



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

Ana Caroline Fontanella

**Modificação da polietilenoimina com aminoácidos e estudo de interação com
o DNA**

Blumenau
2024

Ana Caroline Fontanella

**Modificação da polietilenoimina com aminoácidos e estudo de interação com
o DNA**

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

Orientador: Prof. Ismael Casagrande Bellettini, Dr.

Blumenau

2024

Fontanella, Ana Caroline

Modificação da polietilenoimina com aminoácidos e estudo de interação com o DNA / Ana Caroline Fontanella ; orientador, Ismael Casagrande Bellettini, 2024.

48 p.

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

Inclui referências.

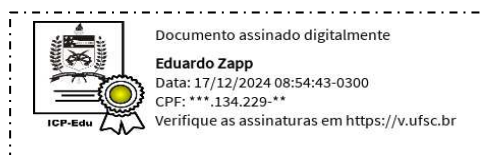
1. Química - Bacharelado. 2. Polímeros. 3. Políplexos. 4. Polietilenoimina. 5. DNA. I. Bellettini, Ismael Casagrande. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. III. Título.

Ana Caroline Fontanella

Modificação da polietilenoimina com aminoácidos e estudo de interação com o DNA

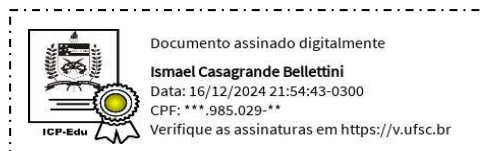
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela em Química e aprovado em sua forma final pelo Curso de Bacharelado em Química.

Blumenau, 06 de dezembro de 2024.

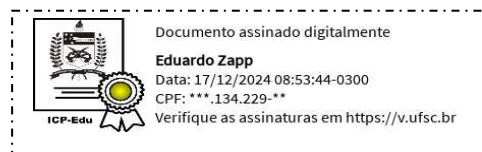


Coordenação do Curso

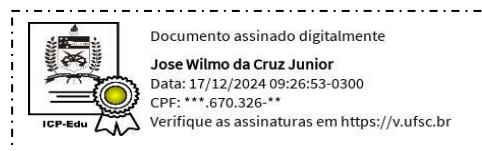
Banca examinadora



Prof. Ismael Casagrande Bellettini, Dr.
Orientador



Prof. Eduardo Zapp, Dr.
Instituição UFSC



Prof. José Wilmo, Dr.
Instituição UFSC

Blumenau, 2024.

À minha mãe, Geni, e à minha irmã, Debora: se cheguei onde cheguei,
sendo quem eu sou, devo a vocês. Sempre nós três.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à minha mãe e à irmã por sempre acreditarem no meu potencial, pelo incentivo a buscar os meus sonhos e pelo amor incondicional que mesmo com a distância sempre se fez presente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ismael Bellettini, por todo o conhecimento compartilhado, pela parceria, compreensão e pelos momentos em que tomou o lugar de terapeuta tentando acalmar minha ansiedade.

Ao meu esposo, Gustavo, pelo amparo em todas as esferas da vida e por embarcar junto comigo na luta por esta conquista.

Ao meu Gato, pelo amparo emocional e por me lembrar muitas vezes da hora de dar um tempo nos estudos pra fazer um carinho ou encher o pote de ração.

A todos os amigos, tanto os que vieram antes quanto os que vieram durante o período da graduação, pelo incentivo e pela força.

Ao meu trio, Maria Paula e Leonardo, por todas as risadas e companheirismo, além da parceria e paciência em cada trabalho em grupo realizado.

Aos colegas e professores do CReATe por todas as fofocas e risadas durante as horas experimentais e de (tentativa) de estudo.

Aos professores Dr. Eduardo Zapp, Dr. José Wilmo da Cruz Junior e Dra. Lidiane Meier, por aceitarem colaborar com o trabalho ao compor a banca examinadora.

A todo corpo docente do curso, por serem mais que professores excelentes, mas também seres humanos incríveis. Cada um de vocês ensinou alguma coisa muito além do conteúdo programático de suas disciplinas.

Ao CNPQ pelo provento que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A terapia gênica tem sido alvo de diversos estudos para o tratamento de diversas doenças, especialmente no que tange o desenvolvimento de bons vetores para a entrega de material genético. Neste âmbito, buscando uma alternativa ao uso de vetores virais, a polietilenoimina (PEI) tem sido amplamente estudada. Sua natureza catiônica possibilita a formação de poliplexos com o DNA, permitindo a permeação desse complexo na membrana celular e posterior liberação do material genético no ambiente intracelular. A PEI desempenha um excelente papel na interação com o DNA e transfecção gênica, porém a PEI de 25.000 g mol⁻¹, a mais utilizada nas pesquisas, apresenta considerável citotoxicidade, enquanto suas correspondentes de baixa massa molar apresentam baixa ou nenhuma citotoxicidade, apesar de serem menos eficiente na complexação com o DNA e consequentemente na eficiência de transfecção. Com base no exposto, o presente estudo visou a modificação estrutural da PEI 2.000 g mol⁻¹ com os aminoácidos cisteína (PEI-Cis) e histidina (PEI-His) e a avaliação do efeito de tais modificações na interação desses oligômeros com o DNA de timo de bezerro (ctDNA). Os resultados obtidos demonstraram o sucesso das reações de modificação sem apresentar prejuízos à capacidade de complexação das PEIs modificadas com o ctDNA, com as análises de interação PEIs/ctDNA indicando a completa complexação em razões N/P entre 1 e 5. Além disso, em razão nitrogênio/fosfato (N/P) 15 os poliplexos apresentaram ζ de 20,9 mV, 22,3 mV e 23,1 mV e diâmetros médios de 138,5 nm, 142,8 nm e 176,6 nm para PEI/ctDNA, PEI-Cis/ctDNA e PEI-His/ctDNA, respectivamente, sendo tais características consideradas adequadas para a permeação celular de acordo com a literatura.

Palavras-chave: PEI; DNA; terapia gênica; aminoácidos; poliplexos.

ABSTRACT

Gene therapy has been the subject of several studies for the treatment of various diseases, especially with regard to the development of good vectors for the delivery of genetic material. In this context, seeking an alternative to the use of viral vectors, polyethyleneimine (PEI) has been widely studied. Its cationic nature enables it to form polyplexes with the DNA, allowing this complex to permeate the cell membrane and subsequently release the genetic material into the intracellular environment. PEI plays an excellent role in interaction with DNA and gene transfection, but PEI of 25,000 g mol⁻¹, the most widely used in research, shows considerable cytotoxicity, while its lower molar mass counterparts show little or no cytotoxicity, despite being less efficient in complexing with DNA and consequently in transfection efficiency. Based on the above, this study aims to modify the structure of PEI 2,000 g mol⁻¹ with the amino acids cysteine (PEI-Cis) and histidine (PEI-His) and evaluate the effect of these modifications on the interaction of these oligomers with calf thymus DNA. The results obtained showed that the modification reactions were successful without jeopardising the modified PEIs' ability to complex with ctDNA. The PEIs/ctDNA interaction analyses indicated complete complexation at N/P ratios between 1 and 5. In addition, nitrogen/phosphate ratio (N/P) 15, the polyplexes showed ζ of 20.9 mV, 22.3 mV and 23.1 mV and average diameters of 138.5 nm, 142.8 nm and 176.6 nm for PEI/ctDNA, PEI-Cis/ctDNA and PEI-His/ctDNA, respectively, and these characteristics are considered suitable for cell permeation according to the literature.

Keywords: PEI; DNA, gene therapy, amino acids, polyplexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da PEI ramificada	15
Figura 2 - Esquema da estrutura de dupla hélice do DNA (A) e orientação espacial dos grupos fosfato, bases nitrogenadas e desoxirribose (B)	17
Figura 3 - Estrutura química geral de um α -aminoácido	19
Figura 4 - Estrutura química da histidina	20
Figura 5 - Estrutura química da cisteína	21
Figura 6 - Esquema da complexação entre DNA e PEI em solução	23
Figura 7 - Representação esquemática dos procedimentos de modificação da PEI e caracterização dos produtos	25
Figura 8 - Estrutura química da PEI modificada com aminoácido	28
Figura 9 - Esquema do mecanismo de acoplamento com EDC/NHS	29
Figura 10 - Espectros de FTIR da PEI, PEI-His e PEI-Cis	29
Figura 11 - Espectros de ^1H RMN [400 MHz, D_2O , δ (ppm)] da PEI-Cis e Cisteína (A) e PEI-His e Histidina (B)	31
Figura 12 - Espectro de UV-Vis em diferentes razões N/P para os poliplexos ctDNA/PEI-Cis	33
Figura 13 - Curva de absorção máxima ($A_{260\text{ nm}}$) em função de diferentes razões N/P para os poliplexos formados entre o DNA e a PEI em suas versões pura e modificadas	34
Figura 14 - estrutura química do corante SYBR Green I	36
Figura 15 - Intensidade de emissão de fluorescência normalizada vs razões N/P para PEI-Cis, PEI-His e PEI	36
Figura 16 - Potencial ζ dos complexos ctDNA/PEIs em função das razões N/P em tampão Hepes (pH 7,4)	38
Figura 17 - Gráficos comparativos entre (a) fluorescência (b) UV-vis e (c) potencial ζ para os complexos PEIs/ctDNA	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEI	Polietilenoimina
Cis	Cisteína
His	Histidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic acid)
ctDNA	DNA de Timo de Bezerro
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês Fourier transform infrared spectroscopy)
^1H RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
UV-Vis	Espectrofotometria no Ultravioleta e Visível
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês Dynamic light scattering)
ζ	Potencial Zeta
RENETA	Rede Nacional de Especialistas em Terapias Avançadas
PLL	Poli(L-lisina)
PAMAM	Poliamidoamina
N/P	Nitrogênio/Fosfato
U_E	Mobilidade Eletroforética
ELS	Dispersão de Luz Eletroforética (do inglês Electrophoretic light scattering)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxissuccionimida
PDI	Índice de Polidispersão (do inglês Polydispersity index)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	TERAPIA GÊNICA	13
3.2	POLIELETRÓLITOS E POLIPLEXOS	14
3.3	POLIETILENOIMINA (PEI)	15
3.4	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)	16
3.5	MODIFICAÇÕES DA PEI	18
3.6	AMINOÁCIDOS	19
3.6.1	Histidina	20
3.6.2	Cisteína	21
3.7	INTERAÇÃO PEI/DNA	22
4	METODOLOGIA	24
4.1	REAGENTES	24
4.2	REAÇÕES DE MODIFICAÇÃO DA PEI E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS	24
4.2.1	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	25
4.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (¹H RMN)	25
4.3	ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE PEIs E ctDNA	26
4.3.1	Espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-vis)	26
4.3.2	Fluorescência	26
4.3.3	Potencial zeta	27
4.3.4	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	27
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	28
5.1	REAÇÕES DE MODIFICAÇÃO DA PEI	28
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS PEIs MODIFICADAS	29
5.2.1	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	29

5.2.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (¹H RMN)	30
5.3	ESTUDO DE INTERAÇÃO DAS PEIs COM ctDNA	32
5.3.1	Espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-vis)	32
5.3.2	Fluorescência	35
5.3.3	Potencial zeta (ζ)	37
5.3.4	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	39
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE A - Relações de volume calculadas para cada razão N/P considerando soluções de concentração 0,2 mg mL⁻¹	47

1 INTRODUÇÃO

Desde o primeiro contato da ciência com o DNA até os dias atuais a complexidade desta macromolécula em sua estrutura e funções desperta o interesse de pesquisadores das mais diversas áreas. Na década de setenta, o professor Paul Berg de Stanford desenvolveu a técnica de DNA recombinante para fazer manipulações genéticas, tendo como lampejo inicial para o desenvolvimento de tal técnica a forma de apresentação de doenças monogênicas dando início ao que hoje se conhece por terapia gênica (RABELO *et al.*, 2018).

Muito embora as doenças monogênicas tenham sido o estopim das pesquisas acerca da manipulação genética para fins terapêuticos, em pouco tempo o foco dos estudos migrou para o tratamento dos mais diversos tipos de câncer e até o ano de 2018, cerca de 65% de todos os testes clínicos de terapia gênica eram destinados a pacientes oncológicos (RABELO *et al.*, 2018).

Para que a manipulação genética tenha aplicação terapêutica, são necessários vetores de entrega de genes eficazes, neste aspecto é possível dividir estes vetores em duas grandes classes: os virais e os não virais. Ainda que os vetores virais possuam intrinsecamente alta habilidade de transfecção gênica, muitas vezes acabam gerando respostas imunes do organismo além de terem alto custo atrelado a sua produção (SHYRLEI *et al.*, 2020; FOLDVARI *et al.*, 2016).

Como alternativa ao uso de vetores virais, têm sido desenvolvidas pesquisas em torno da aplicação de polímeros catiônicos para este fim e entre os polieletrólitos estudados evidencia-se a polietilenoimina (PEI). Os polímeros são capazes de formar poliplexos com o DNA através da interação de suas cargas positivas com as cargas negativas dos grupos fosfato do ácido nucleico, e após atravessar a parede celular, pela diferença de pH extra e intracelular, o material genético é liberado dentro da célula (YUE; WU, 2013).

A PEI, especialmente de $25.000 \text{ g mol}^{-1}$, apresenta bons resultados em interação com o DNA e transfecção gênica quando comparada a outros polímeros estudados, por outro lado, sua citotoxicidade não pode ser ignorada. Existe uma relação de acréscimo de citotoxicidade com o aumento da massa molar da PEI, porém suas correspondentes de baixa massa molar não demonstram resultados satisfatórios em relação à transfecção gênica (WAGNER *et al.*, 2013).

Neste cenário, o presente trabalho objetivou realizar modificações com aminoácidos na estrutura da PEI de baixa massa molar (2.000 g mol^{-1}) visando o aprimoramento de sua interação com o DNA e consequente melhoria da habilidade como vetor de terapia gênica sem a indesejada citotoxicidade atrelada ao polímero correspondente de massa molar mais alta.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a complexação da PEI modificada com os aminoácidos cisteína e histidina com o DNA de timo de bezerro (ctDNA).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar quimicamente a PEI com os aminoácidos cisteína e histidina;
- Caracterizar as PEIs modificadas por meio de análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H RMN);
- Estudar as interações do ctDNA com as PEIs modificadas por meio de espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-vis), espalhamento dinâmico de luz (DLS), fluorescência e potencial zeta (ζ).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 TERAPIA GÊNICA

O aprimoramento genético feito através de correções ou modificações dos genes com fins terapêuticos pode ser colocado como uma definição simplificada para a terapia gênica. Para o funcionamento deste modelo terapêutico, se faz necessário o uso de vetores que possam entregar o material genético responsável por esta modificação nas células de interesse, tais vetores podem ser divididos em dois grandes grupos: vetores virais e vetores não virais (GONÇALVES; PAIVA, 2017).

Segundo relatório da Rede Nacional de Especialistas em Terapias Avançadas (RENETA) até o ano de 2020 haviam nove produtos de terapia gênica com registro para comercialização, dentre estes, apenas um deles não faz uso de vetores virais, sejam eles para aplicação direta ou indireta (*ex-vivo*) (CARVALHO *et al.*, 2020; ZYNTEGLO™, 2023; BRASIL, 2022; AMSTERDÃ, [2016]).

Os vetores virais são, sem dúvidas, os mais estudados para aplicação na terapia gênica, isso porque entre os critérios para que se tenha um bom vetor para terapia gênica, o primeiro é a alta capacidade de transportar e entregar material genético nas células de interesse, característica essa atendida naturalmente pelos vírus. Por outro lado, ainda que os vetores virais sejam trabalhados com o objetivo de eliminar a patogenicidade encontrada em seus correspondentes de ocorrência natural, o sistema imune humano é tão apurado que ainda assim é capaz de detectar e tentar expulsar o organismo estranho que recebe, em forma de reações muitas vezes tão graves que podem inviabilizar o tratamento (SHIRLEY *et al.*, 2020).

Uma prática comum para driblar a imunogenicidade dos vetores virais é a administração de imunossupressores em paralelo ao tratamento de terapia gênica, porém o paciente pode ter problemas de saúde secundários decorrentes do uso de drogas imunossupressoras em altas doses e/ou por longos períodos (FOLDVARI *et al.*, 2016). Esta falha do vetor coloca em vista a importância de pesquisas em cima de vetores não virais, que além da vantagem em relação à baixa resposta imune do corpo, apresenta-se de forma economicamente mais viável.

Dentre as alternativas ao uso de vetores virais, os polímeros são muito estudados, especialmente os polieletrólitos catiônicos por sua possibilidade de complexação com moléculas de ácidos nucleicos. Além disso, suas características físico químicas conferem relativa facilidade em possíveis modificações químicas visando aprimoramento em determinadas funções a serem desempenhadas por estes materiais (YUE; WU, 2013).

3.2 POLIELETRÓLITOS E POLIPLEXOS

Polieletrólitos são macromoléculas com grupos ionizáveis em meio aquoso. Estas macromoléculas podem ser de ocorrência natural ou sintética e suas características específicas as fazem úteis para diversas aplicações (AKYOL; KIRBOGA; ONER, 2014), como por exemplo no tratamento de água, com estudos acerca de sua aplicação em sistemas para a remoção de íons metálicos presentes (MAGNET *et al.*, 2012; WAN *et al.*, 2022) ou ainda aplicações na biotecnologia, valendo-se da característica de polieletrólito dos ácidos nucleicos para formação de poliplexos com polímeros catiônicos naturais e/ou sintéticos (ARANDA-BARRADAS *et al.*, 2022; LIU; HU; FENG, 2020; YUE; WU, 2013).

Diversos estudos acerca de vetores de entrega de genes baseiam-se em polímeros catiônicos encontrados de forma comercial, sendo os três mais utilizados nas pesquisas a polietilenoimina (PEI), a poli(L-lisina) (PLL) e a poliamidoamina (PAMAM), dentre estes, a PEI tomou destaque por conta de sua capacidade de transfecção elevada em relação aos outros citados, embora ainda não seja o suficiente para competir com os vetores virais quando se trata desta mesma habilidade (YUE; WU, 2013).

Quando em contato com macromoléculas de carga oposta, os polieletrólitos podem formar complexos, chamados poliplexos. Dada a origem eletrostática das interações dos poliplexos, a sua formação e estabilidade são intimamente relacionadas a características como massa molar e nível de ramificação da molécula, já que tais características interferem direta e significativamente na densidade de carga da espécie (JÄGER *et al.*, 2012).

Muito embora se trate da formação dos poliplexos por termos eletrostáticos, o que sugere que o processo segue uma lei entálpica, na verdade o que rege essa interação é um processo entrópico (YUE; WU, 2013). Polieletrólitos, quando em

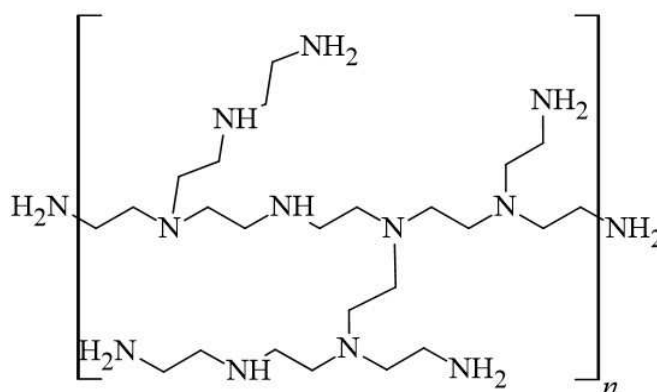
solução, possuem uma dupla camada elétrica, quando ocorre a formação de um poliplexo essa dupla camada elétrica é parcialmente destruída em ambas macromoléculas envolvidas e os contra-íons até então limitados a uma determinada região são liberados para a solução, implicando em um aumento da entropia. Nota-se que, isso não significa que a formação do poliplexo não poderá ser entalpicamente favorável, o que ocorre é que esse não será o fator determinante já que em casos nos quais a solução é mais concentrada e/ou os polieletrólitos possuem maior carga a variação de entalpia será positiva mas ainda assim não impedirá que o processo ocorra espontaneamente (VAN DER GUCHT *et al.*, 2011).

3.3 POLIETILENOIMINA (PEI)

A polietilenoimina (PEI) é um polímero sintético cuja estrutura pode ser linear ou ramificada (Figura 1). A PEI ramificada é polimerizada por abertura de anel à partir da molécula aziridina, a PEI linear também pode ser sintetizada desta forma, porém o mais comum é a obtenção por meio da hidrólise de poli(2-oxazolina)s (ZHANG *et al.*, 2022; TAUHARDT *et al.*, 2011).

Sua estrutura consiste em uma cadeia heterogênea com a presença de aminas, sendo estas aminas exclusivamente secundárias no caso da PEI linear (KAFIL; OMIDI, 2011) e na proporção de 1: 2: 1 de aminas primárias, secundárias e terciárias, respectivamente no caso da PEI ramificada, embora esta razão possa ser diferente a depender das condições reacionais da polimerização (HOLYCROSS; CHAI, 2013; YUE; WU, 2013).

Figura 1 - Estrutura química da PEI ramificada.



Fonte: elaborado pela autora.

Dentre as características mais importantes da PEI, pode se citar o valor de pK_a de cada grupo amino presente, pois através desta informação é possível mensurar as condições reacionais mais adequadas ao trabalhar com este composto. As aminas primárias da PEI ramificada apresentam pK_a de 9,4, as aminas secundárias possuem pK_a variando de 4,4 a 8,6 a depender de sua vizinhança dentro da cadeia polimérica, já para as aminas terciárias a protonação dependerá de um ambiente químico bastante ácido, pois devido a sua vizinhança química deficiente em elétrons, apresenta um pK_a bastante baixo (HOLYCROSS; CHAI, 2013).

Uma característica decorrente da presença de grupamentos amino com diferentes pK_a 's na cadeia polimérica da PEI é sua alta capacidade tamponante que provoca o efeito de esponja de prótons. Supõe-se que a ação deste efeito na transfecção gênica seja associada ao aumento da pressão osmótica após a protonação destes grupos, levando ao rompimento do endossomo (YUE; WU, 2013).

Embora a variação na massa molar de um polímero não implique mudanças em sua composição química, observa-se que a PEI apresenta uma redução significativa em sua toxicidade quando a massa molar diminui de $25.000 \text{ g mol}^{-1}$ para 2.000 g mol^{-1} . No entanto, a eficiência de transfecção tende a aumentar com o aumento da massa molar da PEI. Para razões PEI/DNA de até 10, a eficiência de transfecção da PEI com massa molar de 2.000 g mol^{-1} é muito baixa ou indetectável, enquanto a PEI com massa molar de $25.000 \text{ g mol}^{-1}$ exibe altos valores de transfecção mesmo em razões baixas (como 5). Mesmo quando a razão PEI 2.000 g mol^{-1} /DNA é o dobro da razão PEI $25.000 \text{ g mol}^{-1}$ /DNA, a eficiência de transfecção da PEI de 2.000 g mol^{-1} ainda é inferior à da PEI de 25.000 g/mol . No que se refere à citotoxicidade, a PEI de maior massa molar pode apresentar um grau de citotoxicidade até aproximadamente 75% maior do que a sua contraparte de baixa massa molar (DUBE *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2013).

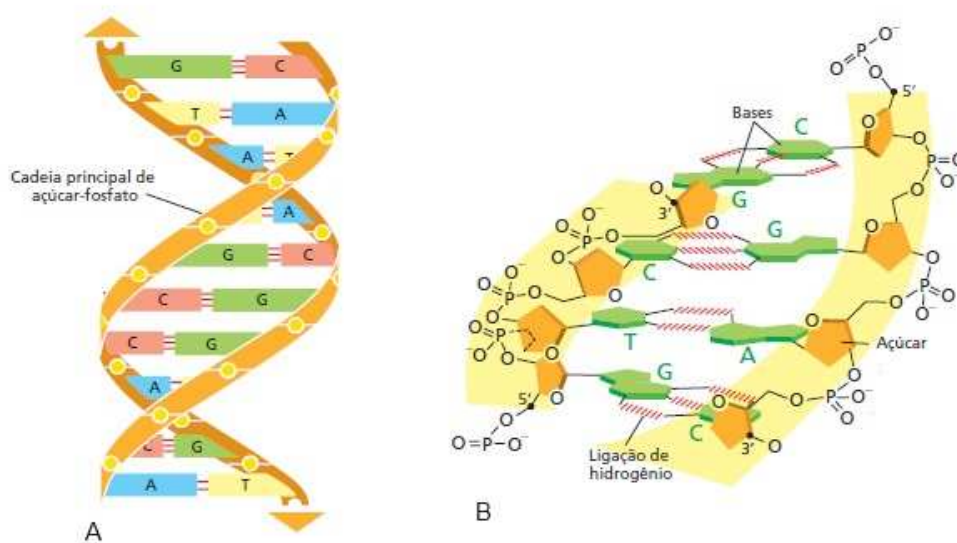
3.4 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

A estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA - do inglês Deoxyribonucleic acid) consiste em duas cadeias poliméricas compostas por quatro meros diferentes, os nucleotídeos. Tais nucleotídeos são formados pela desoxirribose ligada a um

grupo fosfato e uma base nitrogenada que pode ser adenina, citosina, guanina ou timina (ALBERTS *et al.*, 2017).

A ligação entre as duas cadeias poliméricas ocorre por meio de ligação de hidrogênio entre duas bases nitrogenadas, sendo que a adenina somente poderá se ligar à timina e a citosina poderá se ligar somente a guanina e vice-versa, isso porque a adenina e a guanina são bases bicíclicas (purinas), enquanto a citosina e a timina são monocíclicas (pirimidinas), e esta limitação das ligações garante que as duas cadeias desoxirribose-fosfato sejam equidistantes em qualquer lugar da estrutura, assim obtêm-se uma molécula onde as bases estão voltadas para o interior e os pares desoxirribose-fosfato para o exterior, se conformando em posição de dupla hélice para otimizar o empilhamento das bases no interior da molécula (Figura 2), a esta conformação é dado o nome de B-DNA e além desta existem ainda as conformações A-DNA e Z-DNA, que são encontradas apenas em ambientes químicos e biológicos mais específicos (ALBERTS *et al.*, 2017).

Figura 2 - Esquema da estrutura de dupla hélice do DNA (A) e orientação espacial dos grupos fosfato, bases nitrogenadas e desoxirribose (B).



Fonte: adaptado de Alberts *et al.* (2017).

As bases nitrogenadas que compõem o DNA, purinas e pirimidinas, são bases fracas e de estrutura aromática, devido a esta estrutura de duplas ligações conjugadas, é associado ao DNA (e outros ácidos nucleicos) um comprimento de onda de máxima absorção característico de 260 nm, possibilitando um método de

análise simples para estudos envolvendo esta classe de moléculas (NELSON; COX, 2014).

3.5 MODIFICAÇÕES DA PEI

Quando em razões PEI/DNA adequadas, concomitante ao aumento da massa molar da PEI, há o aumento da afinidade desta com os ácidos nucleicos (WAGNER *et al.*, 2013). Neste caso parece pertinente utilizar PEI com massa molar tão alta quanto possível para aplicações em terapia gênica, porém, ao avaliar a citotoxicidade de PEI's de diferentes massas molares, foi constatado o aumento da citotoxicidade para as moléculas de maior massa molar (WAGNER *et al.*, 2013), portanto se faz necessário encontrar o equilíbrio entre eficiência de complexação e citotoxicidade para uma aplicação segura e efetiva em tratamentos medicinais.

Assim, acreditando no potencial da PEI como vetor na terapia gênica, mas reconhecendo suas limitações, diversos estudos foram desenvolvidos visando o aprimoramento de suas características a partir de modificações em sua estrutura, podendo alterar aspectos como eficiência de complexação e/ou liberação de genes e atenuação da citotoxicidade.

Albuquerque e colaboradores (2018) modificaram a PEI ramificada ($25.000 \text{ g mol}^{-1}$) com lactose, os resultados apresentaram um considerável decréscimo na interação do polímero com o DNA, porém a PEI-lactose foi considerada livre de citotoxicidade enquanto a captação celular não foi prejudicada.

Enquanto de um lado há estudos de modificação da PEI que visam atenuar os efeitos citotóxicos da PEI $25.000 \text{ g mol}^{-1}$, outros buscam aprimorar características de transfecção e interação com o DNA de PEIs com massa molar mais baixa, conhecidamente menos tóxicas.

Neste cenário Karimov *et al.* (2021) obtiveram significativo aprimoramento de biocompatibilidade e eficiência de transfecção para a PEI de baixa massa molar (2.000 g mol^{-1}) combinando reticulação com dissulfeto e posterior modificação com tirosina. Com objetivo análogo, Wu *et al.* (2020) estudou os efeitos de modificação da PEI 600 g mol^{-1} com três diferentes aminoácidos, chegando a características bastante próximas à da PEI $25.000 \text{ g mol}^{-1}$ no que tange a transfecção gênica porém mantendo uma toxicidade bastante reduzida. Tais estudos trazem uma perspectiva positiva para a utilização da PEI de baixa massa molar ao invés da PEI

de $25.000 \text{ g mol}^{-1}$ que já é mais consolidada e amplamente utilizada para pesquisas com fins de aplicação em terapia gênica.

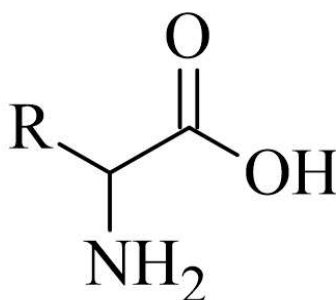
Os melhores resultados em modificações da PEI são obtidos quando se atinge um equilíbrio entre a hidrofobicidade e a hidrofiliabilidade dos grupos inseridos já que a qualidade de um vetor de entrega de genes é medida de forma multifatorial (LINSHA MALI; PRIYA; REKHA, 2021; DE OLIVEIRA *et al.*, 2023).

3.6 AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são moléculas bifuncionais - grupo amino e grupo ácido carboxílico - que quando polimerizadas formam um polímero linear chamado de polipeptídeo ou proteína. Dentre as centenas de aminoácidos conhecidos, 20 deles são tidos como comuns, por serem frequentemente identificados nas proteínas sintetizadas pelos organismos vivos (ALBERTS *et al.*, 2017; NELSON; COX, 2014).

A estrutura de um aminoácido é constituída por dois grupos funcionais característicos e mais uma cadeia lateral "R" (Figura 3). Essa cadeia lateral é a responsável primordial pela diferenciação das características e classificação dos aminoácidos em cinco categorias baseadas essencialmente em sua polaridade e pH: Apolares aromáticos, apolares alifáticos, polares sem carga, básicos e ácidos. Embora a maioria dos 20 aminoácidos comuns se enquadre satisfatoriamente em uma dessas categorias, alguns como a histidina, cisteína e a glicina não conseguem ser classificados de maneira absoluta (NELSON; COX, 2014).

Figura 3 - Estrutura química geral de um α -aminoácido.



Fonte: elaborado pela autora.

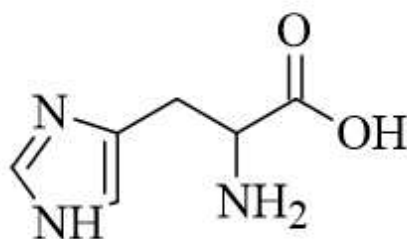
Em geral, os 20 aminoácidos comuns são α -aminoácidos, ou seja, o grupo amino e o grupo carboxila são ligados ao mesmo carbono e neste mesmo átomo de

carbono tem-se ligado o grupo R e o átomo de hidrogênio, exceto no caso da glicina, o aminoácido de estrutura mais simples possível, cujo grupo R é também um átomo de hidrogênio. Portanto, tem-se neste carbono α , um centro quiral da molécula que leva a dois enantiômeros possíveis por conta da geometria característica dos orbitais moleculares do carbono, e conseqüentemente entende-se que os aminoácidos são espécies opticamente ativas (NELSON; COX, 2014).

3.6.1 Histidina

A histidina é um α -aminoácido cujo grupo lateral é um metilimidazol (Figura 4). Sua classificação é na classe dos aminoácidos com grupo R positivamente carregados, ou básicos. Porém, sua classificação pode não ser absoluta, já que a ligação dos nitrogênios do ciclo imidazol com os prótons é relativamente fraca, logo, em pH neutro, a molécula é apenas parcialmente positiva (ALBERTS *et al.*, 2017).

Figura 4 - Estrutura química da histidina.



Fonte: elaborado pela autora.

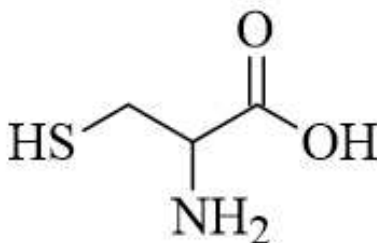
O ponto isoelétrico da histidina é de 7,59 e em uma curva de titulação, este aminoácido apresenta três pontos de inflexão que dizem respeito ao pKa de cada um dos grupos presentes: os dois esperados por seu grupo amino e ácido carboxílico, pKa's 9,17 e 1,82, respectivamente e; o terceiro, pKa 6, referente à protonação do imidazol do grupo lateral (NELSON; COX, 2014).

No que se refere a terapia gênica, as modificações da PEI com histidina relatadas apresentam significativo acréscimo na eficiência de transfecção dos genes, resultado atribuído ao aumento da capacidade tamponante do polímero decorrente do pKa do grupo imidazol (DHANYA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022; SEO *et al.*, 2022).

3.6.2 Cisteína

Assim como a histidina, a cisteína é um α -aminoácido sintetizado pelo organismo, seu grupo lateral consiste em uma metila ligada a um tiol ($-\text{CH}_2\text{-SH}$) (Figura 5) e sua classificação é mais ambígua, enquanto alguns autores a classificam como um aminoácido de grupo lateral apolar (ALBERTS *et al.*, 2017), outros a colocam na classificação com grupo lateral polar não carregado (NELSON; COX, 2014). É possível compreender a classificação da cisteína como polar não carregada quando se olha para a definição deste grupo, que para Nelson e Cox (2014) consiste em aminoácidos mais hidrofílicos que os apolares por conta da presença de grupos funcionais que formam ligação de hidrogênio com a água, considerando este parâmetro, a cisteína é um caso especial, pois é um ácido fraco que pode formar ligações de hidrogênio mais fracas que as convencionais com oxigênio e nitrogênio.

Figura 5 - Estrutura química da cisteína.



Fonte: elaborado pela autora.

Seu ponto isoelétrico é de 5,07 e, assim como nos aminoácidos carregados, apresenta três pK_a 's, sendo 1,96, 10,28 e 8,18 referentes ao grupo ácido carboxílico, amino e tiol, respectivamente (NELSON; COX, 2014).

No contexto da terapia gênica, a cisteína tem sido utilizada como vetor de entrega de genes principalmente na forma de peptídeos ou polipeptídeos. Bogacheva *et al.* (2017), trabalhou com polipeptídeos contendo arginina, histidina e cisteína como vetores de genes e atribuiu à cisteína uma função estabilizadora dos poliplexos pelo aumento da interação entre o vetor e o material genético, tal função é devida principalmente a possibilidade de ligações dissulfeto entre os grupos tiol da cisteína.

Karimov *et al.* (2021) realizaram a modificação da PEI 2.000 g mol⁻¹ com tirosina associando à reticulação das cadeias poliméricas com ligações dissulfeto, sendo que a reticulação objetivou criar um vetor de maior massa molar a partir de precursores de baixa massa molar. Tal técnica demonstrou melhoria da eficiência de liberação de DNA dentro da célula pois as ligações dissulfeto são reversíveis em meio redutor, além disso, a reticulação não gerou prejuízos à biocompatibilidade do vetor.

3.7 INTERAÇÃO PEI/DNA

A formação de poliplexos PEI/DNA é facilitada pela conformação das duplas hélices de DNA, pois com os grupos fosfato negativamente carregados voltados para fora da estrutura, estes ficam mais suscetíveis às interações eletrostáticas com moléculas catiônicas.

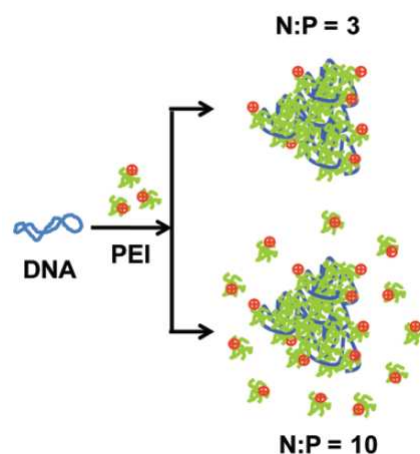
A interação entre a PEI e o DNA se dá primordialmente por meio da atração eletrostática entre as cargas positivas das aminas do polímero e a carga negativa dos grupos fosfato da molécula de DNA, conforme demonstrado em diversos estudos de simulação computacional (SUN *et al.*, 2011; ZIEBARTH *et al.*, 2017; FARCAS; BEU, 2018). Quando essa interação ocorre, se observa uma neutralização parcial de ambas as cargas que atuam na formação do poliplexo, porém é necessário que se mantenha certa quantia de carga superficial positiva para que possa existir uma interação com a membrana celular negativamente carregada, possibilitando a endocitose do polímero carregado com o material genético (YUE; WU, 2013).

O processo de complexação PEI/DNA pode ser resumido em três fases atreladas a diferentes razões entre nitrogênio (das moléculas de PEI) e fosfato (das moléculas de DNA) (N/P): a primeira, em razões N/P baixas, consiste no início da complexação do DNA com a PEI, neste momento as cargas superficiais medidas ainda são negativas e as macromoléculas estão todas solubilizadas no meio, evidenciando a complexação incompleta do DNA; num segundo momento ocorre a completa complexação do DNA com a PEI, marcado por uma carga superficial neutra, provocando uma compactação da estrutura do complexo e a consequente precipitação destes; e no terceiro momento com razões N/P mais altas, os polímeros livres em solução interagem com os poliplexos formados, causando um

efeito de desnivelamento e consequente ressolubilização dos poliplexos decorrente do aumento de volume destes (BELLETTINI *et al.*, 2017).

Apesar de muitos autores apontarem a completa complexação do DNA com a PEI (seja pura ou com estrutura modificada) em baixas razões N/P (entre 1 e 3), os estudos de eficiência de transfecção de genes indica sua maior eficácia sempre em razões N/P consideravelmente mais altas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; LIU; HU; FENG, 2020; DE OLIVEIRA *et al.*, 2023). Ao aprofundar os estudos acerca deste fenômeno, foi constatado que em razões N/P acima de 3, as cadeias catiônicas coexistem em duas formas, sendo uma condensada ao DNA e as excedentes a esta razão se encontram livres em solução (Figura 6), sendo constatado que são estas cadeias livres que, apesar de apresentarem maior toxicidade, são responsáveis pela eficiência na transfecção gênica (YUE; WU, 2013).

Figura 6 - Esquema da complexação entre DNA e PEI em solução.



Fonte: adaptado de Yue e Wu, 2013.

Em estudos posteriores foi elucidada a função das cadeias de PEI livres no acréscimo da eficiência de transfecção, sendo constatado que tais cadeias agem especialmente no espaço intracelular, limitando a diminuição do pH em volta dos poliplexos liberados do endossomo e assim evitando a captação destes poliplexos pelos lisossomos, consequentemente mitigando a digestão celular dos poliplexos PEI/DNA e permitindo a chegada do material genético ao núcleo da célula. Além disso, as cadeias de PEI livres otimizam a transcrição do DNA para RNA mensageiros e posterior saída do RNA mensageiro do núcleo para o citosol (XU *et al.*, 2014; CAI *et al.*, 2016).

Tendo o exposto como fundamento e visando a viabilização da PEI de 2.000 g mol⁻¹ como um bom vetor de entrega de genes, no presente estudo foram realizadas modificações em sua estrutura a fim de atingir um possível incremento em sua habilidade de interação com o DNA.

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES

O DNA do timo de bezerro (ctDNA - do inglês Calf Thymus DNA), o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (98%), a N-hidroxissuccionimida (NHS) (98%), a L-Cisteína (97%), a L-Histidina (99%) e o SYBR Green I foram obtidos da Sigma-Aldrich, bem como a PEI de 2.000 g mol^{-1} com polidispersão de 1,1. O tampão Hepes foi obtido da Êxodo Científica. Para o ajuste do pH das soluções de polímero foi utilizada uma solução padronizada de ácido clorídrico (HCl) $6,0 \text{ mol L}^{-1}$. Em todos os experimentos foi utilizada água de osmose reversa.

4.2 REAÇÕES DE MODIFICAÇÃO DA PEI E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS

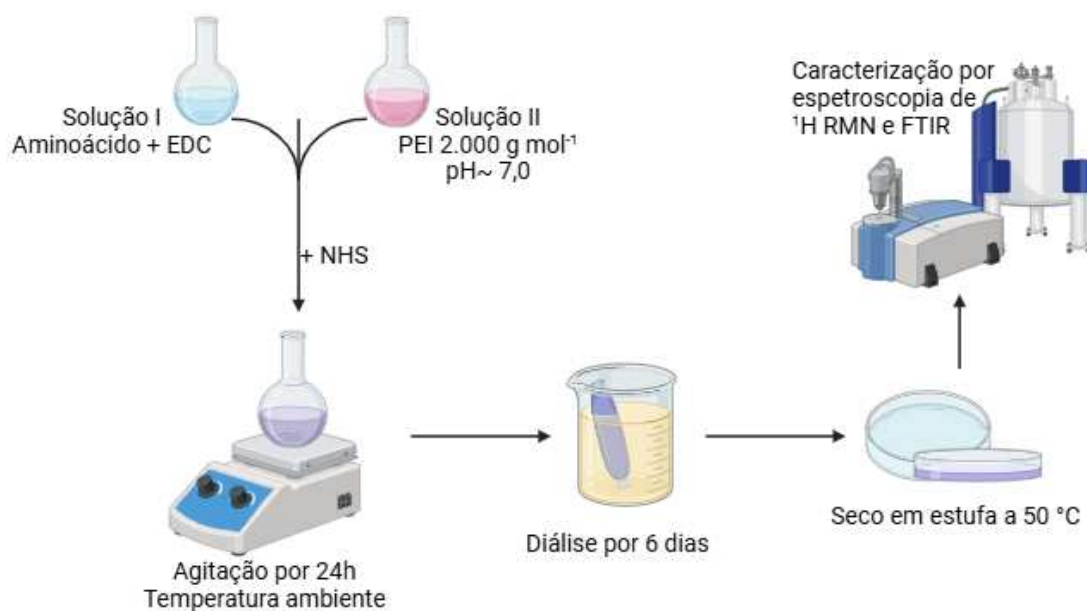
Inicialmente foram preparados 15 mL de solução aquosa contendo 250,0 mg (5,8 mmol) de PEI 2000 g mol^{-1} a solução foi mantida sob agitação por 24h e em seguida o pH foi ajustado com uma solução de HCl ($6,0 \text{ mol L}^{-1}$) até a neutralidade da solução. As soluções de aminoácidos foram preparadas com 20% da quantia em mol da PEI, em 5 mL de água deionizada. Junto à solução de aminoácido, EDC foi adicionado na proporção molar 1:1 (aminoácido:EDC) e a solução foi mantida sob agitação por 30 minutos.

A solução de aminoácido foi então adicionada gota a gota à solução contendo a PEI, e posteriormente foi adicionado NHS à mistura na proporção molar de 1:4 em relação ao EDC. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24h e então foi dialisada em membrana de MWCO de 2.000 g mol^{-1} por 6 dias com trocas de água diárias para eliminação de qualquer molécula de baixa massa molar que não tenha reagido com o polímero, o conteúdo retido na membrana foi então seco em estufa a 50°C .

As caracterizações dos produtos da modificação foram feitas através de ^1H RMN, utilizando água deuterada como solvente (D_2O) e FTIR.

Na Figura 7 está representado um esquema dos procedimentos experimentais desta etapa.

Figura 7 - Representação esquemática dos procedimentos de modificação da PEI e caracterização dos produtos.



Fonte: elaborado pela autora.

4.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Visando a caracterização das PEIs modificadas por FTIR, ambas foram analisadas, bem como a PEI pura, em espectrofotômetro FTIR Perkin Elmer Frontier por Refletância Total Atenuada (ATR). A faixa de número de onda utilizada para obtenção dos espectros foi de 4000cm⁻¹ a 500 cm⁻¹ com resolução de 2 cm⁻¹.

4.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (¹H RMN)

Os espectros de ¹H RMN das PEIs modificadas foram realizados na Central de Análises Químicas da UFSC campus Florianópolis, em espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear de 400 MHz modelo NMR AS 400 da marca Varian. As amostras foram diluídas em água deuterada em tubos de 5 mm em concentração aproximada de 30 mg mL⁻¹.

4.3 ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE PEIs E ctDNA

4.3.1 Espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-vis)

Para realização de estudo de interação das PEIs com o ctDNA, foram definidas razões nitrogênio/fosfato (N/P) entre 0 e 15. Para cada unidade de repetição do ctDNA, com massa de $330,0 \text{ g mol}^{-1}$, atribui-se uma unidade de fosfato, da mesma forma atribui-se uma unidade de nitrogênio para cada unidade de repetição da PEI, com massa de $43,1 \text{ g mol}^{-1}$ por mero e PEIs modificadas, cujas massas molares por unidade de repetição foram recalculadas após determinação de grau de substituição por $^1\text{H RMN}$.

Todas as soluções utilizadas nas interações foram preparadas na concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando tampão Hepes pH 7,4 a fim de mimetizar a condição do plasma sanguíneo. As proporções volumétricas entre as soluções de ctDNA, PEI e tampão podem ser vistas no Apêndice A.

O preparo das soluções de ctDNA/PEIs foi feito com 2 horas de antecedência à análise, a fim de fornecer o tempo necessário para a máxima eficiência de complexação entre o DNA e os polímeros.

As análises foram conduzidas em espectrofotômetro modelo UV-1800 da Shimadzu, com varredura na faixa de comprimento de onda de 200 nm a 400 nm.

4.3.2 Fluorescência

Para obtenção de espectros de emissão de fluorescência do SYBR Green I uma solução de ctDNA de concentração $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ contendo o corante foi titulada com as soluções de PEIs em concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em cubeta de quartzo com as quatro faces polidas. Utilizou-se espectrofluorímetro RF-6000 da Shimadzu, ajustando as aberturas das fendas de excitação e emissão dos monocromadores para 5 mm e definido os parâmetros para excitação das amostras em 497 nm com registro da emissão de 500 nm a 700 nm.

4.3.3 Potencial zeta

Visando a determinação da carga superficial dos políplexos em diferentes razões N/P (as mesmas utilizadas para espectrofotometria UV-Vis), obteve-se a mobilidade eletroforética (U_E) dos políplexos pela técnica de dispersão de luz eletroforética (ELS - do inglês Electrophoretic light scattering), utilizando o equipamento ZetaSizer da Malvern no Departamento de Química da UFSC-Florianópolis em cubetas próprias para a análise. Tendo a mobilidade eletroforética foi possível determinar o potencial zeta (ζ) dos políplexos através da equação de Henry (1).

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (1)$$

Onde ε corresponde à constante dielétrica do meio, η é a viscosidade e $f(ka)$ é a função de Henry cujo valor é de aproximadamente 1,5.

4.3.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

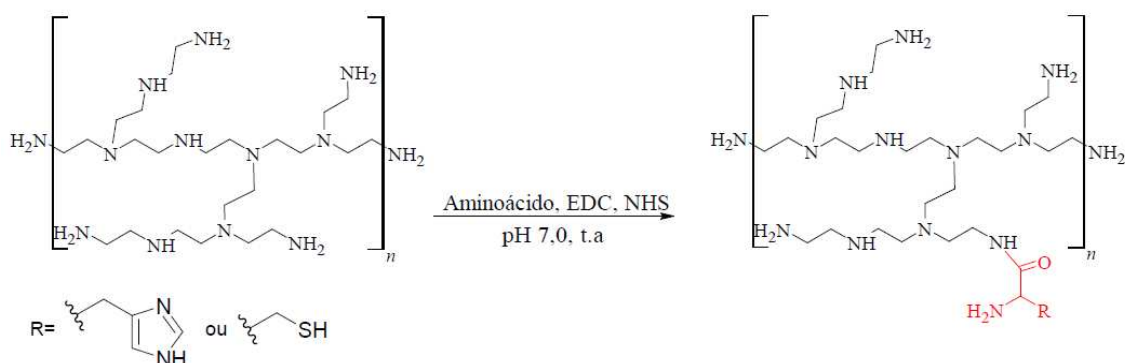
O diâmetro médio e o índice de polidispersão dos políplexos foi avaliado para as amostras de razão N/P= 15 pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS - do inglês Dynamic light scattering). Para tal foi utilizado o equipamento ZetaSizer da Malvern do departamento de Química da UFSC-Florianópolis, as amostras foram acondicionadas em célula confeccionada em poliestireno e ao equipamento é acoplado um laser He-Ne que opera em comprimento de onda de 633 nm e ângulo de detecção de 173°.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REAÇÕES DE MODIFICAÇÃO DA PEI

A síntese das PEIs modificadas segue um mecanismo de substituição nucleofílica acídica, resultando na estrutura representada na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura química da PEI modificada com aminoácido.

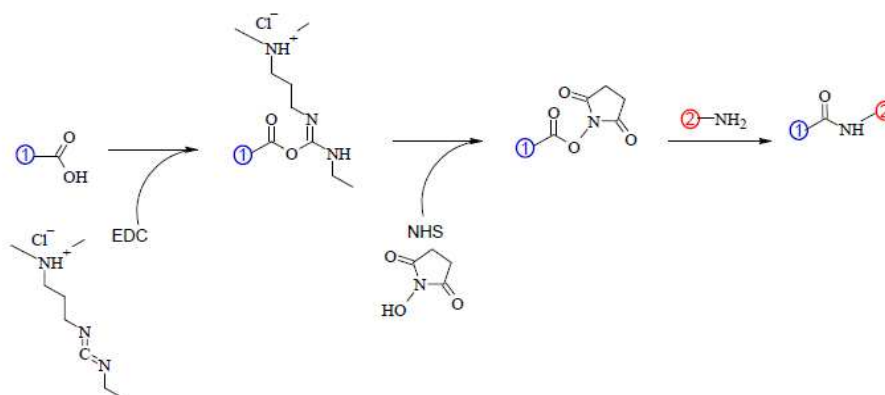


Fonte: elaborado pela autora.

Para o sucesso da reação é imprescindível a neutralização do pH da solução de PEI, pois isso garante que as aminas primárias estejam desprotonadas, com seus pares de elétrons livres para o ataque à carbonila.

A amidação entre um ácido carboxílico e uma amina não ocorre de forma direta pois o próton do ácido carboxílico é imediatamente removido, formando o carboxilato, que é uma espécie não suscetível a ataques de nucleófilos (BRUICE, 2006). Dado esse fato, utilizou-se o EDC como agente de acoplamento, e o NHS em seguida age na estabilização do intermediário formado pela reação do EDC com o aminoácido, este intermediário estabilizado pode então ser atacado por uma amina nucleofílica liberando um bom grupo abandonador, conforme pode ser visto na Figura 9 (SOMBRA, 2019).

Figura 9 - Esquema do mecanismo de acoplamento com EDC/NHS.



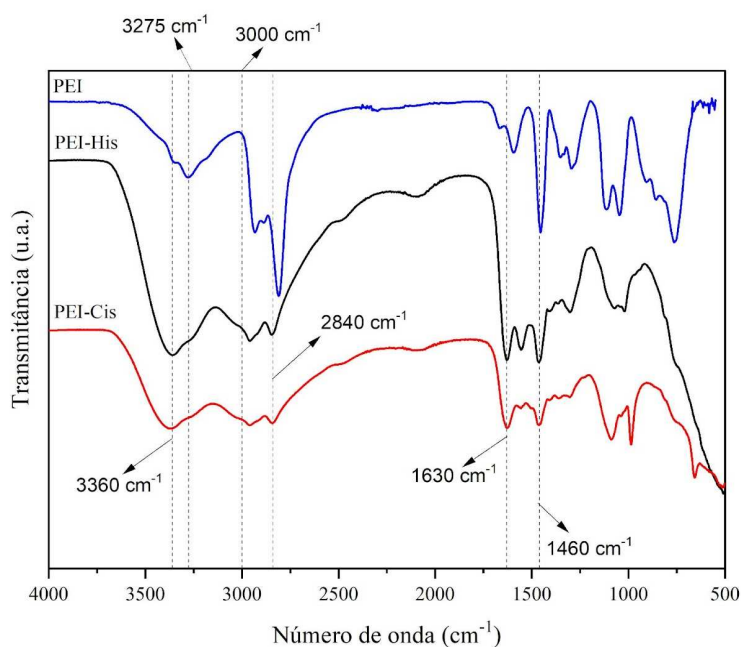
Fonte: adaptado de Sombra (2019).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PEIs MODIFICADAS

5.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Após a finalização da síntese de modificação das PEIs, a primeira análise para fins de caracterização realizada foi a espectroscopia de FTIR, que mede a energia associada aos movimentos vibracionais de estiramento e dobramento das ligações químicas (PAVIA *et al.*, 2010). Na Figura 10 estão representados os espectros de FTIR da PEI pura e das duas PEIs modificadas.

Figura 10 - Espectros de FTIR da PEI, PEI-His e PEI-Cis.



Fonte: elaborado pela autora.

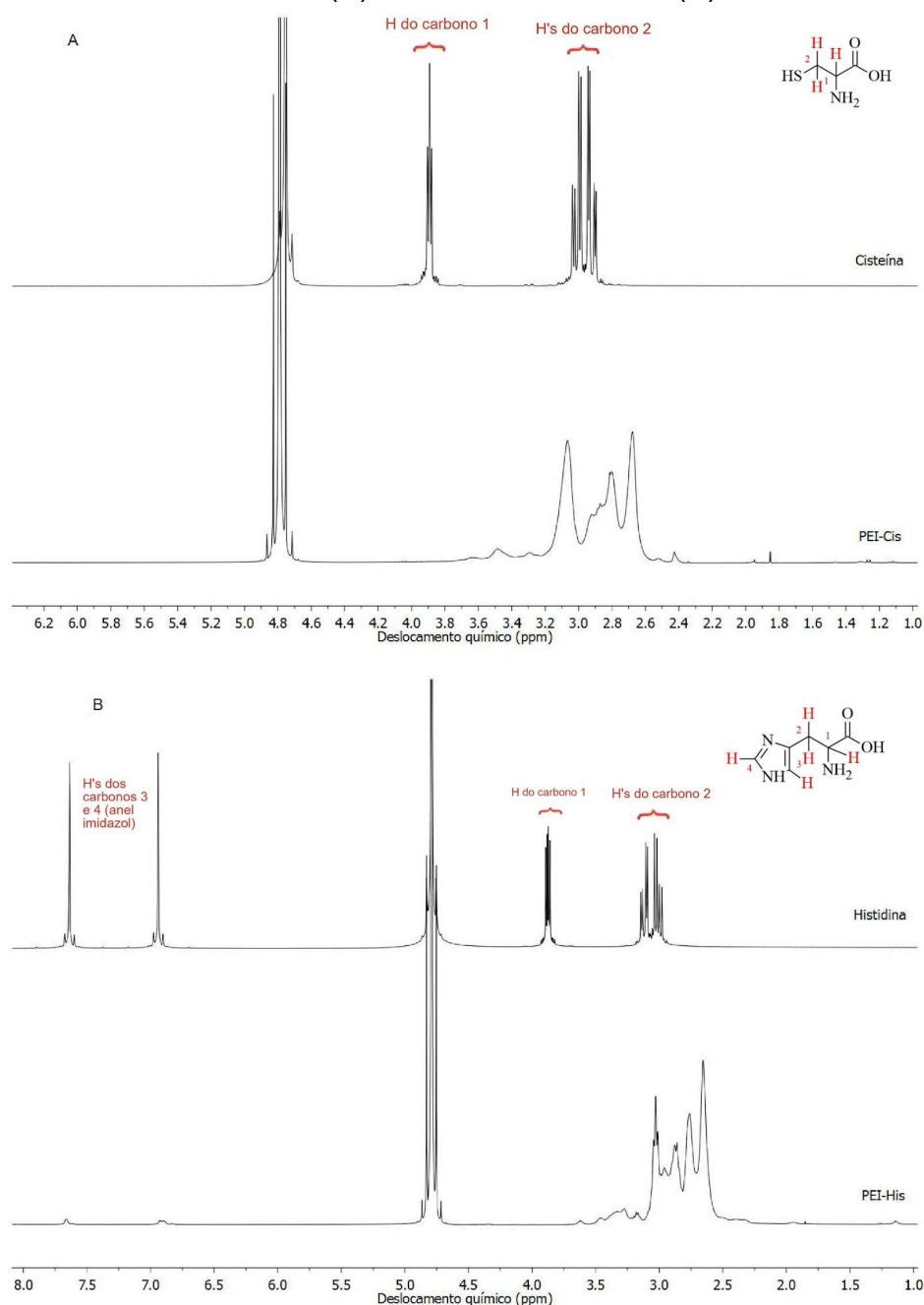
Algumas bandas de absorção são comuns às três análises, esse é o caso das bandas entre 3000 e 2840 cm^{-1} e as bandas em 1460 cm^{-1} que correspondem aos dobramentos e estiramentos, respectivamente, das ligações C-H em alcanos. Para a PEI pura, há ainda uma banda de estiramento em aproximadamente 3275 cm^{-1} característica da ligação N-H de aminas secundárias, nesta mesma região poderiam ser encontradas duas bandas de estiramento das ligações N-H de aminas primárias, possivelmente estas bandas foram suprimidas no espectro da PEI ramificada pela banda única referente à amina secundária em virtude do maior número de aminas secundárias na estrutura em relação às primárias (PAVIA *et al.*, 2010).

Um forte indício do sucesso na modificação da PEI com ambos os aminoácidos é a existência de uma banda pronunciada em 1630 cm^{-1} que não existe no espectro da PEI pura, característica do estiramento das ligações C=O da ligação amida formada. A banda de dobramento N-H em aproximadamente 1550 cm^{-1} se sobrepõem parcialmente a banda de 1630 cm^{-1} dando uma impressão de dubleto a este sinal (PAVIA *et al.*, 2010). Além disso, nas PEIs modificadas há um deslocamento para maior número de onda do estiramento N-H, se apresentando então em 3360 cm^{-1} .

5.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H RMN)

A segunda contribuição na caracterização dos polímeros modificados foi a análise por ^1H RMN, análise cuja absorção de energia medida está atrelada ao núcleo dos átomos, mais especificamente ao seu spin. Em seu estado não excitado, os spins nucleares de um átomo adotam uma orientação aleatória, a espectroscopia por RMN mede a resposta da orientação desses spins quando aplicada uma fonte magnética externa. Esta análise é altamente valiosa na determinação de estruturas moleculares tendo em vista que spins nucleares sob diferentes ambientes químicos sentem um campo magnético resultante diferente e conseqüentemente exibe um sinal diferente no espectro (MCMURRY, 2012). Os espectros obtidos para os polímeros modificados podem ser vistos na Figura 11.

Figura 11 - Espectros de ^1H RMN [400 MHz, D_2O , δ (ppm)] da PEI-Cis e Cisteína (A) e PEI-His e Histidina (B).



Fonte: elaborado pela autora.

O espectro de ^1H RMN da PEI ramificada apresenta sinais entre δ 2,2 e 2,6 ppm referente aos hidrogênios ligados aos carbonos dos grupos $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-)$ (HOLYCROSS; CHAI, 2013). Assim, foi possível definir o percentual de substituição de aminoácidos na PEI através das integrais dos sinais referentes aos hidrogênios da PEI e dos aminoácidos.

O espectro da cisteína contido na Figura 11A apresenta dois conjuntos de sinais, sendo o primeiro entre δ 2,8 e 3,1 ppm, correspondendo aos 2 hidrogênios ligados ao carbono vizinho ao tiol; o segundo sinal está aproximadamente em δ 3,9 ppm e corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono α à carbonila e grupo amino. No espectro da PEI-Cis (Figura 11A). Os sinais da molécula obtida após a reação de modificação está suscetível a pequenos deslocamentos frente aos iniciais, tendo em vista que um novo ambiente químico se estabelece, portanto, considerando os sinais de δ 2,5 a 3,0 ppm e δ 3,0 a 3,6 ppm como sendo referentes à PEI e à cisteína, respectivamente, através da integração destes, constatou-se um grau de substituição de aproximadamente 15% para a modificação da PEI com cisteína.

Para a determinação do grau de substituição da PEI com a histidina a análise se deu de forma semelhante à descrita anteriormente. Conforme se observa na Figura 11B, para a histidina há dois multipletos, um entre δ 2,9 e 3,2 ppm e outro aproximadamente em δ 3,9 ppm, referentes aos hidrogênios ligados ao carbono α ao anel imidazol e ao hidrogênio ligado ao carbono α à carbonila e grupo amino, respectivamente; outros dois sinais são vistos em aproximadamente δ 7,0 ppm e δ 7,6 ppm correspondem aos hidrogênios aromáticos. Na PEI-His, são considerados os sinais de δ 2,5 a 3,0 ppm referentes à PEI e de δ 3,0 a 3,8 ppm referentes à histidina. Desconsiderando para fins de cálculo os hidrogênios aromáticos, determinou-se um percentual de substituição da PEI com histidina de aproximadamente 13%.

Após determinação de percentual de substituição, considerando a massa molar por unidade de repetição da PEI pura de $43,2 \text{ g mol}^{-1}$, foi possível ajustar a massa molar média por mero para as PEIs modificadas, obtendo massas de $58,6 \text{ g mol}^{-1}$ e $60,9 \text{ g mol}^{-1}$ por mero para a PEI-Cis e para a PEI-His, respectivamente.

5.3 ESTUDO DE INTERAÇÃO DAS PEIs COM ctDNA

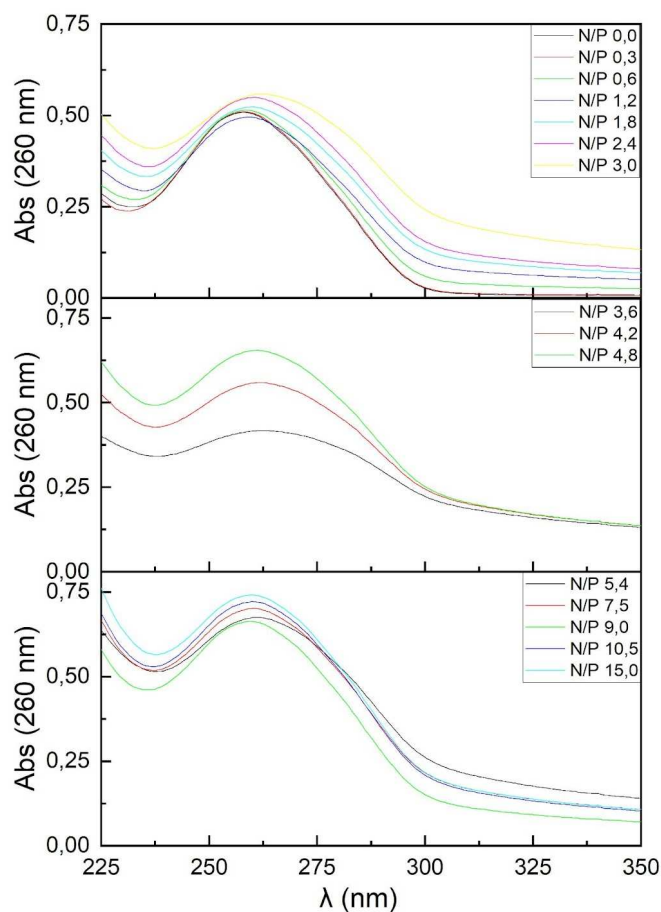
5.3.1 Espectrofotometria no ultravioleta e visível (UV-vis)

Na espectrofotometria UV-Vis mede-se a energia necessária para a excitação de um elétron, especificamente neste caso, mede essa energia em um sistema insaturado, envolvendo as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, e a parte de determinada molécula que possui tal característica chama-se cromóforo (VOGEL, 2017).

Portanto, o estudo da interação entre as PEIs e o ctDNA é pautado no entendimento do que ocorre com a molécula de DNA a cada nova proporção de PEI adicionada tendo por base a interação da luz com as bases nitrogenadas da molécula de ctDNA que são os grupos cromóforos presentes e que conferem seu comprimento de onda de absorção máxima característico em 260 nm (DAVID; COX, 2014).

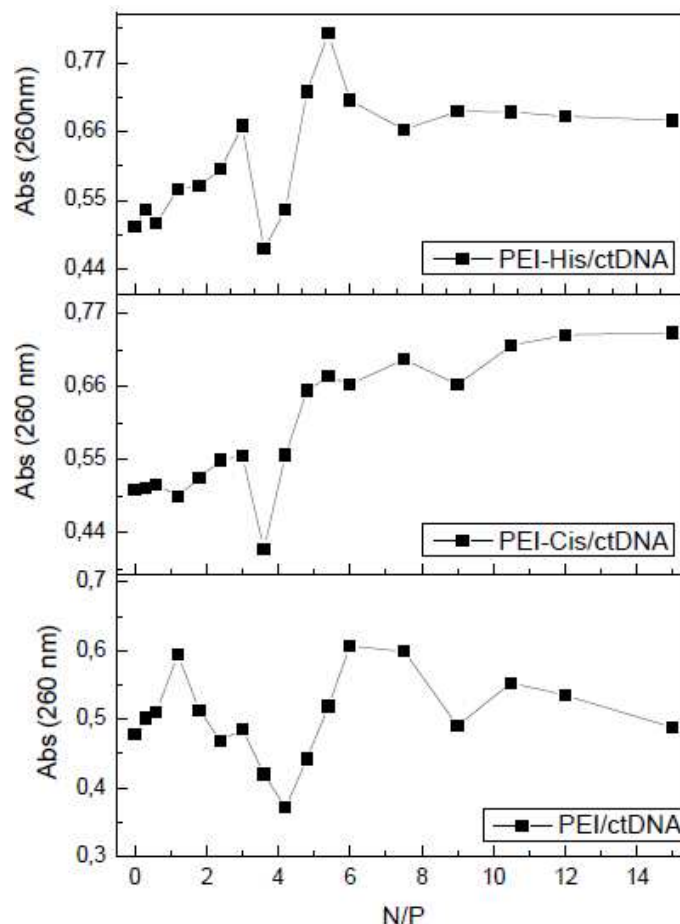
Para a interação do ctDNA com as PEIs o volume de solução de DNA foi mantido constante (125 μL) alterando o volume de solução de PEI a ser utilizado a fim de obter as razões N/P desejadas. Abaixo, observa-se o espectro obtido à partir de soluções com diferentes razões N/P representado pela interação entre ctDNA/PEI-Cis, sabendo que os demais espectros seguem o mesmo padrão (Figura 12) bem como a curva de absorção máxima em $\lambda = 260$ nm para cada uma das PEIs modificadas (Figura 13).

Figura 12 - Espectro de UV-Vis em diferentes razões N/P para os poliplexos ctDNA/PEI-Cis.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 13 - Curva de absorção máxima ($A_{260\text{ nm}}$) em função de diferentes razões N/P para os poliplexos formados entre o ctDNA e a PEI em suas versões pura e modificadas.



Fonte: elaborado pela autora.

Para os três casos estudados, em baixas razões N/P é observado ligeiro aumento de absorbância, conhecido como efeito hipercrômico, que sugere uma alteração na conformação do ctDNA que diminui a interação de empilhamento em sua estrutura deixando suas bases nitrogenadas mais expostas, este efeito pode ser explicado pela atração eletrostática que começa a se estabelecer entre o ctDNA e as moléculas de PEI presentes na solução (HAN *et al.*, 2004).

No ponto de absorbância mínima, sendo em razão N/P de 3,6 para ambas as PEIs modificadas e 4,2 para a PEI pura, entende-se que há a completa complexação entre as PEIs e o ctDNA, levando à compactação da estrutura dos poliplexos e consequente precipitação destes (BELLETTINI *et al.*, 2017).

A partir do ponto de mínima absorbância há novamente um efeito hipercrômico associado ao aumento da porção de PEI da solução, atingindo relativa estabilidade em razões acima N/P acima de 6. O que ocorre neste momento é a

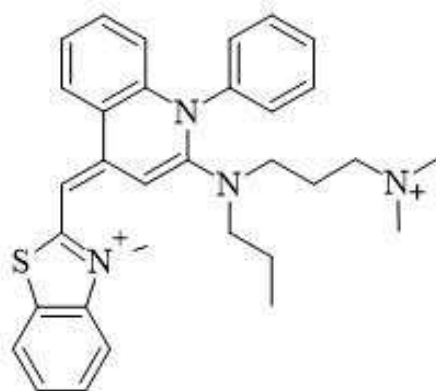
ressolubilização dos poliplexos formados, induzida pela presença de um excesso de polications na solução (HAN *et al.*, 2004). À medida em que aumenta-se a proporção de PEI em solução os poliplexos tornam-se menos emaranhados, e os grupos cromóforos ficam mais expostos, aumentando a absorbância relacionada a estes grupos até atingir o platô.

5.3.2 Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência mede a energia emitida em forma de fótons por um analito ao retornar ao seu estado fundamental após sofrer uma excitação. Este método é consideravelmente mais sensível em relação a espectroscopias de absorção, porém ainda assim é menos empregado devido a menor parcela de sistemas químicos com emissão fluorescente de intensidade significativa para tornar a análise viável (SKOOG *et al.*, 2006). O DNA é uma molécula cuja estrutura química não fornece por si só bons níveis de fluorescência perante relaxamento de uma excitação (GUSTAVSSON; MARKOVITSI, 2021), por este motivo são empregados intercalantes, corantes que se ligam a estrutura da biomolécula a fim de viabilizar sua análise por espectroscopia de fluorescência, como é o caso do SYBR Green I.

O SYBR Green I (Figura 14) é um corante fluoróforo que por conta de sua característica catiônica em pH neutro ou próximo da neutralidade (como é o caso do pH fisiológico) é capaz de se intercalar aos pares de bases da dupla fita de DNA, tendo sua intensidade de fluorescência aumentada em mais de 1.000 vezes quando intercalado à estrutura da biomolécula. Apesar da natureza catiônica do fluoróforo, é improvável do ponto de vista entrópico que os grupos amino estabelecem uma ligação com os grupos fosfato do DNA, neste sentido, o papel da atração eletrostática entre estes grupos é de direcionamento do corante para sua posição (DRAGAN *et al.*, 2012), desta forma, os grupos seguem disponíveis para a interação com a PEI.

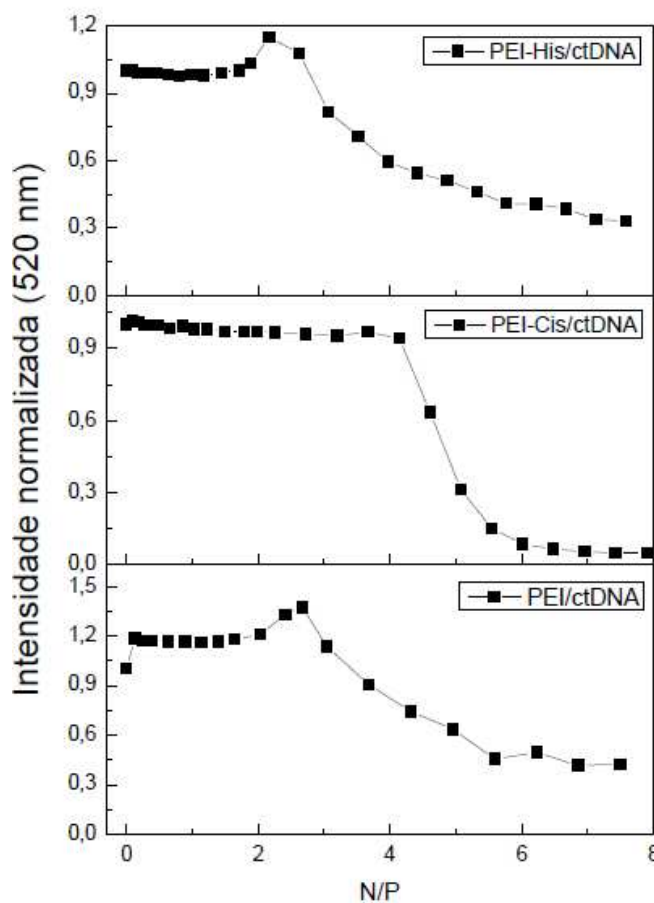
Figura 14 - Estrutura química do corante SYBR Green I.



Fonte: elaborado pela autora.

Espectros de fluorescência do SYBR Green I intercalado ao ctDNA foram obtidos para diferentes razões N/P e a partir dos dados obtidos foram gerados gráficos que relacionam a intensidade de fluorescência no comprimento de máxima emissão ($\lambda = 520$ nm) às razões N/P. conforme Figura 15.

Figura 15 - Intensidade de emissão de fluorescência normalizada vs razões N/P para PEI-Cis, PEI-His e PEI.



Fonte: elaborado pela autora.

Considerando que a intensidade de emissão de fluorescência é efetiva apenas quando o corante SYBR Green I está intercalado ao DNA, infere-se que o decaimento da intensidade de emissão deve-se à interrupção da interação corante/ctDNA. Sabe-se que, quando complexado com a PEI, bem como a suas versões modificadas, o ctDNA sofre uma alteração em sua conformação, não sendo mais possível a alocação do intercalante entre os pares de bases do ctDNA, conforme demonstrado por outros autores com intercalantes com funcionamento semelhante ao do SYBR Green I (BELLETTINI *et al.*, 2017; HAN *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA *et al.*, 2023).

A intensidade de emissão de fluorescência começa a cair a partir de razões N/P de 2,67 para a PEI pura, 2,17 e 4,14 para a PEI-His e PEI-Cis, respectivamente, indicando que nestes pontos a complexação ctDNA/PEI's se inicia, desfazendo o complexo ctDNA/SYBR Green I, com as moléculas do corante ficando livres na solução.

É notável que há um decaimento significativo na intensidade de emissão nos três casos, enquanto com a PEI e a PEI-His a intensidade mínima atingida é de aproximadamente 0,33, para a interação com a PEI-Cis a intensidade cai para muito próximo de zero ainda que o decaimento precise de uma razão N/P maior para iniciar, pode-se teorizar que esta diferença seja atribuída a possibilidade de formação de ligações dissulfeto entre cadeias de PEI-Cis por conta dos grupos tiol da cisteína, levando a uma macromolécula de maior massa molar e consequente interação de complexação mais forte com o DNA.

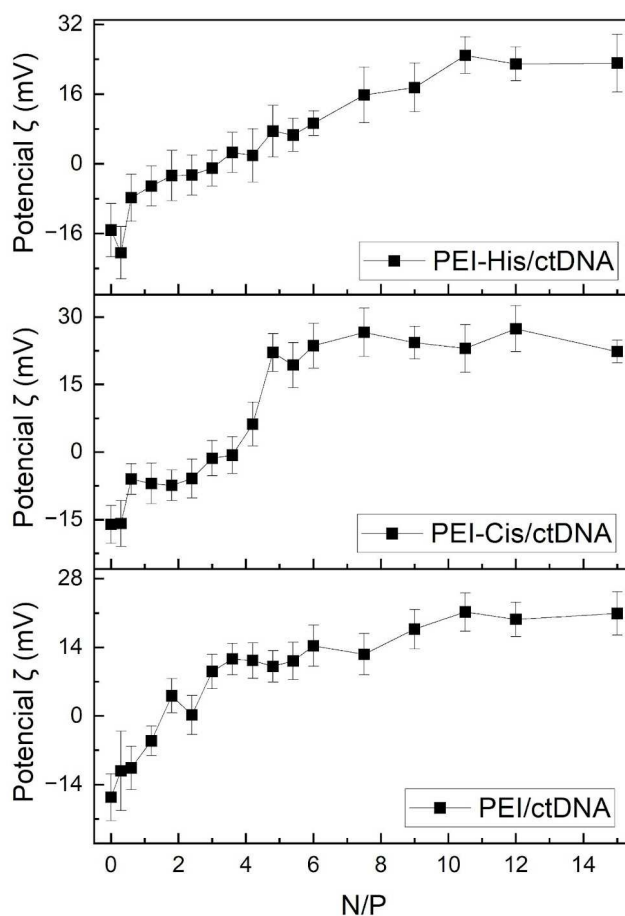
5.3.3 Potencial zeta (ζ)

O potencial zeta (ζ) expressa a diferença de potencial elétrico entre a dupla camada elétrica de uma partícula, sendo o políplexo neste caso, e o meio dispersante (BHATTACHARJEE, 2016).

Conforme apresentado por Bellettini e colaboradores (2017), valores negativos de ζ indicam que existem grupos fosfato expostos na solução, portanto, nas razões N/P em que $\zeta < 0$ ainda existem moléculas de DNA não complexadas às PEIs na amostra. A completa complexação das moléculas de DNA com as PEIs é indicada por $\zeta = 0$ e ao passo em que moléculas de PEI são adicionadas após total

complexação do DNA, os valores de ζ se tornam positivos. As medidas de potencial ζ obtidas para cada razão N/P estão apresentadas na Figura 16.

Figura 16 - Potencial ζ dos complexos ctDNA/PEIs em função das razões N/P em tampão Hepes (pH 7,4).

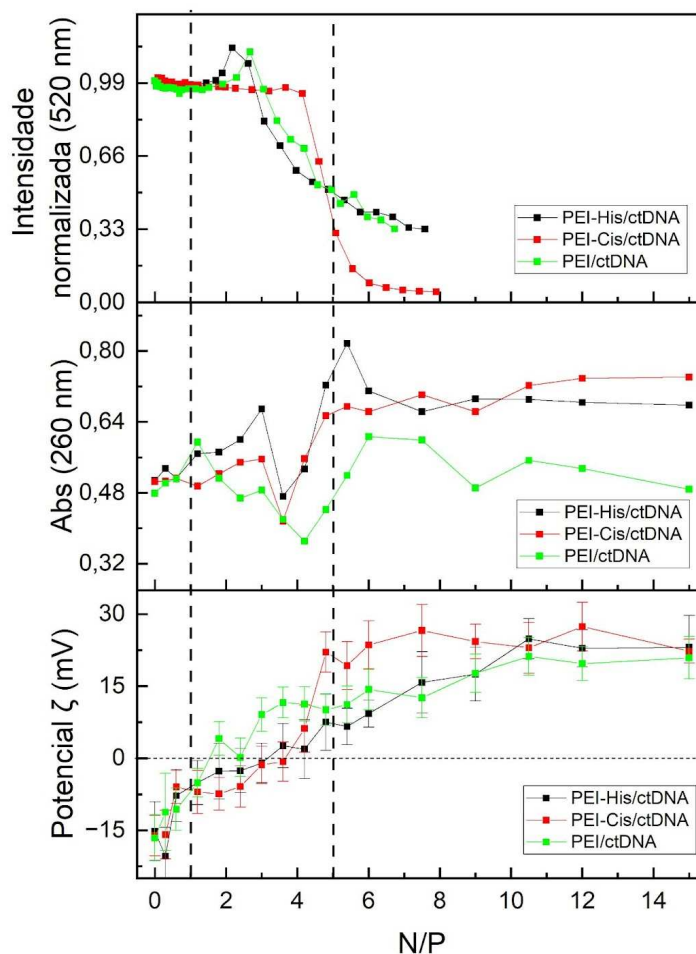


Fonte: elaborado pela autora.

A total complexação das moléculas de ctDNA se dá em razões N/P entre 1,2 e 2,4 para os políplexos PEI/ctDNA e entre 3,0 e 4,2 para os políplexos formados entre ctDNA e as PEIs modificadas, onde os valores de ζ se aproximam de 0 mV, acima destas razões os valores de ζ se tornam cada vez mais positivos, indicando o aumento das cadeias policatônicas em volta dos políplexos, atingindo valores máximos de $\zeta = 21,2$ mV, $\zeta = 27,4$ mV e $\zeta = 24,9$ mV para PEI/ctDNA, PEI-Cis/ctDNA e PEI-His/ctDNA, respectivamente. Os dados obtidos estão de acordo com o encontrado na literatura, onde diversos autores demonstram a completa complexação PEIs/DNA em razões N/P entre 1 e 3 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; LIU; HU; FENG, 2020; DE OLIVEIRA *et al.*, 2023). Além disso, é possível observar a

correlação entre o potencial ζ e as demais análises realizadas para o estudo de interação PEIs/ctDNA, conforme apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Gráficos comparativos entre fluorescência UV-vis e potencial ζ para os complexos PEIs/ctDNA.



Fonte: elaborado pela autora.

Na Figura 17 é possível observar que as alterações características das propriedades dos poliplexos ocorre na mesma faixa de razão N/P (entre N/P= 1,0 e N/P = 5,0) para as diferentes análises, sendo a queda da intensidade de emissão de fluorescência, o ponto de absorbância mínima e $\zeta = 0$ os indicadores da completa complexação PEIs/ctDNA.

5.3.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) é empregada na determinação do diâmetro médio de partículas e índice de polidispersão (PDI) por

meio da análise do espalhamento de luz causado por estas partículas dispersas quando são atingidas por um feixe de laser (BHATTACHARJEE, 2016).

O tamanho dos complexos é de suma importância para a qualidade de um vetor em terapia gênica. Segundo Wang *et al.* (2021) o tamanho dos poliplexos se torna menor à medida em que a razão N/P aumenta. Sabe-se ainda que cargas residuais positivas no poliplexo são necessárias para que a membrana fosfolipídica seja ultrapassada e o poliplexo atinja o meio intracelular (YUE; WU, 2013). Portanto, para obtenção dos diâmetros médios dos poliplexos e PDI destes, foram utilizadas as amostras em maior razão N/P (N/P= 15) e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetro médio e PDI dos poliplexos PEIs/ctDNA em N/P = 15 em tampão Hepes (pH 7,4).

	Diâmetro médio (nm)	PDI
PEI-His/ctDNA	176,6 ± 31,2	0,366
PEI-Cis/ctDNA	142,8 ± 27,4	0,357
PEI/ctDNA	138,5 ± 24,6	0,589

Fonte: elaborado pela autora.

Os poliplexos formados com a PEI não modificada apresentam menor diâmetro médio em relação às PEIs modificadas por aminoácidos, fato que pode ser atribuído ao maior impedimento estérico nas cadeias modificadas, minimizando a capacidade de compactação do oligômero. Por outro lado, o PDI dos poliplexos com as PEIs modificadas é significativamente menor, indicando que os polímeros modificados formam complexos de tamanho mais uniforme com o ctDNA.

Foldvari *et al* (2016) aponta que poliplexos maiores que 150 nm apresentam menor capacidade de penetrar na membrana celular, portanto admite-se que, apesar de os poliplexos formados entre o ctDNA e as PEIs modificadas serem maiores que o correspondente com a PEI pura, estes ainda são aptos a transpor a membrana celular.

6 CONCLUSÃO

Tendo por base os objetivos expostos para a presente pesquisa é possível inferir o sucesso da mesma. As modificações da PEI com a cisteína e histidina foram analisadas por FTIR e ^1H RMN que possibilitaram evidenciar o êxito das reações. Além disso, a análise de ^1H RMN possibilitou a determinação dos graus de substituição de 15% e 13% para a PEI-Cis e PEI-His, respectivamente.

A interação entre o ctDNA e as PEIs foi avaliada utilizando espectrofotometria de UV-Vis, espectroscopia de fluorescência e potencial ζ os resultados destas evidenciaram uma eficiência de complexação do ctDNA com as PEIs modificadas e a PEI pura. Por meio da espectrofotometria de UV-Vis em diferentes razões N/P ainda foi possível elucidar as três fases da interação entre as PEIs e o ctDNA: o início da interação entre as macromoléculas em baixas razões N/P, marcado por um pequeno efeito hipercrômico; a complexação total dos polieletrólitos e sua consequente precipitação, em razões N/P de 3,6 para as PEIs modificadas e 4,2 para a PEI pura; e por fim a ressolubilização dos poliplexos formados em decorrência do excesso de cátions no meio, em razões N/P mais altas, marcada por um efeito hipercrômico acentuado. Em faixas de razão N/P semelhantes, as três fases da complexação foram elucidadas pelo potencial ζ dos poliplexos.

Além disso, por meio da técnica de DLS foram determinados os tamanhos e PDI dos poliplexos formados em N/P=15, sendo que a modificação da PEI levou a poliplexos com maior diâmetro médio porém com maior regularidade em seus tamanhos.

Como perspectiva a continuidade do estudo, pode ser interessante submeter as PEIs modificadas a estudos biológicos visando avaliar características importantes para uma possível aplicação em terapia gênica, como eficiência de transfecção dos genes e citotoxicidade em relação a PEI 2.000 g mol^{-1} sem modificações.

REFERÊNCIAS

AKYOL, Emel; KIRBOGA, Semra; ÖNER, Mualla. Polyelectrolytes: Science and Application. In: **Polyelectrolytes: Thermodynamics and Rheology**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p. 87-112.

ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2017.

ALBUQUERQUE, Lindomar JC *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. 1700299, 2018.

AMSTERDÃ. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. . **Strimvelis**: autologous cd34+ enriched cell fraction that contains cd34+ cells transduced with retroviral vector that encodes for the human ada cDNA sequence. autologous CD34+ enriched cell fraction that contains CD34+ cells transduced with retroviral vector that encodes for the human ADA cDNA sequence. [2016]. Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/strimvelis>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

ARANDA-BARRADAS, María E. *et al.* Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery. **Carbohydrate polymer technologies and applications**, v. 4, p. 100228, 2022.

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

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. **Journal of controlled release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BOGACHEVA, Mariia *et al.* Arginine-rich cross-linking peptides with different SV40 nuclear localization signal content as vectors for intranuclear DNA delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 21, p. 4781-4785, 2017.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (org.). **Carta de aprovação de produto de terapia avançada: kymriah® (tisagenlecleucel)**. [S. L]: Anvisa, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/sangue/terapias-avancadas/cartas-de-aprovacao>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. . **Anvisa aprova 3º produto de terapia avançada para tratamento do câncer**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-3o-produto-de-terapia-avancada-para-tratamento-do-cancer>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

BRUCE, Paula Yurkanis. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

CAI, Jinge *et al.* Quantitative study of effects of free cationic chains on gene transfection in different intracellular stages. **Journal of Controlled Release**, v. 238, p. 71-79, 2016.

CARVALHO, Adriana Bastos *et al.* **Cenário de crescimento de produtos de terapia avançada no Brasil e no mundo**. [S. L.]: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2020. 238 p. Disponível em: <<https://www.reneta.org.br/informa%C3%A7%C3%B5es-sobre-pta>>. Acesso em: 30 jan. 2024.

DE OLIVEIRA, Fernando A. *et al.* Balancing gene transfection and cytotoxicity of nucleic acid carriers with focus on ocular and hepatic disorders: evaluation of hydrophobic and hydrophilic polyethyleneimine derivatives. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 11, n. 20, p. 4556-4571, 2023.

DHANYA, G. R. *et al.* Histidine and arginine conjugated starch-PEI and its corresponding gold nanoparticles for gene delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 120, p. 999-1008, 2018.

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

DUBE, Brahmanand *et al.* Cholic acid modified 2 kDa polyethylenimine as efficient transfection agent. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1337-1341, 2013.

FARCAS, Alexandra; BEU, Titus A. Complexation of DNA with Cationic Polymers. **Studia Universitatis Babes-Bolyai. Chemia**, v. 63, n. 2, p. 165-173, 2018.

FOLDVARI, Marianna *et al.* Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 165-190, 2016.

GONÇALVES, Giulliana Augusta Rangel; PAIVA, Raquel de Melo Alves. Terapia gênica: avanços, desafios e perspectivas. **Einstein (São Paulo)**, v. 15, p. 369-375, 2017.

GUSTAVSSON, Thomas; MARKOVITSI, Dimitra. Fundamentals of the intrinsic DNA fluorescence. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n. 5, p. 1226-1235, 2021.

HAN, Jungho *et al.* Polyplex formation of calf thymus DNA with branched and linear polyethyleneimine. **Macromolecular Research**, v. 12, p. 501-506, 2004.

HOLYCROSS, Daniel R.; CHAI, Minghui. Comprehensive NMR studies of the structures and properties of PEI polymers. **Macromolecules**, v. 46, n. 17, p. 6891-6897, 2013.

JÄGER, Michael *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.

KAFIL, Vala; OMIDI, Yadollah. Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in a431 cells. **BiolImpacts: BI**, v. 1, n. 1, p. 23, 2011.

KARIMOV, Michael *et al.* The combined disulfide cross-linking and tyrosine-modification of very low molecular weight linear PEI synergistically enhances transfection efficacies and improves biocompatibility. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 161, p. 56-65, 2021.

KIM, Tae-Hun *et al.* Synthesis of polyethylene glycol-oligo (glutamic acid) conjugated with polyethylenimine-dexamethasone for gene delivery applications. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, n. 11, p. 7325-7330, 2013.

LINSHA MALI, A.; PRIYA, S. S.; REKHA, M. R. Hydrophobic and hydrophilic modifications of polyethylenimine towards gene delivery applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 45, p. 51323, 2021.

LIU, Minchen; HU, Yulan; FENG, Yi. Evaluation of low molecular weight polyethylenimine-introduced chitosan for gene delivery to mesenchymal stem cells. **Materials Express**, v. 10, n. 7, p. 1170-1176, 2020.

MCMURRY, John. **Química Orgânica**. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

MAGNET, C. *et al.* Functionalization of organic membranes by polyelectrolyte multilayer assemblies: Application to the removal of copper ions from aqueous solutions. **Journal of colloid and interface science**, v. 376, n. 1, p. 202-208, 2012.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G. M.; KRIS, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

RABELO, Ana Cláudia *et al.* Realidades e perspectivas do uso de terapia gênica no tratamento de doenças. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 20, n. 3, p. 122-127, 2018.

SEO, Jinah *et al.* Zoledronic acid-loaded cationic methylcellulose polyplex nanoparticles for enhanced gene delivery efficiency and breast cancer cell killing effect. **Applied Nanoscience**, v. 12, n. 11, p. 3303-3314, 2022.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

SHIRLEY, Jamie L. *et al.* Immune responses to viral gene therapy vectors. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 3, p. 709-722, 2020.

SOMBRA, Venícios Gonçalves. Desenvolvimento de Materiais Termorresponsivos de Copolímeros de Poli (N-Isopropilacrilamida) com Goma do Cajueiro e seus derivados. 2019.

SUN, Chongbo *et al.* Molecular dynamics simulations of DNA/PEI complexes: effect of PEI branching and protonation state. **Biophysical journal**, v. 100, n. 11, p. 2754-2763, 2011.

TAUHARDT, Lutz *et al.* Linear polyethyleneimine: optimized synthesis and characterization—on the way to “pharmagrade” batches. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 212, n. 17, p. 1918-1924, 2011.

VAN DER GUCHT, Jasper *et al.* Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems. **Journal of colloid and interface science**, v. 361, n. 2, p. 407-422, 2011.

VOGEL, Arthur Israel. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2017.

XU, Tao *et al.* Elucidating the role of free polycationic chains in polycation gene carriers by free chains of polyethylenimine or N, N, N-trimethyl chitosan plus a certain polyplex. **International journal of nanomedicine**, p. 3231-3245, 2014.

WAGNER, Michael *et al.* Opposites attract: influence of the molar mass of branched poly (ethylene imine) on biophysical characteristics of siRNA-based polyplexese. **Rsc Advances**, v. 3, n. 31, p. 12774-12785, 2013.

WAN, Tao *et al.* Synthesis of polyethylenimine-modified magnetic hydrogel nanocomposite absorbents for heavy metals removal. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 39, n. 11, p. 3138-3145, 2022.

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

WU, Xiao-Ru *et al.* Amino acid-linked low molecular weight polyethylenimine for improved gene delivery and biocompatibility. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 975, 2020.

YUE, Yanan; WU, Chi. Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 2, p. 152-170, 2013.

ZHANG, Wen *et al.* Insight into the synthesis of branched polyethylenimines from 2-haloethylamine via a one-pot two-stage process. **Polymer**, v. 255, p. 125113, 2022.

ZHANG, Yu *et al.* Intelligent poly (l-histidine)-based nanovehicles for controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 349, p. 963-982, 2022.

ZIEBARTH, Jesse D. *et al.* Structural comparisons of PEI/DNA and PEI/siRNA complexes revealed with molecular dynamics simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 8, p. 1941-1952, 2017.

ZYNTÉGLO. **ZYNTÉGLO™ is a one-time gene therapy that addresses beta-thalassemia at the genetic level.** 2023. Disponível em: <<https://www.zynteglo.com/how-zynteglo-gene-therapy-works>>. Acesso em: 31/01/2024

**APÊNDICE A - Relações de volume calculadas para cada razão N/P
considerando soluções de concentração 0,2 mg mL⁻¹.**

N/P	PEI			PEI-Cys		PEI-His	
	Vol. DNA (mL)	Vol. PEI (mL)	Vol. Tampão (mL)	Vol. PEI-Cys (mL)	Vol. Tampão (mL)	Vol. PEI-His (mL)	Vol. Tampão (mL)
0,0	0,125	0,000	0,875	0,000	0,875	0,000	0,875
0,3	0,125	0,005	0,870	0,007	0,868	0,007	0,868
0,6	0,125	0,010	0,865	0,013	0,862	0,014	0,861
1,2	0,125	0,020	0,855	0,027	0,848	0,028	0,847
1,8	0,125	0,030	0,845	0,040	0,835	0,042	0,833
2,4	0,125	0,040	0,835	0,053	0,822	0,055	0,820
3,0	0,125	0,050	0,825	0,067	0,808	0,069	0,806
3,6	0,125	0,060	0,815	0,080	0,795	0,083	0,792
4,2	0,125	0,070	0,805	0,093	0,782	0,097	0,778
4,8	0,125	0,080	0,795	0,107	0,768	0,111	0,764
5,4	0,125	0,090	0,785	0,120	0,755	0,125	0,750
6,0	0,125	0,100	0,775	0,133	0,742	0,138	0,737
7,5	0,125	0,125	0,750	0,166	0,709	0,173	0,702
9,0	0,125	0,150	0,725	0,200	0,675	0,208	0,667
10,5	0,125	0,175	0,700	0,233	0,642	0,242	0,633
12,0	0,125	0,200	0,675	0,266	0,609	0,277	0,598
15,0	0,125	0,225	0,650	0,333	0,542	0,346	0,529