

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Sistemas artificiais para entrega de genes

Atualmente, inúmeros sistemas de entrega de genes são estudados quanto à sua especificidade de ação sobre as células (Zuhorn *et al.*, 2007; Torchilin, 2005). Tais sistemas baseiam-se em dois modelos bastante conhecidos: vetores virais e não virais. Vetores virais, constituídos por vírus e os mais utilizados para transfecção gênica apresentam alta eficiência de entrega de seu material genético para a célula hospedeira (Zuber *et al.*, 2006) quando comparados com vetores não virais - também conhecidos por vetores inertes (Laporte *et al.*, 2006; Pack *et al.*, 2005; Safinya, 2001). Porém, o uso repetitivo desses carreadores biológicos irá eventualmente gerar diversos problemas que poderiam ser evitados com o uso dos vetores inertes, que não são patogênicos e apresentam baixa toxicidade (Chittimalla *et al.*, 2007; Medina-Kauwe *et al.*, 2005; Oku *et al.*, 2001). Diversos tipos de moléculas ou partículas catiônicas capazes de ligar DNA e transportá-lo às células têm sido propostas (Ewert *et al.*, 2008; Bondi *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Dentre elas estão aquelas formadas por lípides catiônicos sintéticos em forma de fragmentos de bicamadas ou lipossomos ou os polieletrólitos ou polímeros carregados positivamente que servem como veículo para a entrega de genes (Petri & Carmona-Ribeiro, 2007).

Vários estudos descrevem as barreiras extra e intracelulares enfrentadas pelos complexos vetor-DNA para atingir o núcleo da célula. Estas barreiras envolvem a degradação do DNA no plasma, a evasão do DNA no endossomo e sua estabilidade no citoplasma (Hoekstra *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2005; Wiethoff & Middaugh, 2003; Brown *et al.*, 2001), uma vez que estes fatores influenciam diretamente a taxa de transfecção (Hoekstra *et al.*, 2007; Rao & Gopal, 2006). De acordo com Rejman *et al.* (2004) o tamanho dos vetores é de suma importância para sua internalização na célula, sendo um pré-requisito para o processo de

endocitose que está diretamente relacionado com a eficiência da transfecção. O estudo concluiu que partículas maiores ( $\geq 500$  nm de diâmetro) levam um tempo maior para alcançar o compartimento lisossomal em contraste com as menores ( $\leq 200$  nm de diâmetro). Estas observações são importantes para entender porque partículas maiores apresentam uma taxa maior de transfecção. Embora a internalização das partículas maiores possa ser menor em comparação com as menores, a liberação dos genes no citoplasma deve ser muito maior, devido ao seu prolongado tempo de residência neste compartimento, evitando, desta maneira, a rápida degradação lisossomal (Rejman *et al.*, 2004).

Vetores artificiais catiônicos precisam, ainda, de determinação sistemática e detalhada de seus efeitos *in vivo* referentes a biocompatibilidade e biodegradabilidade (Mastrobattista *et al.*, 2006; Pack *et al.*, 2005), para apresentarem segurança e eficiência com baixa toxicidade na entrega de genes (Agarwal & Mallapragada, 2008).

### **1.2 - Moléculas anfifílicas e auto-associação**

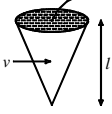


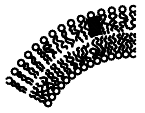
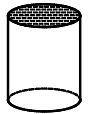
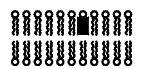
Anfifílicos em solução aquosa podem se auto-associar originando diferentes estruturas supramoleculares como as micelas, estruturas do tipo bastão, bicamadas, vesículas, fases hexagonais (invertidas ou não), entre outras formas possíveis. Os principais fatores que determinam a auto-associação são as forças de interação de van der Waals, o efeito hidrofóbico, as pontes de hidrogênio, as interações eletrostáticas e o parâmetro de empacotamento crítico ou parâmetro geométrico  $N_s$  (Israelachvili, 1992; Gennis, 1989; Evans & Wennerström, 1994).

$$N_s = \frac{v}{la_0}$$

onde,  $v$  é o volume da porção hidrofóbica da molécula do surfactante;  $l$  é o comprimento da cadeia apolar e  $a_0$  é a área ótima da cabeça polar.

A Tabela 1 ilustra a associação entre  $N_s$  e os agregados supramoleculares formados. À medida que o parâmetro geométrico aumenta, as dimensões da estrutura supramolecular formada também aumentam.

**Tabela 1:** Agregados supramoleculares de anfifílicos (Israelachvili, 1992).

Lipídio	$N_s$	Forma do empacotamento	Estrutura formada
Lipídios de cadeia simples (surfactantes) com área da cabeça polar grande: <i>SDS e CTAB em baixa concentração de sal.</i>	$< 1/3$	Cone 	Micela esférica 
Lipídios de cadeia dupla com área de cabeça polar grande, cadeias fluidas: <i>Fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina, diexadecilfosfato, sais de dialquildimetilamônio.</i>	$1/2 - 1$	Tronco de cone 	Bicamadas flexíveis, vesículas 
Lipídios de dupla cadeia com área de cabeça polar pequena, lipídios aniônicos em alta concentração salina, cadeias saturadas rígidas: <i>Fosfatidiletanolamina, fosfatidil serina <math>I^+ Ca^{2+}</math>.</i>	$\sim 1$	Cilindro 	Bicamadas planas 

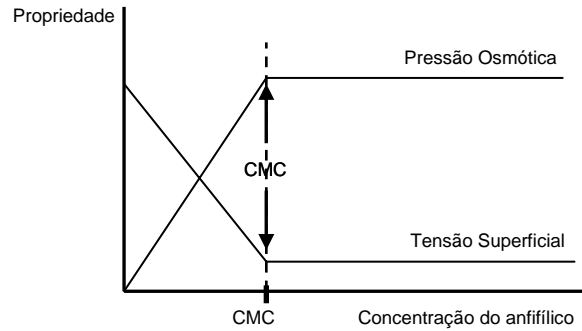
O tamanho e forma do agregado de anfifílico são dependentes dos parâmetros moleculares (volume da porção hidrofóbica da molécula, comprimento de cadeia e área da cabeça polar) e variáveis intensivas (temperatura e força iônica). O modelo de auto-associação de Israelachvili prevê o agregado ótimo para um determinado conjunto de parâmetros moleculares e variáveis intensivas usando um critério de minimização de energia livre para o monômero no agregado (Israelachvili *et al.*, 1977).

De um ponto de vista termodinâmico, a principal força que dirige a formação e estabilização de agregados de anfifílicos hidratados é o efeito hidrofóbico. Essa força é de natureza entrópica, pois permite uma maior organização das moléculas anfifílicas em forma

de agregados, mas às custas de um aumento da entropia da água (solvente), e é resultado de uma coerção ou de uma compressão desfavorável localizada sobre as moléculas de água ao empacotarem em torno de um hidrocarboneto não polar. A energia livre de auto-associação de surfactantes em soluções diluídas é constituída de três termos: i) a contribuição hidrofóbica devido às cadeias apolares; ii) o termo de superfície atribuído aos grupos polares; iii) o termo de empacotamento que requer que o interior hidrofóbico do agregado exclua água (Evans & Wennerström, 1994).

As micelas são estruturas altamente dinâmicas, e o equilíbrio entre monômero e agregado é um processo rápido (tempo de meia vida da ordem de microsegundos). A natureza da dinâmica destes agregados também se reflete nas propriedades de movimento dos monômeros dentro da micela. Eles podem rotacionar ao longo do seu eixo molecular, difundir lateralmente ao longo da superfície micelar e sofrer movimento segmental (cadeias alquílicas). Em comparação com outros agregados, como bicamadas ou monocamadas, as micelas são menos empacotadas e estáveis.

A formação de micelas usualmente é um processo altamente cooperativo e é caracterizada por mudanças abruptas em uma grande variedade de propriedades das soluções. As propriedades mais freqüentemente utilizadas para se definir os valores de concentração micelar crítica (cmc) são a tensão superficial, condutividade e turbidez (ou espalhamento de luz) (Jones & Chapman, 1995). A Figura 1 mostra um diagrama esquemático de algumas destas propriedades em função da concentração total de surfactante em solução.



**Figura 1:** Representação esquemática da mudança de algumas propriedades físicas de soluções de anfifílicos em função da sua concentração (Caetano, 2001).

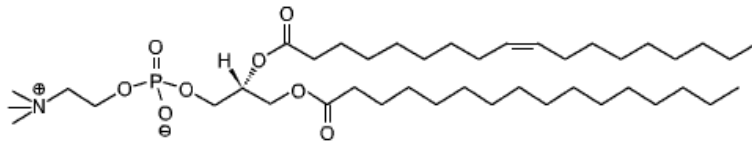
As moléculas do anfifílico se adsorvem na interface com o grupo hidrofóbico para fora da água e o grupo hidrofílico da solução. Como as forças de interação das moléculas de água com o grupo hidrofóbico é menor que as interações entre as moléculas de água, a adsorção do anfifílico causa uma redução na tensão superficial da solução. O gráfico da tensão superficial em função da concentração do anfifílico mostra uma queda significativa da tensão superficial como apresentado na Figura 1. Após a formação de micelas a concentração superficial do anfifílico se estabiliza assim como a tensão superficial, permitindo determinar a cmc pelo ponto de inflexão das duas semi-retas do gráfico de tensão superficial em função da concentração do anfifílico.

Apesar das micelas serem utilizadas como sistema-modelo para membranas naturais, os lipossomos são considerados como sistemas que mais se aproximam das membranas, devido ao fato destas estruturas se organizarem em forma de bicamadas que é, em princípio, semelhante à porção lipídica das membranas celulares, nas quais estão incorporadas as proteínas (Singer & Nicolson, 1972; New, 1990). Lipossomos podem ser definidos como vesículas lipídicas, formadas espontaneamente quando os lipídios estão dispersos em meio aquoso, podendo apresentar tamanhos diferentes e ser constituídos por várias bicamadas lipídicas (multilamelares) (New, 1990). Os lipossomos são caracterizados por sua composição lipídica, seu diâmetro médio e pela heterogeneidade dos tamanhos destes agregados em

solução (Gennis, 1989; Santos & Castanho, 2002). A semelhança entre os lipossomos e as membranas naturais contribui para que os primeiros sejam empregados para administração de medicamentos, sendo um método vantajoso nas aplicações medicinais, pois reduzem as dosagens a serem utilizadas e diminuem os efeitos alérgicos, tóxicos e colaterais das mesmas.

Os lipídios nas bicamadas podem apresentar fases distintas, dependendo da temperatura. Esta dependência está relacionada com a possibilidade das cadeias dos ácidos graxos em adotar conformações diferentes com o aumento da mesma (New, 1990). Desta maneira, ao ser atingida uma determinada temperatura, há a transição de uma fase gel ou sólida muito ordenada, para uma fase líquido cristalina onde o grau de liberdade das moléculas individuais é maior; esta condição resultante é descrita como sendo fluída (New, 1990). Esta temperatura, característica para cada lipídeo, é conhecida como temperatura de transição de fase ( $T_c$ ), sendo influenciada pelo comprimento da cadeia alifática, pelo grau de insaturação da mesma ou pela estrutura do grupo polar. O entendimento da transição de fase e fluidez das membranas é importante na preparação e exploração de lipossomos, desde que o comportamento de fase da membrana de lipossomos determina propriedades tais como permeabilidade, fusão, agregação e ligação à moléculas, as quais podem afetar a estabilidade dos lipossomos e seu comportamento em sistemas biológicos (Plagemann & Woffendin, 1988). A maioria dos lipídios nas membranas biológicas parece estar na fase líquido cristalina; geralmente os sistemas naturais não apresentam transições de fases bem definidas como os lipídios puros, sendo, porém, transições largas que abrangem uma faixa grande de temperaturas.

Bicamadas fechadas delimitando um compartimento aquoso interno (vesículas) podem ser formadas em água pela auto-associação de lípidos que também são moléculas anfifílicas (como exemplo, a molécula de fosfatidilcolina, Figura 2).



**Figura 2:** Estrutura da fosfatidilcolina, fosfolípide natural capaz de formar bicamadas.

Para anfifílicos formadores de bicamadas, o valor de  $v/a_0l$  deve ser próximo de um, caracterizando geometrias moleculares aproximadamente cilíndricas. Por essa razão, lipídios com duas cadeias são prováveis formadores de bicamadas, e de fato a maioria deles forma bicamadas.

A duplicação da cadeia também afeta outras propriedades do agregado, tanto estáticas como dinâmicas. Primeiro, aumenta a hidrofobicidade do lipídio, que diminui drasticamente sua concentração micelar crítica (cmc). A cmc de lipídios formadores de micelas está por volta de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  enquanto a de lipídios formadores de bicamadas está entre  $10^{-6}$  e  $10^{-10}$  M. Segundo, aumenta o tempo de residência,  $\tau_R$ , das moléculas dentro do agregado. Para lipídios formadores de micelas, o tempo de residência é aproximadamente  $10^{-4}$  s, enquanto que para lipídios formadores de bicamadas este tempo é de aproximadamente  $10^4$  s (Israelachvili, 1992).

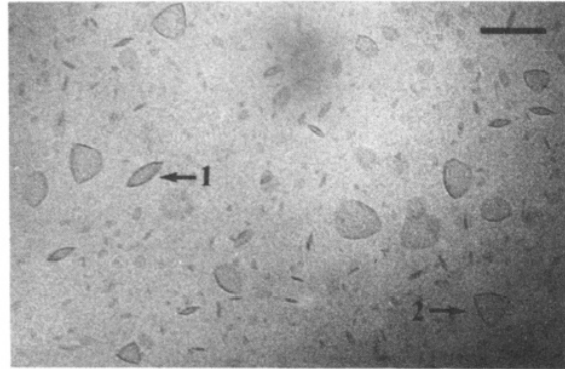
Os lipossomos podem ser caracterizados pela sua forma e pelo tamanho, sendo que este último varia de acordo com o método de preparação empregado. Existem vários métodos de preparação que podem levar à formação de vesículas multilamelares e unilamelares (com diferentes diâmetros) (New, 1990; Allen *et al.*, 1988; Wu & McConnell, 1975). Como exemplos têm-se:

- Sonicação em banho, que forma vesículas multilamelares (Kunitake *et al.*, 1977);

- Sonicação por tip, que forma vesículas unilamelares pequenas e/ou fragmentos de membranas (Mortara *et al.*, 1978; Kano *et al.*, 1979; Pansu *et al.*, 1990; Carmona-Ribeiro *et al.*, 1991);
- Vaporização clorofórmica, que gera vesículas unilamelares grandes (Carmona-Ribeiro & Chaimovich, 1983; Carmona-Ribeiro *et al.*, 1984);
- Injeção etanólica seguida de diálise para eliminação do etanol, que forma vesículas unilamelares pequenas (Batzri & Korn, 1973);
- Injeção etérea, que forma vesículas unilamelares grandes (Deamer & Bangham, 1976).

Em relação à preparação da dispersão lipídica, a sonicação por tip foi o método utilizado no presente trabalho para produzir pequenos fragmentos abertos de bicamadas de DODAB em solução aquosa de baixa força iônica. Estes fragmentos, assim como as vesículas que os originaram são coloidalmente estáveis devido à repulsão eletrostática (Pansu *et al.*, 1990; Carmona-Ribeiro *et al.*, 1991). As principais evidências para a existência dos fragmentos foram: i) a ausência de resposta osmótica da dispersão, indicando ausência de compartimento aquoso interno (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1984); ii) imagem da dispersão obtida através de microscopia eletrônica de transição (TEM) (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1991); iii) microscopia eletrônica de transmissão em amostras congeladas ou crio-TEM (Figura 3) (Hammarstrom *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1995); iv) espalhamento de luz quase-elástico e espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (Pansu *et al.*, 1990; Feitosa & Brown, 1997); v) coexistência de fases fluida e sólida na bicamada para dispersões sonicadas de DODAB atribuindo-se a fase fluida aos arranjos lipídicos na borda dos fragmentos (Cocquyt *et al.*, 2004); vi) solubilização de drogas hidrofóbicas em dispersões de fragmentos de bicamada que não ocorre nas vesículas fechadas correspondentes (Vieira & Carmona-Ribeiro, 2001; Pacheco & Carmona-Ribeiro, 2003).





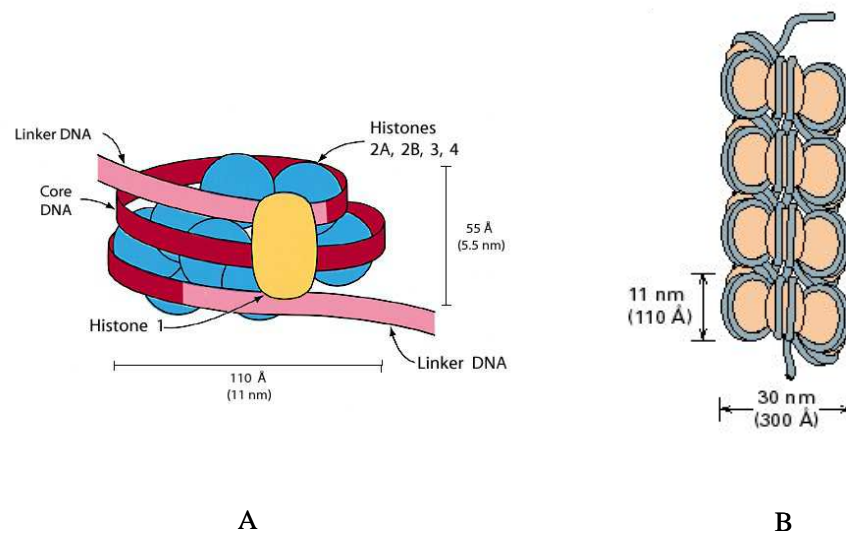
**Figura 3:** Microscopia eletrônica de transmissão de amostras congeladas (crio-TEM) de fragmentos de DODAB obtidos por sonicação com “tip”. Somente fragmentos de bicamada de DODAB são encontrados em dispersão. A barra no lado direito superior da imagem representa 100 nm de tamanho (Andersson *et al.*, 1995).

### **1.3 - Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e sua interação com DNA**

De um ponto de vista físico-químico, a interação entre DNA e lipídios ou surfactantes catiônicos pode ser vista como uma interação entre dois polieletrólitos de carga oposta dirigindo a formação de um complexo mantido à custa da formação de pares iônicos (Liu & Lu, 2007; Dias *et al.*, 2002; Barreleiro *et al.*, 2002); estes, por sua vez, são conhecidos como "lipoplexes" (Wasungu *et al.*, 2006; Davis, 2002; Han *et al.*, 2000) e entregam ácidos nucléicos às células, ocorrendo posteriormente a endocitose do sistema (Wrobell *et al.*, 1995). Essa interação induz uma mudança conformacional nas moléculas de DNA caracterizada por alta cooperatividade envolvendo a transição bobina-glóbulo para o DNA (Horer & Enache, 1995; Melnikov *et al.*, 1995; Remy *et al.*, 1994). As mudanças conformacionais do DNA induzidas por agentes catiônicos podem ser estudadas por microscopia de fluorescência para avaliar o grau de compactação do DNA (Gaweda *et al.*, 2008).

Apesar do avanço quanto a se desvendar alguns aspectos estruturais da interação, de um modo geral, a interação DNA/anfifílicos catiônicos ainda é pouco compreendida. Particularmente importante é a caracterização do sistema DNA/bicamadas catiônicas dada a perspectiva de seu uso em transferência de genes (Dias *et al.*, 2005).

Informações de relevante importância são aquelas referentes à organização do DNA nas células. Em relação ao DNA eucariótico ele está enrolado ao redor de nucleoproteínas, chamadas histonas (1, 2A, 2B, 3 e 4), formando os nucleossomos. O enrolamento do DNA ao redor do nucleossomo contribui para sua compactação, diminuindo sua extensão linear. Um trecho distendido de 200 pares de bases de DNA teria um comprimento de cerca de 68 nm. O enrolamento deste DNA ao redor de um octâmero de histonas enovela esse DNA em torno de partículas protéicas de aproximadamente 10 nm de diâmetro. Na cromatina, os nucleossomos estão dispostos de modo a formar um solenóide com aproximadamente 36 nm de diâmetro com 11 nm de espessura para cada camada de nucleossomos; estando essas camadas empilhadas umas sobre as outras (Figura 4) (Stryer *et al.*, 2004). Desta forma, DNA com comprimento da ordem de metros pode ser compactado em um núcleo celular de 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio (Kornberg & Lorch, 1999).

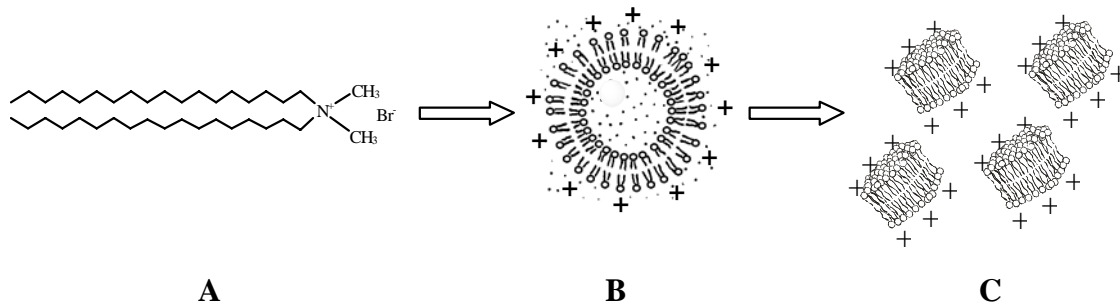


**Figura 4:** Estrutura de um nucleossomo formado pela associação de nucleoproteínas - histonas (1, 2A, 2B, 3 e 4), local onde o DNA está organizado em células eucarióticas (A) e organização dos nucleossomos na cromatina (B) (Stryer *et al.*, 2004).

Conforme citado anteriormente, a auto-associação de lípidos catiônicos em dispersão aquosa resulta em estruturas de bicamada fechada ou aberta dependendo do método de

preparação (Carmona-Ribeiro, 1992; Israelachvili, 1992). Os grupos da cabeça polar localizam-se na superfície das membranas, em contato com o meio externo, enquanto as cadeias hidrocarbônicas formam o centro hidrofóbico da membrana, que está protegido da água.

Na figura 5, apresenta-se a estrutura química do DODAB (A), lípide catiônico que se autoassocia em dispersão aquosa como bicamadas catiônicas fechadas (B) ou abertas (C) dependendo do método de preparação.



**Figura 5:** Estrutura química da molécula de DODAB (A), bicamadas fechadas formadas por vortexação acima da Tc em água (B) e fragmentos de bicamada obtidos por sonicação com tip também acima da Tc (C).

Desde sua introdução como um lípide sintético formador de bicamada, o DODAB tem mostrado potencial para diversas aplicações importantes uma vez que interage bem com biomoléculas importantes de carga oposta como proteínas (Lincopan *et al.*, 2006-a) e ácidos nucleicos (Lincopan *et al.*, 2006-a; Miguel *et al.*, 2003; Kikuchi & Carmona-Ribeiro, 2000; Behr, 1993) e superfícies e particulados negativamente carregados em geral como wafers de silício (Pereira *et al.*, 2006), filmes poliméricos (Pereira *et al.*, 2002), sílica (Moura & Carmona-Ribeiro, 2003; Rapuano & Carmona-Ribeiro, 2000; Rapuano & Carmona-Ribeiro, 1997), células (Tápias *et al.*, 1994; Carmona-Ribeiro *et al.*, 1997; Campanhã *et al.*, 2001) ou

partículas poliméricas de carga oposta (Pereira *et al.*, 2004; Tsuruta *et al.*, 1995; Carmona-Ribeiro & Midmore, 1992).

Cárdenas *et al.* (2005) utilizaram DNA fita simples (ss-DNA) e fita dupla (ds-DNA) extraído de salmão para interagir com brometo, cloreto ou fluoreto de cetiltrimetilamônio - CTAB, CTAC e CTAF (tensoativos semelhantes ao DODAB, mas com apenas uma cadeia hidrocarbônica) e demonstraram que a estabilidade dos complexos DNA/camada catiônica é influenciada pela densidade de cargas dos componentes dos arranjos. A molécula de DNA adsorve sobre superfícies hidrofóbicas independentemente da conformação (fita simples ou dupla) e do comprimento, provavelmente devido ao ganho entrópico com o deslocamento das moléculas de água da superfície hidrofóbica. Em geral, ss-DNA adsorve em uma extensão mais ampla do que ds-DNA devido a maior exposição de domínios hidrofóbicos e a camada adsorvida é mais fina do que aquela formada por ds-DNA.

De acordo com Mitrakos & Macdonald (2000), quanto maior a cadeia de nucleotídeos, maior a dificuldade de pareamento com anfifílicos catiônicos e portanto, menor a eficiência de incorporação em vesículas, com menor eficiência de transfecção gênica.

#### ***1.4 - Partículas utilizadas para a imobilização de DNA***

Inúmeros estudos demonstram a utilização de partículas-suporte utilizadas para a imobilização de biomoléculas, entre elas DNA. A necessidade de detecção de uma determinada seqüência de DNA tem se tornado cada vez mais necessária em estudos genéticos, patológicos, ensaios de segurança alimentar e muitos outros usos no âmbito das aplicações biotecnológicas e biomédicas.

Partículas hidrofílicas de sílica recobertas por bicamada lipídica (Moura & Carmona-Ribeiro, 2003; Salay & Carmona-Ribeiro, 1999; Rapuano & Carmona-Ribeiro, 1997) são um ótimo suporte para a imobilização de proteínas. A sílica, por ser um material biocompatível,

também pode ser utilizada como base para a construção de vetores inertes usados para terapia gênica (Luo & Saltzman, 2006).

Com o intuito de mimetizar os nucleossomos das células e posteriormente imobilizar DNA, Zinchenko *et al.* (2007-a) utilizaram nanopartículas (NP) catiônicas de vários tamanhos (10 a 99 nm) formadas por sílica recoberta com poli(L-lisina) e a partir destas foi possível a interação com DNA fita simples do bacteriófago T4 (T4-DNA). O estudo concluiu que a maior adsorção de DNA ocorre sobre as maiores partículas testadas (99 nm). Ainda neste contexto, os autores verificaram que o número de nanopartículas complexadas por cadeia de DNA aumenta com o aumento da concentração de partículas. Ainda, com o aumento da densidade numérica de partículas, diminui a quantidade de DNA livre em solução. A quantidade de DNA adsorvida por partícula é independente da concentração de NP, mas aumenta significativamente com o aumento do tamanho da partícula (Zinchenko *et al.*, 2007-a).

Alguns estudos avaliaram a seletividade e a eficiência de hibridização de DNA fita simples imobilizado sobre partículas poliméricas (Chiari, 2004). Polímeros catiônicos representam um bom suporte para imobilização de DNA, já que o ácido nucléico possui superfície carregada negativamente e a interação se dá por atração eletrostática (Fox & Ray, 2006). Modificações na superfície polimérica também apresentam uma alternativa para a construção de partículas-suporte (Chiari, 2004). Algumas modificações podem incluir tanto ligação covalente a determinadas moléculas orgânicas (Taira & Yokoyama, 2004) quanto ligações não-covalentes capazes de melhorar a interação entre DNA e partículas-suporte (Dong *et al.*, 2007), fornecendo assim diferentes tecnologias para a imobilização de DNA.

A utilização de nanopartículas magnéticas como materiais carreadores é muito estudada para a fabricação de biosensores, imunoenaios e várias outras aplicações envolvendo a imobilização de enzimas, proteínas, transporte controlado de DNA e transporte

de drogas anticancerígenas. A síntese química e a funcionalização de nanopartículas magnéticas e nanopartículas magnéticas cobertas por ouro tornou possível a imobilização de oligonucleotídeos derivatizados com biotina (covalentemente ligada ao oligonucleotídeo) sobre estas partículas derivatizadas com estreptavidina (Kouassi & Irudayaraj, 2006). Assim, nanopartículas de óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recobertas com ouro (Au) e, a seguir modificadas conforme descrito anteriormente apresentam excelente biocompatibilidade e estabilidade. Ainda, nesse mesmo estudo, foram usados outros procedimentos como modificações da superfície recoberta com ouro com grupo amina via silanização com 3-aminopropil trimetoxi silano (APTMS), quimiossorção de ácido L-aspártico (LAA) e a carboxilação com ácido mercaptoundecanóico. A imobilização de estreptavidina foi mais eficiente quando as partículas foram funcionalizadas com ácido L-aspártico, devido à disponibilidade de dois sítios de ligação através dos grupos carboxila e amina. Este estudo demonstra, ainda, que a proporção da hibridização está diretamente relacionada à extensão da ligação das partículas à estreptavidina e que partículas magnéticas cobertas por ouro são ideais como suportes para biosensores. O sucesso da imobilização e hibridização destas superfícies são passos importantes na avaliação da sensibilidade e especificidade da amostra (Kouassi & Irudayaraj, 2006).

### ***1.5 - Interações entre DNA e partículas biomiméticas***

A imobilização de DNA sobre partículas biomiméticas é um campo de considerável interesse em biotecnologia, apresentando inúmeras aplicações, entre elas, a fabricação de kits para hibridização de material genético (Zhang *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2004), diagnóstico clínico (Wu *et al.*, 2008; Feaver & Mullenix, 2004), chips de DNA (Cosnier & Mailley, 2008; Takahashi *et al.*, 2005) e terapia gênica (Pack *et al.*, 2005).

Uma promissora alternativa para a construção de partículas biomiméticas é a utilização de microesferas poliméricas aniônicas de poliestireno sulfato (PSS) recobertas por bicamadas

catiônicas (Carmona-Ribeiro & Midmore, 1992). A otimização do processo de recobrimento do particulado polimérico de PSS com uma bicamada catiônica de DODAB, a partir de fragmentos de bicamada de DODAB (DODAB BF) encontra-se descrita em Pereira *et al.*, (2004). Fragmentos de bicamada e microesferas de poliestireno interagem em solução para formar látex recoberto com uma bicamada catiônica. Nesse último trabalho, demonstrou-se a importância da força iônica para obtenção de um recobrimento homogêneo de cada partícula polimérica com uma bicamada catiônica através de um estudo sistemático de efeito de força iônica sobre tamanho e potencial zeta do particulado em presença de fragmentos de bicamada de DODAB obtidos por dispersão ultra-sônica (Pereira *et al.*, 2004). Primeiramente, os fragmentos adsorvem desordenadamente sobre o látex em decorrência de dois tipos de interação: 1) interações hidrofóbicas entre suas bordas hidrofóbicas e a superfície também hidrofóbica das partículas poliméricas; 2) atração eletrostática entre as partículas aniônicas e os fragmentos catiônicos (Pereira *et al.*, 2004). Diante dessa situação, a adição de 1 mM de NaCl final ocasionou homogeneização do recobrimento sobre o particulado possivelmente via implementação da interação hidrofóbica entre fragmentos adsorvidos adjacentes que então se fundiram para gerar excelente recobrimento contínuo de cada partícula com uma bicamada catiônica (Pereira *et al.*, 2004).

Recentemente nosso grupo tem explorado o potencial desse tipo de recobrimento também para revestir superfícies planas (Pereira *et al.*, 2006), particulados de sílica (Moura & Carmona-Ribeiro, 2003), particulados de drogas hidrofóbicas (Lincopan & Carmona-Ribeiro, 2006; Pacheco & Carmona-Ribeiro, 2003) e outras dispersões de interesse biotecnológico ou farmacológico.

Por outro lado, anfifílicos catiônicos de modo geral são reconhecidamente tóxicos tanto para células procarióticas como para as eucarióticas (Pantani *et al.*, 1995-a; Pantani *et al.*, 1995-b; Salt *et al.*, 1970). Compostos de amônio quaternário, como o DODAB,

apresentam alta toxicidade, e esta é decorrente de sua baixa biodegradabilidade (Lincopan *et al.*, 2006-b; Lv *et al.*, 2006). DODAB pode ser considerado um agente microbicida cuja citotoxicidade diferencial já foi estabelecida (Carmona-Ribeiro, 2003). Sua ação microbicida usando bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas como modelos já foi caracterizada (Pereira *et al.*, 2008; Carmona-Ribeiro, 2000; Martins *et al.*, 1997; Sicchierolli *et al.*, 1995; Tapias *et al.*, 1994) assim como seu efeito sobre a viabilidade de fibroblastos normais e transformados em cultura (Carmona-Ribeiro *et al.*, 1997). A Tabela 2 ilustra a citotoxicidade diferencial do DODAB frente a diversas linhagens celulares tanto de procariotos quanto de eucariotos (Tabela 2). Por exemplo, células de mamífero são mais resistentes a DODAB que bactérias e fungos, sobrando 50% de viáveis de fibroblastos normais em DODAB 1 mM enquanto que bactérias apresentam 0% de viabilidade em concentrações micromolares de DODAB (Tabela 2).

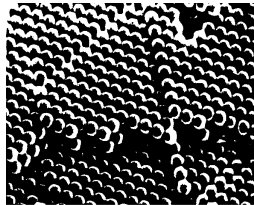
**Tabela 2:** Citotoxicidade diferencial do DODAB para células procarióticas e eucarióticas (Carmona-Ribeiro, 2003).

Tipo de célula	Concentração inicial de células viáveis / (células/mL)	[DODAB] para 50% de sobreviventes / (mM)
Fibroblastos de camundongo Balb-c 3T3 normais (clone A31)	$1 \times 10^4$	1,000
Fibroblastos de camundongo SVT2 (SV40 transformados)	$1 \times 10^4$	1,000
<i>Candida albicans</i>	$2 \times 10^6$	0,010
<i>Escherichia coli</i>	$2 \times 10^7$	0,028
<i>Salmonella typhimurium</i>	$2 \times 10^7$	0,010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3 \times 10^7$	0,005
<i>Staphylococcus aureus</i>	$3 \times 10^7$	0,006

Assim sendo, como DODAB foi o composto utilizado para recobrir partículas neste trabalho, avaliou-se sistematicamente a citotoxicidade dos arranjos PSS/DODAB/DNA sobre células bacterianas através de curvas de viabilidade celular de *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa, da família *Enterobacteriaceae*.

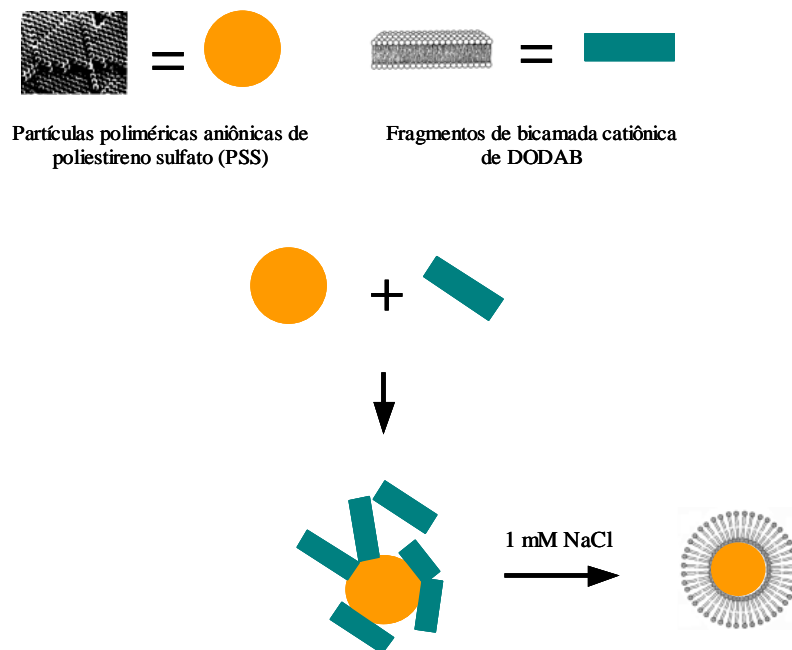


Na Figura 6, são apresentadas partículas aniônicas de poliestireno sulfato que podem ser obtidas comercialmente em ampla faixa de tamanhos (20-2000 nm) podendo ser utilizadas para formação das bicamadas catiônicas suportadas e adsorção de DNA ou outras biomoléculas de carga oposta como, por exemplo, proteínas (Lincopan *et al.*, 2006-a).



**Figura 6:** Microscopia eletrônica da partícula de poliestireno sulfato utilizada como modelo de particulado hidrofóbico e aniônico para adsorção de bicamadas catiônicas de DODAB.

A Figura 7 apresenta um esquema da interação entre fragmentos de bicamada de DODAB e partículas aniônicas de poliestireno sulfato. O resultado é a formação de partículas recobertas por bicamada catiônica produzidas a partir da interação partícula/fragmentos em solução de 1 mM de NaCl (Pereira *et al.*, 2004).



**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.

## 2 - OBJETIVOS

- Otimizar o recobrimento de diferentes diâmetros de partículas de poliestireno sulfato (PSS) através de sua interação com fragmentos de bicamada de DODAB; caracterizar os arranjos, PSS/DODAB, através de medidas de diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial zeta;
- Obter e caracterizar arranjos formados por partículas biomiméticas e diferentes tipos de DNA através de medidas de diâmetro médio, distribuição de tamanho, potencial-zeta e estabilidade coloidal em forma de cinéticas de turbidez a 400 nm em função do tipo e concentração de DNA (DNA dos bacteriófagos lambda, T5 e T2) ou tamanho da partícula-suporte;
- Determinar a citotoxicidade dos arranjos PSS/DODAB/DNA contra a bactéria *Escherichia coli*.

## 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 - *Materiais*

- Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA, lote 053K3446);
- Poliestireno sulfato (PSS) com diâmetros de  $83 \pm 4$ ,  $137 \pm 3$ ,  $301 \pm 6$ ,  $526 \pm 26$  e  $626 \pm 12$  nm (Interfacial Dynamics Corporations - Portland, Or, USA, lotes 10-277-71, 10-307-57, 10-66-58, 10-182-13 e 10-185-22, respectivamente);
- DNA linear dos bacteriófagos lambda ( $\lambda$ -DNA), T5 (T5-DNA) e T2 (T2-DNA), extraídos da bactéria *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, USA, lotes 094K9103, 76H8838, 86H8925, respectivamente);
- *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25522;
- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25523;

- Caldo Tryptic Soy Broth (TSB) (Merk KgaA - Darmstadt, Germany, lote VM545159 601);
- Ágar MacConkey (Merk KgaA - Darmstadt, Germany, lote VM 476868 420);
- Ágar Chapman (Merk KgaA - Darmstadt, Germany, lote VM 945369 235);
- Nitrato de mercúrio 1 mM;
- Difenilcarbazona (Merck KgaA - Darmstadt, Germany, lote 610L414387);
- Álcool etílico 95% p.a. (Merck S.A., lote 29536);
- Cloreto de Sódio (NaCl) (Merck KgaA - Darmstadt, Germany, lote K28555404 049);
- Água Milli-Q.

### **3.2 - Métodos**

#### **3.2.1 - Preparo de dispersões de fragmentos de bicamada catiônica de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)**

Lípide catiônico, DODAB, foi pesado analiticamente e transferido para um erlenmeyer. Depois, foi adicionada solução de NaCl 1 mM suficiente para obter-se a concentração desejada (2 mM). Em seguida, este preparado foi submetido a sonicação no equipamento Lab-Line Ultra Tip por 15 minutos, com sonda de um “cell disrupter virsonic - model 150”, operado a 90 W nominais e temperatura de aproximadamente 70°C. Após este procedimento, o DODAB foi centrifugado por 1 hora a 10.000 rotações por minuto (rpm) para precipitar partículas de titânio e multilamelas que eventualmente se formam por esta técnica.

A concentração de DODAB foi determinada através de microtitulação (Schales, O. & Schales, S.S., 1941) com nitrato de mercúrio. O princípio do método consiste em dosar o contraíon, utilizando difenilcarbazona como solução indicadora. A solução de NaCl também foi titulada por este método.

### 3.2.2 - Diluição da solução estoque de DNA dos bacteriófagos lambda ( $\lambda$ ), T5 e T2

DNA dos bacteriófagos  $\lambda$ , T5 e T2 na presença de 1 mM de NaCl foram obtidos comercialmente em concentrações estoque de 565, 505, 128,5  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, sendo estocados a  $-20^\circ\text{C}$ . A partir destas concentrações foram diluídos em concentrações finais de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . A Tabela 3 apresenta as propriedades físicas das moléculas de DNA utilizadas no trabalho.

**Tabela 3:** Propriedades físicas do DNA dos bacteriófagos  $\lambda$ , T5 e T2.

Tipo de DNA	Peso molecular (Da)	Tamanho do DNA (bp)
$\lambda$	$31,5 \times 10^6$	48.502
T5	$68 \times 10^6$	103.000
T2	$110 \times 10^6$	164.000

### 3.2.3 - Preparação das dispersões de poliestireno sulfato (PSS) e dos arranjos PSS/DODAB

Partículas de poliestireno sulfato com diâmetros de 83 (PSS83), 137 (PSS137), 301 (PSS301), 526 (PSS526) e 626 (PSS626) nm foram preparadas com as seguintes concentrações:  $2,6 \times 10^{11}$ ,  $9,6 \times 10^{10}$ ,  $2,0 \times 10^{10}$ ,  $6,6 \times 10^9$  e  $4,6 \times 10^9$  partículas/mL, respectivamente, calculadas a partir do número inicial de partículas/mL de PSS (dado fornecido pelo fabricante - ver Tabela 4). A área superficial total foi mantida igual em todas as dispersões ( $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ ). As concentrações finais de PSS83, PSS137, PSS301, PSS526 e PSS626 utilizadas em todos os experimentos foram fixadas em  $6,6 \times 10^{10}$ ,  $2,4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1,6 \times 10^9$  e  $1,2 \times 10^9$  partículas/mL, respectivamente. Na sequência, em diferentes experimentos, partículas de PSS interagiram por 1 h a  $25^\circ\text{C}$  com fragmentos de bicamada catiônica de DODAB em concentrações crescentes de DODAB ( $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2}$  mM) produzindo os arranjos PSS83/DODAB, PSS137/DODAB, PSS301/DODAB, PSS526/DODAB e PSS626/DODAB. Todas as amostras foram preparadas em solução de NaCl 1 mM.

**Tabela 4:** 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.

Látex	Diâmetro médio (nm)	Densidade de carga superficial ( $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )	Área por grupo carregado ( $\text{nm}^2$ )	Área superficial específica ( $\text{cm}^2\text{g}^{-1}$ )	Concentração de partículas (partículas/mL)
PSS83	$83 \pm 4$	1,84	8,7	685.205	$2,69 \times 10^{14}$
PSS137	$137 \pm 3$	0,79	20,1	415.124	$5,97 \times 10^{13}$
PSS301	$301 \pm 6$	1,68	9,5	188.944	$5,87 \times 10^{12}$
PSS526	$526 \pm 26$	4,95	3,3	108.122	$1,34 \times 10^{12}$
PSS626	$626 \pm 12$	6,43	2,5	90.850	$7,44 \times 10^{11}$

### ***3.2.4 - Determinação do diâmetro médio de partícula e potencial-zeta para os arranjos PSS/DODAB e PSS/DODAB/DNA***

Espalhamento de diferentes radiações como microondas, infravermelho próximo, visível ou ultravioleta, raios X, ou nêutrons, permite investigar estrutura e dinâmica de diferentes materiais dispersos em meio líquido (Chu & Liu, 2000). Ao incidir um feixe de luz sobre uma dispersão coloidal, parte dessa luz pode ser absorvida, parte pode ser espalhada e a parte restante pode ser transmitida sem alteração através da dispersão (Shaw, 1992). A turbidez freqüentemente associada ao aspecto leitoso de diversas dispersões coloidais é definida pela expressão (Shaw, 1992):

$$I_t/I_o = \exp[-T l]$$

onde,  $I_t$  é a intensidade da luz transmitida,  $I_o$  é a intensidade da luz incidente,  $T$  é a turbidez e  $l$  é o caminho percorrido pela luz através da dispersão. Essa turbidez, derivada do espalhamento de luz pela amostra, pode ser determinada em espectrofotômetros comuns como uma espécie de “absorção” de luz, ou seja, luz que não chega ao detector do aparelho por ter sido espalhada e que este interpreta como uma “absorbância”. Entretanto, freqüentemente

necessita-se conhecer a dispersão em maior detalhe quanto a tamanho de partículas individuais ou distribuições de tamanho das partículas.

“Dynamic light-scattering” ou “quasi-elastic light-scattering” ou “photon correlation spectroscopy” (PCS) ou “intensity fluctuation spectroscopy” são termos normalmente utilizados para indicar uma das técnicas mais versáteis e úteis para medir tamanhos de partícula ou distribuições de tamanho. Essa técnica se baseia na flutuação de intensidades de luz espalhada pela dispersão ao longo de tempo que decorre do movimento browniano de suas partículas. O decaimento da função de autocorrelação temporal dessas flutuações de intensidade de luz espalhada é usado para medir diretamente o coeficiente de difusão translacional ( $D$ ), o qual, por sua vez, está inversamente relacionado ao raio hidrodinâmico da partícula ( $R$ ). Para partículas esféricas em uma dispersão diluída, a relação de Stokes-Einstein associa  $D$  e  $R$ :

$$D = k_B T / (6\pi\eta R)$$

onde,  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\eta$  é a viscosidade do meio. Assim, para uma partícula esférica pode-se determinar seu raio hidrodinâmico (o qual inclui uma camada de solvatação) a partir de um experimento de PCS.

Uma caracterização física também importante de um particulado em dispersão refere-se ao seu comportamento diante de um campo elétrico aplicado. Eletroforese é o fenômeno segundo o qual partículas carregadas migram ao serem submetidas a um campo elétrico. A velocidade real é determinada pelo potencial-zeta das partículas, pela viscosidade e permissividade relativa do meio, e pela intensidade do campo elétrico aplicado. A velocidade eletroforética em um campo unitário de 1 V/m é chamada de mobilidade eletroforética da partícula. A partir da velocidade eletroforética o potencial-zeta que é o potencial de superfície junto ao plano de cisalhamento da partícula pode ser determinado usando a equação de Henry

válida para valores baixos de potencial-zeta (Henry, 1931) ou usando computações exatas de potencial-zeta a partir da teoria de O'Brien e White que estabelece um elo entre as mobilidades eletroforéticas medidas experimentalmente e os valores de potencial-zeta em diversas condições experimentais de tamanho de partícula e força iônica do meio (O'Brien & White, 1978). A mobilidade eletroforética da partícula quando o seu raio é relativamente grande em comparação à espessura da dupla camada elétrica (por exemplo, em força iônica alta quando o potencial de superfície decai rapidamente com a distância a partir da superfície física da partícula) é dada pela aproximação de Smoluchowski (Shaw, 1992):

$$\zeta = \mu \eta / \varepsilon$$

onde,  $\eta$  é a viscosidade do meio,  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do meio e  $\mu$  é a mobilidade eletroforética.

Nos experimentos, as distribuições de tamanho foram obtidas a partir da técnica de espalhamento quasi-elástico de luz, QELS, usando um equipamento ZetaPlus Zeta Potential Analyser da Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, equipado com um laser de 570 nm e um detector de luz à 90° para medidas de tamanho. O programa NNLS (“non negatively constrained least squares method”) entre outros do ZetaPlus, permite obter a distribuição das constantes de decaimento das flutuações da luz espalhada (Grabowski & Morrison, 1983). O coeficiente de difusão (D) é obtido a partir do ângulo de espalhamento e da constante de decaimento  $\Gamma$ , pela expressão  $D = \Gamma/k^2$ , onde  $k = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$ ,  $n$  é o índice de refração do meio,  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz incidente e  $\theta$  é o ângulo de espalhamento. Supondo serem esféricas as partículas da dispersão, o seu tamanho será relacionado com coeficiente de difusão D, pela relação de Stokes-Einstein:  $d = k_b T / 3\pi\eta(t)D$  ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ), onde  $k_b$  é a constante de Boltzmann's, T é a temperatura em K,  $\eta(t)$  é a viscosidade do líquido na qual as partículas da dispersão estão se movendo e d é o diâmetro médio da

partícula (Grabowski & Morrison, 1983). O potencial-zeta ( $\zeta$ ) das dispersões foi determinado a partir do tamanho médio, força iônica e mobilidade eletroforética ( $\mu$ ) tal que a partir da equação de Smoluchowski teremos  $\zeta = \mu \eta / \varepsilon$  onde  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $\varepsilon$  é a constante dielétrica. O Zeta-Sizer da Brookhaven utiliza-se do chamado “electrophoretic light scattering” segundo o qual a velocidade das partículas movendo-se em um campo elétrico é diretamente medida pela mudança de frequência da luz laser espalhada, a qual se relaciona diretamente com a mobilidade eletroforética (Wilson *et al.*, 2001).

Foram realizadas medidas de diâmetro médio ( $D_z$ ), distribuição de tamanho e potencial-zeta ( $\zeta$ ) para fragmentos de DODAB, partículas de PSS de vários tamanhos (Tabela 4), arranjos PSS/DODAB e arranjos PSS/DODAB/DNA em cubetas de poliestireno de 2 mL. O efeito da concentração de DODAB sobre diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial-zeta dos arranjos PSS/DODAB foi determinado para os diferentes particulados de PSS. Assim avaliou-se também o efeito da natureza e concentração de DNA ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) sobre diâmetro médio, distribuição de tamanho, potencial-zeta e estabilidade coloidal dos arranjos PSS/DODAB/DNA.

### ***3.2.5 - Determinação de estabilidade coloidal de arranjos PSS301/DODAB e PSS301/DODAB/DNA através de turbidimetria a 400 nm***

A turbidimetria baseia-se na propriedade que as suspensões coloidais apresentam de espalharem luz. A turbidimetria mede a radiação espalhada que corresponde a uma “absorbância” derivada desse espalhamento a qual pode ser determinada usando um espectrofotômetro UV-Vis (Harvey, 2000). Neste experimento, a turbidez a 400 nm foi determinada através de um espectrofotômetro Hitachi 2000. As amostras foram colocadas em cubetas de vidro de 1 mL.



A estabilidade coloidal dos arranjos PSS301/DODAB e PSS301/DODAB/DNA foi avaliada através de cinéticas de turbidez a 400 nm monitoradas durante 30 minutos a 25°C. Em uma primeira etapa, partículas de PSS301 ( $5 \times 10^9$  partículas/mL) e DODAB em concentrações crescentes ( $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2}$  mM) foram rapidamente misturadas (aproximadamente 10 segundos) antes que as leituras de turbidez a 400 nm fossem realizadas. Na etapa seguinte, o arranjo PSS301/DODAB com concentração de  $5 \times 10^9$  partículas/mL para PSS301 e 0,02 mM para DODAB interagiu por 1 h a 25°C e, em seguida, diferentes tipos de DNA ( $\lambda$ , T5 ou T2-DNA) foram adicionados na mistura. As concentrações de DNA variaram de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$  e a turbidez foi lida a 400 nm.

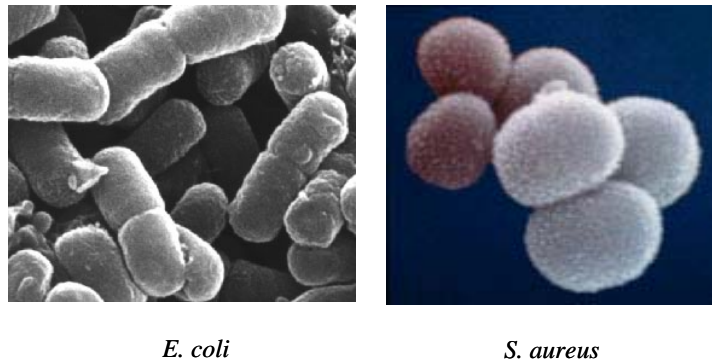
### ***3.2.6 - Fotografia das dispersões e imagens de microscopia de força atômica (AFM) para os arranjos PSS/DODAB/DNA***

A visualização macroscópica das dispersões de PSS137/DODAB/DNA e PSS301/DODAB/DNA foram obtidas usando uma câmera digital Sony/Cyber-shot 3.2 megapixels. As concentrações finais de PSS137, PSS301 e DODAB foram de  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL,  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente.  $\lambda$ , T5 ou T2-DNA foram adicionados em concentrações crescentes sobre os arranjos PSS/DODAB.

Imagens topográficas de AFM para os arranjos PSS137/DODAB/T2-DNA foram obtidas usando um sistema de imagem molecular PicoSPM-LE com cantilevers operando no modo de contato intermitente (modo AAC), com uma frequência de ressonância de aproximadamente 302 kHz. Todas as imagens topográficas representam o resultado original e referem-se a uma área de  $(10 \times 10) \mu\text{m}^2$  com uma resolução  $(512 \times 512)$  pixels. As concentrações finais de PSS137, DODAB e T2-DNA foram iguais a  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL, 0,02 mM e  $8 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

### 3.2.7 - Cultivo de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

As curvas de crescimento de *Escherichia coli* (*E. coli*) e de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Figura 8) foram determinadas por turbidez a 600 nm e por plaqueamento e contagem de células viáveis.



**Figura 8:** Visualização por microscopia eletrônica das espécies bacterianas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

As bactérias *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 foram reativadas em 3 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB) a 37°C por 2 - 5 h. Em seguida, foram semeadas em meio adequado para cultivo, em placas com ágar MacConkey (*E. coli*) e Chapman (*S. aureus*). Foram então incubadas a 37°C durante 24 h. Uma alçada de cada cultura foi retirada e cada bactéria semeada, separadamente, em caldo TSB. Os tubos foram colocados num shaker a 160 rpm com temperatura de 37°C, durante 2 h. Este foi considerado o inóculo de partida. Depois, 0,1 mL deste inóculo foi colocado em tubos contendo 10 mL de caldo TSB e estes, incubados em shaker a 37°C e 160 rpm por 0, 20, 45, 60, 90, 180, 240 e 300 minutos. Posteriormente, foram feitas leituras de turbidez contra meio de cultura (branco) em comprimento de onda 600 nm. O plaqueamento das suspensões (semeadura em placas) foi realizado através do método de diluições em tubos. As suspensões bacterianas foram cultivadas em triplicata e incubadas a 37°C, por 24 h. A leitura das placas foi feita através da contagem de colônias em um contador

de colônias manual e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro da solução (UFC/mL).

### **3.2.8 - Ensaio de viabilidade celular para os arranjos PSS137/DODAB/DNA e PSS301/DODAB/DNA contra a bactéria E. coli**

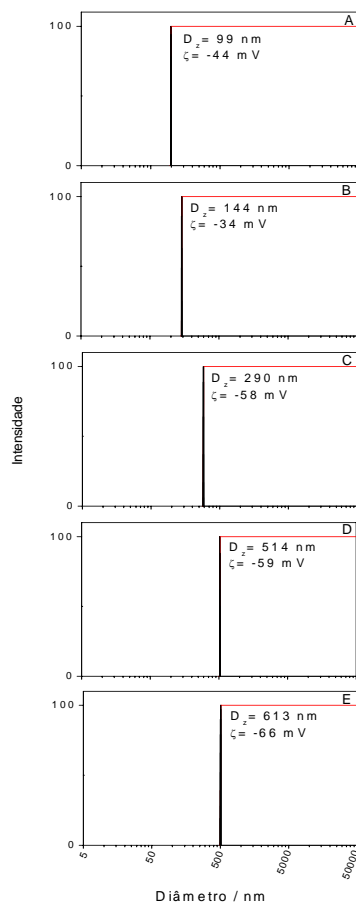
*E. coli* foi reativada por 2 - 5 h a 37°C em 3 mL de caldo TSB. Em seguida, as bactérias foram espalhadas sobre placas de ágar MacConkey e incubadas (37°C/6 h). Algumas colônias foram retiradas da placa e incubadas em 50 mL de caldo TSB (160 rpm, 37°C, 2,5 h). A cultura de bactérias foi sedimentada e separada de seu caldo nutritivo por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi substituído por água estéril e a cultura foi ressuspensa. O procedimento de centrifugação/ressuspensão foi repetido por 3 vezes antes da utilização das bactérias para avaliação da viabilidade celular a partir dos arranjos PSS/DODAB/DNA. Depois disso, o pellet final foi ressuspensa em um volume de água estéril suficiente para se obter 0,127 unidades de absorvância a 600 nm que é equivalente a  $2 \times 10^7$  UFC/mL.

Em uma segunda etapa, 0,5 mL da suspensão final de células foi adicionado sobre os arranjos PSS137/DODAB/DNA ou PSS301/DODAB/DNA (as concentrações finais de PSS137, PSS301 e DODAB foram de  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL,  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente;  $\lambda$ , T5 ou T2-DNA foram adicionados em concentrações crescentes). Após 1 h de interação, as misturas foram diluídas (1:1000) e 0,1 mL da mistura final foi espalhada sobre placas de ágar. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 h a 37°C. A leitura das placas foi feita através da contagem de colônias em um contador de colônias manual e o resultado expresso em UFC/mL. A viabilidade celular (%) foi plotada em função da concentração de DNA para os três tipos de DNA testados.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

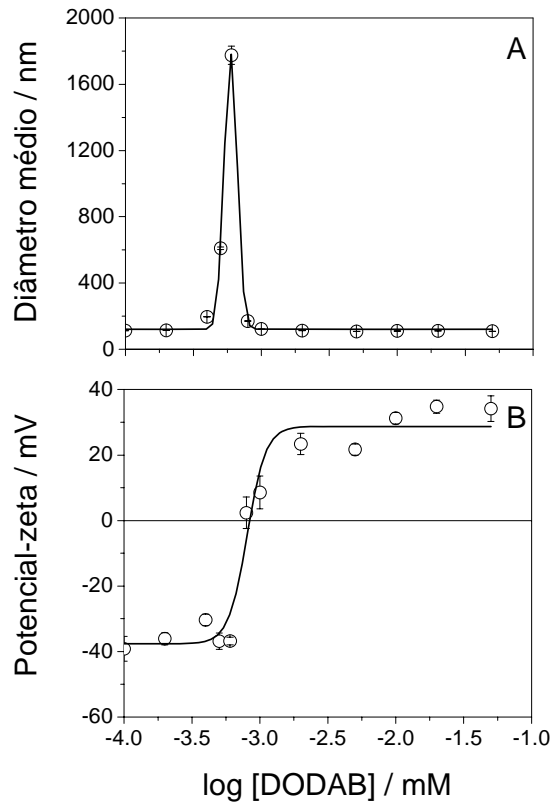
### 4.1 - Recobrimento de partículas aniônicas de poliestireno sulfato (PSS) com fragmentos de bicamada catiônica de DODAB

O aumento da concentração de DODAB sobre partículas aniônicas de PSS produziu arranjos estáveis e partículas positivamente carregadas cobertas com uma bicamada. Os arranjos PSS/DODAB foram preparados em solução de NaCl 1 mM em uma faixa de tamanhos de partículas que variou de 83 a 626 nm com concentrações fixas de  $6,6 \times 10^{10}$ ,  $2,4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1,6 \times 10^9$  e  $1,2 \times 10^{10}$  partículas/mL e em concentrações crescentes de DODAB ( $1 \times 10^{-4}$  -  $5 \times 10^{-2}$  mM). Em seguida, foram caracterizados através de medidas de diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial-zeta. A Figura 9 mostra a distribuição de tamanho para as partículas de PSS antes do recobrimento com bicamada catiônica de DODAB.



**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.

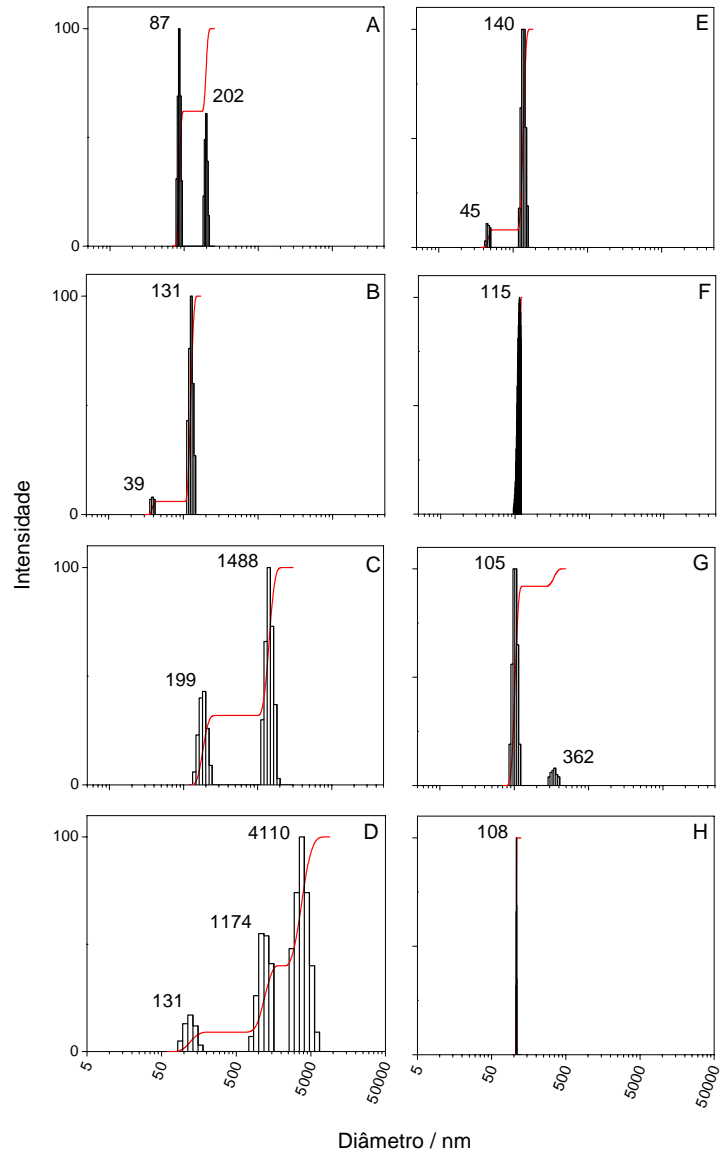
A Figura 10 apresenta o efeito da concentração de DODAB sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) para partículas de PSS83. Observa-se que, em torno de  $6 \times 10^{-4}$  mM de DODAB ocorreu máxima agregação mostrada por um aumento máximo do diâmetro médio da dispersão. Além disso, a neutralização de cargas foi verificada através de um potencial-zeta igual a zero. Depois da neutralização, o diâmetro médio das partículas retornou ao valor próximo dos valores iniciais com reversão do potencial-zeta, agora positivo, indicando o recobrimento das partículas poliméricas aniônicas por fragmentos de bicamada catiônica.



**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  $1,43 \times 10^{-3}$  m<sup>2</sup>. 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.

A Figura 11 mostra a distribuição de tamanho para os arranjos PSS83/DODAB. A concentração final de PSS83 foi fixada em  $6,6 \times 10^{10}$  partículas/mL. As concentrações finais de lípide catiônico foram 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),

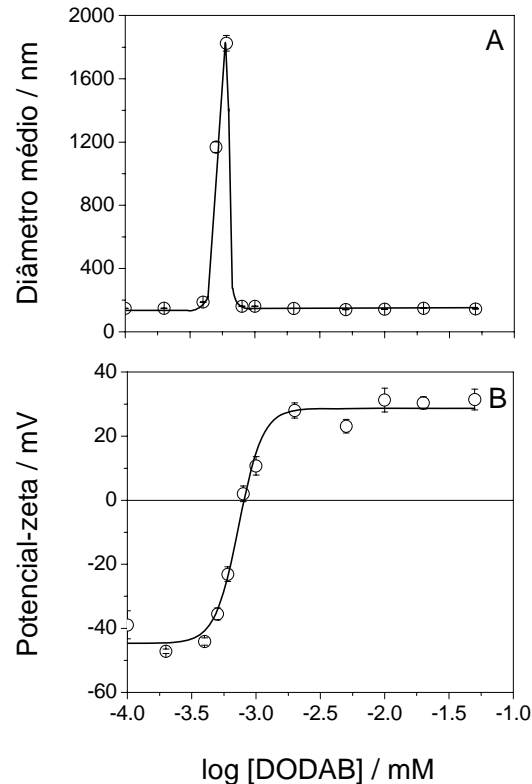
$1 \times 10^{-2}$  (G) e  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. Nessas condições, observa-se que a mínima polidispersidade é obtida com concentração final de DODAB igual a  $2 \times 10^{-2}$  mM (H).



**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.

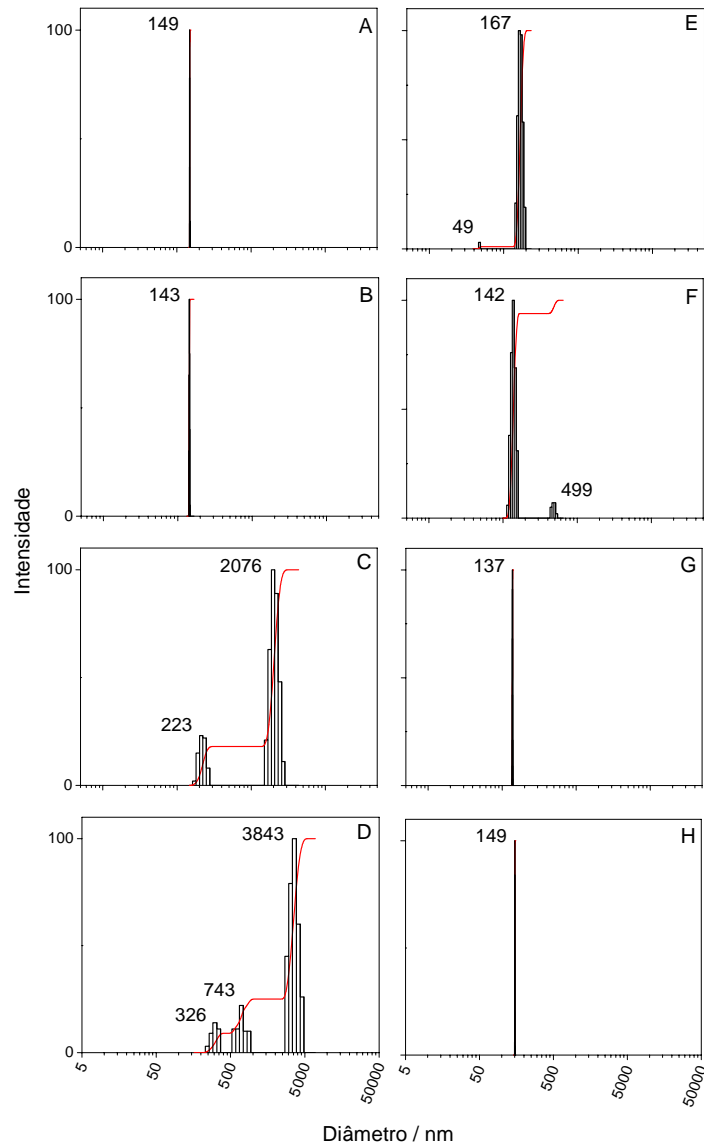
A Figura 12 mostra o efeito da concentração de DODAB sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) para partículas de PSS137 recobertas por fragmentos de bicamada de DODAB em concentrações crescentes de DODAB. Ao redor de  $6 \times 10^{-4}$  mM de DODAB houve máxima agregação indicada pelo aumento máximo do diâmetro médio da dispersão.

Conseqüentemente, a neutralização de cargas foi verificada através do valor do potencial-zeta. Depois da neutralização, o diâmetro médio das partículas retornou ao tamanho médio próximo dos valores iniciais com reversão do potencial-zeta, de negativo para positivo, indicando o recobrimento das partículas de PSS por fragmentos de bicamada catiônica.



**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  $1,43 \times 10^{-3}$  m<sup>2</sup>. 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.

A Figura 13 apresenta a distribuição de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB. A concentração final de PSS137 foi fixada em  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL. As concentrações finais de lípide catiônico foram 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. Nota-se que uma baixa polidispersidade pode ser obtida tanto em baixas concentrações de DODAB (A e B) como em concentrações maiores (G e H), depois da neutralização de cargas.

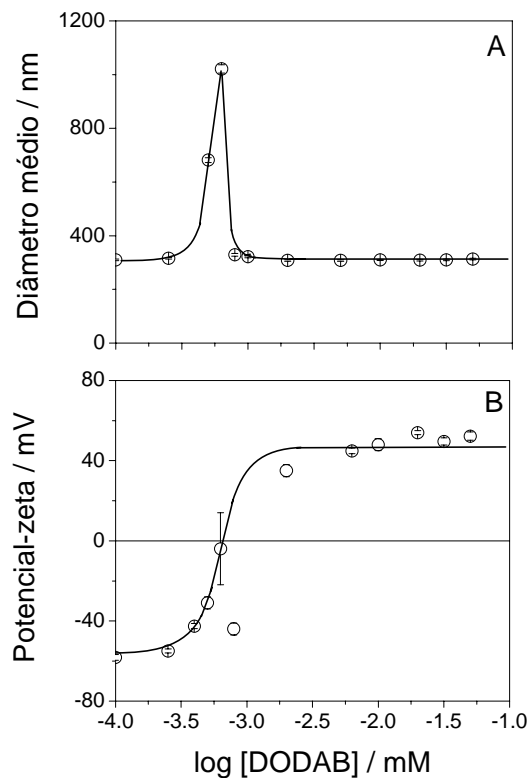


**Figura 13:** Distribuição de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB. A concentração final de PSS137 foi igual a  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL. A concentração final de DODAB foi igual a  $1 \times 10^{-4}$  (A),  $2 \times 10^{-4}$  (B),  $5 \times 10^{-4}$  (C),  $6 \times 10^{-4}$  (D),  $1 \times 10^{-3}$  (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.

A Figura 14 apresenta o efeito da concentração de DODAB sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) para partículas de PSS301 recobertas por fragmentos de bicamada de DODAB em concentrações crescentes de lípide catiônico. Assim como para os dois diâmetros de partículas de PSS mostrados anteriormente (PSS83 e PSS137), uma concentração de  $6 \times 10^{-4}$  mM de DODAB é necessária para que ocorra máxima agregação

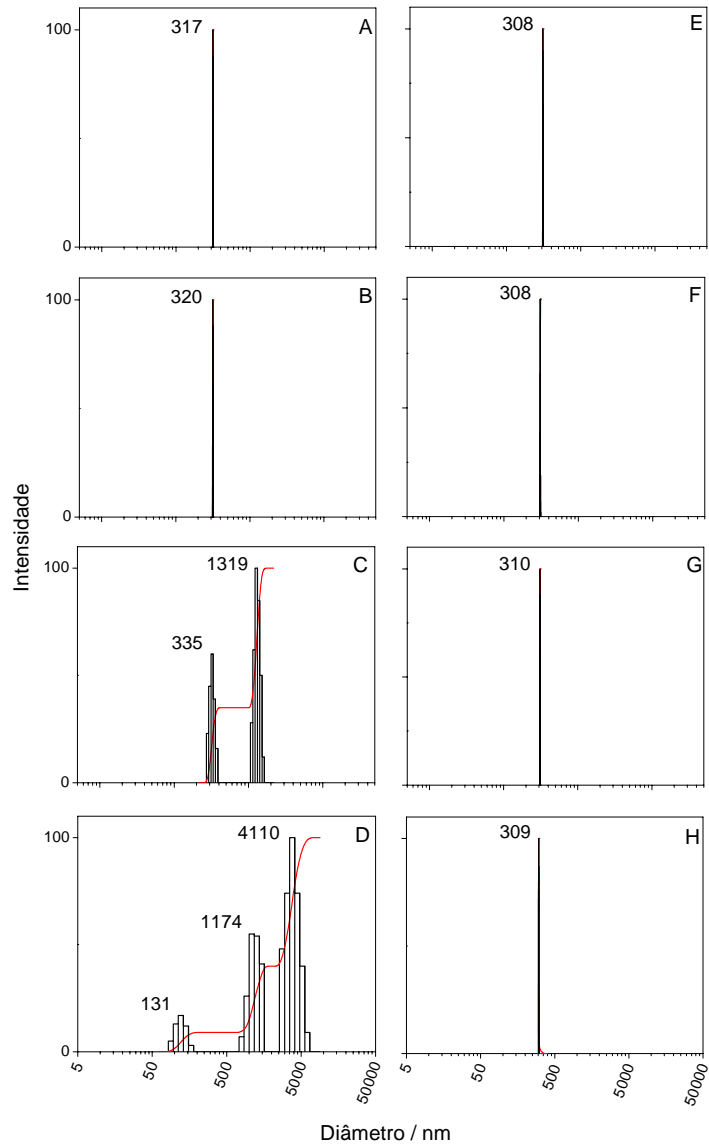


mostrada pelo maior aumento do diâmetro médio da dispersão. Conseqüentemente, a neutralização de cargas foi verificada através do valor do potencial-zeta (próximo a zero). Depois da neutralização, o diâmetro médio das partículas retorna ao tamanho médio próximo dos valores iniciais com reversão do potencial-zeta, agora positivo, também indicando o recobrimento das partículas poliméricas aniônicas por fragmentos de bicamada catiônica.



**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  $1,43 \times 10^{-3}$  m<sup>2</sup>, respectivamente. 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.

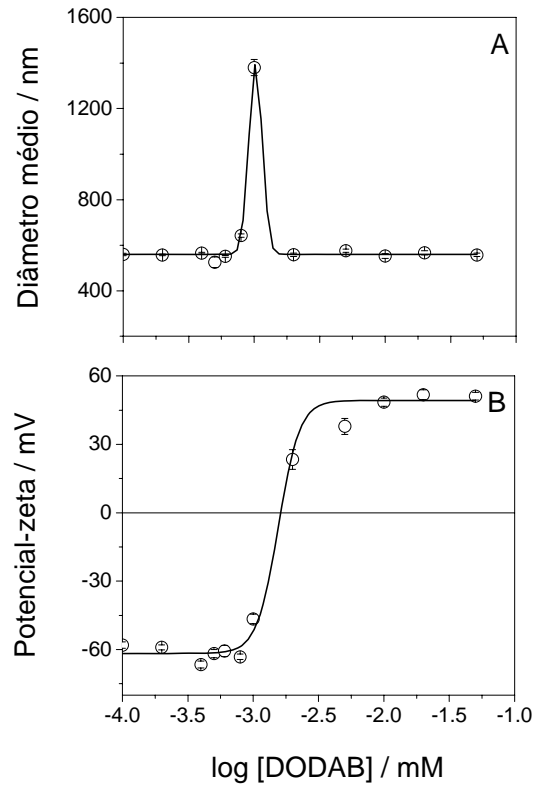
A Figura 15 mostra a distribuição de tamanho os arranjos PSS301/DODAB. A concentração final de PSS301 foi fixada em  $5 \times 10^9$  partículas/mL e as concentrações finais de lípide foram iguais a  $1 \times 10^{-4}$  (A),  $2 \times 10^{-4}$  (B),  $5 \times 10^{-4}$  (C),  $6 \times 10^{-4}$  (D),  $1 \times 10^{-3}$  (E),  $2 \times 10^{-3}$  (F),  $1 \times 10^{-2}$  (G) a  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. Observa-se que uma baixa polidispersidade pode ser obtida tanto em baixas concentrações de DODAB (A e B) como em altas concentrações, acima da concentração necessária para máxima agregação (E, F, G e H).



**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) a  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. As amostras foram preparadas em 1 mM de NaCl e interagiram por 1 h/25°C.

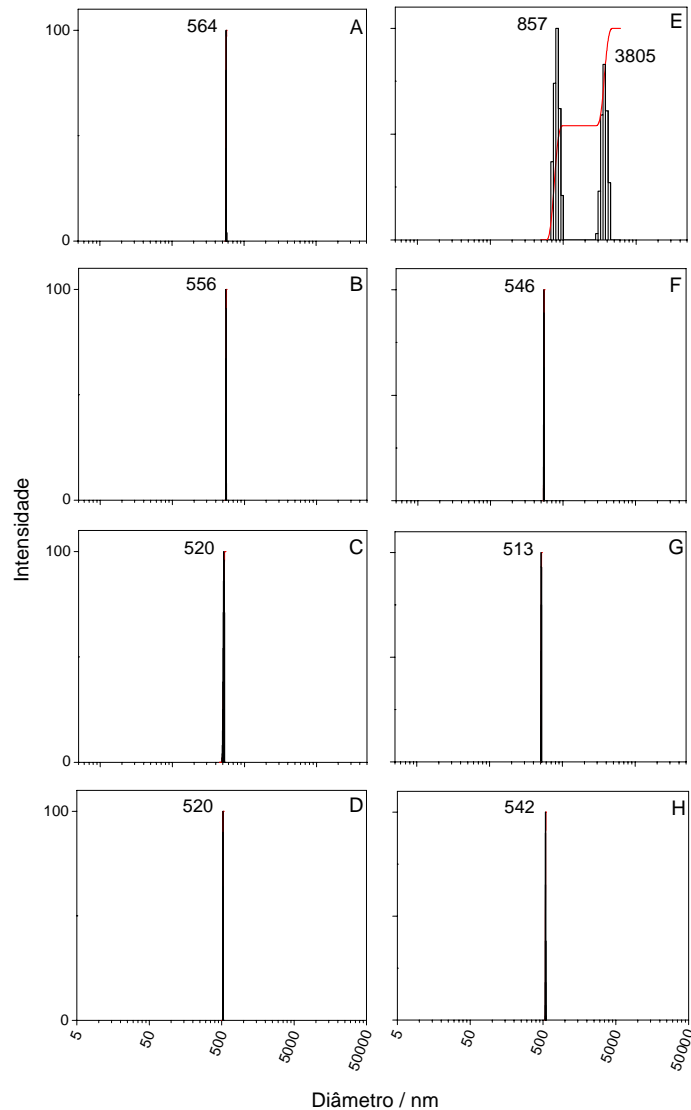
A Figura 16 apresenta o efeito da concentração de DODAB sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) para partículas de PSS526 recobertas por fragmentos de bicamada de DODAB em concentrações crescentes de lípide catiônico. Aqui, a máxima agregação ocorreu em uma concentração de  $1 \times 10^{-3}$  mM de DODAB verificada pelo aumento máximo do diâmetro médio da dispersão com conseqüente neutralização de cargas. Depois da neutralização, o diâmetro médio das partículas retorna ao tamanho médio próximo dos valores

iniciais com reversão do potencial-zeta, de negativo para positivo, indicando o recobrimento das partículas poliméricas aniônicas por fragmentos de bicamada de catiônica.



**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  $1,43 \times 10^{-3}$  m<sup>2</sup>, respectivamente. 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.

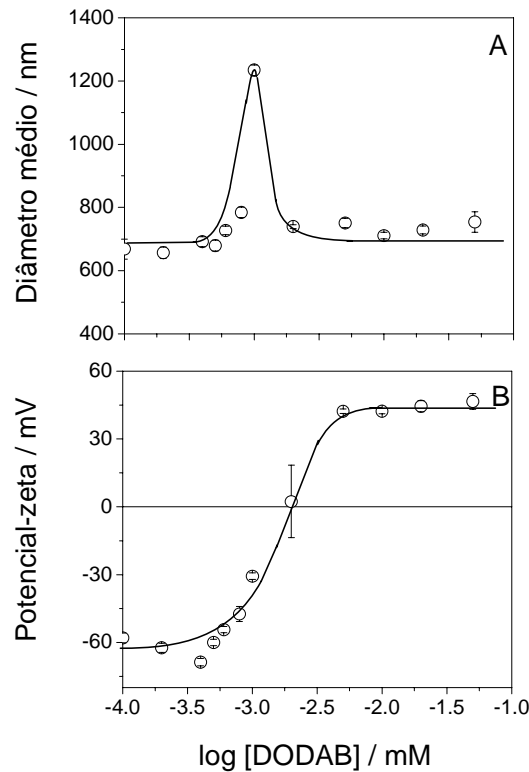
A Figura 17 mostra a distribuição de tamanho para os arranjos PSS526/DODAB. A concentração final fixa de PSS526 foi igual a  $1,6 \times 10^9$  partículas/mL. As concentrações finais de lípide catiônico foram de  $1 \times 10^{-4}$  (A),  $2 \times 10^{-4}$  (B),  $5 \times 10^{-4}$  (C),  $6 \times 10^{-4}$  (D),  $1 \times 10^{-3}$  (E),  $2 \times 10^{-3}$  (F),  $1 \times 10^{-2}$  (G) e  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. Observa-se que, para todas as concentrações de DODAB testadas no experimento, a polidispersidade acentuada foi verificada somente na concentração de DODAB necessária para a máxima agregação, que foi igual a  $1 \times 10^{-3}$  mM (E). Para as outras concentrações de DODAB o sistema apresentou baixa polidispersidade e estreita distribuição de tamanho.



**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.

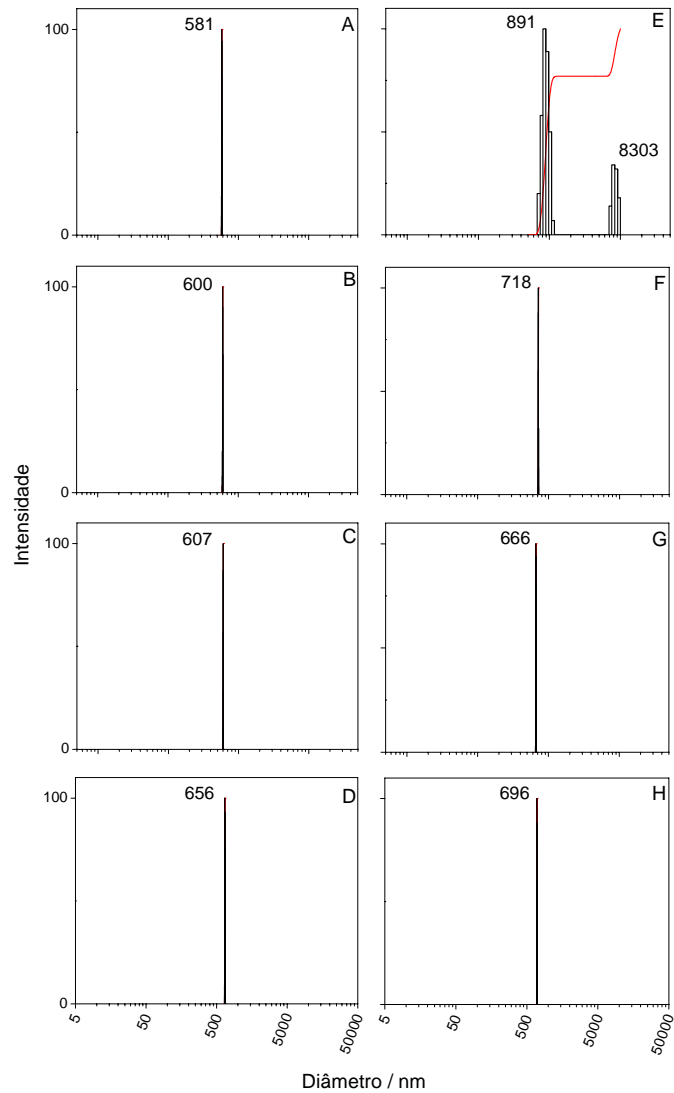
Finalmente, a Figura 18 apresenta o efeito da concentração de DODAB sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) para partículas de PSS626 recobertas por fragmentos de bicamada de DODAB em concentrações crescentes de DODAB. Nota-se que, em torno de  $1 \times 10^{-3}$  mM de DODAB ocorreu agregação máxima indicada pelo máximo aumento do diâmetro médio da dispersão. Após a neutralização de cargas, o diâmetro médio das partículas retornou ao tamanho médio próximo aos valores iniciais com reversão do

potencial-zeta, agora positivo, indicando o recobrimento das partículas de PSS por fragmentos de bicamada catiônica de DODAB.



**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  $1,43 \times 10^{-3}$  m<sup>2</sup>, respectivamente. 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.

A Figura 19 apresenta a distribuição de tamanho para os arranjos PSS626/DODAB. A concentração final de PSS626 foi fixada em  $1,2 \times 10^9$  partículas/mL. As concentrações finais fixas de lípide foram 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) a  $2 \times 10^{-2}$  (H) mM. Nessas condições, nota-se que, para todas as concentrações de DODAB testadas, a alta polidispersidade foi verificada somente na concentração de DODAB necessária para a máxima agregação, igual a  $1 \times 10^{-3}$  mM (E). Para as outras concentrações de lípide catiônico o sistema apresentou polidispersidade baixa e estreita distribuição de tamanho.



**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.

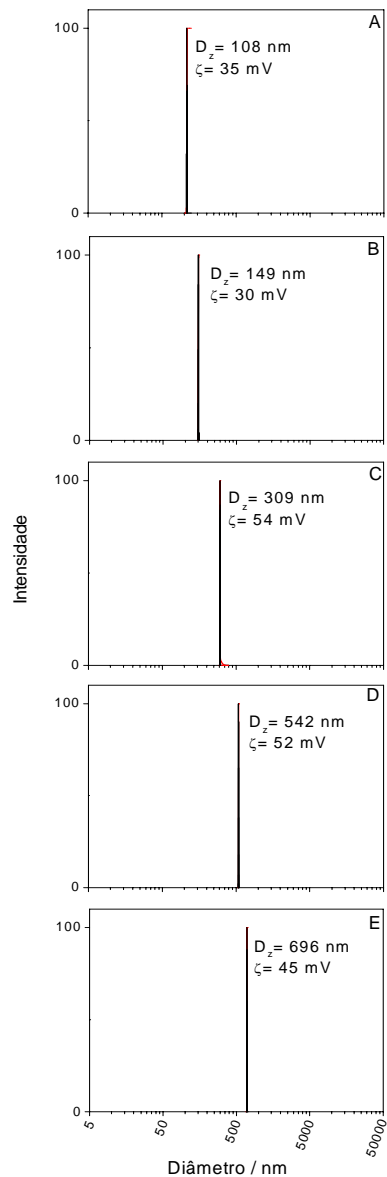
Pode-se estimar a concentração teórica de DODAB necessária para o recobrimento de um particulado de PSS com uma bicamada. Considerando-se que a área por molécula ocupada pelo DODAB na interface ar-água é de  $0,6 \text{ nm}^2$  (Claesson *et al.*, 1989),  $1,18 \times 10^{15}$  moléculas de DODAB ou uma concentração final de  $7 \times 10^{-3}$  mM de DODAB seria necessária para o recobrimento de partículas de PSS nas concentrações finais utilizadas nos experimentos.

A Tabela 5 apresenta a concentração final de partículas de PSS, a concentração de DODAB necessária para se obter  $\zeta$  igual a zero, a concentração de DODAB para ocorrência da máxima agregação e, finalmente, a concentração de DODAB necessária para  $D_z$  mínimo com  $\zeta$  positivo (após recobrimento das partículas com bicamada catiônica de DODAB).

**Tabela 5:** 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  $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ .

Látex	Concentração de partículas (partículas/mL)	[DODAB] para $\zeta=0$ /mM	[DODAB] para máxima agregação /mM	[DODAB] para $D_z$ mínimo e $\zeta$ positivo /mM
PSS83	$6,6 \times 10^{10}$	$8 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-3}$
PSS137	$2,4 \times 10^{10}$	$8 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-3}$
PSS301	$5,0 \times 10^9$	$6 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-3}$
PSS526	$1,6 \times 10^9$	$2 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$	$10 \times 10^{-3}$
PSS626	$1,2 \times 10^9$	$2 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}$	$10 \times 10^{-3}$

A concentração de DODAB necessária para recobrir todas as partículas de PSS com uma bicamada catiônica foi ligeiramente acima daquela requerida para deposição da bicamada: 0,02 mM de DODAB foi mais do que suficiente para recobrir uma área superficial total de  $1,43 \times 10^{-3} \text{ m}^2$  de partículas com uma bicamada. A Figura 20 mostra a distribuição de tamanho para partículas com 83 (A), 137 (B), 301 (C), 526 (D) e 626 (E) nm de diâmetro médio com 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, recobertas por 0,02 mM de DODAB. Uma estreita distribuição de tamanho foi obtida para os arranjos PSS/DODAB. Adicionalmente, o diâmetro das partículas de PSS aumentou para 108, 149, 309, 542 e 696 nm, respectivamente.



**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.

Desta maneira, em 1 mM de NaCl, partículas biomiméticas foram formadas a partir do recobrimento de partículas aniônicas de PSS com fragmentos de bicamada catiônica de DODAB. Este procedimento foi demonstrado em trabalhos anteriores através da determinação de isothermas de adsorção (Carmona-Ribeiro, 1992), microscopia eletrônica de transmissão (Petri & Carmona-Ribeiro, 2007), aumento do diâmetro médio da partícula de 8-10 nm,

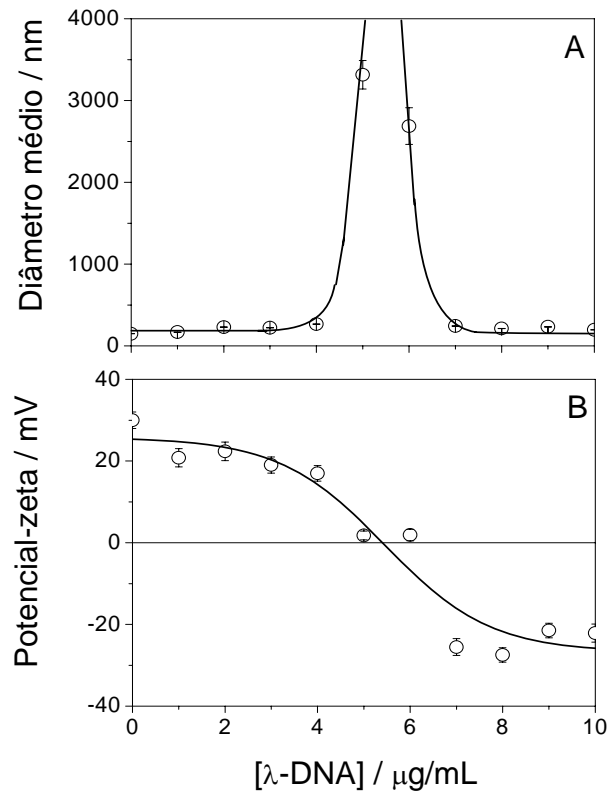


reversão do potencial-zeta de negativo para positivo e aumento da estabilidade coloidal (Lessa & Carmona-Ribeiro, 1999). A força iônica de 1 mM provida por 1 mM de NaCl foi efetiva para induzir a autoassociação de fragmentos de bicamada adjacentes sobre partículas poliméricas (Pereira *et al.*, 2004). Na neutralização de cargas, existe uma máxima agregação interpartículas e mínima estabilidade coloidal. O aumento da concentração de DODAB estabiliza o sistema com tamanho e potencial-zeta consistentes com a deposição da bicamada.

#### ***4.2 - Efeito do tipo e concentração de DNA sobre partículas biomiméticas de PSS137/DODAB***

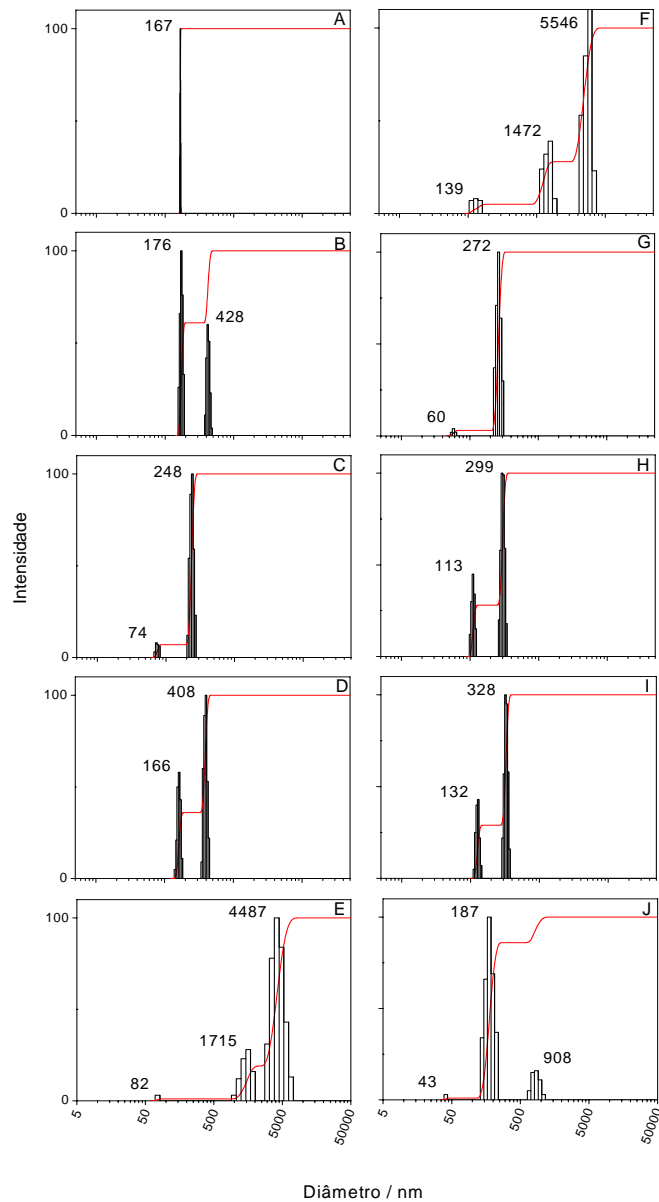
O objetivo do estudo a seguir foi verificar o efeito do tipo e concentração de DNA sobre a estabilidade coloidal dos arranjos PSS137/DODAB/DNA. Desta maneira, três diferentes moléculas de DNA ( $\lambda$ , T5 ou T2) foram adicionadas sobre partículas biomiméticas de PSS137/DODAB. As concentrações finais PSS137 e DODAB foram de  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . A caracterização dos arranjos foi realizada através de medidas de diâmetro médio, distribuições de tamanho e potencial-zeta após 1 h de interação a 25°C.

A Figura 21 apresenta o efeito da concentração  $\lambda$ -DNA sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) dos arranjos PSS137/DODAB/ $\lambda$ -DNA. Nota-se que, o diâmetro médio atinge um valor máximo na neutralização de cargas, onde ocorre uma maior agregação interpartículas, mas com estabilização após esta situação. O potencial-zeta torna-se negativo com o aumento da concentração de  $\lambda$ -DNA. Aproximadamente entre 5 e 6  $\mu\text{g/mL}$  de  $\lambda$ -DNA foi suficiente para a neutralização de cargas.



**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.

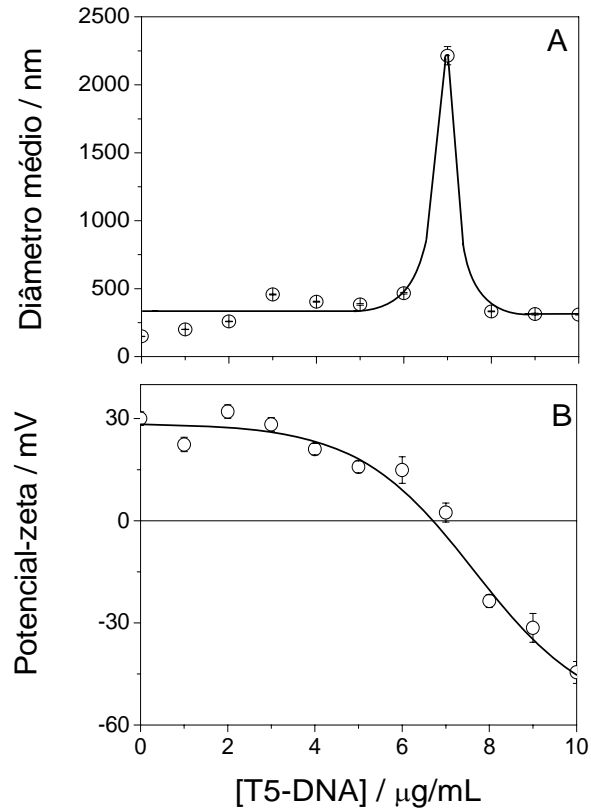
A Figura 22 apresenta as distribuições de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB/ $\lambda$ -DNA, onde as concentrações finais de PSS137 e de DODAB foram fixadas em  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. As concentrações finais de  $\lambda$ -DNA foram iguais a 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Observa-se que a polidispersidade aumenta com o aumento da concentração de  $\lambda$ -DNA.



**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 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.

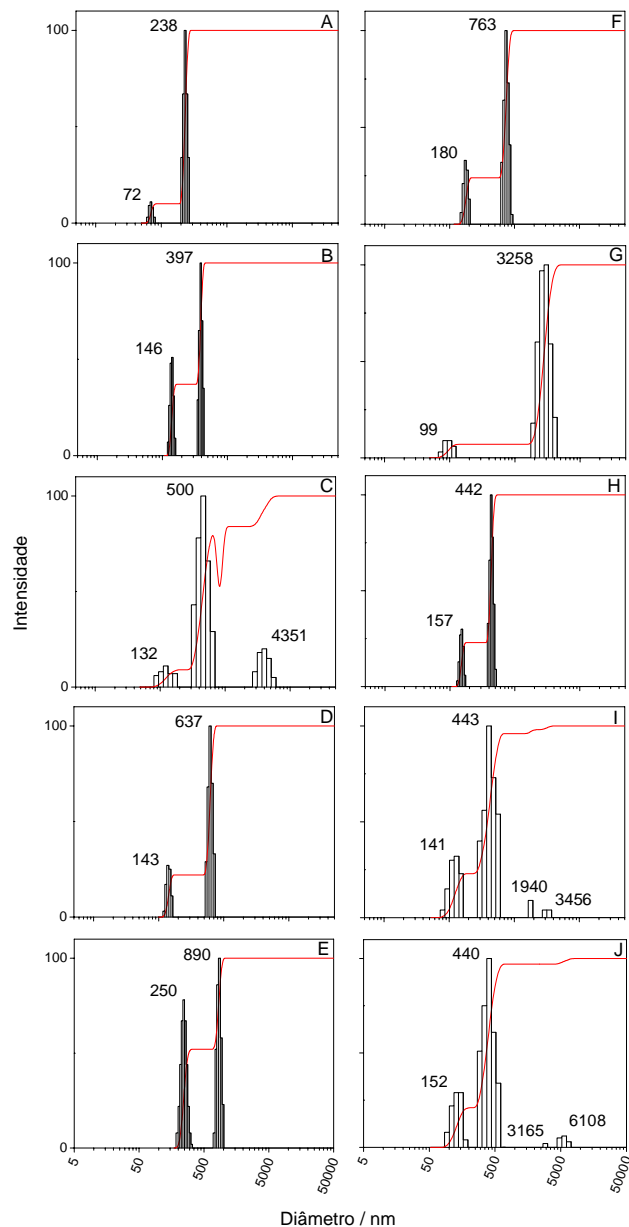
A Figura 23 mostra o efeito da concentração de T5-DNA sobre diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) dos arranjos PSS137/DODAB/T5-DNA. De acordo com a Figura 23, o diâmetro médio atinge um valor máximo na neutralização de cargas, em torno 7  $\mu\text{g/mL}$  de T5-DNA. Após o ponto de neutralização ocorre a estabilização do sistema com reversão do

potencial-zeta, que atingiu valores cada vez mais negativos com o aumento da concentração de T5-DNA.



**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.

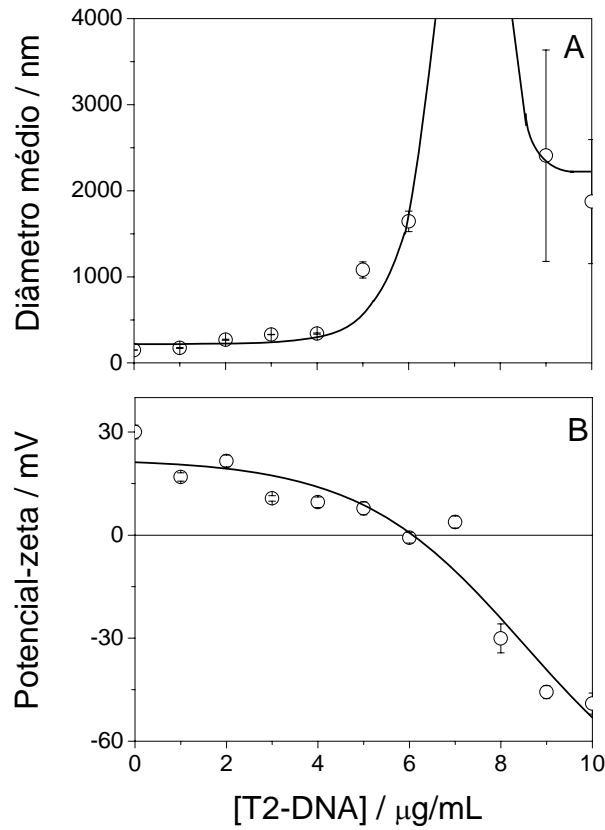
A Figura 24 mostra as distribuições de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB/T5-DNA, onde as concentrações finais de PSS137 e de DODAB foram fixadas em  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. As concentrações finais de T5-DNA foram de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Observa-se que a polidispersidade aumenta com o aumento da concentração de T5-DNA.



**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.

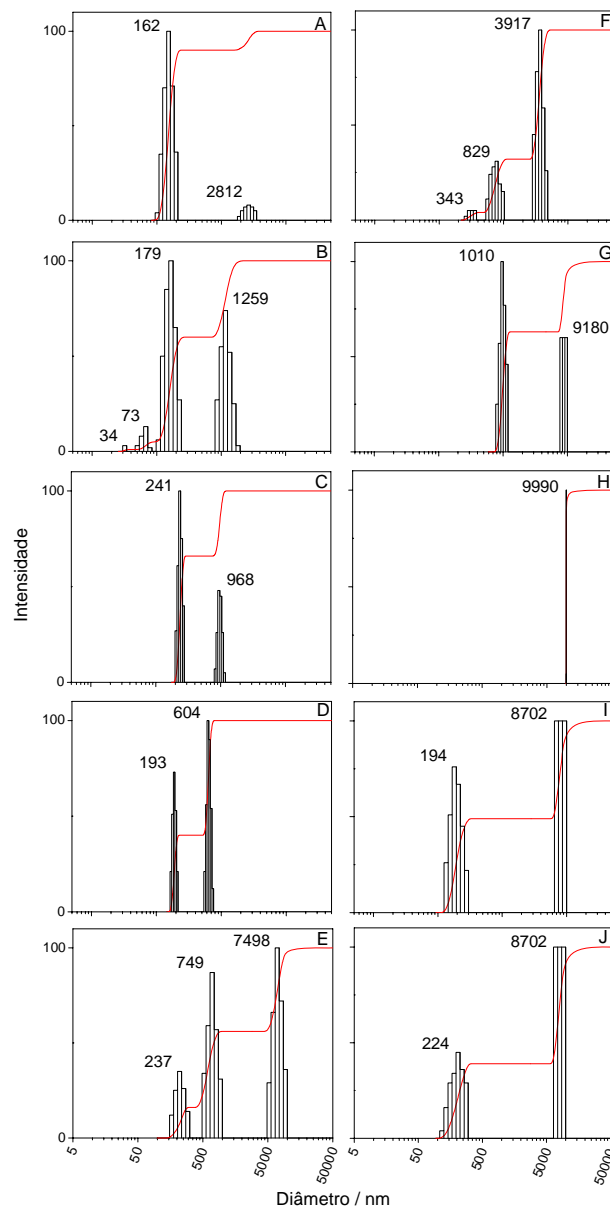
A Figura 25 apresenta o efeito da concentração de T2-DNA sobre diâmetro médio (A) e potencial-zeta (B) dos arranjos PSS137/DODAB/T2-DNA. Nota-se que o diâmetro médio dos arranjos aumentou gradativamente até atingir o ponto de máxima agregação interpartículas. A concentração de 8  $\mu\text{g/mL}$  de T2-DNA foi necessária para essa máxima

agregação. O potencial-zeta diminuiu gradativamente alcançando valores negativos devido ao aumento da concentração de T2-DNA.



**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.

A Figura 26 apresenta as distribuições de tamanho para os arranjos PSS137/DODAB/T2-DNA. As concentrações finais de PSS137 e de DODAB foram fixadas em  $2,4 \times 10^{10}$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. As concentrações finais de T2-DNA foram de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Nota-se que, com o aumento da concentração de T2-DNA a polidispersidade dos arranjos aumenta.



**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.

A Tabela 6 mostra o 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.

**Tabela 6:** 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.

Arranjos	[DNA] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diâmetro médio (nm)	Potencial-zeta (mV)	Polidispersidade
PSS137	-	$133 \pm 1$	$-35 \pm 2$	$0.059 \pm 0.007$
DODAB (2 mM)	-	$65 \pm 2$	$45 \pm 2$	$0.289 \pm 0.006$
PSS137/DODAB (0,02 mM)	-	$149 \pm 1$	$30 \pm 2$	$0.049 \pm 0.014$
PSS137/DODAB/ $\lambda$ -DNA	1	$169 \pm 1$	$21 \pm 2$	$0.096 \pm 0.012$
	2	$230 \pm 1$	$22 \pm 2$	$0.152 \pm 0.017$
	3	$223 \pm 2$	$19 \pm 2$	$0.158 \pm 0.019$
	4	$267 \pm 2$	$17 \pm 2$	$0.163 \pm 0.013$
	5	$3316 \pm 175$	$2 \pm 1$	$0.278 \pm 0.053$
	6	$2687 \pm 223$	$2 \pm 1$	$0.387 \pm 0.033$
	7	$244 \pm 2$	$-26 \pm 2$	$0.122 \pm 0.017$
	8	$213 \pm 1$	$-27 \pm 2$	$0.177 \pm 0.013$
	9	$234 \pm 1$	$-21 \pm 2$	$0.167 \pm 0.015$
	10	$198 \pm 3$	$-22 \pm 2$	$0.183 \pm 0.010$
PSS137/DODAB/T5-DNA	1	$200 \pm 2$	$22 \pm 2$	$0.136 \pm 0.038$
	2	$258 \pm 2$	$32 \pm 2$	$0.236 \pm 0.013$
	3	$457 \pm 4$	$28 \pm 2$	$0.281 \pm 0.008$
	4	$404 \pm 4$	$21 \pm 2$	$0.285 \pm 0.008$
	5	$384 \pm 6$	$16 \pm 2$	$0.247 \pm 0.009$
	6	$467 \pm 6$	$15 \pm 4$	$0.282 \pm 0.013$
	7	$2214 \pm 67$	$2 \pm 3$	$0.368 \pm 0.032$
	8	$333 \pm 3$	$-24 \pm 2$	$0.229 \pm 0.012$
	9	$313 \pm 6$	$-31 \pm 4$	$0.273 \pm 0.017$
	10	$309 \pm 3$	$-45 \pm 3$	$0.243 \pm 0.009$
PSS137/DODAB/T2-DNA	1	$174 \pm 2$	$17 \pm 1$	$0.122 \pm 0.022$
	2	$269 \pm 7$	$22 \pm 2$	$0.293 \pm 0.015$
	3	$329 \pm 2$	$11 \pm 1$	$0.245 \pm 0.013$
	4	$340 \pm 7$	$10 \pm 2$	$0.232 \pm 0.006$
	5	$1081 \pm 94$	$8 \pm 2$	$0.370 \pm 0.006$
	6	$1644 \pm 120$	$-1 \pm 2$	$0.342 \pm 0.025$
	7	$4918 \pm 3348$	$4 \pm 2$	$0.321 \pm 0.050$
	8	$16669 \pm 5372$	$-30 \pm 4$	$0.446 \pm 0.062$
	9	$2407 \pm 1229$	$-46 \pm 2$	$0.367 \pm 0.024$
	10	$1874 \pm 721$	$-49 \pm 3$	$0.346 \pm 0.045$



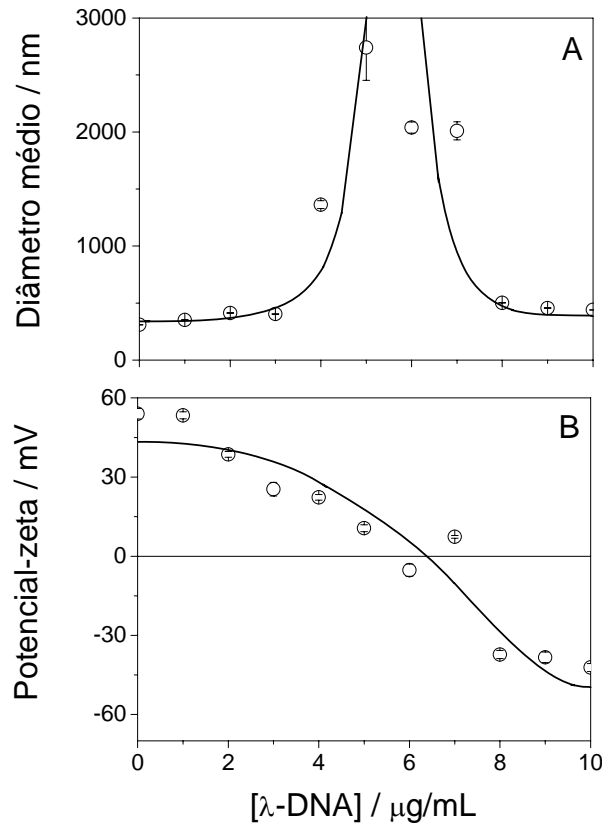
De acordo com a Tabela 6, podemos observar que nas concentrações de 5, 7 e 8  $\mu\text{g/mL}$  de  $\lambda$ , T5 e T2-DNA, respectivamente, potenciais-zeta são próximos de zero e a agregação é máxima, verificada pelo aumento máximo do tamanho dos arranjos. Acima destas concentrações ocorre uma redispersão, evidenciada pela diminuição do tamanho das partículas, porém, a alta polidispersidade revela a baixa estabilidade coloidal para os arranjos em concentrações crescentes de DNA. A menor estabilidade coloidal e a maior polidispersidade foi observada para o DNA de maior peso molecular (T2-DNA) em concentrações de DNA acima da neutralização de cargas, após a reversão do potencial-zeta de positivo para negativo.

#### ***4.3 - Efeito do tipo e concentração de DNA sobre partículas biomiméticas de PSS301/DODAB***

Neste experimento demonstrou-se o efeito do tipo e concentração de DNA sobre a estabilidade coloidal dos arranjos PSS301/DODAB/DNA. Desta maneira, três diferentes moléculas de DNA ( $\lambda$ , T5 ou T2) foram adicionadas sobre partículas biomiméticas de PSS301/DODAB. As concentrações finais PSS301 e DODAB foram de  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. A concentração de DNA variou de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . A caracterização dos arranjos foi realizada através de medidas de diâmetro médio, distribuições de tamanho e potencial-zeta após 1 h de interação a 25°C.

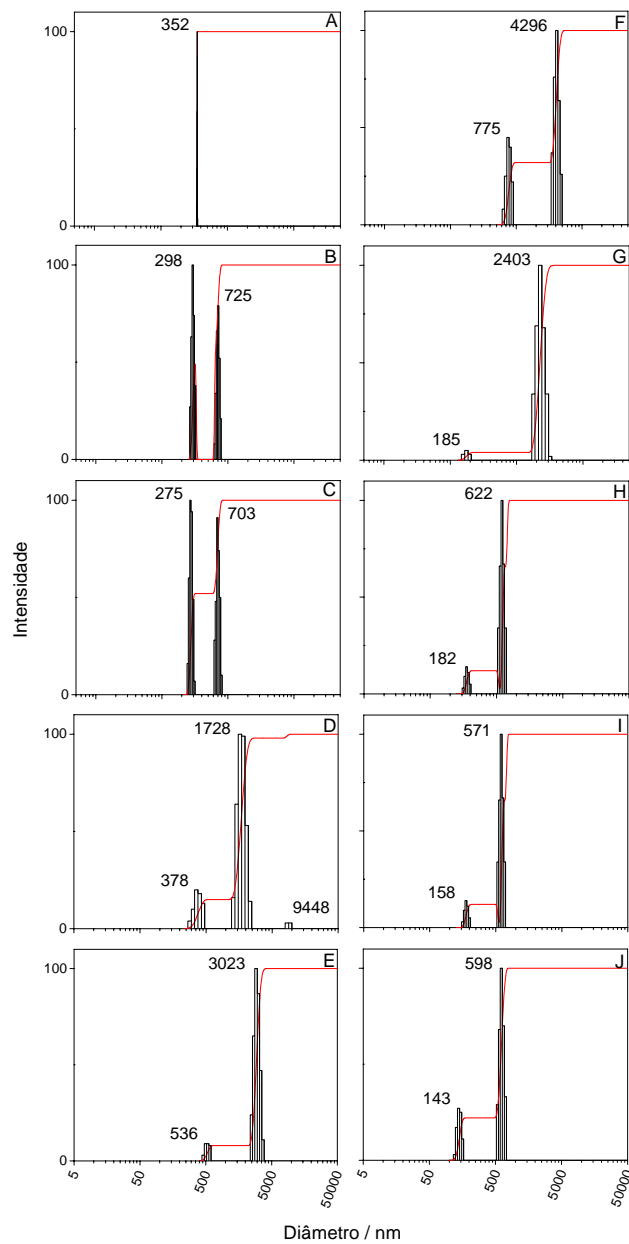
A Figura 27 apresenta o efeito da concentração de  $\lambda$ -DNA sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) dos arranjos PSS301/DODAB/ $\lambda$ -DNA. Neste experimento, a máxima agregação ocorreu quando a concentração de  $\lambda$ -DNA foi de 5  $\mu\text{g/mL}$ , semelhante ao ensaio

realizado com partículas de PSS137/DODAB. Observa-se, também, que o potencial-zeta dos arranjos diminuiu com o aumento da concentração de  $\lambda$ -DNA.



**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.

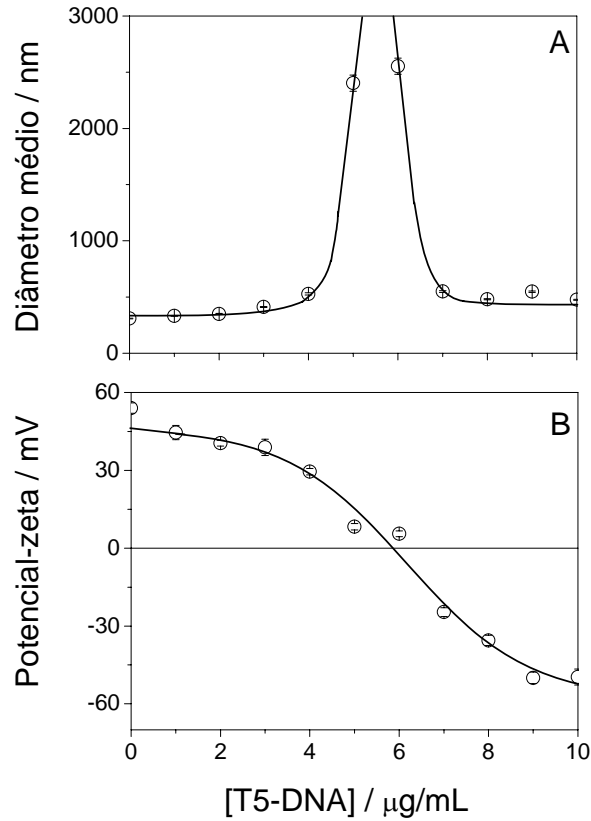
A Figura 28 mostra as distribuições de tamanho para os arranjos PSS301/DODAB/ $\lambda$ -DNA, onde as concentrações finais de PSS301 e de DODAB foram fixadas em  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. As concentrações finais de  $\lambda$ -DNA foram de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Observa-se que, a polidispersidade aumenta com o aumento da concentração de  $\lambda$ -DNA.



**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.

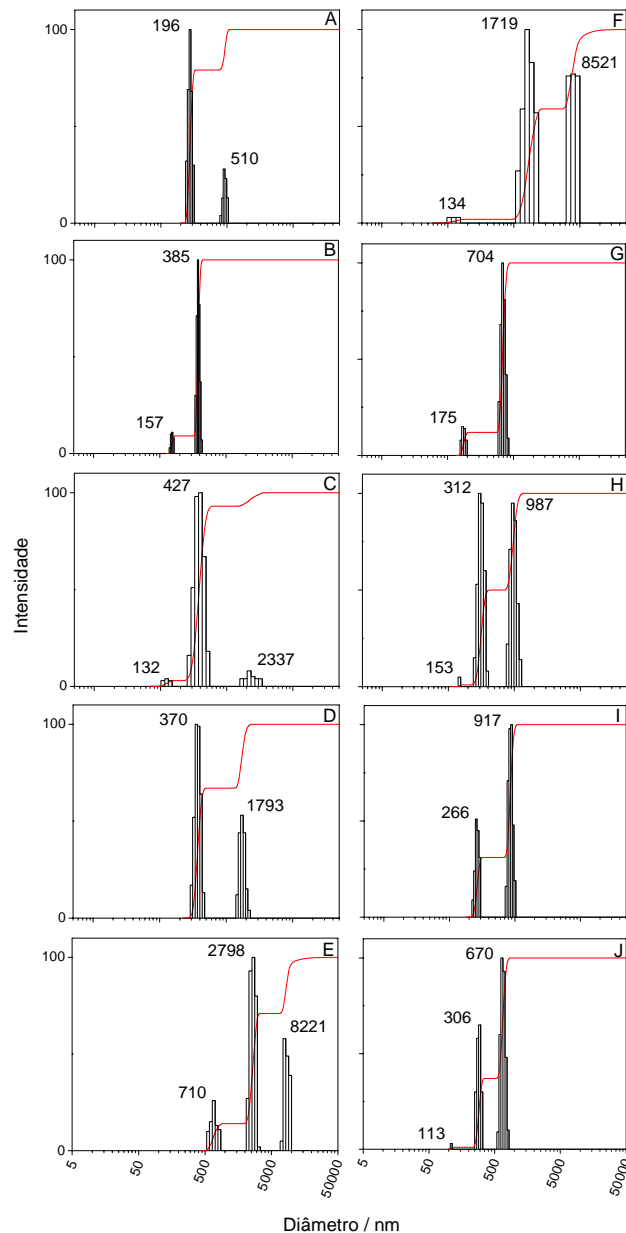
A Figura 29 mostra o efeito da concentração de T5-DNA sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) dos arranjos PSS301/DODAB/T5-DNA. Nota-se que, o aumento máximo do diâmetro médio dos arranjos ocorreu próximo a 6  $\mu\text{g/mL}$  de T5-DNA com a

máxima agregação interpartículas. Em seguida, ocorreu a reversão do potencial-zeta que atingiu valores negativos com o aumento da concentração de T5-DNA.



**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.

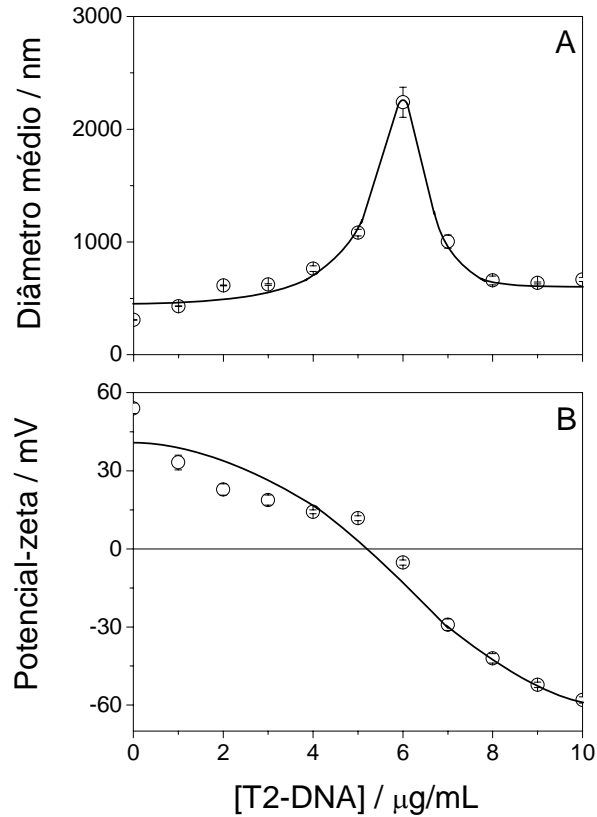
A Figura 30 apresenta as distribuições de tamanho para os arranjos PSS301/DODAB/T5-DNA. As concentrações finais de PSS301 e de DODAB foram fixadas em  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. As concentrações finais de T5-DNA foram iguais a 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Nessas condições, o aumento da concentração de T5-DNA ocasionou aumento da polidispersidade.



**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.

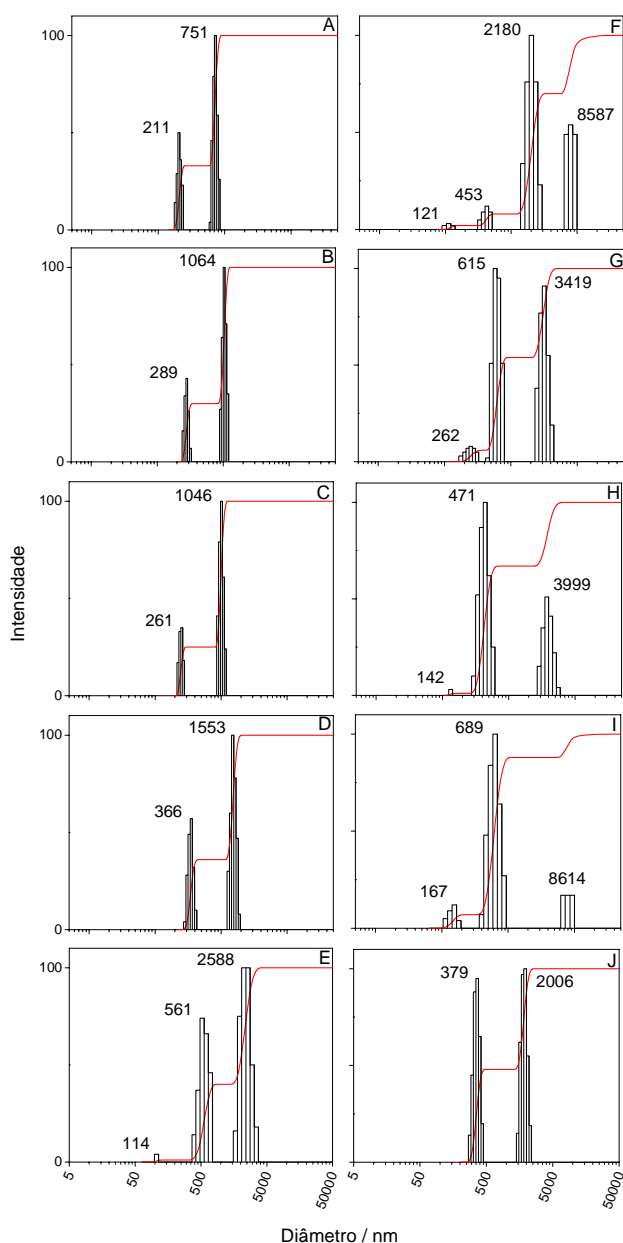
A Figura 31 apresenta o efeito da concentração de T2-DNA sobre o diâmetro médio (A) e o potencial-zeta (B) dos arranjos PSS301/DODAB/T2-DNA. Desta forma, observa-se que a concentração de T2-DNA necessária para a máxima agregação dos arranjos (6  $\mu\text{g/mL}$ ) foi semelhante à concentração requerida pelos arranjos PSS301/DODAB/T5-DNA (Figura

29). Assim como nos outros experimentos, após a neutralização de cargas, ocorre a reversão do potencial-zeta e as partículas adquirem superfície negativamente carregada.



**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.

A Figura 32 mostra as distribuições de tamanho para os arranjos PSS301/DODAB/T2-DNA. As concentrações finais de PSS301 e de DODAB foram fixadas em  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, respectivamente. As concentrações finais de T2-DNA foram de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I) e 10 (J)  $\mu\text{g/mL}$ . Nota-se que a alta polidispersidade aumenta com o aumento da concentração de T2-DNA.



**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.

A Tabela 7 mostra o 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.

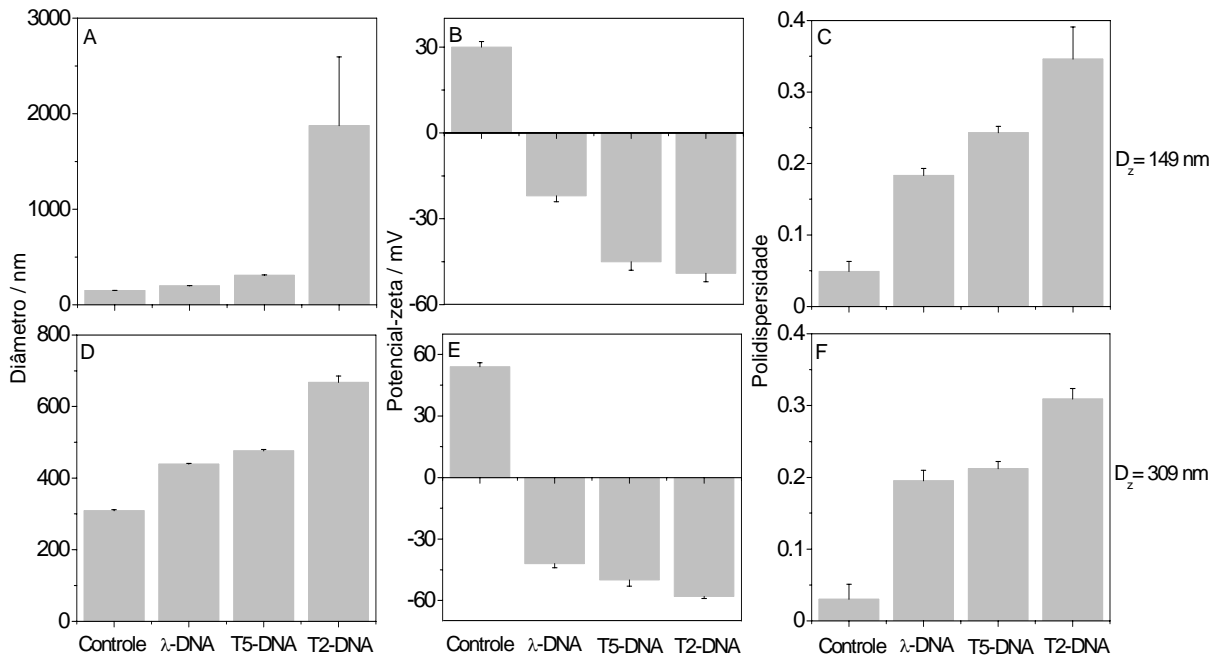
**Tabela 7:** Diâmetro médio, potencial-zeta e polidispersidade para partículas de PSS301 ( $5 \times 10^9$  partículas/mL), dispersão de DODAB e para os arranjos supramoleculares PSS301/DODAB/ $\lambda$ , T5 e T2-DNA em concentrações crescentes de DNA.

Arranjos	[DNA] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diâmetro médio (nm)	Potencial-zeta (mV)	Polidispersidade
PSS301	-	$308 \pm 2$	$-44 \pm 3$	$0.038 \pm 0.005$
DODAB (2 mM)	-	$65 \pm 2$	$45 \pm 2$	$0.289 \pm 0.006$
PSS301/DODAB (0,02 mM)	-	$309 \pm 3$	$54 \pm 2$	$0.030 \pm 0.021$
PSS301/DODAB/ $\lambda$ -DNA	1	$351 \pm 4$	$53 \pm 1$	$0.128 \pm 0.028$
	2	$412 \pm 3$	$39 \pm 1$	$0.159 \pm 0.026$
	3	$404 \pm 4$	$25 \pm 3$	$0.145 \pm 0.039$
	4	$1363 \pm 34$	$22 \pm 1$	$0.310 \pm 0.006$
	5	$2741 \pm 287$	$11 \pm 1$	$0.336 \pm 0.014$
	6	$2039 \pm 49$	$-5 \pm 2$	$0.365 \pm 0.028$
	7	$2011 \pm 79$	$7 \pm 1$	$0.245 \pm 0.036$
	8	$502 \pm 3$	$-37 \pm 2$	$0.192 \pm 0.017$
	9	$456 \pm 3$	$-38 \pm 2$	$0.192 \pm 0.021$
	10	$439 \pm 2$	$-42 \pm 2$	$0.195 \pm 0.015$
PSS301/DODAB/T5-DNA	1	$333 \pm 4$	$45 \pm 3$	$0.130 \pm 0.028$
	2	$351 \pm 4$	$40 \pm 1$	$0.105 \pm 0.034$
	3	$412 \pm 5$	$39 \pm 3$	$0.147 \pm 0.027$
	4	$528 \pm 10$	$30 \pm 1$	$0.240 \pm 0.016$
	5	$2403 \pm 72$	$8 \pm 1$	$0.315 \pm 0.023$
	6	$2553 \pm 72$	$6 \pm 1$	$0.318 \pm 0.027$
	7	$549 \pm 7$	$-25 \pm 2$	$0.236 \pm 0.016$
	8	$480 \pm 5$	$-36 \pm 2$	$0.245 \pm 0.013$
	9	$547 \pm 6$	$-50 \pm 2$	$0.244 \pm 0.016$
	10	$476 \pm 4$	$-50 \pm 3$	$0.212 \pm 0.010$
PSS301/DODAB/T2-DNA	1	$430 \pm 3$	$33 \pm 3$	$0.252 \pm 0.014$
	2	$615 \pm 4$	$23 \pm 2$	$0.280 \pm 0.011$
	3	$623 \pm 6$	$19 \pm 2$	$0.286 \pm 0.014$
	4	$764 \pm 25$	$14 \pm 4$	$0.303 \pm 0.030$
	5	$1083 \pm 29$	$12 \pm 1$	$0.331 \pm 0.012$
	6	$2240 \pm 134$	$-5 \pm 1$	$0.360 \pm 0.025$
	7	$1004 \pm 59$	$-29 \pm 2$	$0.331 \pm 0.013$
	8	$659 \pm 39$	$-42 \pm 2$	$0.287 \pm 0.014$
	9	$637 \pm 9$	$-52 \pm 1$	$0.265 \pm 0.017$
	10	$667 \pm 18$	$-58 \pm 1$	$0.309 \pm 0.015$



Conforme a Tabela 7, podemos verificar que em concentrações de 5, 6 e 6  $\mu\text{g/mL}$  de  $\lambda$ , T5 e T2-DNA, respectivamente, os potenciais-zeta são próximos de zero e a agregação é máxima, verificada pelo aumento máximo do tamanho dos arranjos. Semelhantemente ao experimento realizado com os arranjos PSS137/DODAB/DNA, após a neutralização de cargas ocorre uma redispersão, evidenciada pela diminuição do tamanho das partículas, mas a alta polidispersidade revela a baixa estabilidade coloidal para os arranjos em concentrações crescentes de DNA. Mais uma vez, a menor estabilidade coloidal e a maior polidispersidade foram observadas para o DNA de maior peso molecular (T2-DNA) em concentrações crescentes de DNA acima da neutralização de cargas, após a reversão do potencial-zeta de positivo para negativo.

Para avaliar o efeito do tipo de DNA sobre o diâmetro médio, o potencial-zeta e a polidispersidade, as concentrações dos três tipos de DNA ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) foram fixadas em 10  $\mu\text{g/mL}$  e os experimentos foram realizados para os arranjos PSS137/DODAB/DNA (Figura 33 A, B e C) e PSS301/DODAB/DNA (Figura 33 D, E e F). O peso molecular dos DNAs aumenta na ordem de  $\lambda < \text{T5} < \text{T2-DNA}$ . Desse modo, o aumento do peso molecular ocasionou aumento dos tamanhos, redução dos potenciais-zeta com produção de partículas mais negativamente carregadas e aumento substancial das polidispersidades dos arranjos supramoleculares.

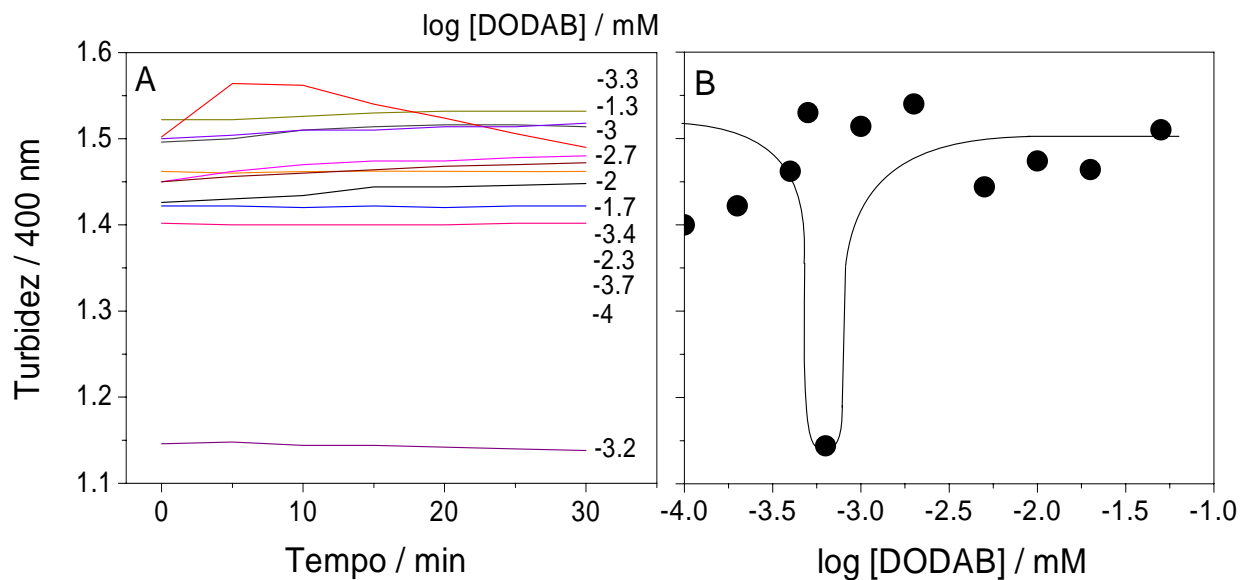


**Figura 33:** Efeito do tipo de DNA ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) em uma concentração fixa de 10  $\mu\text{g/mL}$  de DNA sobre o diâmetro médio, o potencial-zeta e a polidispersidade dos arranjos PSS137/DODAB/DNA (A, B, C) e PSS301/DODAB/DNA (D, E, F).

#### 4.4 - Estabilidade coloidal dos arranjos PSS301/DODAB e PSS301/DODAB/DNA através de leituras de turbidez a 400 nm

Em uma primeira etapa, o efeito da concentração de DODAB sobre partículas de PSS301 foi avaliado através de cinéticas de turbidez a 400 nm. A Figura 34 (A) mostra cinéticas de turbidez para arranjos PSS301/DODAB em função do tempo (30 minutos) após a adição de DODAB. A concentração de PSS301 foi fixada em  $5 \times 10^9$  partículas/mL e a concentração de DODAB variou em uma faixa de  $1 \times 10^{-4}$  a  $5 \times 10^{-2}$  mM. A Figura 34 (B) apresenta a leitura de turbidez a 400 nm no instante 5 minutos para os arranjos PSS301/DODAB em função da concentração de DODAB. Este estudo tornou possível o conhecimento da concentração de DODAB necessária para a máxima agregação interpartículas. Observa-se que, assim como nos experimentos que determinaram o diâmetro médio dos arranjos PSS301/DODAB (Figura 14 A), a concentração de DODAB requerida

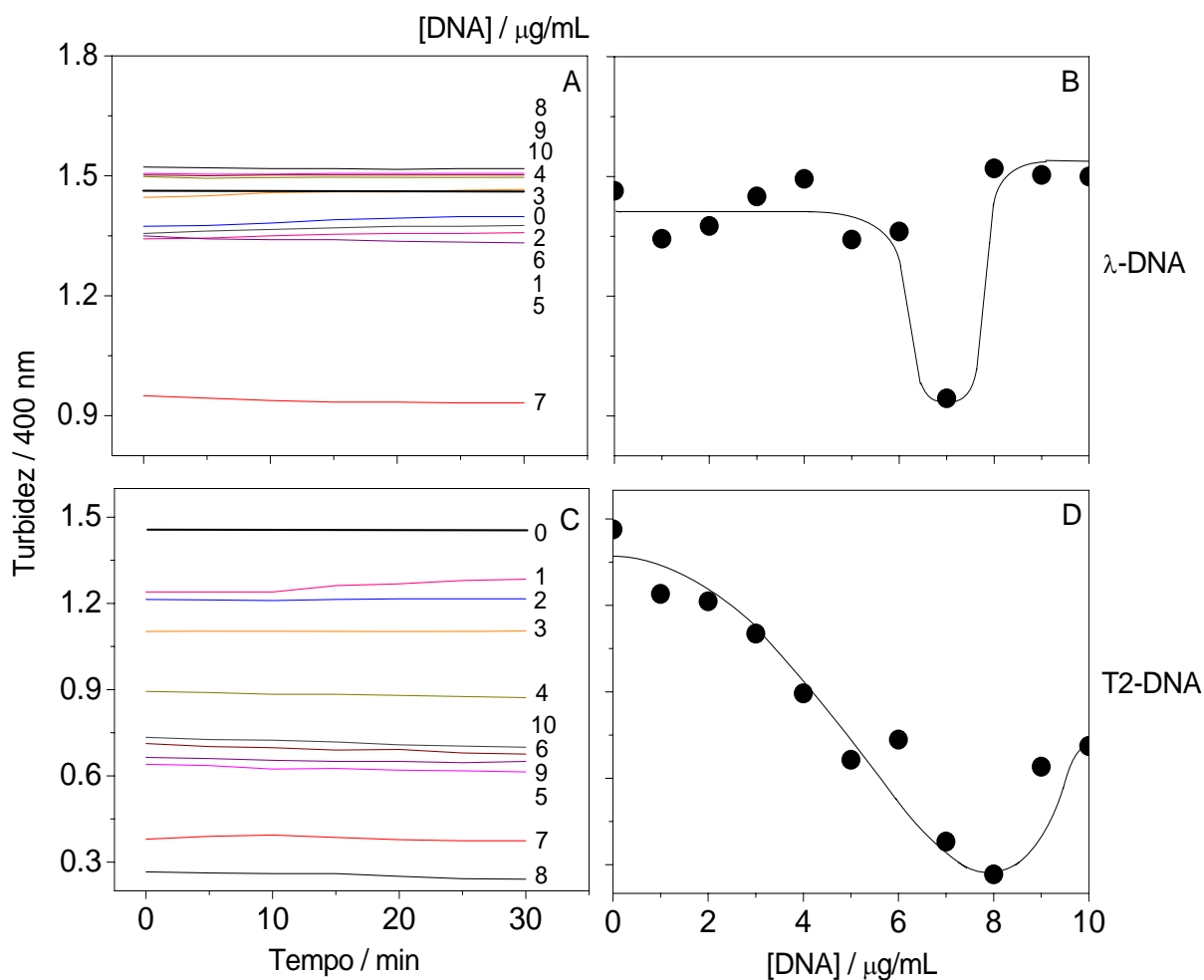
para a máxima agregação é em torno de  $6 \times 10^{-4}$  mM. Este resultado é evidenciado pela diminuição acentuada da turbidez da amostra que atingiu um valor mínimo de aproximadamente 1.150, quando comparado com outros valores de turbidez para outras concentrações de DODAB.



**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.

O efeito do tipo e concentração de DNA sobre cinéticas de turbidez a 400 nm foi avaliado para os arranjos PSS301/DODAB/DNA para dois diferentes DNAs ( $\lambda$  e T2-DNA) (Figura 35). A Figura 35 (A e C) apresenta cinéticas de turbidez para os arranjos PSS301/DODAB/ $\lambda$ -DNA e PSS301/DODAB/T2-DNA, respectivamente, em função do tempo (30 minutos) após a adição de DNA. A Figura 35 (B e D) mostra leituras de turbidez a 400 nm no instante 5 minutos para os arranjos PSS301/DODAB/ $\lambda$ -DNA e PSS/DODAB/T2-DNA, respectivamente, em função da concentração de DNA. As concentrações finais de

PSS301 e DODAB foram, respectivamente,  $5 \times 10^9$  partículas/mL e 0,02 mM, enquanto as concentrações de  $\lambda$  e T2-DNA variaram de 1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ .



**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.

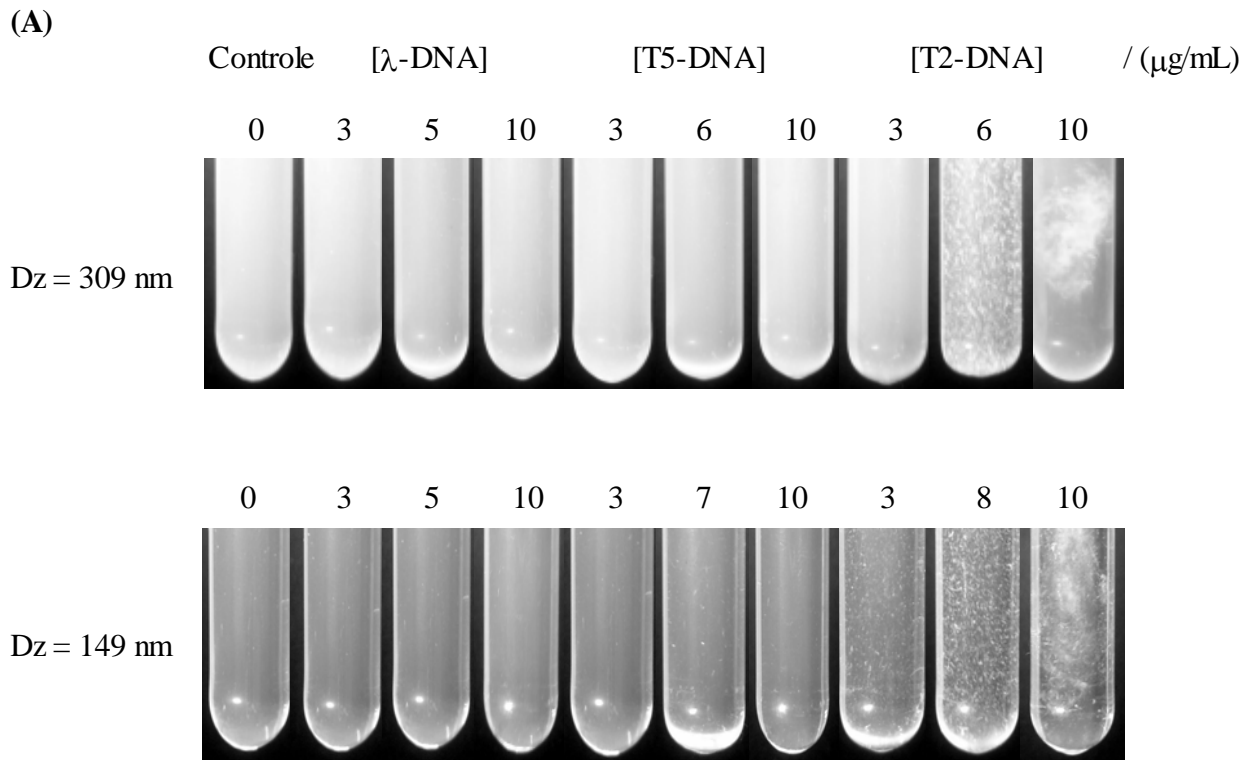
A adição de DNA ao particulado biomimético catiônico levou a uma rápida mudança de turbidez que permaneceu praticamente constante durante 30 minutos após a adição (Figura 35 A e C). Em certos valores de concentração de DNA observou-se extensa agregação da dispersão com ocorrência de sedimentação e diminuição do valor de turbidez do sobrenadante (Figura 35 A e C). A turbidez no sobrenadante foi de 0,938 para PSS301/DODAB/ $\lambda$ -DNA e

0,254 para PSS301/DODAB/T2-DNA em 7 e 8  $\mu\text{g/mL}$  de DNA, respectivamente. Este resultado é consistente com a concentração de 6  $\mu\text{g/mL}$  de DNA requerida para potencial-zeta igual a zero e neutralização de carga (Figuras 27 e 31).

A maior diferença entre  $\lambda$  e T2-DNA refere-se a possibilidade de redispersão dos arranjos PSS301/DODAB/DNA após a neutralização de cargas. Somente os arranjos PSS301/DODAB/ $\lambda$ -DNA são capazes de redispersar acima desse ponto (Figura 35 B). Os arranjos PSS301/DODAB/T2-DNA não redispersam (Figura 35 D).

#### ***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)***

As fotos das dispersões PSS137/DODAB/DNA e PSS301/DODAB/DNA e imagens de AFM são mostradas na Figura 36. A Figura 36 (A) mostra as fotos das dispersões PSS/DODAB/DNA nos tubos de ensaio. Dois tamanhos de partículas biomiméticas foram usados: 309 nm (PSS301/DODAB) e 149 nm (PSS137/DODAB). Três concentrações de cada um dos DNAs utilizados ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) foram escolhidas: a primeira, abaixo da neutralização de cargas (com arranjos positivamente carregados), a segunda, na neutralização de cargas (com potencial-zeta próximo a zero) e a terceira, acima da neutralização de cargas (com arranjos negativamente carregados). O controle (0) refere-se ao arranjo sem o DNA, ou seja, com concentração zero de DNA. Como verificado nos experimentos anteriores, o DNA de maior peso molecular (T2-DNA) é o que apresenta menor estabilidade coloidal, visualizada pela não redispersão após a neutralização de cargas (Figura 36 (A)).

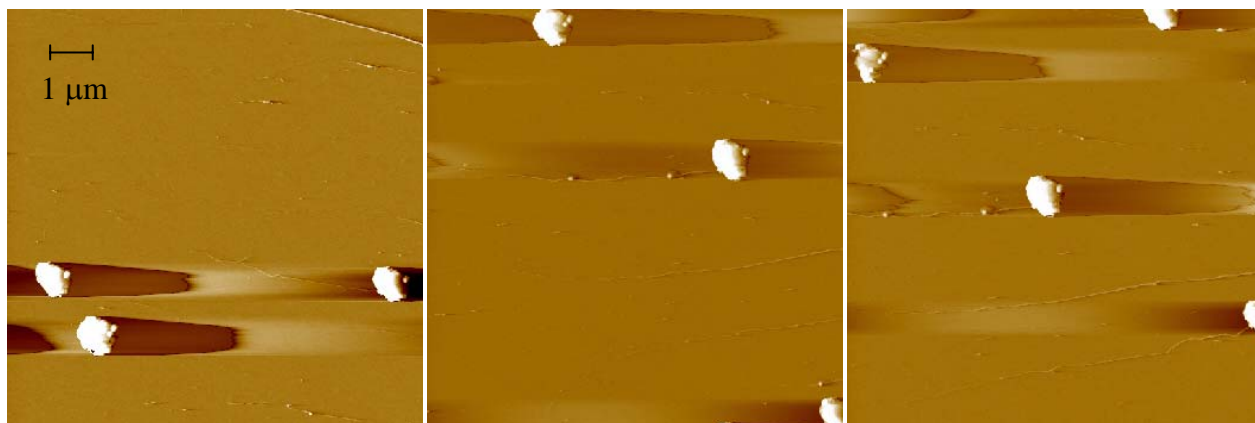


**Figura 36 (A):** Visualização macroscópica das dispersões de PSS301/DODAB/DNA e PSS137/DODAB/DNA nos tubos de ensaio em concentrações crescentes de  $\lambda$ , T5 e T2-DNA.

A Figura 36 (B) mostra as imagens de AFM obtidas para os arranjos PSS137/DODAB/T2-DNA no ponto de neutralização de cargas (8  $\mu\text{g/mL}$  de T2-DNA). Arranjos que mimetizam os nucleossomos puderam ser visualizados por AFM. Todas as partículas adsorveram às longas cadeias de DNA e a imagem mais freqüente foi a formação de conglomerados muito semelhantes a aqueles encontrados em amostras biológicas onde o DNA está enrolado ao redor de cada nucleossomo para formar a cromatina (Stryer *et al.*, 2004). Modelos artificiais de cromatina foram recentemente desenvolvidos a partir de nanopartículas de sílica com 10, 15 e 40 nm de diâmetro médio recobertas com poli(L-lisina) (Zinchenko *et al.*, 2007-b). Neste trabalho, DNA de alto peso molecular extraído de bacteriófago e marcado com molécula fluorescente foi compactado sobre nanopartículas

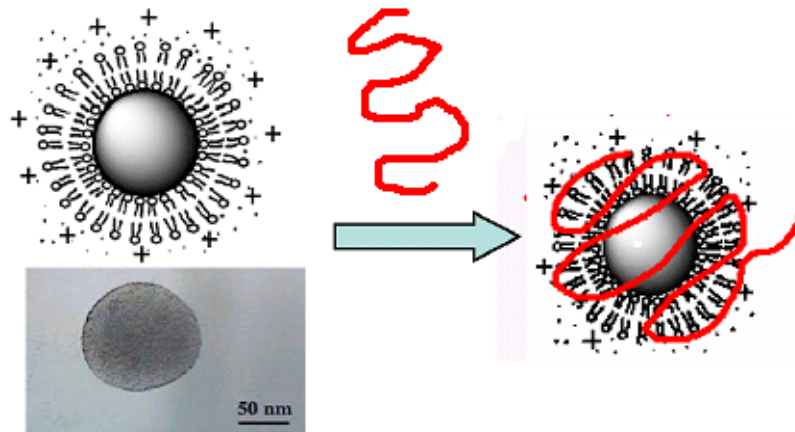
catiônicas sendo visualizado por microscopia de fluorescência. Foi observado que quanto maior o tamanho da partícula, maior a compactação do DNA (Zinchenko *et al.*, 2007-b).

**(B)**



**Figura 36 (B):** Imagens de AFM para o arranjo PSS137/DODAB/T2-DNA no ponto de neutralização de cargas (8 µg/mL de T2-DNA).

A Figura 37 apresenta um esquema dos arranjos PSS/DODAB/DNA. Microesferas de PSS recobertas com uma bicamada catiônica de DODAB podem ser visualizados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Petri & Carmona-Ribeiro, 2007).

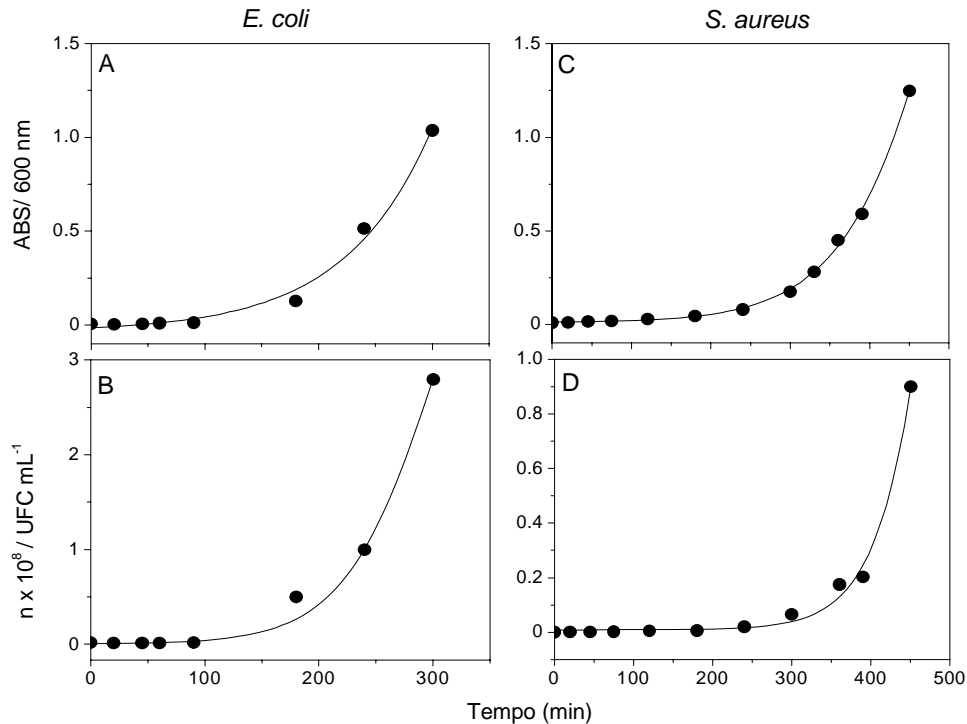


**Figura 37:** Representação esquemática de uma partícula biomimética utilizada para imobilização de DNA (uma biomolécula de carga oposta).

#### 4.6 - Determinação da curva de crescimento bacteriano para duas espécies de microrganismos

Conforme a Figura 38, foram obtidas curvas de crescimento para as bactérias de *E. coli* (Figura 38 A e B) e *S. aureus* (Figura 38 C e D), relacionando densidade numérica de células determinada pelos métodos de plaqueamento (UFC/mL) e leitura de turbidez (600 nm). O gráfico da turbidez (Figura 38 A) e densidade numérica de células –  $n$  (Figura 38 B) em função do tempo de cultivo para bactéria de *E. coli* mostrou que, após 60 min de cultivo, as bactérias entraram na fase log. Tanto a curva de turbidez quanto a curva de viabilidade indicaram que, após 300 minutos de cultivo, as bactérias ainda se encontraram em aumento exponencial. Para as células de *S. aureus* tanto a curva de turbidez (Figura 38 C) quanto a curva de viabilidade (Figura 38 D) indicaram que, após 120 minutos de cultivo, as bactérias entraram na fase log e continuam nela após 450 minutos de cultivo.



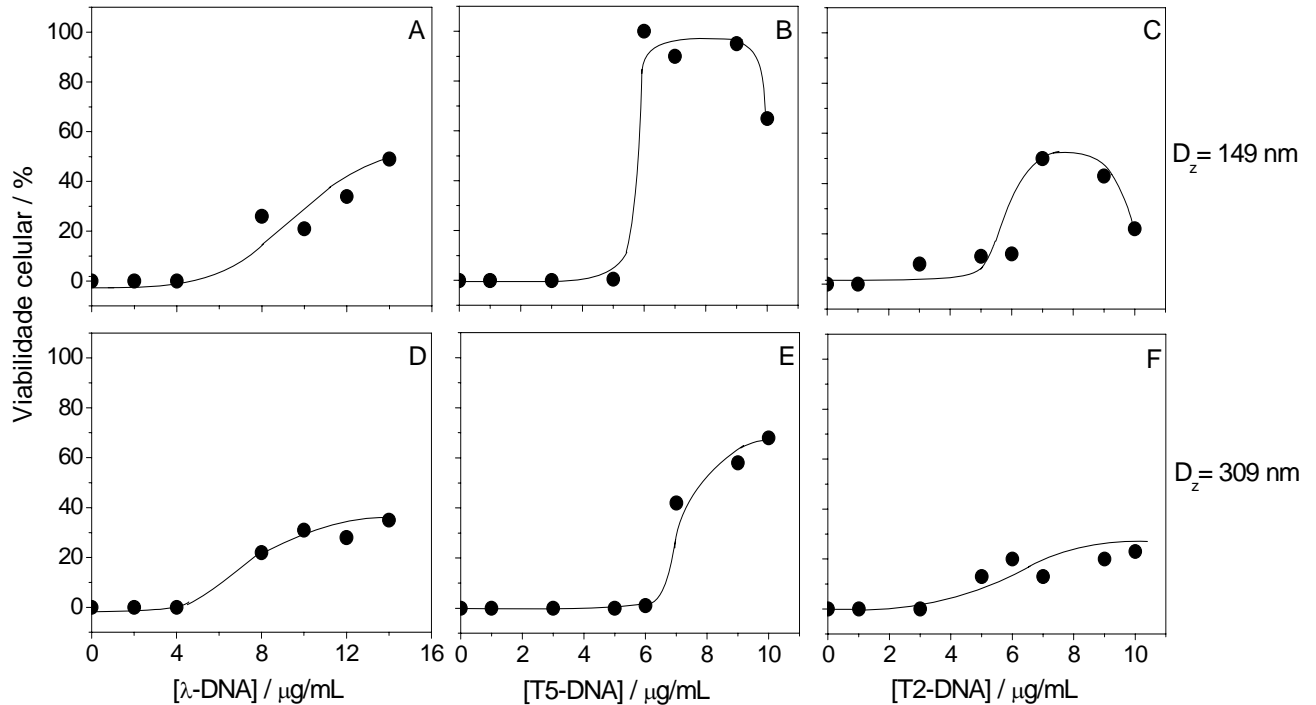


**Figura 38:** Curvas de crescimento para bactérias de *E. coli* (A, B) e *S. aureus* (C, D) pelos seguintes métodos: leituras de turbidez a 600 nm (A e C) e densidade numérica de células  $n$  (B e D) como uma função do tempo de cultivo em horas. Antes de plaquear 0,1 mL da mistura em ágar, diluições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

#### 4.7 - Efeito dos arranjos PSS137/DODAB/DNA ou PSS301/DODAB/DNA sobre a viabilidade celular de *E. coli*

A viabilidade celular de *E. coli* foi afetada de diversas maneiras de acordo com carga e tamanho de partícula, tipo e concentração de DNA (Figura 39). Foram obtidas viabilidades celulares para três diferentes DNAs ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) que interagiram com partículas biomiméticas de dois diferentes tamanhos: 149 nm (PSS137/DODAB) e 309 nm (PSS301/DODAB). A Figura 39 (A, B e C) mostra as curvas de viabilidade celular de *E. coli* para os arranjos PSS137/DODAB/ $\lambda$ , T5 e T2-DNA, respectivamente. Observa-se que a viabilidade celular é zero em baixas concentrações de DNA (0-5  $\mu\text{g/mL}$  de DNA) indicando o caráter tóxico da predominância de arranjos positivos em dispersão. As curvas de viabilidade celular de *E. coli* para os arranjos PSS301/DODAB/ $\lambda$ , T5 e T2-DNA também são

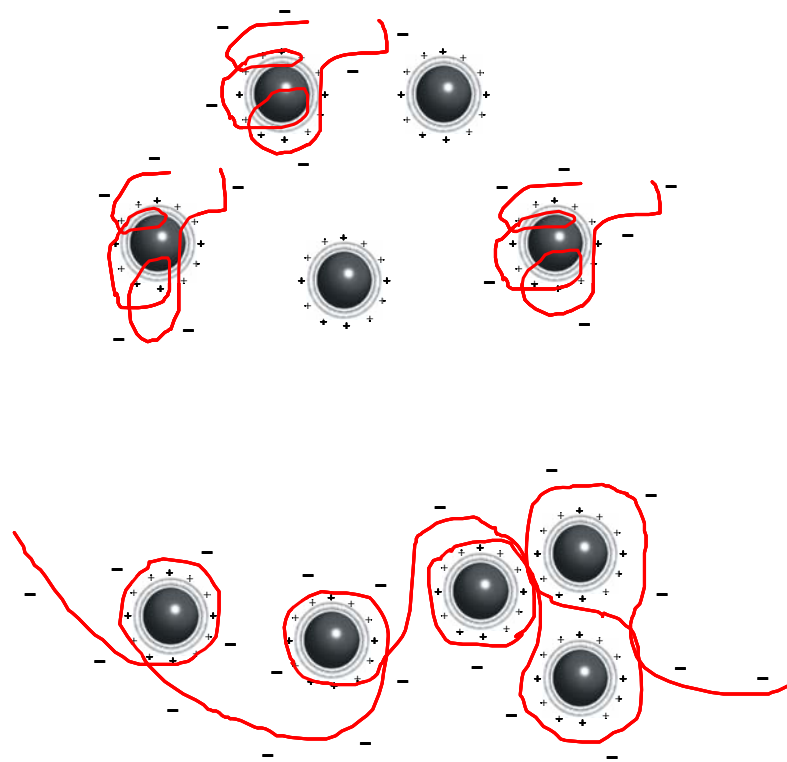
mostradas na Figura 39 (D, E e F, respectivamente). A viabilidade celular de *E. coli* também é zero em baixas concentrações de DNA e aumenta a partir da neutralização de cargas.



**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.

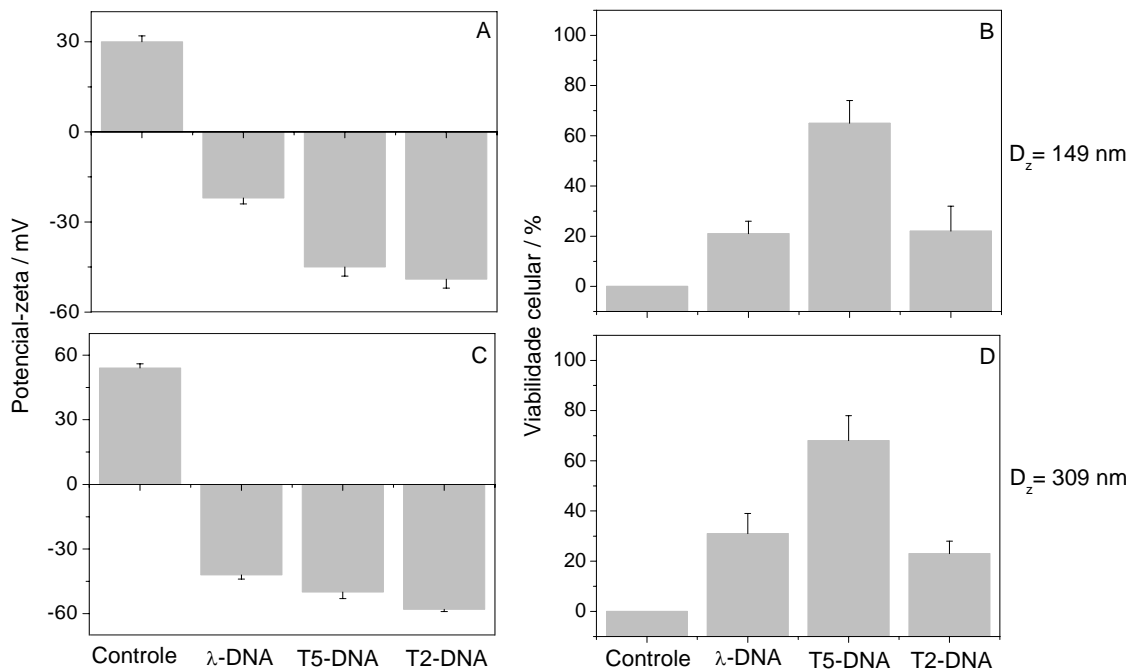
Arranjos envolvendo  $\lambda$ -DNA afetam a viabilidade celular de *E. coli* de modo similar para os dois tamanhos de partículas biomiméticas catiônicas testadas (Figura 39 A e D). Já os arranjos envolvendo T5 ou T2-DNA afetam a viabilidade celular de *E. coli* de modo diferente para os dois tamanhos de partículas biomiméticas catiônicas testadas (Figura 39 B e E; C e F). Em uma concentração de DNA necessária para a neutralização de cargas ou acima dela a viabilidade celular de *E. coli* foi maior para os arranjos envolvendo T5 e T2-DNA (Figura 39 B e E; C e F) do que para os arranjos que envolveram  $\lambda$ -DNA (Figura 39 A e D). Talvez, uma possível explicação para a baixa viabilidade celular é que  $\lambda$ -DNA (a molécula de DNA de menor tamanho e peso molecular utilizada no experimento) compacta-se melhor sobre as

partículas biomiméticas em comparação com as moléculas de DNAs maiores (ver imagens de AFM para os arranjos PSS137/DODAB/T2-DNA na Figura 36 B). Desta maneira, uma maior quantidade de partículas biomiméticas catiônicas livres ocasionariam a diminuição da viabilidade celular. Compostos catiônicos são reconhecidamente tóxicos para células procarióticas e eucarióticas (Pereira *et al.*, 2008; Carmona-Ribeiro *et al.*, 1997). A Figura 40 apresenta a situação de algumas partículas catiônicas livres em contraste com a situação de ausência de partículas catiônicas livres em dispersão. No primeiro caso seria esperada menor viabilidade celular, potencial-zeta menos negativo e tamanhos médios menores em relação ao segundo caso.



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

Para avaliar a relação entre potencial-zeta e tipo de DNA sobre a viabilidade celular de *E. coli* as concentrações dos três tipos de DNA ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) foram fixadas em 10  $\mu\text{g/mL}$  e os experimentos foram realizados para os arranjos PSS137/DODAB/DNA (Figura 41 A e B) e PSS301/DODAB/DNA (Figura 41 C e D). Os controles referem-se aos arranjos PSS137/DODAB e PSS301/DODAB na ausência de DNA.



**Figura 41:** Efeito tipo de DNA ( $\lambda$ , T5 e T2-DNA) em uma concentração fixa de 10  $\mu\text{g/mL}$  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).

O efeito mais significativo observado nos experimentos de viabilidade celular de *E. coli* corresponde à ação bactericida dos arranjos supramoleculares catiônicos em baixas concentrações de DNA (Figura 39). Para 10  $\mu\text{g/mL}$  de DNA, os arranjos aniônicos PSS/DODAB/DNA resultaram em viabilidades celulares que variaram entre 20 e 70 %, mas que não resultaram em um comportamento monotônico com potencial-zeta (Figura 41) ou tamanho de partícula (Figura 33 A e D).

A questão relevante para aplicações de partículas catiônicas em terapia gênica refere-se à internalização dos arranjos partícula catiônica-gene e às propriedades desses arranjos que implementarão essa internalização (Rejman *et al.*, 2004). O tamanho parece ser uma propriedade importante que determina o mecanismo de entrada das partículas na célula. O tamanho de lipoplexos é difícil de controlar e seria de se esperar que partículas biomiméticas catiônicas apresentassem a vantagem do controle de tamanho dos arranjos para se determinar efeitos de tamanho sobre a transfecção. Essa, de fato, é uma perspectiva de grande potencial que deverá ser investigada no futuro para entrega de genes carregados por plasmídeos adsorvidos sobre as partículas biomiméticas catiônicas.

#### 4 - CONCLUSÕES

Partículas biomiméticas catiônicas monodispersas obtidas em uma ampla faixa de tamanhos podem ser utilizadas para interação com DNA de cadeia longa. Os arranjos supramoleculares de partículas catiônicas e DNA neutros ou aniônicos exibem baixa estabilidade coloidal, alta polidispersidade e alguma citotoxicidade contra *E. coli*. Os arranjos supramoleculares catiônicos exibem alta citotoxicidade (0% de viabilidade celular), alta estabilidade coloidal e boa polidispersidade. Na neutralização de cargas, os arranjos com DNA de maior peso molecular revelaram por AFM conglomerados solenoidais de partículas similares a nucleossomos. A interação entre as partículas biomiméticas catiônicas e DNAs plasmidiais contendo genes deverá permitir uma melhor compreensão de efeitos de tamanho, carga e polidispersidade dos arranjos sobre entrega de genes em células eucarióticas ou procarióticas.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; MALLAPRAGADA, S.K. Synthetic sustained gene delivery systems. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 8, p. 311-330, 2008.

AHMAD, A.; EVANS, H.M.; EWERT, K.; GEORGE, C.X.; SAMUEL, C.E.; SAFINYA, C.R. New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid-DNA complexes for gene delivery. *J. Gene Med.*, v. 7, p. 739-748, 2005.

ALLEN, M.T.; MIOLA, L.; WHITTEN, D.G. Host guest interactions - a fluorescence investigation of the solubilization of diphenylpolyene solute molecules in lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 110, p. 3198-3206, 1988.

ANDERSSON, M.; HAMMARSTROM, L.; EDWARDS, K. Effect of bilayer phase-transitions on vesicle structure and its influence on the kinetics of viologen reduction. *J. Phys. Chem.*, v. 99, p. 14531-14538, 1995.

BARRELEIRO, P.C.A.; MAY, R.P.; LINDMAN, B. Mechanism of formation of DNA-cationic vesicle complexes. *Faraday Discuss.*, v. 122, p. 191-201, 2002.

BATZRI, S; KORN, E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 298, p. 1015-1019, 1973.

BEHR, J.P. Synthetic gene transfer vectors. *Acc. Chem. Res.*, v. 26, p. 274-278, 1993.

BONDI, M.L.; AZZOLINA, A.; CRAPARO, E.F.; LAMPIASI, N.; CAPUANO, G.; GIAMMONA, G.; CERVELLO, M. Novel cationic solid-lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene delivery. *J. Drug Targeting*, v. 15, p. 295-301, 2007.

BROWN, M.D.; SCHATZLEIN, A.G.; UCHEGBU, I.F. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int. J. Pharm.*, v. 229, p. 1-21, 2001.

CAETANO, W. Estudos físico-químicos da interação de clorpromazina e trifluoperazina com sistemas biomiméticos de membrana biológica. São Carlos, 2001 - Tese (Doutorado) IQSC-USP.

CAMPANHÃ, M.T.N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic vesicles and *Candida albicans*. *J. Phys. Chem. B*, v.105, p. 8230-8236, 2001.

CÁRDENAS, M.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. DNA and cationic surfactants at solid surfaces. *Colloids Surf. A.*, v. 270-271, p. 33-43, 2005.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bilayer-forming synthetic lipids: Drugs or carriers? *Curr. Med. Chem.*, v. 10, p. 2425-2446, 2003.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. *An. Acad. Bras. Ci.*, v. 72, p. 30-43, 2000.

CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic amphiphile vesicles. *Chem. Soc. Rev.*, v. 21, p. 209-214, 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., CASTUMA, C. E., SESSO, A.; SCHREIER, S. Bilayer structure and stability in dihexadecylphosphate dispersions. *J. Phys. Chem.*, v. 95, p. 5361-5366, 1991.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; CHAIMOVICH, H. Preparation and characterization of large dioctadecyldimethylammonium chloride liposomes and comparison with small sonicated vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 733, p. 172-179, 1983.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; MIDMORE, B. R. Synthetic bilayer adsorption onto polystyrene microsphere. *Langmuir*, v. 8, p. 801-806, 1992.

CARMONA-RIBEIRO, A.M.; ORTIS, F.; SCHUMACHER, R. I.; ARMELIN, M. C. S. Interactions between cationic vesicles and cultured mammalian cells. *Langmuir*, v. 13, p. 2215-2218, 1997.

CARMONA-RIBEIRO, A.M., YOSHIDA, L.S.; SESSO, A.; CHAIMOVICH, H. Permeabilities and stabilities of large dihexadecylphosphate and dioctadecyldimethylammonium chloride vesicles. *J. Colloid Interf. Sci.*, v. 100, p. 433-443, 1984.

CHIARI, M. Polymers for immobilizing biologic molecules on solid surfaces and immobilization process. *Ital. Appl.*, 24 pp., 2004.

CHITTIMALLA, C.; DALKARA, D.; ZUBER, G. Design, synthesis and evaluation of a novel polymer for gene delivery to mammalian cells. *Lett. Drug Des. Discovery*, v. 4, p. 92-98, 2007.

CHU, B.; LIU, T. Characterization of nanoparticles by scattering techniques. *J. Nanoparticles Res.*, v. 2, p. 29-41, 2000.

CLAESSON, P.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; KURIHARA, K. Dihexadecyl phosphate monolayers: intralayer and interlayer interactions. *J. Phys. Chem.*, v. 93, p. 917-922, 1989.

COCQUYT, J.; OLSSON, U.; OLOFSSON, G.; VAN DER MEEREN, P. Temperature quenched DODAB dispersions: Fluid and solid state coexistence and complex formation with oppositely charged surfactant. *Langmuir*, v. 20, p. 3906-3912, 2004.

COSNIER, S.; MAILLEY, P. Recent advances in DNA sensors. *Analyst*, v. 133, p. 984-991, 2008

DAVIS, M.E. Non viral gene delivery systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 13, p. 129-131, 2002.

DEAMER, D.; BANGHAM, A.D. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 443, p. 629-635, 1976.

DIAS, R.; ANTUNES, F.; MIGUEL, M.; LINDMAN, S.; LINDMAN, B. DNA-lipid systems. A physical chemistry study. *J. Med. Biol. Res.*, v. 35, p. 509-522, 2002.



DIAS, R.S.; INNERLOHINGER, J.; GLATTER, O.; MIGUEL, M.G.; LINDMAN, B. Coil-globule transition of DNA molecules induced by cationic surfactants: a dynamic light scattering study. *J. Phys. Chem.*, v. 109, p. 10458-10463, 2005.

DONG, L.; HOLLIS, T.; FISHWICK, S.; CONNOLLY, B.A.; WRIGHT, N.G.; HORROCKS, B.R.; HOULTON, A. Synthesis, manipulation and conductivity of supramolecular polymer nanowires. *Eur. J. Chem-A*, v. 13, p. 822-828, 2007.

EVANS, D.F.; WENNERSTRÖM, H. *The colloidal domain - Where physics, chemistry, biology and technology meet (1)*. New York: VHC Publishers Inc., 1994.

EWERT, K.K.; AHMAD, A.; BOUXSEIN, N. F.; EVANS, H.M.; SAFINYA, C. R. Non-viral gene delivery with cationic liposome-DNA complexes. *Meth. Mol. Biol.*, v. 433, p.159-175, 2008.

FEAVER, W.J.; MULLENIX, M. Use of rolling circle DNA replication for signal amplification in immunoassays. *U.S. Pat. Appl. Publ.*, 75 pp., 2004.

FEITOSA, E.; BROWN, W. Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide. *Langmuir*, v. 13, p. 4810-4816, 1997.

FOX, W.A.; RAY, W.C., III. Polycationic polymer coatings for immobilizing biological samples. *PCT Int. Appl.*, 44 pp., 2006.

GAWEDA, S.; MORÁN, M. C.; PAIS, A.A.C.C.; DIAS, R.S.; SCHILLÉN, K.; LINDMAN, B.; MIGUEL, M.G. Cationic agents for DNA compaction. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 323, p. 75-83, 2008.

GENNIS, R.B. *Biomembranes: molecular structure and function*. New York: Springer Verlag, Inc. 1989.

GRABOWSKI, E.; MORRISON, I. Measurements of suspended particles by quasi-elastic light scattering. New York: Wiley-Interscience, p. 199-236, 1983.

HAMMARSTROM, L.; VELIKIAN, I.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Cryo-TEM evidence - sonication of dihexadecyl phosphate does not produce closed bilayers with smooth curvature. *Langmuir*, v. 11, p. 408-410, 1995.

HAN, S.; MAHATO, R.I.; SUNG, Y.K.; KIM, S.W. Development of biomaterials for gene therapy. *Mol. Ther.*, v.2, p. 302-317, 2000.

HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*. New York: McGraw-Hill, 2000.

HENRY, D. C. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 133, 106, 1931.

HOEKSTRA, D.; REJMAN, J.; WASUNGU, L.; SHI, F.; ZUHORN, I. Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 35, p. 68-71, 2007.

HORER, O.L.; ENACHE, C. Conformational transitions in polyelectrolyte adsorption. *Biophys. Chem.*, v. 54, n.1, p. 43-48, 1995.

ISRAELACHVILI, J.N. Intermolecular and surface forces. 2. ed. London: Academic Press, 1992.

ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL D.J., NINHAM, B.W. Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 470, p. 185-201, 1977.

JONES, M.N.; CHAPMAN, D. Micelles, monolayers, and biomembranes (1). John Wiley & Sons, Inc. 1995.

KANO, K.; ROMERO, A.; DJERMOUNI, B.; ACHE, H.; FENDLER, J.H. Characterization of surfactant vesicle as a membrane mimetic agent. 2. temperature-dependant changes of turbidity, viscosity, fluorescence polarization of 2 methylanthracene, and positron annihilation in sonicated dioctadecyldimethylammonium chloride. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 101, p. 4030-4037, 1979.

KIKUCHI, I.S.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Interactions between DNA and synthetic cationic liposomes. *J. Phys. Chem. B*, v. 104, p. 2829-2835, 2000.

KORNBERG, R. D.; LORCH, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, v. 98, p. 285-294, 1999.

KOUASSI, G.K.; IRUDAYARAJ, J. Magnetic and gold-coated magnetic nanoparticles as a DNA sensor. *Anal. Chem.*, v. 78, p. 3234-3241, 2006.

KUNITAKE, T.; OKAHATA, Y.; TAMAKI, K.; KUMAMARU, F.; TAKAYANAGI, M. Formation of the bilayer membrane from a series of quaternary ammonium salts. *Chem. Lett.*, v. 4, p. 387-390, 1977.

LAPORTE, L.; REA, J.C.; SHEA, L.D. Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials*, v. 27, p. 947-954, 2006.

LESSA, M.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between bilayer membranes and latex. *Colloids Surf. A.*, v.153, p.355-361, 1999.

LINCOPAN, N.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Lipid-covered drug particles: Combined action of dioctadecyldimethylammonium bromide and amphotericin B or miconazole. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 58, p. 66, 2006.

LINCOPAN, N.; ROSA, H.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Biomimetic Particles. *Macromol. Symp.*, v. 245-6, p. 485-490, 2006-a.

LINCOPAN, N.; BORELLI, P.; FOCK, R.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Toxicity of an effective amphotericin B formulation at high cationic lipid to drug molar ratio. *Exper. Toxicol. Pathol.*, v. 58, p. 175-183, 2006-b.

LIU, S.; LU, G. Interaction of cationic vesicle with ribonucleotides (AMP, ADP, and ATP) and physicochemical characterization of DODAB/ribonucleotides complexes. *Biophys. Chem.*, v. 127, p. 19-27, 2007.

LV, H.; ZHANG, S.; WANG, B.; CUI, S.; YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release*, v. 114, p. 100-109, 2006.

LUO, D; SALTZMAN, W. M. Non viral gene delivery - Thinking of silica. *Gene Ther.*, v. 13, p. 585-586, 2006.

MARTINS, L.M.S.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic vesicles as bactericides. *Langmuir*, v. 13, p. 5583-5587, 1997.

MASTROBATTISTA, E; VAN DER AA, M.A.E.M; HENNINK, W.E; CROMMELIN, D.J.A. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nature Rev. Drug Discov.*, v. 5, p. 115-121, 2006.

MEDINA-KAUWE, L.K.; XIE, J.; HAMM-ALVAREZ, S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.*, v. 12, p. 1734-1751, 2005.

MELNIKOV, S.M.; SERGEYEV, V.G.; YOSHIKAWA, K. Discrete coil-globule transition of large DNA induced by cationic surfactant. *J. Am. Chem. Soc.* v. 117, p. 2401-2408, 1995.

MIGUEL, M.G.; PAIS, A.A.C.C.; DIAS, R.S.; LEAL, C.; ROSA, M.; LINDMAN, B. DNA-cationic amphiphile interactions. *Colloids Surf. A.*, v. 228, p. 43-55, 2003.

MITRAKOS, P.; MACDONALD, P.M. Nucleotide chain length and the morphology of complexes with cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1463, p. 355-373, 2000.

MORTARA, R.A.; QUINA, F.H.; CHAIMOVICH, H. Formation of closed vesicles from a simple phosphate diester - Preparation and some properties of vesicles of dihexadecylphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, v. 81, p. 1080-1086, 1978.

MOURA, S.P.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic bilayer fragments on silica at low ionic strength: Competitive adsorption and colloid stability. *Langmuir*, v. 19, p. 6664-6667, 2003.

NAKAMURA, F.; HARA, M.; TOMADA, K.; KAORU, H.; HAYASHI, J.; KNORR, W.; MANNA, A. Development of DNA hybridization system using probe-immobilized gold nanoparticles and application to the detection of base-mismatching mutation by surface plasmon resonance. *Japan Science and Technology Agency*, 15 pp., 2004.

NEW, R.R.C. *Liposomes: a practical approach (1)*. New York, Oxford University Press, 1990.

O'BRIEN, R. W.; WHITE, L. R. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J. Chem. Soc. - Faraday Trans.*, v. 2, p. 1607-1626, 1978.

OKU, N.; YAMAZAKI, Y.; MATSUURA, M.; SUGIYAMA, M.; HASEGAWA, M.; NANGO, M. A novel non-viral gene transfer system, polycation liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 52, p. 209-218, 2001.

PACHECO, L.F.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Effects of synthetic lipids on solubilization and colloid stability of hydrophobic drugs. *J. Colloid Interf. Sci.*, v. 258, p. 146-154, 2003.

PACK, D.W.; HOFFMAN A.S.; PUN S.; STAYTON, P.S. Design and development of polymers for gene therapy. *Nature Rev. Drug Discov.*, v. 4, p. 581-593, 2005.

PANSU, R.M.; ARRIO, B.; RONCIN, J.; FAURE, J. Vesicles versus membrane fragments in DODAC suspensions. *J. Phys. Chem.*, v. 94, p. 796-801, 1990.

PANTANI, C.; SPRETI, N.; MAGGITI, M.C.; GERMANI, R. Acute toxicity of some synthetic cationic and zwitterionic surfactants to freshwater amphipod *Echinogammarus-TibaldII*. *B. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 55, p. 179-186, 1995-a.

PANTANI, C.; SPRETI, N.; NOVELLI, A.A.; GHIRARDINI, A.V.; GHETTI, P.F. Effect of particulate matter on copper and surfactants acute toxicity to *Echinogammarus-TibaldII* (crustacea, amphipoda). *Environ. Technol.*, v. 16, p. 263-270, 1995-b.

PEREIRA, E.M.A.; KOSAKA, P.M.; ROSA, H.; VIEIRA, D.B.; KAWANO, Y.; PETRI, D. F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Hybrid materials from intermolecular associations between cationic lipid and polymers. *J. Phys. Chem. B.*, v.112, p. 9301-9310, 2008.

PEREIRA, E.M.A.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Adsorption of cationic lipid bilayer onto flat silicon wafers: Effect on ion nature and concentration. *J. Phys. Chem. B*, v. 110, p. 10070-10074, 2006.

PEREIRA, E.M.A.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic vesicles at hydrophobic surfaces. *J. Phys. Chem. B*, v. 106, p. 8762-8767, 2002.

PEREIRA, E.M.A.; VIEIRA, D.B.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Cationic bilayers on polymeric particles: Effect of low NaCl concentration on surface coverage. *J. Phys. Chem. B*, v. 108, p. 11490-11495, 2004.

PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. (2007) Biomimetic Particles, In *Polymeric Nanostructures and Their Applications*, H. S. Nalwa (Ed.), American Scientific Publishers, p. 485-530, 2007.

PLAGEMANN, P.G.W., WOFFENDIN, C. Species-differences in sensitivity of nucleoside transport in erythrocytes and cultured-cells to inhibition by nitrobenzylthioinosine, dipyridamole, dilazep and lidoflazine. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 969, p. 1-8, 1988.

RAO, N.M.; GOPAL, V. Cell biological and biophysical aspects of lipid-mediated gene delivery. *Biosci. Rep.*, v. 26, p. 301-324, 2006.

RAPUANO, R.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Supported bilayers on silica. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 226, p. 299-307, 2000.

RAPUANO, R.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Physical adsorption of bilayer membranes on silica. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 193, p. 104-111, 1997.

REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I.S., HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.*, v. 377, p. 159-169, 2004.

REMY, J.S.; SIRLIN, C.; VIERLING, P.; BEHR, J.P. Gene-transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconj. Chem.*, v. 5, p. 647-654, 1994.

ROY, R.; SAVARIAR, E.N.; THAYUMANAVAN, S. Synthesis of new class of cationic polymers for gene delivery. *Am. Chem. Soc.*, v. 46, p. 1172, 2005.

SAFINYA, C.R. Structures of lipid-DNA complexes: supramolecular assembly and gene delivery. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 11, p. 440-448, 2001.

SALAY, L.C.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Wetting of SiO<sub>2</sub> surfaces by phospholipid dispersions. *J. Adhesion Sci. Technol.*, v. 13, p. 1165-1179, 1999.

SALT, W. G.; WISEMAN, D. Relation between uptake of cetyltri-methylammonium bromide by *Escherichia coli* and its effects on cell growth and viability. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 22, p. 261, 1970.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Quím. Nova*, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SCHALES, O.; SCHALES, S. S. A simple and accurate method for the determination of chloride in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 140, p. 879-884, 1941.

SICCHIEROLLI, S.M.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Bacteria flocculation and death by cationic vesicles. *Langmuir*, v. 11, p. 2991-2995, 1995.

SHAW, D.J. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. London: Butterworth & Co., 3. ed., 1992.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. *Science*, v. 175, p. 720, 1972.

STRYER, L.; BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5. ed., p. 899-901, 2004.

TAIRA, S.; YOKOYAMA, K. DNA-conjugated polymers for self-assembled DNA chip fabrication. *Anal. Sci.*, v. 20, p. 267-271, 2004.

TAKAHASHI, M.; OKADA, J.; ITO, K.; HASHIMOTO, M.; HASHIMOTO, K.; YOSHIDA, Y.; FURUICHI, Y.; OHTA, Y.; MISHIRO, S.; GEMMA, N. Construction of an electrochemical DNA chip for simultaneous genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Toshiba Research & Development Center*, v. 130, p. 687-693, 2005.

TAPIAS, G.N.; SICCHIEROLLI, S.M.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Interactions between cationic vesicles and *Escherichia coli*. *Langmuir*, v. 10, p. 3461-3465, 1994.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discovery*, v. 4, p. 145-160, 2005.

TSURUTA, L.R.; LESSA, M.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Effect of particle size on colloid stability of bilayer-covered polystyrene microspheres. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 175, p. 470-475, 1995.

VIEIRA, D.B.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. *J. Colloid Interface Sci.*, v. 244, p. 427-431, 2001.

WASUNGU, L.; HOEKSTRA, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release*, v. 116, p. 255-264, 2006.

WIETHOFF, C.M.; MIDDLEAUGH, C.R. Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.*, v. 92, p. 203-217, 2003.

WILSON, W.W.; WADE, M.M.; HOLMAN, S.C.; CHAMPLIN, F.R. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements *J. Microbiol. Meth.*, v. 43, p. 153, 2001.

WROBELL, I.; COLLINS, D. Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1235, p. 296-304, 1995.

WU, P.; CASTNER, D.G.; GRAINGER, D.W. Diagnostic devices as biomaterials: a review of nucleic acid and protein microarray surface performance issues. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, v. 19, p. 725-753, 2008

WU, S.H.W.; McCONNELL, H.M. Phase separations in phospholipid membranes. *Biochemistry*, v. 14, p. 847-854, 1975.

ZHANG, Z.; LIANG, P.; ZHENG, X.; PENG, D.; YAN, F.; ZHAO, R.; FENG, C.L. DNA immobilization/hybridization on plasma-polymerized pyrrole. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 1613-1617, 2008.

ZHANG, S.; XU, Y.; WANG, B.; QIAO, W.; LIU, D.; LI, Z. Cationic compounds used lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J. Control. Release*, v. 100, p. 165-180, 2004.

ZINCHENKO, A.A.; SAKAUE, T.; ARAKI, S.; YOSHIKAWA, K.; BAIGL, D. Single-chain compaction of long duplex DNA by cationic nanoparticles: modes of interaction and comparison with chromatin. *J. Phys. Chem. B*, v. 111, p. 3019-3031, 2007-a.

ZINCHENKO, A.A.; LUCKEL, F.; YOSHIKAWA, K. Transcription of giant DNA complexed with cationic nanoparticles as a simple model of chromatin. *Biophys. J.*, v. 92, p. 1318-1325, 2007-b.

ZUBER, G.; DALKARA, D.; REMY, J.S. Virus like nanoparticles for gene therapy. *Smart Nanoparticles in Nanomedicine*, v. 8, p. 183-216, 2006.

ZUHORN, I.S.; ENGBERTS, J.B.F.N.; HOEKSTRA, D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur. Biophys. J.*, v. 36, p. 349-362, 2007.