

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

**HELOÍSA ROSA**

**Interações entre DNA de Bacteriófagos e Partículas**  
**Biomiméticas Catiônicas**

São Paulo

Data do depósito na SPG:

01/08/2008

**HELOÍSA ROSA**

**Interações entre DNA de Bacteriófagos e Partículas  
Biomiméticas Catiônicas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Bioquímica).*

*Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Maria Carmona-Ribeiro*

São Paulo

2008

Heloísa Rosa

Interações entre DNA de Bacteriófagos e Partículas Biomiméticas Catiônicas

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química  
da Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).*

Aprovado em: .....

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** .....

Instituição: .....

Assinatura: .....

**Prof. Dr.** .....

Instituição: .....

Assinatura: .....

**Prof. Dr.** .....

Instituição: .....

Assinatura: .....

*Aos meus pais, **Edgard Rosa e Lucimar Raymundi Rosa**,  
pela vida e pelo amor incondicional.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus;

À minha orientadora Ana Maria Carmona-Ribeiro, pelo aprendizado e oportunidade, além do entusiasmo pela pesquisa;

Às minhas queridas irmãs Estela e Gabriela, pelo carinho e compreensão;

Aos meus avós, por estarem presentes em todos os momentos;

Aos amigos do laboratório:

Débora Braga Vieira, pela amizade e pelo incentivo;

Julio Rozenfeld, por toda atenção;

Fabiana Diniz e Cecília Sobral, pela empolgação;

Nilton Lincopan, Viviane Kim, Ana Carolina Silva e Rubens Araújo,  
pelos cafés e pelas risadas;

Aos outros amigos Vinícius e Daniel Manzoni, Viviana Paes e Meire Nakano;

À prof<sup>a</sup>. Denise Petri, pelas imagens de microscopia;

Aos funcionários do Instituto de Química;

Ao CNPq pelo suporte financeiro;

A todos que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e a força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre”.*  
*(Louis L’Amour)*

*“A vida não passa de um instante, mas basta este instante para empreendermos coisas eternas”.*  
*(Ernest Bersot)*

## RESUMO

Rosa, H. **Interações entre DNA de Bacteriófagos e Partículas Biomiméticas Catiônicas**. 2008. 78p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A associação entre DNA de cadeia de longa e partículas catiônicas foi caracterizada por determinações de tamanho (espalhamento de luz dinâmico), análise de potencial-zeta, turbidimetria, estabilidade coloidal, microscopia de força atômica (AFM) e determinação de citotoxicidade dos arranjos contra a bactéria *E. coli* a partir da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Partículas de poliestireno sulfato (PSS) de diversos tamanhos foram recobertas por uma bicamada de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e intituladas partículas biomiméticas catiônicas PSS/DODAB. Estas são altamente organizadas, catiônicas e monodispersas. Em seguida, por adição de  $\lambda$ , T5 ou T2-DNA, os arranjos supramoleculares PSS/DODAB/DNA foram obtidos e caracterizados em função da concentração de DNA e tamanho de partícula (80-700 nm). Em baixas concentrações de DNA, foram obtidos arranjos cationicos PSS/DODAB/DNA de boa estabilidade coloidal, polidispersidade moderada e alta citotoxicidade contra *E. coli*. A partir da concentração de DNA correspondente à neutralização de cargas, foram obtidos arranjos neutros ou aniônicos de baixa estabilidade coloidal, alta polidispersidade e citotoxicidade moderada. Arranjos similares a nucleossomos foram visualizados por AFM para alguns arranjos na situação de neutralização de cargas (potencial-zeta igual a zero). Estão em perspectiva experimentos com DNA plasmidial que poderão revelar o papel do tamanho de partícula, carga e polidispersidade sobre a transfecção de genes em sistemas de células-modelo.

**Palavras-chave:** partículas biomiméticas catiônicas, bicamadas catiônicas, DNA.

## ABSTRACT

Rosa, H. **Interactions between Bacteriophage DNA and Cationic Biomimetic Particles.** 2008. 78p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The interaction between giant bacteriophage DNA and cationic biomimetic particles was characterized from sizing by dynamic light-scattering, zeta-potential analysis, turbidimetry, colloid stability, atomic force microscopy (AFM) and determination of cytotoxicity against *E. coli* from colony forming unities (CFU) counting. Firstly, polystyrene sulfate (PSS) particles with different sizes were covered by a dioctadecyldimethylammonium bromide (DODAB) bilayer yielding the so called cationic biomimetic particles (PSS/DODAB). These cationic particles are highly organized, present a narrow size distribution and were obtained over a range of particle sizes. Thereafter, upon adding  $\lambda$ , T5 or T2-DNA to PSS/DODAB particles, supramolecular assemblies PSS/DODAB/DNA were obtained and characterized over a range of DNA concentrations and particle sizes (80-700 nm). Over the low DNA concentration range, PSS/DODAB/DNA assemblies were cationic, colloidally stable with moderate polydispersity and highly cytotoxic against *E. coli*. From DNA concentration corresponding to charge neutralization, neutral or anionic supramolecular assemblies PSS/DODAB/DNA exhibited low colloid stability, high polydispersity and moderate cytotoxicity. Some nucleosome mimetic assemblies were observed by AFM at charge neutralization (zeta-potential equal to zero). In perspective are experiments with plasmid DNA which will possibly reveal the role of particle charge, size and polydispersity for PSS/DODAB/DNA mediated gene transfection.

**Keywords:** cationic biomimetic particles, cationic bilayers, DNA.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da mudança de algumas propriedades físicas de soluções de anfifílicos em função da sua concentração (Caetano, 2001).....5
- Figura 2:** Estrutura da fosfatidilcolina, fosfolípide natural capaz de formar bicamadas.....7
- Figura 3:** Microscopia eletrônica de transmissão de amostras congeladas (crio-TEM) de fragmentos de DODAB obtidos por sonicação com “tip”. Somente fragmentos de bicamada de DODAB são encontrados em dispersão. A barra no lado direito superior da imagem representa 100 nm de tamanho (Andersson *et al.*, 1995).....9
- Figura 4:** Estrutura de um nucleossomo formado pela associação de nucleoproteínas - histonas (1, 2A, 2B, 3 e 4), local onde o DNA está organizado em células eucarióticas (A) e organização dos nucleossomos na cromatina (B).....10
- Figura 5:** Estrutura química da molécula de DODAB (A), bicamadas fechadas formadas por vortexação acima da T<sub>c</sub> em água (B) e fragmentos de bicamada obtidos por sonicação com tip também acima da T<sub>c</sub> (C).....11
- Figura 6:** Microscopia eletrônica da partícula de poliestireno sulfato utilizada como modelo de particulado hidrofóbico e aniônico para adsorção de bicamadas catiônicas de DODAB....17
- Figura 7:** Esquema das interações entre os fragmentos de bicamada catiônica de DODAB e partículas poliméricas de carga oposta. O recobrimento com bicamada contínua pode ser obtido em 1 mM de NaCl.....17
- Figura 8:** Visualização por microscopia eletrônica das espécies bacterianas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.....26
- Figura 9:** Distribuição de tamanho para partículas de PSS com 83 (A), 137 (B), 301 (C), 526 (D) e 626 (E) nm de diâmetro médio a  $6,6 \times 10^{10}$ ,  $2,4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1,6 \times 10^9$  e  $1,2 \times 10^9$  partículas/mL, respectivamente.....28
- Figura 10:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para o arranjo PSS83/DODAB. A concentração final fixa de PSS83 foi igual a  $6,6 \times 10^{10}$  partículas/mL e a área superficial total da dispersão foi de  $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ . A concentração final de DODAB variou de  $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2}$  mM. As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....29
- Figura 11:** Distribuição de tamanho para os arranjos PSS83/DODAB. A concentração final de PSS83 foi igual a  $6,6 \times 10^{10}$  partículas/mL. A concentração final de DODAB foi de  $1 \times 10^{-4}$  (A),  $2 \times 10^{-4}$  (B),  $5 \times 10^{-4}$  (C),  $6 \times 10^{-4}$  (D),  $1 \times 10^{-3}$  (E),  $2 \times 10^{-3}$  (F),  $1 \times 10^{-2}$  (G) e  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....30

**Figura 12:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para os arranjos PSS137/DODAB. A concentração final fixa de PSS137 foi de  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e a área superficial total igual a  $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ . A concentração final de DODAB variou de  $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2} \text{ mM}$ . As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....31

**Figura 13:** Distribuição de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB. A concentração final de PSS137 foi igual a  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL. A concentração final de DODAB foi igual a  $1 \times 10^{-4}$  (A),  $2 \times 10^{-4}$  (B),  $5 \times 10^{-4}$  (C),  $6 \times 10^{-4}$  (D),  $1 \times 10^{-3}$  (E),  $2 \times 10^{-3}$  (F),  $1 \times 10^{-2}$  (G) e  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....32

**Figura 14:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para os arranjos PSS301/DODAB. A concentração final fixa e a área superficial total das partículas de PSS301 foram  $5 \times 10^9$  partículas/mL e  $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ , respectivamente. A concentração final de DODAB variou de  $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2} \text{ mM}$ . As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....33

**Figura 15:** Distribuição de tamanho para os arranjos PSS301/DODAB. A concentração final de PSS301 foi igual a  $5 \times 10^9$  partículas/mL. A concentração final de DODAB variou na faixa de  $1 \times 10^{-4}$  (A),  $2 \times 10^{-4}$  (B),  $5 \times 10^{-4}$  (C),  $6 \times 10^{-4}$  (D),  $1 \times 10^{-3}$  (E),  $2 \times 10^{-3}$  (F),  $1 \times 10^{-2}$  (G) e  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....34

**Figura 16:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para os arranjos PSS526/DODAB. A concentração final fixa e a área superficial total das partículas de PSS301 foram iguais a  $1,6 \times 10^9$  partículas/mL e  $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ , respectivamente. A concentração final de DODAB variou de  $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2} \text{ mM}$ . As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....35

**Figura 17:** Distribuição de tamanho para os arranjos PSS526/DODAB. A concentração final de PSS526 foi fixada em  $1,6 \times 10^9$  partículas/mL. A concentração final de DODAB foi de  $1 \times 10^{-4}$  (A),  $2 \times 10^{-4}$  (B),  $5 \times 10^{-4}$  (C),  $6 \times 10^{-4}$  (D),  $1 \times 10^{-3}$  (E),  $2 \times 10^{-3}$  (F),  $1 \times 10^{-2}$  (G) e  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....36

**Figura 18:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para os arranjos PSS626/DODAB. A concentração final fixa e a área superficial total das partículas de PSS626 foram de  $1,2 \times 10^9$  partículas/mL e  $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ , respectivamente. A concentração final de DODAB variou de  $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2} \text{ mM}$ . As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....37

**Figura 19:** Distribuição de tamanho para os arranjos PSS626/DODAB. A concentração final de PSS626 foi igual a  $1,2 \times 10^9$  partículas/mL. A concentração final de DODAB variou de  $1 \times 10^{-4}$  (A),  $2 \times 10^{-4}$  (B),  $5 \times 10^{-4}$  (C),  $6 \times 10^{-4}$  (D),  $1 \times 10^{-3}$  (E),  $2 \times 10^{-3}$  (F),  $1 \times 10^{-2}$  (G) e  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.....38

**Figura 20:** Distribuição de tamanho para partículas de PSS/DODAB formadas a partir de partículas de PSS com diâmetro de 83 (A), 137 (B), 301 (C), 526 (D) e 626 (E) nm em concentrações de  $6,6 \times 10^{10}$ ,  $2,4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1,6 \times 10^9$  e  $1,2 \times 10^9$  partículas/mL, respectivamente, após a interação com 0,02 mM de DODAB. Esta concentração de DODAB foi suficiente para cobrir uma área superficial total de  $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$  de partículas com uma bicamada.....40

**Figura 21:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para o arranjo PSS137/DODAB/ $\lambda$ -DNA, onde as concentrações finais fixas de PSS137 e DODAB foram  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de  $\lambda$ -DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....42

**Figura 22:** Distribuições de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB/ $\lambda$ -DNA, onde as concentrações finais fixas de PSS137 e DODAB foram  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração final de  $\lambda$ -DNA variou de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....43

**Figura 23:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para o arranjo PSS137/DODAB/T5-DNA, onde as concentrações finais fixas de PSS137 e DODAB foram  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de T5-DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....44

**Figura 24:** Distribuições de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB/T5-DNA, sendo as concentrações finais fixas de PSS137 e DODAB iguais a  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração final de T5-DNA foi de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....45

**Figura 25:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para o arranjo PSS137/DODAB/T2-DNA sendo as concentrações finais fixas de PSS137 e DODAB iguais a  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de T2-DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....46

**Figura 26:** Distribuições de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB/T2-DNA, onde as concentrações finais fixas de PSS137 e DODAB foram de  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração final de T2-DNA foi de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....47

**Figura 27:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para o arranjo PSS301/DODAB/ $\lambda$ -DNA, sendo as concentrações finais fixas de PSS301 e DODAB iguais a  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de  $\lambda$ -DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....50

**Figura 28:** Distribuições de tamanho para os arranjos PSS/DODAB/ $\lambda$ -DNA, onde as concentrações finais fixas de PSS301 e DODAB iguais a  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração final de  $\lambda$ -DNA foi de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....51

**Figura 29:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para arranjos PSS301/DODAB/T5-DNA, sendo as concentrações finais fixas de PSS301 e DODAB iguais a  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de T5-DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....52

**Figura 30:** Distribuições de tamanho para os arranjos PSS/DODAB/T5-DNA, onde as concentrações finais fixas de PSS301 e DODAB foram de  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração final de T5-DNA foi de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....53

**Figura 31:** Diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) para arranjos PSS301/DODAB/T2-DNA, onde as concentrações finais fixas de PSS301 e DODAB foram de  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de T2-DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....54

**Figura 32:** Distribuições de tamanho para os arranjos PSS301/DODAB/T2-DNA, sendo as concentrações finais fixas de PSS301 e DODAB iguais a  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração final de T2-DNA foi de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Todas as amostras foram preparadas em NaCl 1 mM e interagiram por 1 h/25°C.....55

**Figura 33:** Efeito do tipo de DNA ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) em uma concentração fixa de 10  $\mu\text{g/mL}$  de DNA sobre o diâmetro médio, o potencial-zeta e a polidispersidade dos arranjos PSS137/DODAB/DNA (A, B, C) e PSS301/DODAB/DNA (D, E, F).....58

**Figura 34:** Efeito do tempo (A) e concentração de DODAB (B) sobre cinéticas de turbidez a 400 nm para os arranjos PSS301/DODAB. As concentração finais de PSS foi de  $5 \times 10^9$  partículas/mL, enquanto a concentração de DODAB variou de  $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2}$  mM. Notar que a turbidez do particulado sem DODAB é estável com o tempo e igual a aproximadamente 1.5.....59

**Figura 35:** Efeito do tempo, tipo e concentração de DNA sobre cinéticas de turbidez a 400 nm para os arranjos PSS301/DODAB/ $\lambda$  (A, B) e T2-DNA (C, D). As concentrações finais de PSS e DODAB foram  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$  para  $\lambda$  e T2-DNA.....60

**Figura 36:** Visualização macroscópica das dispersões de PSS301/DODAB/DNA e PSS137/DODAB/DNA nos tubos de ensaio em concentrações crescentes de  $\lambda$ , T5 e T2-DNA (A). Imagens de AFM para o arranjo PSS137/DODAB/T2-DNA no ponto de neutralização de cargas (8  $\mu\text{g/mL}$  de T2-DNA) (B).....62 e 63

**Figura 37:** Representação esquemática de uma partícula biomimética utilizada para imobilização de DNA (uma biomolécula de carga oposta).....64

**Figura 38:** Curvas de crescimento para bactérias de *E. coli* (A, B) e *S. aureus* (C, D) pelos seguintes métodos: leituras de turbidez a 600 nm (A e C) e densidade numérica de células n (B e D) como uma função do tempo de cultivo em horas. Antes de plaquear 0,1 mL da mistura em ágar, diluições de 1:1000 foram realizadas em água Milli Q.....65

**Figura 39:** Efeito dos arranjos supramoleculares PSS/DODAB/DNA sobre a viabilidade celular (%) de *E. coli*. Partículas biomiméticas catiônicas (149 e 309 nm de diâmetro médio) interagiram com  $\lambda$ -DNA (A, D), T5-DNA (B, E) e T2-DNA (C, F) As concentrações finais de PSS137 e PSS301 foram de  $2,4 \times 10^{10}$  e  $5 \times 10^9$  partículas/mL. A concentração final de DODAB foi igual a 0,02 mM. A concentração final de células de *E. coli* em cada amostra foi de  $1 \times 10^7$  UFC/mL.....66

**Figura 40:** Representação esquemática das possibilidades de compactação de DNA de cadeia longa (vermelho) sobre partículas biomiméticas catiônicas (cinza).....67

**Figura 41:** Efeito tipo de DNA ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) em uma concentração fixa de 10  $\mu$ g/mL de DNA sobre o potencial-zeta e a viabilidade celular de *E. coli* para os arranjos PSS137/DODAB/DNA (A e B) e PSS301/DODAB/DNA (C e D).....68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Agregados supramoleculares de anfifílicos (Israelachvili, 1992).....	3
<b>Tabela 2:</b> Citotoxicidade diferencial do DODAB para células procarióticas e eucarióticas (Carmona-Ribeiro, 2003).....	16
<b>Tabela 3:</b> Propriedades físicas do DNA dos bacteriófagos $\lambda$ , T5 e T2.....	20
<b>Tabela 4:</b> Propriedades das microesferas de poliestireno sulfato (PSS) em água. As abreviaturas para cada particulado incluem o diâmetro médio obtido por microscopia eletrônica fornecido pelo fabricante.....	21
<b>Tabela 5:</b> Propriedades físicas das partículas biomiméticas utilizadas para a imobilização de DNA. A concentração teórica de DODAB para recobrimento das partículas de PSS com uma bicamada de DODAB é $7 \times 10^{-3}$ mM quando a área superficial total para cada particulado é $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ .....	39
<b>Tabela 6:</b> Diâmetro médio, potencial-zeta e polidispersidade para partículas de PSS137 ( $2,4 \times 10^{10}$ partículas/mL), dispersão de DODAB e para os arranjos supramoleculares PSS137/DODAB/ $\lambda$ , T5 e T2-DNA em concentrações crescentes de DNA.....	48
<b>Tabela 7:</b> Diâmetro médio, potencial-zeta e polidispersidade para partículas de PSS301 ( $5 \times 10^9$ partículas/mL), dispersão de DODAB e para os arranjos supramoleculares PSS301/DODAB/ $\lambda$ , T5 e T2-DNA em concentrações crescentes de DNA.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	atomic force microscopy (microscopia de força atômica)
DODAB	brometo de dioctadecildimetilamônio
DODAB BF	fragmentos de bicamada de DODAB
$D_z$	diâmetro médio
$\lambda$ -DNA	DNA do bacteriófago lambda ( $\lambda$ )
mM	milimolar
mV	milivolt
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
PSS	poliestireno sulfato
PSS83	poliestireno sulfato com 83 nm de diâmetro
PSS137	poliestireno sulfato com 137 nm de diâmetro
PSS301	poliestireno sulfato com 301 nm de diâmetro
PSS526	poliestireno sulfato com 526 nm de diâmetro
PSS626	poliestireno sulfato com 626 nm de diâmetro
TSB	tryptic soy broth
T5-DNA	DNA do bacteriófago T5

T2-DNA	DNA do bacteriófago T2
UFC	unidades formadoras de colônia
UFC/mL	unidades formadoras de colônia por mililitro
$\mu\text{g/mL}$	microgramas por mililitro
$\mu\text{m}$	mícron
$\zeta$	potencial-zeta



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 SISTEMAS ARTIFICIAIS PARA ENTREGA DE GENES.....	1
1.2 MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS E AUTO-ASSOCIAÇÃO.....	2
1.3 BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO (DODAB) E SUA INTERAÇÃO COM DNA.....	9
1.4 PARTÍCULAS UTILIZADAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE DNA.....	12
1.5 INTERAÇÕES ENTRE DNA E PARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS.....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.2.1 PREPARO DE DISPERSÕES DE FRAGMENTOS DE BICAMADA CATIÔNICA DE BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO (DODAB) .....	19
3.2.2 DILUIÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE DNA DOS BACTERÍOFAGOS LAMBDA ( $\lambda$ ), T5 E T2.....	20
3.2.3 PREPARAÇÃO DAS DISPERSÕES DE POLIESTIRENO SULFATO (PSS) E DOS ARRANJOS PSS/DODAB.....	20
3.2.4 DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULA E POTENCIAL-ZETA PARA OS ARRANJOS PSS/DODAB E PSS/DODAB/DNA.....	21
3.2.5 DETERMINAÇÃO DE ESTABILIDADE COLOIDAL DE ARRANJOS PSS301/DODAB E PSS301/DODAB/DNA ATRAVÉS DE TURBIDIMETRIA A 400 NM.....	24
3.2.6 FOTOGRAFIA DAS DISPERSÕES E IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) PARA OS ARRANJOS PSS/DODAB/DNA.....	25
3.2.7 CULTIVO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	26
3.2.8 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR PARA OS ARRANJOS PSS137/DODAB/DNA E PSS301/DODAB/DNA CONTRA A BACTÉRIA <i>E. COLI</i> .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
4.1 RECOBRIMENTO DE PARTÍCULAS ANIÔNICAS DE POLIESTIRENO SULFATO (PSS) COM FRAGMENTOS DE BICAMADA CATIÔNICA DE DODAB.....	28
4.2 EFEITO DO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE DNA SOBRE PARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS DE PSS137/DODAB.....	41
4.3 EFEITO DO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE DNA SOBRE PARTÍCULAS BIOMIMÉTICAS DE PSS301/DODAB.....	49
4.4 ESTABILIDADE COLOIDAL DOS ARRANJOS PSS301/DODAB E PSS301/DODAB/DNA ATRAVÉS DE LEITURAS DE TURBIDEZ A 400 NM.....	58
4.5 FOTOGRAFIA DAS DISPERSÕES PSS137/DODAB/DNA E PSS301/DODAB/DNA E VISUALIZAÇÃO DOS ARRANJOS PSS137/DODAB/T2-DNA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	61
4.6 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO PARA DUAS ESPÉCIES DE MICRORGANISMOS.....	64
4.7 EFEITO DOS ARRANJOS PSS137/DODAB/DNA OU PSS301/DODAB/DNA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE <i>E. COLI</i> .....	65
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>