



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS BLUMENAU
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA EXATAS E EDUCAÇÃO
CURSO BACHARELADO EM QUÍMICA

Luara Ferreira Lino

**Formação de poliplexos a partir de DNA e polietilenoimina modificada com
lactose, maltose e manose**

Blumenau
2024

Luara Ferreira Lino

Formação de poliplexos a partir de DNA e polietilenoimina modificada com lactose, maltose e manose

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Bacharelado em Química do Centro de Ciências Exatas e Educação do Campus Blumenau da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Química.

Orientador: Prof., Dr. Ismael Casagrande Bellettini

Blumenau
2024

Lino, Luara Ferreira

Formação de políplexos a partir de DNA e polietilenoimina modificada com lactose, maltose e manose / Luara Ferreira Lino ; orientador, Ismael Casagrande Bellettini, 2024.

59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau, Graduação em Química - Bacharelado, Blumenau, 2024.

Inclui referências.

1. Química - Bacharelado. 2. Políplexos. 3. DNA. 4. Polietilenoimina. I. Bellettini, Ismael Casagrande. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. III. Título.

Luara Ferreira Lino

Formação de poliplexos a partir de DNA e polietilenoimina modificada com lactose, maltose e manose

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela em Química e aprovado em sua forma final pelo Curso de Bacharelado em Química.

Blumenau, 28 de junho de 2024.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof. Ismael Casagrande Bellettini, Dr.
Orientador

Prof. Eduardo Zapp, Dr.
Instituição UFSC

Prof. José Wilmo, Dr.
Instituição UFSC

Blumenau, 2024.

Dedico aos meus pais, Eduardo e Ana Cristina e ao meu amor, Jonatas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu consolo e refúgio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini, por ter me acolhido e guiado desde que nos conhecemos. Obrigada pela amizade e suporte.

A banca examinadora composta pelos professores Dr. Eduardo Zapp, Dr. José Wilmo e Dra. Patrícia Brondani por fazerem parte deste momento tão importante.

Ao Jonatas, pelo amor, carinho, suporte e companhia, me apoiando em minha maior conquista.

Aos meu pais, pelo incrível apoio, amor e orações.

A minha família, pelo incentivo, ânimo e conselhos prestados.

Ao Francisco, pelo ombro amigo, confidente e companheiro diário durante toda a graduação.

Aos colegas do CReATe.

Aos professores, pela comunhão e apoio ao longo do processo.

A Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

A terapia genética atua na inserção de genes em células que possuem material genético defeituoso com o objetivo de impedir a reprodução da célula e inserir um código genético saudável. Essa inserção acontece através de agentes carregadores virais e não virais, sendo os não-virais de grande interesse no campo de pesquisa para entrega de genes por apresentarem estabilidade e baixa citotoxicidade como a polietilenoimina (PEI), que pode ser modificada com outras moléculas para ampliar seu desempenho na transfecção de material genético. Diante disso, a PEI foi modificada com lactose, maltose e manose por meio de adição nucleofílica de amina primária em aldeído e a caracterização dos polímeros modificados foi feita por RMN ^1H e FTIR comprovando um grau de substituição de 13% para PEI-Lac e PEI-Mal e 18% para a PEI-Man. A espectrofotometria de UV-Vis, viscosimetria capilar, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e emissão de fluorescência do SYBR Green I foram as técnicas utilizadas para estudar a complexação do DNA pelas PEIs modificadas. As análises realizadas comprovaram três etapas de formação dos poliplexos: (1) baixas concentrações de PEI resultaram na condensação parcial das cadeias de DNA que permaneceram parcialmente expostas ao solvente; (2) formação do complexo coacervado apresentando potencial ζ igual a zero em que as cadeias de DNA foram completamente condensadas; e (3) quantidades maiores de PEI levaram à formação de poliplexos carregados positivamente resultando em complexos com diâmetros abaixo de 100 nm, correspondendo ao tamanho necessário para aplicação na terapia genética.

Palavras-chave: terapia genética; DNA; polietilenoimina; poliplexos.

ABSTRACT

Gene therapy involves inserting genes into cells that have defective genetic material in order to prevent cell reproduction and insert a healthy genetic code. This insertion occurs through viral and non-viral carrier agents, with non-viral agents being of great interest in the field of gene delivery research because they are stable and have low cytotoxicity, such as polyethyleneimine (PEI), which can be modified with other molecules to enhance its performance in transfecting genetic material. Therefore, PEI was modified with lactose, maltose and mannose by means of nucleophilic addition of primary amine to aldehyde, and the modified polymers were characterized by ^1H NMR and FTIR, demonstrating a degree of substitution of 13% for PEI-Lac and PEI-Mal and 18% for PEI-Man. UV-Vis spectrophotometry, capillary viscometry, dynamic light scattering (DLS) and SYBR Green I fluorescence emission were the techniques used to study DNA complexation by modified PEIs. The analyses performed demonstrated three stages of polyplex formation: (1) low concentrations of PEI resulted in partial condensation of DNA strands that remained partially exposed to the solvent; (2) formation of a coacervate complex with a ζ potential equal to zero in which the DNA strands were completely condensed; and (3) higher amounts of PEI led to the formation of positively charged polyplexes resulting in complexes with diameters below 100 nm, corresponding to the size required for application in gene therapy.

Keywords: gene therapy; DNA; polyethyleneimine; polyplexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da PEI ramificada (A) e linear (B).....	19
Figura 2 - Representação esquemática de transfecção gênica utilizando a PEI.....	19
Figura 3 - Representação da composição de um nucleotídeo e das interações entre as bases nitrogenadas do DNA.....	21
Figura 4 - Estrutura das conformações A, B e Z da molécula de DNA, da esquerda para a direita.....	22
Figura 5 - Reação de adição nucleofílica de amina primária (PEI) em aldeído (manose).....	29
Figura 6 - Espectros de FTIR da PEI, lactose e PEI-Lac (A); da PEI, maltose e PEI-Mal (B) e da PEI, manose e PEI-Man (C).....	30
Figura 7 - Estrutura química da maltose (esquerda) e lactose (direita).....	32
Figura 8 - Espectros de RMN ¹ H da PEI, PEI-Man, PEI-Mal e PEI-Lac em D ₂ O.....	33
Figura 9 - Absorbância em 350 nm dos sistemas de DNA/PEIs em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4 a 25 °C para diferentes razões N/P.....	35
Figura 10 - Representação gráfica do comportamento observado nas análises de UV-Vis.....	36
Figura 11 - Espectro UV-Vis do poliplexo de DNA/PEI-Lac em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4 a 25 °C para diferentes razões N/P.....	37
Figura 12 - Valores de η_{rel} para diferentes razões N/P para DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4 a 25 °C.....	38

Figura 13 - Representação gráfica do comportamento observado nas análises de viscosidade.....	39
Figura 14 - Valores de ζ para diferentes razões N/P em 25 °C para DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4.....	41
Figura 15 - Representação ilustrativa do impedimento causado pela presença dos açúcares lactose (esquerda) e manose (direita) nas análises de potencial zeta.....	42
Figura 16 - Estrutura molecular do SYBR Green I.....	43
Figura 17 - Intensidade normalizada de emissão de fluorescência em 520 nm vs. razão N/P dos complexos de DNA/PEI, DNA/PEI-Man, DNA/PEI-Lac e DNA/PEI-Mal, mantendo a concentração de DNA constante em 25 μ g/mL em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4 a 25 °C.....	44
Figura 18 - Representação gráfica do processo de complexação da molécula de DNA com polication na presença de SYBR Green I.....	45
Figura 19 - Medidas de coeficiente de correlação e porcentagem em número dos tamanhos dos políplexos formados na razão N/P=15 em 25 °C para DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4.....	47
Figura 20 - Medidas de porcentagem em número dos tamanhos dos políplexos formados na razão N/P=15 em 25 °C para DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4...	48
Figura 21 - Comparação entre potencial ζ , fluorescência, UV-Vis e viscosidade relativa para o políplexo de DNA/PEI em função da razão N/P.....	50
Figura 22 - Modelo de interação entre DNA e PEI em meio aquoso.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
ATR	Reflectância Total Atenuada
D_H	Diâmetro médio
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELS	Dispersão de luz eletroforética
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
I	Intensidade de emissão de fluorescência
η_{rel}	Viscosidade relativa
N/P	Razão nitrogênio/fosfato
PEI	Polietilenoimina
PEI-Lac	Polietilenoimina modificada com lactose
PEI-Mal	Polietilenoimina modificada com maltose
PEI-Man	Polietilenoimina modificada com manose
PDI	Polidispersão
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton (1H)
t	Tempo de escoamento da solução
t_0	Tempo de escoamento do solvente
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
ζ	Potencial zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVOS GERAIS	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	POLIETILENOIMINA (PEI)	18
3.2	MODIFICAÇÕES POLIMÉRICAS NA POLIETILENOIMINA (PEI).....	19
3.3	DNA	21
3.4	POLIPLEXOS E TERAPIA GENÉTICA.....	23
4	METODOLOGIA	25
4.1	MATERIAIS.....	25
4.2	MODIFICAÇÃO DA PEI COM MALTOSE, LACTOSE E MANOSE	25
4.3	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER POR REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR).....	26
4.4	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (RMN ¹ H).....	26
4.5	ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS	26
4.6	VISCOSIDADE.....	26
4.7	POTENCIAL ZETA.....	27
4.8	ESPALHAMENTO DE LUZ.....	27
4.9	FLUORESCÊNCIA.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS PEIS MODIFICADAS.	30
5.1.1	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	30
5.1.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de H¹ (RMN ¹H) ..	32
5.2	ESTUDOS DA INTERAÇÃO DOS POLÍMEROS MODIFICADOS COM DNA 34	
5.2.1	Espectrofotometria UV-Vis.....	34
5.2.2	Viscosidade	37
5.2.3	Potencial Zeta.....	40
5.2.4	Fluorescência.....	43
5.2.5	Espalhamento de Luz	46

5.2.6	Estudo da interação do DNA com as PEIs modificadas	49
6	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIA.....	53

1 INTRODUÇÃO

A terapia genética tem como base a inserção de genes funcionais em células cujo material genético apresenta estrutura defeituosa. Essa inserção tem como objetivo a substituição desse material e proporcionar o início à expressão de um gene saudável, como também suplementar o corpo com proteínas que podem prevenir ou tratar doenças. Essa técnica é um método terapêutico promissor com grande potencial de avanço científico no tratamento de deficiências genéticas, tais como câncer, infecções virais e doenças neurodegenerativas (ROLLAND, 2005).

A transferência do material genético é feita através de agentes carregadores, divididos em dois grupos: vetores virais e não virais. Os vetores virais (retrovírus e adenovírus) apresentam algumas desvantagens, tais como toxicidade, carregamento limitado, não especificidade das células-alvo, entre outras (VETTER; WAGNER, 2022). Diante disso, os vetores não virais têm se destacado como alternativa promissora no processo de carregamento e expressão do DNA, pois apresentam estabilidade, fácil produção, baixa citotoxicidade, dimensões aproximadas à molécula de DNA e complexam com ele através de ligação eletrostática (MORRIS et al., 2000). Dentre inúmeros polímeros catiônicos estudados, a polietilenoimina (PEI) se destacou devido à presença de todas as características fundamentais para a transferência do material genético citadas anteriormente que podem ter sua eficácia melhorada através de modificações químicas utilizando açúcares, como visto em estudo de Albuquerque e colaboradores (ALBUQUERQUE et al., 2018) que modificaram a PEI com lactose apresentando resultados promissores em que a expressão gênica é mantida, a citotoxicidade é reduzida e a absorção dos polímeros modificados com o açúcar acontece em maior extensão.

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como objetivo apresentar os resultados comparativos da modificação da PEI com lactose, manose e maltose visando estudar a influência e comportamento de cada açúcar na performance e propriedades físico-químicas dos políplexos formados pela complexação do DNA com esses polímeros modificados para uma possível aplicação na terapia genética.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver políplexos a partir da complexação de DNA e polietilenoimina modificada com diferentes açúcares e estudar as suas propriedades físico-químicas visando obter um potencial vetor não viral para entrega de genes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

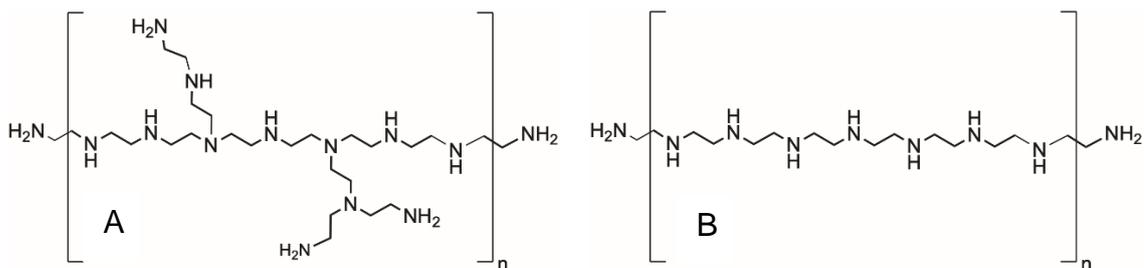
- Modificar a polietilenoimina (PEI) com açúcares (maltose, manose e lactose) e caracterizá-las através de FTIR e RMN ¹H.
- Avaliar a porcentagem de substituição de cada PEI modificada.
- Estudar a complexação da PEI sem modificação e as PEIs modificadas com DNA em variadas razões nitrogênio/fosfato (N/P).
- Avaliar as propriedades físico-químicas dos políplexos formados, como carga superficial, viscosidade relativa, diâmetro e capacidade de condensação do DNA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLIETILENOIMINA (PEI)

A polietilenoimina (PEI) é uma poliamina catiônica com alta densidade de cargas positivas, podendo ser encontrada nas formas ramificadas (Figura 1A) e lineares (Figura 1B) (WIEGAND et al., 2013). É caracterizada como um polieletrólito devido à presença de grupos ionizáveis, como as aminas primárias e secundárias (KAM; GREGORY, 2001) que, quando dissolvidas em solução aquosa se ionizam adquirindo cargas positivas, caracterizando a PEI também como um policátion (LYKLEMA, 2005).

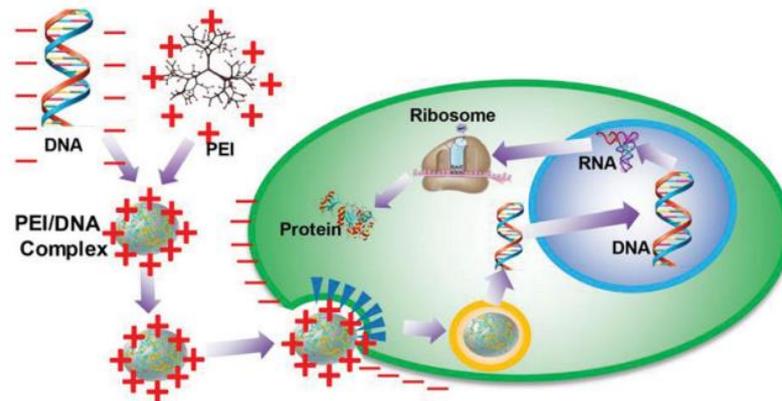
Figura 1 – Estrutura química da PEI ramificada (A) e linear (B).



Fonte: adaptado de (WIEGAND et al., 2013).

Em termos estruturais, a PEI é um polímero com aminas primárias, secundárias e terciárias em que apenas uma parte das aminas são protonadas em pH fisiológico, conferindo à PEI uma capacidade tamponante permitindo a liberação de material genético no interior da célula (AKINC et al., 2005). Por ser um polímero catiônico e hidrofílico (LYKLEMA, 2005), condensa as moléculas de DNA em partículas positivas, gerando um complexo chamado de políplexo, que se liga aos resíduos aniônicos da membrana da célula alvo e, por endocitose, é abstraído pela célula (SOUZA, 2019) (Figura 2). A PEI pode ser encontrada em diferentes massas molares apresentando relativa citotoxicidade, que pode ser diminuída através de tratamentos e modificações (ARRUDA, DANIELLE C.; HOFFMANN, CÉLINE; CHARRUEAU, CHRISTINE; BIGEY, PASCAL; ESCRIOU, 2017).

Figura 2 – Representação esquemática de transfecção gênica utilizando a PEI.



Fonte: adaptado de (YANG et al., 2017).

A PEI possui aplicação em diversas áreas, como agente quelante para íons metálicos (VON ZELEWSKY; BARBOSA; SCHLÄPFER, 1993), auxiliar de floculação na indústria de papel e celulose (JÄGER et al., 2012), tratamento de água (BOLTO, 1995), suplemento para tratamentos com antibióticos como agente antimicrobiano (GIBNEY et al., 2012) e para transfecção não viral e administração de ácidos nucleicos (JÄGER et al., 2012) em estudos biológicos. A aplicação da PEI no ramo de estudos de sistemas sintéticos para entrega de gene é uma estratégia atrativa em tratamentos para o câncer. Blessing e colaboradores (BLESSING et al., 2001) sintetizaram um complexo de polietilenoimina modificada covalentemente com peptídeos de fator de crescimento epidérmico para tratamento de células tumorais, apresentando resultados promissores com um aumento de 300 vezes da eficiência de transfecção com o uso da PEI modificada.

Devido à presença dos grupos amino, a PEI pode reagir facilmente com epóxi, cloreto de ácido, ácidos carboxílicos e aldeídos para que sua estrutura seja modificada, sendo possível obter novas substâncias com aplicações e objetivos específicos diferenciados (ZHANG et al., 2023).

3.2 MODIFICAÇÕES POLIMÉRICAS NA POLIETILENOIMINA (PEI)

As modificações poliméricas apresentam uma área de pesquisa de grande interesse na comunidade científica para a busca de novos materiais com propriedades específicas e variadas. Muitos estudos têm sido realizados explorando diversas modificações na polietilenoimina, tais como: PEI modificada com quitosana para adsorção de alaranjado de metila (CHEN et al., 2023); remoção de ácido

perfluorooctanóico utilizando PEI modificada com óxido de grafeno (LEI et al., 2022); remoção de íons de cobre em solução aquosa utilizando PEI modificada com biocarvão de casca de lagosta (JIANG et al., 2022), nanopartículas de PEI modificada com quitosana para melhora da reação de carboxilação e absorção de CO₂ em plantas (ROUTIER et al., 2023), entre outros.

Essas modificações permitem que diversas características naturais da PEI, como relativa citotoxicidade e propriedade de transfecção gênica, sejam alteradas para que o polímero seja eficiente na finalidade escolhida. Isso acontece pela combinação das características de cada um dos agentes participantes, ou seja, PEI e moléculas modificadoras, como compostos supramoleculares, metais e açúcares (KURLYKIN; GOLOVINA; TENKOVTSSEV, 2023).

Uma das áreas de utilização da polietilenoimina modificada com metais é a síntese orgânica em reações de acoplamento catalisadas por metais de transição, trazendo inovação para o processo de síntese e para a química verde, promovendo não só condições reacionais brandas como também economia na quantidade de reagentes orgânicos (PEÑAS-SANJUÁN et al., 2023). A PEI também tem sido usada no campo de *drug delivery* (liberação controlada de fármacos) evitando problemas comuns da administração de fármacos como rápida ou descontrolada liberação com subdosagem ou superdosagem trazendo ineficiência no desempenho do fármaco, portanto, o uso da PEI nessa finalidade traz maior e melhor controle da entrega do fármaco no alvo de liberação (PINELLI et al., 2022).

A modificação da PEI com açúcares tem conquistado muito espaço na comunidade científica. Fumoto e colaboradores (FUMOTO et al., 2003) estudaram as características de disposição intra-hepática de complexos de DNA plasmídeo com polietilenoimina modificada com galactose resultando em uma atividade de transfecção 26 vezes maior do que a de complexos de PEI pura. A modificação da PEI com manose e colesterol para complexação com DNA de minicírculo para codificar o domínio de entrada do receptor do SARS-CoV-2 foi estudada por Eusébio e colaboradores (EUSÉBIO et al., 2024) obtendo resultados promissores na biocompatibilidade dos nanocarregadores e altos níveis de transcrição e expressão de proteínas nas células estudadas.

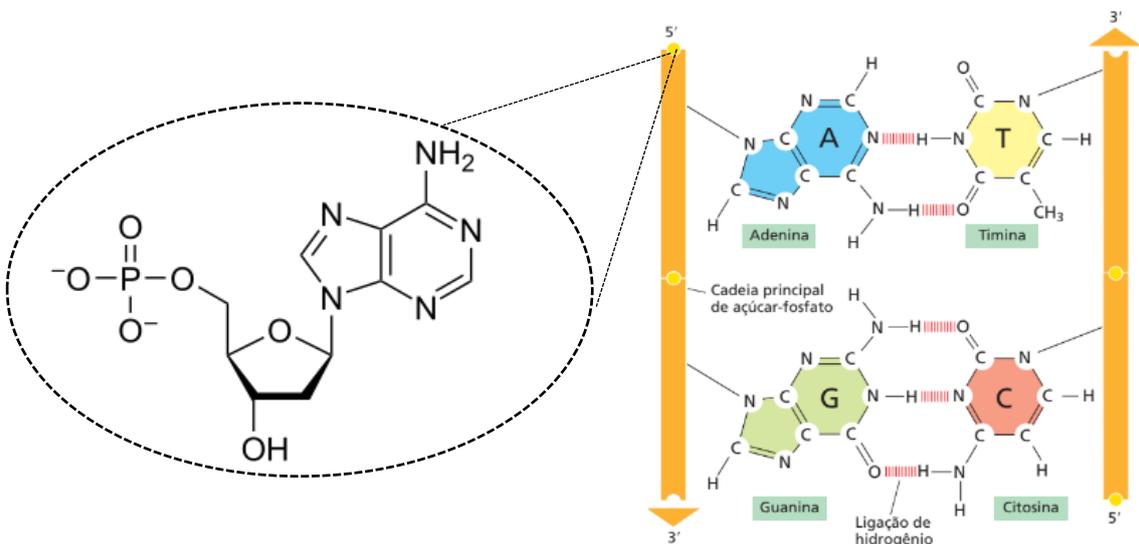
A PEI tem sido utilizada em muitos estudos na área da terapia gênica e, ao longo dos últimos anos alguns trabalhos apresentaram inovação e melhoria na entrega de material genético pela PEI e PEIs modificadas, promovendo capacidade

tamponante, baixa citotoxicidade e transfecção eficientes através da complexação desse polímero com RNA e DNA (SALMASI et al., 2015).

3.3 DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA – do inglês Deoxyribonucleic Acid), cuja estrutura e mecanismo foram propostos em 1953 por James Watson e Francis Crick, é o elemento da célula responsável por carregar o material genético. Sua estrutura, apesar de simples, apresenta grande importância no carregamento dos genes. É composto por duas cadeias polipeptídicas, chamadas de fitas hélices, formadas por vários nucleotídeos compostos por um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada sendo elas a Adenina, Timina, Guanina ou Citosina. As cadeias polipeptídicas se ligam umas às outras através de ligações de hidrogênio entre as bases (Figura 3).

Figura 3 – Representação da composição de um nucleotídeo e das interações entre as bases nitrogenadas do DNA.



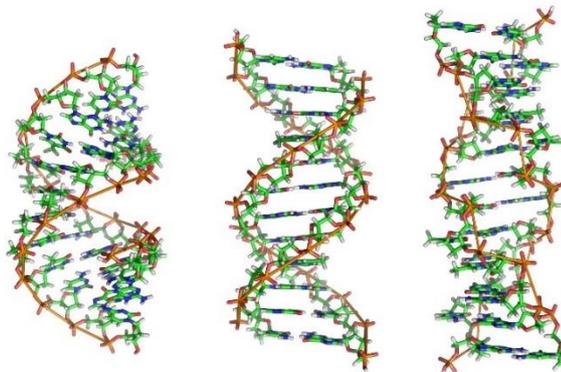
Fonte: adaptado de (ALBERTS et al., 2017).

Antes mesmo de sua estrutura de dupla-hélice ser descoberta, foram identificadas mais de um tipo de conformação, através dos estudos realizados por Rosalind Franklin, em 1951. Rosalind determinou, por difração de raios X, que a conformação A (um estado cristalino anteriormente detectado) acontecia com 75% de umidade relativa, já sob uma atmosfera com 92% de umidade, uma segunda

conformação era identificada, chamada de forma B, onde as fibras de DNA se tornavam mais finas e alongadas, assumindo um estado *para*-cristalino (ROUTIER et al., 2023). Somente após sua constatação foi que Watson e Crick propuseram seu modelo de dupla hélice.

Além das conformações A e B, uma terceira estrutura foi identificada, chamada de Z-DNA (Figura 4), apresentando inversão do sentido da dupla hélice observada nas formas anteriores, além de um formato “zigue-zague” da cadeia principal (GHOSH; BANSAL, 2003). Após alguns estudos, foi possível determinar que a forma B é a mais comumente encontrada em seres vivos. Já as conformações A e Z, geralmente acontecem em condições de baixa umidade relativa e em determinados percentuais de álcoois em solução ou presença de contra-íons (POHL; JOVIN, 1972). Portanto, a conformação B de dupla hélice proposta por Watson e Crick em 1953 é a mais amplamente encontrada.

Figura 4 – Estrutura das conformações A, B e Z da molécula de DNA, da esquerda para a direita.



Fonte: adaptado de (GHOSH; BANSAL, 2003).

A estrutura B mencionada permite ao DNA que o exterior de sua cadeia possua uma característica de cargas negativas devido à presença dos grupos fosfatos, sendo assim, é possível que outras moléculas se liguem ao DNA a partir desses grupos, como polímeros catiônicos.

3.4 POLIPLEXOS E TERAPIA GENÉTICA

Poliplexos é o nome dado aos complexos formados pela interação de DNA ou RNA com polieletrólitos, que são polímeros que possuem unidades aniônicas ou catiônicas em sua estrutura. Esses complexos têm sido usados no desenvolvimento de diversas formas farmacêuticas para administração de medicamentos (GHOSH; BANSAL, 2003).

Como comentado anteriormente, um gene é uma porção do DNA que carrega o código genético, responsável pela codificação de uma cadeia polipeptídica, também chamada de proteína (PORTIN; WILKINS, 2017). Terapias genéticas usando ácidos nucleicos é uma abordagem animadora para tratamentos contra câncer, caracterizando-se como uma alternativa às terapias agressivas intravenosas, tais como quimioterapias, radioterapias e cirurgias, pois essas possuem efeitos colaterais agressivos e penosos, uma vez que tais metodologias não apresentam especificidade, podendo atacar células saudáveis além das cancerígenas (VETTER; WAGNER, 2022). Tal metodologia não é usada apenas nos estudos de tratamentos de câncer, mas também foram desenvolvidos métodos para a inibição da replicação do SARS-CoV-2 nos pulmões (BALDASSI et al., 2022).

A terapia genética consiste na entrega de material genético nas células-alvo com o uso de carregadores ativados positivamente, como lipídeos e polímeros catiônicos para produzir alterações permanentes em seus fenótipos (ALBUQUERQUE et al., 2018). Para que seja eficiente, os resultados da terapia genética precisam apresentar eficácia na transferência de genes e expressão gênica adequada (REMY et al., 1998). Os transportadores à base de lipídios incluem lipoplexos, lipopolipexos e a classe de sistemas de nanopartículas lipídicas; já os carregadores a base de polímeros incluem micelas e poliplexos poliméricos, como também hidrogéis. Poliplexos poliméricos são complexos formados pela complexação eletrostática entre um ácido nucleico, que possui grande quantidade de cargas negativas provenientes dos grupos fosfato, e um polímero catiônico com grupos amino. Uma grande variedade de polímeros catiônicos vêm sendo investigada para esse tipo de aplicação, tais como Poli-L-Lisina (PLL), Polietilenoimina (PEI), Poli-N-oligoetilenoimino-aspartamidas, metacrilatos e dendrímeros (VETTER; WAGNER, 2022). Os poliplexos catiônicos (polímeros modificados com estruturas carregadas positivamente) apresentam um caminho

promissor por terem estrutura na mesma escala de grandeza das moléculas de DNA podendo se complexar através de interações eletrostáticas.

Em 1995, Boussif e colaboradores (BOUSSIF et al., 1995) estudaram pela primeira vez a aplicação da PEI como reagente de transfecção celular, demonstrando a capacidade da PEI de transferir material genético para cérebro de ratos recém-nascidos. Desde então, muitos estudos têm explorado o uso da PEI agente transfectante (YAMANO; DAI; MOURSI, 2010) e na terapia genética (SHARMA et al., 2011). Remy e colaboradores (REMY et al., 1998) estudaram a capacidade de transporte versátil e eficaz da polietilenomina complexada com DNA para entrega de genes em cérebro de mamíferos. Por apresentar relativa citotoxicidade, alguns efeitos adversos podem ser identificados após sua administração. Godbey e colegas (GODBEY; WU; MIKOS, 2001) apresentaram uma alteração significativa no padrão de expressão gênica de células endoteliais após administração da PEI. Poliplexos utilizando PEI linear, estudados por Chollet e colaboradores (CHOLLET et al., 2002), foram aplicados em camundongos, resultando em necrose hepática, ativação do endotélio pulmonar, adesão de plaquetas agregadas e choque após altas doses serem injetadas.

Muitas características do polímero utilizado afetam grandemente os efeitos citotóxicos abordados, como massa molar, propriedades polipeptídicas, grau de ramificação, concentração do poliplexo, tamanho da partícula e condições experimentais (HSU; ULUDAĞ, 2012). Portanto, a modificação de sua estrutura para que a entrega de genes seja eficaz e com baixos efeitos colaterais se faz necessário para que o seu emprego na terapia genética seja fonte de avanços promissores.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

A polietilenoimina ramificada (PEI) ($M_w = 25.000$ g/mol, M_w – do inglês molecular weight/peso molecular), o DNA *calf thymus*, borato de sódio decahidratado, complexo de borano piridina, manose, lactose e maltose foram adquiridos da Sigma Aldrich. O tampão ácido HEPES foi adquirido da Êxodo Científica. Todos os reagentes foram utilizados sem prévia purificação. Em todos os experimentos foi utilizada água de osmose reversa.

4.2 MODIFICAÇÃO DA PEI COM MALTOSE, LACTOSE E MANOSE

A síntese de modificação da PEI se deu pelo mesmo método para os três açúcares utilizados.

Em um balão de fundo redondo foram colocados com 0,3 g ($1,2 \times 10^{-5}$ mol) de PEI e 30 mL de borato de sódio 0,1 mol/L, que permaneceram em agitação por 24h até completa solubilização do polímero. Após esse período, 1,3 g ($3,6 \times 10^{-3}$ mol) de maltose (PEI-Mal) (ou lactose - PEI-Lac) foram solubilizados em 5 mL da solução de borato de sódio 0,1 mol/L, e posteriormente foi adicionado ao balão reacional. Depois da etapa anterior, 5 mmol do complexo de borano/piridina foram adicionados à reação e a solução se manteve em agitação por 7 dias a 50 °C. Após esta etapa, a solução foi colocada em uma membrana de diálise Spectra/Por® MWCO 3.500 g/mol por 3 dias. Após esse período, o polímero modificado foi colocado em placas de petri e seco em estufa por 3 dias a 50 °C. A massa utilizada visou uma substituição de 15% dos açúcares nas moléculas de PEI.

A síntese de modificação da PEI com manose (PEI-Man) seguiu o mesmo procedimento descrito acima, mas com 0,19 g ($1,05 \times 10^{-3}$ mol) do açúcar para manter uma substituição de 15%. O meio reacional ficou sob agitação por 24h e teve seu processo de diálise e secagem igual aos outros.

Depois de secos, os polímeros foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER POR REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)

As análises da PEI, das PEIs modificadas e dos açúcares foram realizadas no espectrômetro FTIR Perkin Elmer Frontier por Refletância Total Atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de 4000 a 450 cm^{-1} , com resolução 2 cm^{-1} e com média de 16 varreduras.

4.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTONS (RMN ^1H)

Para caracterização estrutural das PEI e PEIs modificadas, análises de espectrometria de ressonância magnética nuclear de prótons foram realizados em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 400 MHz da Varian, modelo NMR AS 400, na Central de Análises do Departamento de Química (UFSC-Florianópolis). As amostras de polímero foram dispersas em D_2O , em tubos de 5 mm, na concentração de ~30 mg/mL. Obtiveram-se os espectros de prótons com 1024 scans.

4.5 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS

A complexação foi acompanhada no espectrofotômetro de UV, modelo UV-1800 da Shimadzu, em diferentes concentrações do polímero mantendo a concentração de DNA constante. Foram preparadas soluções de 200 $\mu\text{g/mL}$ para o DNA e para as PEIs em tampão HEPES pH 7,4. A partir dessas soluções, foram realizadas diferentes diluições para obter proporções de polímero/DNA variadas de acordo com a porcentagem de substituição de cada PEI modificada.

4.6 VISCOSIDADE

As medidas de viscosidade foram realizadas em um viscosímetro capilar (GLASS Company Inc) de diâmetro de 0,54 mm com detecção do fluxo realizado manualmente sob temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. As medidas foram feitas para as razões N/P de 0; 0,3; 1,2; 3; 3,6; 4,8; 7,5; 10 e 15 escolhidas a partir das leituras realizadas no UV-Vis das três PEIs modificadas. Cada leitura, incluindo a medida do solvente

(tampão Hepes), foi feita em duplicata e os cálculos de viscosidade relativa (Equação 1) foram realizados usando os valores médios dos tempos de escoamento do DNA e do tampão.

$$\eta_{rel} = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} \quad (1)$$

O tempo t corresponde ao tempo de escoamento da solução e t_0 o tempo de escoamento do solvente e, por se tratarem de soluções diluídas, as densidades foram consideradas iguais.

4.7 POTENCIAL ZETA

Para a determinação da carga superficial dos políplexos nas diferentes proporções N/P foi utilizada a dispersão de luz eletroforética (ELS) que fornece a mobilidade eletroforética que, por sua vez, permite a obtenção do potencial zeta (ζ). Foi utilizado um equipamento ZetaSizer da Malvern no Departamento de Química da UFSC-Florianópolis, com uma cubeta própria para a medida de potencial zeta. As medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C.

4.8 ESPALHAMENTO DE LUZ

A determinação do diâmetro médio (D_H) e o índice de polidispersão (PDI) dos políplexos foram realizados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando um equipamento ZetaSizer da Malvern, em uma célula de poliestireno no Departamento de Química da UFSC-Florianópolis. Um laser He-Ne está acoplado ao equipamento e este opera em comprimento de onda de 633 nm com ângulo de detecção de 173°. Os políplexos de DNA/PEI, DNA/PEI-Man, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Lac foram medidos na razão N/P de 15 e as medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C.

4.9 FLUORESCÊNCIA

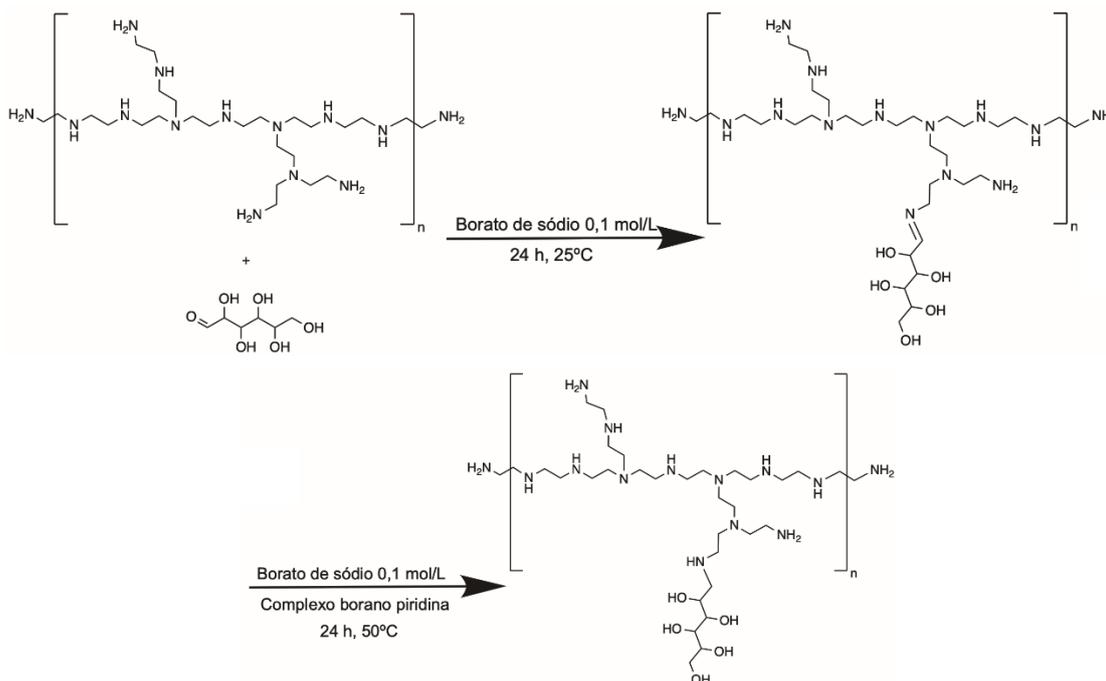
Os espectros de emissão de fluorescência do SYBR Green I foram obtidos através de um espectrofluorímetro, modelo RF-6000 da Shimadzu, por titulação da

solução de DNA 25 $\mu\text{g/mL}$ com soluções de PEI (1000 $\mu\text{g/mL}$), PEI-Man (2000 $\mu\text{g/mL}$), PEI-Mal (2000 $\mu\text{g/mL}$) e PEI-Lac (2000 $\mu\text{g/mL}$). As amostras foram excitadas em 497 nm e os espectros de emissão foram registrados de 500 a 700 nm após a adição de cada volume de solução de polímero. As aberturas das fendas de excitação e de emissão dos monocromadores foram ajustadas para 5 nm e as titulações foram realizadas em célula de quartzo com as quatro faces polidas a 25 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese das PEIs modificadas segue uma reação de adição nucleofílica de amina primária em aldeído, cujo esquema reacional está representado na Figura 5.

Figura 5 - Reação de adição nucleofílica de amina primária (PEI) em aldeído (representado pela manose).



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A reação apresentada na Figura 6 se caracteriza como uma clássica reação entre aldeídos e aminas primárias com a formação de iminas, conhecidas como bases de Schiff, como resultado da primeira etapa (CLAYDEN et al., 2001). A presença do complexo de borano/piridina tem como função a redução da ligação dupla entre os átomos de carbono do açúcar e nitrogênio do polímero, para formação da amina desejada como produto final.

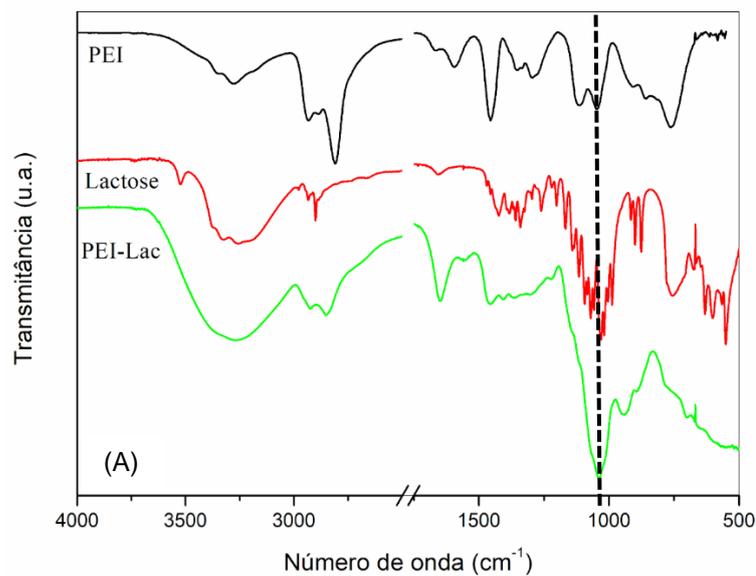
Após a síntese das PEIs modificadas com maltose, manose e lactose foram realizadas análises de FTIR e RMN ^1H para caracterização desses polímeros e confirmação das modificações.

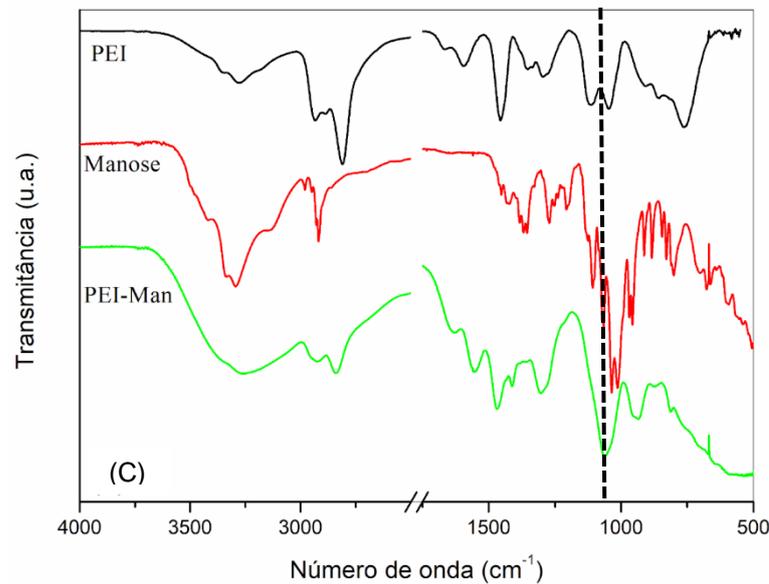
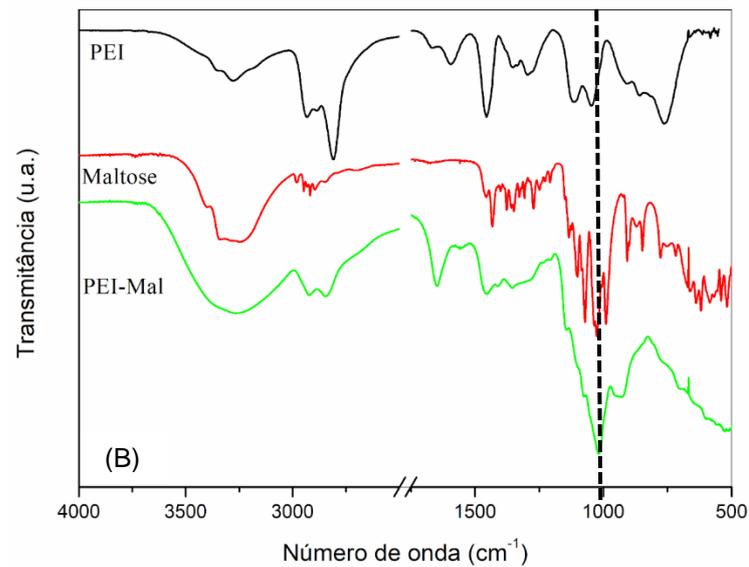
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PEIS MODIFICADAS.

5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier fornece informações sobre a presença ou ausência de grupos funcionais na molécula analisada e, muitas vezes, é utilizada em investigações para identificação de substâncias desconhecidas (SINGH; SINGH, 2022). A Figura 6 apresenta os espectros de FTIR da PEI, dos açúcares lactose, maltose e manose e dos políplexos formados por DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man.

Figura 6 - Espectros de FTIR da PEI, lactose e PEI-Lac (A); da PEI, maltose e PEI-Mal (B) e da PEI, manose e PEI-Man (C).



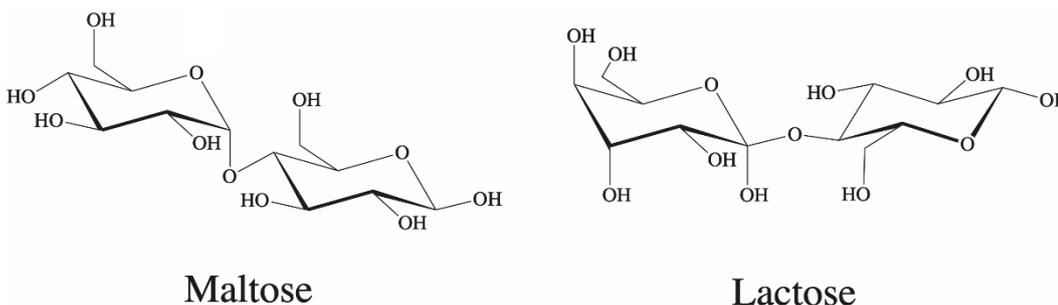


Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A literatura (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2014) mostra que ligações simples do tipo C-O vibram na faixa de 1100 cm^{-1} . A massa dos átomos é um dos efeitos que explica as bandas de C-O, uma vez que ligações entre átomos mais leves vibram em frequências maiores, o que pode ser visto no espectro de FTIR da PEI-Lac (Figura 6 – A), cuja a síntese é comprovada com o surgimento da banda em 1050 cm^{-1} da ligação C-O, correspondente às ligações presentes na estrutura da lactose (ALBUQUERQUE et al., 2018). No espectro da PEI-Lac é possível identificar a banda de O-H entre $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ característica da lactose juntamente com a banda de N-H na mesma faixa do espectro da PEI, sendo essas bandas presentes nos outros espectros.

A lactose e a maltose são açúcares que possuem suas estruturas químicas muito semelhantes, se diferenciando apenas na ligação β -1,4 da lactose e α -1,4 da maltose (Figura 7). Diante disso, as bandas em evidência da PEI-Lac são análogas às bandas da PEI-Mal (Figura 6 – B), mais uma vez comprovando a síntese com o surgimento da banda em 1025 cm^{-1} da ligação C-O.

Figura 7 - Estrutura química da maltose (esquerda) e lactose (direita).



Fonte: Adaptado de (STYLIANOPOULOS, 2012).

A manose, diferentemente da lactose e maltose, é formada somente por um anel e não há competição entre a abertura de dois anéis no momento da síntese. Porém, seu espectro (Figura 6 - C) em muito se assemelha aos apresentados anteriormente, onde é possível identificar em 1100 cm^{-1} a banda de C-O no espectro da PEI-Man.

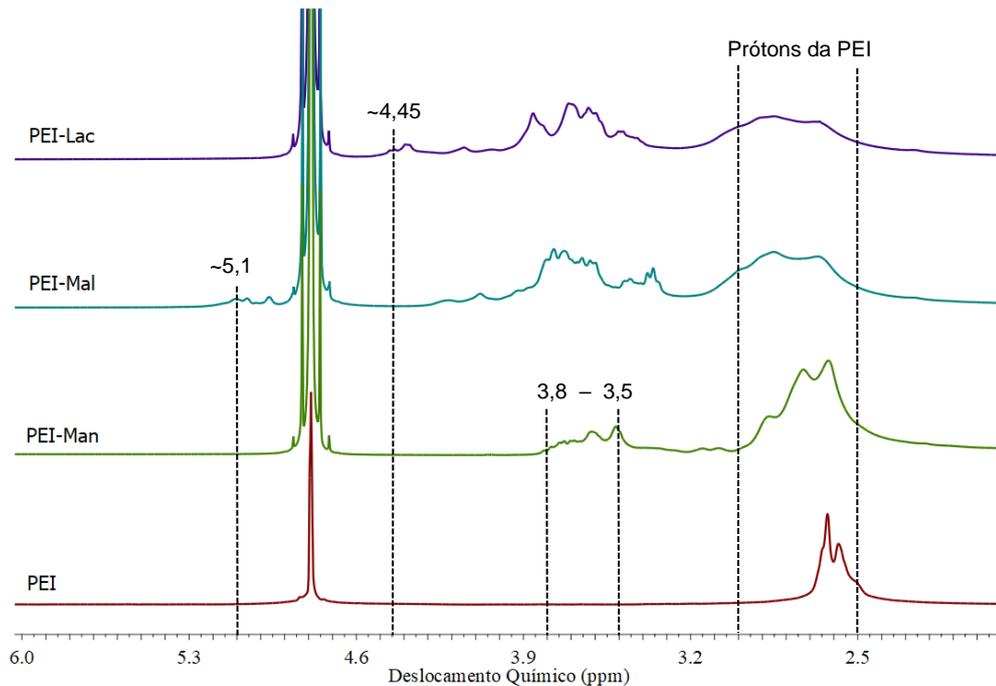
Através dos espectros de FTIR da PEI-Lac, PEI-Mal e PEI-Man foi possível comprovar, pela presença de grupos funcionais, a efetivação da síntese e obtenção dos polímeros desejados. Porém, as etapas de caracterização não se findam em uma única técnica, visto que cada uma tem suas limitações, portanto, se faz necessário realizar outras análises para comprovar os dados obtidos.

5.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de H^1 (RMN ^1H)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) tem como principal aplicação a determinação dos prótons de uma molécula, fornecendo informações das estruturas químicas dos compostos. Na síntese de modificação polimérica, é uma técnica muito utilizada para a confirmação da modificação e determinação do grau de substituição.

A Figura 8 apresenta os espectros obtidos para a PEI-Lac, PEI-Mal, PEI-Man e da PEI em água deuterada (D_2O). A partir desses espectros é possível identificar os picos característicos da PEI e dos açúcares. A partir das integrais dos picos identificados é possível estimar o grau de substituição dos açúcares na PEI.

Figura 8 - Espectros de RMN 1H da PEI, PEI-Man, PEI-Mal e PEI-Lac em D_2O .



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

O partir dos espectros acima, pode-se identificar o pico correspondente aos hidrogênios ainda presentes no solvente (D_2O) em ~4,8 ppm (BELLETTINI et al., 2017) e o sinal representante da PEI em 2,5-3,0 ppm (SALMASI et al., 2015), que correspondem aos 4 prótons da unidade monomérica da PEI.

O sinal em ~4,45 ppm no espectro da PEI-Lac representa o hidrogênio anomérico da lactose (BELLETTINI et al., 2015). Este sinal aparece separado dos demais sinais, pois está mais desblindado devido à presença de elementos eletronegativos (oxigênios) que diminuem a densidade eletrônica do átomo deslocando-a para si (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2014). O cálculo do grau de substituição do açúcar na PEI foi realizado utilizando o valor das integrais de cada sinal abordado, resultando em uma substituição de 13%, ou seja, a cada mero de PEI há 0,13 moléculas de lactose. Para o espectro da PEI-Mal, o sinal do

hidrogênio anomérico está localizado em ~5,1 ppm. O grau de substituição calculado a partir das integrais foi de 13% (APPELHANS et al., 2009).

Os resultados obtidos a partir do espectro da PEI-Man apresentam um sinal em 3,8-3,5 ppm que se refere aos 7 prótons da molécula. Ao realizar os cálculos do grau de substituição levando em consideração a integral desses picos com os referentes ao da PEI o resultado foi de 18% de substituição. As porcentagens calculadas foram utilizadas para o correto preparo das diferentes razões N/P nas análises físico-químicas das complexações com o DNA.

A partir do grau de substituição dos açúcares na PEI, foi possível calcular a massa molar do mero de cada PEI modificada, resultando em 94,4 g/mol para a PEI-Lac/PEI-Mal e 72,3 g/mol para a PEI-Man, sendo 43,1 g/mol a massa molar do mero da PEI pura.

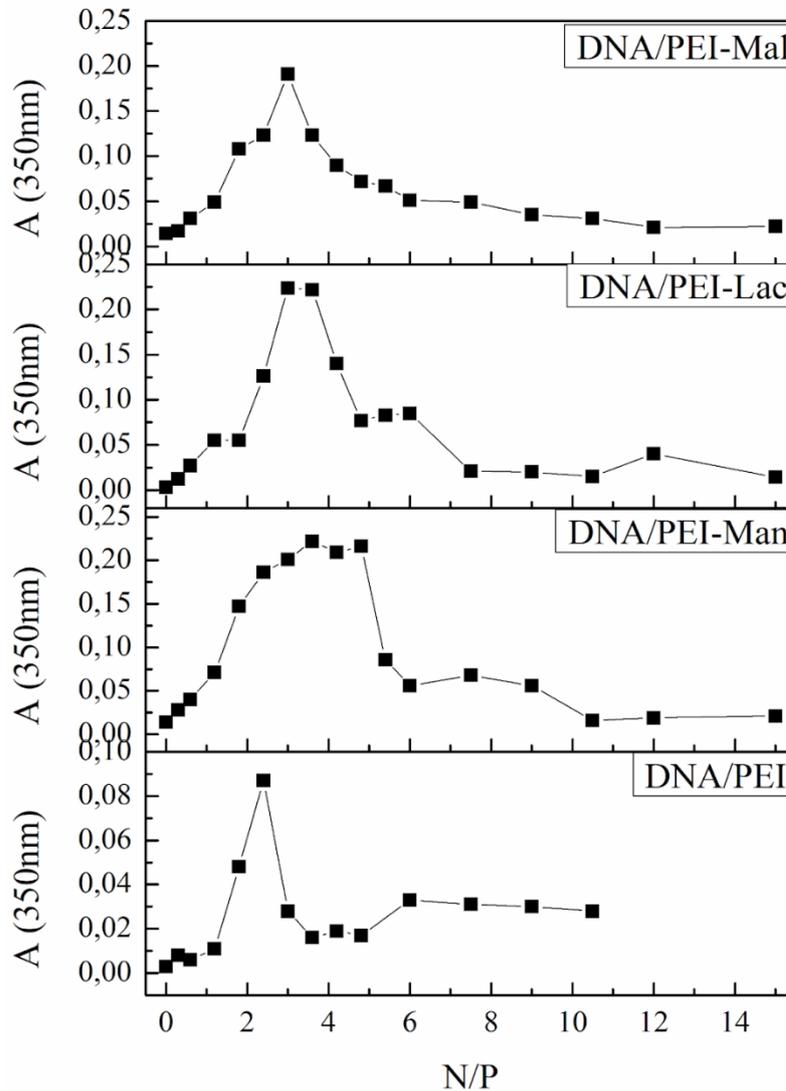
5.2 ESTUDOS DA INTERAÇÃO DOS POLÍMEROS MODIFICADOS COM DNA

5.2.1 Espectrofotometria UV-Vis

Para o estudo da formação dos poliplexos a concentração de DNA utilizada foi mantida constante em 25 µg/mL (330 g/mol (massa molar mero); $7,57 \times 10^{-8}$ mols) enquanto as concentrações das PEIs foram aumentando. Essas misturas de DNA/PEIs foram descritas em diferentes razões nitrogênio/fosfato (N/P), que correspondem à proporção entre um átomo de nitrogênio da PEI e um átomo de fósforo da cadeia de DNA. Considerando que uma unidade de repetição do DNA tem um fósforo e da PEI um nitrogênio, pode-se calcular a partir das massas molares dos meros a razão N/P de cada sistema.

A Figura 9 mostra as alterações na absorbância em 350 nm da complexação do DNA com a PEI pura e PEIs modificadas em diferentes razões N/P.

Figura 9 - Absorbância em 350 nm dos sistemas de DNA/PEIs em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4 a 25 °C para diferentes razões N/P.



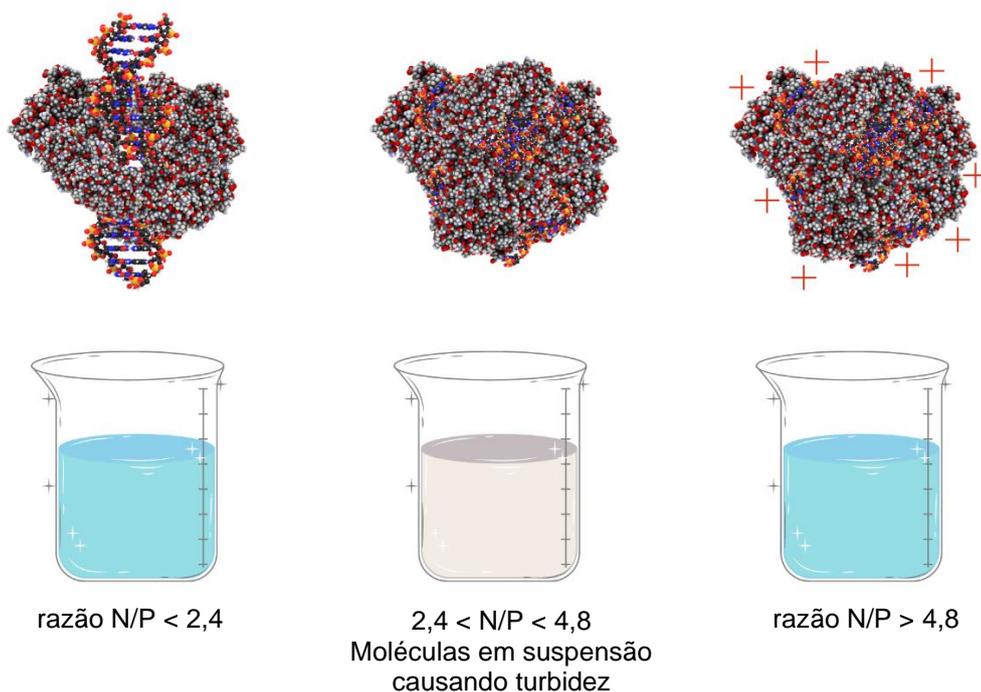
Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Os espectros de UV-Vis dos políplexos de DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man apresentam três principais regiões. A baixa absorbância em razões N/P inferiores a 2,4 exibe o baixo efeito da presença da PEI na complexação com o DNA cujas cadeias não estão inteiramente enoveladas e suas bases nitrogenadas mais expostas. Entre as razões N/P de 2,4 a 4,8 é possível observar um aumento da intensidade da absorbância devido à formação do complexo (WAGNER, 2004), resultando em uma maior dispersão da luz causada pelo efeito Tyndall devido à suspensão das moléculas em solução (HAN; CHANG, 2000). O máximo de absorbância observado para as PEIs modificadas ocorrem em uma

razão N/P acima da apresentada no espectro de DNA/PEI, sendo necessário mais polímero para que a condensação do DNA ocorra.

Em razões N/P superiores a 4,8 um efeito hipocrômico é observado (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2014), causado pelo excesso de cargas positivas provenientes das PEIs. A elevada concentração de PEI resulta na maior solubilidade dos poliplexos em solução, diminuindo a intensidade da absorbância (SIRAJUDDIN; SAQIB; BADSHAH, 2013), cujo comportamento está representado pela Figura 10 de acordo com cada razão N/P comentada. É importante ressaltar que os espectros de UV-Vis das PEIs modificadas apresentaram maior intensidade de absorbância para todas as razões N/P quando comparados com o espectro de DNA/PEI, comprovando a presença dos açúcares em sua estrutura.

Figura 10 – Representação gráfica do comportamento observado nas análises de UV-Vis.

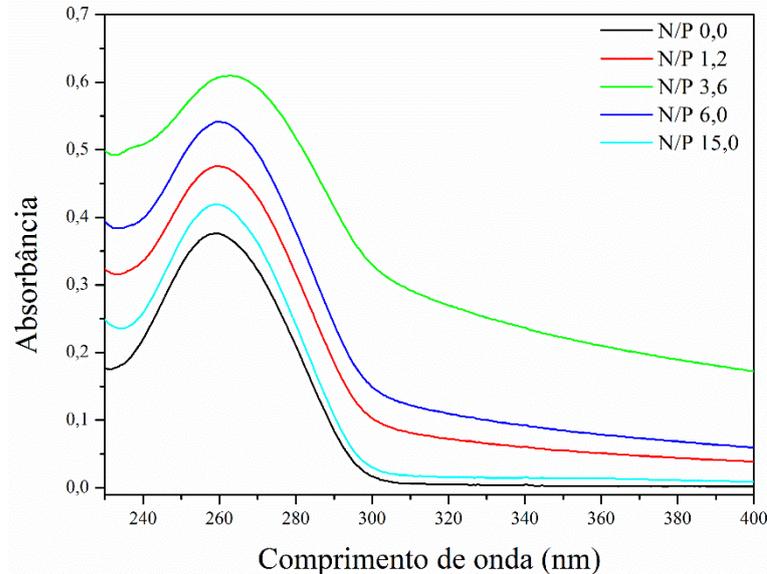


Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Este mesmo estudo também pode ser acompanhado em 260 nm, comprimento de onda de absorção máxima dos grupos cromóforos presentes nas estruturas das bases pirimídicas (citosina e timina) e púricas (adenina e guanina) do DNA (SIRAJUDDIN; SAQIB; BADSHAH, 2013). A Figura 11 apresenta o espectro

UV-Vis do políplexo de DNA/PEI-Lac nas razões N/P de 0,0, 1,2, 3,6, 6,0 e 15,0 acompanhado em 260 nm.

Figura 11 – Espectro UV-Vis do políplexo de DNA/PEI-Lac em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4 a 25 °C para diferentes razões N/P.



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

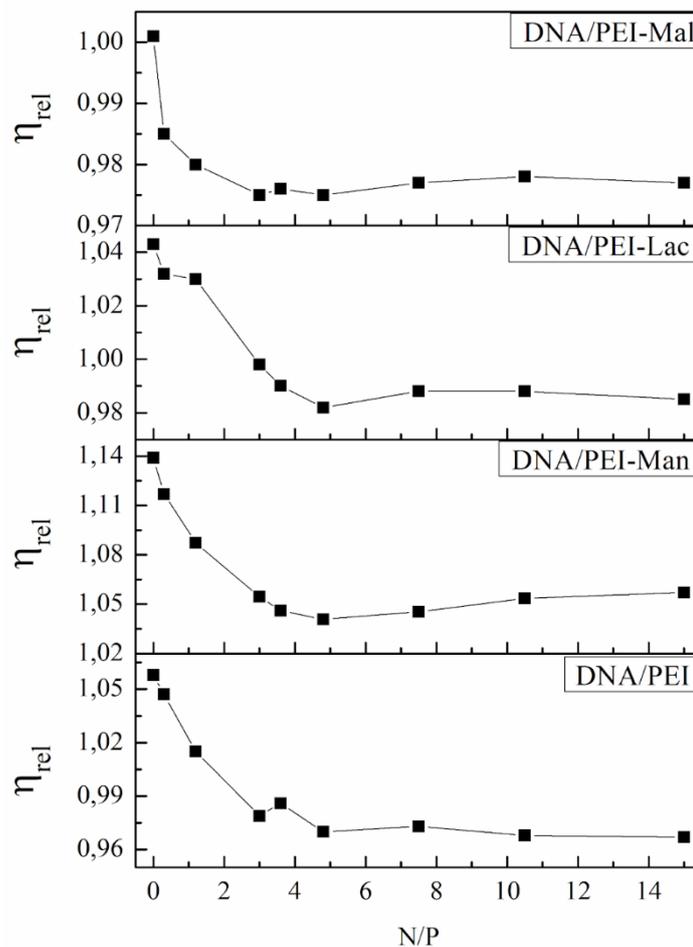
Através da Figura 11 é possível observar uma absorbância máxima no comprimento de onda de 260 nm, sendo a maior intensidade observada para a razão N/P=3,6, seguida de um decaimento conforme aumento da concentração de PEI, atingindo valores menores em razão N/P=15, correspondente ao mesmo comportamento observado em 350 nm. Além do efeito de hiper Cromismo, a banda de maior absorbância apresenta um alargamento quando comparada às outras razões N/P, devido à presença dos grupos hidrofílicos, que não permitem a precipitação dos complexos, mantendo-os sempre em suspensão resultando em uma grande dispersão da luz. As razões N/P em que foram observadas o efeito hiper Cromico correspondem aos resultados obtidos para as medidas de viscosidade.

5.2.2 Viscosidade

As medidas de viscosidade permitem avaliar o comportamento dos políplexos frente ao tamanho e ocupação das moléculas de DNA, uma vez que, quando condensadas, tem seu volume reduzido a uma forma mais compacta devido

a diminuição das interações com o solvente ou com outras cadeias de DNA (STEVENS, 2001). Com a formação de complexos neutros formados a partir de compostos cujas cargas são opostas, espera-se uma diminuição da viscosidade do sistema (DRAGAN; MIHAI; SCHWARZ, 2006), portanto, um estudo do comportamento da viscosidade relativa da complexação das PEIs modificadas com DNA foi realizado e a Figura 12 apresenta os valores de η_{rel} obtidos para diferentes razões N/P para os poliplexos de DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man.

Figura 12 - Valores de η_{rel} para diferentes razões N/P para DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4 a 25 °C.

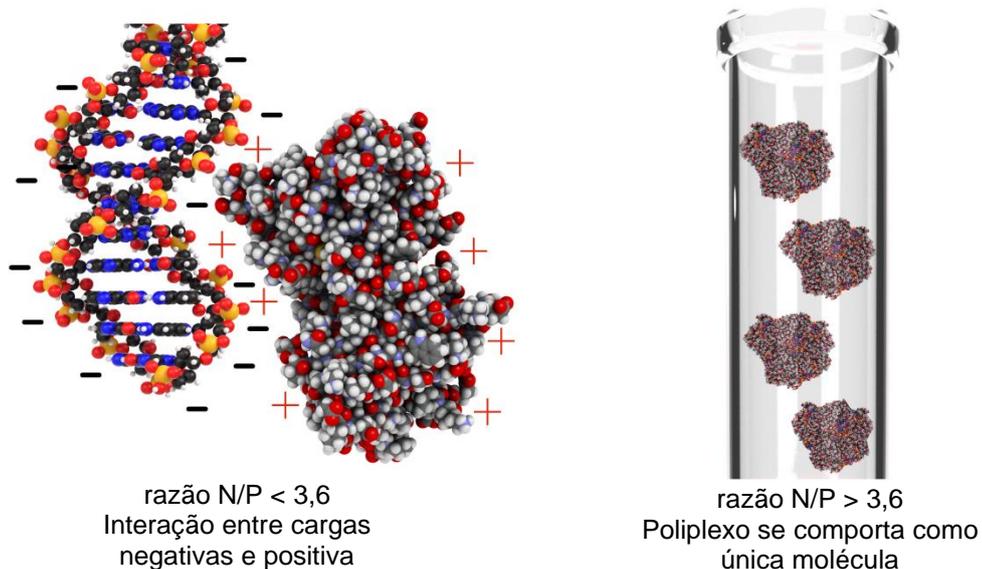


Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A formação de todos os poliplexos apresentam uma diminuição nos valores de η_{rel} até ficarem estáveis. Seus valores elevados são devido à interação

eletrostática entre cargas positivas do polímero e cargas negativas do DNA, retardando o tempo de cisalhamento. Com o aumento da concentração de PEI é observado um decréscimo na viscosidade relativa até razões N/P $\sim 3,6$, devido a neutralização das cargas e início da formação dos políplexos. A partir dessa razão N/P, os valores de viscosidade relativa ficam em valores mínimos, em que o políplexo se comporta como uma única molécula diminuindo o tempo de escoamento (Figura 13) como observado e comprovado no estudo de complexação entre policarboxibetaína e poliânion fraco (SCHWARZ et al., 2006). É interessante ressaltar que a modificação das PEIs não afetou a capacidade de condensação do DNA, uma vez que o mínimo da viscosidade relativa dos políplexos de DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man ocorreu nas mesmas razões N/P observadas para DNA/PEI.

Figura 13 - Representação gráfica do comportamento observado nas análises de viscosidade.



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

As interações eletrostáticas da cadeia de DNA condensada com a PEI modificada explica o leve aumento nos valores de viscosidade observados para razões N/P > 4,8 dos políplexos de DNA-PEI-Lac, DNA-PEI-Mal e DNA-PEI-Man, uma vez que, em altas concentrações de PEI os políplexos formados estão carregados positivamente, devido à alta densidade de cargas positivas da PEI em solução

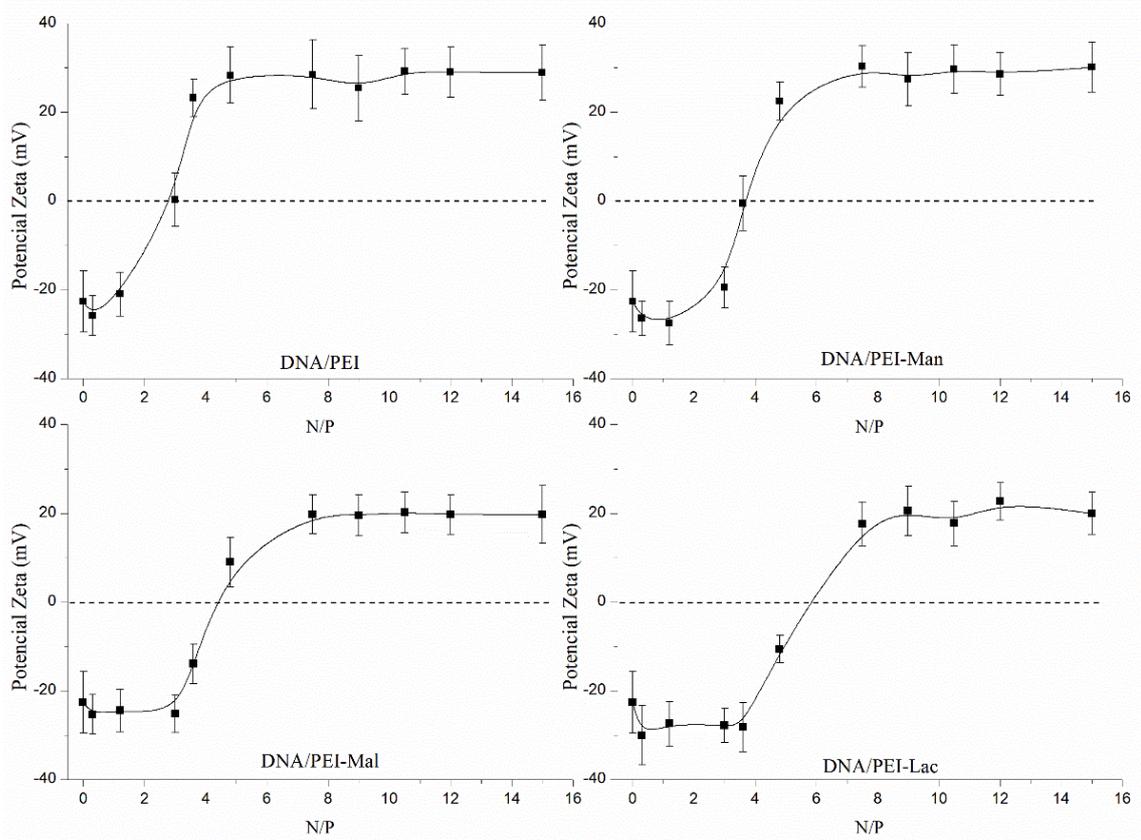
aquosa, não havendo mais possibilidade de agregação das moléculas poliméricas com as cadeias de DNA (VUORIMAA-LAUKKANEN et al., 2017).

Um fato importante a ser retratado é que as razões N/P onde se obteve um mínimo nos valores de η_{rel} correspondem aos resultados obtidos de maior absorbância em 350 nm nos espectros de UV-Vis e inversão de cargas nas leituras de potencial zeta.

5.2.3 Potencial Zeta

A formação dos políplexos estudados é baseada na interação das cargas positivas do polícatión com as cargas negativas dos grupos fosfatos do ácido nucleico. Diante disso, o estudo e comportamento da carga superficial dos políplexos formados pelo DNA e PEIs modificadas é acompanhado pelas medidas de potencial zeta (ζ) que permitem o estudo e identificação do comportamento das interações polímero-DNA (MADY et al., 2011).

Figura 14 - Valores de ζ para diferentes razões N/P em 25 °C para DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4.



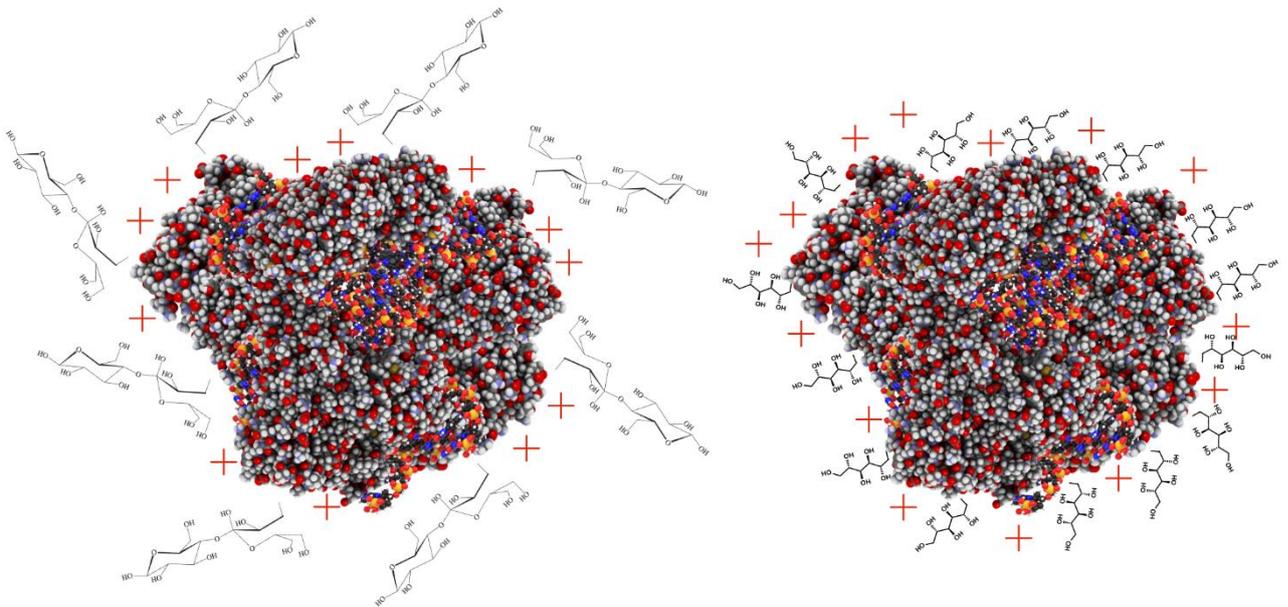
Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A Figura 14 apresenta os valores de potencial ζ para os poliplexos de DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em diferentes razões N/P. Os valores de potencial ζ para razões N/P inferiores a 3,6 para DNA/PEI apresentaram valores negativos, indicando que existem cadeias de DNA que não estão completamente condensadas pela PEI. Com o aumento da concentração da PEI, existe a formação de um coacervado, que é identificado pela neutralidade das cargas, para o DNA/PEI essa razão é em N/P ~3,6. Para razões N/P superiores a 3,6 os valores de potencial ζ são positivos, representando a condensação das cadeias de DNA pelas cadeias da PEI (DREW MYERS, 2002). O mesmo comportamento foi observado para todos os outros poliplexos. Para DNA/PEI-Man os valores de potencial ζ de inversão de cargas foram iguais ao do DNA/PEI.

Os complexos formados por DNA/PEI-Lac e DNA/PEI-Mal apresentaram um comportamento semelhante com diferença na inversão de cargas ocorrendo entre as razões N/P 4,8 e 7,5 para DNA/PEI-Lac e 3,6 e 4,8 para DNA/PEI-Mal, comprovado pela comparação com o estudo da interação de DNA com PEI modificada com galactose (PEI-Gal), que apresentou resultados semelhantes de potencial ζ zero em razão N/P=6,7 (KUNATH et al., 2003). As análises de UV-Vis realizadas para os mesmos sistemas obtiveram um máximo de absorbância na mesma razão N/P onde ocorrem as inversões de cargas, indicando a formação de um coacervado, com tamanho maior e aumentando a dispersão da luz. A mudança no comportamento da viscosidade é observada na mesma razão N/P.

As análises de potencial ζ são realizadas pela medida de mobilidade eletroforética (ME) de partículas carregadas em um campo de tensão com cargas opostas em suas extremidades e representa a velocidade de movimento dessas partículas em um campo elétrico (HUNTER, 1988). Os valores obtidos para DNA/PEI = 28,9 mV, DNA/PEI-Man = 30,1 mV, DNA/PEI-Lac = 20,0 mV e DNA/PEI-Mal = 19,7 mV, todos na mesma razão N/P=15.

Figura 15 – Representação ilustrativa do impedimento causado pela presença dos açúcares lactose (esquerda) e manose (direita) nas análises de potencial zeta.



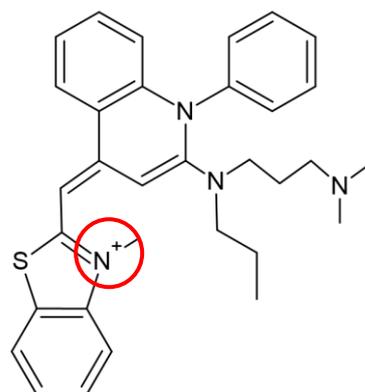
Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A lactose e maltose são açúcares que possuem o dobro de tamanho das moléculas da manose e, mesmo a PEI-Man apresentando um grau de substituição (18%) maior do que PEI-Lac e PEI-Mal (13%), a presença desses dois últimos açúcares na estrutura da PEI encobre as cargas positivas do polímero resultando em valores de potenciais ζ inferiores como representado na Figura 15, pois a ME é menor devido as cargas disponíveis na superfície do políplexo.

5.2.4 Fluorescência

A fluorescência é uma técnica amplamente utilizada para estudos das interações em complexos macromoleculares, como os políplexos formados por DNA e policátions (DRAGAN et al., 2012). Sabe-se que ácidos nucleicos são substâncias não fluorescentes (GUSTAVSSON; MARKOVITSI, 2021), por isso se faz necessário o uso de intercalantes, conhecidos como fluoróforos, que interagem efetivamente com o DNA aumentando consideravelmente a sua emissão de fluorescência, como o brometo de etídio, laranja de acridina e SYBR Green I (DRAGAN et al., 2012), cuja estrutura está representada na Figura 16.

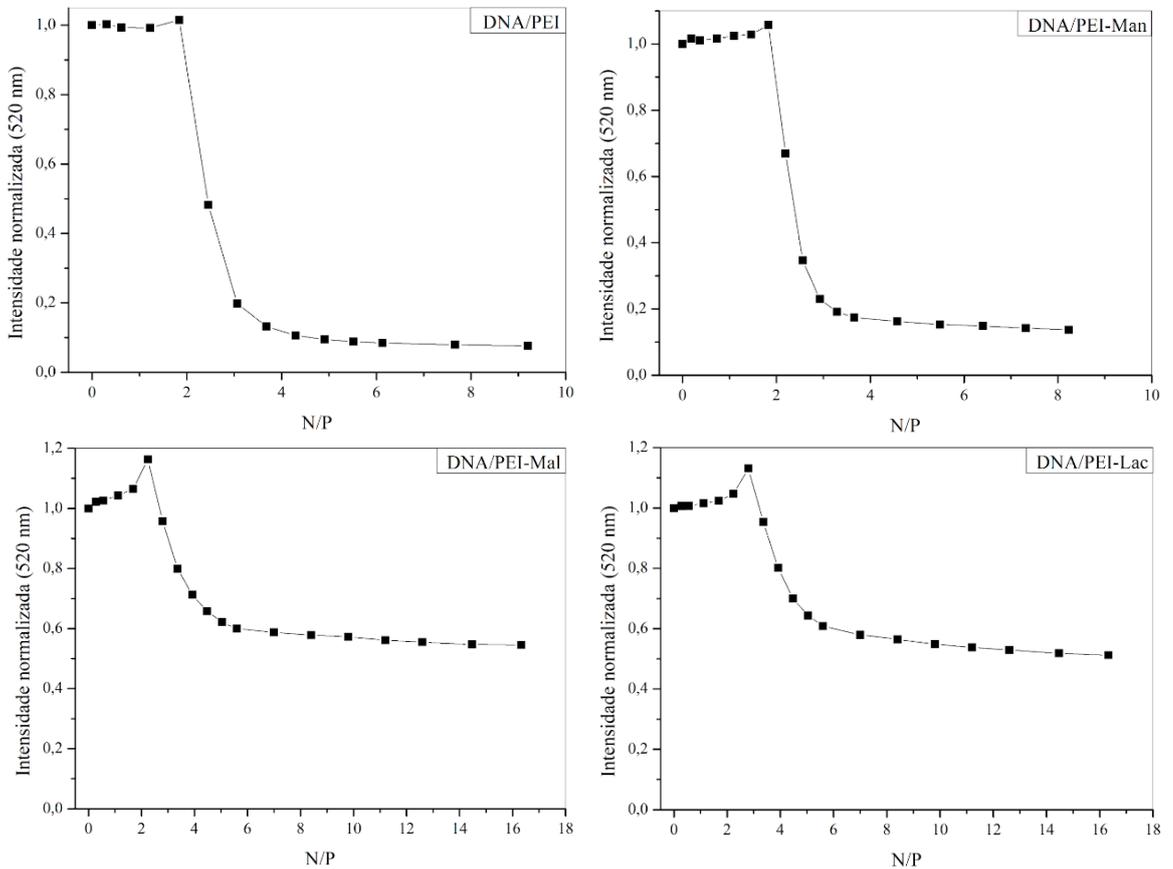
Figura 16 – Estrutura molecular do SYBR Green I.



Fonte: adaptado de (DRAGAN et al., 2012).

A partir dos espectros de emissão de fluorescência do SYBR Green I gerados na titulação do DNA com as soluções de PEI, PEI-Man, PEI-Mal e PEI-Lac, fez-se um gráfico de emissão de fluorescência em 520 nm *versus* razão N/P obtida a cada adição de polímero (Figura 17).

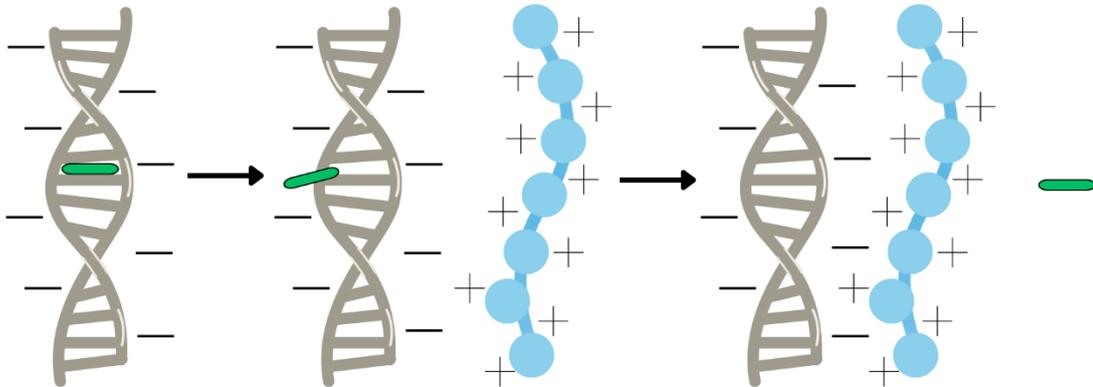
Figura 17 – Intensidade normalizada de emissão de fluorescência em 520 nm vs. razão N/P dos complexos de DNA/PEI, DNA/PEI-Man, DNA/PEI-Lac e DNA/PEI-Mal, mantendo a concentração de DNA constante em 25 µg/mL em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4 a 25 °C.



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Observa-se um decréscimo na emissão de fluorescência com o aumento da razão N/P até atingir valores mínimos constantes próximos ao do fluoróforo livre em solução (DRAGAN et al., 2012). O SYBR Green I, carregado positivamente, se liga na molécula de DNA, carregada negativamente, e se acomoda entre as duplas hélices, aumentando a fluorescência da molécula. Quanto maior a concentração de polímero em solução, as cadeias poliméricas se ligam ao DNA, condensando-o, e assim não há mais espaço para que o intercalante se ligue às duplas hélices resultando na diminuição de emissão de fluorescência (KETOLA et al., 2011) (Figura 18).

Figura 18 – Representação gráfica do processo de complexação da molécula de DNA com polication na presença de SYBR Green I.



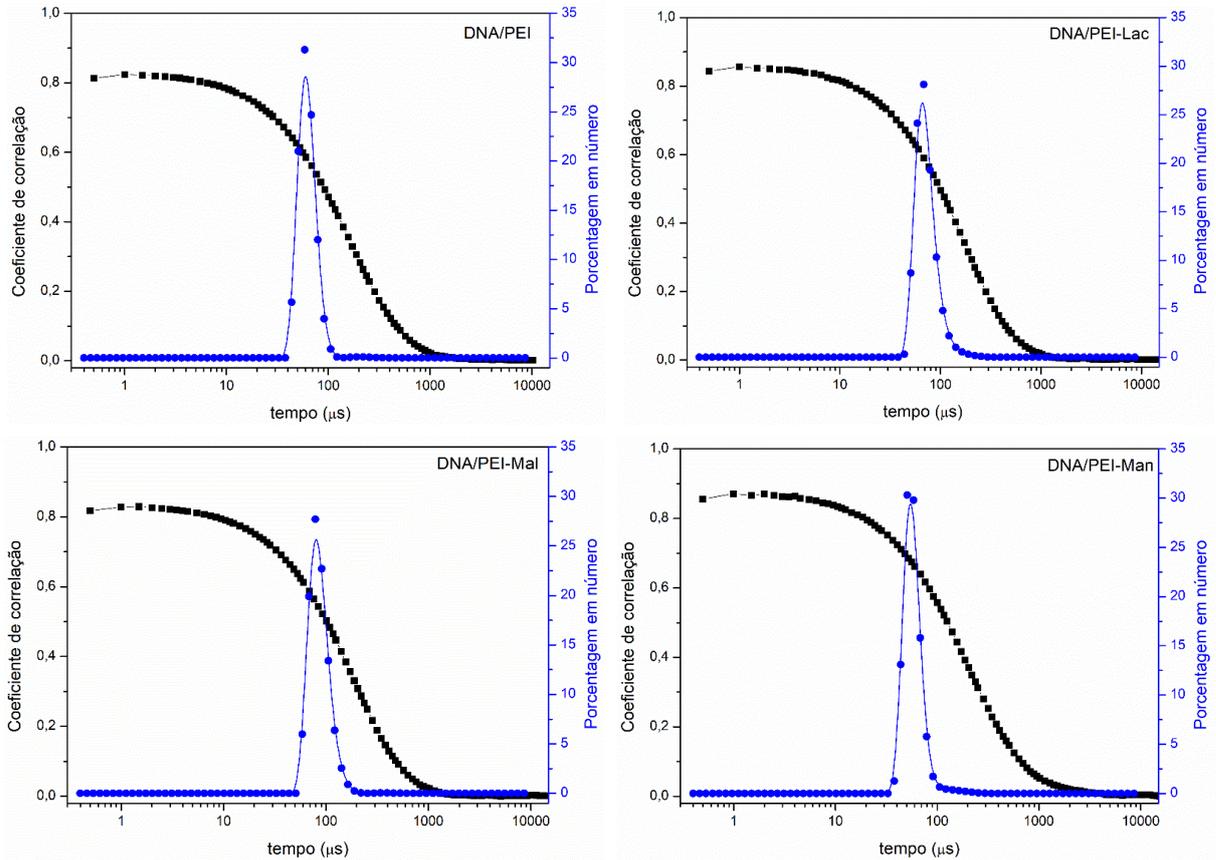
Fonte: elaborado pela autora, 2024.

O decaimento da intensidade de emissão de fluorescência se inicia em razões N/P iguais a 2,4 e 2,2 para os políplexos de DNA/PEI e DNA/PEI-Man, respectivamente e 3,4 e 2,8 para DNA/PEI-Lac e DNA/PEI-Mal, respectivamente. A partir das razões N/P mencionadas, todas as cadeias de DNA estão complexadas pelos polímeros, não havendo mais DNA livre em solução para que o intercalante se ligue (ZIPPER et al., 2004). Entretanto, os políplexos de DNA/PEI-Lac e DNA/PEI-Mal não atingiram valores de intensidade de emissão de fluorescência próximos à zero, como observado para DNA/PEI e DNA/PEI-Man. Provavelmente, devido ao tamanho das estruturas da lactose e maltose substituídas na PEI há uma dificuldade de interação entre as cargas positivas da PEI e negativas do DNA, possibilitando que algumas moléculas do fluoróforo ainda estejam intercaladas ao DNA. É importante e interessante ressaltar que o decaimento da emissão de fluorescência ocorre nas mesmas, ou próximas, razões N/P em que se observou a inversão de sinais nas análises de potencial ζ , o decaimento nos valores de viscosidade e aumento na intensidade de absorbância em 350 nm. Wiethoff e colaboradores (WIETHOFF et al., 2003) estudaram a capacidade da PEI de deslocar o intercalante brometo de etídio quando complexada com o DNA e concluíram que o fluoróforo é completamente descolado em razões N/P entre 2 e 4, correspondente às razões N/P encontradas pelo presente estudo se diferenciando na escolha do intercalante utilizado.

5.2.5 Espalhamento de Luz

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) tem sido amplamente utilizada para estudo do comportamento de complexos de polieletrólitos (LE CERF et al., 2007) e é uma das principais técnicas de caracterização de polímeros, fornecendo informações como massa molar média e tamanho médio das moléculas (DAUTZENBERG, 2000). As medidas de DLS resultam na obtenção do coeficiente de difusão dos polímeros de acordo com o tempo necessário que a macromolécula precisa para percorrer o feixe de luz incidente devido ao seu movimento browniano (HELLWEG et al., 2000), assim, quanto maior for o tempo de detecção desse movimento, maior será o tamanho da molécula. O estudo do tamanho dos políplexos formados por DNA e PEIs modificadas e pura foi realizado utilizando a razão N/P de 15 para obtenção dos valores de coeficiente de correlação e porcentagem em número dos diferentes tamanhos encontrados foram determinados.

Figura 19 - Medidas de coeficiente de correlação e porcentagem em número dos tamanhos dos poliplexos formados na razão N/P=15 em 25 °C para DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4

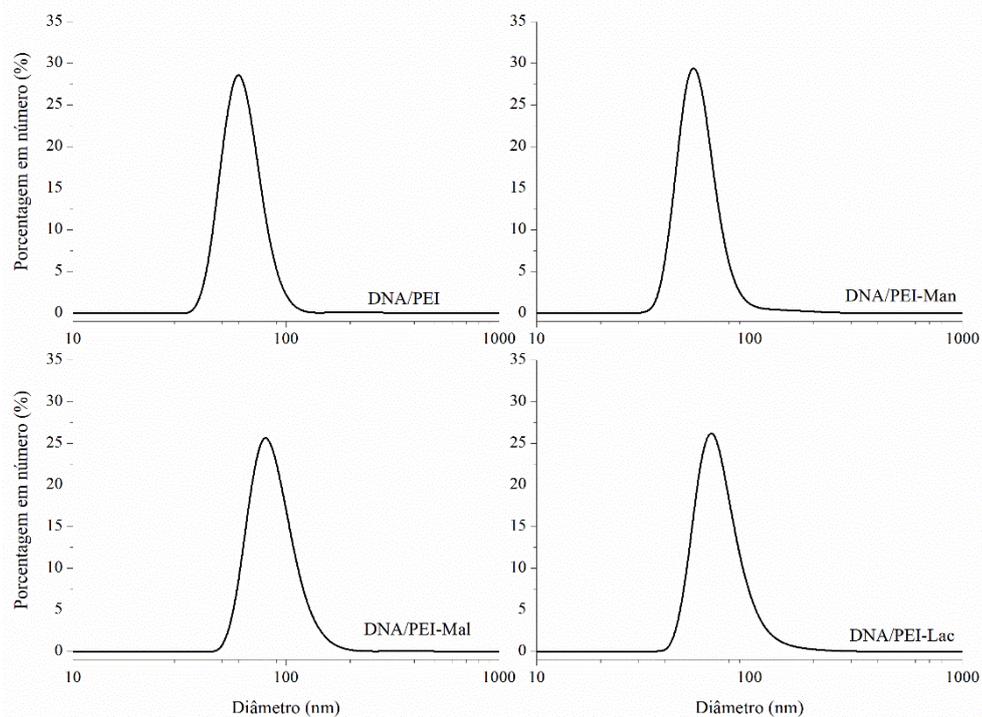


Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A Figura 19 apresenta os gráficos de coeficiente de correlação e porcentagem em número dos diferentes tamanhos encontrados em função do tempo (μs) para os poliplexos de DNA-PEI, DNA-PEI-Lac, DNA-PEI-Mal e DNA-PEI-Man em um ângulo de detecção de 173° . A inclinação da curva do coeficiente de correlação nos fornece a informação da distribuição de tamanhos das partículas, portanto, quanto mais inclinada a curva menor a distribuição e mais uniformes são os tamanhos (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016). Os resultados obtidos mostram uma leve inclinação da curva comprovando os diferentes tamanhos encontrados. O gráfico de porcentagem em número exibe a porcentagem de cada tamanho presente na amostra lida e, quanto mais alargada for a curva, maior a distribuição de tamanhos.

Para a aplicação dos poliplexos na terapia genética se faz necessário o uso de partículas com até 200 nm de tamanho para que a penetração na camada celular seja facilitada (KUNATH et al., 2003). A Figura 20 apresenta a porcentagem em número pelo diâmetro (nm) dos poliplexos de DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man.

Figura 20 - Medidas de porcentagem em número dos tamanhos dos poliplexos formados na razão N/P=15 em 25 °C para DNA/PEI, DNA/PEI-Lac, DNA/PEI-Mal e DNA/PEI-Man em solução aquosa tamponada (Hepes 25 mmol/L) em pH de 7,4.



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

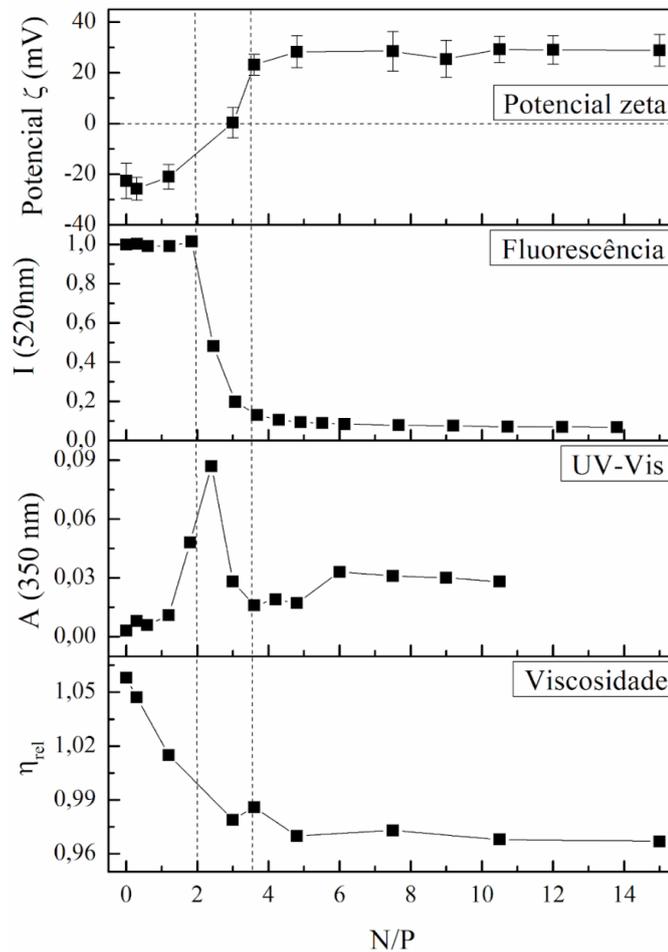
Os poliplexos formados que apresentaram menor tamanho foram de DNA/PEI e DNA/PEI-Man, com diâmetro de $58,8 \pm 23,7$ nm e $50,7 \pm 26,7$ nm, respectivamente. Como abordado anteriormente, o tamanho reduzido da manose produz baixos efeitos no comportamento da PEI em complexação com o DNA, comprovado pela semelhança de tamanhos dos poliplexos mencionados. Já os poliplexos de DNA/PEI-Lac e DNA/PEI-Mal apresentaram diâmetros de $68,1 \pm 45,7$ nm e $78,8 \pm 41,6$ nm, respectivamente. A lactose e maltose na estrutura do polímero tem influência no tamanho dos poliplexos, que registraram um diâmetro maior devido ao maior volume desses açúcares. É importante ressaltar que, mesmo em presença de açúcares

volumosos, a complexação das PEIs modificadas com o DNA produziu poliplexos que apresentaram tamanhos aceitáveis ao uso na terapia genética, mesmo em razões N/P superiores. Wang e colaboradores (WANG et al., 2021) estudaram a complexação do DNA com PEIs modificadas com ésteres para entrega de genes e observaram que, quanto maior a razão N/P, menor o tamanho do complexo gerado sendo 100 nm para razões N/P=14.

5.2.6 Estudo da interação do DNA com as PEIs modificadas

A Figura 19 mostra os gráficos de viscosidade relativa, potencial ζ , UV-Vis e fluorescência em diferentes razões N/P para o poliplexo de DNA/PEI. Para todas as técnicas utilizadas para acompanhar a formação dos poliplexos, as alterações nos valores obtidos foram observadas na mesma faixa de razão N/P, ou seja, a formação do coacervado, representado pela neutralidade de cargas resultante da condensação das cadeias aniônicas do DNA pelas cadeias catiônicas da PEI. Quando o coacervado foi formado apresentou diminuição da emissão de fluorescência pelo deslocamento do intercalante, valores de potencial ζ iguais a zero, redução da viscosidade relativa e efeito hipercrômico na absorbância do UV-Vis.

Figura 21 – Comparação entre potencial ζ , fluorescência, UV-Vis e viscosidade relativa para o poliplexo de DNA/PEI em função da razão N/P.

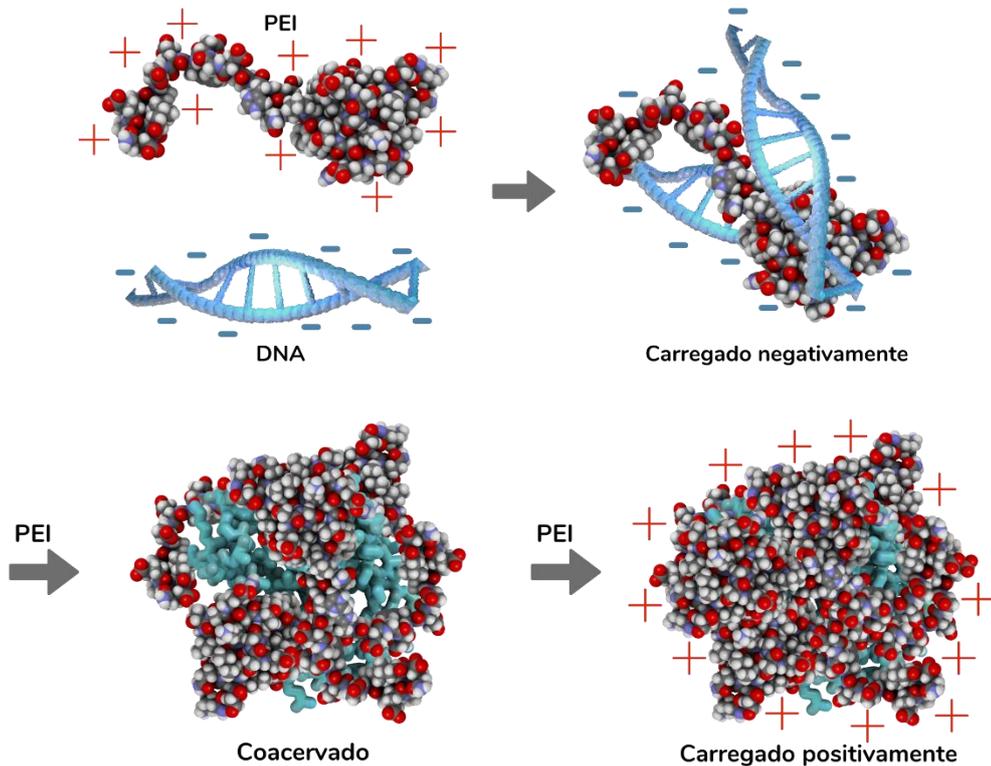


Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Wiethoff *et al.* (WIETHOFF *et al.*, 2003) estudaram a interação de DNA com PEI por fluorescência e demonstraram que a complexação ocorreu em razão N/P=3. Mady e colaboradores (MADY *et al.*, 2011) estudaram a complexação do DNA com PEI por fluorescência, UV-Vis e potencial ζ obtendo a formação do complexo coacervado em razão N/P=3, enquanto a formação do poliplexo carregado negativamente e positivamente ocorreu N/P<3 e >3, respectivamente. Esses resultados também foram verificados por Vuorimaa-Laukkanen e colegas (VUORIMAA-LAUKKANEN *et al.*, 2017) que observaram a formação do poliplexo de DNA/PEI por fluorescência. Choosahoonkriang *et al.* (CHOOSAKOONKRIANG *et al.*, 2003) usaram potencial ζ , dicroísmo circular e espalhamento de luz para investigar as interações eletrostáticas entre PEI e DNA resultando nas mudanças de resultado ocorrendo em razão N/P entre 2 e 4.

A Figura 22 mostra uma proposta de modelo representativo das etapas de interação entre os polímeros estudados com as cadeias de DNA, com base nos resultados obtidos e observados na literatura.

Figura 22 – Modelo de interação entre DNA e PEI em meio aquoso.



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Em baixas concentrações de PEI as cadeias de DNA ainda estão expostas ao solvente e parcialmente condensadas. Nesse momento, as interações eletrostáticas entre as cargas opostas direcionam a agregação. Em uma segunda etapa, ocorre a formação do coacervado, apresentando neutralidade de cargas em que as alterações nos resultados são observadas. Em razões N/P maiores há um excesso de cargas positivas no políplexo ocasionado pelas altas concentrações de PEI, resultando na formação de políplexos carregados positivamente.

6 CONCLUSÃO

A modificação da PEI com maltose, manose e lactose foi comprovada através de análises de FTIR e RMN ^1H possibilitando a identificação do grau de substituição da PEI-Lac e PEI-Mal de 13% e 18% para PEI-Man. O estudo da complexação da PEI pura e PEIs modificadas com DNA em diferentes razões N/P foi realizado através de espectrofotometria de UV-Vis, viscosimetria capilar, potencial ζ , espalhamento de luz dinâmico e intensidades de emissão de fluorescência do SYBR Green I. As técnicas utilizadas foram adequadas e apresentaram mudanças nas propriedades do poliplexo formado na mesma faixa de razão N/P, como: o efeito de hipercromismo nos espectros de UV-Vis; um decréscimo nos valores de η_{rel} ; inversão de cargas nas medidas de potencial ζ ; e redução da intensidade de emissão de fluorescência do SYBR Green I. A técnica de espalhamento de luz dinâmico ainda permitiu a obtenção do diâmetro dos poliplexos formados em razão N/P=15 resultando em tamanhos inferiores a 100 nm, correspondendo ao tamanho necessário para aplicação na terapia genética.

A formação do poliplexos compostos por DNA e PEI modificada com açúcares ou PEI pura apresentou três principais etapas, sendo elas de: (1) baixas concentrações de PEI ocasionando na condensação parcial das cadeias de DNA que ainda estão expostas ao solvente; (2) formação do complexo coacervado apresentando potencial ζ igual a zero onde as cadeias de DNA estão completamente condensadas; e (3) razões N/P maiores em que ocorre a formação de poliplexos carregados positivamente devido às altas concentrações de PEI.

O uso de diferentes técnicas para caracterização e estudo do comportamento das interações dos poliplexos formados comprovaram a importância dessa combinação para entender as diferentes etapas da complexação do DNA com as PEIs modificadas. Como perspectivas do presente trabalho, os resultados obtidos podem ser aplicados em estudos futuros de análises biológicas, como citotoxicidade e viabilidade celular dos poliplexos formados pelas PEIs modificadas para emprego na terapia genética.

REFERÊNCIA

AKINC, A. et al. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. **The Journal of Gene Medicine**, v. 7, n. 5, p. 657–663, 1 maio 2005.

ALBERTS, B. et al. Biologia molecular da célula. **Biologia Molecular da Célula**, 2017.

ALBUQUERQUE, L. J. C. et al. Sweet Vector for Gene Delivery: the Sugar Decoration of Polyplexes Reduces Cytotoxicity with a Balanced Effect on Gene Expression. **Macromolecular Bioscience**, v. 18, n. 2, p. 1–9, 2018.

APPELHANS, D. et al. Hyperbranched PEI with various oligosaccharide architectures: Synthesis, characterization, ATP complexation, and cellular uptake properties. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 5, p. 1114–1124, 2009.

ARRUDA, DANIELLE C.; HOFFMANN, CÉLINE; CHARRUEAU, CHRISTINE; BIGEY, PASCAL; ESCRIOU, V. Centro de Ciências | Vetores não virais inovadores para entrega e terapia de RNA de pequena interferência. Nanoestruturas para Nova Terapia, 713–740 | 10.1016/b978-0-323-46142-9.00026-8. In: **Nanostructures for Novel Therapy**. [s.l: s.n.].

BALDASSI, D. et al. Inhibition of SARS-CoV-2 replication in the lung with siRNA/VIPER polyplexes. **Journal of Controlled Release**, v. 345, p. 661–674, 1 maio 2022.

BELLETTINI, I. C. et al. PS-b-PAA nanovesicles coated by modified PEIs bearing hydrophobic and hydrophilic groups. **Journal of Molecular Liquids**, v. 210, p. 29–36, 2015.

BELLETTINI, I. C. et al. Properties of polyplexes formed through interaction between hydrophobically-modified poly(ethylene imine)s and calf thymus DNA in aqueous solution. **Soft Matter**, v. 13, n. 14, p. 2609–2619, 2017.

BLESSING, T. et al. Different strategies for formation of PEGylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 529–537, 2001.

BOLT0, B. A. SOLUBLE POLYMERS IN WATER PURIFICATION. **Pergamon Prog. Polym. Sci**, v. 20, p. 987–1041, 1995.

BOUSSIF, O. et al. 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, n. 16, p. 7297–7301, 1995.

CHEN, Z. et al. Preparation of polyethyleneimine-modified chitosan/Ce-UIO-66 composite hydrogel for the adsorption of methyl orange. **Carbohydrate Polymers**, v. 299, 1 jan. 2023.

CHOLLET, P. et al. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. **Journal of Gene Medicine**, v. 4, n. 1, p. 84–91, 2002.

CHOOSAKOONKRIANG, S. et al. Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 8, p. 1710–1722, 2003.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. [s.l: s.n.]. v. 1

DAUTZENBERG, H. Polyelectrolyte complex formation: Role of a double hydrophilic polymer. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 201, n. 14, p. 1765–1773, 2000.

DRAGAN, A. I. et al. SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. **Journal of Fluorescence**, v. 22, n. 4, p. 1189–1199, 2012.

DRAGAN, E. S.; MIHAI, M.; SCHWARZ, S. Polyelectrolyte complex dispersions with a high colloidal stability controlled by the polyion structure and titrant addition rate. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 290, n. 1–3, p. 213–221, 2006.

DREW MYERS. **Emulsions. Surfaces, Interfaces, and Colloids.** [s.l: s.n.], v. 4

EUSÉBIO, D. et al. Mannosylated polyethylenimine-cholesterol-based nanoparticles for targeted delivery of minicircle DNA vaccine against COVID-19 to antigen-presenting cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 654, n. January, 2024.

FUMOTO, S. et al. Analysis of Hepatic Disposition of Native and Galactosylated Polyethylenimine Complexed with Plasmid DNA in Perfused Rat Liver. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 18, n. 4, p. 230–237, 2003.

GHOSH, A.; BANSAL, M. A glossary of DNA structures from A to Z. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, v. 59, n. 4, p. 620–626, 1 abr. 2003.

GIBNEY, K. A. et al. Poly(ethylene imine)s as antimicrobial agents with selective activity. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 9, p. 1279–1289, 2012.

GODBEY, W. T.; WU, K. K.; MIKOS, A. G. Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. **Biomaterials**, v. 22, n. 5, p. 471–480, 2001.

GUSTAVSSON, T.; MARKOVITSI, D. Fundamentals of the Intrinsic DNA Fluorescence. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 5, p. 1226–1235, 2021.

HAN, M. J.; CHANG, J. Y. Advances in Polymer Science, v.153. Biopolymers, PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites, 2000, p.204. v. 153, 2000.

HELLWEG, T. et al. Interaction of short DNA fragments with the cationic polyelectrolyte poly(ethylene imine): A dynamic light scattering study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 163, n. 1, p. 71–80, 2000.

HSU, C. Y. M.; ULUDAĞ, H. Nucleic-acid based gene therapeutics: Delivery challenges and modular design of nonviral gene carriers and expression cassettes to overcome intracellular barriers for sustained targeted expression. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 4, p. 301–328, 2012.

JÄGER, M. et al. Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: Synthetic modification, characterization, and application. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 13, p. 4755–4767, 2012.

JIANG, C. et al. Polyethyleneimine-modified lobster shell biochar for the efficient removal of copper ions in aqueous solution: Response surface method optimization and adsorption mechanism. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 6, 1 dez. 2022.

KAM, S.-K.; GREGORY, J. THE INTERACTION OF HUMIC SUBSTANCES WITH CATIONIC POLYELECTROLYTES. **Wat. Res**, v. 35, n. 15, p. 3557–3566, 2001.

KETOLA, T. M. et al. Role of polyplex intermediate species on gene transfer efficiency: Polyethylenimine-DNA complexes and time-resolved fluorescence spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 8, p. 1895–1902, 2011.

KUNATH, K. et al. Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: Degree of substitution affects complex size and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 88, n. 1, p. 159–172, 2003.

KURLYKIN, M. P.; GOLOVINA, M. A.; TENKOVTSSEV, A. V. Mendeleev Communications New type polyrotaxanes based on polyethyleneimine and a cyclodextrin. **Mendeleev Commun**, v. 33, p. 360–361, 2023.

LE CERF, D. et al. Contribution of flow field flow fractionation with on line static and dynamic light scattering to the study of hydrosoluble polyelectrolyte complexes. **Analytica Chimica Acta**, v. 604, n. 1, p. 2–8, 2007.

LEI, X. et al. Removal of perfluorooctanoic acid via polyethyleneimine modified graphene oxide: Effects of water matrices and understanding mechanisms. **Chemosphere**, v. 308, 1 dez. 2022.

LYKLEMA, J. The bottom size of colloids. **Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences**, v. 53, n. 4, p. 317–323, 2005.

MADY, M. M. et al. Effect of Polymer Molecular Weight on the Dna/Pei Polyplexes Properties. **J. Biophys**, v. 21, n. 2, p. 151–165, 2011.

MORRIS, M. C. et al. Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 5, p. 461–466, 1 out. 2000.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy fifth edition**. [s.l: s.n.].

PEÑAS-SANJUÁN, A. et al. Carbon-supported statistically distributed polyethyleneimine/palladium (II) complexes as efficient and sustainable Sonogashira catalysts. **Reactive and Functional Polymers**, v. 190, p. 105643, 2023.

PINELLI, F. et al. On the influence of polyethyleneimine modification in nanogel-driven drug delivery. 2022.

POHL, F. M.; JOVIN, T. M. Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: Equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC). **Journal of Molecular Biology**, v. 67, n. 3, p. 375–396, 28 jun. 1972.

PORTIN, P.; WILKINS, A. The Evolving Definition of the Term “ Gene ”. v. 205, n. April, p. 1353–1364, 2017.

REMY, J. S. et al. Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 30, n. 1–3, p. 85–95, 1998.

ROLLAND, A. Gene medicines: The end of the beginning? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 5, p. 669–673, 5 abr. 2005.

ROUTIER, C. et al. Chitosan-Modified Polyethyleneimine Nanoparticles for Enhancing the Carboxylation Reaction and Plants' CO₂ Uptake. **ACS Nano**, v. 17, n. 4, p. 3430–3441, 2023.

SALMASI, Z. et al. Heterocyclic amine-modified polyethylenimine as gene carriers for transfection of mammalian cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 96, p. 76–88, 2015.

SCHWARZ, S. et al. Formation of polyelectrolyte complexes in a polycarboxybetaine/weak polyanion system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 276, n. 1–3, p. 65–71, 2006.

SHARMA, A. et al. Polyethylenimine-conjugated gold nanoparticles: Gene transfer potential and low toxicity in the cornea. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 4, p. 505–513, 2011.

SINGH, M. K.; SINGH, A. Fourier transform infrared (FTIR) analysis. **Characterization of Polymers and Fibres**, p. 295–320, 1 jan. 2022.

SIRAJUDDIN, M.; SAQIB, A. †; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. 2013.

SOUZA, A. P. DE. Transferência Gênica De Fibroblastos, Oócitos E Embriões Suínos Mediada Por Polietilenoimina. p. 1–87, 2019.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.

STEVENS, M. J. Simple simulations of DNA condensation. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 1, p. 130–139, 2001.

STYLIANOPOULOS, C. Carbohydrates: Chemistry and Classification. **Encyclopedia of Human Nutrition**, v. 1–4, p. 265–271, 1 jan. 2012.

VETTER, V. C.; WAGNER, E. Targeting nucleic acid-based therapeutics to tumors: Challenges and strategies for polyplexes. **Journal of Controlled Release**, v. 346, p. 110–135, 1 jun. 2022.

VON ZELEWSKY, A.; BARBOSA, L.; SCHLÄPFER, C. W. Poly(ethylenimines) as Brønsted bases and as ligands for metal ions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 123, n. 1–2, p. 229–246, 1993.

VUORIMAA-LAUKKANEN, E. et al. Difference in the core-shell dynamics of polyethyleneimine and poly(L-lysine) DNA polyplexes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. December 2016, p. 122–127, 2017.

WAGNER, E. Strategies to Improve DNA Polyplexes for in Vivo Gene Transfer: Will “Artificial Viruses” Be the Answer? 2004.

WANG, G. et al. Virus-mimetic DNA-ejecting polyplexes for efficient intracellular cancer gene delivery. **Nano Today**, v. 39, 2021.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature** **1953** **171**:4356, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 25 abr. 1953.

WIEGAND, C. et al. Poly(ethyleneimines) in dermal applications: biocompatibility and antimicrobial effects. **International journal of pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 165–174, 2013.

WIETHOFF, C. M. et al. A fluorescence study of the structure and accessibility of plasmid DNA condensed with cationic gene delivery vehicles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 6, p. 1272–1285, 2003.

YAMANO, S.; DAI, J.; MOURSI, A. M. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. **Molecular Biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 287–300, 2010.

YANG, S. et al. Optimized PEI-based Transfection Method for Transient Transfection and Lentiviral Production. **Current protocols in chemical biology**, v. 9, n. 3, p. 147–157, 2017.

ZHANG, C. et al. Polyethyleneimine (PEI) and Chitosan (CS) grafted with L-cysteine were used as effective materials for Hg(II) adsorption. 2023.

ZIPPER, H. et al. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 12, 2004.