela 5.7	Potenciais zeta obtidos para os polímeros TMCs em solução e para os poliplexos TMC/ON N/P 80 (as soluções foram preparadas em tampão 20 mM HEPES + 5% m/v de Glicose, pH 7,40)	118

LISTA DE NOTAÇÕES

BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
CAC	Concentração de Agregação Crítica
CHI	Quitosana
CMC	Carboximetilquitosana
Da	Dalton
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raios X
DSC	Difratometria Exploratória Diferencial
EDC	<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
FBS	Soro fetal bovino
FTIR	Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GA	Grau de acetilação
GD	Grau de desacetilação
GI	Grau de intumescimento
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
HEPES	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -2-etanossulfônico
IV	Infravermelho
L2K	Lipofectamina 2000 [®]
M	Mol/L
MES	Ácido 2- <i>N</i> -morfolinoetanossulfônico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

ON	Oligonucleotídeo curto de fita simples
PBS	Tampão fosfato salino
pDNA	Plasmídeo DNA
pH	Potencial hidrogeniônico
PL	Fotoluminescência
PVA	Poli(álcool vinílico)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Sulfo-NHS	<i>N</i> -Hidroxisulfosuccinimida
t	Tempo
T	Temperatura
TG	Análise Termogravimétrica
TMC	Quitosana modificada com amina quaternária (<i>N,N,N</i> -trimetilquitosana)
TMC-DA	<i>N,N,N</i> -trimetilquitosana modificada com grupos decanoil
TMC-SA	<i>N,N,N</i> -trimetilquitosana modificada com grupos estearil
TMC-VA	<i>N,N,N</i> -trimetilquitosana modificada com grupos valeroil
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
λ	Comprimento de Onda
^1H RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a síntese do derivado de quitosana modificado quimicamente com grupos palmitoil e de derivados da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC) modificados com ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia acíclica (5, 10 e 18 carbonos).

Os derivados *N*-acilados da TMC foram caracterizados e calculados os graus de substituição química utilizando ^1H NMR. A modificação química do TMC com cadeias acíclicas foi realizada com o objetivo de preparar novos complexos de tamanho nanométrico (poliplexos) entre o TMC e seus derivados e oligonucleotídeos curtos de cadeia simples (ONs). A influência do tamanho da cadeia hidrofóbica (C5, C10 e C18) na interação do TMC com os ONs e formação dos poliplexos foi estudada e verificado que o tamanho da cadeia hidrofóbica é um fator importante na interação do polímero com o ON e também na estabilidade da partícula formada. Os poliplexos preparados com TMC-SA2 (modificado com grupos estearil) apresentaram melhores resultados de transfecção celular em células HeLa, além de maior capacidade de condensação do oligonucleotídeo e maior estabilidade em meio de cultura celular. Os resultados obtidos indicam que o tamanho da cadeia hidrofóbica é relevante para a interação do polímero com o ON e indicam a existência de um balanço de interações eletrostáticas/hidrofóbicas entre o polímero e o oligonucleotídeo. Resultados de citotoxicidade em resazurina mostraram que os TMCs modificados com ácidos graxos e, bem como, os poliplexos preparados não apresentaram citotoxicidade em células HeLa.

A influência da modificação da quitosana com grupos palmitoil foi estudada pela conjugação e estabilização do polímero com pontos quânticos (QDs). Os resultados mostraram que a quitosana e a *N*-palmitoilquitosana são eficientes como ligantes e estabilizaram e nuclearam os QDs de CdS com tamanho estimado de 3,5 nm e atividade de fluorescência no espectro visível.

ABSTRACT

This work shows the synthesis of chemically modified chitosan derivative with palmitoyl groups and derivatives of N, N, N-trimethylchitosan (TMC) modified with fatty acids of different acyl chain sizes (5, 10 and 18 carbons).

TMC *N*-acylated derivatives were characterized and calculated the degree of chemical substitution using ^1H NMR. The chemical modification of TMC acyl chains was performed for the purpose of prepare new nanoscale complexes were prepared (polyplexes) between the TMC and its derivatives and single-stranded oligonucleotides (ONs). The influence of the length of the hydrophobic chain (C5, C10 and C18) in the interaction of TMC with the ONs and polyplexes formation was studied and found that the size of the hydrophobic chain is an important factor in the interaction of the polymer with the ON and also stability the formed particle. The polyplexes prepared with TMC-SA2 (modified with stearyl groups) showed better results in cell transfection in HeLa cells, and greater oligonucleotide condensation capacity and high stability in cell culture medium. The results indicate that the size of the hydrophobic chain is important for the interaction of the polymer with the ON and indicate the existence of a balance of electrostatic/hydrophobic interactions between the polymer and the oligonucleotide. Resazurin cytotoxicity results show that, TMCs, and modified fatty acids, as well as those prepared polyplexes showed no cytotoxicity on HeLa cells.

The influence of modification of chitosan with palmitoyl groups was studied by combination and stabilization of polymer with quantum dots (QDs). The results have evidenced that both chitosan and N-palmitoylchitosan have performed as capping ligands on nucleating and stabilizing colloidal CdS QDs with estimated average size below 3.5 nm and fluorescent activity in the visible range of the spectra.

1. INTRODUÇÃO

Um dos biopolímeros naturais mais abundantes, depois da celulose, a quitina e seu derivado desacetilado quitosana tornaram-se centro de atenção científica, principalmente nas últimas duas décadas, devido a combinação incomum de propriedades biológicas com propriedades mecânicas, físicas e químicas. No entanto, aplicações da quitina são limitadas devido à sua natureza insolúvel e intratável. A quitosana, derivado obtido a partir da hidrólise alcalina da quitina tem melhor perfil de solubilidade, menor cristalinidade e é passível de modificações químicas devido à presença de grupos funcionais como hidroxila, acetamida e amina (MOURYA & INAMDAR, 2008; GOMES *et al.*, 2014, KORCHAGINA & PHILIPPOVA, 2012).

Recentemente, a quitosana tem sido proposta como uma alternativa mais viável para utilização como vetor não viral para aplicação em entrega de ácidos nucleicos. A potencialidade da utilização da quitosana como veículo genético é baseada na sua propriedade catiônica (DASH *et al.*, 2011; SARANYA *et al.*, 2011; RAGELLE *et al.*, 2014). Em pH ácido, abaixo do seu pKa, as aminas primárias presentes na cadeia polimérica encontram-se positivamente carregadas. Essas aminas protonadas são capazes de interagir eletrostaticamente com os grupos negativamente carregados presentes nos ácidos nucleicos (DNA, siRNA e oligonucleotídeo curto de fita simples). Esta interação gera a formação espontânea, em meio aquoso, de complexos em escala nanométrica chamados de poliplexos (PLAPPLIED *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2014).

Quitosana com altas massas molares (100-400 kDa) podem formar poliplexos muito estáveis com o DNA (KOPING-HOGGARD *et al.*, 2004). Entretanto, alguns problemas como a baixa solubilidade deste polímero em pH fisiológico, a alta viscosidade em concentrações usadas em ensaios *in vivo* e a lenta dissociação e liberação do ácido nucleico dentro das células, tem limitado o sucesso da utilização da quitosana como veículo de entrega genética (GOMES *et al.*, 2014).

Com o objetivo de ultrapassar essas e outras limitações, diversos derivados da quitosana têm sido desenvolvidos e investigados nos últimos anos (MOREIRA *et al.*, 2009). A modificação química da quitosana é de grande interesse científico porque a modificação não altera a sua estrutura da cadeia polimérica, mantém as suas propriedades físico-químicas e bioquímicas originais além de ser possível acrescentar novas ou superiores propriedades. Ainda possibilita a produção de uma variedade de derivados com propriedades desejáveis para aplicações específicas em áreas diversificadas, principalmente, de produtos farmacêuticos, biomédicos e biotecnológicos. Várias possibilidades de modificações químicas têm sido realizadas, tais como a oligomerização, alquilação, acilação, quaternização, hidroxialquilação, carboxialquilação, tioação, sulfatação, fosforilação, modificações enzimáticas e copolimerização de enxertia (MOURYA & INAMDAR, 2008).

Entre os diversos derivados de quitosana, o derivado catiônico *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC) que apresenta alta solubilidade em pH fisiológico devido a presença de cargas positivas permanentes em sua estrutura polimérica tem sido estudado e proposto, ainda em estágio inicial de pesquisa, como possível vetor para terapia gênica (CURTI *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2014; AMIDI *et al.*, 2006). O grau de quaternização e a massa molecular exercem papel importante na eficiência de transfecção genética e na citotoxicidade. A ligação forte entre os grupos catiônicos da TMC com o ácido nucleico, também pode dificultar a dissociação do gene dentro das células provocando baixa transfecção. Portanto, melhorias da eficiência na entrega genética da TMC também são requeridas (MOURYA & INAMDAR, 2009).

Modificações hidrofóbicas na estrutura da TMC e também na quitosana têm sido estudadas e propostas para melhorar a eficiência de transfecção, bem como, a interação com outras biomoléculas. Os grupos hidrofóbicos podem promover a entrada do material genético nas células, devido a interação com a membrana celular e também podem promover a melhor interação com o material genético e a dissociação do gene (LAYEK & SINGH, 2012; KORCHAGINA & PHILIPPOVA, 2012).

A introdução de grupos laterais hidrofóbicos na estrutura da quitosana aumenta significativamente a tendência de suas cadeias poliméricas em se auto-organizarem em meio aquoso. Semelhante a qualquer outro polieletrólito hidrofobicamente modificado, o derivado hidrofóbico de quitosana, quando é dissolvido em água, organiza-se espontaneamente em agregados devido à associação por interações hidrofóbicas induzindo ao crescimento dos agregados e repulsão eletrostática limitando o seu crescimento (KORCHAGINA & PHILIPPOVA, 2010).

Esses agregados formados por derivados hidrofóbicos de quitosana são muito promissores como veículos para entrega de drogas, entrega de genes e estabilização de nanopartículas inorgânicas. As cargas positivas dessas espécies podem aumentar a sua penetração através das membranas celulares e, portanto, fornecer propriedades mucoadesivas e antimicrobianas. Além disso, vários agregados preparados com derivados de quitosana hidrofobicamente modificados apresentam elevado potencial como vetores genéticos porque a presença de porções hidrofóbicas pode melhorar a eficiência de transfecção (GOMES *et al.*, 2014; KORCHAGINA & PHILIPPOVA, 2010).

Nos últimos anos, um novo campo de pesquisa em nanotecnologia baseado na construção de materiais híbridos bioconjugados surgiu chamando a atenção dos cientistas. Tais materiais são formados especialmente pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e estão sendo estudados para novas aplicações para diagnóstico e imagem *in vitro* e *in vivo*, engenharia de tecidos e biosensoriamento (MANSUR, 2010). A combinação de materiais inorgânicos de baixa dimensão tais como nanotubos, nanofios, nanobastões e pontos quânticos bioconjugados com moléculas orgânicas como polímeros sintéticos, carboidratos, proteínas e dendrímeros oferece uma caixa de ferramentas com inúmeras alternativas para estudar e investigar eventos biológicos e fenômenos complexos que ocorrem nos organismos vivos (SANTOS *et al.*, 2013).

Pontos Quânticos (*Quantum Dots* - QDs) são uma nova classe de nanopartículas semicondutoras fluoróforas, que são ativamente pesquisadas para aplicações em ciências da saúde. No entanto, para serem utilizados em ambientes biológicos eles devem apresentar

compatibilidade no meio fisiológico. Portanto, estudar modificações na superfície química dos QDs é importante para torná-los solúveis em água e biocompatíveis. Além disso, a superfície "ideal" para o nanomaterial híbrido exige comportamento anfifílico com a presença de ambas as funcionalidades hidrofóbicas e hidrofílicas que possam interagir nas suas interfaces com uma variedade de moléculas de espécies biológicas. Assim, têm sido produzidos QDs bioconjugados com polímeros anfifílicos para permitir interações hidrofóbicas, enquanto que a parte hidrofílica possibilita a interação com o meio aquoso. No entanto, a superfície funcionalizada dos QDs deve possuir diâmetro hidrodinâmico adequado para ser útil em aplicações biológicas como sonda fluorescente (MANSUR, 2010; SANTOS *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o desenvolvimento de rotas de síntese inovadoras para a produção de QDs bioativos, com estabilidade química, distribuições estreitas de tamanho e biocompatibilidade, associado com o menor diâmetro hidrodinâmico possível é uma área muito promissora para pesquisas científicas, SANTOS *et al.*, 2013. Apesar da variedade de potenciais aplicações dos pontos quânticos, poucos relatos foram publicados combinando os pontos quânticos com quitosana e derivados e a maioria dos trabalhos estão relacionados com a produção de filmes e nanopartículas de quitosana com QDs embebidos na matriz polimérica. Portanto, pesquisas utilizando a quitosana e seus derivados hidrofóbicos como estabilizantes de pontos quânticos são inovadoras e podem trazer resultados científicos interessantes pela combinação das propriedades biológicas e físico-químicas da quitosana e derivados com as propriedades dos QDs (MANSUR, 2010; MANSUR *et al.*, 2012, MANSUR *et al.*, 2013, SANTOS *et al.*, 2013).

Neste trabalho foram desenvolvidas e caracterizadas a quitosana e a TMC quimicamente funcionalizadas através da reação de acilação de grupos hidrofóbicos alifáticos de diferentes tamanhos de cadeia. O caráter inovador deste trabalho consiste no estudo da utilização da quitosana modificada com grupos palmitoil como agentes de carreamento e estabilização de nanopartículas fluorescentes (pontos quânticos) e na aplicação dos derivados *N*-acilados da TMC como vetores não virais para entrega de oligonucleotídeo curto de cadeia simples. Os novos poliplexos TMC/oligonucleotídeo preparados foram

avaliados quanto ao diâmetro hidrodinâmico, a estabilidade em meio de cultura celular, a capacidade de condensar o oligonucleotídeo e quanto à eficiência de transfecção celular e citotoxicidade *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Preparar e caracterizar a quitosana (CHI) e a *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC) quimicamente modificada com ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia para potencial aplicação farmacêutica e biológica.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Modificar quimicamente a quitosana com grupos palmitoil utilizando a rota de funcionalização com os agentes de acoplamento EDC e sulfo-NHS.

2.2.2. Caracterizar a quitosana modificada por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR), análise térmica e ângulo de contato.

2.2.3. Preparar e caracterizar conjugados com a quitosana modificada com pontos quânticos (QD) e estudar a estabilidade das nanopartículas formadas.

2.2.4. Desenvolver uma rota de síntese para modificar a TMC com diferentes tamanhos de cadeias de ácidos graxos (5, 10 e 18 carbonos).

2.2.5. Caracterizar a modificação química da TMC por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H RMN) e por FTIR.

2.2.6. Preparar complexos entre as TMCs modificadas e os oligonucleotídeos de cadeias simples.

2.2.7. Caracterizar os complexos TMC/ON em relação ao tamanho, potencial zeta e estabilidade em meio de cultura celular.

2.2.8. Avaliar a capacidade de condensação do ON nos complexos formados com as TMCs modificadas utilizando ensaio de retenção em gel de poli(acrilamida).

2.2.9. Avaliar a transfecção celular e a citotoxicidade das nanopartículas TMC/ON em células HeLa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Quitina e Quitosana

3.1.1. Aspectos Gerais

A quitina e a quitosana são copolímeros aminoglicopiranos compostos por resíduos de *N*-acetilglicosamina e glicosamina, Figura 3.1. Estes polissacarídeos provêm de fontes renováveis e são estudados na literatura de forma intensiva para aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, biomédica, biotecnológica, agrícola, indústrias alimentar e não alimentar, bem como no tratamento de água, papel e têxteis (MUZZARELLI *et al.*, 2004; MUZZARELLI *et al.*, 2011; MUZZARELLI *et al.*, 2012). Quitina e quitosana possuem propriedades únicas e emergiram como uma nova classe de materiais com funções fisiológicas altamente sofisticadas devido à sua atividade biológica versátil, excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade em combinação com baixa toxicidade (COSTA JR *et al.*, 2008; COSTA JR *et al.*, 2009; MOURYA & INAMDAR, 2008).

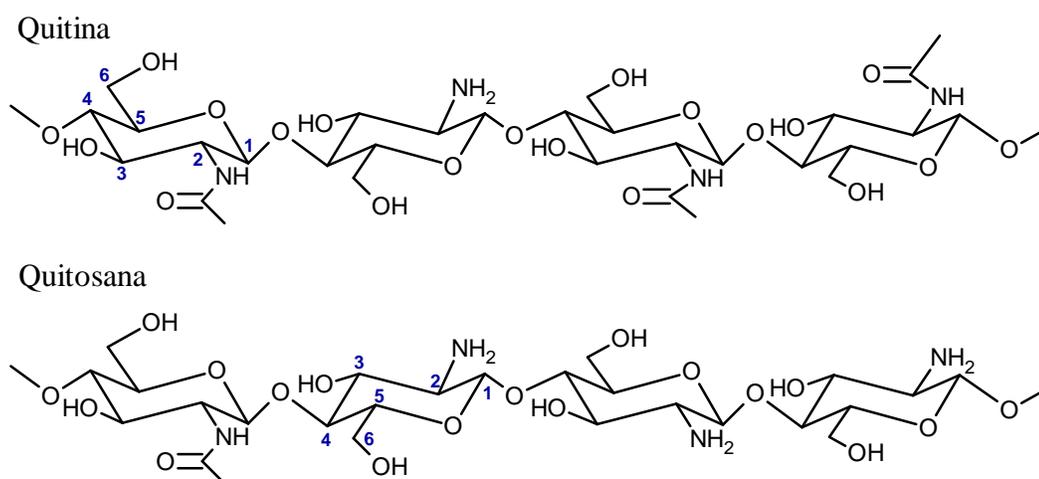


Figura 3.1. Representação das estruturas químicas da quitina e da quitosana.

A quitina é o segundo biopolímero natural mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, sua presença ocorre também em nematóides e parede celular de fungos e leveduras. A quitosana pode ser obtida

a partir da quitina por meio da desacetilação desta em meio alcalino. Quando o grau de desacetilação (GD) da quitina alcança em torno de 50% (dependendo da origem do polímero) ela se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamada de quitosana (MUZZARELLI *et al.*, 2004; KUMAR, 2000).

A quitosana possui melhor solubilidade em meio aquoso ácido, menor cristalinidade e é passível de modificações químicas devido à presença de grupos funcionais como hidroxila, acetamida e amina. A modificação química da quitosana é de interesse científico porque a funcionalização não afeta estruturalmente a cadeia polimérica da quitosana, pois mantém a estrutura física e as propriedades bioquímicas originais e agrega ao polímero propriedades novas ou melhoradas (KUMAR *et al.*, 2004). A modificação química da quitosana proporciona a criação de uma variedade de derivados com propriedades diversas para aplicações específicas em diversas áreas como em produtos farmacêuticos, biomédicos e em biotecnologia (MOURYA & INAMDAR, 2008).

3.1.2. Propriedades físico-químicas

A quitina é um heteropolímero catiônico linear que possui resíduos de *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis e distribuídos aleatoriamente unidos pela ligação β -1,4. A configuração β -1,4 resulta em uma estrutura polimérica rígida e não ramificada. A diferença entre a quitina e os demais polissacarídeos abundantes, é a presença do nitrogênio. Quitobiose, *O*-(2-amino-2-desoxi- β -*D*-glicopiranosil)-(1-4)-2-amino-2-desoxi-*D*-glicose, é a natureza estrutural da quitina. A água de ligação também faz parte da estrutura polimérica (KUMAR *et al.*, 2004).

A abundância dos grupos hidroxila (um grupo hidroxila primário no carbono 6 e uma hidroxila secundária no carbono 3) e o grupo amina altamente reativo (no carbono 2) ou os grupos *N*-acetil promovem a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, resultando na formação de agregados poliméricos lineares com alta cristalinidade e com propriedades variadas (PRASHANTH & THARANATHAN, 2007).

A solubilização da quitosana ocorre pela protonação dos grupos $-NH_2$ posicionados no carbono 2 da unidade repetitiva *D*-glicosamina, convertendo o polissacarídeo em um polieletrólito em meio aquoso ácido (RINAUDO, 2006).

Entretanto, a solubilidade da quitosana depende de vários outros parâmetros além do grau de desacetilação, tais como, massa molar, concentração do ácido e do polímero e da força iônica do meio. De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina de quitina e quitosana, podem-se obter diversos tipos de quitosana variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade. Geralmente, é difícil a obtenção de quitosana com elevado grau de desacetilação e um elevado peso molecular, pois, à medida que este aumenta a possibilidade de degradação do polímero também aumenta (SILVA *et al.*, 2006; MUZZARELLI *et al.*, 2011; MUZZARELLI *et al.*, 2012).

Em estado sólido, a quitosana é um polímero semicristalino. Em soluções diluídas os parâmetros responsáveis pela conformação da cadeia de quitosana podem ser divididos em duas partes, parâmetros estruturais (onde se encaixam o GA, o comprimento da cadeia e a distribuição dos dois tipos de resíduos *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina) e parâmetros do meio (como força iônica, pH, temperatura, constante dielétrica do solvente, etc.), SORLIER, *et al.*, (2002).

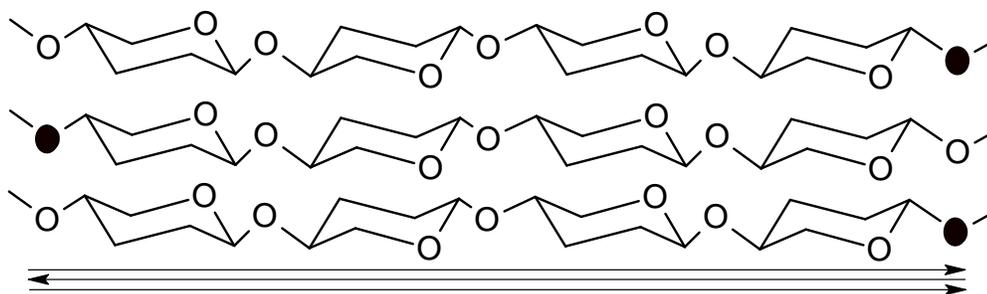
A quitosana é facilmente solúvel em soluções ácidas diluídas em pH inferiores a 6,0, devido à protonação dos grupos amina que possuem um valor de pKa de 6,3 tornando a quitosana solubilizada um polieletrólito catiônico (COSTA *et al.*, 2008). A presença dos grupos amina indica que o pH altera substancialmente o estado carregado e as propriedades da quitosana. Em valores de pH inferiores a 6,5, as aminas protonam-se tornando-se carregadas positivamente e tornando a quitosana em um polieletrólito catiônico solúvel em água. Por outro lado, em valores de pH acima de 6,5, as aminas desprotonam-se tornando o polímero insolúvel em meio aquoso. A transição solúvel para insolúvel ocorre no seu valor de pKa entre 6 e 6,5. A solubilidade da quitosana em meio aquoso ácido é dependente do

método de desacetilação utilizado e do grau de desacetilação do polímero, pois esses fatores afetam o seu pKa. (MUZZARELLI *et al.*, 2012).

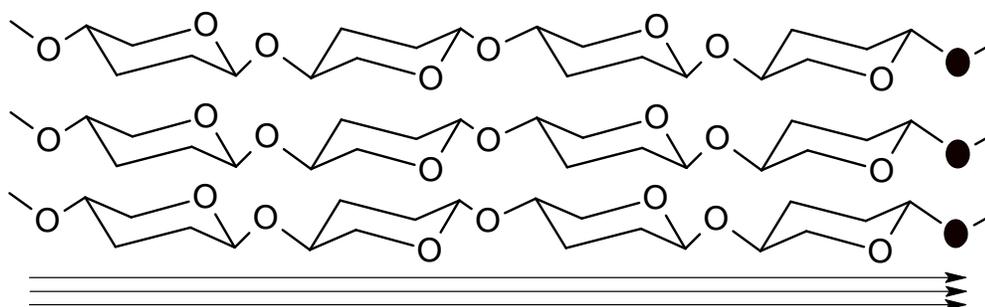
A quitina e a quitosana, também são conhecidas por apresentar polimorfismo (KOZO *et al.*, 2004). Existem três formas conhecidas de quitina, α , β e γ , dependendo da origem do polímero e do seu tratamento durante o processo de extração. As formas polimórficas da quitina diferem no empacotamento e polaridades de cadeias adjacentes em folhas sucessivas (MOURYA & INAMDAR, 2008). Em geral, as cadeias individuais assumem uma estrutura essencialmente linear, que sofrem um giro completo, a cada 10,1-10,5 Å ao longo do eixo da cadeia. Porque cada unidade glicosídica na cadeia é quiral e todas as unidades estão conectadas por um átomo de oxigênio que liga o carbono 1 de uma unidade glicosídica ao carbono 4 de uma unidade adjacente, uma direção distinta "esquerda" e "direita" poderá ser atribuída a cada cadeia polimérica (RAMAKRISHNAN & PRASAD, 1972; MOURYA & INAMDAR, 2008).

As formas polimórficas da quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero em lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). A forma amorfa mais comum exibida pela quitina é conhecida como conformação α , em que a célula unitária é ortorrômbica e as cadeias individuais são dispostas em forma antiparalela (Figura 3.2 (a)) correspondendo a um empacotamento denso resultante da disposição das cadeias poliméricas em diferentes lamelas ou folhas. Esta disposição favorece a existência de muitas ligações de hidrogênio inter e intra cadeias entre as mesmas lamelas e as lamelas vizinhas (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; MOURYA & INAMDAR, 2008). Assim, as cadeias adjacentes estão orientadas em direções opostas. A forma amorfa menos comum, conhecida como a conformação β , corresponde a uma célula unitária monoclinica com cadeias de polímero dispostas em forma paralela conduzindo a forças intermoleculares fracas, Figura 3.2 (b). Uma terceira forma, a γ -quitina, possui duas cadeias paralelas em associação com uma cadeia antiparalela. Esta terceira forma, menos estudada que as demais, pode ser considerada como uma variante das estruturas anteriores (MOURYA & INAMDAR, 2008).

(a) Arranjo antiparalelo



(b) Arranjo paralelo

**Figura 3.2.** Arranjos paralelo e antiparalelo na cadeia polimérica da quitina.

A cristalinidade é máxima para quitina (isto é, 0% desacetilada) e para a quitosana totalmente desacetilada (isto é, 100% desacetilada). A quitosana que possui estrutura linear não ramificada e alta massa molecular é um excelente agente de aumento de viscosidade em ambientes ácidos e se comporta como um material pseudoplástico ao provocar redução da viscosidade com aumento das taxas de cisalhamento. A viscosidade da solução de quitosana aumenta com o aumento da concentração de quitosana, diminuição da temperatura e com o aumento do grau de desacetilação (DASH *et al.*, 2011).

Embora as estruturas moleculares da quitina e quitosana pareçam bastante semelhantes, as características físicas e as reações químicas a que são submetidas são muitas vezes surpreendentemente distintas. Ambos os polímeros possuem grupos hidroxilas e aminas reativos, mas geralmente a quitosana é menos cristalina que a quitina, tornando a molécula de quitosana menos impedida estericamente e mais reativa. Depois do aquecimento, a

quitina e a quitosana sofrem decomposição antes de ocorrer a fusão, e, portanto, elas não apresentam temperaturas de fusão definidas (MOURYA & INAMDAR, 2008).

Provavelmente, a diferença mais notável entre a quitina e a quitosana esteja entre suas solubilidades. Existem relativamente poucos solventes para quitina, enquanto quase todos os ácidos aquosos são capazes de dissolver a quitosana, dos quais o mais utilizados são o ácido fórmico e ácido acético. A multiplicidade de sítios catiônicos formados devido à protonação dos grupos amina ao longo das cadeias de quitosana aumenta a sua solubilidade aumentando tanto a polaridade e o grau de repulsão eletrostática (MOURYA & INAMDAR, 2008).

A escolha da fonte da quitina e o seu processo de isolamento também são fatores que afetam a qualidade e as propriedades físico-químicas da quitosana de forma significativa, POCHANAVANICH & SUNTORNSUK (2002). A quitosana mais disponível comercialmente é produzida a partir da desacetilação da quitina retirada de cascas de camarão em condições alcalinas, a altas temperaturas e por longos períodos de tempo (KANNAN *et al.*, 2010; POCHANAVANICH & SUNTORNSUK, 2002; WU *et al.*, 2005). No entanto, o fornecimento das matérias-primas é variável lote a lote, sazonal e o processo é laborioso e dispendioso (CRESTINI *et al.*, 1996). Além disso, a quitosana obtida é heterogênea no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas e o polímero obtido a partir de crustáceos pode apresentar reações alérgicas quando utilizado em biomateriais (CRESTINI *et al.*, 1996).

Os recentes avanços na tecnologia de fermentação sugerem que o cultivo de fungos selecionados pode representar uma fonte alternativa para obtenção de quitosana. Paredes das células fúngicas e septos de *Ascomicetos*, *Zigomicetos*, *Basidiomicetos* e *Deuteromicetos* contêm principalmente a quitina, que é responsável pela manutenção da forma, intensidade e integridade de estrutura celular (POCHANAVANICH & SUNTORNSUK, 2002; WU *et al.*, 2005). Estes micro-organismos podem ser facilmente cultivados com nutrientes simples e a quitosana presente na parede celular facilmente recuperada. A produção e caracterização da quitosana têm sido estudadas principalmente

em espécies de fungos de *Absidia* e *Mucor* (POCHANAVANICH & SUNTORNSUK, 2002).

Outra alternativa para a produção de quitosanas com propriedades mais homogêneas e mais adequadas para utilização em aplicações farmacêuticas é a quitosana obtida a partir de cogumelos comestíveis, *Agaricus biosporus* (PLAPIED *et al.*, 2010). Os polímeros obtidos a partir dessa fonte apresentam excelente reprodutibilidade em relação à massa molecular e ao grau de desacetilação além de baixa percentual de outros açúcares. A empresa Kitozyme[®] (Bélgica) produz quitosanas e seus derivados, como a *N, N, N*-trimetilquitosana obtida a partir de origem não animal, de cogumelos, em grau farmacêutico e com variedade de massas moleculares e graus de acetilação.

3.2. Modificações Químicas

A quitina é um biopolímero quimicamente estável devido à existência no seu estado sólido, de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, esta inércia química causa dificuldades em sua utilização. A α quitina devido a sua insolubilidade é raramente submetida a reações químicas, exceto para reações de desacetilação para obtenção da quitosana, já a β quitina quando comparada à α tem relativamente alta reatividade (MOURYA & INAMDAR, 2008).

Já a quitosana é uma molécula mais reativa, sem modificar o grau de polimerização do polímero, pode-se modificá-lo quimicamente uma vez que possui grupos funcionais reativos. As aminas primárias e grupos hidroxilas primários e secundários em sua estrutura química oferecem muitas possibilidades de modificações, tais como, *N*-acetilação, *N*-acilação, *N*-alquilação, *N*-carboxilação, *N*-sulfonação e formação de bases de Schiff com aldeídos e cetonas. Apesar da maioria das modificações químicas da quitosana ocorrer em seus grupos amino (mais reativos), as hidroxilas em C-3 e C-6 das unidades estruturais do biopolímero também são susceptíveis a reações (MOURYA & INAMDAR, 2008). As modificações químicas nos grupos hidroxila ocorrem preferencialmente naqueles

posicionados em C-6, uma vez que os localizados em C-3 são menos reativos e mais estericamente impedidos (KUMAR *et al.*, 2004).

A versatilidade de possíveis modificações na cadeia polimérica da quitosana e as possíveis aplicações dos seus derivados representam grande desafio para a comunidade científica e para a indústria (MOURYA & INAMDAR, 2008).

O uso prático da quitosana tem sido limitado pelas suas formas não modificadas quimicamente, então a modificação da quitosana é requerida para possibilitar seu uso em uma variedade de aplicações biomédicas incluindo a interação e o carreamento intracelular de materiais genéticos. Nos últimos anos, muitos derivados de quitosana têm sido estudados para utilização em aplicações biológicas (SARANYA *et al.*, 2011).

Reações de *N*-alquilação, *N*-acilação, e *N*-hidroxiacilação são utilizadas para melhorar a bioatividade da quitosana. Além disso, o substituinte orgânico notavelmente altera a solubilidade da quitosana em água. Como mencionado, o excesso de ligação de hidrogênio intramolecular e intermolecular entre as cadeias e folhas de quitosana tem um papel importante para a insolubilidade do polímero em água. Através da substituição dos grupos *N*-amino, a regularidade normal das ligações de hidrogênio intermoleculares é reduzida, criando espaço para as moléculas de água preencherem e solvatarem os grupos hidrofílicos presentes na estrutura polimérica (e do substituinte, se ele compreende componentes hidrofílicos). Espera-se que a substituição com grupos volumosos suplementares aumente a solubilidade da quitosana em água. Isto porque o grande tamanho do substituinte cria mais espaço entre as folhas do polímero, fragilizando, assim, as ligações de hidrogênio intermoleculares. Isso permite que mais moléculas de água possam preencher esses espaços, o que leva ao aumento da solubilidade do polímero (CHAMPAGNE, 2008).

A estrutura química da quitosana, juntamente com seu peso molecular, grau de desacetilação e grau de ionização tem contribuído para utilização como agente hemostático. Porém, a não uniformidade na estrutura química da quitosana provocada pelas variações estruturais da quitina geram propriedades hemostáticas variáveis lote a lote. Uma das

maneiras reportadas na literatura para contornar esse problema é a modificação química da quitosana com grupos hidrofóbicos (DE CASTRO *et al.*, 2011). Quitosana modificada com grupos hidrofóbicos, como ácidos graxos de cadeias longas (ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico) podem formar micelas de escala nanométrica em meio aquoso. As nanomicelas formadas apresentam núcleo hidrofóbico e casca hidrofílica em meio aquoso. O núcleo possibilita o carregamento de drogas hidrofóbicas e a casca promove a estabilidade coloidal das partículas (CHIU *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011).

Nesta revisão, serão descritas algumas das principais reações de modificação da quitosana e a importância dos derivados obtidos.

3.2.1. Quitosana Quaternizada – *N,N,N*-trimetilquitosana

A metilação intensiva da quitosana gera a formação da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC), Figura 3.3, um derivado caracterizado por possuir cargas positivas permanentes em suas cadeias poliméricas como consequência da quaternização dos grupos amino presentes nos carbonos 2 da estrutura da quitosana (MOURYA & INAMDAR, 2009). A TMC é um polieletrólito solúvel em água com boa absorção intestinal e propriedades adequadas para adsorção de drogas macromoleculares hidrofílicas (BRITTO & ASSIS, 2007; CURTI *et al.*, 2003; LIANG *et al.*, 2009).

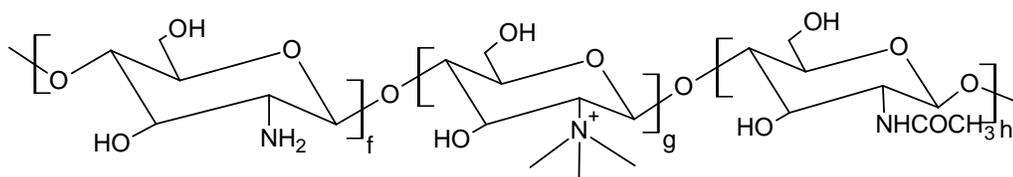


Figura 3.3. Estrutura química da TMC.

A TMC pode ser sintetizada tanto pela adição covalente do substituinte contendo um grupo amônio quaternário quanto pela quaternização dos grupos amino do polímero (CURTI *et al.*, 2003). Este último método tem recebido a atenção com a utilização de agentes de alquilação como os haletos de alquila. Graus de quaternização (DQ) superiores a 53% têm

sido alcançados pela reação da quitosana com iodometano (um agente de alquilação) em condições alcalinas na presença de *N*-metil-2-pirrolidona (BRITTO & ASSIS, 2007).

A trimetilação permite a manutenção ou melhoria das propriedades mucoadesivas da quitosana dependendo do grau de quaternização. Em particular, as propriedades mucoadesivas aumentam com o aumento do grau de quaternização. Isso acontece porque com a trimetilação, o caráter catiônico da quitosana é aumentado e promove maior interação com a mucina, resultando em mucoadesão (MOURYA & INAMDAR, 2008).

Em virtude da forte propriedade básica do grupo de amônio quaternário, a TMC é considerada como candidato adequado em relação a quitosana para a condensação e entrega de ácidos nucleicos carregados negativamente (MOURYA & INAMDAR, 2008).

3.2.2. Hidroxialquil quitosana

Quitosanas hidroxialquílicas são obtidas pela reação da quitosana com epóxidos (com óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de butileno) e glicidol. Dependendo do epóxido, das condições (solvente e temperatura) a reação pode ocorrer predominantemente no grupo amino ou hidroxila, originando *N*-hidroxialquil ou *O*-hidroxialquil ou a mistura de ambos (MOURYA & INAMDAR, 2008).

A proporção de substituição O/N (hidroxipropilação da quitosana por óxido de propileno) é determinada por escolha do catalisador (NaOH ou HCl) e temperatura de reação. Sem catalisador a *N*-hidroxipropilação é obtida devido a maior reatividade dos grupos amina, a catálise ácida leva a formação principalmente do *N*-derivado e também alguns produtos de *O*-alquilação. Com a catálise básica a *O*-alquilação é preferida com uma tendência a produção de oligômeros, a temperaturas superiores a 40°C (PENG *et al.*, 2005).

A síntese da hidroxipropilquitosana foi estudada por PENG *et al.* (2005) e o efeito antimicrobial foi avaliado enquanto que DANG *et al.* (2006) avaliou o potencial do mesmo polímero como material transportador de células sensível a temperatura.

3.2.3. Carboxialquil quitosana

O processo de carboxialquilação promove a formação de grupos ácidos sobre a estrutura polimérica da quitosana. Com a introdução de grupos carboxil nos grupos amino da quitosana polieletrólitos anfóteros contendo ambos os grupos catiônicos e aniônicos são preparados. Através da variação do grau de substituição do grupo carboxil podem-se obter várias densidades de carga na cadeia macromolecular, que proporcionam uma forma conveniente de controlar o comportamento pH dependente. Ambos, derivados de quitosana *N*-carboxialquil e *O*-carboxialquil são preparados utilizando-se diferentes condições reacionais com ácido mono-halocarboxílico para atingir a seletividade *N* contra *O*. Uma rota de síntese seletiva para a formação da *N*-carboxialquilação utiliza carboxialdeídos em uma sequência de aminação reductiva. Ao usar o ácido glioxílico, a quitosana solúvel em água (*N*-carboximetilquitosana - CMC) é obtida. Com a seleção adequada da proporção dos reagentes, isto é, com quantidades equimolares de ácido glioxílico e de grupos aminoácidos, o produto é em parte *N*-monocarboxi metilado, *N*-dicarboxi metilado e *N*-acetilado dependendo da origem da quitosana (MOURYA & INAMDAR, 2008; UPADHYAYA *et al.*, 2013).

A carboximetilação é uma rota de modificação da quitosana interessante porque aumenta a solubilidade aquosa do polímero enquanto acrescenta novas funcionalidades. Os mecanismos de agregação e solubilidade da CMC podem ser explicados da seguinte maneira, enquanto as ligações de hidrogênio entre o polímero e a água e a presença dos grupos carboxilados ($-\text{COO}^-$) nas cadeias da CMC são forças diretoras para a solubilidade aquosa do polímero, as ligações de hidrogênio intermoleculares entre as cadeias de CMC e a repulsão eletrostática entre elas são as forças responsáveis pela agregação da CMC em água (UPADHYAYA *et al.*, 2013).

A *N*-carboximetilquitosana não é somente solúvel em água como também possui propriedades químicas, físicas e biológicas únicas como alta viscosidade, grande volume hidrodinâmico, capacidade de formação de gel e filmes que fazem deste derivado uma

opção atraente para utilização em biomateriais, cosméticos e indústria alimentícia (MOURYA & INAMDAR, 2008).

A carboximetilquitosana tem sido utilizada no desenvolvimento de diferentes sistemas de entrega de proteínas como em hidrogéis superporosos, hidrogéis pH sensitivos e hidrogéis com ligações cruzadas (MOURYA & INAMDAR, 2008).

3.2.4. N-Acilação da quitosana

Derivados de quitosana *N*-acilados podem ser obtidos partir da reação da quitosana com cloretos de acila e anidridos (Figura 3.4). De maneira geral, as reações de acilação são conduzidas em meios como ácido acético aquoso/metanol, piridina, piridina/clorofórmio, ácido tricloroacético/dicloroetano, mistura etanol/metanol, misturas metanol/formamida ou dimetildformamida/cloreto de lítio (MOURYA & INAMDAR, 2008).

Devido às reatividades diferentes das duas hidroxilas e do grupo amino da unidade de repetição da quitosana, a acilação pode ser controlada nos locais esperados, isto é, nas aminas, hidroxilas, ou em ambos os grupos. A introdução de grupos hidrofóbicos dota a quitosana com novas propriedades físico-químicas tais como a formação de organizações poliméricas, incluindo géis, vesículas poliméricas, filmes Langmuir-Blodgett, cristais líquidos, membranas e fibras (MOURYA & INAMDAR, 2008, LAYEK & SINGH, 2012).

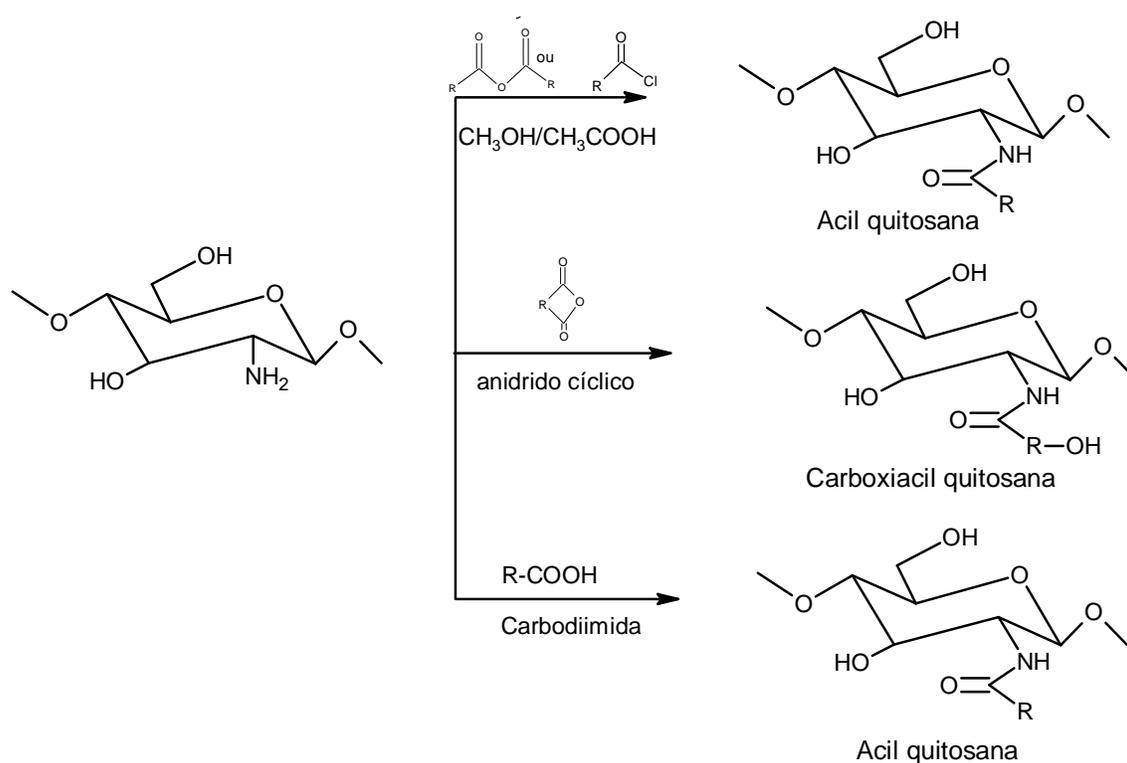


Figura 3.4. Reações de acilação da quitosana.

Polímeros hidrofóbicos solúveis em água surgiram como nova classe de macromoléculas industrialmente importantes. A introdução de grupos hidrofóbicos também dota a quitosana com uma maior variabilidade de solubilidade e propriedades físico-químicas ZONG *et al.*, (2000).

ZONG *et al.*, (2000) sintetizaram quitosanas aciladas com cadeias hidrofóbicas longas, reagindo a quitosana com cloretos de hexanoíla, decanoíla e lauriloíla em mistura de piridina/clorofórmio. Estes derivados acilados com 4 graus de substituição por anel monossacarídeo (dissubstituição no amino e monosubstituição em cada um dos grupos hidroxila) exibiram excelente solubilidade em solventes orgânicos, tais como, clorofórmio, benzeno, piridina, e tetrahydrofurano. As análises indicam que estes polímeros formam estrutura em camadas no estado sólido e o espaçamento entre as camadas aumenta linearmente com o aumento do comprimento de cadeias laterais.

A *N*-acilação da quitosana com grupos saturados (por exemplo, com cadeias carbônicas de 12-18 carbonos) e grupos acil insaturados de diferentes comprimentos de cadeia (por exemplo, oleico e linoleico), bem como os grupos acil aromáticos foram sintetizados e obtidos substituintes distribuídos aleatoriamente em quantidade controlada ao longo da cadeia polimérica. Anidridos cíclicos também são usados para a acilação via reações de abertura de anel formando o derivado de quitosana *N*-carboxilado. LAYEK & SINGH (2012) estudaram o efeito da modificação química da quitosana com cadeias carbônicas de comprimentos crescentes (C₆-C₁₀) sobre a solubilidade em água, o tamanho da partícula, o potencial zeta, a afinidade em ligar-se ao plasmídeo DNA, a eficiência na transfecção celular e a biocompatibilidade *in vitro*. Os derivados *N*-acilados foram sintetizados pela reação de acoplamento entre os grupos carboxílicos presentes nos ácidos graxos e os grupos amina presentes na quitosana, utilizando o reagente EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)).

TIEN *et al.* (2003), sintetizaram derivados hidrofóbicos de quitosana (caproil, octanoil, miristoil e palmitoil) pela reação de *N*-acilação utilizando os respectivos cloretos de acila em pH 7,2. Foi relatado que os derivados apresentaram menor capacidade de hidratação e desempenharam papel importante na estabilização da rede polimérica via interações hidrofóbicas.

3.2.5. *O*-Acilação da quitosana

A introdução de grupos hidrofóbicos na quitosana através da ligação éster tem duas vantagens: (i) grupos hidrofóbicos contribuem para a organo solubilidade (ii) a ligação éster é hidrolisada por enzimas como a lipase. Além disso, a ligação glicosídica de derivados de quitosana, também é degradada por glicosidases. Portanto, os derivados de quitosana com grupos *O*-acil são considerados materiais de revestimento biodegradáveis (MOURYA & INAMDAR, 2008).

A preparação de *N,O*-acil de quitosana em ácido metanossulfônico (MeSO₃H) como solvente foi realizada. Embora a *O*-acilação seletiva da quitosana em MeSO₃H em virtude da formação de sal de amina primária com o grupo MeSO₃H foi parcialmente relatada, a

estutura química detalhada e o efeito protetor do grupo MeSO_3H sobre as amins ainda não estão claros. A preparação de O, O-didecanoil quitosana e O-succinil quitosana foi também relatada através da formação do intermediário protetor ftaloilquitosana. Este método, no entanto, precisa de várias etapas como a proteção do grupo amino por ftaloilação, O-acilação e, finalmente, a remoção do grupo de proteção por um método apropriado, como através da utilização de hidrato de hidrazina (MOURYA & INAMDAR, 2008).

3.2.6. Derivados de quitosana anfífilicos

Com o avanço das tecnologias de materiais, a quitosana tem sido quimicamente modificada para se auto-organizar em nanoarquiteturas que são utilizáveis em aplicações biomédicas avançadas, tais como nanocarreadores de drogas, *scaffolds* para engenharia de tecidos e agentes de nanoimagem. A quitosana coloidal anfífilicamente modificada é um material relativamente recente recebendo maior atenção com inúmeras publicações que abordam as vantagens médicas em sistemas específicos (LARSSON *et al.*, 2013).

Modificações químicas na quitosana com ambos grupos hidrofóbico e hidrofílicos foram relatados pela primeira vez por YOSHIOKA *et al.* (1995). Cadeias alquílicas hidrofóbicas de vários comprimentos foram ligadas aos grupos amina e as cadeias hidrofílicas e os grupos sulfato foram ligados às hidroxilas, produzindo quitosana modificada capaz de formar micelas poliméricas.

MIWA *et al.*, (1993) sintetizaram a N-lauril-carboximetilquitosana inserindo os grupos lauril hidrofóbicos nos grupos amino e os grupos hidrofílicos carboximetil nas hidroxilas, formando também micelas poliméricas. Com base nestes resultados, preparações de derivados anfífilicos a base de quitosana são muitas vezes realizados pela modificação hidrofílica por carboximetilação para aumentar a solubilidade em água e com modificações adicionais utilizando grupos hidrofóbicos, tal como colesterol, ácido linoleico, ácido deoxicólico e anidrido hexanoil anidrido. Com um grande número de possíveis configurações, as estratégias gerais de modificação tipicamente incluem reações com grupos hidrofílicos para aumentar a solubilidade em água e com os grupos hidrofóbicos

para facilitar a auto-organização do polímero em nanoestruturas, bem como para melhorar as interações com estruturas lipídicas bio-relevantes, tais como membranas celulares (LARSSON *et al.*, 2013).

Colóides auto-organizados têm mostrado grande potencial em numerosas aplicações, com facilidade de produção, regularidade no tamanho e forma devido a presença de um núcleo, uma bicamada ou nanodomínios com propriedades polares opostas as do solvente. O tamanho das partículas pode também ser importante, influenciando as características tanto de circulação quanto de internalização celular. A superfície das nanopartículas é muitas vezes caracterizada em termos do potencial zeta, com valor absoluto da ordem de +25 mV, sugerindo boa estabilidade em soluções aquosas. As partículas carregadas devem interagir com as biomoléculas e células *in vivo*, assim, o potencial zeta é uma propriedade relevante. No entanto, estas interações eletrostáticas são complexas, tornando a estabilidade *in vivo* de difícil previsão, somente a partir dos valores de potencial zeta. A superfície das nanopartículas expostas ao ambiente podem ser modificadas para aplicações específicas como para evitar a adsorção de proteínas, a agregação e a coagulação da partícula e prolongamento do tempo de circulação na corrente sanguínea (LARSSON *et al.*, 2013).

Lipossomos e micelas de baixo peso molecular foram amplamente estudados para aplicações farmacêuticas e biotecnológicas, tais como a entrega de drogas, terapia gênica, e entrega de proteínas à célula alvo. As novas moléculas poliméricas anfífilicas são caracterizadas em relação às suas propriedades físico-químicas, tais como a concentração de agregação crítica (CAC), tamanhos de partículas, potencial zeta, e quanto a características nano e microestruturais, com propriedades consoantes à natureza e ao grau de substituição. Geralmente, substituintes ácidos permitem interações com os grupos amino dependentes do pH. A variedade e complexidade das relações entre estrutura e propriedades em vários tipos de anfífilicos poliméricos a base de quitosana tornam as simplificações e generalização das propriedades finais difíceis. Normalmente, os polímeros anfífilicos a base de quitosana e outros polímeros auto associam-se assumindo uma estrutura hidrofóbica-hidrofílica núcleo-casca (LARSSON *et al.*, 2013). Os domínios hidrofóbicos podem também estar intercalados através da partícula, especialmente grupos hidrofóbicos curtos.

PHILIPPOVA & KORCHAGINA (2012) propuseram este tipo de estrutura para as nanopartículas de quitosana modificadas com cadeias laterais n-dodecil, sugerindo a estrutura de nanogel com ligações cruzadas e domínios hidrofóbicos.

Auto-organização dos anfifílicos poliméricos a base de quitosana é impulsionada pela orientação dos grupos hidrofóbicos para formar domínios hidrofóbicos com o grupos hidrófilos orientados para o meio aquoso. Geralmente, a CAC diminui com o aumento do grau de substituição hidrofóbica e do tamanho dos grupos hidrofóbicos, como relatado na literatura (PHILIPPOVA & KORCHAGINA, 2012).

3.2.7. *Reatividade Quitosana x TMC*

Considerando a disponibilidade dos grupos reativos (aminas e hidroxilas) na cadeia polimérica da quitosana e de seu derivado TMC para interagir com os reagentes e formar produtos acilados, observa-se maior complexidade e impedimento estérico da cadeia polimérica da TMC em relação da cadeia de quitosana. Na Figura 3.5, estão representadas as estruturas tridimensionais das principais grupos químicos presentes nas estruturas macromoleculares da quitosana e da TMC.

Na macromolécula de TMC, além dos grupos *N*-acetilglicosamina e glicosamina, existem os grupos trimetilados que fornecem à cadeia polimérica caráter catiônico permanente, gerando maior repulsão entre os grupos e maior complexidade e impedimento estérico. Quando em solução aquosa, o polímero TMC pode se conformar de modo a expor os grupos quaternizados ao solvente tornando os grupos $-NH_2$ menos disponíveis e mais impedidos estericamente em comparação com a quitosana não modificada (MOURYA & INAMDAR, 2009). Para polímeros de mesmo grau de desacetilação, ao se comparar o derivado quaternizado com a quitosana, aquele possuirá menos grupos $-NH_2$ disponíveis para a reação com os reagentes de acilação uma vez que parte destes grupos foram quaternizados. Portanto, espera-se que a reação química no TMC seja mais dificultada do que para a quitosana não modificada.

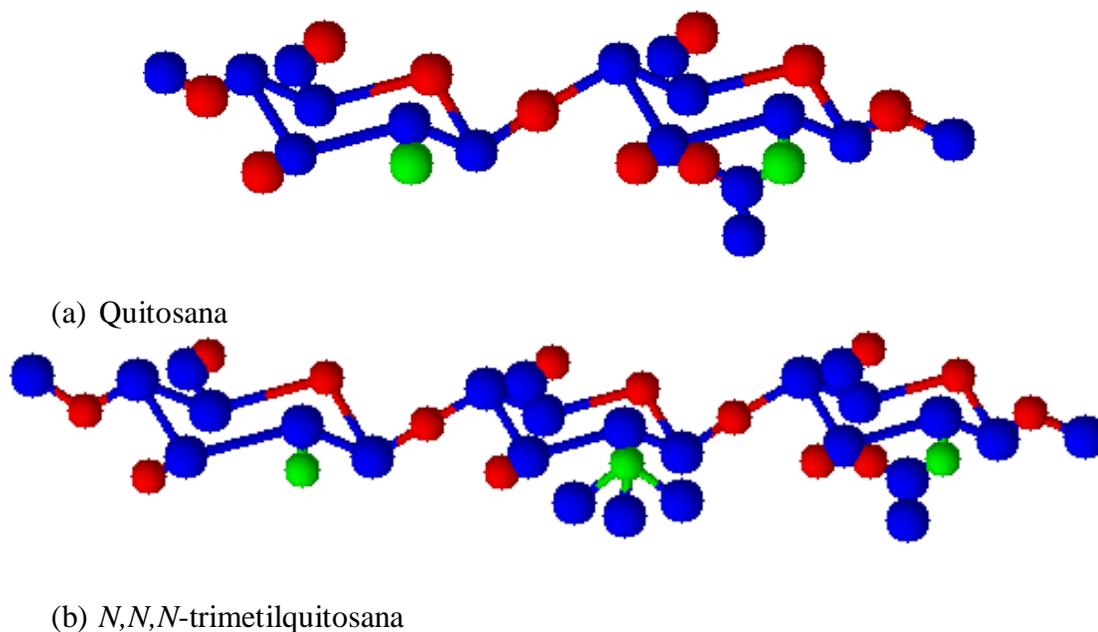


Figura 3.5. Estruturas tridimensionais para a quitosana e para a TMC.

A química das carbodiimidas representa uma rota simples e relativamente eficiente para conjugação direta de ácidos carboxílicos em aminas primárias e formação de ligações amida (LAYEK & SINGH, 2012; CHOUDHARI *et al.*, 2012). Essa rota tem sido estudada na literatura para modificação química da quitosana com grupos acílicos. O reagente EDC, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), reage com os grupos ácidos carboxílicos presentes nos ácidos graxos, formando um intermediário altamente reativo, *O*-aciluréia, que sofre um ataque nucleofílico pelas aminas primárias da quitosana formando a ligação amida. Porém, o EDC é instável em soluções aquosas porque pode ser hidrolisado (SANTOS, 2011). Para que a reação ocorra é necessário um pH tamponado próximo de 7,0 para que as aminas presentes na quitosana não estejam protonadas.

Outra rota para síntese de derivados acilados de quitosana utilizando cloretos de acila é relatada na literatura devido à alta reatividade desses reagentes (TIEN *et al.*, 2003). Os cloretos de acila são compostos derivados dos ácidos carboxílicos e extremamente reativos, Figura 3.6. A presença do átomo de cloro ligado ao carbono carbonílico produz um

eletrófilo forte gerando grande carga parcial positiva no átomo de carbono, além disso, o íon cloreto por ser base fraca é um bom grupo abandonador. Isto significa que um nucleófilo fraco pode atacar o carbono. A reação ocorre via adição-eliminação no carbono acílico pelo ataque do nucleófilo (grupos aminas presentes na quitosana) e com a formação da ligação amida e liberação do ácido clorídrico (SOLOMONS & FRYHLE, 2011). As condições adequadas para esta reação são a presença de pH ligeiramente básico e excesso de cloreto de acila para minimizar a hidrólise do mesmo.

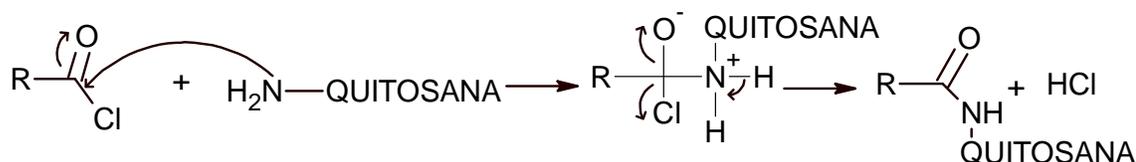


Figura 3.6. Representação do mecanismo da reação de acilação da quitosana com cloretos de acila.

3.3. Caracterização da Quitosana e seus Derivados

A caracterização dos materiais é um fator importante em um projeto devido à necessidade de seleção adequada do material baseado no desempenho do sistema em estudo. Além disso, ela permite a identificação das estruturas encontradas nos materiais e relacioná-la com fatores que possam ser importantes na seleção de um material visando o seu melhor desempenho em uma aplicação específica. Dependendo das solicitações a que este material ou sistema será submetido, a caracterização poderá abranger a avaliação de propriedades mecânicas, elétricas, bioatividade, imunogenicidade, eletrônicas, magnéticas, ópticas, químicas, térmicas e até mesmo a combinação de duas ou mais destas propriedades (ORÉFICE *et al.*, 2006; COSTA, 2010). Inúmeras são as técnicas utilizadas na caracterização da quitosana e seus derivados, dentre as quais podem ser citadas as análises químicas utilizando espectroscopia de absorção na região do infravermelho, espectroscopia UV-Vis, espectroscopia Raman e ressonância magnética nuclear (RMN). Além disso, análises morfológicas através de técnicas microscópicas como Microscopia Eletrônica de

Varredura (SEM), Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM).

Quando se pensa na utilização da quitosana como um biomaterial, além da caracterização físico-química e morfológica, a caracterização biológica torna-se essencial. Deve-se conhecer o comportamento do polímero quanto a sua atividade biológica *in vitro*, através de ensaios de citotoxicidade e a sua liberação no meio biológico.

Nesta revisão serão abordadas, resumidamente, as principais técnicas de caracterização físico-química e biológica da quitosana e seus derivados.

3.3.1. Caracterização físico-química

3.3.1.1. Espectroscopia FTIR

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) representa uma técnica importante na determinação dos grupos funcionais de um dado material. A região espectral do infravermelho compreende a radiação com número de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} ou com comprimento de onda de 0,78 a 1000 μm . A espectroscopia de infravermelho é aplicada para análises químicas qualitativas e quantitativas (ORÉFICE *et al.*, 2006).

A radiação infravermelha (IV) por ter baixa energia é absorvida somente por moléculas em que as vibrações e as rotações possam mudar o momento dipolo da molécula. Cada grupo funcional absorve em uma frequência característica de radiação na região do IV. Assim, um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectrograma de FTIR, permite caracterizar os grupos funcionais de um material conhecido ou desconhecido (SKOOG *et al.*, 2002).

A espectroscopia FTIR é muito valiosa na caracterização química da quitosana e seus derivados, na Tabela 3.1 estão relacionadas as bandas e a posição dos picos dos grupos químicos associados a estrutura química da quitosana. O espectro de IV deste polímero

apresenta um amplo pico de absorção em 3435 cm^{-1} , que está associado ao grupo N-H, a ligação de hidrogênio e ao estiramento O-H. A banda referente ao estiramento do C-H o pico de 2922 cm^{-1} (com menor intensidade) corresponde à vibração assimétrica e o pico de 2879 cm^{-1} (com maior intensidade) à vibração simétrica. Além disso, na banda característica da deformação angular do CH_2 (tesoura) aparece em 1423 cm^{-1} (COSTA JR., 2008).

O grau de desacetilação (GD) da quitosana também pode ser avaliado a partir do espectro de infravermelho onde se utiliza as seguintes bandas de referência: 3450 cm^{-1} , 2878 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} e as bandas características como as de: 1655 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , além de sugerir, que para qualquer GD de quitina ou quitosana, as bandas de 1420 cm^{-1} e 1320 cm^{-1} , como de referência e característica são mais estáveis independentemente da técnica, estado ou estrutura secundária (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001).

A espectroscopia FTIR também é uma técnica de caracterização importante para evidenciar a formação da *N,N,N*-trimetilquitosana especialmente na região de $1700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. As evidências são, além das bandas observadas para a quitosana, uma nova banda referente a deformação angular do grupo amônio quaternário em $1630\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ e uma banda característica em 1490 cm^{-1} a qual é atribuída a deformação angular assimétrica dos grupos metílicos introduzidos na cadeia polimérica pela reação de quaternização. Pode-se observar também que a banda relacionada ao grupo amina diminui sua intensidade devido a metilação dos grupos amino (MANSUR *et al.*, 2012). Para evidenciar que a reação de metilação ocorreu preferencialmente nos grupos amina, os picos referentes às hidroxilas primárias e secundárias entre $1160\text{ e }1030\text{ cm}^{-1}$ podem ser monitorados e a ausência de modificação nestes picos indica que não houve reação de *O*-alquilação (CURTI *et al.*, 2003, MOURYA & INAMDAR, 2008).

Tabela 3.1. Números de onda e grupos químicos característicos da quitosana (ν = estiramento; δ = dobramento (deformação)), BRUGNEROTTO, 2001; COSTA JR, 2008; LI *et al.*, 2004; WANG, 2004

Bandas (cm^{-1})	Grupo químico	Bandas (cm^{-1})	Grupo químico
3570 – 3200 3450	ν OH ligado ν N-H ₂	1340 – 1250 1380	δ C-N (terciária)
2955 – 2845 2922	ν C-H (assimétrico)	1321	ν C-N (primária)
2878	ν C-H (simétrico)	1260	ν C-N (secundária)
1900 – 1500 1658	Amida I: ν C=O	1154 e 896	ν COC (estrutura sacarídea - β -1-4)
1650 – 1550 1658 – 1630	δ N-H (I)	1160 1154	ν - ponte de oxigênio
1640 – 1690	ν C=N (fraco) (Base de Schiff)	1300 – 1000 1070	ν C-O (cíclico)
1570-1515 1560	δ N-H (II)	1030	ν C-O (cíclico)
1465 1423	δ OH e CH ₂ (tesoura)	897	ν C-O

As modificações químicas na estrutura da quitosana, produzindo derivados de quitosana *N*-acilados, também podem ser visualizadas e caracterizadas por FTIR. O acoplamento do ácido graxo nos grupos amina da quitosana, com a formação da ligação amida pode ser confirmado pela visualização da diminuição da intensidade do pico em 1570 cm^{-1} referente a deformação da ligação N-H das aminas primárias enquanto que o pico em 1555 cm^{-1} referente ao deformação das ligações N-H do grupo amida II é observado. Os picos de absorção dos grupos CH₂ em $2850\text{-}2950 \text{ cm}^{-1}$ também podem ser observados após a reação de acilação e as suas intensidades são proporcionais ao tamanho da cadeia acílica inserida na quitosana, Figura 3.7 (TIEN *et al.*, 2013; LAYEK & SINGH, 2012).

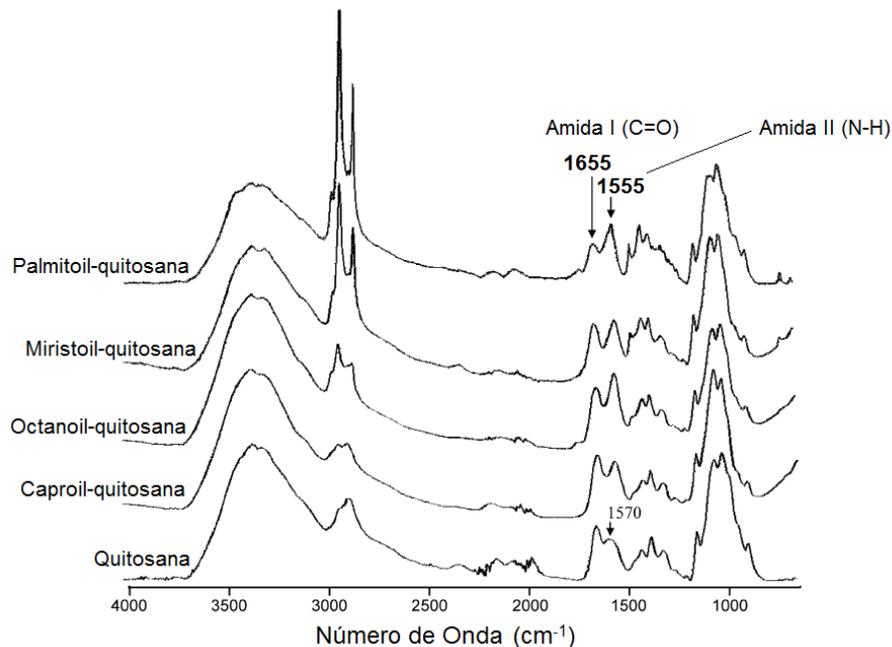


Figura 3.7. Espectros FTIR para amostras de quitosana aciladas. Adaptado de TIEN *et al.*, 2003.

3.3.1.2. Espectroscopia Raman

Quando uma molécula é irradiada, a energia pode ser transmitida, absorvida, ou espalhada. A espectroscopia Raman é baseada na detecção da luz espalhada. O espectro Raman é o comprimento de onda da radiação espalhada em relação ao da radiação de excitação (*laser*). As leituras são feitas na região do visível e do infravermelho próximo. A espectroscopia Raman é uma técnica complementar a espectroscopia de infravermelho (MELLO, 2009). Assim como o infravermelho, o espectro Raman pode ser usado para identificação de grupos funcionais (“impressão digital”). A espectroscopia Raman oferece algumas vantagens em relação à espectroscopia FTIR, dentre elas podem se destacar as informações sobre vibrações homonucleares simétricas como os estiramentos $-C=C-$ e $-S=S-$ que são fracas ou inativas no infravermelho, o anéis aromáticos possuem bandas fortes ($\sim 1000\text{cm}^{-1}$), as amostras precisam de pouca ou nenhuma preparação, o vidro é um bom material para ser usado como janelas para medidas por Raman, não requer acessórios especiais, não há interferência de umidade, dentre outras (TUMA, 2005; MELLO, 2009).

O espectro Raman para amostras de quitosana é composto por bandas envolvendo principalmente estiramentos C-O e C-C. Os picos presentes entre 850-900 cm^{-1} são atribuídos a configuração estrutural alfa e beta da quitina/quitosana, bem como às ligações glicosídicas típicas destes polissacarídeos. Esta região não sofre alterações quando a quitosana sofre modificação química com carboxilas, carboximetilação. Em 1253 cm^{-1} está centrada a banda referente ao estiramento C-OH. O estiramento ν (C=O) centrado em 1650 cm^{-1} típico de amostras de quitina apresenta-se ausente ou diminuído nas amostras desacetiladas de quitosana. Em 1258 cm^{-1} pode-se visualizar a presença de grupos carboxílicos na quitosana (MELLO, 2009).

Para a caracterização de enzimas, proteínas e outras biomoléculas a espectroscopia Raman é considerada uma ferramenta valiosa e versátil. Utilizando esta técnica, podem ser estudadas as estruturas tridimensionais e secundárias das proteínas.

Pelo fato das proteínas serem polipeptídios de grandes dimensões, frequentemente constituídas por centenas de aminoácidos, os seus espectros vibracionais contém um conjunto complexo de bandas superpostas. No entanto, Raman espalhamento de aminoácidos aromáticos da cadeia polipeptídica origina um conjunto de picos dominantes no espectro. Por exemplo, o pico forte centrado em 1656 cm^{-1} refere-se à banda chamada de amida I correspondente à soma dos modos de acoplamento da cadeia polipeptídica. A maior contribuição para a banda amida I vem do estiramento C=O dos grupos carbonílicos do peptídeo (TUMA, 2005).

3.3.1.3. Espectroscopia RMN

As bases experimentais da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram estabelecidas por F. Bloch e E. M. Purcell, em meados da década de 40 e, devido aos seus estudos, eles receberam o Prêmio Nobel de Física em 1952 (BONAGAMBA *et al.*, 2005). Desde então profissionais de diversas áreas da ciência utilizam esta técnica nos estudos das propriedades magnéticas de materiais. A razão pela qual esta técnica desperta tanto interesse se deve ao fato de ela proporcionar uma investigação muito mais profunda das características magnéticas estudadas em um determinado material, quando comparada a outras técnicas.

Ela pode ser usada para: caracterizar e identificar substâncias, estudar o magnetismo, controle de qualidade de produtos, tomografia, etc. (BONAGAMBA *et al.*, 2005; JÚNIOR, 2008).

A técnica de RMN mede a energia de interação entre o momento magnético nuclear com um campo magnético. Os momentos magnéticos fazem um movimento natural de precessão na presença de campos magnéticos. As frequências de precessão (e os tempos de relaxação) dependem do ambiente em torno dos núcleos, ou seja, de como os momentos magnéticos nucleares interagem com os outros campos magnéticos gerados por outras partículas presentes na amostra estudada. Essa interação do momento magnético nuclear com os campos gerados ao seu redor permite a técnica de RMN desvendar características da vizinhança dos núcleos e, portanto, fazer uma análise mais apurada da estrutura e da dinâmica molecular da amostra em questão (JÚNIOR, 2008).

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Próton, ^1H RMN, é uma técnica que se baseia nas principais características provocadas pelos núcleos de hidrogênio. É considerada quantitativa nas análises de amostras de quitosana em relação aos valores de grau de acetilação. Como a dissolução da quitosana em meio ácido resulta em uma solução viscosa, faz-se necessário que a medida seja realizada a altas temperaturas (70-80 °C) (SANTOS *et al.*, 2003).

A determinação de grau médio de acetilação (GA) por ^1H RMN de amostras de quitosana pode ser realizada utilizando a área do pico na região de 2 ppm atribuído aos núcleos de hidrogênio da metila do grupo acetamido (A_{CH_3}) e a área do pico em 3,2 ppm atribuído ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel de glicosamino (A_{H_2}), segundo a Equação 3.1 (SIGNINI & CAMPANA FILHO, 2003; SANTOS *et al.*, 2003; ALVARENGA *et al.*, 2010).

$$\% \text{GA} = \frac{A_{\text{CH}_3}}{3A_{\text{H}_2}} \times 100$$

Equação 3.1

O grau de quaternarização médio da *N,N,N*-trimetilquitosana é uma propriedade muito importante a ser avaliada. A espectroscopia de ^1H RMN é considerada a melhor técnica de avaliar o grau de quaternarização da TMC (CURTI *et al.*, 2003; ALVARENGA *et al.*, 2010). Usando a razão entre a integral do pico $(\text{CH}_3)_3$, amino quaternário, em 3,1-3,4 ppm e a integral do pico do hidrogênio entre 4,7 e 5,7 ppm pode-se calcular o grau de quaternização (DQ) da TMC, Equação 3.2 (MOURYA & INAMDAR, 2009).

$$\% DQ = \frac{(\text{CH}_3)_3}{H} \times \frac{1}{9} \times 100 \quad \text{Equação 3.2}$$

A técnica ^1H RMN também é muito relevante na caracterização da modificação química da quitosana com grupos acílicos, pois além dos sinais observados para a amostra do polímero não modificado aparecem novos picos em 0,8 e 1,25 ppm referentes aos sinais dos prótons dos grupos CH_3 e CH_2 da cadeia graxa, respectivamente (LAYEK & SINGH, 2012).

No espectro ^1H RMN característico para a quitosana o pico em 1,9 ppm revela a presença dos três prótons *N*-acetil dos grupos *N*-acetil glicosamina e o pico na região de 3,0 ppm mostra o próton H_2 do resíduo glicosamina. Os prótons dos anéis da quitosana são observados na região de 3,4-3,8 ppm, Figura 3.8 (LAYEK & SINGH, 2012).

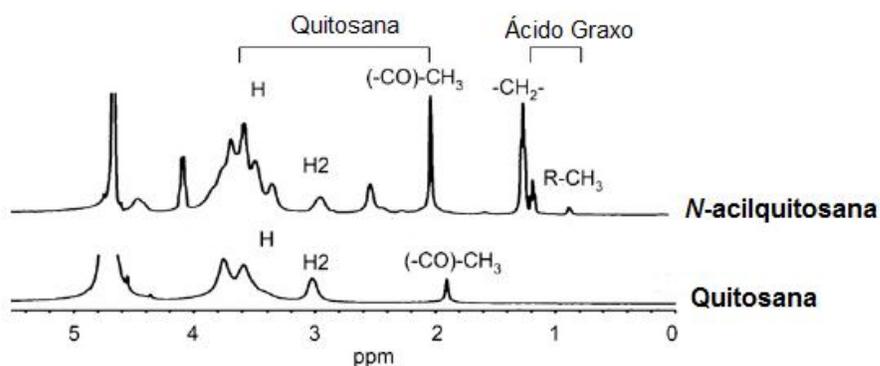


Figura 3.8. Espectro ^1H RMN típico para uma amostra de quitosana e de quitosana modificada com cadeias carbônicas saturadas (*N*-acilquitosana) (adaptada de LAYEK & SINGH, 2012).

A caracterização *N,N,N*-trimetilquitosana após a reação de *N*-alquilação é realizada ^1H RMN. Os sinais assinalados incluem o pico em 3,5 ppm referente aos hidrogênios dos grupos amino quaternários e o pico em 2,8 ppm referente aos grupos amino dimetilados bem com o sinal entre 3,36 e 3,56 ppm referente ao grupo *O*-metilado. O átomo de hidrogênio ligado ao carbono 1 do anel de glicopiranosose é responsável pelos sinais observados em 4,5 a 5,5 ppm (CURTI *et al.*, 2003; JINTAPATTANAKIT *et al.*, 2008; MOURYA & INAMDAR, 2009).

3.3.1.4. Análise Térmica

Os métodos térmicos de análise são aqueles nos quais as variações nas propriedades físicas ou químicas de uma substância são medidas em função da temperatura. Dentre estes métodos, podem citar alguns mais relevantes para a caracterização de amostras poliméricas. A análise termogravimétrica (TG) na qual é efetuada uma medida da mudança de peso de uma substância em função da temperatura ou do tempo e a calorimetria diferencial de varredura (DSC) em que se mede a diferença de energia cedida a uma substância e a um material de referencia em função da temperatura são algumas das técnicas mais relevantes (VOGEL, 2010).

Em geral, as curvas TG obtidas para amostras de quitosana apresentam dois eventos térmicos, o processo de desidratação e a degradação do polímero com geração de material carbonizado (SANTOS, 2003; ZAWADZKI & KACZMAREK, 2010).

Para amostras de quitosana as curvas DSC obtidas sob atmosfera de N_2 na faixa de temperatura entre 20 e 500 °C apresentam dois picos. O primeiro estágio, endotérmico, inicia-se em 60 °C e corresponde ao processo de desidratação, cuja área depende do histórico de secagem da amostra e o segundo estágio inicia-se em 240 °C, endotérmico, corresponde ao processo de degradação do polímero pela decomposição térmica e oxidativa da quitosana com a vaporização e eliminação de produtos voláteis (NETO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2003).

A análise térmica é empregada na caracterização de amostras de quitosana aciladas é relatado na literatura que a estabilidade térmica do polímero tende a diminuir após a introdução dos grupos acil. A introdução de substituintes ou unidades laterais flexíveis em estruturas de polissacáridos deve perturbar a estrutura cristalina da quitosana, especialmente através da perda de ligações de hidrogênio intramoleculares (ZONG *et al.*, 2000).

3.3.2. Caracterização biológica

A quitosana é um polissacarídeo natural que tem atraído interesse científico significativo durante as duas últimas décadas. É um material potencialmente biologicamente compatível e quimicamente versátil (grupos NH_2 e várias possibilidades de massas molares). Estas duas propriedades básicas têm sido utilizadas por cientistas para criarem diversas formulações e materiais a base de quitosana para serem utilizados em várias aplicações biomédicas e farmacêuticas incluindo como veículos para entrega de drogas e genes e em engenharia de tecidos (KEAN & THANOU, 2010). Quando se fala em "quitosana" deve-se ter em mente que existe um grande grupo de entidades químicas estruturalmente diferentes que podem apresentar diferentes resultados de biodistribuição, biodegradação e perfis toxicológicos.

Nesta revisão serão abordadas algumas informações sobre as propriedades biológicas que afetam a utilização segura da quitosana como veículo na entrega de drogas e genes.

3.3.2.1. Biodegradação

Um aspecto importante na utilização de polímeros em biomateriais e mais especificamente como veículo na entrega de drogas é o seu destino metabólico no organismo ou biodegradação. No caso da absorção sistêmica de polímeros hidrofílicos tais como quitosana, eles devem ter uma massa molar adequada para ocorrer a depuração renal. Se o tamanho polimérico administrado for maior do que este, em seguida, o polímero deve ser submetido a degradação. A biodegradação (química ou enzimática) proporciona a formação de fragmentos adequados para a depuração renal. A degradação química refere-se a

degradação catalisada pelo ácido estomacal (KEAN & THANOU, 2010). A quitosana pode ser também degradada por enzimas que hidrolisam ligações *N*-acetilglicosamina, em organismos vertebrados a degradação ocorre pela lisoenzima e por enzimas bacterianas presentes no cólon. Em geral, tanto a taxa e a extensão da biodegradabilidade da quitosana nos organismos vivos são dependentes do grau de desacetilação (GD). O aumento no grau de desacetilação promove uma diminuição na taxa de degradação (KEAN & THANOU, 2010).

Ensaio de caracterização química que determinam a degradação da quitosana comumente utilizam a cromatografia de permeação em gel (GPC) para avaliar a diminuição da massa molar com a degradação. A lisoenzima foi estudada e observada sua eficiência na degradação da quitosana, amostra do polímero com GD=50 % apresentou diminuição de 66 % em sua viscosidade após 4 h de incubação *in vitro*, a pH 5,5 (0,1 M de tampão fosfato, NaCl 0,2 M, 37 °C). Os polímeros de peso molecular mais baixo e menor grau de desacetilação são mais suscetíveis a degradação. Amostras de TMC foram degradadas pela lisoenzima a taxas semelhantes às quitosanas nativas, mas a degradação era insensível ao pH do meio (KEAN & THANOU, 2010).

As modificações feitas na estrutura da quitosana podem torná-la mais ou menos tóxica e quaisquer reagentes residuais devem ser cuidadosamente removidos. É importante considerar que a formulação da quitosana em drogas podem alterar os perfis farmacocinéticos e de biodistribuição. Como por exemplo, no caso de nanopartículas quitosana/plasmídeo DNA, a cinética e a distribuição *in vivo* são controladas principalmente pelas propriedades das partículas (tamanho e carga), LIU *et al.*, 2010.

Além disso, a cinética da liberação celular pode ser alterada devido à interação de cargas (por exemplo, no caso de complexos com DNA ou oligonucleotídeos). Este equilíbrio ou redução das cargas positivas na molécula de quitosana tem efeitos sobre a sua interação com as células e o microambiente, muitas vezes levando à diminuição da absorção e uma diminuição na toxicidade. No caso de uma droga conjugada covalentemente, as propriedades físico-químicas (hidrofilicidade) e a conformação do polímero são alteradas

(formação de micelas), com os consequentes efeitos na distribuição e absorção celular. Além disso, a via de administração determina a absorção, a concentração, o tempo de contato e os tipos de células afetados e devem ser mantidos em mente (LIU *et al.*, 2010).

3.3.2.2. Toxicidade

Um critério importante para vetores utilizados na entrega de genes é a baixa citotoxicidade. Os polímeros catiônicos são relatados na literatura por possuir alguma citotoxicidade inerente devido às interações com as membranas celulares e componentes intracelulares negativamente carregados. Numerosos estudos têm enfatizado a natureza relativamente não tóxica dos derivados à base de quitosana e outros polímeros catiônicos, tais como poli(lisina) e poli(etileno imina). No entanto, a toxicidade depende do tipo de derivado de quitosana, o seu grau de pureza, bem como do tipo de células estudadas (LAYEK & SINGH, 2013).

Para utilização da quitosana em formulações como biomaterial é considerada vantajosa a baixa toxicidade deste polímero, a pequena capacidade alergênica que induz a moderados estímulos imunológicos e também a possibilidade da quitosana ser metabolizada por lisossomos (MAO *et al.*, 2010; SINGLA & CHAWLA, 2010). Estudos *in vivo*, mostraram que a quitosana é não tóxica e biodegradável. Mostrando que a dose letal 50% da quitosana, em ratos é superior a 16 g/kg (ARAI *et al.*, 1968).

LAYEK & SINGH (2013) estudaram o efeito da modificação hidrofóbica da quitosana (massa molar ~50 kDa, GD = 91 %) com grupos caproil na citotoxicidade, interação com DNA plasmídeo (pDNA) e transfecção celular. Foi mostrado que quitosana modificadas com diferentes graus de substituição de grupos caproil (5,5 %, 15,5 % e 24,6 %) não alteraram a atividade metabólica celular, em ensaio de viabilidade celular por MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), em concentrações acima de 2 mg/mL, concentração 50 vezes maior do que a concentração máxima de polímero utilizado na transfecção em estudos *in vitro*. Além disso, o grau de substituição dos grupos caproil não alterou a viabilidade de ambas as células HEK 293 e HeLa. Os poliplexos

polímero/pDNA em diferentes razões N/P não alteraram a viabilidade celular, em comparação com o controle (considerado como 100% viabilidade). Portanto, os resultados do ensaio de MTT confirmou a natureza não tóxica das quitosanas modificadas com grupos caproil bem como dos complexos com pDNA.

3.4. Quitosana e derivados como estabilizantes de pontos quânticos

Nos últimos anos, a inovação em nanotecnologia e nanomedicina têm sido uma importante força motriz para a criação de novos nanocompósitos e nanobioconjugados. Essencialmente, estes materiais podem reunir as funcionalidades intrínsecas das nanopartículas inorgânicas e, bem como, as funcionalidades químicas e biológicas das biomoléculas e polímeros de origem natural, tais como, carboidratos e derivados, glicoconjugados, proteínas, DNA, enzimas e oligopeptídeos (MANSUR *et al.*, 2013).

Tendo em vista o grande número de alternativas disponíveis para produzir híbridos e conjugados para bioaplicações, a quitosana e seus derivados têm sido frequentemente selecionados, devido à sua biocompatibilidade, propriedades físico-químicas e mecânicas, solubilidade e estabilidade química relativa em ambiente fisiológico (MANSUR *et al.*, 2013).

Da mesma forma, existem várias alternativas de materiais inorgânicos nanoestruturados unidimensionais e zero dimensionais, como nanotubos de carbono, nanofios, nanobastões e pontos quânticos, que são adequados para a conjugação com carboidratos para produzir nanomateriais híbridos para bioaplicações. Os pontos quânticos (QDs) são nanocristais semicondutores ultra-pequenos compostos por um número de átomos no intervalo de alguns milhares. Devido à sua dimensão reduzida, a exposição dos QDs a níveis de energia eletrônicos discretos dão origem a propriedades eletrônicas, óticas e magnéticas únicas (LI *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2007; MANSUR *et al.*, 2013).

Os QDs emergiram rapidamente como uma nova classe de nanomateriais fluorescentes para um número ilimitado de aplicações, principalmente como sondas em biologia, medicina e farmácia. Tendo muitas vantagens sobre os corantes orgânicos, tais como amplo espectro

de excitação e resistência à fotodegradação, os QDs apresentam propriedades interessantes para uso em nanotecnologia, nanomedicina e áreas de nanobiotecnologia. No entanto, para serem usados em condições biológicas, os QDs devem apresentar compatibilidade no meio fisiológico onde grande número de macromoléculas naturais existe. Portanto, um tratamento na superfície química dos QDs é necessário para torná-los biocompatíveis e solúveis em água (MANSUR *et al.*, 2013).

A quitosana e seus derivados têm sido relatados na literatura como possibilidades para biofuncionalização da superfície dos QDs utilizando a rota química coloidal aquosa (MANSUR *et al.*, 2012a; MANSUR *et al.*, 2012b; MANSUR *et al.*, 2013).

Apesar dos avanços na síntese de nanohíbridos baseados na conjugação de QDs com biomoléculas, na maioria dos estudos publicados os QDs são sintetizados através do método tradicional utilizando compostos organometálicos e rotas de síntese que contêm elementos tóxicos, tais como cádmio, chumbo e mercúrio, que utilizem solventes orgânicos e ligantes (trioctil fosfina/óxido de trioctil fosfina) em altas temperaturas. Atualmente, a rota de síntese de QDs mais comumente utilizada contêm cádmio bivalente, amplamente conhecido como tóxico, devido à acumulação de íons Cd^{2+} em tecidos e órgãos (SCHATKOSKI, 2011; MANSUR *et al.*, 2013).

Embora o Cd^{2+} esteja incorporado em um núcleo nanocristalino (como sulfuretos ou selenetos de baixa solubilidade) cobertos por uma “casca” de material semicondutor como ZnS e cercado por ligantes biologicamente compatíveis, tais como polímeros, aminoácidos, proteínas e carboidratos, ainda não está claro se esses íons tóxicos terão impacto sobre o uso clínico de QDs como sondas luminescentes para aplicações biomédicas. Conseqüentemente, uma grande preocupação sobre a toxicidade de QDs preparados com núcleos de metais pesados tem sido levantada em células vivas, animais e seres humanos, e no meio ambiente, pois o impacto a longo prazo ainda não é totalmente compreendido (MANSUR *et al.*, 2013).

3.4.1. Pontos Quânticos

Pontos quânticos (QDs) são nanocristais de materiais semicondutores inorgânicos que possuem uma faixa de diâmetro entre 2 e 10 nm e contêm centenas de milhares de átomos (MANSUR, 2010; WELLER *et al.*, 1986). Os QDs são geralmente compostos pela combinação de átomos dos elementos de diferentes grupos da tabela periódica: II-VI (por exemplo, CdS e CdTe) e III-V (InAs e InP) (SCHATKOSKI, 2011). Uma grande diferença entre os QDs e os semicondutores na forma de sólido estendido ou *bulk* do material, está no aumento da relação área superficial por unidade de volume.

Por serem materiais com dimensões tão pequenas, os elétrons e buracos, sofrem confinamento quântico, modificando as propriedades físicas, químicas, eletrônicas e ópticas desses materiais. Uma nanopartícula de semicondutor encontra-se em regime de confinamento quântico, quando suas dimensões são reduzidas a ponto da diferença entre os valores de energia entre a banda de valência (BV) e a banda de condução (BC), ser próxima ou menor do que as dimensões do raio de Bohr do seu *éxciton* (MANSUR, 2010).

Uma das propriedades óticas mais interessantes destes nanocristais, do ponto de vista da aplicação tecnológica, é a forte intensidade de luminescência que apresentam, permitindo que sejam utilizados em dispositivos optoeletrônicos, fotovoltaicos e biomédicos, dentre outros. Além disso, apresentam uma larga faixa de comprimentos de onda para excitação, picos de fluorescência simétricos e um comprimento de fluorescência ajustável ao tamanho das partículas (BRUCHEZ *et al.* 1998; CHAVES, 2006).

A redução de tamanho dos materiais aumenta a razão entre o número de átomos presentes na superfície e os átomos presentes no interior. Consequentemente, quanto menor o diâmetro da partícula do material, maior é a fração de seus átomos pertencentes a sua superfície em relação aos átomos constituintes de seu interior (SMITH *et al.*, 2006). Este aumento da razão área superficial/volume implica no aumento de defeitos de superfícies por elevar a interrupção da rede cristalina e do aumento de energia livre na superfície (ligações terminais incompletas, vacância). Este fator provoca a redução de rendimento

quântico e da fotoluminescência à medida que o diâmetro do QD diminui. Com o crescimento de uma camada na superfície dos QDs pode-se modificar a estrutura da nanopartículas reduzindo os defeitos superficiais (SMITH *et al.*, 2006). Desta forma, os QDs com estrutura núcleo/casca, podem ser formados por uma combinação de dois ou mais semicondutores distintos, onde o material do núcleo é recoberto por camada externa de outro semicondutor.

Os sistemas de nanopartículas semicondutoras com estrutura do tipo núcleo/casca (NC, do termo em inglês, *Core/Shell*, CS), Figura 3.9, apresentam núcleo com cerca de 100 a 100000 átomos, cercados por uma casca externa que contém um número inferior de átomos (MANSUR, 2010).

O tamanho nanométrico do NC resulta em um confinamento quântico observável, definido por uma energia de *band gap* (E_g) crescente acompanhado pela quantização da energia (REISS *et al.*, 2009). Esse efeito é acompanhado pela interação de Coulomb entre os portadores de carga. Para a maioria dos semicondutores, essa observação regularmente acontece quando o tamanho de partícula é reduzido a alguns nanômetros.

No processo de formação da estrutura NC ocorre a passivação da camada superior com o crescimento da casca formada por um segundo semicondutor. Desta maneira, a eficiência de fluorescência e estabilidade dos vários tipos de semicondutores QDs é significativamente melhorada. Além disso, pela escolha apropriada dos semicondutores do núcleo e materiais de casca, é possível a harmonia do comprimento de onda de emissão em uma janela espectral maior que com ambos os materiais isolados (REISS *et al.*, 2009).

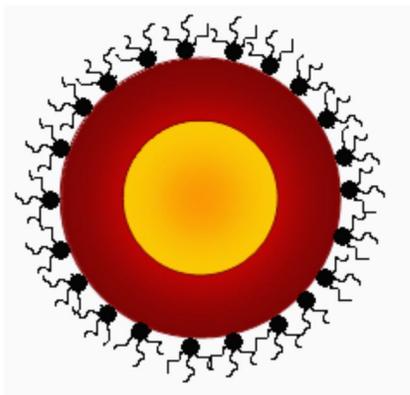


Figura 3.9. Desenho mostrando um ponto quântico com estrutura núcleo/casca (SCHATKOSKI, 2011).

Os QDs não apresentam um espectro de absorção discreto, semelhante aos átomos. Nos espectros de QDs verifica-se a ocorrência de banda relativamente larga, ocasionado pelo alargamento térmico e principalmente dispersão de tamanho das nanopartículas nos processos de síntese, principalmente em rotas coloidais aquosas. Como isolar um único tamanho de partícula é um processo praticamente impossível, ocorrem emissões simultâneas dos QDs. Em temperatura ambiente, a banda de emissão em espectro de um QD pode apresentar a mudança denominada de FWHM, (*full width at half maximum*) de alguns nanômetros. Mesmo assim a distribuição de tamanho ocorre com valores inferiores a 5 %, que refletem em bandas de emissão simétricas, aproximadamente Gaussianas, cuja FWHM é de aproximadamente 25 a 30 nm (REISS *et al.*, 2009).

A relação da distribuição de tamanho de nanopartículas pode ser avaliada através da medida do índice HWHM (*half width at half maximum*). O índice HWHM representa uma relação da distribuição de tamanhos de nanopartículas presente nas amostras (REISS *et al.*, 2009).

Os pontos quânticos têm sido obtidos, a partir da rota química coloidal, por meio de uma variedade de técnicas experimentais. Diversas rotas sintéticas têm sido propostas com o objetivo de aperfeiçoar e simplificar os métodos de síntese já existentes e, assim, tornar

possível a obtenção de nanocristais com uma distribuição estreita de tamanhos, alta cristalinidade e sem defeitos de superfície, REISS *et al.* (2009).

O método “ideal” de síntese de QDs de semicondutores deverá permitir a preparação de nanopartículas que apresentam uma uniformidade de composição, forma, dimensão, estrutura superficial estável. Consequentemente, a utilização de QDs requer a preparação de nanocristais monodispersos e amostras bem caracterizadas, permitindo obter propriedades físicas do tamanho dos QDs (REISS *et al.*, 2009; SCHATKOSKI, 2011).

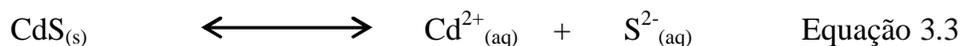
A obtenção de uma amostra em que os nanocristais se apresentem com dispersão de dimensão reduzida só é possível se o procedimento de síntese assegurar uma elevada velocidade de nucleação e uma baixa velocidade de crescimento das partículas (REISS *et al.*, 2009; SCHATKOSKI, 2011). São vários os procedimentos de preparação atualmente conhecidos, sendo neste trabalho, dado o destaque para a rota coloidal aquosa, por permitir à obtenção de amostras com as qualidades acima referidas e compatíveis com sistemas biológicos.

Um dos primeiros métodos de preparação de nanopartículas (aproximadamente 5 nm) de elementos dos grupos II-VI da tabela periódica foram preparados por rotas coloidais. Um exemplo típico é a síntese de QDs de CdS, por precipitação em fase homogênea a partir de soluções aquosas de CdSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (ROSSETTI, 1984). Dado que a solubilidade do CdS em água é extremamente reduzida é possível obter tais partículas partindo de soluções muito diluídas dos referidos íons. As dimensões e propriedades das partículas produzidas são determinadas pela extensão de dois processos elementares: formação dos núcleos de cristalização (cristalitos) e a sua agregação.

Neste contexto, o método de síntese deve tornar possível controlar o processo de crescimento do cristal, e assegurar que este processo seja interrompido imediatamente após os pequenos germens cristalinos estejam completamente nucleados de forma homogênea. Impede-se assim a agregação destes cristalitos, limitando-se com o conseqüente aumento

do tamanho das partículas, e reduzindo-se a dispersão dos tamanhos das partículas formadas.

A estabilidade dos cristalitos é determinada pelo equilíbrio dinâmico do processo descrito pela seguinte reação química (Equação 3.3).



Na primeira fase de formação dos núcleos de cristalização, o método de síntese deve assegurar que os cristais de menores dimensões não sofram um processo de dissolução espontânea, tal fenómeno é conhecido como "*Ostwald ripening*". Como os cristais de menores dimensões apresentam uma razão área/volume superior à dos cristais de maiores dimensões, e por isso uma maior energia livre superficial, que torna-os menos estáveis e por isso servem de "nutriente" para o processo de crescimento dos cristais maiores. A solubilidade dos cristais de menores dimensões pode ser reduzida e o conseqüente tempo de vida aumentado pela escolha do solvente, da temperatura e do pH do meio reacional. Assim, em um solvente que apresente uma constante dielétrica inferior a da água, o equilíbrio descrito pela Equação 3.3 desloca-se no sentido da formação de CdS devido à redução da estabilidade dos íons, evitando-se deste modo a dissolução dos cristais. A valores mais elevados de pH a solubilidade dos íons sulfetos diminui e, deste modo, favorece o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do respectivo sulfeto metálico (ROSSETTI, 1984).

É também exigido que a síntese QDs via rota coloidal não evolua no sentido da agregação das partículas ou mesmo na sua posterior precipitação. O modo mais simples de se estabilizar as partículas da solução coloidal é por via de fenômenos de repulsão eletrostática (ROSSETTI, 1984). Este fenómeno ocorre com maior intensidade em solventes polares em que as espécies de determinado íons apresentam em excesso na solução, originando, na sua vizinhança, uma nuvem de íons de carga oposta, que são assim atraídos para a superfície dos cristalitos carregados. Este modo de estabilização não permite a obtenção de soluções

coloidais com elevada concentração e o processo de agregação das partículas decorre num curto intervalo de tempo.

Usando agentes estabilizantes em elevados valores de pH, contendo grupos tiol, como o ácido 3-mercaptopropiônico em excesso de íons de Cd^{2+} , para sistema de CdTe (ROGACH, 1997) e poliméricos orgânicos com grupo OH, poli (álcool vinílico) (PVA), em PQs de CdS podem melhorar a estabilidade coloidal das nanopartículas (MANSUR, 2010, MANSUR *et al.*, 2011a, MANSUR *et al.*, 2011b).

Foi confirmado experimentalmente, a partir de medidas de fotoluminescência que as nanopartículas de semicondutores possuem um largo número de estados com energias dentro da banda de energia proibida, devido à existência de defeitos de superfície e de ligações suspensas. Estes estados de superfície têm influência nas propriedades óticas e em particular na fotoluminescência das nanopartículas de semicondutores, funcionando como centros de decaimento não radiativo. A existência e extensão destes centros podem ser eliminadas ou minimizadas pela utilização de agentes estabilizantes que estabelecem ligações com esses estados de superfície, sendo tal processo usualmente designado como passivação. As propriedades fotoluminescentes podem ser significativamente melhoradas por este processo de estabilização (PAN, 2005).

A quitosana tem sido estudada na literatura como um polímero adequado para ser utilizado na estabilização e bioconjugação com QDs, primeiro porque a quitosana tem boa capacidade de formar quelatos com metais de transição, segundo os grupos amino e hidroxilas presentes na cadeia polimérica de quitosana são bons ligantes para os QDs e ainda a natureza viscosa das soluções de quitosana pode também prevenir a aglomeração durante o crescimento das nanopartículas. Terceiro, a solubilidade em meio aquoso e a biocompatibilidade inerentes a quitosana torna possível a utilização da mesma em meio biológico e ainda a alta afinidade da quitosana por proteínas e DNA torna possível a utilização do material em outras aplicações (LI *et al.*, 2003). Na Figura 3.10, é mostrado um esquema de interação entre QDs CdS e a quitosana.

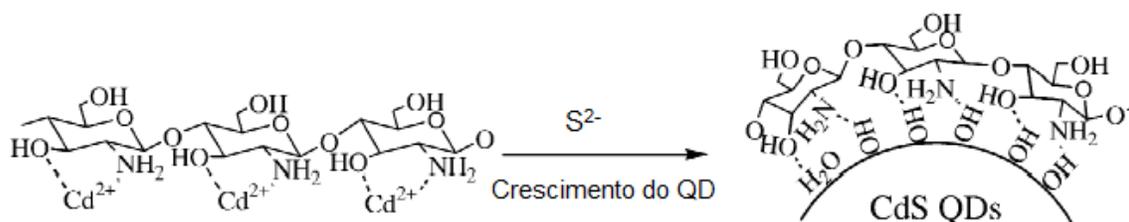


Figura 3.10. Representação esquemática da interação do QD de CdS com a quitosana (adaptada de *LI et al.*, 2003).

Recentemente, o grupo do professor Mansur tem relatado a utilização da quitosana e seus derivados, TMC e CMC, como um ligante efetivo na produção de QDs por rota coloidal aquosa (*MANSUR et al.*, 2012; *MANSUR et al.*, 2013).

3.5. Quitosana e derivados em Aplicações como Vetores não Virais para Entrega de Ácidos Nucleicos

3.5.1. Terapia Gênica

A terapia gênica é atualmente considerada como uma estratégia que fornece às células a informação genética necessária para produzir especificamente proteínas terapêuticas ou aumentar seus níveis totais de expressão, corrigindo ou modulando especificamente as patologias. Além disso, o conceito foi ampliado para incluir especificamente a regulação da expressão gênica por meio da utilização de oligonucleotídeos curtos e de fita simples que tem como alvo o DNA ou RNA, conceito este nomeado como a terapia gênica *antisense* (*GASCÓN et al.*, 2013; *PÊGO et al.*, 2013).

A terapia *antisense* consiste na introdução no interior da célula de um fragmento de DNA ou RNA capaz de se hibridizar com uma sequência complementar do RNA mensageiro localizado no citoplasma e/ou no núcleo, inibindo a tradução. Este acoplamento pode ocorrer também com o DNA nuclear, originando uma tríplice hélice, e conseqüentemente, impedindo a transcrição. A inibição, seja da transcrição ou da tradução do material genético de microrganismos ou de genes humanos modificados, poderá impedir o aparecimento de estados patológicos (*PÊGO et al.*, 2013; *GOMES et al.*, 2014).

Para alcançar a plena realização do conceito de terapia gênica, devem ser desenvolvidos vetores eficientes para o carregamento e a entrega de ácidos nucleicos para as células. Um sistema de entrega efetivo deve assegurar a proteção do ácido nucleico contra a degradação no ambiente extracelular, deve proporcionar um tempo de circulação suficiente evitando a entrega prematura quando o vetor é administrado por via intravenosa, deve possibilitar o direcionamento específico a diferentes populações de células, deve entregar eficazmente o ácido nucleico para um número suficiente de células, e, em certos casos, resultar na expressão do gene em concentrações suficientemente elevadas para produzir um efeito terapêutico. Os vetores que fazem a entrega exógena de ácidos nucleicos *in vitro* e *in vivo*, podem ser divididos em dois grupos principais: vetores virais e não virais (KNIPE *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2010; POUTON *et al.*, 1998; WARD *et al.*, 2001; WU & WU, 1987).

Ao longo dos últimos anos, muitas tentativas têm sido feitas com o objetivo de projetar vetores não virais que possam atingir o nível de expressão e especificidade gênica alcançada pelos vetores virais, proporcionando maior flexibilidade em termos quantidade de ácido nucleico transportada, ultrapassando as barreiras do sistema imunológico, e reduzindo os riscos biológicos (JAYAKUMAR *et al.*, 2007). A maioria destes sistemas de entrega não virais é de natureza catiônica, interagindo com o ácido nucleico carregado negativamente via interações eletrostáticas entre os grupos fosfato do ácido nucleico e os grupos catiônicos poliméricos. Classicamente, a carga total do complexo (potencial zeta) deve apresentar um valor líquido positivo. Isto permite que o complexo transportado possa interagir de forma eficiente com a membrana celular carregada negativamente e possa ser internalizado pela célula, principalmente através de endocitose (GOMES *et al.*, 2014).

Vários sistemas não virais baseados em nanopartículas, tais como, lipídeos, peptídeos e polímeros têm sido atualmente desenvolvidos para aplicações em terapia gênica. Entre eles, vetores de entrega à base de quitosana ganharam uma grande atenção para a entrega de plasmídeo DNA (pDNA), RNA de pequena interferência (siRNA) e oligonucleotídeos curtos de fita simples (ON) (ENNELI *et al.*, 2009; PÊGO *et al.*, 2013).

3.5.2. Quitosana e derivados como vetores na entrega de ácidos nucleicos

A quitosana (CHI) é um dos vetores poliméricos de origem natural utilizados em terapia gênica relatados na literatura devido a sua biodegradabilidade, baixas toxicidade e imunogenicidade. Este polímero tem sido proposto como uma alternativa mais segura em comparação com outros vetores não virais, tais como os lipídios catiônicos (AZIZI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2010; PÊGO *et al.*, 2013).

No entanto, algumas desvantagens estão associadas com a baixa solubilidade em pH fisiológico, problemas de direcionamento celular e capacidade reduzida de fuga endossomal, gerando baixas eficiências de transfecção, quando comparado com vetores baseados em lipídios ou outros vetores poliméricos, tais como a poli(etileno imina) (BOUSSIF *et al.*, 1995; DHEUR & SAISON-BEHMOARAS, 2000; GOMES *et al.*, 2014).

Ainda, a presença de grupos amina na estrutura da quitosana confere a versatilidade química para a modificação e funcionalização deste polímero. A fim de conceber um sistema de entrega genética verdadeiramente eficaz baseados em quitosana e ainda seguro para utilização clínica, a otimização do sistema de entrega é crucial. Isto pode ser conseguido através da compreensão e da manipulação de vários parâmetros e propriedades, assim como pela modificação e funcionalização química da quitosana e de derivados de quitosana, os quais são discutidos a seguir bem como os principais fatores que afetam as propriedades da quitosana e sua aplicação como vetor em terapia gênica (GOMES *et al.*, 2014).

A massa molar da quitosana é de grande influência no tamanho de partícula e estabilidade do políplexo formado, portanto, a associação/dissociação dos ácidos nucleicos e eficiência de transferência genética. KIANG *et al.*(2004) atribuíram influência da massa molar na formação do políplexo ao efeito do emaranhamento da cadeia, afirmando que este efeito é menos significativo com a diminuição da massa molar. Além disso, massas molares elevadas de quitosana conferem a este polímero a capacidade de “aprisionar” mais facilmente os ácidos nucleicos livres devido a interação eletrostática.

Para assegurar a função biológica dos ácidos nucleicos, os mesmos devem permanecer intactos quer no ambiente extra ou intracelular. Enquanto que no meio extra-celular, os ácidos nucleicos devem ser protegidos da degradação por nucleases e dos componentes do soro, uma vez entregues nas células alvo, devem resistir a degradação no interior do compartimento celular endossomal/lisossomal (PÊGO *et al.*, 2013).

A utilização pioneira da CHI como vetor não viral ocorreu por MUMPER *et al.* (1995) e, desde então, a quitosana tem se tornado um dos mais proeminentes e atraentes polímeros a serem utilizados vetores não virais em terapia gênica. A entrega do ácido nucleico em um políplexo formado com quitosana depende muito das interações iônicas e não iônicas que se estabelecem entre os carboidratos presentes na estrutura do polímero e as proteínas presentes na superfície das células (GOMES *et al.*, 2014).

As partículas de CHI/ácido nucleico podem ser preparadas por diferentes métodos, incluindo a coacervação, gelificação e dessolvatação. A utilização dos diferentes métodos em conjunto com outros parâmetros como a concentração de ácido nucleico, concentração de sal, pH e temperatura podem influenciar o tamanho dos complexos formados (ERBACHER *et al.*, 1998).

A interação entre a quitosana e o DNA é dependente do peso molecular e do GA (MESSAI *et al.*, 2005). Kiang *et al.* (2004) testaram quitosanas com um peso molecular a partir de 390 kDa, com graus de acetilação que variaram entre 10 e 38 %. O aumento do GA gerou um decréscimo na atividade de transfecção celular *in vitro*, devido a desestabilização das partículas na presença de proteínas do soro, porém, os níveis de transfecção *in vivo* aumentaram com o aumento do GA. Isto foi associado com o fato do DNA estar mais disponível para o tecido circundante no local da injeção (intramuscular), devido a uma libertação mais rápida do DNA dos complexos na presença de soro. Além disso, a degradação *in vivo* da quitosana aumentou de forma significativa para GA acima de 30%. No entanto, sistemas de entrega baseados em CHI, assim como outros vetores não virais, mostraram que a eficiência de transfecção varia muito com o tipo de células (LIU *et al.*, 2007; PÊGO *et al.*, 2013).

Embora a quitosana esteja sendo proposta como uma alternativa para outros vetores não virais, tais como lipossomas ou polímeros catiônicos como a PEI, ela geralmente apresenta menor transfecção e problemas com estabilidade (GRAYSON *et al.*, 2006). Esses problemas podem ser atribuídos à sua solubilidade limitada em pH fisiológico, bem como a captação celular ineficiente, dificuldade na fuga endossomal, e problemas com a dissociação do poliplexo. Consequentemente, vários esforços estão sendo feitos para melhorar a eficiência de transfecção da quitosana através da introdução de diferentes tipos grupamentos químicos na cadeia polimérica (JAYAKUMAR *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2007; KIM & KIM, 2007; LIU *et al.*, 2010; PÊGO *et al.*, 2013).

Uma abordagem comum para melhorar a eficiência de transfecção visa a melhoria da solubilidade da quitosana em condições fisiológicas. A enxertia de PEI na cadeia da quitosana levou ao aumento da solubilidade do polímero, bem como a melhoria da eficiência de transfecção em relação a PEI sozinha. Outra estratégia baseia-se na enxertia cadeias de poli(etileno glicol) a quitosana, o que melhora a solubilidade do polímero, aumenta a estabilidade dos complexos na corrente sanguínea (prolonga o tempo de circulação das partículas) e aumento na eficiência de transfecção (GOMES *et al.*, 2014).

A quaternização da quitosana pela metilação dos grupos amina primários, formando a trimetilquitosana (TMC), também tem sido estudada objetivando melhorar a solubilidade da quitosana e estabilidade do poliplexo em condições fisiológicas (PÊGO *et al.*, 2013).

Oligômeros de quitosana trimetilada também estão sendo explorados a fim de melhorar as propriedades dos vetores baseados em CHI, permitindo um aumento na solubilidade e estabilidade do polímero em condições fisiológicas (GOMES *et al.*, 2014; KÖPING-HÖGGARD *et al.*, 2004).

Embora a introdução de modificações hidrofílicas geralmente evita interações indesejáveis entre os poliplexos e o ambiente biológico, aumentando assim a estabilidade poliplexos e solubilidade. Espera-se que a introdução de unidades hidrofóbicas influencie a adsorção às

membranas celulares, o mecanismo de absorção de células e a entrega dos ácidos nucleicos às células (LIU *et al.*, 2010).

Vetores baseados em quitosana lactosilada quando testado em células HeLa demonstraram ter níveis de transfecção comparáveis aos obtidos para a PEI. Copolímeros PEI/CHI tem mostrado melhorias em termos de níveis de transfecção, com uma redução de toxicidade celular em relação ao homopolímero PEI. Para mimetizar o mecanismo de fuga endosomal da PEI, a funcionalização da quitosana com grupos tamponantes como o grupo imidazol também apresentou melhorias na capacidade de transfecção do vetor (PÊGO *et al.*, 2013).

No caso de siRNA e oligonucleotídeos *antisense*, vetores baseados em quitosana ainda estão em estágio prematuro de investigação (ENNELI *et al.*, 2009; GAZORI *et al.*, 2009; TALAEI *et al.*, 2011). No que diz respeito à entrega siRNA talvez o primeiro exemplo de nanocomplexos CHI/siRNA seja dado pelo trabalho de KATAS & ALPAR (2006). Nesse trabalho, o tamanho das partículas siRNA/CHI mostrou ser proporcional ao peso molecular da CHI, com as partículas menores formadas quando se utiliza CHI de menor peso molecular (110 kDa, em comparação com 270 kDa).

3.5.3. Terapia Gênica com Oligonucleotídeos de Cadeia Simples (ON)

Oligonucleotídeos *antisense* (ONs) são moléculas sintéticas curtas, de cadeia simples, que têm sequências complementares ao RNA mensageiro (mRNA) ou pré-mensageiro (pre-mRNA) alvo os quais a hibridação seletiva gera a inibição da expressão do gene. Os ONs têm o potencial de proporcionar maior benefício terapêutico em relação aos medicamentos tradicionais para o tratamento de infecções virais, câncer, esclerose múltipla, hepatite, transplante renal e colite ulcerativa (GOMES *et al.* 2014)

O potencial terapêutico das ONs de fita simples (ONs) foi descoberto em 1978, quando ZAMECNIK & STEPHENSON relataram que um oligonucleotídeo de DNA complementar com o RNA alvo foi capaz de inibir a replicação do vírus em cultura celular. Tal como acontece com os outros ácidos nucleicos (tais como siRNA), estas moléculas podem ser

facilmente degradadas e têm dificuldade entrar nas células. Modificações químicas nos ONs têm sido estudadas com o objetivo de aumentar a estabilidade dos mesmos, aumentar sua capacidade de atravessar a membrana plasmática e também para manter a sua eficácia após a administração *in vivo*, no entanto, a necessidade de utilização de quantidades elevadas de ONs para alcançar uma boa resposta e a falta de direcionamento celular pode trazer alguns problemas de toxicidade (STRAARUP *et al.*, 2010). Assim, o desenvolvimento de vetores apropriados de entrega de ONs torna-se fundamental. O pequeno tamanho e a baixa densidade de carga da molécula dos ONs representa um problema para a complexação. Além disso, o seu caráter de fita simples confere uma ligeira característica apolar a molécula devido à exposição de bases aromáticas nitrogenadas (ENELI *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2014; PÊGO *et al.*, 2013)

Sistemas virais e não virais de transporte de ONs vêm sendo desenvolvidos, ainda em fase inicial, a fim de aumentar a penetração celular dos oligonucleotídeo. Os vetores virais têm elevada eficiência de transdução, mas a sua uso terapêutico é limitado devido à alta toxicidade e imunogenicidade. Portanto, nos últimos anos, os sistemas veiculares não virais para entrega de ONs têm sido desenvolvidos utilizando polímeros catiônicos naturais ou sintéticos e lipídeos (HONG *et al.*, 2008; GAZORI *et al.*, 2009).

O oligonucleotídeo, Figura 3.11, ao contrário do DNA, apresenta um fragmento curto de cadeia simples de ácidos nucleicos e, por isso, possui menor densidade de carga negativa, possui igualmente as bases nitrogenadas expostas o que confere uma característica ligeiramente apolar quando comparado com o DNA (PÊGO *et al.*, 2013). Logo, a utilização de ONs na formação de complexos poliméricos baseados em quitosana e seus derivados hidrofílicos modificados com grupos hidrofóbicos torna-se atraente para maximizar as interações com oligonucleotídeos.

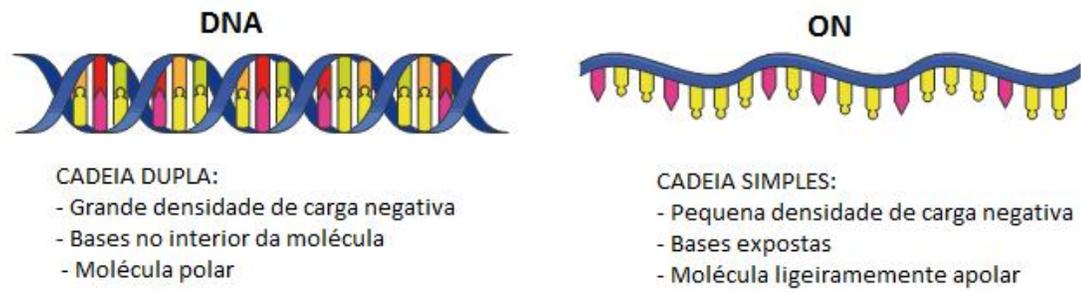


Figura 3.11. Representação das estruturas das moléculas de DNA e ON.

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1. Etapas de desenvolvimento do trabalho

Na Figura 4.1 estão mostradas as principais etapas de desenvolvimento deste trabalho.

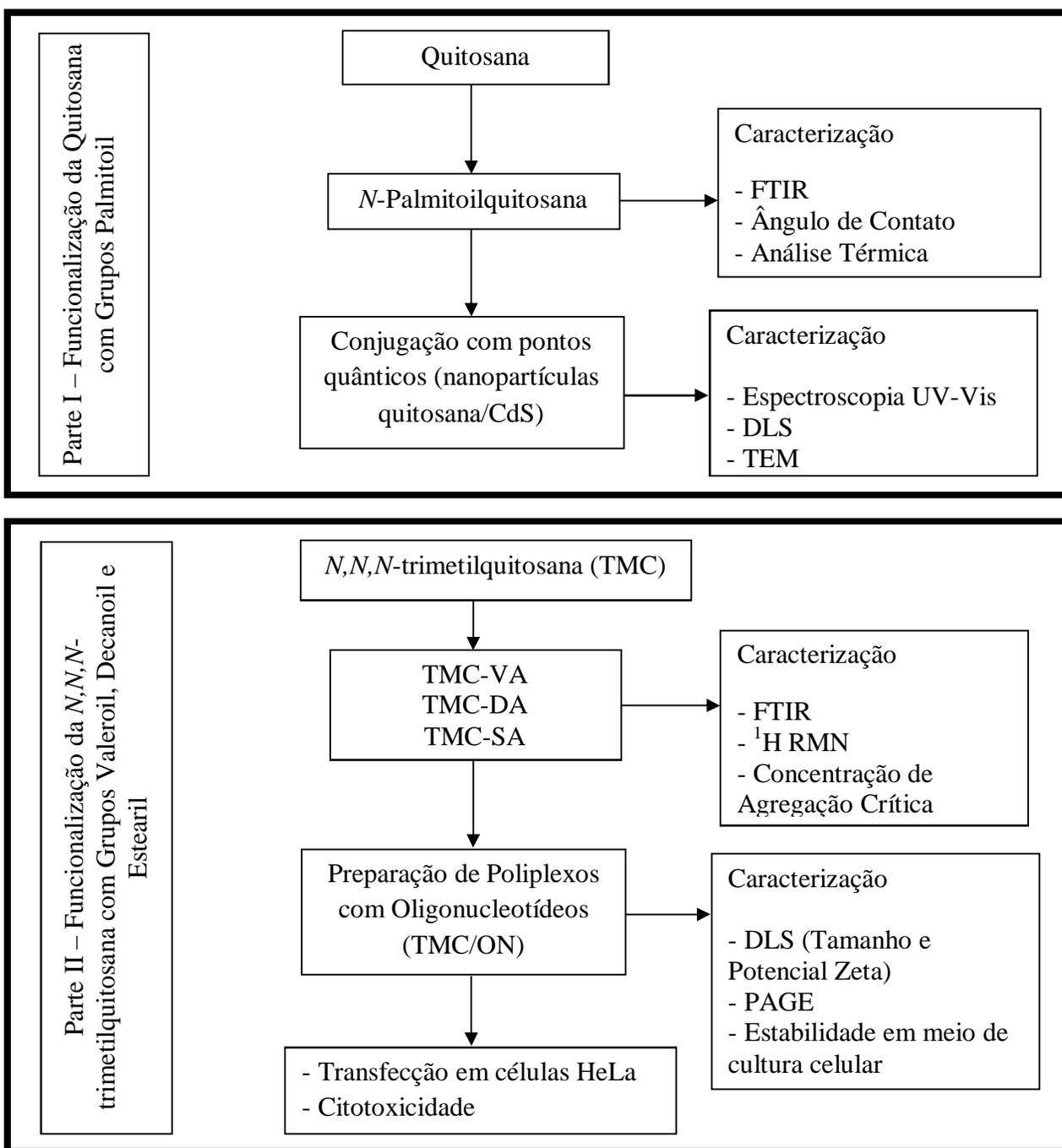


Figura 4.1 Fluxograma representando as etapas de desenvolvimento do trabalho.

4.2. Materiais

A quitosana (alta massa molar, GD 77 % foi fornecida pela Sigma-Aldrich e utilizada sem purificação prévia. O ácido palmítico (ácido hexadecanóico, $C_{16}H_{32}O_2$, Sigma-Aldrich) e esteárico (ácido octadecanóico, $C_{18}H_{36}O_2$, Sigma-Aldrich) foi conjugado à quitosana de pela formação da ligação amida entre os grupos $-NH_2$ da quitosana e o grupo $-COOH$ do ácido graxo, utilizando os agentes de acoplamento EDC/sulfo-NHS (EDC: 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, Sulfo-NHS: *N*-hidroxisulfosuccinimida, Sigma-Aldrich).

N, N, N - trimetilquitosana (TMC₄₃) de massa molar 43300 g/mol, valor obtido por cromatografia por permeação em gel (GPC), grau de desacetilação 89 % e 30 % de quaternização (KiOmedine-TMC lote VIHA0013-157) foi fornecida pela Kitozyme[®] e foi caracterizada antes da utilização em relação a massa molecular por GPC, FTIR e por ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN). A TMC foi purificada antes da utilização. Todos os reagentes e precursores (em grau analítico): cloreto de pentanoíla, cloreto de decanoíla, cloreto de tetradecanoíla, etanol, éter dietílico e metanol foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação prévia. O ácido 2-*N*-morfolinoetanossulfônico (MES) e o (ácido *N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-2-etanossulfônico) (HEPES) utilizados para o preparo das soluções tampão foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação prévia. *N*-succinimidil estearato foi obtido da Santa Cruz *Biotechnology* e utilizado sem purificação prévia. Oligonucleotídeo (ON), totalmente fosforotiolado 2'-O-metil-RNA oligonucleotídeo (SCO705: CCUCUUACCUCAGUUACA), 18 bases e 6098,9 g/mol, foi obtido da IDT (*Integrated DNA Technologies*, USA). As células HeLa/Luc705 foram gentilmente doadas pelo Dr. R. Kole, Universidade da Carolina do Norte, USA. *SYBR*[®] *Gold Nucleic Acid Gel Stain* foi obtido da Invitrogen. Soro bovino fetal (FBS) foi obtido da *ThermoFisher Scientific*. Todos os reagentes utilizados foram obtidos em grau analítico e água deionizada (Millipore *Simplicity*[™]) com resistividade de 18 MΩ·cm foi usada na preparação de todas as soluções.

4.3. Métodos

4.3.1. Modificação química da quitosana com grupos palmitoil

1,000 g de quitosana foi dissolvido em 100 mL de solução aquosa de ácido acético (ácido etanóico, 100 % de pureza, Synth) de concentração 1% v/v sob agitação magnética a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) por 24 h. Após a solubilização completa da quitosana, foram adicionados ao sistema 85 mL de metanol (álcool metílico, 99,8 % de pureza, Synth) sob agitação magnética e o sistema permaneceu homogêneo.

Foram adicionados o ácido palmítico à solução preparada anteriormente. Foram adicionados 15 mL de solução de EDC/sulfo-NHS preparada em metanol ($0,07 \text{ mol.L}^{-1}$) sob agitação magnética. A razão molar de EDC/sulfo-NHS:Ácido Graxo foi de 1:1. Após 24 h de reação, foram adicionados a mistura reacional 200 mL de solução de metanol/amônia (7:3 v/v) sob agitação magnética. Foi formado um precipitado, o qual foi filtrado e lavado com água deionizada, metanol e acetona por 5 vezes e seco na estufa por 48 h a 40 °C.

4.3.2. Caracterização da quitosana modificada com grupos palmitoil

A técnica de FTIR foi utilizada para avaliação da presença de grupos químicos característicos da macromolécula de quitosana e da modificação química da quitosana com grupos palmitoil. Os espectros de FTIR foram obtidos em triplicata pelo modo ATR (reflexão total atenuada) na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} durante 64 varreduras, com resolução de $0,1 \text{ cm}^{-1}$ (Nicolet, Perkin-Elmer, USA).

As curvas TG/DTG e DSC das amostras de quitosana e palmitoil-quitosana, bem como das membranas de palmitoil-quitosana foram obtidas em uma termobalança SDT Q-600, TA Instruments. Todos os experimentos foram realizados em triplicata utilizando um suporte

de alumínio a uma razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ iniciando da temperatura de 30°C até $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob atmosfera de nitrogênio.

A avaliação da tensão superficial, de forma a caracterizar as superfícies, foi realizada através da medição do ângulo de contato entre a superfície das amostras de membranas de quitosana e de quitosana modificada com grupos palmitoil (C-Pal) e a gota de água deionizada. Para a medição do ângulo de contato foi utilizada a foto digital da gota (volume = $50\text{ }\mu\text{L}$) depositada sobre a superfície da amostra das membranas de quitosana e palmitoil-quitosana utilizando uma microseringa. Todas as imagens foram realizadas dentro do tempo máximo de 1 minuto após a aplicação da microgota, usando uma câmera digital SONY DSC-W70. As medições foram conduzidas em condições monitoradas de umidade relativa (55 ± 5) % e temperatura ambiente (25 ± 3) $^{\circ}\text{C}$. Foram utilizados como resultados a média e o desvio padrão de seis tratamentos independentes ($n=6$).

4.3.3. Síntese e caracterização das nanopartículas CdS em soluções de Quitosana e Palmitoil-quitosana

4.3.3.1. Síntese das nanopartículas de CdS estabilizadas com CHI e C-Pal

Para a síntese das nanopartículas de CdS (sulfeto de cádmio), foram preparadas soluções de quitosana e de quitosana (CHI) modificada com grupos palmitoil (C-Pal).

As soluções de quitosana foram preparadas pela dissolução do polímero, concentração de 1,0 %p/v, em solução aquosa de ácido acético (2 %v/v) sob agitação magnética moderada por 12 h até a completa solubilização do polímero. As soluções preparadas foram diluídas em água para a concentração de 0,45 g/L para a síntese das nanopartículas de CdS.

As nanopartículas de CdS foram sintetizadas via rota aquosa em uma mistura reacional contendo soluções estoque de Cd^{2+} e S^{2-} como precursores e CHI e C-Pal como ligantes.

A síntese foi conduzida da seguinte maneira: solução de CHI ou C-Pal (47 mL, pH $3,8 \pm 0,1$) foi adicionada a mistura reacional. Sob agitação magnética moderada, a solução

precursora de cádmio (4,0 mL, Cd^{2+}) e a solução precursora de enxofre (2,5 mL, S^{2-}) foram adicionadas a reação (razão molar $\text{Cd}^{2+}:\text{S}^{2-}$ foi de 1:2). A coloração da solução foi modificada para amarelada e alíquotas de 3,0 mL foram coletadas em diferentes intervalos de tempos (após a preparação, um dia após e quatro dias após a preparação) para medidas UV-vis que foram usadas para análises cinéticas e de estabilidade coloidal. Uma representação esquemática da reação de síntese das nanopartículas está mostrada na figura 4.5.

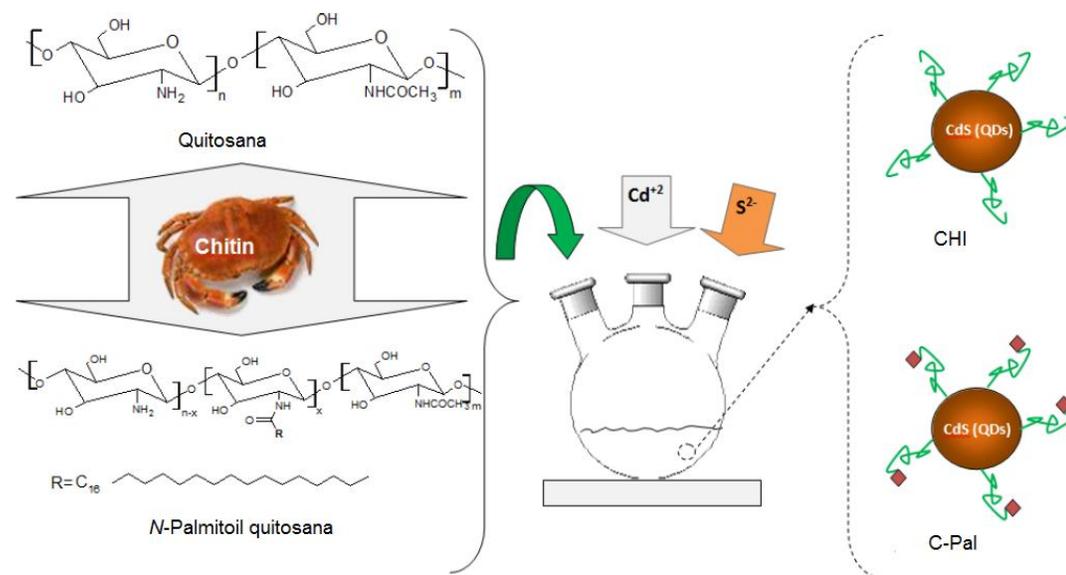


Figura 4.2. Representação do procedimento de síntese das nanopartículas de CdS e quitosana ou quitosana modificada com grupos palmitoil (SANTOS *et al.*, 2013).

4.3.3.2. Caracterização das nanopartículas de CdS estabilizadas com CHI e C-Pal

Espectroscopia UV-vis (Lambda EZ-210, Waltham, MA, USA) foi usada para monitorar a reação de formação dos *quantum dots* de CdS e a sua estabilidade relativa no meio reacional usando comprimento de onda de 600 a 190 nm, no modo de transmissão em cubeta de quartzo. Baseado nas curvas de absorvância é possível calcular os tamanhos médios das nanopartículas e suas propriedades óticas. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

A caracterização dos nanohíbridos bioconjugados CdS foi conduzida baseada no espectro adquirido a temperatura ambiente usando uma fonte de luz de xenônio (HPX-2000, Mikropack, Ostfildern, Alemanha) acoplada a um espectrômetro *Ocean Optics* USB2000 VIS-NIR. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Adicionalmente, o meio contendo as nanopartículas CdS foi colocado dentro de uma câmara escura e iluminado por radiação UV ($\lambda_{\text{excitação}} = 245 \text{ nm}$, 6 W, Boitton Instrumentos, São Paulo, Brasil). Imagens digitais foram registradas da fluorescência das nanopartículas na região visível.

A caracterização nanoestrutural dos bioconjugados *quantum dots* baseada em imagens e padrão de difração de elétrons foram conduzidas utilizando microscopia eletrônica de transmissão (TEM, microscópio Tecnai G2-F20-FEI, Hillsboro, OR, USA) a uma voltagem de 200 kV. Para análises TEM as amostras foram preparadas pelo gotejamento da dispersão coloidal em uma tela porosa de carbono.

Análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram conduzidas usando o equipamento Brookhaven ZetaPALS (laser de 660 nm, células acrílicas de 4,5 mL, Holtsville, NY, USA).

Para análises DLS dos híbridos, as dispersões coloidais foram filtradas três vezes através de um filtro de 0,45 μm (Millex LCR 25 mm, Millipore, Ostfildern, Alemanha) para remover impurezas.

Após a filtração, as amostras foram deixadas em um banho ultrassônico por aproximadamente 10 s. As amostras foram analisadas a $25,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e o espalhamento de luz foi detectado a 90° .

4.3.4. Purificação da TMC

Para purificação da *N, N, N*-trimetilquitosana (TMC_{43}), foram pesados 1,000 g do polímero e adicionados em um béquer de plástico contendo 200 mL de água Milli-Q. A solução foi deixada sob agitação magnética por 2 h a temperatura ambiente ($20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) e então se adicionou ácido acético glacial gota a gota até a obtenção de um pH igual a 5, água Milli-Q

foi adicionada até que se atingisse um volume total de 300 mL. A solução foi deixada sob agitação magnética a temperatura ambiente por 2 h, filtrada em filtro de vidro sinterizado #2 e em seguida em filtro #1 para remoção das impurezas. A TMC₄₃ purificada foi precipitada adicionando-se solução 1:1 etanol/éter dietílico e solução de NaOH 10 mol/L (gota a gota) até atingir pH 9. A TMC₄₃ precipitada foi distribuída em tubos Falcon[®] e centrifugada uma vez a 524 rad/s (5000 rpm) por 5 minutos. Após cada centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol.

A TMC₄₃ purificada foi dissolvida novamente em água Milli-Q, congelada em freezer a -80 °C e liofilizada (Labconco) por 72 h. O polímero purificado foi armazenado em câmara fria a 4 °C.

4.3.5. Modificação química da TMC com grupos pentanoil (TMC-VA)

Antes da reação de modificação química a TMC purificada foi deixada em estufa de vácuo por 12 h a 60 °C para secagem. As quantidades utilizadas dos reagentes foram calculadas como objetivo de obter uma modificação química teórica das aminas primárias de $3,3 \times 10^{-5}$ mols de grupos pentanoil/mol de TMC (ou 20% de modificação teórica) usando-se um excesso de cloreto de pentanoíla de 20 vezes. Para a reação, 50 mg de TMC₄₃ foram dissolvidos em 6,2 mL de solução tampão HEPES 0,5 M, pH 7,4, sob agitação magnética por 12 h a 37 °C. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionados 9,4 mL de metanol e o sistema foi deixado por 1 h sob agitação magnética a 50 °C, Figura 4.3. Foram adicionados, gota a gota, à solução de TMC₄₃, uma solução de cloreto de pentanoíla em 9,4 mL de metanol e o sistema foi deixado por 8h sob agitação magnética a 50 °C. A mistura reacional foi dialisada (membrana de diálise *Spectra/Por 3*, massa molecular de corte 3,5 kDa) por 72 h contra água destilada para remoção dos reagentes remanescentes solúveis em água. Após a diálise, a solução foi liofilizada a -80 °C (Labconco) por 72 h e o polímero obtido foi lavado três vezes com etanol após sucessivas centrifugações (8000 rpm, 5 min) para remoção do ácido valérico residual. Após a purificação, o polímero foi dissolvido em água Milli-Q e liofilizado novamente por 72 h. O

polímero modificado com grupos pentanoil foi chamado de TMC-VA e armazenado em câmara fria a 4 °C.

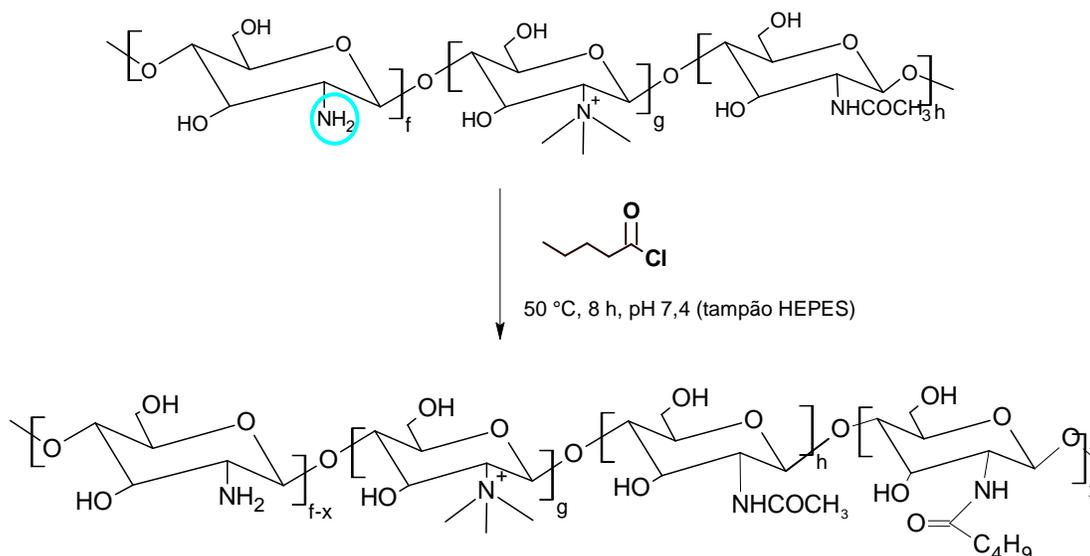


Figura 4.3. Esquema de síntese da TMC-VA.

4.3.6. Modificação química da TMC com grupos decanoil (TMC-DA)

Antes da reação de modificação química a TMC₄₃ foi deixada em estufa de vácuo por 12 h a 60 °C para secagem. As quantidades utilizadas dos reagentes foram calculadas como objetivo de obter uma modificação química de $3,3 \times 10^{-5}$ mols de grupos decanoil/mol de TMC (ou 20% de modificação teórica) e excesso de cloreto de decanoíla de 20 vezes. Para a reação, 50 mg de TMC foram dissolvidos em 6,2 mL de solução tampão fostato 0,5 M, pH 7,4, sob agitação por 12 h a 37 °C. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionados 9,4 mL de metanol e o sistema foi deixado por 1 h sob agitação magnética a 50 °C, Figura 4.4. Foram adicionados, gota a gota, à solução de TMC₄₃, uma solução de cloreto de decanoíla em 9,4 mL de metanol e o sistema foi deixado por 8 h sob agitação magnética a 50 °C.

A mistura reacional foi dialisada (membrana de diálise *Spectra/Por 3*, massa molecular de corte 3,5 kDa) por 72 h contra água destilada para remoção dos reagentes remanescentes

solúveis em água. Após a diálise, a solução foi liofilizada $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Labconco) por 72 h e o polímero obtido foi lavado três vezes com etanol após sucessivas centrifugações (8000 rpm, 5 min) para remoção do ácido decanoico residual. Após a purificação, o polímero foi dissolvido em água Milli-Q e liofilizado novamente por 72 h. O polímero modificado com grupos decanoil foi chamado de TMC-DA2 e armazenado em câmara fria a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

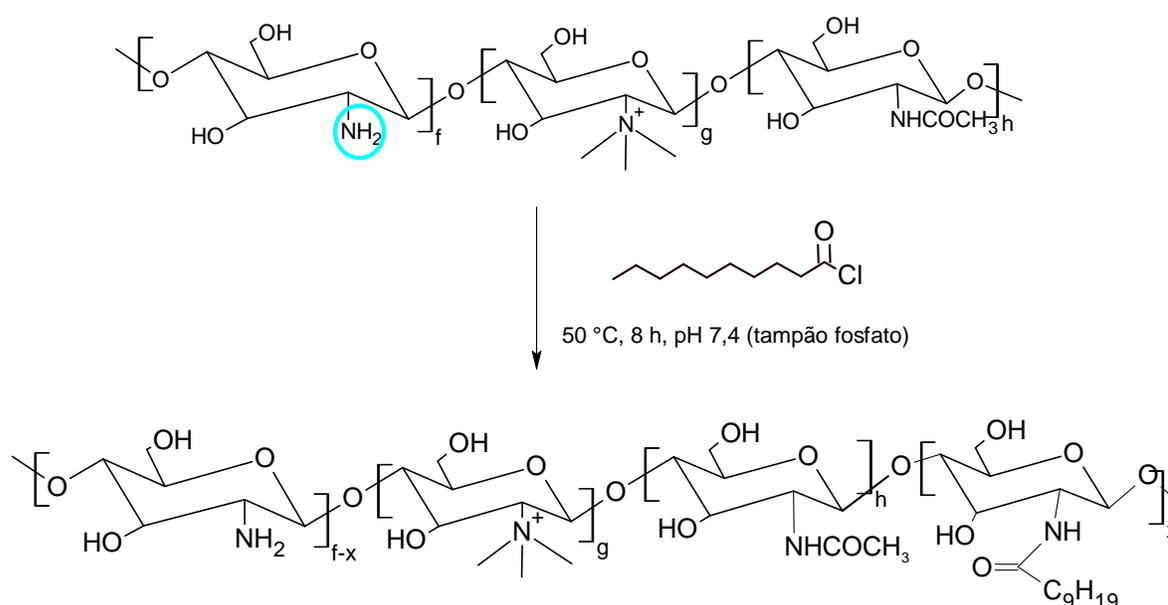


Figura 4.4. Esquema de síntese da TMC-DA.

4.3.7. Modificação química da TMC com grupos estearil (TMC-SA)

Antes da reação de modificação química a TMC_{43} foi deixada em estufa de vácuo por 12 h a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, para secagem. As quantidades utilizadas dos reagentes foram calculadas como objetivo de obter uma modificação química de $3,3 \times 10^{-5}$ mols de grupos decanoil/mol de TMC (ou 20% de modificação teórica). Para a reação, 50 mg de TMC foram dissolvidos em 6,2 mL de solução tampão ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES) 0,1 M, pH 6,5 sob agitação por 12 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo e adicionados 9,4 mL de metanol, o sistema foi deixado por 1 h sob agitação magnética a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram adicionados, gota a gota, à solução de TMC_{43} , uma solução do N-succinimidil estearato em 9,4 mL de metanol e o sistema foi deixado por 24 h sob agitação magnética a

50 °C, Figura 4.5. A mistura reacional foi dialisada (membrana de diálise *Spectra/Por 3*, massa molecular de corte 3,5 kDa) por 72 h contra água destilada para remoção dos reagentes remanescentes solúveis em água. Após a diálise, a solução foi liofilizada a -80 °C (Labconco) por 72 h e o polímero obtido foi lavado três vezes com etanol após sucessivas centrifugações (8000 rpm, 5 min) para remoção do ácido esteárico residual. Após a purificação, o polímero foi dissolvido em água Milli-Q e liofilizado novamente por 72 h. O polímero modificado com grupos estearil foi chamado de TMC-SA2 e armazenado em câmara fria a 4 °C.

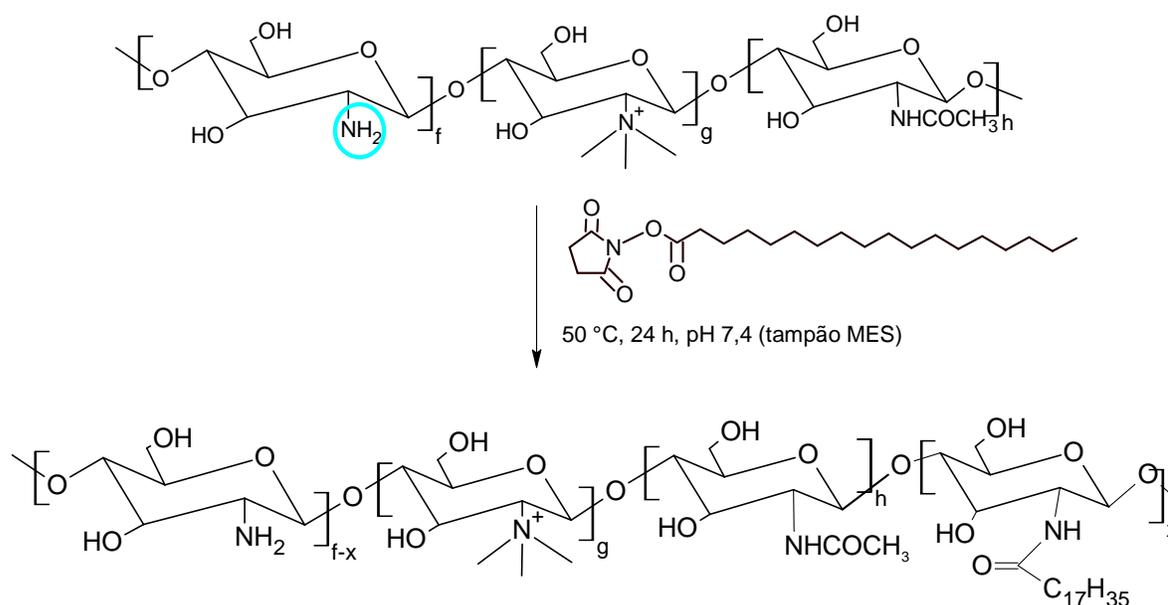


Figura 4.5. Esquema de síntese da TMC-SA.

4.3.8. Caracterização das TMCs modificadas

A ligação química entre o ácido graxo e os grupos amino da cadeia de TMC foi confirmada por ressonância magnética nuclear de próton (¹H NMR) e espectroscopia de infravermelho (FTIR).

Para os experimentos ¹H NMR, o TMC modificado (concentração final de 0,33 g/mL) foi dissolvido em D₂O em um ThermomixerTM a 50 °C sob agitação de 800 rpm. Após 1h de

agitação foi adicionado DCI (2.7% v/v) e depois de 1 h adicionou-se metanol-D₄. Os espectros ¹H NMR foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 400MHz a 50 °C e 200 varreduras. Todas as análises foram realizadas em triplicada e os resultados médios serão expressos com seus respectivos desvios padrão.

Os ensaios FTIR foram realizados nas amostras previamente secas por 12 h a 60 °C em estufa de vácuo. As análises foram realizadas em espectrômetro Perkin Elmer System 200 usando a técnica ATR pela acumulação de 200 interferogramas a 4 cm⁻¹ de resolução espectral.

4.3.9. *Determinação da Concentração de Agregação Crítica dos TMCs modificados*

A concentração de agregação crítica (CAC) dos TMCs modificados e do TMC não modificado foi avaliada usando a técnica de espectroscopia de fluorescência (*Synergy*TM *Mx*, *BioTek Instruments*, USA) e o pireno como uma sonda hidrofóbica.

Para os experimentos, foram preparadas soluções dos TMCs em 20 mM de tampão HEPES contendo 5% p/v de glicose, pH 7,4. Um volume específico de solução aquosa de pireno (concentração $6,0 \times 10^{-7}$ M) foi adicionado sobre vortex (3-4 s) e aquecida durante 12 h a temperatura de 37 °C para equilibrar os agregados poliméricos formados.

As soluções das amostras de TMCs contendo pireno foram excitadas usando laser xenon (*Synergy*TM *Mx*). As concentrações de TMC e TMCs modificados com ácidos graxos foram variadas de $1,0 \times 10^{-4}$ a 2,0 mg/mL. A razão entre as intensidades da primeira (372 nm) e da terceira (383 nm) banda no espectro de emissão do pireno foi obtida, usando o comprimento de excitação de 317 nm, emissão na região entre 350-450 nm e o tempo de integração de 10 s/nm.

4.3.10. Preparação e quantificação das soluções de TMC₄₃, TMC-VA, TMC-DA e TMC-SA

Antes do preparo das soluções as amostras de TMC₄₃ (não modificada) e TMCs modificadas (TMC-VA, TMC-DA e TMC-SA) foram deixadas em estufa de vácuo por 12 h a 60 °C, para secagem.

Foram preparadas soluções de TMC₄₃ e TMCs modificadas com concentrações iguais a 0,3% p/v através da dissolução da massa correspondente de cada polímero em metade do volume total de solução em HCl 5 mM por 4 h sob agitação a 37 °C e a outra metade do volume total de solução em tampão HEPES 40 mM + 10% p/v Glicose pH 7,4. A solução foi deixada por 12 h sob agitação magnética a 37 °C.

A solução final foi filtrada em membrana Millipore® tamanho de poro 0,8 µm e em seguida em membrana Millipore®, 0,22 µm, para remoção de impurezas.

Após a filtração, as concentrações das soluções foram quantificadas pelo ensaio do *Cibacron Brilliant Red* (Sigma-Aldrich), MUZZARELLI (1998).

Para quantificação, foram pesados 1,5 mg de Cibacron e adicionados em 1 mL de água Milli-Q. Esta solução foi diluída 20 vezes em solução tampão HEPES (20 mM + 5% p/v Glicose, pH 9,2).

Foi preparada uma curva de calibração, com as soluções de TMC e TMCs modificadas de concentração conhecida, 0,3 % p/v, (antes da filtração) as quais foram diluídas em sucessivas diluições (triplicata), Tabela 4.1. Após as sucessivas diluições e preparação da curva padrão foram adicionados 500 µL da solução de cibacron e solução final foi deixada por 20 minutos sob agitação de 800 rpm em termomixer a temperatura de 25 °C.

A amostras das soluções filtradas de TMC e TMCs modificadas as quais foram diluídas em sucessivas diluições (triplicata), completando um volume total de 50 µL e adicionados

500 μ L da solução de cibacron e solução final foi deixada por 20 minutos sob agitação de 800 rpm em ThermomixerTM a temperatura de 25 °C .

As amostras foram colocadas em placas de 96 poços (BD FalconTM) e foi lida a absorvância a 575nm (fluorímetro de placas, *Biotek Synergy MX*). Foi construída a curva padrão e as concentrações das soluções de TMC₄₃ e TMCs modificadas depois de filtradas foram calculadas.

Tabela 4.1. Soluções usadas na realização da curva padrão para a quantificação da concentração da solução de TMC₄₃ e TMCs modificadas pelo método do *cibacron red*.

Curva Padrão		
	Polímero (μ L)	Tampão (μ L)
A	50	0
B	40	10
C	30	20
D	20	30
E	10	40
F	0	50

4.3.11. Preparação e caracterização dos complexos TMC/ON

Para o preparo dos poliplexos entre o polímero e o oligonucleotídeo (ON), foram utilizadas as soluções de TMCs preparadas após a filtração e quantificação. Foram preparados poliplexos com várias razões N/P (calculado pela relação entre o número de moles de grupos quaternarizados do TMC -N - e o número de moles dos grupos de fosfato de oligonucleotídeo -P-) através do aquecimento das soluções do polímero e do ON separadamente em ThermomixerTM a 60 °C por 5 min. Em seguida o volume adequado da solução de ON foi adicionado à solução polimérica sob vortex durante 8 s, após o qual a suspensão do complexo foi deixada por 15 min a 60 °C, com agitação de 800 rpm. Subsequentemente, a solução foi colocada à temperatura ambiente (20 \pm 3) °C para

estabilização final em um tempo mínimo de 30 min. Nas Tabelas 4.2 e 4.3 são mostradas as quantidades e os componentes utilizados para preparação de dois diferentes tipos de complexos.

Tabela 4.2. Valores utilizados na complexação do TMC₄₃ (solução com concentração de 0,27% p/v) com ON (concentração 0,3 μM)

Razão N/P	5	10	20	40	60	80	100	120	140	160
Razão Molar	1,25	2,49	4,98	9,97	14,95	19,93	24,91	29,90	34,9	39,9
N/pmol	10800	21600	43200	86400	129600	172800	216000	259200	302400	345600
TMC ₄₃ /pmol	149,5	299,0	597,9	1195,8	1793,8	2391,7	2989,6	3587,5	4185,5	4783,4

Solução ON	Amostras										
	V (ON)/μL	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
	V (tampão)/μL	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	22,1	12,5	2,9	-
	Na ₂ SO ₄ 1M->50mM	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0

Solução TMC	V (TMC ₄₃)/μL	2,4	4,8	9,6	19,2	28,8	38,4	47,9	57,5	67,1	76,7
	V (tampão)/μL	37,6	35,2	30,4	20,8	11,2	1,6	-	-	-	-

	V (poliplexo)/μL	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	86,7
--	------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Após a preparação dos poliplexos, os diâmetros médios e os índices de polidispersão (Pdi) das nanopartículas foram avaliados por *Dynamic Light Scattering* (DLS), Zetasizer Nano ZS (Malvern). Todas as análises DLS foram realizadas em triplicata e os valores médios serão mostrados com seu respectivo desvio padrão.

Tabela 4.3. Valores utilizados na complexação do TMC-SA2 (solução com concentração de 0,25% p/v) com ON (concentração 0,3 μ M)

Razão N/P	5	10	20	40	60	80	100	120	140	160
Razão Molar	1,2	2,5	5,0	10,0	14,9	19,9	24,9	29,9	34,9	39,9
N/pmol	10800	21600	43200	86400	129600	172800	216000	259200	302400	345600
TMC-SA/pmol	149,5	299,0	597,9	1195,8	1793,8	2391,7	2989,6	3587,5	4185,5	4783,4

Solução ON	Amostras											
	V (ON)/ μ L	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
	V (tampão)/ μ L	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	18,2	7,9	-	-	
	Na ₂ SO ₄ 1M- >50mM	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	

Solução TMC	V (TMCSA)/ μ L	2,6	5,2	10,4	20,7	31,1	41,4	51,8	62,1	72,5	82,8
	V (tampão)/ μ L	37,4	34,8	29,6	19,3	8,9	-	-	-	-	-

V (poliplexo)/ μ L	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	82,5	92,8
------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Para avaliação da carga superficial dos poliplexos e polímeros sem ON, ensaios de potencial zeta foram realizados. Os poliplexos foram preparados e cada amostra foi diluída, separadamente, 3 vezes em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose pH 7,40. Após as diluições, foram realizadas as análises de potencial zeta. Para efeitos de comparação também foram realizadas análises nas mesmas condições, mas na ausência de ON.

A capacidade de condensação do ON pelos poliplexos foi avaliada por ensaio de retardamento em gel de poliácridamida. Os poliplexos foram preparados em diferentes razões N/P e submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida com tensão de 120 V

durante 30 minutos. O tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) foi usado como um tampão de corrida. Após a execução dos géis, as bandas foram reveladas em solução de SYBR Gold 1% v/v durante 15 minutos sob agitação lenta. As bandas dos oligonucleotídeos foram visualizadas e fotografadas (Chemi-Doc, *Bio-Rad Laboratories*, EUA).

4.3.12. Avaliação da estabilidade dos complexos TMC/ON em meio de cultura celular

Para verificar a estabilidade dos políplexos em meio de cultura celular (DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco + 10% v/v FBS – soro fetal bovino pré-tratado por aquecimento) e em solução tampão 20 mM HEPES + 5% p/v Glucose, pH 7,4 (onde os complexos são preparados), foram realizadas análises de tamanho e potencial zeta das nanopartículas, Zetasizer Nano ZS (Malvern). Todas as análises DLS foram realizadas em triplicata e os valores médios serão mostrados com seu respectivo desvio padrão.

Para os experimentos de análise de diâmetro das partículas, foram preparados políplexos TMC₄₃/ON (N/P 80), TMC-VA3/ON, TMC-VA9/ON, TMC-DA2/ON e TMC-SA2/ON (N/P 80) como descrito anteriormente e as amostras foram diluídas 1:3 em meio de cultura DMEM + 10% v/v soro FBS.

A capacidade e a estabilidade dos políplexos em condensar o ON após a diluição em meio de cultura celular foi avaliada por ensaio de retardamento em gel de poliacrilamida. Os políplexos foram preparados em diferentes razões N/P e diluídos na razão 1:3 em DMEM + 10% v/v FBS, após a incubação de 1 h os políplexos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com tensão de 120 V durante 30 minutos. O tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) foi usado como um tampão de corrida. Após a execução dos géis, as bandas foram reveladas em solução de SYBR Gold 1% v/v durante 15 minutos sob agitação lenta. As bandas dos oligonucleotídeos foram visualizadas e fotografadas (Chemi-Doc, *Bio-Rad Laboratories*, EUA).

4.3.13. Transfecção dos poliplexos em células HeLa/Luc705

Células HeLa/Luc705, cultivadas em DMEM, com FBS a 10% e gentamicina 50ug/mL, foram semeadas 24h antes da transfecções a uma densidade de 60.000 células por poço em placas de cultura de 24 poços. No dia da transfecção, o meio foi substituído por DMEM com FBS a 10% v/v, sem a adição de antibióticos. Os complexos TMC/ON foram preparados como descrito anteriormente e Lipofectamina 2000[®] – L2K (Invitrogen) foi utilizada segundo protocolo do fabricante para preparar complexos controle. Os complexos foram adicionados gota a gota às células, num volume final de 300µL e a incubação prosseguiu durante 48h, durante a qual um volume de meio completo fresco (sem antibióticos) foi adicionado aos poços passadas 24h.

Após 48h de contato com os poliplexos, as células foram colhidas em tampão de lise HEPES Krebs Ringer (HKR): NaCl 130 mM , KCl 5 mM , MgSO₄ 1,2 mM , CaCl₂ a 1,2 mM , HEPES 20 mM , Na₂SO₄ 1,2 mM , Glucose 10 mM, pH 7,3, com adição de 0,15% de Triton 100X). As células lisadas foram guardadas em freezer -80°C.

Todos os ensaios de transfecção foram realizados em triplicata e os valores médios serão mostrados com seu respectivo desvio padrão.

4.3.14. Estudo de eficiência de transfecção dos poliplexos

O nível de expressão da luciferase foi analisado utilizando o ensaio de atividade de luciferase (*Luciferase Assay System*, Promega, EUA). A atividade da luciferase foi medida em um leitor de placas (*Biotek Synergy MX*, USA) pela mistura de 20 µL das células lisadas com 100µL de *Luciferase Assay substrate* (Promega). A concentração total de proteína foi medida usando o kit BCA, *ácido bicinconínico* (estojo de ensaio de proteína BCA, Pierce, *Thermo Scientific Protein Research Products*, EUA). A expressão da luciferase é reportada em unidades de luminescência relativa (RLU) por micrograma de proteína. Todos os ensaios de atividade da luciferase e proteína foram realizados em triplicata e os valores médios serão mostrados com seu respectivo desvio padrão.

4.3.15. Estudo da citotoxicidade das amostras de TMCs e dos políplexos TMC/ON

Ensaio de viabilidade celular foram efetuados usando o ensaio de resazurina (Sigma) (baseado na redução de resazurina em resazurina por células metabolicamente ativas). Ambas as TMCs modificadas livres e políplexos correspondentes foram avaliados em células HeLa/Luc705.

Especificamente, para este ensaio células HeLa (2×10^5 células/mL) foram incubadas por 48 h em placas de cultura de 96 poços, 37 °C e 5% de CO₂, em meio de cultura (DMEM com antibióticos). O meio foi então substituído e as soluções poliméricas TMC₄₃, TMC-VA3, TMC-VA-9, TMC-DA2 e TMC-SA2 e os respectivos políplexos foram adicionados (20 µL polímero ou políplexos em 80 µL de meio sem antibióticos). As células foram então incubadas por 24 h.

Para o ensaio da resazurina, após as 24 h de incubação referidas anteriormente, o meio foi retirado da placa de cultura e adicionada 10 % (v/v) de resazurina em meio de cultura sem antibióticos (0,1 mg/mL; SIGMA-ALDRICH, USA). A placa de cultura foi então incubada por 4 h em estufa a 37 °C e 5 de CO₂. Foram então retirados 100 µL de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços preta, sendo a quantificação feita em espectrofotômetro (*Biotek Synergy MX*) com filtro de excitação a 570 nm e de emissão a 590nm.

Para visualização da morfologia das células após contato com a amostra de polímero e Políplexo TMC/ON, foi realizado o seguinte procedimento. As células HeLa foram gentilmente cedidas pela Professora Zélia Portela Lobato do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) com 10 % de soro fetal bovino (SBF), penicilina G sódica (10 un/mL), 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina e 0,25 mg/mL de anfotericina-b todos os reagentes da fornecidos pela Gibco BRL, NY, EUA, em estufa de CO₂ a 5 % e 37 ° C. Células HeLa da passagem cento e quatro foram plaqueadas (2×10^4 células/poço) em placa de 96 poços. As populações celulares foram sincronizadas em meio sem soro durante

24 horas, após este período, o meio foi aspirado e em seguida colocado 200 μ l de DMEM contendo 10 % de SFB. Em seguida, foram adicionados 20 μ l das amostras de políplexo TMC₄₃/ON e do polímero TMC₄₃. Foram utilizados como controle de referência DMEM com 10% de SFB. O aspecto morfológico das células foi analisado após 24 horas de contato em microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED, Alemanha).

4.3.16. Citometria de Fluxo

Para análises de citometria de fluxo, as células HeLa foram incubadas (60.000 células) 24 h antes da transfecção em placa de cultura celular de 24 poços. As células foram incubadas com nanocomplexos (como descrito anteriormente) por 4 h. Quitosanase (Millipore[®]) (3 mU de quitosanase/ μ g de TMC) em DMEM com pH ajustado para 6,5 foi então adicionada as células, através da completa substituição do meio de cultura anterior, e o sistema incubado por 1 h a 37°C.

As células foram, então, tripsinizadas, lavadas 2 vezes com PBS e finalmente resuspendidas em PBS+2% v/v FBS. As células foram analisadas em FACSCalibur citômetro de fluxo (BD Biosciences) e os resultados analisados usando o software FlowJo (FlowJo, LLC).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese e caracterização da quitosana modificada com grupos palmitoil

Na Figura 5.1 está mostrado um esquema da síntese da quitosana conjugada com os ácidos graxos. Os reagentes de acoplamento EDC/sulfo-NHS promovem a ativação dos grupos carboxílicos presentes no ácido graxo, que sofrem ataque pelos grupos amina presentes na macromolécula de quitosana promovendo a formação da ligação amida entre o polímero e o ácido palmítico com síntese da palmitoil-quitosana (CHOUDHARI *et al.*, 2012).

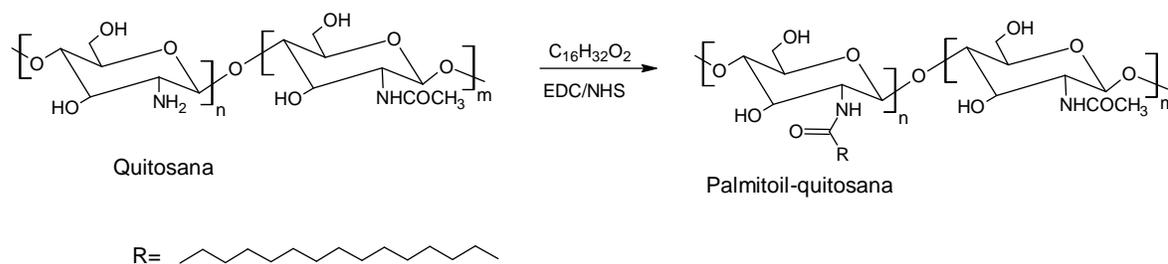


Figura 5.1. Esquema de síntese da quitosana conjugada com grupos palmitoil.

Segundo a literatura, a substituição dos grupos amino presentes na quitosana por grupos amida, *N*-acilação, pode ser confirmada utilizando a espectroscopia FTIR (CHIU *et al.*, 2009; TIEN *et al.*, 2003).

O ácido hexadecanóico (ácido palmítico) é um ácido graxo obtido principalmente do óleo de palma e possui cadeia carbônica saturada contendo 15 átomos de carbono e um grupo funcional carboxílico na extremidade (SALES, 2006). O ácido palmítico possui ponto de fusão de 62 °C sendo insolúvel em água e ligeiramente solúvel em etanol, metanol e acetona. Na Figura 5.2 está mostrado o espectro FTIR obtido para o ácido palmítico. No espectro é observada uma banda larga, 3300 a 2500 cm^{-1} , referente à absorção do estiramento axial do grupo hidroxila presente no ácido carboxílico. Também são observadas as bandas de estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH_2 presente na cadeia alquílica, 2920 e 2850 cm^{-1} , respectivamente. A banda do estiramento do grupo carbonílico do ácido carboxílico foi observada em 1710 cm^{-1} .

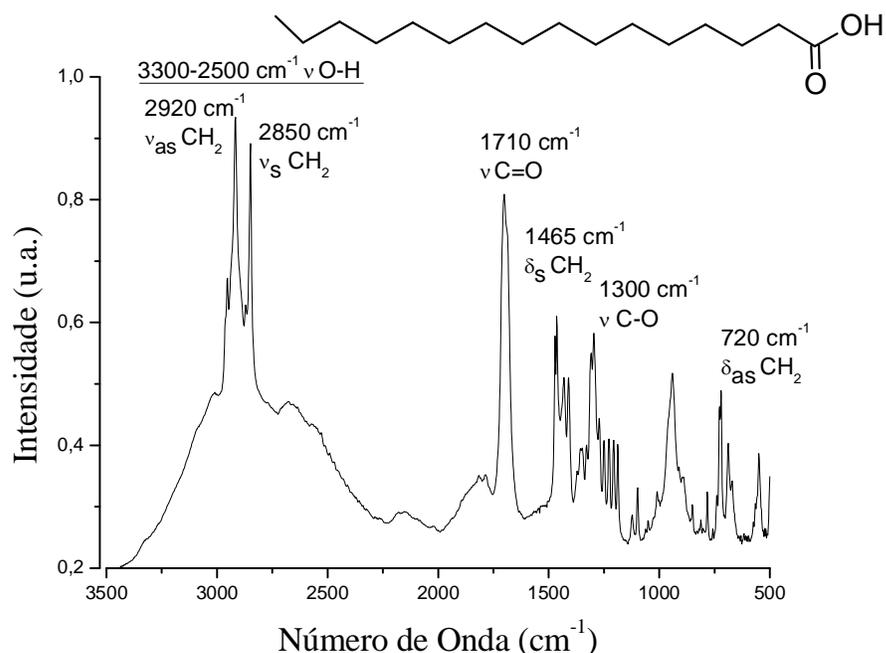


Figura 5.2. Espectro FTIR obtido para o ácido palmítico.

O espectro de infravermelho obtido para a quitosana, Figura 5.3, apresenta um pico de absorção em 3435 cm⁻¹, que está associado ao estiramento do grupo N-H, a ligação de hidrogênio e ao estiramento O-H. Na banda do estiramento do C-H, o pico de 2920 cm⁻¹ (com menor intensidade) corresponde à vibração assimétrica e o pico de 2880 cm⁻¹ (com maior intensidade) à vibração simétrica. Além disso, na banda característica da deformação angular do CH₂ (tesoura) é observado o pico em 1420 cm⁻¹. Devido ao grau de desacetilação da quitosana observa-se o pico da ligação amida e o estiramento da ligação C=O em 1660 cm⁻¹. Os picos de 1320 cm⁻¹, 1260 cm⁻¹ e 1380 cm⁻¹ correspondem às fortes vibrações de dobramento da ligação N-H primária, secundária e terciária, respectivamente. As vibrações fora do plano da ligação C-H correspondente à estrutura sacarídea aparecem em 1155 cm⁻¹ e 895 cm⁻¹, (COSTA JR *et al.*, 2009).

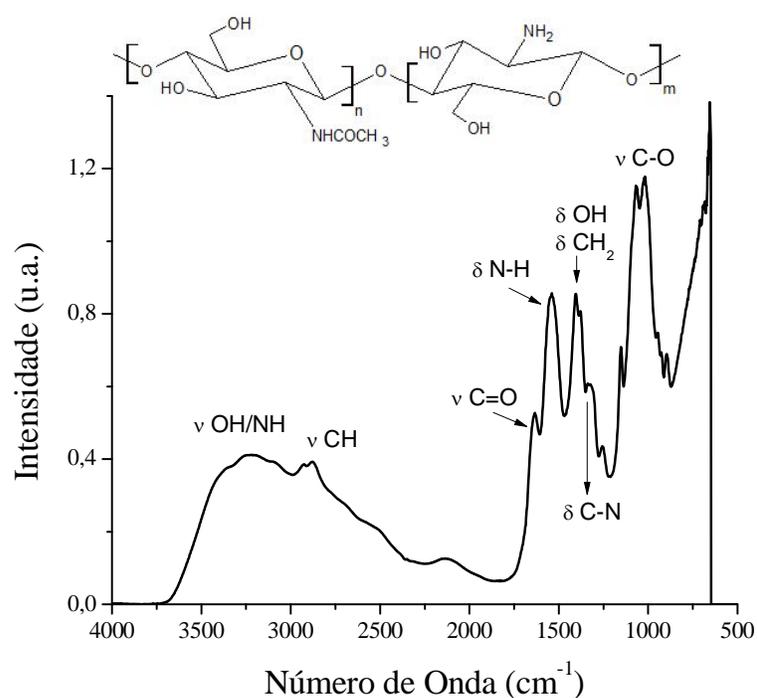


Figura 5.3. Espectro FTIR obtido para a quitosana não modificada.

O espectro infravermelho obtido para as amostras de quitosana modificada com ácido palmítico está mostrado na Figura 5.4. No espectro são observadas as bandas referentes ao estiramento dos hidroxílicos 3300 a 2500 cm^{-1} e as bandas de estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH_2 presente na cadeia alquílica, 2920 e 2850 cm^{-1} , respectivamente. Observa-se a banda de absorção em 1660 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carbonílico da amida e também a banda referente a deformação da ligação N-H da amida mostrando que quitosanas modificadas com ácidos graxos foram sintetizadas.

Outra evidência para a modificação química da quitosana é o desaparecimento da banda em 1710 cm^{-1} , estiramento do C=O do ácido carboxílico. Segundo a literatura e o resumo das principais bandas observadas para a quitosana, para os ácidos graxos e a quitosana modificada com grupos acílicos, mostrado na tabela 5.1, pode-se observar que a quitosana foi modificada quimicamente com grupos palmitoil (CHOUDHARI *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2009).

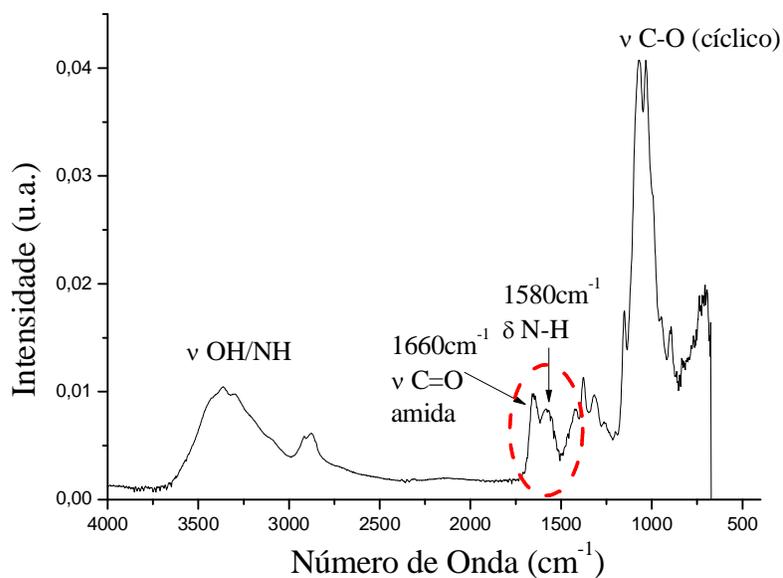


Figura 5.4. Espectro FTIR da quitosana conjugada ao ácido palmítico.

A Figura 5.5 mostra mais uma evidência da modificação química da quitosana, através da observação da diminuição relativa da banda referente ao estiramento axial dos grupos amina presentes nas amostras de quitosana e quitosana modificadas.

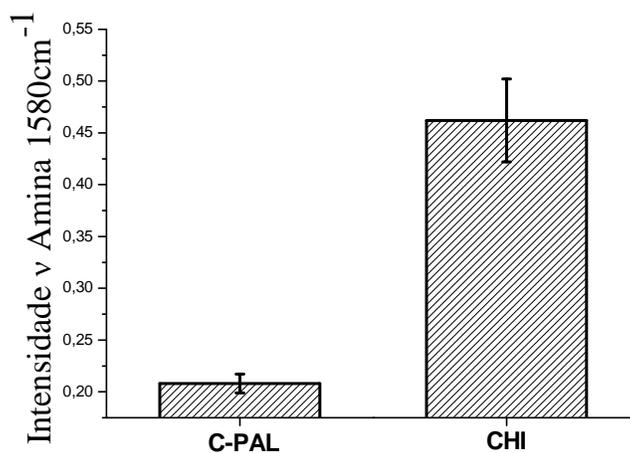


Figura 5.5. Gráfico de barras mostrando a intensidade da banda referente ao estiramento dos grupos amina nas amostras de quitosana e quitosana modificada.

Na Figura 5.6, podem-se observar os espectros FTIR para a quitosana (CHI) e palmitoil-quitosana (C-PAL). Pela análise do espectro percebe-se claramente a diminuição da banda referente ao dobramento da amina em 1580 cm^{-1} e o aumento da banda referente ao estiramento da ligação amida em 1660 cm^{-1} . Esta evidência mostra que a quitosana foi modificada quimicamente com grupos palmitoil.

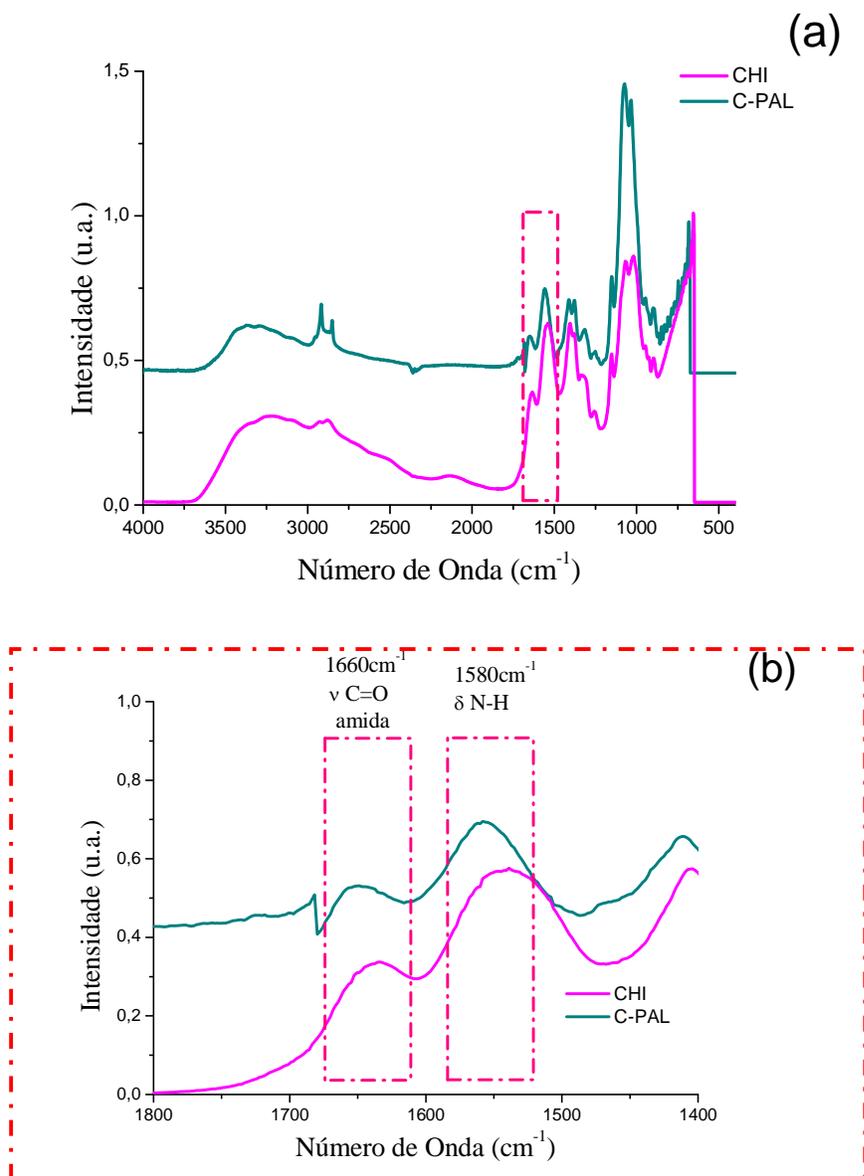


Figura 5.6. (a) Espectros FTIR para a quitosana e palmitoil-quitosana (b) ampliação do espectro na região de 1800 a 1400 cm^{-1} .

Na Tabela 5.1 estão mostradas as principais bandas de absorção no infravermelho (IV) para os grupos químicos presentes nas amostras de quitosana e ácidos graxos.

Tabela 5.1. Principais bandas de absorções na região do IV associadas aos ácidos graxos, quitosana e quitosana acilada

Grupo Funcional	Amostra	Faixa de Absorção (cm ⁻¹)	Atribuição	Referências
-CH ₃	Ácido Graxo	2975-2950	v _{as} CH ₃	BARBOSA, 2008; INOUE <i>et al.</i> , 2004; LI <i>et al.</i> , 2004; SALES <i>et al.</i> , 2008
		2885-2865	v _s CH ₃	
		1465-1440	δ _{as} CH ₃	
		1390-1370	δ _s CH ₃	
-CH ₂ -	Ácido graxo	2930-2920	v _{as} CH ₂	
		2870-2840	v _s CH ₂	
		1480-1440	δ _s CH ₂	
		725-720	δ _{as} CH ₂	
R-COOH	Ácido Graxo	3300-2500	v O-H	
		1725-1710	v C=O	
		1320-1210	v C-O	
R-OH	Quitosana	3570 – 3200	v OH ligado	
R-N-H	Quitosana	3450	v N-H	
Amida I	Quitosana	1900 – 1500 1658	v C=O	
R-N-H	Quitosana	1650 – 1550 1658 – 1630	δ N-H (I)	
R-OH	Quitosana	1465	δ OH	
-CH ₂ -	Quitosana	1423	δ CH ₂ (tesoura)	
C-O-C (cíclico)	Quitosana	1300 – 1000 1070	v C-O (cíclico)	
C-O-C (cíclico)	Quitosana	1030	v C-O (cíclico)	
R-N-H	Quitosana Modificada	3570 – 3200	v OH ligado	BORDENAVE <i>et al.</i> , 2010; CHIU <i>et al.</i> , 2009; FENG <i>et al.</i> , 2012; LEE <i>et al.</i> , 2011;
R-OH	Quitosana Modificada	3450	v N-H	
-CH ₂ -	Quitosana Modificada	2972-2860	v _{as} CH ₂ v _s CH ₂	
Amida I	Quitosana Modificada	1652	v C=O	
Amida II	Quitosana Modificada	1556	v C=O	
R-N-H ₂	Quitosana Modificada	895	δ NH ₂	

A curva TG/DTG, Figura 5.7, obtida para o ácido palmítico apresentou duas perdas de massa entre 60 e 300 °C referentes a sua decomposição. A curva DTA, revelou um pico endotérmico atribuído à fusão do ácido palmítico em 61,2 °C e outro pico endotérmico em 246 °C referente a sua decomposição. Esses resultados estão em concordância com a literatura (CEDEÑO *et al.*, 2003; SALES *et al.*, 2008).

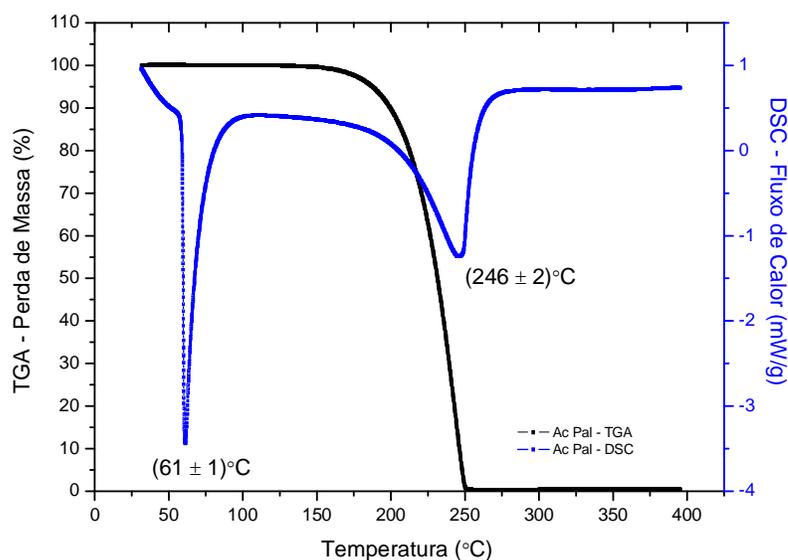


Figura 5.7. Análise termogravimétrica obtida para a amostra de ácido palmítico sob atmosfera de N₂.

Na Figura 5.8, está mostrada a curva termogravimétrica obtida para a amostra de quitosana em pó. Para a quitosana a perda de massa e degradação ocorre em dois estágios endotérmicos. O primeiro estágio ocorre a aproximadamente 69 °C com uma perda de massa inferior a 5 %, referente a perda de água fisicamente adsorvida na rede polimérica. O segundo estágio inicia-se a aproximadamente 240 °C e apresenta um máximo a 278 °C com uma perda de massa de 40,1 %, referente a degradação da cadeia polimérica, tabela 5.2.

Tabela 5.2. Resultados de TG e DSC para a decomposição térmica da amostra de quitosana em atmosfera de N₂

Evento Térmico	TG		Picos DSC/°C
	Intervalo de Temperatura/°C	Perda de Massa ou Resíduo/%	
Desidratação	30-150	4,4	(69±1) - endo
Decomposição, Oxidação	260-400	40,1	(278±2) - endo

Os resultados obtidos são similares aos resultados encontrados na literatura (ROTTA *et al.*, 2011). O primeiro estágio de perda de massa 30-150 °C, refere-se a perda de água. O segundo, 260-400 °C corresponde à decomposição térmica e oxidativa da quitosana bem como da sua vaporização e eliminação de produtos voláteis. De acordo com a literatura, a pirólise de polissacarídeos inicia-se pela quebra desordenada das ligações glicosídicas seguida pela decomposição formando ácido acético, ácido butírico e uma série de ácidos graxos de baixa massa molar (NETO *et al.*, 2005; ROTTA *et al.*, 2011,; SANTOS, *et al.*, 2003).

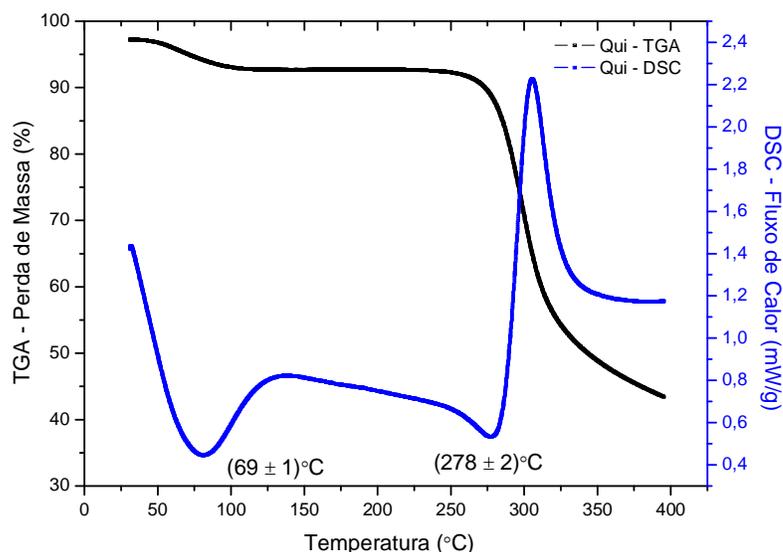


Figura 5.8. Análise termogravimétrica obtida para a amostra de quitosana em pó sob atmosfera de N₂.

Na Figura 5.9 está mostrado o termograma obtido para a amostra de quitosana modificada com ácido palmítico (palmitoil-quitosana). Os resultados mostraram uma maior perda de massa em 88 °C, cerca de 9 %, em comparação com a amostra de quitosana pura. Nessa região ocorre a perda de moléculas de água e a perda de grupos voláteis de baixa massa molar como a cadeia acílica do ácido palmítico. Além disso, o segundo estágio de perda de massa de cerca de 40 % mostra a decomposição térmica e oxidativa da quitosana iniciando-se a 230 °C e com um máximo em 274 °C. Segundo a literatura, a quitosana modificada quimicamente apresenta as perdas de massa deslocadas para temperaturas mais baixas do que a quitosana não modificada. Isso porque a palmitoil-quitosana é menos estável termicamente que a quitosana pura. Já a decomposição térmica da quitosana modificada é deslocada para temperaturas inferiores a quitosana pura (MA *et al.*, 2009).

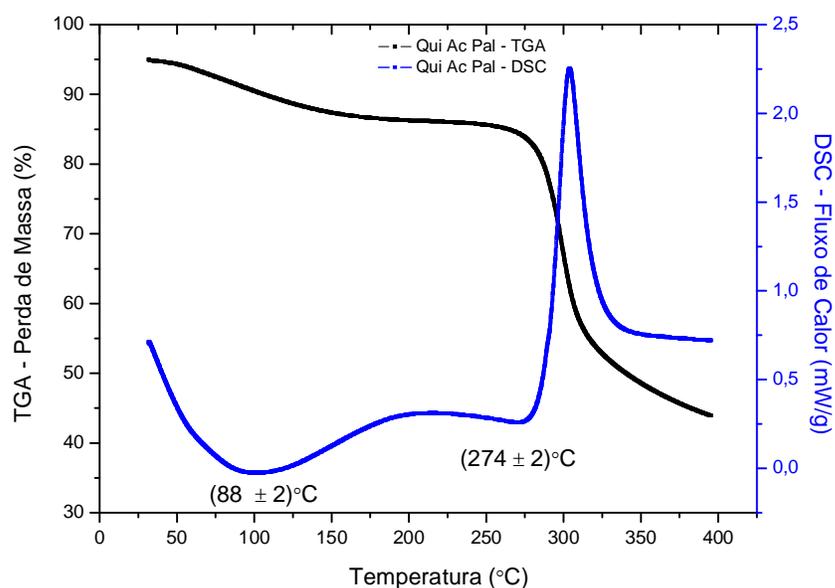


Figura 5.9. Análise termogravimétrica obtida para a amostra de quitosana conjugada ao ácido palmítico sob atmosfera de N₂.

Polissacarídeos geralmente possuem grande afinidade com água e, portanto, podem ser facilmente hidratados, resultando em estruturas macromoleculares desordenadas. Como se sabe, as propriedades de hidratação dos polissacarídeos dependem das estruturas molecular

e supramolecular (NETO *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2009). Portanto, variações nas posições dos picos e/ou área relacionados com os eventos de perda de água são esperados e podem revelar mudanças moleculares físicas e químicas na estrutura da quitosana.

Os resultados obtidos pela análise térmica mostraram diferenças nas posições dos picos para as amostras de quitosana e palmitoil-quitosana, revelando a modificação química da quitosana com grupos palmitoil provocou alterações na capacidade e na força de interação da quitosana com as moléculas de água. Considerando a estrutura química da quitosana, as moléculas de água podem interagir com dois grupos polares, hidroxila e amina. Foi relatado na literatura que a interação das moléculas de água com as hidroxilas é mais forte do que interação da mesma com as aminas. No caso da quitosana, a quantidade de água de hidratação é menor do que na palmitoil-quitosana. Em quantidades inferiores de água, estas moléculas interagem mais facilmente com os grupos aminas e então, o evento de transição térmica ocorre em intervalos de temperaturas mais baixas (NETO *et al.*, 2005). Entretanto, para a palmitoil-quitosana que possivelmente possui mais água de hidratação na sua estrutura, devido ao processo de modificação química, e ainda, possui grupos palmitoil ligados nos sítios onde havia as aminas, a água estará interagindo com as hidroxilas e por isso o evento de desidratação térmica deslocou para intervalos de temperaturas mais elevadas.

5.1.1. Membranas de Quitosana e Palmitoil-Quitosana

A análise visual das amostras do filme de quitosana mostrou um aspecto translúcido, homogêneo e ligeiramente mais amarelado do que o filme de palmitoil-quitosana, Figura 5.10. Ambos os filmes foram preparados com espessura média de (90 ± 5) μm , mas ajustando-se o volume de solução no molde, placa de Petri de poli(estireno), podem-se obter espessuras finais variadas.



Figura 5.10. Imagem das membranas (a) quitosana e (b) palmitoil-quitosana.

A análise morfológica dos filmes de quitosana e de palmitoil-quitosana por MEV não revelou diferenças entre os dois materiais. Ambas as amostras apresentaram aspecto morfológico homogêneo sem a presença de poros ou outros defeitos, como mostrado na Figura 5.11.

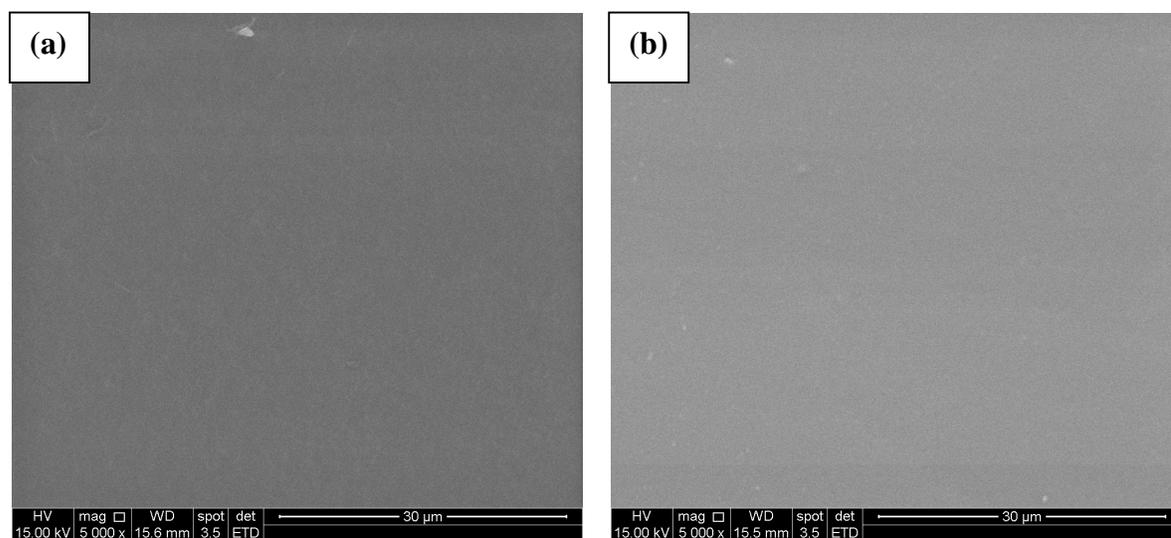


Figura 5.11. Imagens obtidas por MEV a um aumento de 5000x das amostras de filmes de quitosana (a) e de palmitoil-quitosana (b).

O experimento de intumescimento conduzido nos filmes de quitosana e de palmitoil-quitosana apresentou um padrão inicialmente rápido de absorção de fluido em aproximadamente 0,5 h, seguido pela estabilização de massa num período superior a 96 h, Figura 5.12. Ao exame visual as amostras também apresentaram apreciável aumento de volume. Os resultados para a membrana de quitosana revelaram um intumescimento inicial de 567 %, em meia hora de experimento, e o volume de fluido absorvido decresceu até sua

estabilização para aproximadamente 390 % em um período superior a 96 h de experimento. Já os resultados obtidos para a amostra de palmitoil-quitosana revelaram uma menor absorção de fluido. Em meia hora de experimento o fluido absorvido foi 450% seguido por uma estabilização após 96 h de 400%. Em pH 7,40 da solução PBS, os grupos polares hidroxilas e aminas da cadeia macromolecular da quitosana interagem com as moléculas de água via ligações de hidrogênio promovendo uma grande absorção de fluido e aumento de volume da membrana. Os grupos hidrofóbicos palmitoil reduziu a capacidade de absorção de fluido da estrutura da quitosana tornando a estrutura polimérica mais rígida e menos exposta a interação com moléculas de água, sugerindo a presença de domínios nanoagregados formados por interações hidrofóbicas, Figura 5.13.

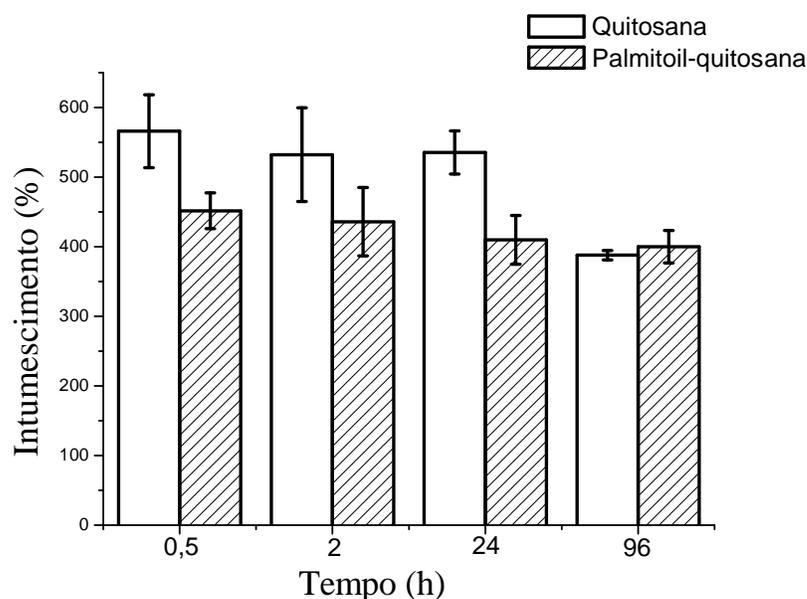


Figura 5.12. Intumescimento das amostras de membranas de quitosana e palmitoil-quitosana.

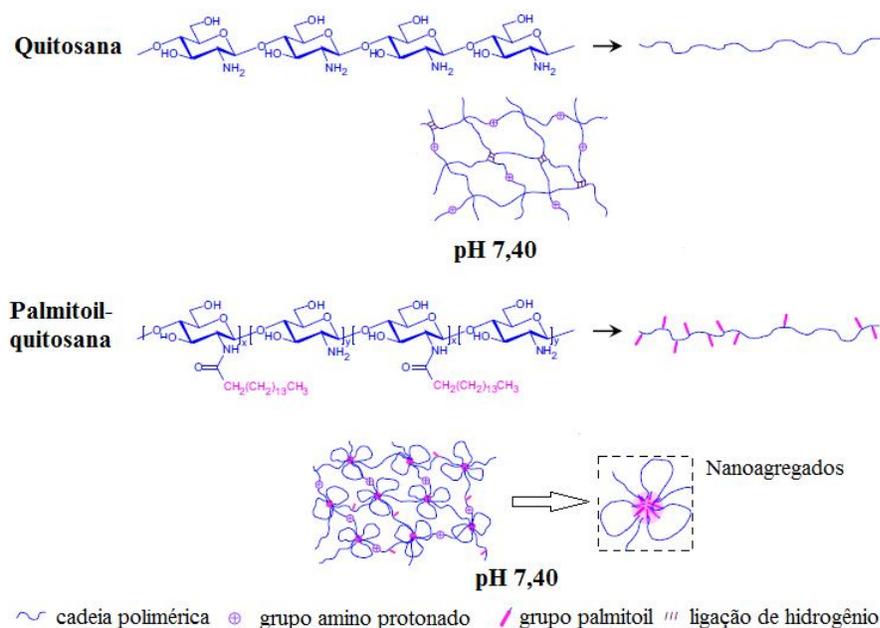


Figura 5.13. Esquema de interação das cadeias de quitosana e palmitoil-quitosana durante o intumescimento.

A menor molhabilidade, ou seja, maior hidrofobicidade do filme de palmitoil-quitosana em relação ao filme de quitosana é confirmada pelo aumento do ângulo de contato, Figura 5.14, pois o aumento do ângulo de contato indica um aumento na hidrofobicidade da superfície (SUNILKUMAR *et al.*, 2012). Possivelmente a conformação da cadeia polimérica é modificada pela funcionalização química e inserção de grupos palmitoil hidrofóbicos na estrutura da quitosana. Com a adição de grupos hidrofílicos na cadeia polimérica as interações intermoleculares por ligações de hidrogênio são minimizadas e o polímero conforma-se de maneira que os grupos hidrofóbicos interajam entre si e os grupos hidrofílicos fiquem conformados e menos expostos diminuindo a molhabilidade da superfície e consequentemente aumentando o ângulo de contato.

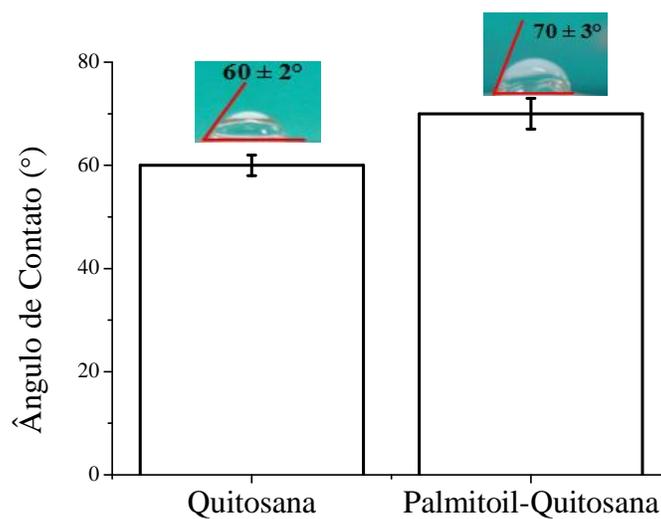


Figura 5.14. Ângulo de contato para as amostras de quitosana e palmitoil-quitosana.

Os resultados obtidos por análise térmica e por ângulo de contato das membranas de quitosana e palmitoil- quitosana revelaram a modificação química na estrutura da quitosana. Assim como os resultados de intumescimento revelaram uma maior absorção de água no filme de quitosana os resultados de análise térmica mostraram uma maior interação com a água para a membrana de quitosana, Tabela 5.3. Isso porque a perda de massa e o intervalo de temperatura do evento térmico foram maiores para a quitosana do que para as membranas de palmitoil-quitosana, Figuras 5.15 e 5.16. Após a funcionalização química da quitosana com grupos hidrofóbicos a cadeia polimérica tende a se reorganizar formando nanoagregados para minimizar a energia livre superficial onde os grupos hidrofóbicos interagem entre si reduzindo a absorção de água do polímero (PARK *et al.*, 2010).

Tabela 5.3. Resultados de TG e DSC para a decomposição térmica das amostras de membranas de quitosana e *N*-palmitoilquitosana em atmosfera de N₂

Membrana	Evento Térmico	TG		Picos DSC/°C
		Intervalo de Temperatura/°C	Perda de Massa/%	
Quitosana	Desidratação	30-175	17,0 ± 0,2	(80 ± 4) - endo
	Decomposição, Oxidação	210-325	40,0 ± 0,1	(287 ± 6) - endo
Palmitoil-Quitosana	Desidratação	30-150	15,0 ± 0,1	(73 ± 3) - endo
	Decomposição	200-330	39,0 ± 0,3	(280 ± 2) - endo

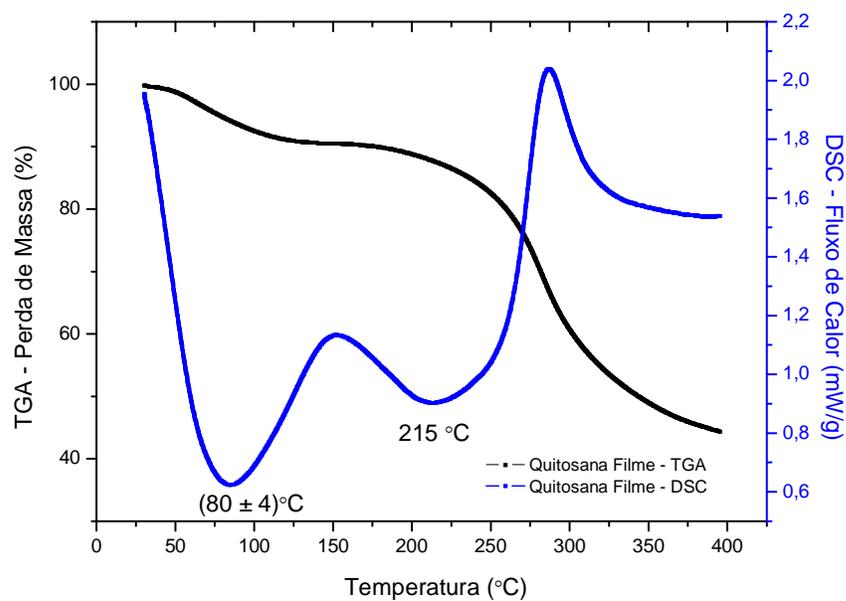


Figura 5.15. Termograma obtido para a amostra de filme de quitosana.

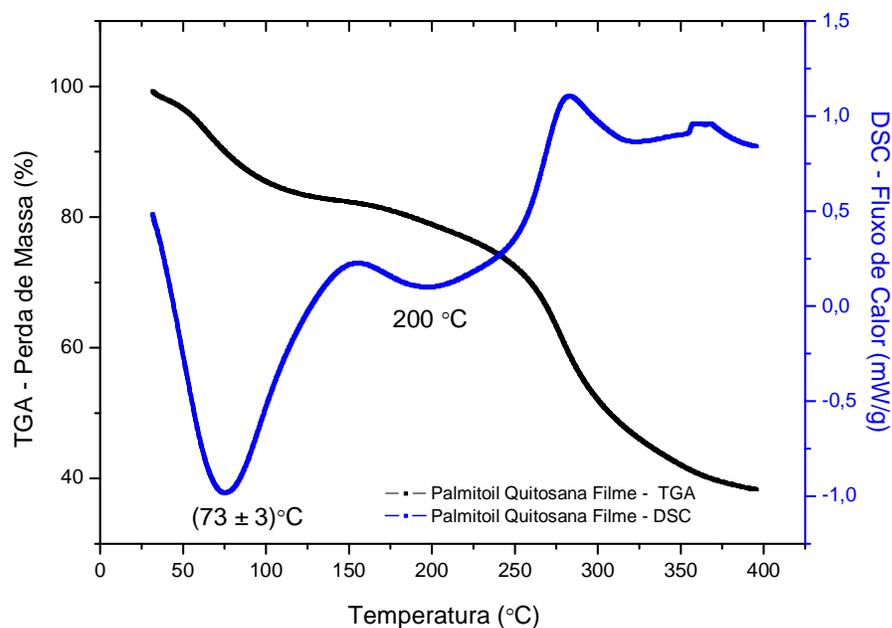


Figura 5.16. Termograma obtido para a amostra de filme de palmitoil-quitosana.

5.2. Síntese e Caracterização das nanopartículas de CdS estabilizadas com CHI e C-Pal

Algumas informações básicas sobre a física e a química de nanocristais semicondutores são necessárias para caracterizar os sistemas bioconjugados. Essencialmente, devido à sua dimensão, as nanopartículas de semicondutores irão apresentar um efeito de “confinamento quântico”, relacionada com o éxciton (ou par “elétron/buraco”) gerado pela radiação de excitação (BRUS, 1984). Isso significa que, os nanocristais depois de atingirem um limiar específico de tamanho de partícula (R =raio), são chamados de pontos quânticos e a energia de *band gap* (E_{QD}) é mais ampla do que a mesma energia para material original em *bulk* (MANSUR, 2010). Neste estudo, o tamanho médio das nanopartículas em suspensão coloidal foi determinado a partir do modelo empírico de Henglein (WELER *et al.*, 1986), que relaciona o diâmetro ($2R$) das nanopartículas de CdS à “absorção óptica excitônica” (λ_{exc}) a partir do espectro UV-vis. Este procedimento tem sido amplamente utilizado para

estimar o tamanho das nanopartículas de semicondutores diretamente *in situ* a partir de dispersões coloidais, através do método de espectroscopia de UV-vis.

Na Figura 5.17 (A), são apresentados os resultados obtidos por espectroscopia de UV-vis para as nanopartículas coloidais de semicondutores em meio aquoso usando a quitosana e a quitosana modificada com ácido palmítico (C-Pal) como estabilizante. Os nanocristais de CdS foram nucleados e estabilizados com os ligantes a base de quitosana e quitosana modificada (após 4 dias), com tamanhos médios equivalentes de 3,5 nm (2R), tanto para a quitosana e para a *N*-palmitoil quitosana, que foram estimadas a partir do modelo e comprimento de onda valor empírico de Henglein na primeira transição excitônica (λ_{exc} , nm), usando a Equação 5.1.

$$2R_{CdS} = \frac{0,1}{(0,1338 - 0,0002345\lambda_{exc})} \quad \text{Equação 5.1}$$

O método de espectroscopia UV-vis também pode ser utilizado para estimar o deslocamento da banda proibida ("*blue-shift*") causado pelo "efeito de confinamento quântico" nas nanopartículas de semicondutores. A energia de band gap (E_{QD}) foi avaliada usando a relação de TAUC (1972) para a obtenção do valor de comprimento de onda (λ_{onset}) associado ao "*onset* de absorção", como mostrado na Equação 5.2.

$$(\alpha hv)^2 = B(hv - E_{QD}) \quad \text{Equação 5.2}$$

Onde: α é o coeficiente de absorção, hv é a energia do fóton, B é a forma parâmetro de banda, E_{QD} é o gap ótico das nanopartículas.

Portanto, pode-se estimar o valor de *band gap* diretamente plotando um gráfico de (αhv) versus (hv) e extrapolando a parte linear do gráfico do eixo (hv) , ou seja, $\alpha = 0$ (linhas tracejadas na Figura 5.17 (B)).

Podem-se observar valores muito similares para o *band gap*, $E_{QD} = 2,59 \pm 0,02$ eV e $2,56 \pm 0,02$ eV, para suspensões coloidais CdS usando CHI e C-Pal, respectivamente, que foram

calculados utilizando a relação de "TAUC". Como estes valores obtidos são superiores aos valores comumente relatados na literatura "valor de *bulk*" de 2,4 eV para CdS (Mansur, 2010), pode-se afirmar que os pontos quânticos foram efetivamente sintetizados por esta via em etapa única, utilizando quitosana e seu acil-derivado como estabilizante. Os resultados extraídos a partir de análises de espectros de UV-Vis e absorção ótica encontram-se resumidos na Tabela 5.4.

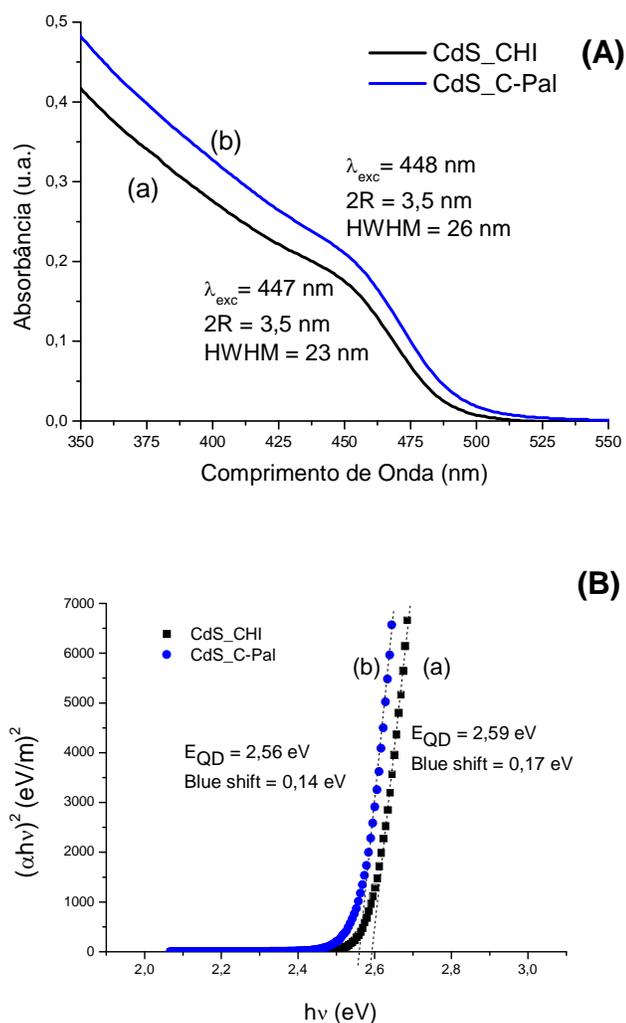


Figura 5.17. (A) Espectros de absorção UV-visível e (B) espectros de absorção ótica das nanopartículas de CdS estabilizadas com soluções poliméricas após 4 dias de preparação, (a) quitosana e (b) *N*-palmitoil quitosana (C-Pal).

Tabela 5.4. Parâmetros obtidos para os pontos quânticos, energia de *Band gap*, *blue-shift* e tamanho estimado das nanopartículas

Amostra	Parâmetros	Valores após 5 dias
CdS-CHI	<i>Band Gap</i> (eV)	$2,59 \pm 0,02$
	<i>Blue Shift</i> (eV)	$0,17 \pm 0,02$
	λ_{exc} (nm)	447 ± 2
	2R (nm)	$3,5 \pm 0,1$
	HWHM (nm)	23 ± 1
CdS-CPal	<i>Band Gap</i> (eV)	$2,56 \pm 0,02$
	<i>Blue Shift</i> (eV)	$0,14 \pm 0,02$
	λ_{exc} (nm)	448 ± 2
	2R (nm)	$3,5 \pm 0,1$
	HWHM (nm)	26 ± 1

A meia-largura no meio-máximo (HWHM) na região de baixa energia do primeiro éxciton do pico de absorção pode ser utilizada como um indicativo relativo de distribuição de tamanho das nanopartículas (DAI *et al.*, 2006), um menor valor de HWHM corresponde a mais estreita distribuição de tamanho (YU *et al.*, 2004). Normalmente, os índices HWHM de nanocristais sintetizados utilizando precursores organometálicos estão no intervalo de 10 nm até 20 nm (DAI *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2003a), em comparação com QDs preparados em soluções aquosas que possuem mais ampla largura do pico (YU *et al.*, 2003b).

Neste estudo, os valores de HWHM estimados para as amostras de pontos quânticos foram semelhantes para ambos os conjugados de CdS-CHI e CdS-C-PAL, 23 ± 1 nm e 26 ± 1 nm, respectivamente. Como seria de esperado, os valores obtidos para ambas as amostras são superiores aos valores relatados na literatura para CdS tipicamente preparados utilizando as vias não-aquosas. Além disso, apesar dos valores de HWHM obtidos serem estatisticamente semelhantes para ambos os sistemas, o conjugado a base de *N*-palmitoil quitosana (C-Pal) apresentou um ligeiro aumento da dispersão da distribuição dos pontos

quânticos, mas apresentou o valor médio de tamanho equivalente comparado a quitosana. Pode ser sugerido que o grupo acil enxertado na cadeia de quitosana (C-Pal) provocou alterações no equilíbrio das interações hidrofóbicas/hidrofílicas entre os grupos químicos da cadeia polimérica e também nas interações eletrostáticas de grupos carregados com o meio aquoso da suspensão coloidal. Além disso, o impedimento estérico do grupo *N*-palmitoil pode ter afetado o comportamento de capeamento dos glicoconjugados sobre os QDs formados. No entanto, devido ao fato da reação entre os cátions Cd^{+2} e os ânions S^{2-} em meio aquoso, com formação de cristais de CdS, ser muito favorável nas condições utilizadas para a síntese, de acordo com a termodinâmica (variação de energia livre Gibbs $\Delta G < 0$) e cinética (produto de solubilidade constante, $K_{ps} = 8,0 \times 10^{-27}$) (MANSUR *et al.*, 2012; JAISWAL *et al.*, 2012), o efeito da modificação química da quitosana com grupos acil não provocou alterações significativas sobre o tamanho médio e distribuição pontos quânticos de CdS.

Os resultados obtidos indicaram que a quitosana e a *N*-palmitoilquitosana foram eficazes como ligantes para estabilizar os pontos quânticos coloidais de semicondutores em meio aquoso. Pode-se considerar como um possível mecanismo que atua no sistema a redução da energia de superfície elevada dos QDs de CdS pelas interações das funcionalidades químicas a partir de cadeias poliméricas, tal como esquematicamente representado na Figura 5.18. Devido ao "excesso" de íons de cádmio (Cd^{2+}) em comparação com íons sulfetos na síntese dos QDs, $[\text{Cd}^{2+}]/[\text{S}^{2-}] = 2:1$, considera-se que a estabilização de bioconjugados ocorreu predominantemente porque a quitosana é um polímero multi-nucleofílico com a presença dos grupos funcionais amins e hidroxilas. Em relação a quitosana acilada (C-Pal), um comportamento semelhante pode ser previsto considerando que os grupos amino nucleofílicos são prontamente protonados, em meio ácido, como o pKa da quitosana em meio aquoso é de aproximadamente 6,5 (CHIU *et al.*, 2010).

A *N*-acilação da quitosana é favorecida em relação a *O*-acilação porque amins são mais nucleofílicas que as hidroxilas (carbonos 3 e 6 da cadeia de quitosana) e também os grupos amida formados são mais estáveis devido ao efeito de ressonância gerado pelo par de elétrons livres no átomo de nitrogênio do grupo carbonílico, CHIANDOTTI *et al.*, 2010.

Isso significa que os sítios nucleofílicos da quitosana não foram significativamente alterados após a reação de funcionalização com grupos *N*-palmitoil. Esta hipótese é corroborada pelos resultados descritos na literatura sobre a nucleação e estabilização de pontos quânticos de CdS com tamanhos muito semelhantes sintetizados utilizando quitosana e *N*-palmitoilquitosana como ligantes em meio aquoso. Ressalta-se que se trata de uma abordagem simplificada para o sistema, pois muitas outras interações também podem ser relevantes no processo dinâmico e complexo de sintetizar estruturas coloidais nano-híbridas. Várias interações hidrofílicas, hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio, impedimento estérico e conformações espaciais da macromolécula são esperadas em ocorrer com ligantes orgânicos como a quitosana e *N*-palmitoil quitosana como também as interações com as nanointerfaces dos nanocristais semicondutores inorgânicos. No entanto, uma investigação mais aprofundada do fenômeno e mecanismo de adsorção está fora do âmbito do presente estudo, pois seria necessária uma pesquisa adicional de todo o equilíbrio de forças envolvidas na interface do ponto quântico ligante/polímero (MANSUR & MANSUR, 2011; MANSUR *et al.*, 2011; NEL *et al.*, 2009)

5.2.1. Espectroscopia de fotoluminescência (PL)

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar as superfícies e interações com as nano-interfaces dos pontos quânticos em meio aquoso. O comportamento de PL dos pontos quânticos bioconjugados em meio aquoso coloidal reflete as contribuições gerais que ocorrem nos sistemas híbridos, que dependem principalmente do tamanho, da auto-organização, das cargas, da quantidade e química do estabilizante e do tipo de defeitos das partículas.

As imagens de fluorescência e espectros das nanopartículas de CdS estabilizadas com quitosana e *N*-palmitoilquitosana estão mostrados nas Figuras 5.19 (A) e 5.19 (B), respectivamente. A partir dos espectros PL pode ser visto que em ambos os sistemas de fluorescência ocorre a emissão verde centrada em 516 nm. As imagens de fotografias digitais tiradas para o bioconjugado em meio aquoso coloidal sob excitação ultravioleta (câmara escura, $\lambda = 245$ nm) também revelam claramente que a recombinação ocorre pela

emissão de luz verde. De acordo com a literatura, esta emissão verde é favorecida pela síntese das nanopartículas sob a condição de excesso de átomos do metal que entram na rede em sítios intersticiais (Cd_i) (LAKOWICZ *et al.*, 2002; SMYNTYNA *et al.*, 2007) ou atribui-se ao enxofre intersticial (S_i) formados pela dopagem do CdS pela substituição por ânions como o Cl, RAMSDEN *et al.*, 1984. A condição de excesso de cádmio é realizada no presente trabalho no qual a razão molar de $[Cd^{+2}]/[S^{2-}]$ foi igual a 2:1.

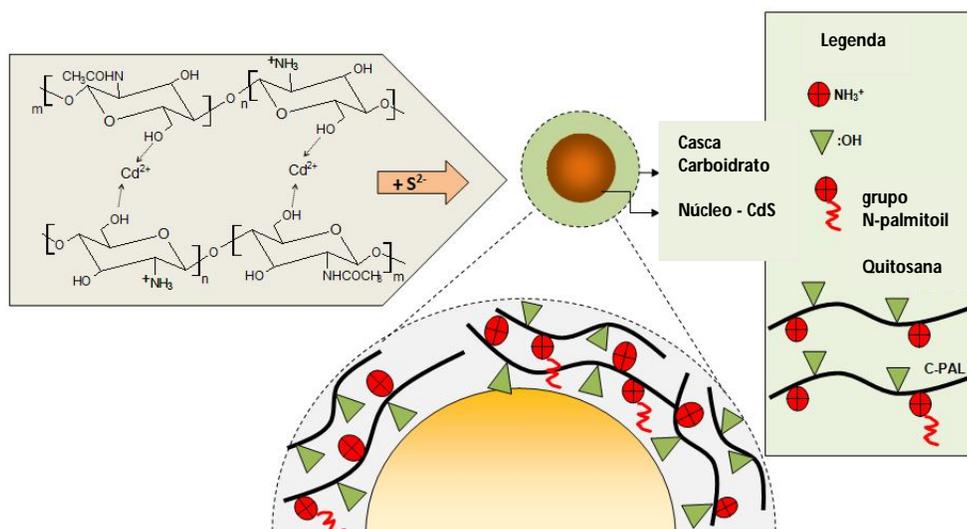


Figura 5.18. Representação esquemática do mecanismo de interação entre os pontos quânticos de CdS e os grupos químicos de cadeias poliméricas de quitosana e N-palmitoilquitosana.

A partir dos espectros PL também foi calculado o parâmetro de largura total a meio máximo (FWHM). Este parâmetro pode ser usado como índice de distribuição de tamanho (menor valor de FWHM é indicativo de uma distribuição de tamanho mais estreita). O parâmetro FWHM foi de 39 ± 2 nm e 45 ± 2 nm para CdS_CHI e CdS_C-PAL, respectivamente. Os resultados indicaram uma dispersão da distribuição do tamanho ligeiramente maior para os pontos quânticos estabilizados com o polímero N-palmitoilquitosana, como previamente sugerido pelos resultados das curvas de absorvância.

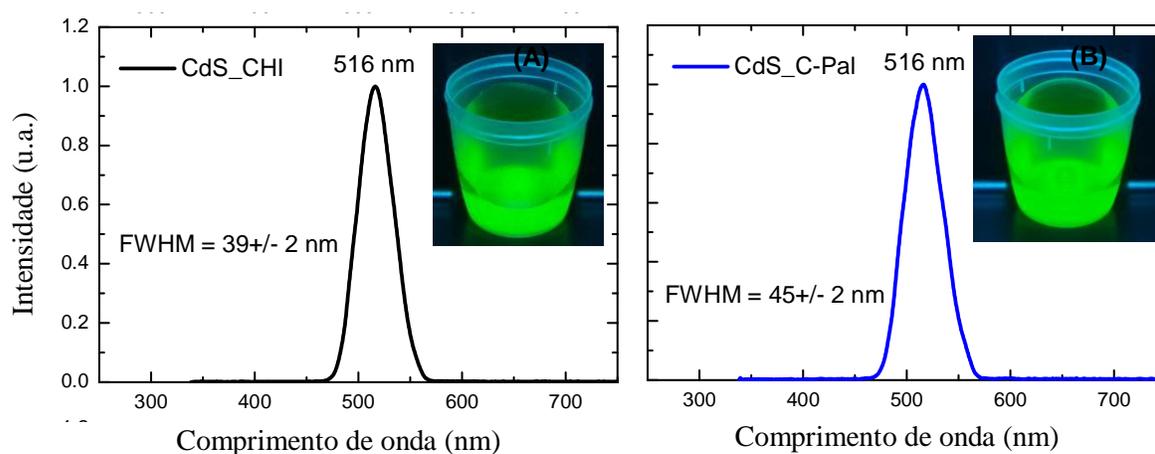


Figura 5.19. Espectros de PL obtidos para as amostras de (A) CdS_CHI e (B) CdS_C-Pal.

5.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Os pontos quânticos biofuncionalizados foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão para investigar as suas principais características morfológicas e estruturais. A Figura 5.20 mostra imagens obtidas para os pontos quânticos de CdS produzidos com quitosana (Figura 5.20 (A)) e C-Pal (Figura 5.20 (B)). Pode-se observar que ambos os sistemas têm nanopartículas com morfologia esférica, com tamanhos de cerca de 3-4 nm, e razoavelmente monodispersas, o que é coerente com os valores estimados pelas medidas de espectroscopia UV-vis descritas na seção anterior. O padrão de difração de elétrons dos pontos quânticos conjugados mostrou um parâmetro de rede comparável a estrutura cristalina wurtzita de CdS (desenho de esboço, inserção da Figura 5.20 (B)). Além disso, a análise química por espectroscopia de energia dispersiva (EDX), não mostrada, indicou Cd e S como os principais elementos químicos presentes nas amostras. Assim, os resultados obtidos por TEM mostraram que pontos quânticos de CdS foram produzidos e estabilizados por ligantes poliméricos a base de quitosana.

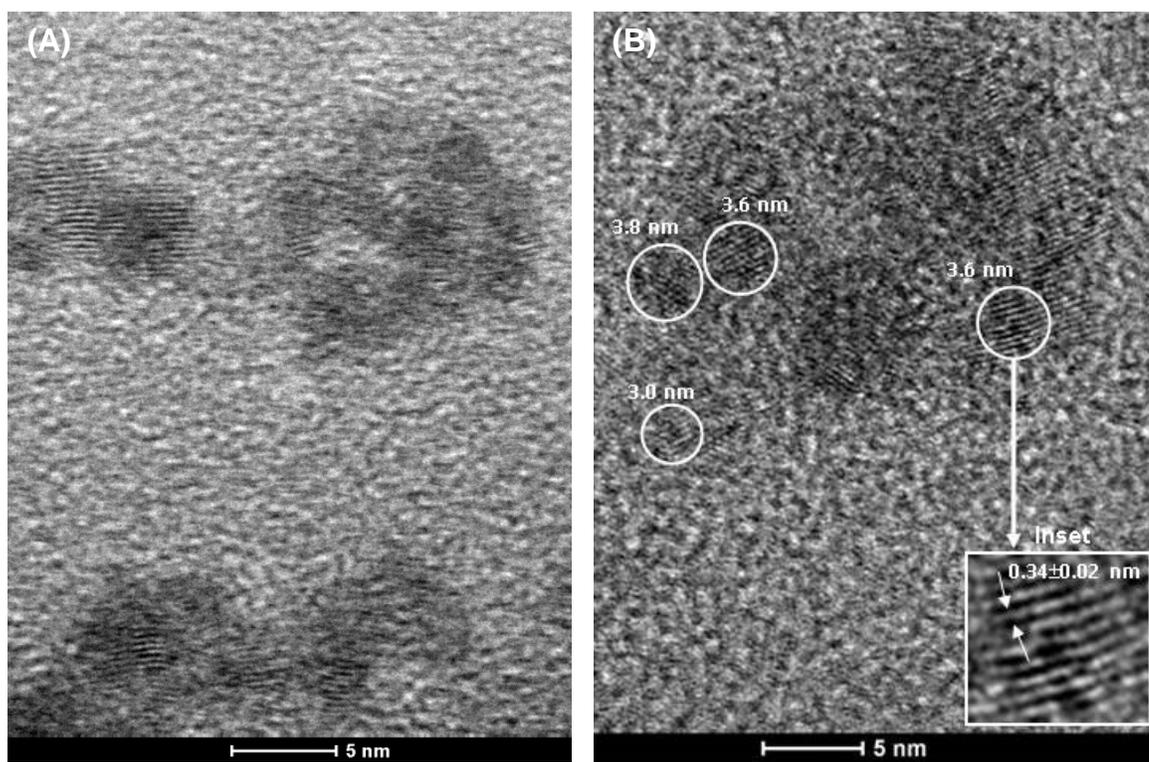


Figura 5.20. Imagem obtida por TEM para CdS_CHI (A) e CdS_C-Pal (B); (Detalhe: espaçamento do plano nanocristalino detalhado por difração de elétrons e desenho representativo).

5.2.3. Análise do espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O valor do tamanho médio em número das partículas de CdS_CHI e CdS_C-Pal foi de $28,4 \pm 0,4$ nm e de $28,0 \pm 0,1$ nm, respectivamente, com um índice de polidispersão de 0,24 para ambos os sistemas. Este valor corresponde ao "diâmetro hidrodinâmico" (H_D) que é diferente do que os tamanhos das partículas semicondutoras primárias calculados a partir da curva de absorção de UV-vis e análise de TEM ($\sim 3,5$ nm). Isso pode ser atribuído às fatos dos pontos quânticos CdS ("núcleo") e quitosana/*N*-palmitoilquitosana ("casca" orgânica) e meio aquoso, são influenciados pelas camadas de solvatação, interações e restrições em ângulos de ligação e de rotação. Estas influências tornam os tamanhos das partículas em meio aquoso coloidal superiores em comparação aos tamanhos "geométricos" estimados

por TEM ou técnicas UV-vis, PONS *et al.*, (2006). A similaridade dos valores, apesar da presença de grupos palmitoil na quitosana pode ser esperada tendo considerando que os sistemas estão em mesmo pH. Mochalova *et al* (2007) relataram que um aumento de 160% da massa molecular da quitosana pela incorporação poli(acrilamida) na cadeia polimérica resultou em um aumento de apenas 15 % no diâmetro hidrodinâmico. Isto indica um efeito secundário do crescimento da cadeia lateral através do grupo amina sobre o diâmetro hidrodinâmico. No caso do presente trabalho, um aumento de 28 % da massa molecular pela inserção de grupos palmitoil no derivado de quitosana, em comparação com a quitosana pura, está associado com o grau de substituição atingido de 20 % (estimado através de FTIR). Nesse sentido, não seriam esperadas diferenças relevantes nos diâmetros hidrodinâmicos dos sistemas CdS_CHI e CdS_Pal quando um aumento na massa molar da cadeia polimérica foi de apenas 28 %.

5.2.4. Pontos quânticos biofuncionalizados para potenciais bioaplicações

Os novos sistemas bioativos fluorescentes desenvolvidos neste estudo podem ser utilizados em inúmeras aplicações biomédicas. Pode-se sugerir como uma aplicação potencial do sistema baseado na interação dos pontos quânticos conjugados com moléculas poliméricas modificadas com ácidos graxos (C-Pal) para aplicações na área de saúde e nutrição.

Devido às suas propriedades químicas e biológicas distintas, a quitosana e seus derivados, um biopolímero catiônico não-tóxico, oferece um grande potencial em aplicações farmacêuticas (CHIU *et al.*, 2010; DOWLING *et al.*, 2011). Uma aplicação relevante é como um suplemento dietético antilipidêmicos para ser utilizado para reduzir a obesidade/excesso de peso e para reduzir o colesterol. A eficiência da ligação da quitosana e seus derivados com lipídeos, no entanto, continua a ser discutível. Ele pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares e tem potente capacidade de ligação a gordura *in vitro* (LIM *et al.*, 2012; MAEZAKI *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2010). Do ponto de vista farmacêutico, a aplicação da quitosana na formulação de nanocarreadores de fármacos é pode ser importante para reduzir a toxicidade, a eficácia e aumentar a segurança da droga, ZHANG *et al.*, 2010. Por consequência, pode prever-se que a combinação de nanomateriais

fluorescentes, tais como QDs com um polímero anfifílico, tal como a quitosana e derivados com unidades hidrofóbicas e hidrofílicas em sua estrutura tem uma probabilidade muito promissora. Idealmente, a parte hidrofóbica do biopolímero anfifílico interage com os lípidos e outras moléculas solúveis de baixo de água por interações hidrofóbicas, enquanto que a parte hidrofílica fornece dispersibilidade em água e, simultaneamente, estabilidade química (JIANG *et al.*, 2006a). No presente estudo, foram sintetizados pontos quânticos de CdS luminescentes estabilizados por *N*-palmitoilquitosana, modificada hidrofobicamente. Estes bioconjugados solúveis em água podem ser sugeridos como suplementos dietéticos que combinam afinidade química com os lípidos e as suas propriedades luminescentes de seguimento e/ou detecção no trato digestivo. A bioaplicação hipotética idealizada para o sistema desenvolvido na presente pesquisa está representada esquematicamente na Figura 5.21 (desenho sem escala). Ressalta-se que não é recomendado como um tratamento de doenças, mas apenas como uma abordagem preliminar para utilizar os nanohíbridos produzidos nesta pesquisa. Sem dúvida, vários estudos devem ser realizados por pesquisadores, nutricionistas e cientistas e outros especialistas para a exploração do grande número de possibilidades, considerando as bioaplicações *in vitro* e *in vivo* dos novos sistemas fluorescentes bioativos introduzidos nesta pesquisa.

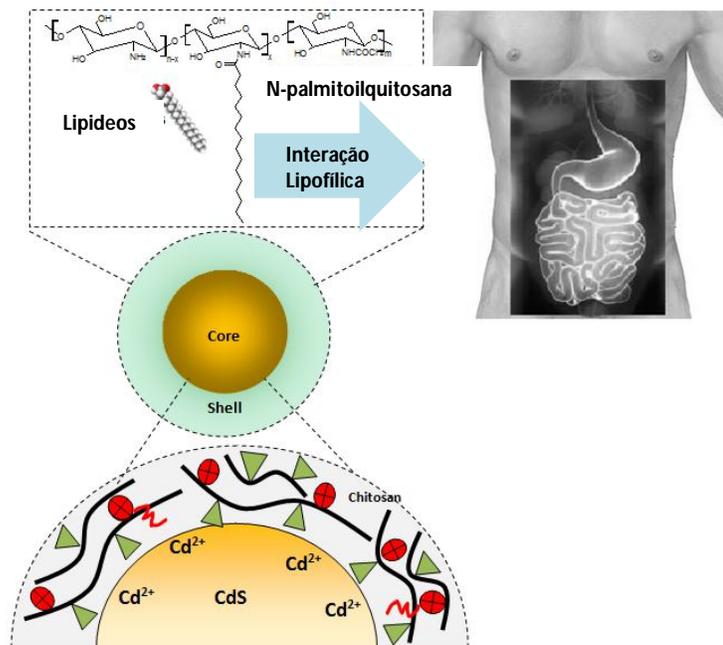


Figura 5.21. Pontos quânticos bioativos de CdS cobjugados com *N*-palmitoilquitosana projetados para potenciais bioaplicações que envolvem interações lipofílicas no trato digestivo.

5.3. Síntese e caracterização da TMC modificada com ácidos graxos

A formação da ligação química entre os cloretos ácidos pentanoico e decanoico foi realizada pelo ataque nucleofílico dos grupos amino presentes na cadeia polimérica do TMC ao carbono do grupo acílico. Na reação ocorre a formação de ácido clorídrico, pelo que esta deve ser conduzida a pH superior a 7 para ocorrer a formação do TMC *N*-acilado e não ocorrer a *O*-acilação (SOLOMONS & FRYHLE, 2011; TIEN *et al.*, 2003). Os produtos da reação solúveis em água foram removidos por diálise e o cloreto de acila residual foi removido por sucessivas lavagens com etanol.

Na reação de modificação do TMC com grupos estearil, o ácido esteárico, ativado com grupos NHS (*N*-hidroxisuccinimida) é reativo com as aminas presentes no TMC e formação da ligação amida com eliminação do NHS (removido por diálise).

Na Figura 5.22, está representado um esquema da reação do TMC com os ácidos graxos.

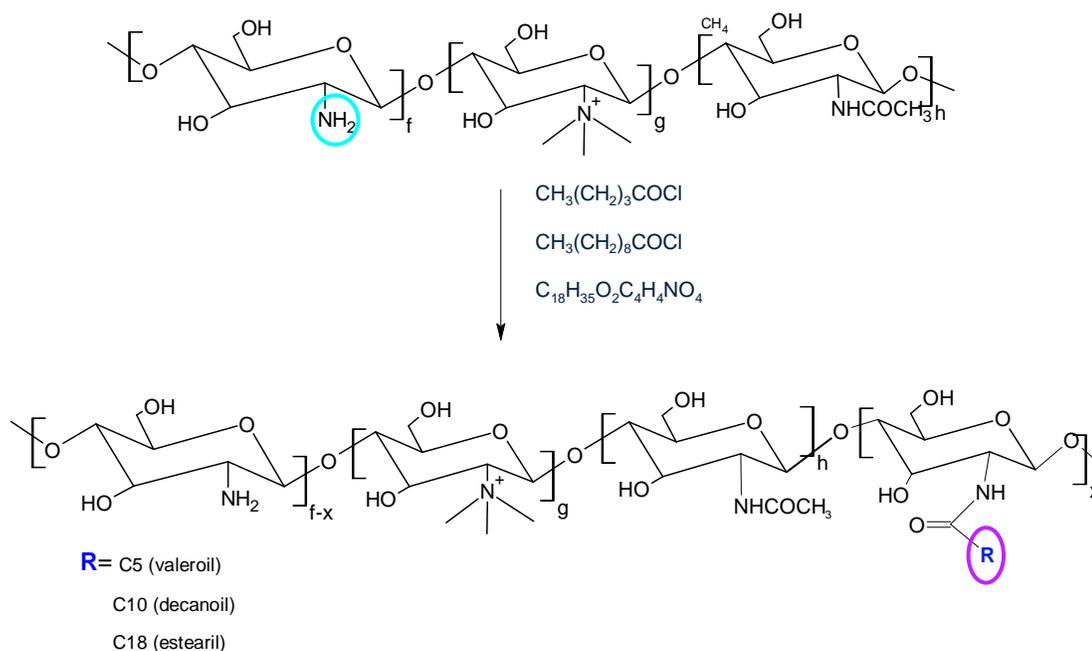


Figura 5.22. Representação da reação de modificação química da TMC com ácidos graxos.

O acoplamento dos ácidos graxos pela formação da ligação amida no TMC foi confirmada por ^1H NMR. Os espectros de ^1H NMR obtidos para o TMC₄₃ e para os TMCs modificados com ácidos graxos estão representados na Figura 5.23.

O grau de quaternização (DQ) da TMC indica o percentual de grupos aminos que foram metilados por grupos amônio quaternários. O DQ para o TMC foi recalculado utilizando ^1H NMR segundo MOURYA *et al.* (2009) como mostrado na Equação 5.3, onde DQ% é o percentual de quaternização e $[(\text{CH}_3)_3]$ é a integral do grupos amino trimetilados (amônio quaternário) na região de 3,1–3,4 ppm e [H] refere-se a integral dos picos do hidrogênio observados na região compreendida entre 4,7 and 5,7 ppm no espectro ^1H -NMR.

$$DQ\% = \left[\frac{[(\text{CH}_3)_3]}{[H]} \times \frac{1}{9} \right] \times 100 \quad \text{Equação 5.3}$$

Após os cálculos foi encontrado um valor de grau de quaternização de 30,1%, valor este coerente com o valor informado pelo fornecedor do polímero (Kitozyme[®]).

No espectro obtido para o TMC, o pico a aproximadamente 2 ppm revela os prótons N-acetil de *N*-acetil-D-glucosamina do grupo acetamida, 2,5-3,1 ppm estão dos prótons metílicos dos grupos *N,N*-dimetilados e em 3,3-3,5 ppm os hidrogênios metílicos dos grupos *N,N,N*-trimetilados (MOURYA *et al.*, 2009; SIEVAL *et al.*, 1998).

Para os TMCs modificados com ácidos graxos, além dos picos mencionados anteriormente ainda são verificados dois novos picos referentes às cadeias carbônicas saturadas inseridas na cadeia polimérica do TMC. Os novos picos a 0,8 e 1,25 ppm são atribuídos CH₃ e o CH₂ do ácido graxo, respectivamente (LAYEK & SINGH, 2012). O grau de substituição de ácidos graxos (GS) na cadeia polimérica do TMC foi calculado pela razão entre a integral do pico em 0,8 ppm (CH₃ - ácido graxo) e a integral do pico 2-2,2 ppm (CH₃ - acetamida TMC), multiplicados pelo grau de acetilação do TMC (GA= 0,11), Equação 5.4. Esse método de cálculo para o grau de substituição foi proposto de acordo com outras análises de modificação química da TMC por ¹H NMR (MOURYA *et al.*, 2009; SIEVAL *et al.*, 1998), escolhendo um pico (acetamida) que não sofre modificação após a reação de funcionalização com ácidos graxos e outro pico observado apenas no espectro dos polímeros modificados (CH₃ - ácido graxo).

$$GS (\%) = \left[\frac{\int CH_3 (0.8 \text{ a } 0.9ppm)_{\text{Ácido Graxo}}}{\int CH_3 (2 \text{ a } 2.2ppm)_{TMC}} \right] \times 0,111 \times 100 \quad \text{Equação 5.4}$$

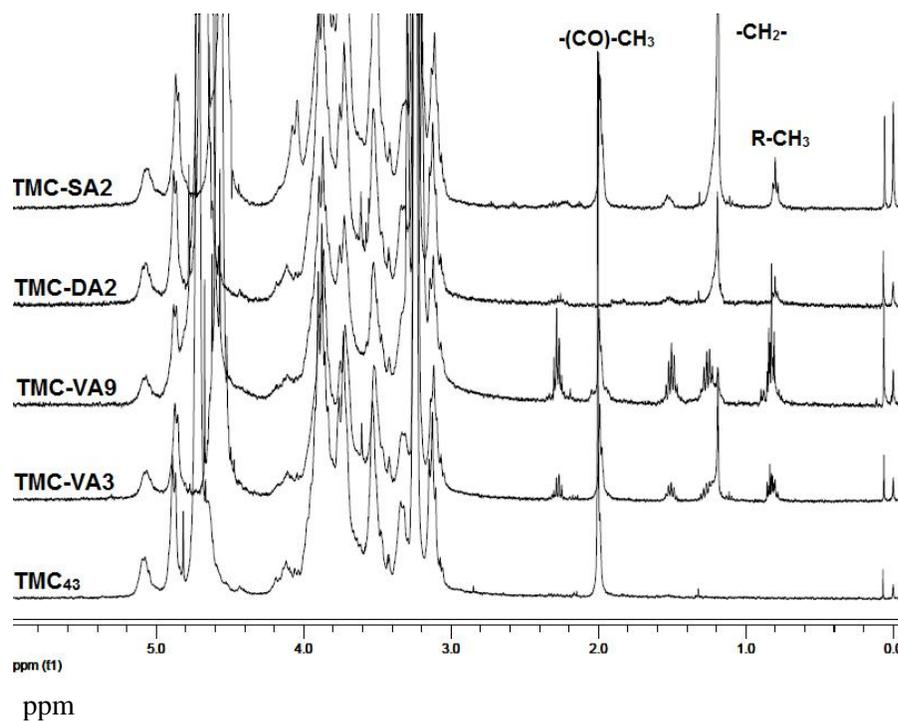


Figura 5.23. Espectros ^1H NMR obtidos para as amostras de TMC sem modificação e modificados com ácidos graxos.

Foram sintetizados os seguintes quatro TMCs modificados cujo grau de substituição (SD) se apresenta na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Graus de substituição determinados por ^1H NMR obtidos para as amostras de TMCs modificadas

Amostra	Ácido Graxo	SD(%)
TMC-VA3	Pentanoil (C5)	(3,8±0,3)%
TMC-VA9	Pentanoil (C5)	(9,1±1,8)%
TMC-DA2	Decanoil (C10)	(1,7±0,1)%
TMC-SA2	Estearil (C18)	(2,1±0,6)%

O espectro FTIR obtido para o TMC₄₃, figura 5.24A (a), apresenta um amplo pico de absorção em 3435 cm⁻¹, que está associado ao estiramento da ligação N-H, a ligação de hidrogênio e ao estiramento do grupo O-H. Para as bandas referentes ao estiramento da ligação C-H dos grupos metílicos do TMC, o pico de 2920 cm⁻¹ corresponde à vibração assimétrica e o pico de 2879 cm⁻¹ (com maior intensidade) à vibração simétrica. Além disso, para a banda característica da deformação angular do CH₂ (tesoura) é observado o pico em 1423 cm⁻¹. Os picos de 1321 cm⁻¹, 1260 cm⁻¹ e 1380 cm⁻¹ correspondem às fortes vibrações de dobramento da ligação N-H primária, secundária e terciária, respectivamente. As vibrações fora do plano da ligação C-H correspondente à estrutura sacarídea aparecem em 1154 cm⁻¹ e 896 cm⁻¹, COSTA *et al*, 2009.

Os espectros FTIR obtidos para as amostras de TMCs modificados estão mostrados na Figura 5.24 (A) (b), (c), (d) e (e). Nos espectros são observadas as bandas referentes ao estiramento dos grupos O-H em 3300 a 2500 cm⁻¹ e as bandas de estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH₂ presente na cadeia carbônica saturada, 2918 e 2852 cm⁻¹, respectivamente. Observa-se a banda de absorção em 1660 cm⁻¹ referente ao estiramento do grupo carbonílico (C=O) da amida e também a banda referente a deformação da ligação N-H da amida II (1555 cm⁻¹), MOURYA *et al*, 2009.

A modificação química do TMC pode ser confirmada por FTIR, após as reações de funcionalização, a banda de absorção correspondente aos grupos amina primários (1570-1590 cm⁻¹) não é aparente e a banda de absorção a 1555 cm⁻¹, associada com a formação de novas ligações de amida devido a acilação do TMC aumenta. Esta mesma tendência foi observada para as bandas de estiramento do grupo C-H em 2918 cm⁻¹ e 2848 cm⁻¹ relacionadas com as cadeias acílicas. A Figura 5.24 (B) mostra a evolução da banda da amida II (1555 cm⁻¹) e ν C - H (2918 cm⁻¹) utilizando a banda de estiramento C-O a 1070 cm⁻¹ (estrutura sacarídea) como a banda de referência interna, percebe-se a confirmação da presença de cadeias acílicas na TMC porque ocorre o aumento da intensidade da banda referente ao estiramento axial aos grupos C-H presentes no ácido graxo e também o aumento na intensidade da banda referente à deformação do grupo amida inserido na cadeia polimérica após a reação de acilação (SANTOS *et al.*, 2013).

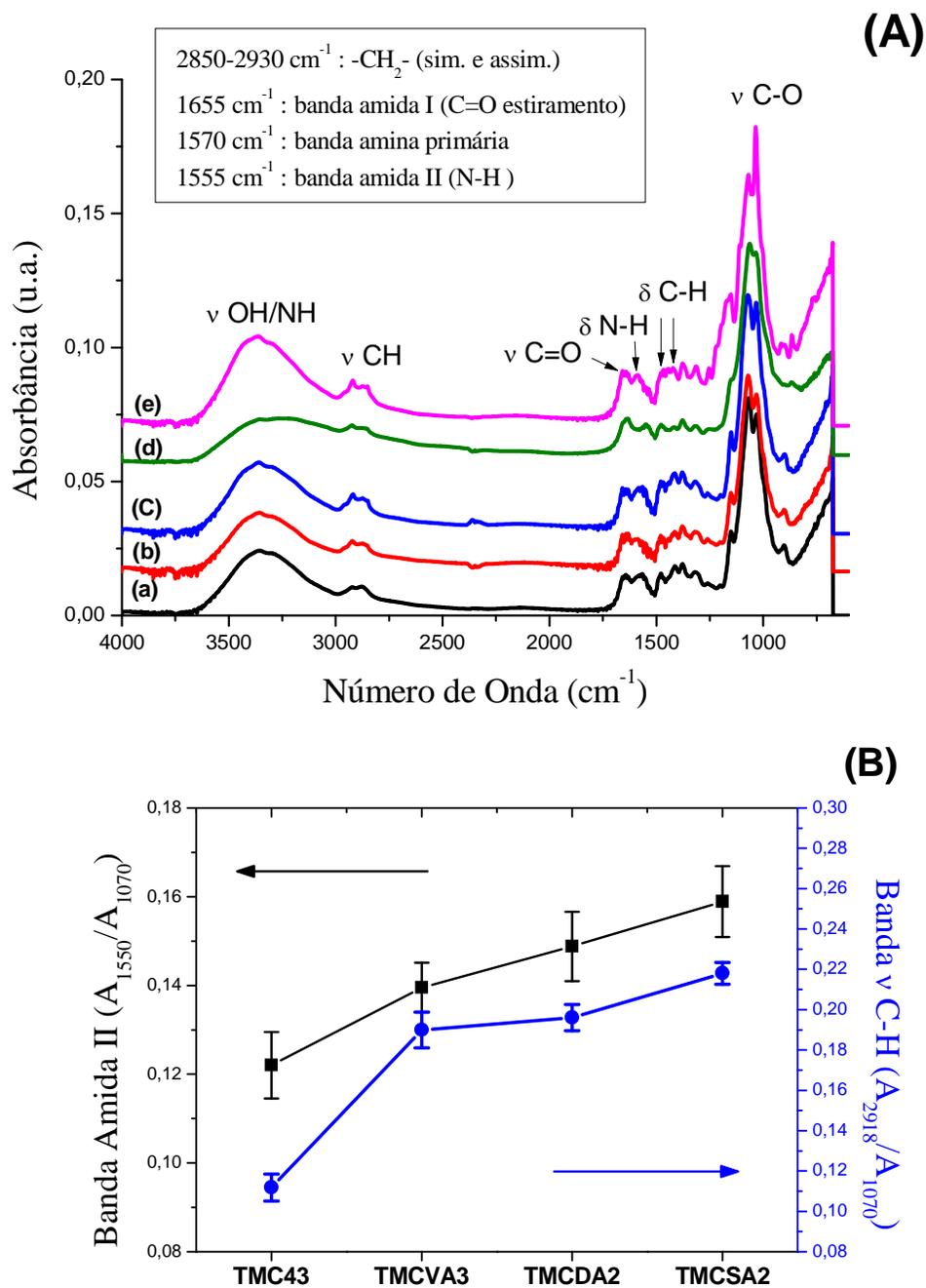


Figura 5.24. (A) Espectros FTIR obtidos para as amostras de TMC modificadas e não modificada. (a) TMC₄₃, (b) TMC-VA3 (c) TMC-VA9, (d) TMC-DA2 e (e) TMC-SA2. (B) Evolução das bandas Amida II e da banda referente ao estiramento do grupo C-H para as TMCs modificadas e não modificada.

Foi escolhida a quitosana com massa molar média de 43300 g/mol para modificação química e posterior formação de complexos com oligonucleotídeos, este tamanho de cadeia polimérico é relatado na literatura como adequado para a formulação de nanopartículas com ácidos nucleicos (LAYEK *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2009). A massa molar do polímero não afeta somente as propriedades físico-químicas e características morfológicas das nanopartículas como também afeta a atividade biológica destas últimas (LAYEK *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2013). O tamanho das cadeias poliméricas deve ser apropriado para proteger o oligonucleotídeo de cadeia simples (ON) antes da internalização celular, mas não ser demasiado elevada de forma a diminuir a libertação deste no interior da célula. Apesar de ser difícil definir um valor ótimo de peso molecular com base no que foi reportado até ao presente, é relatado na literatura que quitosana de baixa massa molar (entre 10.000 e 80.000 g/mol) apresentam resultados melhores em termos da estabilidade das nanopartículas e sua atividade biológica (LAYEK *et al.*, 2012; RAGELLE *et al.*, 2013). Outro fator importante a ter em conta na formulação de nanopartículas é o grau de desacetilação (DD) da quitosana, sendo que quanto maior o grau de desacetilação maior será o número de cargas positivas, sendo também relatado que um DD valor alto (> 80%) é mais adequado para interação com ácidos nucleicos (RAGELLE *et al.*, 2013).

5.4. Preparação e caracterização dos complexos TMC/ON

5.4.1. Preparação das soluções de TMCs

O protocolo colorimétrico utilizando o *Cibacron red* é uma maneira rápida e simples de determinar a concentração de soluções aquosas de quitosana. Os grupos protonados da quitosana atuam como sítios catiônicos para interagir estequiometricamente com grupos aniônicos (grupos sulfônicos) presentes na molécula de *Cibacron Red* promovendo a formação de uma banda de absorção em 575 nm (MUZZARELLI, 1998). Portanto, foram construídas curvas padrão para cada amostra antes da filtração e a concentração de cada amostra foi calculada pela interpolação dos valores de absorvância obtidos na curva padrão.

A Figura 5.25 apresenta um exemplo de uma curva padrão obtida para uma solução de TMC₄₃.

A absorvância média obtida para a solução de TMC₄₃ diluída 3 vezes, foi de 0,229 nm. Então, interpolando com os valores obtidos pela curva padrão o ensaio Cibacron, o valor calculado da concentração final da solução de TMC₄₃ após a filtração foi de 0,27 % p/v.

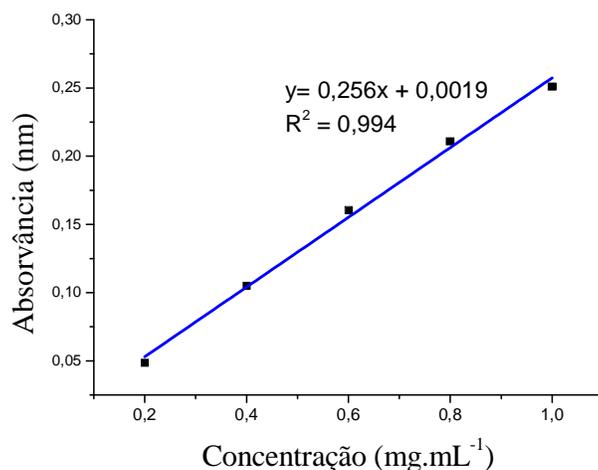


Figura 5.25. Curva padrão obtida para a amostra de TMC₄₃ após o ensaio de Cibacron.

A Figura 5.26 apresenta a curva padrão obtida para a amostra de TMC-SA2. A absorvância média obtida para a solução de TMC-SA2 diluída 3 vezes, foi de 0,146 nm. Então, interpolando com os valores obtidos pela curva padrão o ensaio Cibacron, o valor calculado da concentração final da solução de TMC-SA2 após a filtração foi de 0,25% p/v.

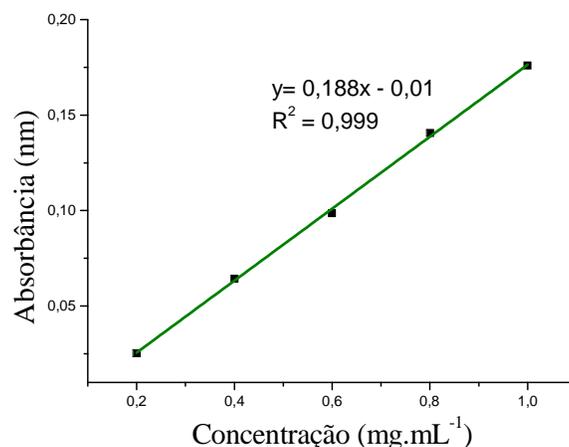


Figura 5.26. Curva padrão obtida para a amostra de TMC-SA2 após o ensaio de Cibacron.

5.4.2. Determinação da Concentração de Agregação Crítica dos TMCs modificados

O estudo da agregação de polímeros é considerado importante porque este fenômeno pode afetar a atividade biológica de TMCs e seus derivados. O comportamento de agregação dos TMCs modificados com ácidos graxos em meio aquoso foi monitorado por fluorometria usando pireno como sonda fluorescente, PHILIPPOVA & KORCHAGINA (2012).

Quando o pireno coexiste com micelas poliméricas aquosas ou outros microdomínios hidrofóbicos, o pireno organiza-se preferencialmente perto ou dentro destes microdomínios e emite fortemente (JO *et al.*, 1998). Quando o pireno coexiste com os agregados de TMCs ocorre um aumento da intensidade de emissão e, principalmente, a terceira maior faixa vibracional I_3 (383 nm) aumenta abruptamente em certa concentração de polímero. Esta concentração é chamada de concentração de agregação crítica (CAC) e é a concentração de auto-agregação de sistemas poliméricos anfífilos.

Os valores CAC foram determinados pela medição da razão das intensidades de I_1 (372 nm) e I_3 (383 nm). As alterações das razões de intensidade (I_1/I_3) das soluções dos agregados dos TMCs modificados e não modificados estão mostradas na figura 5.27. Para todas as amostras de TMCs, em baixas concentrações poliméricas, valores I_1/I_3

permanecem quase inalterados. Com o aumento da concentração, os valores da razão I_1/I_3 começam diminuir com a adição de compostos poliméricos anfifílicos acima da CAC. Os valores CAC foram determinados pela interseção entre as duas regiões lineares. Os valores de CAC são mais comumente utilizados para avaliar a estabilidade termodinâmica das micelas poliméricas em soluções aquosas. Os valores de CAC encontrados para os TMCs e para os TMCs modificados com ácidos graxos são menores que os valores de surfactantes de baixa massa molar, por exemplo 0,52 mg/mL para brometo de cetil trimetil amônio (JIANG *et al.*, 2006a; JIANG *et al.*, 2006b), indicando a estabilidade dos agregados poliméricos em condições diluídas. Esses baixos valores de CAC obtidos indicam que baixas concentrações de polímero podem formar auto-agregados e manter sua estabilidade em condições diluídas.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de CAC obtidos para os diversos derivados de quitosana, com exceção do TMC-SA2 possivelmente devido pequena variação no grau de modificação química dos TMCs. Aumentando o comprimento da cadeia do ácido graxo inserido na TMC os valores obtidos para a CAC aumentaram, Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Concentração de agregação crítica obtida para os diferentes TMCs

Amostra	CAC (mg.mL ⁻¹)	% de variação em relação ao TMC ₄₃
TMC ₄₃	0,210	-
TMC-VA3	0,220	4,8
TMC-VA9	0,259	23
TMC-DA2	0,199	5,2
TMC-SA2	0,329	57

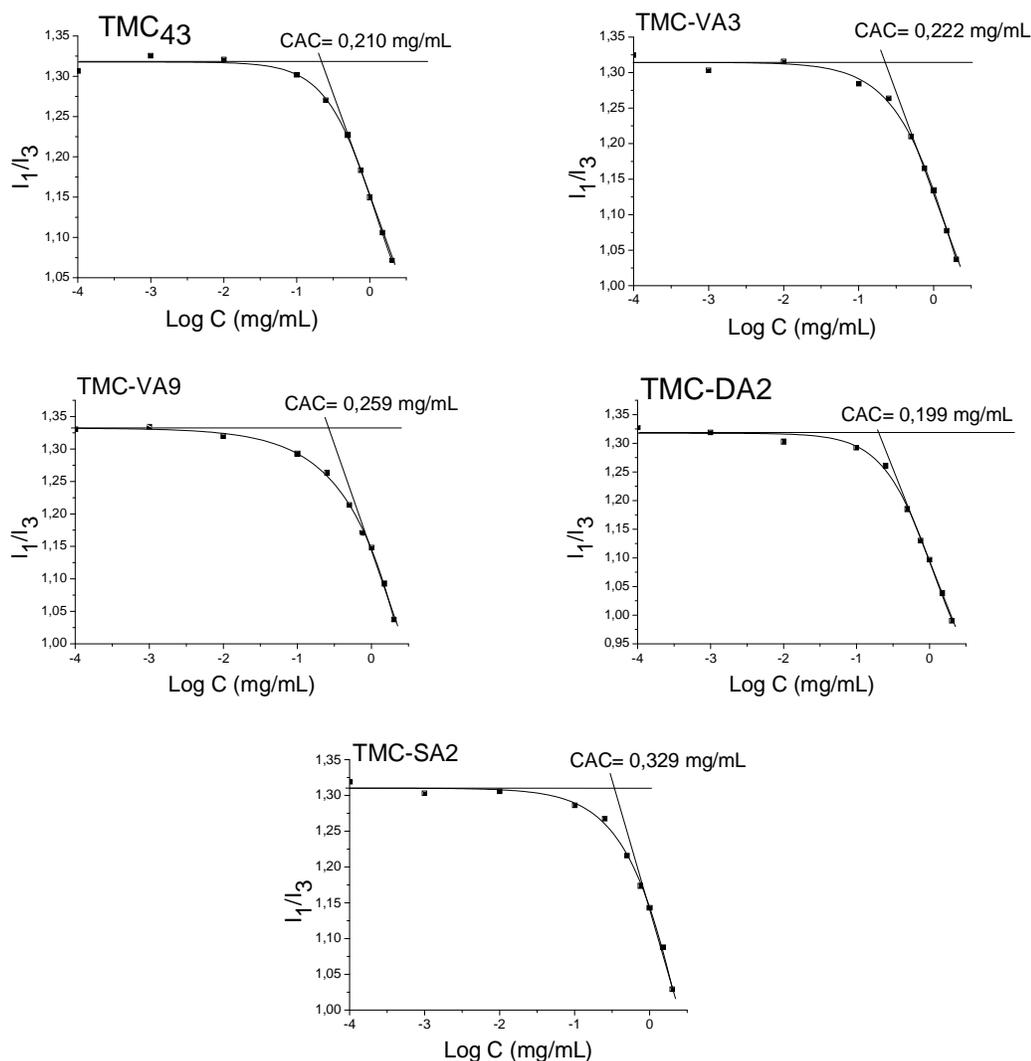


Figura 5.27. Razão entre as intensidades (I_1/I_3) para as amostras de TMCs modificados em solução 20 mM HEPES (pH 7,40) em função da concentração.

O efeito da quantidade de substituintes hidrofóbicos sobre a agregação da quitosana modificada hidrofobicamente (com grupos caproil, octanoil, miristoil e palmitoil) contendo diferentes grupos foi investigado na literatura PHILIPPOVA & KORCHAGINA (2012). De um modo geral verificou-se que os raios dos agregados e a CAC dos mesmos diminuem à medida que o conteúdo de substituintes hidrofóbicos aumenta. No entanto, para os derivados de *N*-octil-*N*-trimetilquitosana o diâmetro dos agregados aumentou com um aumento na densidade de enxertia de substituintes hidrofóbicos no polímero. Sugerindo que

os mecanismos envolvidos nos comportamentos durante a formação de micelas de derivados de quitosana *N*-octil-*N*-trimetil são complicados e diferentes daqueles observados para a quitosana não quaternizada (JO *et al.*, 1998). Os resultado obtido no o presente estudo, no qual a CAC obtida para a TMC-SA2 foi maior do que as CACs obtidas para as outras TMCs modificadas está em conformidade com o resultado encontrado na literatura para a *N*-octil-*N*-trimetilquitosana.

Uma explicação possível para este resultado obtido pode ser, no caso da TMC que tem na sua estrutura polimérica preenchida com cargas positivas permanentes o que não ocorre com a quitosana não quaternizada, há uma repulsão entre grupos carregados provocando um aumento de volume da cadeia polimérica. A presença de cadeias hidrofóbicas diminui a possível repulsão entre os grupos amino quaternizados, modificando a conformação do polímero, permitindo a solubilização de mais cadeias poliméricas nos agregados provocando o aumento da CAC, Tabela 5.6.

5.4.3. *Preparação e caracterização dos políplexos TMC/ON*

Após a filtração e quantificação das concentrações das soluções de TMC₄₃ e TMCs modificados foram preparados os complexos entre os polímeros e oligonucleotídeo.

Para otimizar as condições de preparação dos complexos, foi primeiramente estudado o efeito da presença de sal (NaCl ou Na₂SO₄) no processo de complexação sobre o tamanho das nanopartículas formadas e o índice de polidispersão (Pdi) do sistema. Foram estudadas adições de NaCl e Na₂SO₄ em diferentes concentrações para amostras de complexos de TMC-SA2 na razão N/P 40, Figura 5.28.

O efeito da adição do sal, bem como do tipo de sal (NaCl ou Na₂SO₄), revelou ser um fator relevante para a formação dos complexos. Sugere-se que sem a adição de sal, a estrutura polimérica do TMC-SA2 adota uma conformação estendida devido à repulsão intramolecular dos grupos catiônicos presentes em sua estrutura, por isso o tamanho da partícula e o Pdi da solução na ausência de sal é bem maior do que na presença de sal.

Porém, com a adição de sal, a repulsão eletrostática entre os grupos catiônicos é diminuída promovendo maior compactação da nanopartícula.

O efeito do tipo de sal também é relevante, em sulfato de sódio o tamanho da nanopartícula é ainda menor do que em cloreto de sódio, o que pode ser explicado por um efeito *crosslinking* entre os grupos $-NH_2$ da cadeia polimérica e os íons SO_4^{2-} (AL-REMAWI, 2012).

Os valores de Pdi obtidos representam a estabilidade termodinâmica do sistema sendo que os sistemas nanoparticulados são considerados estáveis para valores de Pdi inferiores a 0,3 (PHILIPPOVA & KORCHAGINA, 2012). Considerando os resultados obtidos, foi escolhida a condição de adição de 50 mM de Na_2SO_4 (concentração de sódio próxima à concentração fisiológica) para a preparação dos poliplexos TMC/ON.

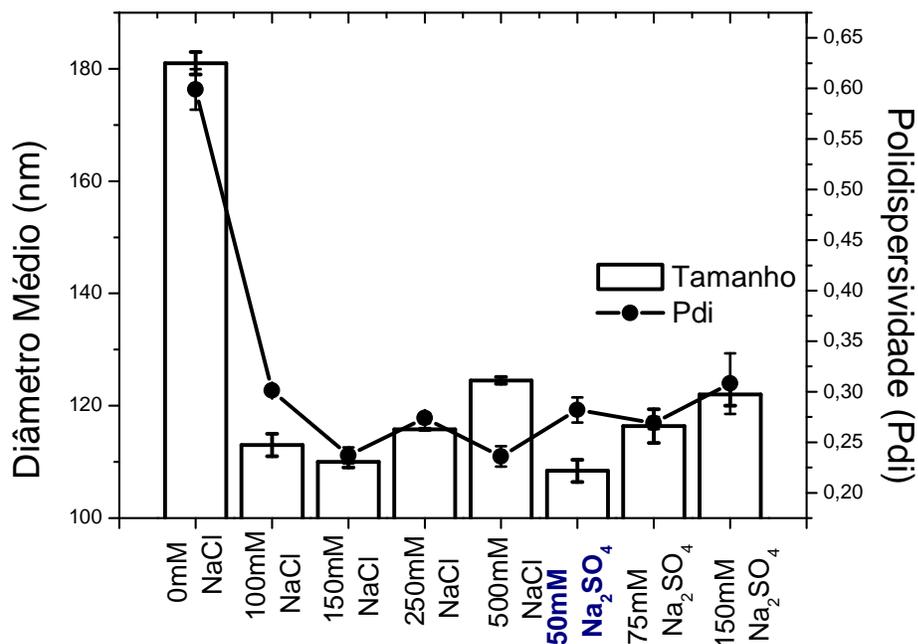


Figura 5.28. Estudo do efeito da adição de sal na formação dos complexos TMC-SA2/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4.

5.4.3.1. Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos políplexos preparados

Para a entrega de ácidos nucleicos com os polímeros catiônicos, o tamanho da partícula é uma das propriedades mais importantes. Geralmente, as partículas de tamanho nanométrico são mais fáceis de serem internalizadas no interior das células do que as partículas microscópicas (GAO *et al.*, 2011). Os diâmetros hidrodinâmicos dos políplexos preparados com as amostras de TMCs (TMC/ON) foram determinados por DLS. O tamanho dos políplexos TMC/ON, de uma maneira geral, mostrou ser dependente das razões N/P, também dependente do grau de substituição de ácido graxo e da cadeia acídica presente na cadeia polimérica (Figura 5.29).

Os políplexos foram preparados em tampão de HEPES 20 mM a pH 7,4. Devido à carga positiva da TMC, este polímero pode condensar com o ON através de interações eletrostáticas para formar políplexos de escala nanométrica. Devido a interação entre as cadeias poliméricas modificadas hidrofobicamente há também uma forte tendência do polímero por si só agregar em meio aquoso, formando partículas de escala manométrica conforme foi mostrado no estudo anterior de concentração de agregação crítica (PHILIPPOVA & KORCHAGINA, 2012).

Em geral, o diâmetro médio dos políplexos foi de 680-90 nm, Figura 5.29, com um índice de polidispersão de 0,6-0,1, mostrado na Figura 5.30.

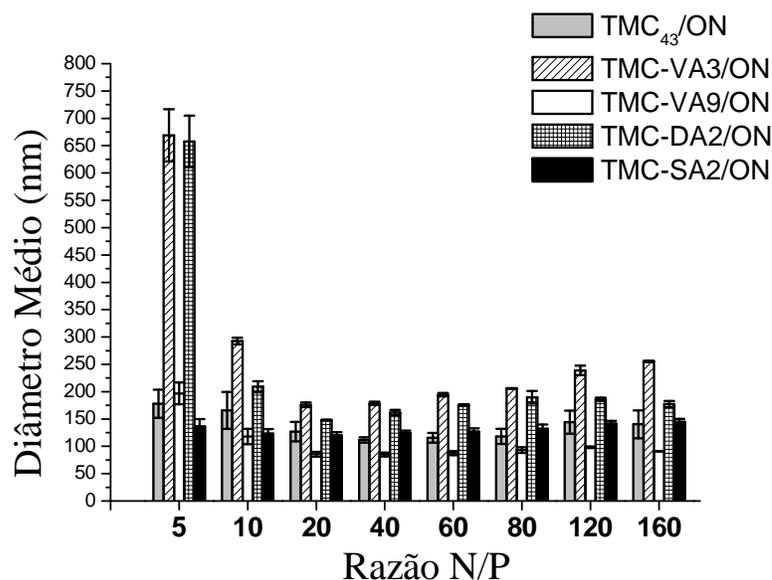


Figura 5.29. Diâmetro médio das nanopartículas obtidas para as amostras de TMC₄₃/ON TMCs modificados com cadeias hidrofóbicas/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4.

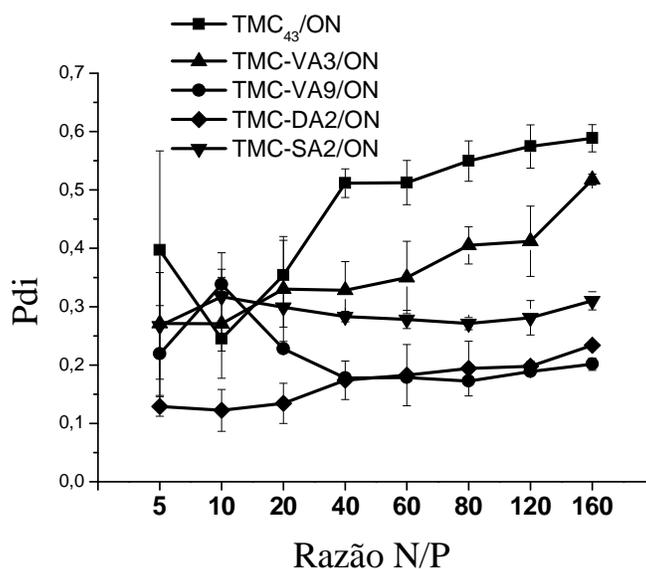


Figura 5.30. Índices de polidispersividades (Pdi) obtidos para nanopartículas de TMC₄₃/ON e TMC-SA/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glucose, pH 7,4.

Foi encontrado, de uma maneira geral, que os diâmetros dos políplexos praticamente não são alterados com um aumento da razão N/P de 10 a 160, possivelmente devido a uma condensação de oligonucleotídeo pelos grupos quaternários do polímero que não são alterados com a reação de *N*-acilação. Porém, para uma melhor análise dos resultados obtidos pelos ensaios de DLS, faz-se necessário uma separação dos políplexos preparados em relação a razão N/P, em relação ao tipo de derivado de TMC utilizado e também em relação aos diferentes graus de substituição de cadeias hidrofóbicas no polímero.

Considerando os políplexos preparados com os TMCs modificados com grupos valeroil TMCVA3/ON e TMCDA2/ON, Figura 5.31, com de substituição de grupos valeroil e decanoil, respectivamente, observou-se que eles apresentaram tamanhos a N/P 5 maiores e muito diferentes dos demais políplexos. Isso pode ser explicado pelo fato de que em baixas razões N/P, existe uma grande concentração de oligonucleotídeo em comparação com a concentração de polímero. Os grupos hidrofóbicos pentanoil (valeroil) e decanoil são curtos e não conseguem efetivamente formar estruturas micelares em solução, dificultando a interação com o oligonucleotídeo. A presença dos grupos pentanoil e decanoil pode gerar uma maior instabilidade nas interações polímero-polímero e polímero-ON modificando a conformação da cadeia polimérica, dificultando a interação com o ON e aumentando o tamanho do políplexo a baixas concentrações de polímero.

Os políplexos TMC-VA9/ON, TMC com maior percentual de modificação de grupos valeroil (cerca de 9 %), apresentaram menores diâmetros do que os outros políplexos preparados para as mesmas razões N/P, provavelmente devido maior interação das regiões hidrofóbicas do polímero com o oligonucleotídeo e pela menor repulsão entre os grupos hidrofóbicos presentes nas cadeias poliméricas. Certamente, existe uma contribuição nítida do grau de substituição sobre o comportamento em solução do TMC modificado com grupos valeroil. Os valores de Pdi obtidos para a amostra de políplexo TMC-VA3/ON foram superiores aos obtidos para a amostra de TMC-VA9/ON (solução monodispersa mesmo em altos N/P, Pdi inferior a 0,3) confirmando que a presença de uma maior concentração de grupos hidrofóbicos promove um aumento na interação do polímero com o

oligonucleotídeo, sugerindo mudanças na conformação da quitosana e aumentando a estabilidade dos agregados poliméricos.

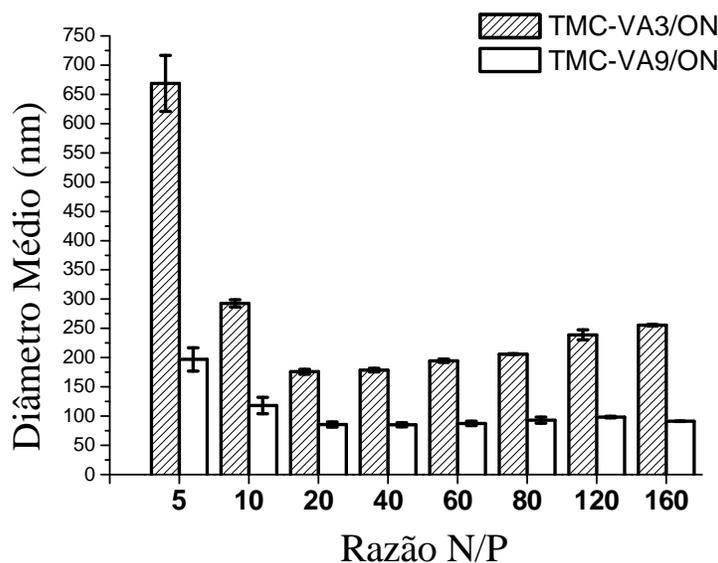


Figura 5.31. Diâmetro médio das nanopartículas obtidas para as amostras de TMC-VA3/ON e TMC-VA9/ON modificadas com grupos valerolil. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4.

Analisando o efeito da razão N/P sobre o diâmetro dos políplexos, Figura 5.32, pode-se observar que para o mesmo tipo de políplexo (mesmo TMC ou seu derivado) praticamente não é observado o efeito sobre o aumento do N/P sobre os diâmetros dos políplexos. Provavelmente, a altos N/P existe alta concentração de polímero e por consequência alta concentração de cargas positivas disponíveis no meio para interagir com o oligonucleotídeo. O que sugere que a altos N/P a interação que prevalece entre o ON e o polímero é a interação eletrostática comparada com as interações hidrofóbicas entre os TMCs modificados com ácidos graxo, não afetando significativamente o tamanho dos políplexos.

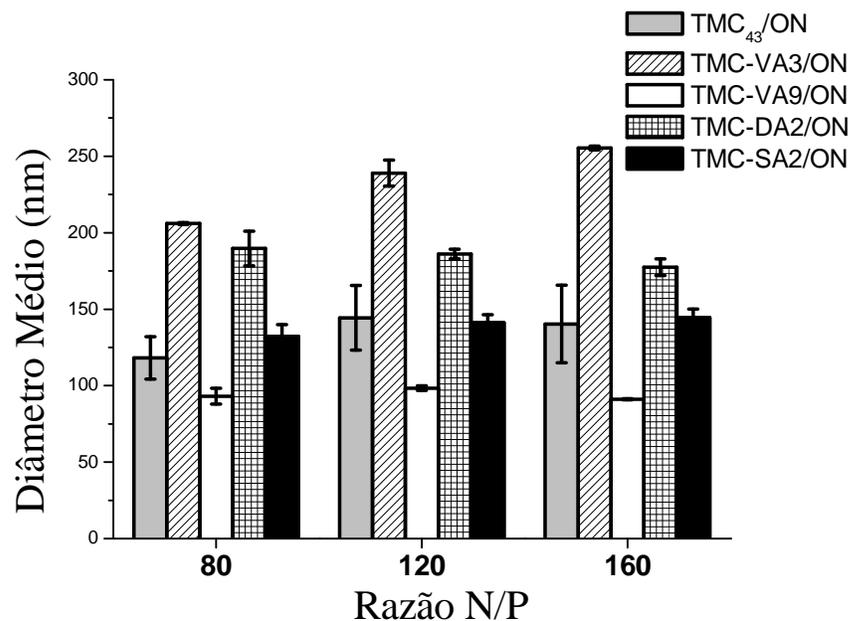


Figura 5.32. Diâmetro médio das nanopartículas obtidas para as amostras de TMC/ON em relação a altas razões N/P. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4.

Quando se compara os tamanhos dos políplexos preparados com TMC e TMC-SA2, praticamente não são observadas diferenças nos tamanhos das nanopartículas que possuem diâmetros na faixa de 150-180 nm. Possivelmente existe um balanço ideal de interações hidrofóbicas/eletrostáticas, onde o efeito da carga do polímero foi predominante nestes políplexos. O TMC-SA2, possui um percentual de cerca de 2% grupos estearil (18 átomos de carbono) em sua cadeia polimérica o que pode gerar mudanças na conformação do polímero, de modo a deixar os grupos quaternizados dispostos para fora (interagindo com o meio) e os grupos hidrofóbicos dispostos para dentro da estrutura interagindo com o oligonucleotídeo. Apesar de não apresentar mudanças no diâmetro hidrodinâmico, a amostra de políplexo TMC-SA2/ON apresentou menor Pdi em comparação com TMC₄₃/ON mostrando que existe mudança na agregação do polímero após a inserção de grupos estearil. Pequenas concentrações de grupos hidrofóbicos pode ter provocado melhor interação com o ON, sem modificar drasticamente o balanço de interações eletrostáticas.

A agregação da quitosana e seus derivados hidrofóbicos em soluções aquosas foi recentemente estudada, PHILIPPOVA E KORCHAGINA (2012), como um equilíbrio entre interações atrativas e repulsivas. Unidades de *N*-acetil-D-glucosamina são capazes de interagir umas com as outras e contribuir para as forças de atração e, por outro lado, a repulsão está relacionada com os grupos carregados positivamente. Um bom equilíbrio deste somatório de interações pode promover a formação de políplexos com diâmetros menores, mas a sobreposição de interações repulsivas em concentrações de polímeros mais altas (altas razões N/P) pode levar ao aumento do tamanho das partículas. Isto pode explicar o aparecimento de nanopartículas com tamanhos ligeiramente maiores com o aumento da relação N/P e também um aumento dos valores médios de Pdi.

Os resultados obtidos com as análises DLS indicam que a presença de grupos com maiores tamanhos de cadeia (grupos estearil) na estrutura da TMC promovem a formação de partículas com menores diâmetros e com polidispersividades menores e mais homogêneas. Isso porque a presença de um maior tamanho de cadeia acíclica pode gerar uma modificação na conformação do polímero diminuindo a repulsão gerada pelos grupos catiônicos (quaternizados) do TMC, e aumentando a interação com o ON via interações eletrostáticas e hidrofóbicas, promovendo a formação de partículas com menores tamanhos.

O potencial zeta é um indicativo da carga superficial e bem com das mudanças de carga superficial dos polímeros e dos políplexos preparados com o oligonucleotídeo. Uma carga superficial positiva possibilita a formação de interações eletrostáticas com as superfícies celulares carregadas negativamente, favorecendo a entrada dos políplexos nas células (GAO *et al.*, 2011). Na Tabela 5.7 estão mostrados os valores de potencial zeta obtidos para as amostras de políplexos preparados na razão N/P 80 e bem como das soluções poliméricas na ausência de ON.

Os potenciais zeta obtidos para as amostras de soluções poliméricas de TMC e TMCs modificados com ácidos graxos fora das condições de complexação (sem adição de Na_2SO_4) são muito próximos e em torno de 17 mV.

Os valores de potencial zeta obtidos para as amostras de políplexos decresceram bruscamente em relação aos valores obtidos para os polímeros puros. Esse resultado foi obtido por dois efeitos. Na formação dos políplexos é adicionado o sal Na_2SO_4 que atua com um agente de ligação cruzada física, estabilizando as cargas positivas do TMC. Além disso, a presença do oligonucleotídeo também promove uma maior interação com as cargas positivas do TMC diminuindo o potencial zeta da partícula resultante.

Tabela 5.7. Potenciais zeta obtidos para os polímeros TMCs em solução e para os políplexos TMC/ON N/P 80 (as soluções foram preparadas em tampão 20 mM HEPES + 5% m/v de Glicose, pH 7,40)

Polímero	Potencial Zeta (mV)	
	Livre	Políplexos (N/P 80)
TMC₄₃	16,0 ± 2,0	6,7 ± 1,0
TMC-VA3	15,4 ± 1,3	11,6 ± 1,8
TMC-VA9	17,5 ± 2,0	12,0 ± 1,2
TMC-DA2	16,6 ± 3,9	10,4 ± 0,7
TMC-SA2	18,0 ± 1,0	8,9 ± 1,5

Na Figura 5.33, pode-se observar um gráfico comparativo para os potenciais zeta obtidos para as amostras de políplexos e polímeros. Pode-se observar um real deslocamento/aumento (δ_1 e δ_2) do potencial zeta para as amostras de políplexos preparados com diferentes derivados de TMC em relação ao TMC não modificado. Observa-se nitidamente o efeito da presença de grupos hidrofóbicos na carga superficial das partículas, sugerindo que existe um balanço de interações eletrostáticas/hidrofóbicas. Uma explicação proposta seria que com a presença dos grupos hidrofóbicos de tamanhos diferentes a cadeia polimérica tende a se conformar de modo a orientar os grupos hidrofóbicos para dentro da estrutura interagindo com o oligonucleotídeo via forças eletrostáticas e via forças hidrofóbicas, Figura 5.34. Quando não há grupos hidrofóbicos, TMC₄₃ não modificado, o efeito e a interação entre o ON e o polímero é puramente eletrostático e, portanto, o potencial zeta do sistema é menor.

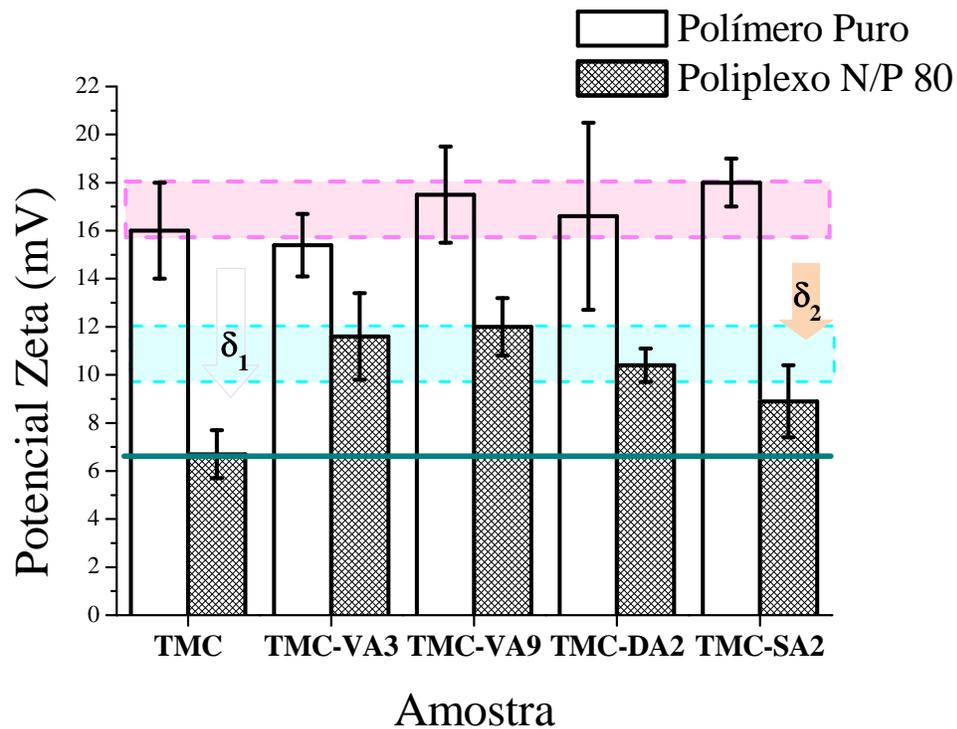


Figura 5.33. Comparação entre os potenciais zeta obtidos para as amostras de polímeros e poliplexos na razão N/P 80.

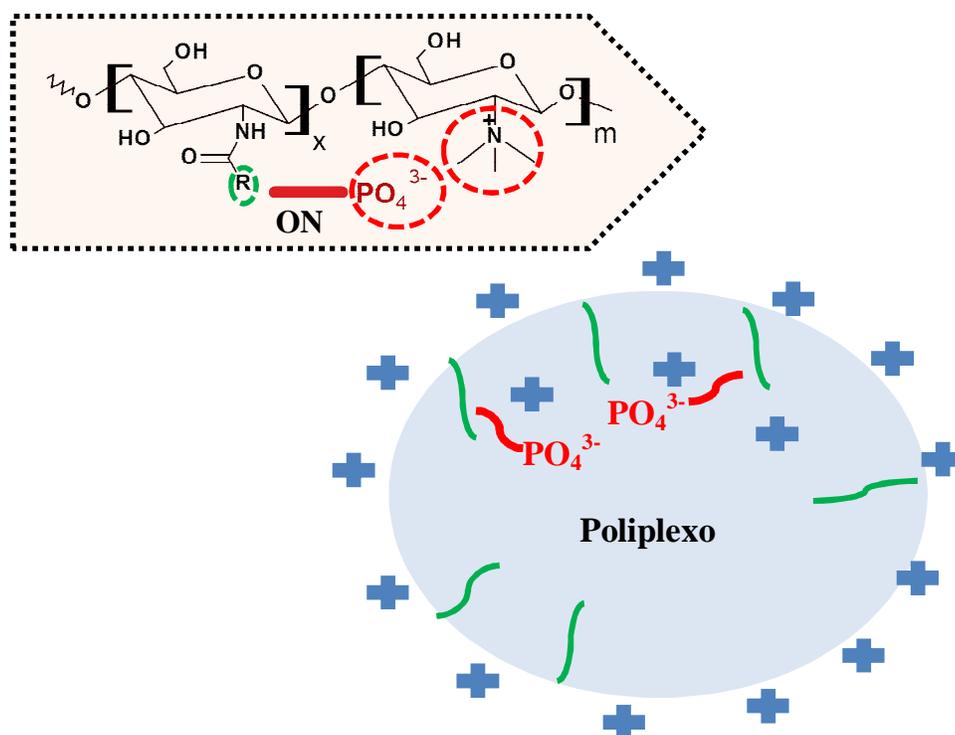


Figura 5.34. Esquema mostrando a estabilização de carga e variação do potencial zeta do polímero modificado com ácidos graxos com a adição do oligonucleotídeo e formação dos poliplexos.

5.4.3.2. Ensaio de retardação em gel de poliacrilamida

A capacidade do TMC₄₃ e dos TMCs modificados com ácidos graxos em condensar o ON foi avaliada por ensaio de retardação usando eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE). Nestes ensaios pode-se avaliar a força da interação entre o polímero e o ON, ou seja, se o ON é incapaz de se dissociar do polímero e, portanto, não ser detectado. Os resultados (Figura 5.35) mostram que, com o aumento da razão N/P a eficiência de retenção do ON foi aumentando gradualmente para ambos os complexos baseados em TMC₄₃ e TMCs modificados com ácidos graxos. Para a amostra de poliplexo TMC-SA2/ON, a retenção do oligonucleotídeo foi quase completa a partir da razão N/P 4, Figura 5.36, mostrando que a modificação química do TMC com grupos estearil promoveu uma melhor interação do polímero com o ON favorecendo a condensação deste na nanopartícula. Uma

vez que os complexos foram preparados em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose pH 7,4 e incubadas em PBS , estes resultados sugerem também que o TMC-SA2 é capaz de formar políplexos estáveis com ON a concentrações de sais fisiológicas. Os políplexos formulados com TMC-VA3, TMCVA9 e TMC-DA2 mostraram pior efeito na condensação do ON quando comparado com o TMC-SA2, o que indica que o tamanho da cadeia hidrofóbica é relevante para maximizar as interações com o ON.

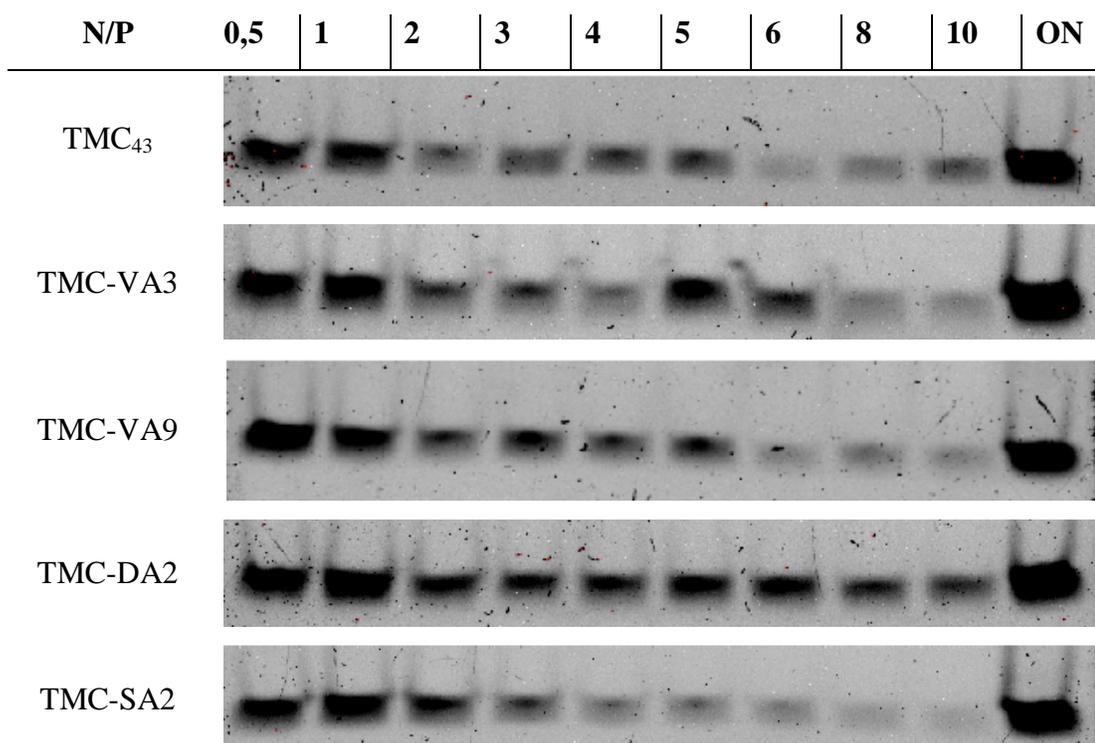


Figura 5.35. Efeito da razão N/P na capacidade de condensar o ON para as amostras de complexos TMC/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4.

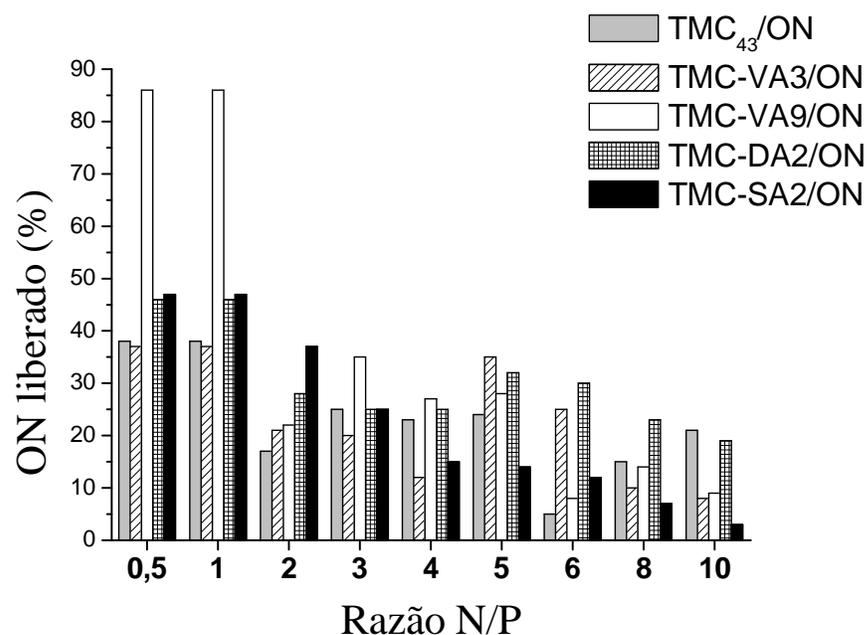


Figura 5.36. Efeito da razão N/P na liberação de ON para as amostras de complexos TMC/ON. As nanopartículas foram preparadas em solução tampão HEPES 20 mM + 5% p/v Glicose, pH 7,4.

5.4.4. Avaliação da estabilidade dos poliplexos

Para avaliação preliminar da estabilidade dos complexos em meio de cultura celular DMEM + 10% v/v FBS, os poliplexos foram preparados e depois diluídos 3 vezes no meio correspondente.

Na Figura 5.37 estão mostradas as curvas obtidas por DLS, em análises de diâmetro das nanopartículas em diferentes condições (sem diluição e diluídas em DMEM + 10% v/v FBS) para as amostras TMC₄₃/ON e TMCs modificados/ON na razão N/P 80.

Observa-se que os poliplexos preparados com TMC₄₃/ON, sem modificação química, são menos estáveis dos que os mesmos poliplexos uma vez que as proteínas presentes no meio de cultura são capazes de interagir com o polímero mais facilmente, desestabilizando a nanopartícula. Isso indica e sugere que a presença de grupos hidrofóbicos permitem não só

uma interação mais eficiente com os ONs, como também conferem à partícula uma capacidade de organização própria que se revela importante para resistir a possíveis efeitos desestabilizantes por interação de proteínas (por exemplo proteínas carregadas negativamente como albumina) com os nanocomplexos.

A diluição de nanopartículas poliméricas no soro pode representar uma forte tensão para os complexos porque as proteínas do soro podem ser adsorvidas nas superfícies das nanopartículas por interações eletrostáticas e promover a desestabilização das mesmas. Assim, a prevenção da desestabilização prematura das nanopartículas é extremamente importante para o seu sucesso em aplicações biológicas (HAN *et al.*, 2013). Após a diluição em soro, um aumento notável nos tamanhos das nanopartículas TMC₄₃/ON, TMC-VA9/ON e TMC-VA3/ON foi observado. Foi também observado a desestabilização dos políplexos preparados com o TMC-DA2, modificado com grupos decanoil (TMC-DA2/ON) e TMC-VA3/ON após incubação em DMEM contendo 10% de FBS. Estes resultados são mais um indicativo de que o baixo grau de substituição de grupos hidrofóbicos de pequeno tamanho de cadeia acíclica não é efetivo para condensar o ON e proteger os políplexos da adsorção das proteínas do soro. Mesmo porque o políplexo preparado com o TMC-VA9, com maior grau de substituição apresentou melhor estabilidade na presença do soro indicando que o maior grau de substituição de grupos hidrofóbicos é mais efetivo na interação do polímero com o ON.

Em contrapartida, o tamanho das nanopartículas TMC-SA2/ON praticamente se manteve inalterado após diluição em meio de cultura. Provavelmente, a formação de agregados poliméricos é adicionalmente reduzida devido à estabilização das micelas induzida pelos grupos estearil.

As nanopartículas TMC-SA2/ON apresentaram maior capacidade em condensar e proteger o ON, quando comparados com outros polímeros. Este resultado está de acordo com a estabilidade em soro obtida por DLS. O comprimento da cadeia do ácido graxo promove uma maior interação e proteção do ON nas nanopartículas.

Essas observações mostram mais evidências de que a modificação química do TMC com grupos estearil promove uma maior interação das cadeias poliméricas com o ON e mais condensação do ON na nanopartícula. As proteínas presentes no meio competem com o polímero na interação com o oligonucleotídeo e acabam desestabilizando as nanopartículas preparadas com o TMC₄₃ (HAN *et al.*, 2013). A incubação das nanopartículas em solução tampão HEPES não apresentou mudanças significativas sobre a estabilidade das mesmas. Na presença de soluções salinas, os complexos TMC₄₃/ON apresentam tamanhos ligeiramente superiores, mas parece não se dissociar. Já para os complexos TMC-SA2/ON, não se observam diferenças significativas entre os tamanhos e a estabilidade das nanopartículas com N/P 80 em solução tampão HEPES pH 7,4.

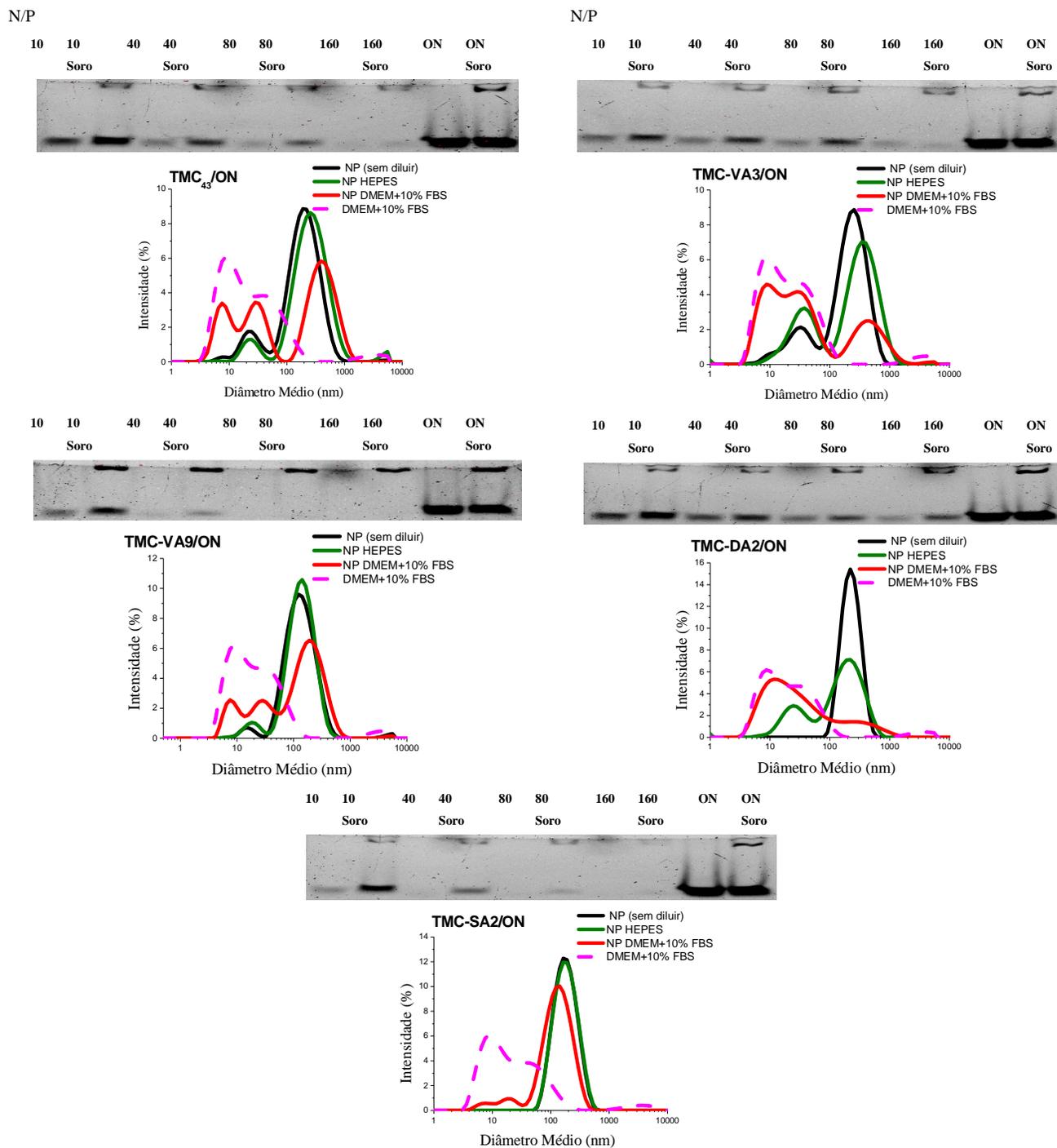


Figura 5.37. Efeito da incubação, em diferentes soluções, no tamanho e na condensação do ON pelas nanopartículas TMC_{43}/ON e TMCs modificados/ON para a razão N/P 80.

5.4.5. Estudo de eficiência de transfecção dos poliplexos TMC/ON

Para examinar a eficiência de transfecção de ONs de cadeia simples pelas nanopartículas em estudo foi utilizada uma linhagem celular HeLa (HeLa/Luc705) que expressa o gene da luciferase cromossomicamente codificado interrompido pelo intron 2 do gene da globina β . O intron da globina β foi mutado levando a um defeito no mecanismo de “splicing” o que leva à retenção de um fragmento do intron no RNA final e à produção da proteína luciferase inativa, Figura 5.38. Oligonucleotídeos *antisense* complementares ao local de mutação redirecionam o “*splicing*” levando à produção de RNA e proteína Luciferase funcionais (LIU *et al.*, 2012; GUTERSTAM *et al.*, 2008). Desta forma é possível relacionar diretamente o aumento de produção da luciferase com a eficiência de entrega do ON às células alvo.

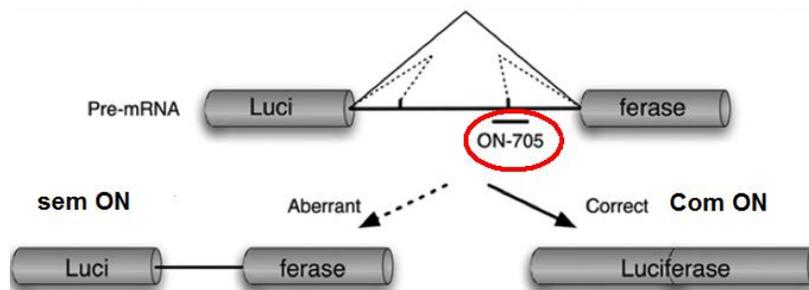


Figura 5.38. Esquema mostrando o mecanismo de correção do defeito da luciferase pela atuação do ON (GUTERSTAM *et al.*, 2008)..

Foram transfectados nas células HeLa/Luc705 os complexos TMC/ON nas razões N/P de 80, 120 e 160. Os resultados do aumento da atividade da luciferase estão mostrados na Figura 5.39. O reagente comercial de transfecção L2K, um reagente padrão para entrega *in vitro* de ácidos nucleicos, foi utilizado como controle positivo.

Observa-se que o complexo preparado com o TMC-SA2/ON medeia transfecção que resulta num aumento da atividade da luciferase, a metade em relação ao controle L2K para o N/P 80. Isso mostra evidências de que o efeito da conjugação de grupos estearil na cadeia polimérica promove um balanço positivo que poderá compreender não só a estabilização

dos nanocomplexos em meio celular mas também influenciar positivamente quer a interação inicial com a membrana celular e subsequente processo de endocitose, quer a estabilidade do nanocomplexo nas vesículas endossomais e subsequente libertação do interior das vesículas para o citoplasma. De acordo com esses resultados, pode-se concluir que a presença de grupos hidrofóbicos na cadeia de TMC aumenta a eficiência de transfecção celular.

Para complexos TMC-DA2/ON resultados das transfecções estão próximos dos resultados obtidos para o polímero não modificado TM₄₃/ON. Os complexos TMC-VA9/ON, a N/P 80, mostrou melhor eficácia de transfecção do que a amostra TMC-VA3/ON, indicando que um percentual de modificação química de grupos valeroil no polímero provoca melhora na eficiência de transfecção das nanopartículas. O tamanho e o Pdi obtidos para os complexos TMC-VA9/ON são menores do que os obtidos para o complexo TMC-VA3/ON. Acredita-se que as partículas de tamanho pequeno e com maior conteúdo hidrofóbico melhoram a eficiência de transfecção, facilitando a entrada dos políplexos nas células por endocitose, induzindo a uma melhor condensação do ON e interação do polímero com membrana celular. Além disso, os resultados obtidos pelo ensaio da estabilidade em meio de cultura mostraram que o maior grau de substituição de grupos hidrofóbicos promove o aumento da estabilidade dos políplexos preparados com TMC-VA9/ON em comparação com o TMC-VA3/ON.

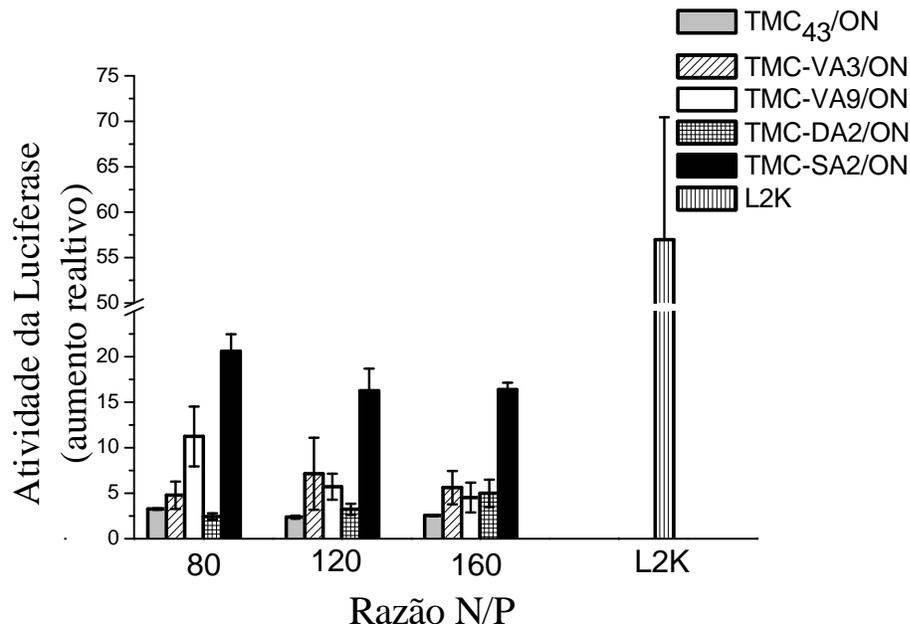


Figura 5.39. Avaliação da atividade da luciferase para os complexos TMC/ON.

A cloroquina (CQ) é um agente lisossomotrópico que distribui-se pelas vesículas celulares endossomáticas e impede a acidificação das mesmas, devido à sua capacidade intrínseca de tamponamento (THIBAULT *et al.*, 2011). É relatado na literatura que a CQ aumenta a eficiência de transfecção de poliplexos não dotados de uma capacidade de tamponamento intrínseca através de um mecanismo que combina a diminuição da degradação enzimática vesicular e a liberação lisossômica acelerada dos poliplexos. O aumento da eficiência de transfecção por tratamento com CQ é frequentemente usado para inferir que a baixa eficiência de um determinado vetor ocorre devido à sua incapacidade de induzir o inchaço e escape lisossômico (THIBAULT *et al.*, 2011).

Para estudo da atuação da CQ no sistema TMC-SA2/ON a razão N/P 80 foi utilizada. Após incubação inicial das células com os nanocomplexos por 24 h, CQ foi adicionada às células a 100 μ M por um período de 4 h, após as quais o meio foi trocado, tendo-se procedido a uma incubação adicional de 24 h. Foi observado, Figura 5.40, que o tratamento com CQ resulta num aumento da atividade da luciferase mais de 3 vezes superior ao observado quando as células são transfectadas, mas não são concomitantemente tratadas com CQ. Além disso, o

complexo preparado com CQ apresenta atividade da luciferase superior ao reagente comercial de transfecção Lipofetamina[®] indicando que os complexos preparados utilizando TMC-SA2 como vetor têm resultados promissores.

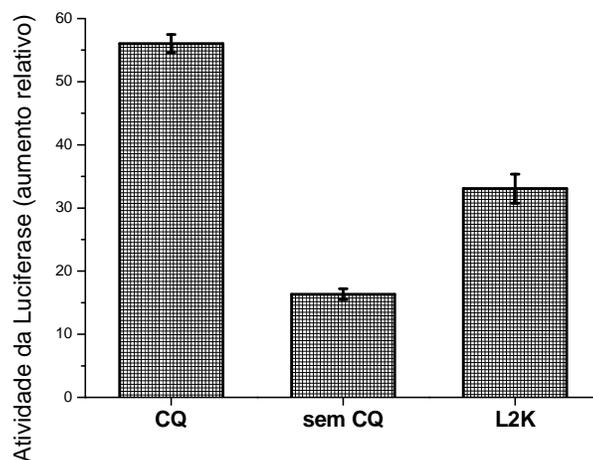


Figura 5.40. Avaliação da atividade da luciferase para a o complexo TMC-SA2 /ON razão N/P 80 na presença e ausência de cloroquina (CQ). Células tratadas com lipoplexos baseados em L2K foram usados como condição de referencia.

5.4.6. Estudo da citotoxicidade dos complexos TMC/ON e dos polímeros

Para avaliação preliminar da citotoxicidade *in vitro* do TMC e dos derivados de TMC preparados e, bem como, dos poliplexos TMC/ON preparados com tais polímeros nas razões N/P 80 e 160 foi utilizado o ensaio de viabilidade celular com resazurina.

O ensaio foi realizado após 24 h de contato das células com as amostras, na Figura 5.41 são apresentados os resultados obtidos para as amostras de polímeros em duas diferentes concentrações, concentrações essas equivalentes a concentração de polímero em mg.mL^{-1} , 0,26 e 0,52 mg.mL^{-1} , nas relações N/P 80 e 160, respectivamente. Observa-se que em geral, a presença dos grupos acílicos na cadeia do TMC após a funcionalização química não tornou o polímero mais citotóxico uma vez que a viabilidade celular obtida para a amostra de TMC não modificado e para os outros TMCs modificados com grupos hidrofóbicos não

apresentou variações significativas de viabilidade celular em relação ao grupo controle ($n = 5$, $p < 0,05$ análise estatística: One way/ANOVA/Bonferroni/ GraphPad Prism). As amostras não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, entretanto, os resultados demonstraram que as mesmas não apresentaram toxicidade para as células HeLa. O polímero TMC-DA2, na concentração de $0,52 \text{ mg.mL}^{-1}$ apresentou viabilidade celular em relação ao controle inferior aos outros polímeros, cerca de $82 \pm 12 \%$.

Os resultados do ensaio de resazurina mostrados na Figura 5.42, obtidos para as amostras de poliPLEXOS nas razões N/P 80 e 160 mostram que as amostras e mesmo o reagente de transfecção comercial Lipofectamina 2000[®] (L2K) não apresentaram citotoxicidade em relação ao controle.

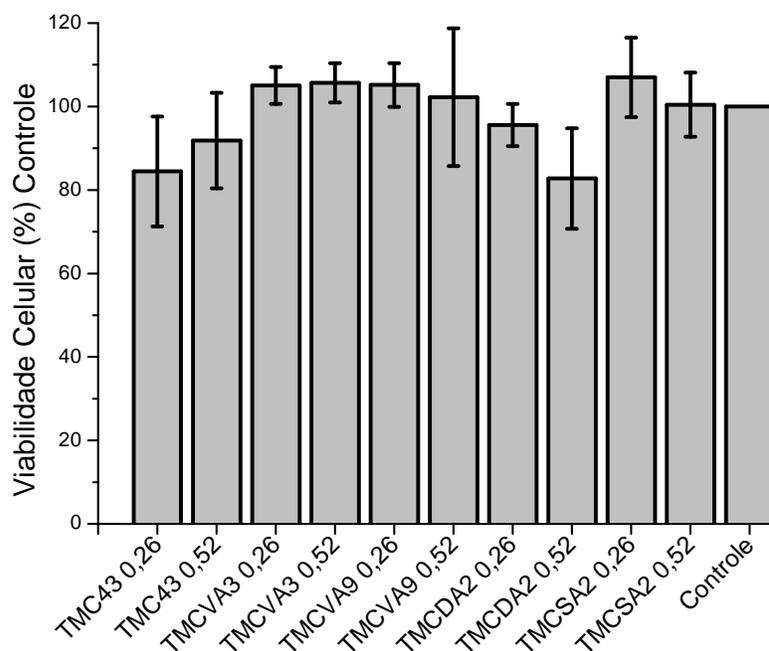


Figura 5.41. Ensaio de resazurina após 24h de contato com as amostras de polímeros em duas diferentes concentrações.

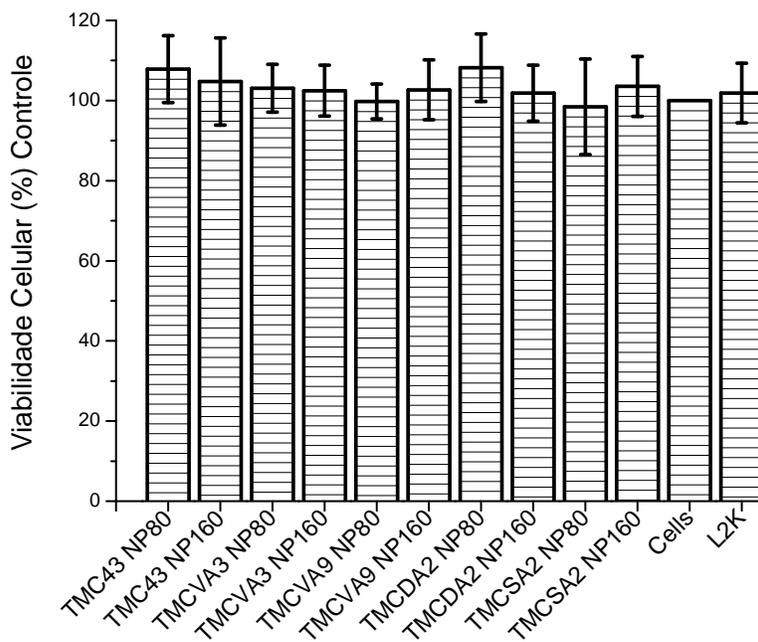


Figura 5.42. Ensaio de resazurina após 24h de contato com as amostras de poliplexos nas razões N/P 80 e 160.

A morfologia das células HeLa foi analisada através de microscopia óptica após 24 h de contato com as amostras poliplexo TMC₄₃/ON e amostra de polímero TMC₄₃. A Figura 5.43 apresenta esses resultados, a morfologia é condizente com a literatura que menciona um emaranhado indistinguível de diversos fenótipos em culturas de células He La. Segundo ROSE (1962) culturas de células HeLa apresentam formas epiteliais (células arredondadas e triangulares), fibroblásticas (alongadas e fusiformes) e dendríticas (semelhantes a células nervosas). Observa-se que após 24 h de contato com as amostras poliplexo TMC₄₃/ON e TMC₄₃ não houve alteração na morfologia das células HeLa em comparação com a condição controle.

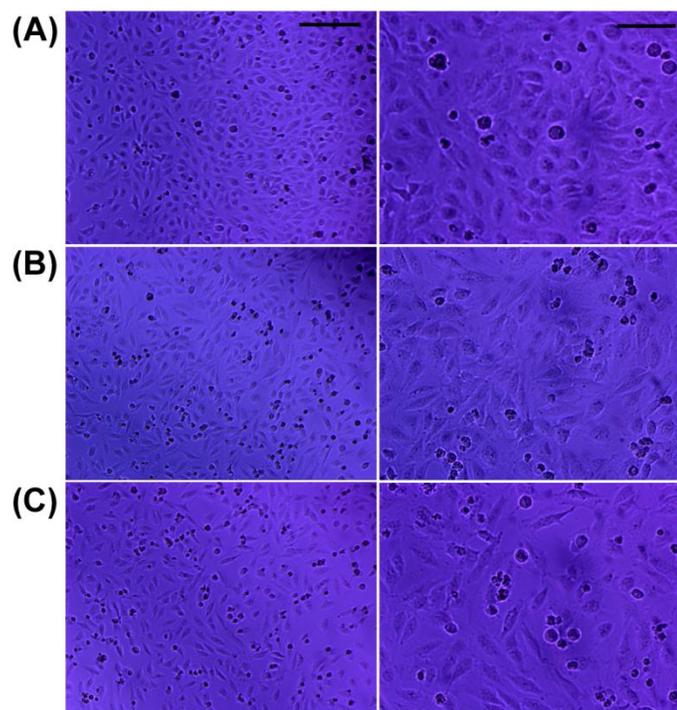


Figura 5.43. Morfologia das células HeLa após contato com a amostra de polímero e políplexo. (A) Condição controle (barra = 10 μm , aumentos de 10 e 20X), (B) Condição tratada com políplexo $\text{TMC}_{43}/\text{ON}$ (aumentos de 10 e 20X) e (C) condição tratada com o polímero TMC_{43} (aumentos de 10 e 20X).

5.4.7. Citometria de Fluxo

O silenciamento genético apenas é realizado após os políplexos serem internalizados nas células, escaparem dos lisossomos e alcançarem o citoplasma (Liu *et al.*, 2013). O ON fluorescente foi complexoado com o TMC e os TMCs modificados, em diferentes razões N/P (80, 120 e 160) e os políplexos formados foram incubados por 4 h para investigação da sua internalização.

Na Figura 5.44 é mostrado o gráfico de citometria de fluxo, no qual pode ser observada a quantidade de oligonucleotídeo fluorescente internalizada nas células HeLa, para as amostras de políplexos TMC/ON nas razões N/P 80, 120 e 160 e, bem como, para o reagente comercial de transfecção L2K. Em geral, pode-se observar que os complexos

preparados apresentaram resultados de internalização superiores as células não tratadas (NT).

Pode-se observar que para as razões N/P 80 e 120, os poliplexos preparados com as amostras de TMCs modificados com cadeias acílicas (TMC-VA3, TMC-VA9, TMC-DA2 e TMC-SA2) apresentaram quantidades superiores de ON internalizados nas células em comparação com o TMC₄₃ (não modificado). Estes resultados estão em concordância com os resultados anteriores e com o objetivo do presente trabalho no qual era esperado que a modificação química do polímero com cadeias acílicas possibilitasse maior interação do polímero com o ON e com a membrana celular promovendo maior transfecção e internalização.

Os resultados mostraram que os poliplexos preparados com TMC-SA2 apresentaram maiores resultados de internalização em comparação com os demais poliplexos provavelmente devido a maior eficiência de interação com o ON, resultado também alcançado nos ensaios de retenção em gel de poliacrilamida, estabilidade e transfecção celular. De acordo com o que já foi discutido nas seções anteriores, a cadeia estearil possibilita maior interação com o oligonucleotídeo por forças hidrofóbicas sem alterar a interação eletrostática entre o polímero e o ON, possibilitando a preparação de poliplexos mais estáveis e com maior capacidade de entrada na célula e entrega do ON.

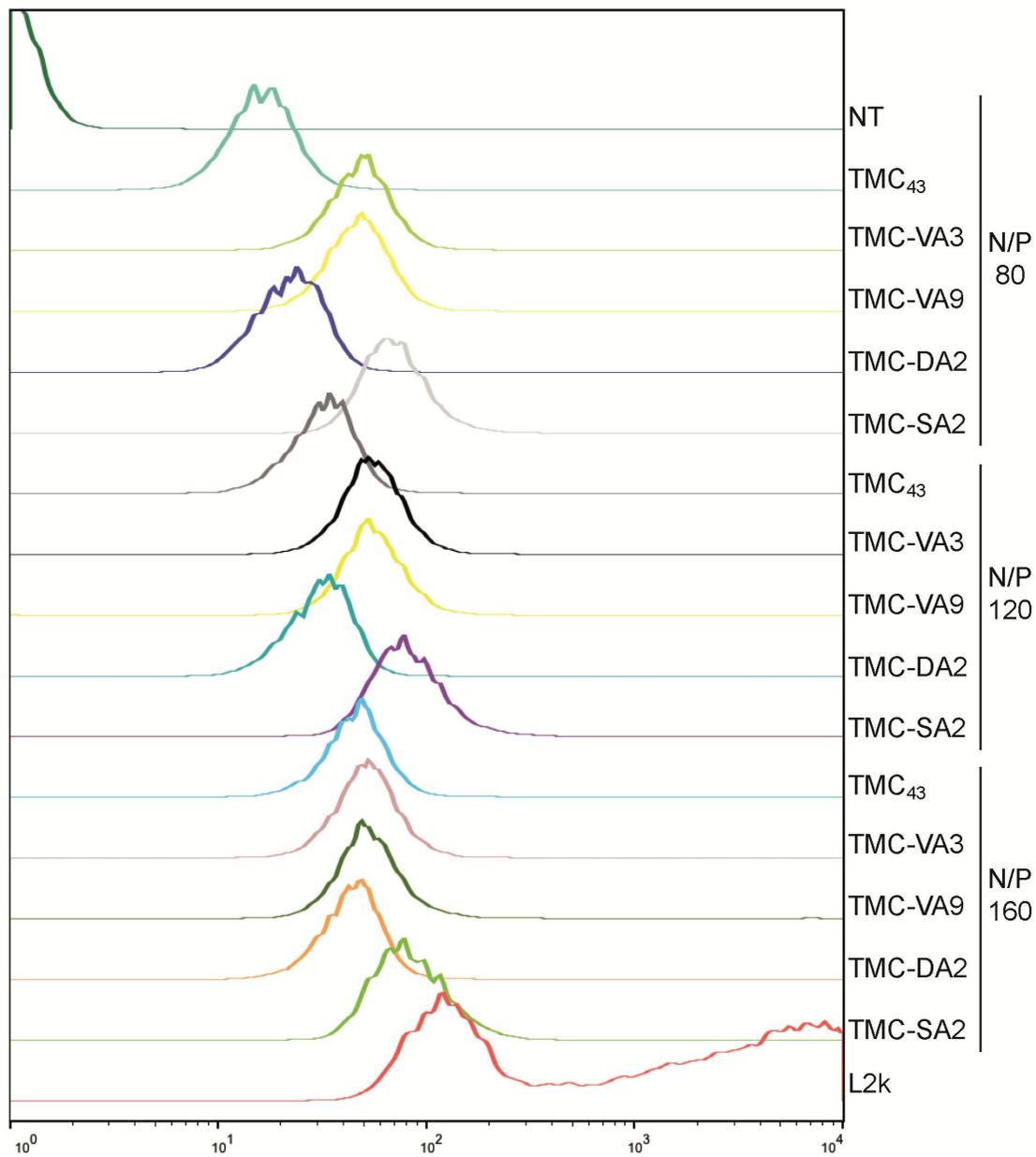


Figura 5.44. Citometria de fluxo mostrando a internalização celular dos complexos TMC/ON em células HeLa a razões N/P 80, 120 e 160.

6. CONCLUSÕES

A reação de *N*-acilação da quitosana mostrou que os derivados *N*-palmitoil sintetizados apresentaram diferentes propriedades físico-químicas devido à mudança do balanço entre as interações hidrofólicas/hidrofóbicas. Adicionalmente, tanto a quitosana quanto a *N*-palmitoilquitosana foram ligantes efetivos para estabilização de pontos quânticos de CdS produzindo nano híbridos com estrutura núcleo-casca inorgânica/orgânica e fotoatividade fluorescente.

O comportamento fotoluminescente e as propriedades físico-químicas dos pontos quânticos biofuncionalizados sugerem que esses sistemas podem ser potencialmente explorados com biomarcadores fluorescentes em diversas aplicações biomédicas.

A modificação química da TMC com grupos hidrofóbicos de diferentes tamanhos de cadeia acíclica, pentanoil, decanoil e estearil, provocou alterações nas propriedades físico-químicas do polímero como capacidade de agregação em solução aquosa, potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico.

O maior grau de modificação química da TMC, ao se comparar polímeros modificados com a mesma cadeia acíclica (valeroil), TMC-VA3 e TMC-VA9, possibilitou a formação de políplexos mais estáveis em meio de cultura celular e com maiores eficiências de transfecção celular. Indicando que, além do tamanho e tipo da cadeia acíclica, o grau de substituição química também é um fator importante na interação do polímero com o oligonucleotídeo e transfecção celular. Os grupos hidrofóbicos presentes nos polímeros *N*-acilados possibilitam maior interação com o oligonucleotídeo que possui característica ligeiramente apolar além de possibilitar maior interação do políplexo formado com a membrana celular.

O efeito do comprimento de cadeia acíclica sobre a capacidade de interação e condensação do polímero com o oligonucleotídeo foi muito relevante, mostrando que o maior tamanho de cadeia hidrofóbica, grupos estearil (C18) possibilitou melhor condensação com o ON,

maior estabilidade da partícula em meio de cultura celular e maior eficiência de transfecção celular.

Os poliplexos e os polímeros (TMC e seus derivados preparados) não apresentaram citotoxicidade em ensaio de resazurina.

Resultados de internalização celular mostraram que o poliplexo preparado com o TMC-SA2 foi mais internalizado pelas células que os demais poliplexos evidenciando que o tamanho da cadeia acídica é importante para maior interação com o ON e entrada nas células devido a maior interação do poliplexo com a membrana celular.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a modificação química da TMC com outros tamanhos de cadeia acíclica e com outros graus de modificação química.
- Avaliar o efeito da modificação química do TMC com outros tamanhos de cadeia na preparação de poliplexos com oligonucleotídeos, bem como, na estabilidade da partícula formada e transfecção celular.
- Realizar ensaios de transfecção em culturas celulares primárias.
- Realizar ensaios de transfecção *in vivo*.
- Modificar o TMC acilado com outros grupos químicos relatados na literatura para aumentar a eficiência de transfecção celular, tais como imidazol e poli(etileno glicol).

8. CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO

7.1. ARTIGOS PUBLICADOS

SANTOS, J. C. C., MANSUR, A. A. P., MANSUR, H. S. One-Step Biofunctionalization of Quantum Dots with Chitosan and *N*-palmitoyl Chitosan for Potential Biomedical Applications. *Molecules*, v. 18, p. 6550-6572, 2013.

7.2. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

SANTOS, J. C. C., MANSUR, A. A. P., MANSUR, H. S. Lipophilic chemical functionalization of chitosan for molecularly imprinted polymer applications. In: EUCHIS 2013, International Conference of the European Chitin Society, Porto, Portugal, 2013.

SANTOS, J. C. C., MANSUR, A. A. P., MANSUR, H. S. Síntese e caracterização da quitosana modificada com ácido palmítico. In: CBPOI, Congresso Brasileiro de Polímeros, 12, 2013, Florianópolis. Associação Brasileira de Polímeros, 2013.

SANTOS, J. C. C., MORENO, P. D., MANSUR, H. S., PÊGO, A. P. Efeito da Funcionalização Química da *N, N, N* - Trimetilquitosana com Ácidos Graxos na Complexação com Oligonucleotídeos. In: XIV Latin American Symposium on Polymers (Simpósio Latino Americano de Polímeros – SLAP) and XII Ibero American Congress on Polymers (Congresso Ibero Americano de Polímeros – CIP), 2014, Porto de Galinhas. Associação Brasileira de Polímeros, 2014.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, E.S., OLIVEIRA, C. P., BELLATO, C. R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p. 1155-1160, 2010.

AMIDI, M., ROMEIJN, S. G., BORCHARD, G., JUNGINGER, H. E., HENNINK, W. E., JISKOOT, W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *Journal of Controlled Release*, v. 10, p. 107-116, 2006.

AZIZI, E., NAMAZI, A., HARIRIAN, I., FOULADDEL, S., KHOSHAYAND, M. R., SHOTORBANI, P. Y., NOMANI, A., GAZORI, T. Release profile and stability evaluation of optimized chitosan/alginate nanoparticles as EGFR antisense vector. *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, p. 455-461, 2010.

ARAI, K., KINUMAKI, T., FUJITA, T. Toxicity of chitosan. *Bull. Tokai Reg. Fish Lab.*, v. 43, 89-94, 1968.

BARBOSA, L. C. A. *Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos*, 1. Ed., Editora UFV, 2008, 189p.

BONAGAMBA, T. J., CAPELLE, K. W., AZEVEDO, E. R. A. RMN e suas aplicações atuais. *Ciência Hoje*, v. 37, n. 221. p. 40, 2005.

BORDENAVE, N., GRELIER, S., COMA, VERONIQUE. Hydrofobization and Antimicrobial Activity of Chitosan and Paper-Based Packaging Material. *Biomacromolecules*, v. 11, p. 88-96, 2010.

BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B., BEHR, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer

into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, p. 7297-7301, 1995.

BRUCHEZ, M., MORONNE, M., GIN, P., WEISS, S., ALIVISATOS, A.P., Semicondutor nanocrystals as florescente biological labels, *Science*, v. 281, p. 2013-2016, 1998

BRUS, L.E. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *Journal of Chemical Physics*, v. 80, p. 4403-4409, 1984.

CAMPANA-FILHO, S. P., BRITTO, D., CURTI, E., ABREU, F. R., CARDOSO, M. B., BATTISTI, M. V., SIM, P. C., GOY, R. C., SIGNINI, R., LAVALL R. L. Extração, estruturas e propriedades de α -e β -quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CHAMPAGNE, L. M. *The synthesis of water soluble n-acyl chitosan derivatives for characterization as antibacterial agents*. Louisiana: University of Louisiana, 2008. 151p. (Tese, Doutorado Química).

CHAVES, C. R., *Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Sulfeto de Cádmio: Aplicações Biomédicas*, Dissertação de Mestrado, UFPE, Pernambuco, 2006, 112p.

CEDEÑO, F. O., PRIETO, M. M., ESPINA, A., GARCÍA, J. R. Fast method for the experimental determination of vaporization enthalpy by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 73, p. 775-781, 2003.

CHIANDOTTI, R. S., RODRIGUES, P. C., AKCELRUD, L. Grafting of chitosan with acyl derivatives. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 1910-1916, 2010.

CHIU, Y-L., CHEN, S-C., SU, C-J., HSIAO, C-W., CHEN, Y-M., CHEN, H-L., SUNG, H-W. pH-Triggered Injectable Hydrogels Prepared from Aqueous N-Palmitoyl Chitosan: *In vitro* characteristics and *in vivo* biocompatibility. *Biomaterials*, v. 30, p. 4877-4888, 2009.

CHIU, Y. L., HO, Y. C., CHEN, Y. M., PENG, S. F., KE, C. J., CHEN, K. J., MI, F. L., SUNG, H.W. The characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles made of hydrophobically-modified chitosan. *Journal of Controlled Release*, v. 146, p. 152-159, 2010.

CHOU DHARI, Y. M., DETANE, S. V., KULTHE, S. S., GODHANI, C. C., INAMDAR, N. N., SHIROLIKAR, M., BORDE, L. C., MOURYA, V. K. Low molecular weight palmitoyl chitosan: Synthesis, characterization and nanoparticle preparation. *Advanced Materials Letters*, v. 3, n. 6, p. 487-492, 2012.

COSTA JR, E. S. *Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2008. 151p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).

COSTA, H. S. *Síntese, Caracterização e Avaliação do Comportamento Degradativo de Híbridos Porosos de Poli (Álcool Vinílico)/Vidro Bioativo*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2010. 174p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).

COSTA JR., E. S., MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*, v. 31, p. 1460-1466, 2008.

COSTA JUNIOR, E., COSTA JR., E. S., PISCITELLI, A. A., STANCIOLI, E. F. B., VASCONCELOS, W. L., MANSUR, H. S. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Chemically Crosslinked Blends for Biomedical Applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, p. 472-481, 2009.

CRESTINI, C., KOVAC, B., GIOVANNOZZI-SERMANNI, G. Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnology Bioengineering*, v. 50, p. 207-210, 1996.

CURTI, E., BRITTO, D., CAMPANA-FILHO, S. P. Methylation of chitosan with iodomethane: Effect of reaction conditions on chemoselectivity and degree of substitution. *Macromolecular Bioscience*, v. 3, p. 571–576, 2003.

DAI, Q., LI, D., JIANG, S., CHEN, H., WANG, Y., KAN, S., LIU, B., CUI, Q., ZOU, G. Synthesis of monodisperse CdSe nanocrystals directly to air: Monomer reactivity tuned by the selenium ligand. *Journal of Crystal Growth*, v. 292, p. 14-18, 2006.

DASH, P. R., READ, M. L., BARRETT, L. B., WOLFERT, M. A., SEYMOUR, L. W. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Therapy*, v. 6, p. 643–650, 1999.

DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITE, R. M., CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981–1014, 2011.

DE CASTRO, G. P., DOWLING, M. B., KILBOURNE, M. KELEDJIAN, K., DRISCOLL, I. R., RAGHAVAN, S. R., HESS, J.R., SCALEA, T. M., BOCHICCHIO G.V. Determination of efficacy of novel modified chitosan sponge dressing in a lethal arterial injury model in swine. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, v. 72, n. 4, p. 899-907, 2011.

DHEUR, S., SAISON-BEHMOARAS, T. E. Polyethyleneimine-mediated transfection to improve antisense activity of 30-capped phosphodiester oligonucleotides. *Methods Enzymology*, v. 313, p. 56–73, 2000.

DOWLING, M. B., KUMAR, R., KEIBLER, M. A., HESS, J. R., BOCHICCHIO, G.V., RAGHAVAN, S. R. A self-assembling hydrophobically modified chitosan capable of reversible hemostatic action. *Biomaterials*, v. 32, p. 3351-3357, 2011.

ENNELI, B., TURAN, S. O., USLU, B., AKBUGA, J. *In vitro* antisense activity of chitosan/AsODN complexes. *Advances in Molecular Biology*, v. 1-2, p. 27-34, 2009.

ERBACHER, P., ZOU, S. M., BETTINGER, T., STEFFAN, A. M., REMY, J. S. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 1332–1339, 1998.

FENG, W., LI, Y., JI, P. Interaction of Water Soluble Chitosan with Multiwalled Carbon Nanotubes. *Materials, Interfaces, and Electrochemical Phenomena*, v. 58, n. 1, p. 285-291, 2012.

GAO, S., CHEN, J., DONG, L., DING, Z., YANG, Y-H., ZHANG, J. Targeting delivery of oligonucleotide and plasmid DNA to hepatocyte via galactosylated chitosan vector. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 60, p. 327-334, 2005.

GAO, H., LU, W., MA, Y., YANG., Y., LI, J., WU, G., WANG, Y., FAN, Y. Amino poly(glycerol methacrylate)s for oligonucleic acid delivery with enhanced transfection efficiency and low cytotoxicity. *Soft Matter*, v. 7, p. 9239-9247, 2011.

GASCÓN, A. R., POZO-RODRÍGUEZ, A., SOLINÍS, M. A. Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy. Chapter 1, 2013.

GAZORI, T., KHOSHAYAND, M. R., AZIZI, E., YAZDIZADE, P., NOMANI, A., HARIRIAN, I. Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 599-606, 2009.

GAZORI, T., HARIRIAN, I., FOULADDEL, S., NAMAZI, A., NOMANI, A., AZIZI, E. Inhibition of EGFR expression with chitosan/alginate nanoparticles encapsulating antisense oligonucleotides in T47D cell line using RT-PCR and immunocytochemistry. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p. 1042–1047, 2010.

GOMES, C. P., LOPES, C. F., MORENO, P. D., VARELA-MOREIRA, A., ALONSO, M. J. PÊGO, A. P. Translating chitosan to clinical delivery of nucleic acid-based drugs, *MRS Bulletin*, v. 39, p. 60-70, 2014.

GRAYSON, A. C., DOODY, A. M., PUTNAM, D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p. 1868-1876, 2006.

HAN, S., MAHATO, R. I., SUNG, Y. K., KIM, S. W. Development of biomaterials for gene therapy. *Molecular Therapy*, v. 2, p. 302–317, 2000.

HONG, H-J., JIN, S-E., PARK, J-S., AHN, W. S., KIM, C-K. Accelerated wound healing by smad3 antisense oligonucleotides-impregnated chitosan/alginate polyelectrolyte complex. *Biomaterials*, v. 29, p. 4831–4837, 2008.

INOUE, T., HISATSUGU, Y., ISHIKAWA, R., SUZUKI, M. Solid–liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures: 2. Mixtures of oleic acid with lauric acid, myristic acid, and palmitic acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 127, p. 161–173, 2004.

JAISWAL, A., GHOSH, S. S., CHATTOPADHYAY, A. Quantum dot impregnated-chitosan film for heavy metal ion sensing and removal. *Langmuir*, v. 28, p. 15687-15696, 2012.

JAYAKUMAR, R., CHENNAZHI, K. P., MUZZARELLI, R.A.A., TAMURA, H., NAIR, S.V., SELVAMURUGAN, N. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, p. 1-8, 2010.

JIANG, G-B., QUAN, D., LIAO, K., WANG, H. Preparation of polymeric micelles based on chitosan bearing a small amount of highly hydrophobic groups. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 514–520, 2006a.

JIANG, G. B., LIAO, D. Q. K., WANG, H. Novel polymer micelles prepared from chitosan grafted, hydrophobic palmitoyl groups for drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, v. 3, p. 152-160, 2006b.

JINTAPATTANAKIT, A., MAO, S., KISSEL, T., JUNYAPRASERT, V. B. Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 70, p. 563–571, 2008.

JO, H. W., LEE, K. Y. Physicochemical Characteristics of Self-Aggregates of Hydrophobically Modified Chitosans. *Langmuir*, v. 14, p. 2329-2332, 1998.

KANNAN, M., NESAKUMARI, M., RAJARATHINAM, K., SINGH, A. J. A. R. Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions. *Advances in Biological Research*, v. 4, n. 1, p. 10-13, 2010.

KATAS, H., ALPAR, H. O. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 115, p. 216–225, 2006.

KEAN, T., THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p. 3-11, 2010.

KIANG, T., WEN, J., LIM, H. W., LEONG, K. W. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, v. 25, p. 5293–5301, 2004.

KIM, T., JIANG, H., JERE, D., PARK, I., CHO, M., NAH, J., CHOI, Y., AKAIKE, T., CHO, C. Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 726-753, 2007.

KIM, S. T., KIM, C-K. Water-soluble chitosan-based antisense oligodeoxynucleotide of interleukin-5 for treatment of allergic rhinitis. *Biomaterials*, v. 28, 3360–3368, 2007.

KNIPE, J. M., PETER, J. T., PEPPAS, N. A. Theranostic agents for intracellular gene delivery with spatiotemporal imaging. *Nano Today*, v. 8, p. 21-38, 2013.

KORCHAGINA, E. V., PHILIPPOVA, O. E. Aggregates of Hydrophobically Modified Chitosan: Light Scattering Study. *Langmuir*, v. 28, p. 7880-7888, 2012.

KÖPING-HÖGGÅRD M., VÅRUM, K. M., ISSA, M., DANIELSEN, S., CHRISTENSEN, B. E., STOKKE, B. T., ARTURSSON, P. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy*, v. 11, n. 19, p.1441-52, 2004.

KORCHAGINA, E. V., PHILIPPOVA, O. E. Multichain Aggregates in Dilute Solutions of Associating Polyelectrolyte Keeping a Constant Size at the Increase in the Chain Length of Individual Macromolecules. *Biomacromolecules*, v. 11, p. 3457-3466, 2010.

KOZO, O., YUI, T., OKUYAMA, K. Three D structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34, p. 1-8, 2004.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications *Reactive & Functional Polymers*, v. 46 p. 1-27, 2000.

KUMAR, M.N.V.R., MUZZARELLI, R.A.A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H., DOMB, A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, v.104, n.12, p.6017-6084, 2004.

LAKOWICZ, J., GRZYCZYNSKI, I., GREGORZ, P., MURPHY, C. Emission spectral properties of cádmium sulfide nanoparticles with multiphonon excitation. *Jounal Physical Chemistry B*, v. 106, p. 5365-5370, 2002.

LARSSON, M., HUANG, W-C., HSIAO, M-H., WANG, Y-J., NYDÉN, M., CHIOUC, S-H., LIU, D-M. Biomedical applications and colloidal properties of

amphiphilically modified chitosan hybrids. *Progress in Polymer Science*, v. 38, p. 1307–1328, 2013.

LAYEK, B., SINGH, J. N-hexanoyl, N-octanoyl and N-decanoyl chitosans: Binding affinity, cell uptake and transfection. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 403-410, 2012.

LAYEK, B., SINGH, J. Caproic acid grafted chitosan cationic nanocomplexes for enhanced gene delivery: Effect of degree of substitution. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 447, p. 182–191, 2013.

LEE, C-M., JANG, D., KIM, J., CHEONG, S-J., KIM, E-M., JEONG, M-H., KIM, S-H., DIM, D. W., LIM, S. T., SOHN, M-H., JEONG, Y. Y., JEONG, H-J. Oleyl-Chitosan Nanoparticles Based on a Dual Probe for Optical/MR. *Bioconjugate Chemistry*, v. 22, p. 186-192, 2011.

LI, H-W., STRAUSS, H. L., SNYDER, R. G. Differences in the IR Methylene Rocking Bands between the Crystalline Fatty Acids and n-Alkanes: Frequencies, Intensities, and Correlation Splitting. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 108, p. 6629-6642, 2004.

LI, Z., DU, Y., ZHANG, Z., PANG, D. Preparation and characterization of CdS quantum dots chitosan biocomposite. *Reactive & Functional Polymers*, v. 55, p. 35-43, 2003.

LIANG, X., TIAN, H., LUO, H., WANG, H., CHANG, J. Novel Quaternized Chitosan and Polymeric Micelles With Cross-Linked Ionic Cores for Prolonged Release of Minocycline. *Journal of Biomaterials Science*, v. 20, p. 115–131, 2009.

LIM, S. B., BANERJEE, A., ÖNYÜKSEL, H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. *Journal Controlled Release*, v. 163, p. 34-45, 2012.

LIU, X. HOWARDA, K., DONGA M., ANDERSENA, M. Ø., RAHBEKA, U. L., JOHNSENC, M. G., HANSENC, O. C., BESENBACHERA, F., JØRGEN, K. The

influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, v. 28, p. 1280–1288, 2007.

LIU, Z. ZHANG, Z., ZHOU, C., JIAO, Y. Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p. 1144-1162, 2010.

MA, G., YANG, D., KENNEDY, J. F., NIE, J. Synthesize and characterization of organic-soluble acylated chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, p. 390–394, 2009.

MANSUR, A., MANSUR, H. e GONZÁLEZ, J., Enzyme-polymers conjugated to quantum-dots for sensing applications, *Sensors*, v. 11, p. 9951-9972, 2011.

MANSUR, H. S. Quantum dots and nanocomposites. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 2, p. 113-129, 2010.

MANSUR, H. S., MANSUR, A. A. P. CdSe Quantum Dots stabilized by carboxylic-functionalized PVA: Synthesis and UV-Vis spectroscopy characterization. *Materials Chemistry and Physics*, v. 125, p. 709-717, 2011a.

MANSUR, H. S., MANSUR, A. A. P., CURTI, E., ALMEIDA, M. V. Bioconjugation of quantum-dots with chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 90, p. 189-196, 2012a.

MANSUR, H. S., MANSUR, A. A. P., GONZÁLEZ, J. C. Synthesis and characterization of CdS quantum dots with carboxylic-functionalized poly (vinyl alcohol) for bioconjugation. *Polymer*, v. 52, p. 1045-1054, 2011b.

MANSUR, H. S., MANSUR, A. A. P., CURTI, E., DE ALMEIDA, M. V. Bioconjugation of quantum-dots with chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan. *Carbohydrate Polymer*, v. 90, p. 189-196, 2012b.

MANSUR, H. S., MANSUR, A. A. P., CURTI, E., DE ALMEIDA, M. V. Functionalized-chitosan/quantum dot nano-hybrids for nanomedicine applications: towards biolabeling and biosorbing phosphate metabolites. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, p. 1696–1711, 2013.

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

MELLO, K. G. P. C. *Imobilização de pepsina em membranas liofilizadas de quitosana e O-carboximetilquitosana*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2009. 99p. (Tese, Doutorado em Tecnologia Química-Farmacêutica).

MESSAI, I., LAMALLE, D., MUNIER, S., VERRIER, B., ATAMAN-ONAL, Y., DELAIR, T. Poly(D, L-lactic acid) and chitosan complexes: interactions with plasmid DNA. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 255, p. 65–72, 2005.

MOREIRA, C., OLIVEIRA, H., PIRES, L. R., SIMÕES, S., BARBOSA, M. A., PÊGO, A. P. Improving chitosan-mediated gene transfer by the introduction of intracellular buffering moieties into the chitosan backbone. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 2995-3006, 2009.

MIWA, A., ISHIBE, A., NAKANO, M., YAMAHIRA, T., ITAI, S., JINNO, S., KAWAHARA, H. Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol. *Pharm. Res.*, v. 15, p. 1844–50, 1998.] MAEZAKI, Y., TSUJI, K., NAKAGAWA, Y., KAWAI, Y., AKIMOTO, M., TSUGITA, T. Hypochloesterolemic effect of chitosan in adult males. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 57, 1439-1444, 1993.

MOCHALOVA, A. E., SMIRNOVA, L. A., ZAITSEV, S. D., SEMCHIKOV, Y. D., ZAITSEVA, I. I., PAVLOV, G. M. Hydrodynamic and molecular characteristics of graft copolymers of chitosan with acrylamide. *Polymer Science Series B*, v. 49, p. 232-235, 2007.

MOURYA, V. K., INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers*, v. 68, p.1013-1051, 2008.

MOURYA, V. K., INAMDAR, N. N. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, 1057-1079, 2009.

MUMPER, R. J., WANG, J., CLAPPELL, J. M., ROLLAND, A. P. Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proc Intern Symp Control Release Bioact Mater*, v. 22, p. 178–179, 1995.

MUZZARELLI, R. A. A. Colorimetric Determination of Chitosan, *Analytical Biochemistry*, v. 260, p. 255–257, 1998.

MUZZARELLI, C., STANIC, V., GOBBI, L., TOSI, G., MUZZARELLI, R. A. A. Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 73-82, 2004.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 1433–1445, 2011.

MUZZARELLI, R. A. A., BOUDRANT, J., MEYER, D., MANNO, N., DEMARCHIS, M., & PAOLETTI, M. G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 995–1012, 2012.

NEL, A. E., MÄDLER, L., VELEGOL, D., XIA, T., HOEK, E. M. V., SOMASUNDARAN, P., KLAESSIG, F., CASTRANOVA, V., THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-biointerface. *Nat. Mater.*, v. 8, p. 543-557, 2009.

NETO, C. G. T., GIACOMETTI, J. A., JOB, A. E., FERREIRA, F. C., FONSECA, J. L. C., PEREIRA, M. R. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, p. 97-103, 2005.

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M. e MANSUR, H. S., *Biomateriais fundamentos & aplicações*, 1. Ed., Cultura Médica, 2006, 538p.

PAN, D. B. WANG, Q., JIANG, S., JI, X., AN, L. Synthesis of extremely small CdSe end highly Luminescent CdSe-CdS CS nanocrystals via a novel two-phase thermal approach, *Advanced Materials*, v.17, n.2, p.176-178, 2005.

PARK, J. H., SARAVANAKUMAR, G., KIM, K., KWON, I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p. 28-41, 2010.

PÊGO, A. P. OLIVEIRA, H., MORENO, P. Biomaterial-Based Vectors for Targeted Delivery of Nucleic Acids to the Nervous System. *Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine*, v. 4, p. 185-224, 2013.

PHILIPPOVA, O. E., KORCHAGINA, E. V. Chitosan and Its Hydrophobic Derivatives: Preparation and Aggregation in Dilute Aqueous Solutions. *Polymer Science Series A*, v. 54, n. 7, p. 552-572, 2012.

PLAPIED, L., VANDERMEULE, G., VROMAN, B., PRÉAT, V., RIEUX, A. Bioadhesive nanoparticles of fungal chitosan for oral DNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 398, p. 210-218, 2010.

POCHANAVANICH, P., SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p. 17-21, 2002.

PONS, T., UYEDA, H. T., MEDINTZ, I. L., MATTOUSSI, H. Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 220, p. 20308-20316, 2006.

POUTON, C. W., LUCAS, P., THOMAS, B. J., UDUEHI, A. N., MILROY, D. A., MOSS, S. H. Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *Journal of Controlled Release*, v. 53, p. 289-299, 1998.

RAMAKRISHNAN, C., PRASAD, N. Rigid-body refinement and conformation of chitin. *Biochim Biophys Acta.*, v. 28, n. 261, p. 123–135, 1972.

RAMSDEN, J. J., GRATZEL, M. Photoluminescence of small cadmium sulphide particles. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, v. 80, p. 919-933, 1984.

REISS, P., PROTIERE, M., LI, L. Core/shell semiconductor nanocrystals, *Small*, v.5, n.2, p.154-168, 2009.

ROLLAND, A. Gene medicines: the end of the beginning? *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 57, p. 669–673, 2005.

ROSE, G. G. The morphological diversity of Gey's strain HeLa after ten years in tissue culture. *Texas Reports on Biology and Medicine*, v. 20, n. 3, p. 308-337, 1962.

ROSSETTI, R., ELLISON, J. L., GIBSON, J. M., BRUS, L. E., Size effects in the excited electronic states of small colloidal CdS crystallites, *Journal of Chemical Physics*, v. 80 (9), p. 4464-4469, 1984,

ROTTA, J., MINATTI, E., BARRETO, P. L. M. Determination of structural and mechanical properties, diffractometry, and thermal analysis of chitosan and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, n. 2, p. 450-455, 2011.

SALES, A. L. C. *Síntese, Caracterização e Análise Térmica de Sais de Lítio, Sódio e Potássio do Ácido Palmítico e do seu Éster Etilico*. São Carlos: Instituto de Química da USP, 2006, 88p. (Dissertação, Mestrado em Química Analítica).

SALES, A. L. C., RAMOS, L. A., NUNES, R. S., NETO, S. C., CAVALHEIRO, E. T. G. Síntese, caracterização e análise térmica dos sais de lítio, sódio e potássio do ácido palmítico e do seu éster etílico. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1722-1726, 2008.

SANTOS, J. E., SOARES, J. P., DOCKAL, E. R. Caracterização de quitosanas comerciais de diversas origens. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SANTOS, J. C. C. *Síntese e Caracterização de Nanocompósitos PVA/Nanotubos de Carbono para Potencial Aplicação Biomédica*. Engenharia Metalúrgica e Materiais, UFMG, 2011, 152p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e Materiais).

SANTOS, J. C. C., MANSUR, A. A. P., MANSUR, H. S. One-Step Biofunctionalization of Quantum Dots with Chitosan and *N*-palmitoyl Chitosan for Potential Biomedical Applications. *Molecules*, v. 18, p. 6550-6572, 2013.

SARANYA, N., MOORTHY, A., SARAVANAN, S., PANDIMA DEVI, M., SELVAMURUGAN, N. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, p. 234-238, 2011.

SCHATKOSKI, V. M. *Síntese e Caracterização de Nanopartículas Semicondutoras com Estrutura tipo “Núcleo/Casca” CdxMn1-xS/CdSe Obtidas por Rota Coloidal Aquosa*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2011. 106p. (Dissertação, mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).

SIEVAL, A. B., THANOUAL, M., KOTZKB, A.F., VERHOEFA, J.C., BRUSSEE, J., JUNGINGER, H.E. Preparation and NMR characterization of highly substituted *N*-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, v. 36, p. 157-165, 1998.

SIGNINI, R., CAMPANA FILHO, S. P. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, n.2, p.58, 2001.

SINGLA, A. K., CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p. 1047-1067, 2010.

SILVA, H. S. R. C., SANTOS, K. S. C. R., FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. 5 ed. São Paulo: Bookman, 2002. 836p.

SMITH, A. M.; RUAN, G.; RHYNER, M. N. Engeneering Luminescent Quantum Dots for In Vivo Molecular and Cellular Imaging, *Annals of Biomedical Engineering*, v. 34, p. 3-14, 2006.

SMYNTYNA, V., SKOBEEVA, V., MALUSHIN, N. The nature of emission centers in CdS nanocrystals. *Radiation Measurements*, v. 42, p. 693-696, 2007.

SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*. 9 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011, volume 2.

STEPHENSON, M. L., ZAMECNIK, P. C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 75, 1, p. 285-288, 1978.

STRAARUP, E. M., FISKEK, N., HEDTJÄRN, M., LINDHOLM, M. W., ROSENBOHM, C., AARUP, V., HANSEN, H. F., ØRUM, H., HANSEN, J. B., KOCH, T. Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and sérum cholesterol in mice and non-human primates. *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. 20, p. 7100-7111, 2010.

SUNILKUMAR, M. FRANCIS, T., THACHIL, E. T., SUJITH, A. Low density polyethylene–chitosan composites: A study based on biodegradation. *Chemical Engineering Journal*, v. 204-206, p. 114-124, 2012.

TALAEI, F., AZIZI, E., DINARVAND, R., ATYABI, F. Thiolated chitosan nanoparticles as a delivery system for antisense therapy: evaluation against EGFR in T47D breast cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, 1963–1975, 2011.

TAN, W. B., HUANG, N., ZHANG, Y. Ultrafine biocompatible chitosan nanoparticles encapsulating multi-coloured quantum dots for bioapplications. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 31, p. 464-470, 2007.

TAUC, J., MENTH, A. States in the gap. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 8-10, p. 569-585, 1972.

TIEN, C. L., LACROIX, M., ISPAS-SZABO, P., MATEESCU, M-A. N-acylated Chitosan: Hydrophobic Matrices for Controlled Drug Release. *Journal of Controlled Release*, v. 93, p. 1-13, 2003.

TUMA, R. Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 36, p. 307–319, 2005.

UPADHYAYA, L., SINGH, J., AGARWAL, V., TEWARI, R. P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. *Carbohydrate Polymers*, v. 91, p. 452– 466, 2013.

VOGEL, A. I. *Análise Química Quantitativa*. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

ZAWADZKI, J., KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, p. 394–400, 2010.

ZONG, Z., KIMURA, Y., TAKAHASHI, M., YAMANE, H. Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer*, v. 41, p. 899-906, 2000.

WARD, C. M., READ, M. L., SEYMOUR, L. W. Systemic circulation of poly(L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood*, v. 97, p. 2221-2229, 2001.

WELLER, H.; SCHMIDT, H.M.; KOCH, U.; FOJTIK, A.; BARAL, S.; HENGLEIN, A.; KUNATH, W.; WEISS, K.; DIEMAN, E. The Size Distribution of Semiconductor Quantum Dots (QDs). *Chemical Physics Letters*, v. 124, p. 557-560, 1986.

WU, G. Y., WU, C. H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *Journal Biological Chemistry*, v. 262, p. 4429-4432, 1987.

WU, T. ZIVANOVIC, S., DRAUGHON, F. A. CONWAY, W., SAMS, C. Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 3888-3894, 2005.

YOSHIOKA, H., NONAKA, K. I., FUKUDA, K., KAZAMA, S. Chitosan-derived polymer-surfactants and their micellar properties. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 59, p. 1901-1904, 1995.

YOU, J., HU, F-Q., DU, Y-Z., YUAN, H. Polymeric Micelles with Glycolipid-like Structure and Multiple Hydrophobic Domains for Mediating Molecular Target Delivery of Paclitaxel. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2450-2556, 2007.

YU, W.W., FALKNER, J. C., SHIH, B. S., COLVIN, V. L. Preparation and characterization of monodisperse PbSe semiconductor nanocrystals in a noncoordinating solvent. *Chemistry of Materials*, v. 16, p. 3318-3322, 2004.

YU, W.W., QU, L., GUO, W., PENG, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials*, v. 15, p. 2854-2860, 2003a.

YU, W.W., WANG, Y. A., PENG, X. Formation and stability of size-, shape-, and structurecontrolled CdTe nanocrystals: Ligand effects on monomers and nanocrystals. *Chemistry of Materials*, v. 15, p. 4300-4308, 2003b.