



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**ENGENHARIA DOS MATERIAIS**

**CELULOSE E MESOCARPO DE BABAÇU COMO COMPLEMENTOS VETORIAIS**  
**PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA BACTERIANA**

**Mestrando: Jailson de Araújo Santos**

**Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**

**Coorientador: Prof. Dr. Daniel Barbosa Liarte**

**Teresina - Piauí**

**2018**

**JAILSON DE ARAÚJO SANTOS**

**CELULOSE E MESOCARPO DE BABAÇU COMO COMPLEMENTOS VETORIAIS  
PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA BACTERIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito complementar à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**

**COORIENTADOR: Prof. Dr. Daniel Barbosa Liarte**

**Teresina-Piauí**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

S237c Santos, Jailson de Araújo.  
Celulose e mesocarpo de babaçu como complementos  
vetoriais para transformação genética bacteriana / Jailson de  
Araújo Santos. – 2018.  
95 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos  
Materiais) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.  
“Orientador: Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho”.  
“Coorientador: Prof. Dr. Daniel Barbosa Liarte”.

1. Ciência dos Materiais. 2. Clonagem. 3. Vetor não-viral.  
4. Biopolímeros. 5. Carregadores de Genes. I. Título.

CDD 620.112

**JAILSON DE ARAÚJO SANTOS**

**CELULOSE E MESOCARPO DE BABAÇU COMO COMPLEMENTOS VETORIAIS  
PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA BACTERIANA**

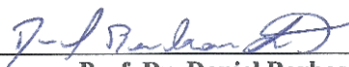
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais da Universidade Federal do Piauí – UFPI, como requisito complementar à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais.

**Aprovada em: 31/07/2017**

**Banca Examinadora**



**Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho**  
Universidade Federal do Piauí  
Orientador



**Prof. Dr. Daniel Barbosa Liarte**  
Universidade Federal do Piauí  
Coorientador



**Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto**  
Universidade Federal do Piauí  
Examinador Externo



**Prof. Dra. Maria Regiane Araújo Soares**  
Universidade Federal do Piauí/Campus Amílcar Ferreira Sobral  
Examinadora Externa

## DEDICATÓRIA

***À minha mãe Neurismar Moraes,***  
*minha base, mulher forte, dedicada, mãe coruja, guerreira e batalhadora, a quem devo tudo o que sou e que com seu amor incondicional me deu forças para nunca desistir dos meus sonhos.*  
*Sem seu apoio, mãe, jamais conseguiria chegar até aqui. Muito obrigado por todos os ensinamentos e dedicação. Este sonho também é seu e sem você não se realizaria.*

***Ao meu Pai Jurandir Batista,***  
*meu exemplo de garra, dedicação e perseverança. Meu pai, o senhor é um homem de força, batalhador e que sempre busca aquilo que deseja. Agradeço-lhe por sempre me proporcionar a oportunidade de lutar e buscar por aquilo que eu sempre acreditei, por ter me guiado pelo caminho dos estudos. O senhor também faz parte dessa conquista. Obrigado por tudo.*

## AGRADECIMENTOS

Gratidão é a palavra que define a conclusão dessa dissertação e toda a minha trajetória durante esses dois anos de mestrado. Sou grato a muitos que comigo caminharam nessa jornada até aqui, me dando apoio nos momentos difíceis e sentindo orgulho a cada vitória.

Agradeço à Deus por não ter deixado faltar fé e persistência para que essa conquista fosse alcançada sem deixar que eu fraquejasse nas adversidades enfrentadas.

Agradeço à minha família, meu porto seguro de força, aliança e amor. Aos meus pais, Jurandir Batista e Neurismar Moraes por todo amor e dedicação à minha criação. Meus irmãos, Nayara Santos e Jefferson Santos, pelo suporte e carinho.

Agradeço meus orientadores Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho e Dr. Daniel Barbosa Liarte por terem acreditado em meu potencial, por todos os ensinamentos e por terem aceitado esse desafio de realizar esse estudo. Sou grato a todo o aprendizado tanto acadêmico, profissional e pessoal que vocês me proporcionaram.

Agradeço todas as contribuições que recebi e que foram de fundamental importância para a execução dos experimentos e desenvolvimento do trabalho dessa dissertação. Em especial, Ana Maria Murta e Dra. Silvane Murta, do laboratório da Fiocruz-MG, ao Fábio Ribeiro e Dra. Durcilene Alves, do laboratório Biotec-Parnaíba, e ao Marcus Vinicius e Davi Alvarenga.

Agradeço à todos os meus amigos de mestrado, que juntos superamos os desafios das disciplinas e as dificuldades da pós-graduação. Em especial minhas amigas Julienne, Leudimar, e meu amigo Patrick. E aos demais amigos de escola, trabalho, infância e da vida que sentem orgulho e torcem por minhas vitórias.

*“We must be willing to let go of the life we  
have planned, so as to have the life that is  
waiting for us.”*

***Joseph Campbell***

*“Precisamos estar dispostos a deixar ir a  
vida que planejamos, para podermos viver a  
vida que nos espera.”*

***Joseph Campbell***

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
<b>CAPÍTULO 1: ESTUDO PROSPECTIVO</b> .....	24
Resumo .....	26
Abstract .....	27
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	32
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	33
3.1 Patentes .....	33
3.2 Artigos .....	37
3.2.1 Evolução Anual .....	38
3.2.2 Distribuição Mundial .....	39
3.2.3 Discussão dos Artigos .....	40
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48



<b>CAPÍTULO 2: ESTUDO DE TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....</b>	<b>55</b>
Resumo .....	57
Abstract .....	58
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>2 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>64</b>
2.1 Materiais .....	64
2.2 Caracterização dos biopolímeros .....	64
2.3 Avaliação da interação DNA com Celulose e Mesocarpo .....	65
2.4 Estudo de citotoxicidade das estruturas de DNA-Celulose e DNA-Mesocarpo em células <i>E. coli</i> .....	66
2.5 Preparo das células competentes .....	66
2.6 Transformação das células competentes .....	67
2.7 Eficiência de transformação .....	68
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>69</b>
3.1 Caracterizações dos Materiais .....	69
3.2 Difração de raios-X .....	70

3.3 Análise estrutural dos materiais .....	72
3.4 Análises termogravimétricas .....	74
3.5 Avaliação da interação entre DNA com celulose e mesocarpo .....	76
3.6 Análise DLS das estruturas de DNA-celulose e DNA-mesocarpo .....	78
3.7 Estudo de citotoxicidade .....	78
3.8 Transformação genética bacteriana .....	80
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>5 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>92</b>
ANEXO 1 – Trabalhos gerados a partir dessa dissertação .....	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica</b> .....	24
<b>Figura 1:</b> Evolução anual de número de artigos publicados. ....	38
<b>Figura 2:</b> Países que mais publicaram artigos entre 2006 e 2017. ....	39
<b>CAPÍTULO 2: Estudo de Transformação Bacteriana</b> .....	55
<b>Figura 1.</b> Difratoograma de raios-X da celulose (C0). ....	71
<b>Figura 2.</b> Difratoograma de raios-X do mesocarpo de babaçu ( <i>Orbignya phalerata</i> Mart.). ....	72
<b>Figura 3.</b> Espectros de FTIR da celulose – C0. ....	73
<b>Figura 4.</b> Espectros de FTIR do mesocarpo de babaçu – M0. ....	74
<b>Figura 5.</b> Curva termogravimétrica e derivada da celulose microcristalina (C0). ....	75
<b>Figura 6.</b> Curva termogravimétrica e derivada do mesocarpo de babaçu (M0). ....	75
<b>Figura 7.</b> Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o padrão de migração do DNA sozinho e do DNA em solução com a celulose (C0) e mesocarpo (M0). ....	77
<b>Figura 8.</b> Resultados das análises de espalhamento de luz dinâmica (DLS) realizado com as amostras: DNA, DNA + C0 – estruturas de DNA com celulose, DNA + M0 – estruturas de mesocarpo com DNA. ....	78
<b>Figura 9.</b> Resultados obtidos a partir de leituras da DO <sub>600</sub> no ensaio de citotoxicidade dos materiais: celulose (C0) e mesocarpo (M0), em diferentes concentrações, sob o crescimento de bactérias <i>E. coli</i> Top 10 F' após 3 e 6 h de incubação, (a) e (b) respectivamente. ....	79
<b>Figura 10.</b> Imagens ópticas obtidas no ensaio de citotoxicidade dos materiais: celulose (C0) e mesocarpo (M0), em diferentes concentrações, sob o crescimento de bactérias <i>E. coli</i> Top 10 F' após 24 h de incubação. ....	80

<b>Figura 11.</b> Imagem óptica de células de <i>E. coli</i> transformadas, mostrando o efeito de diferentes concentrações dos materiais: 0 (controle), 0,015, 0,025, 0,050 e 0,1 mg/mL de celulose (C0) e mesocarpo (M0). .....	81
<b>Figura 12.</b> Unidade Formadora de Colônias transformadas no ensaio de transformação com diferentes concentrações dos materiais: celulose (C0) e mesocarpo (M0) (0 - 0,1 mg/mL) mantendo a quantidade de DNA constante (8ng/ µL). .....	82
<b>Figura 13.</b> Imagem óptica de células de <i>E. coli</i> transformadas usando concentrações crescentes (0,8 - 8 ng) de DNA plasmidial na ausência e presença dos materiais (C0 - celulose e M0 – mesocarpo) em concentração constante de 0,050 mg/mL. ....	83
<b>Figura 14.</b> Número de colônias transformadas após transformação bacteriana variando as quantidades de DNA (0,8 - 8 ng) e mantendo as concentrações dos materiais constantes (0,050 mg/mL de celulose – C0 e mesocarpo – M0). ....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 1:</b> Total de patentes depositadas nas bases EPO, USPTO e INPI entre 2006 e 2017. ....	33
<b>Tabela 2:</b> Quantidade de artigos publicados nas bases de dados <i>Scopus</i> , <i>Web of Science</i> e <i>Scielo</i> por intervalo de tempo. ....	37
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros avaliativos utilizados nos artigos da prospecção referentes ao processo de transfecção gênica. ....	40
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros avaliativos utilizados nos artigos da prospecção referentes ao processo de transformação bacteriana. ....	45
<b>CAPÍTULO 2: Estudo de Transformação Bacteriana .....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 1.</b> Resultados das análises elementar e de potencial zeta das amostras de celulose e mesocarpo de babaçu. ....	69
<b>Tabela 2.</b> Resultados do teste de solubilidade dos materiais. ....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

µg - Micrograma

C & T – Ciência e Tecnologia

C - Carbono

C0 – Celulose pura

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

H- Hidrogênio

O - Oxigênio

CHPTAC – (3-cloro-2-hidroxiopropil) - trimetilamonio

cm<sup>-1</sup> – Centímetros a menos 1

N - Nitrogênio

DLS - Dispersão de Luz Dinâmica

DMSO - Sulfóxido de dimetilo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO<sub>600</sub> – Densidade óptica

DRX – Difração de Raios-X

DTG - Termogravimétrica diferencial

*E. coli* - *Escherichia coli*

*E. coli* TOP 10 F' – Linhagem bacteriana

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EPO - Instituto Europeu de Patentes

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

H<sub>2</sub>O – Fórmula química da água

ID - Identificador

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Kb - Marcador de peso molecular = 1000 pares de bases

kv - Quilovolt

L - Litro

LB - Meio Luria-Bertani

m/m – Massa/Massa

M0 – Mesocarpo de babaçu puro

mA - Miliampère

mg - Miligrama

Mg<sup>2+</sup> - Magnésio

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio

min - Minuto

mL - Mililitro

mM - Milimolar

mol - Molaridade

N – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

ng - Nanogramas

nm - Nanómetros

pb – pares de bases



PEG - Polietileno glicol

PEI - Polietilenimina

pGEM - Plasmídeo

pH - Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotação por minuto

TG - Termogravimétrica

UFC – Unidade Formadora de Colônia

USPTO - Escritório de Marcas e Patentes dos Estados Unidos

V - Voltagem

$\beta$  - Beta

$\zeta$  – Potencial zeta

$\theta$  - Teta

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\varepsilon$  - Épsilon

## RESUMO

Um dos principais desafios da terapia gênica é o desenvolvimento de vetores transportadores de genes seguros e eficazes. Devido às limitações associadas ao uso de vetores virais tais como carcinogênese, imunogenicidade, capacidade limitada de empacotamento de DNA e dificuldade de síntese vetorial, muitos estudos têm se concentrado no uso de carreadores de genes biocompatíveis e biodegradáveis. Dessa forma, nesse estudo investigou-se e comparou-se o efeito de celulose e mesocarpo de babaçu puros como complementos plasmidial em ensaios de transformação bacteriana de células *E. coli* afim de verificar os efeitos desses materiais na eficiência de transferência de genes. O capítulo 1 apresenta um estudo de prospecção de patentes e artigos científicos acerca do uso de diferentes materiais como vetores não virais para o transporte e inserção de genes em células de organismos eucariontes, pelo processo de transformação gênica, e células procariontes, através do processo de transformação bacteriana. O capítulo 2 descreve o estudo realizado com celulose e mesocarpo de babaçu usados como complementos de DNA plasmidial no processo de transformação bacteriana de células de *E. coli*.

## ABSTRACT

One of the major challenges of gene therapy is the development of safe and effective gene carrier vectors. Due to the limitations associated with the use of viral vectors such as carcinogenesis, immunogenicity, limited DNA packaging capacity and difficulty of vector synthesis, many studies have focused on the use of biocompatible and biodegradable genes carriers. In this study, we investigated and compared the effect of pure cellulose and babassu mesocarp as plasmid complement in bacterial transformation assays of *E. coli* cells in order to verify the effects of these materials on the gene transfer efficiency. Chapter 1 presents a prospective study of patents and scientific articles about the use of different polymeric materials as non-viral vectors for the transport and insertion of genes into cells of eukaryotic organisms, through the process of gene transformation, and prokaryotes cells, through the process of bacterial transformation. Chapter 2 describes the transformation study carried out with pure cellulose and babassu mesocarp used as plasmid DNA complements in the bacterial transformation process of *E. coli*.

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios da terapia gênica é o desenvolvimento de vetores transportadores de genes seguros e eficazes. Em ensaios clínicos de transferência gênica são usados vetores virais e vetores não virais (Kay, 2011; Mingozzi & High, 2011). Dentre esses, os vírus ainda são os vetores mais utilizados nessa técnica, em aproximadamente 70% dos casos (Yin et al., 2014). Embora avanços significativos no campo da engenharia genética tenham sido alcançados, várias limitações ainda estão associadas ao uso de vetores virais, incluindo a carcinogênese (Baum et al., 2006), imunogenicidade (Bessis et al., 2004), capacidade limitada de empacotamento de DNA (Thomas et al., 2003) e dificuldade de produção vetorial (Bouard et al., 2009).

Devido essas limitações, a busca por vetores não virais intensificou-se para que vetores alternativos fossem desenvolvidos com potencial de superar muitas dessas limitações, principalmente no que diz respeito a segurança e a eficiência de transferência de genes (Yin et al., 2014). Vetores sintéticos apresentam como principais vantagens: menores taxas de imunogenicidade, potencial de fornecer maiores cargas genéticas e facilidade de serem sintetizados (Pack et al., 2005; Mintzer & Simanek, 2009).

Muitos estudos têm se concentrado no uso de nanocarreadores de genes biocompatíveis e biodegradáveis. Dentre os principais materiais utilizados como vetores não virais, incluem lipídios, como lipossomas e micelas, transportadores baseados em polímeros, tais como quitosana, lisina, ácido poliglutâmico, dextrano, xantano, pululano, policaprolactona, ácido hialurônico e alginato (Mokhtarzadeh et al., 2017).

A transferência de genes pode acontecer tanto em células eucariontes como em células procariontes, processos conhecidos como transfecção e transformação, respectivamente. A transformação bacteriana é um processo que envolve dois componentes: DNA exógeno e uma célula receptora (Johnston et al., 2014). A internalização do DNA exógeno e a integração no genoma do receptor por recombinação homóloga permite que as bactérias adquiram novas características genéticas e se adaptem às mudanças das condições ambientais, promovendo, por exemplo, resistência aos antibióticos (Croucher et al., 2011).

Dessa forma, nesse estudo investigou-se e comparou-se o efeito de celulose e mesocarpo de babaçu puros em ensaios de transformação bacteriana de células *E. coli* afim de verificar os efeitos desses materiais na eficiência de transferência de genes, visando a obtenção de complementos vetoriais carregadores de material genético.

O capítulo 1 apresenta um estudo de prospecção de patentes e artigos científicos acerca do uso de diferentes materiais como complementos vetoriais não virais para o transporte e inserção de genes em células de organismos eucariontes, pelo processo de transformação gênica, e procariontes, através do processo de transformação bacteriana.

O capítulo 2 descreve o estudo realizado com os biopolímeros celulose e mesocarpo de babaçu puros usados como complementos de transferência de DNA plasmidial no processo de transformação bacteriana de células de *E. coli*.

## REFERÊNCIAS

BAUM, C.; KUSTIKOVA, O.; MODLICH, U.; LI, Z.; FEHSE, B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. **Hum. Gene Ther.** 17, 253–263, 2006.

BESSIS, N.; GARCIACOZAR, F. J.; BOISSIER, M. C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. **Gene Ther.** 11 (Suppl. 1), S10–S17, 2004.

BOUARD, D.; ALAZARD-DANY, D.; COSSET, F. L. Viral vectors: from virology to transgene expression. **Br. J. Pharmacol.** 157, 153–165, 2009.

CROUCHER, N. J.; HARRIS, S. R.; FRASER, C.; QUAIL, M. A.; BURTON, J.; LINDEN, M.; MCGEE, L.; GOTTBORG, A.; SONG, J. H.; KO, K. S.; PICHON, B.; BAKER, S.; PARRY, C. M.; LAMBERTSEN, L. M.; SHAHINAS, D.; PILLAI, D. R.; MITCHELL, T. J.; DOUGAN, G.; TOMASZ, A.; KLUGMAN, K. P.; PARKHILL, J.; HANAGE, W. P.; BENTLEY, S. D. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. **Science**, 331, 430–434, 2011.

JOHNSTON, C.; MARTIN, B.; FICHANT, G.; POLARD, P.; CLAVERY, J-P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. **Nature Rev. Microbiology.** 12, p. 16, 2014.

KAY, M. A. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. **Nature Rev. Genet.** 12, 316–328, 2011.

MINGOZZI, F.; HIGH, K. A. Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. **Nature Rev. Genet.** 12, 341–355, 2011.

MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. **Chem. Rev.** 109, 259–302, 2009.

MOKHTARZADEH, A.; ALIBAKHSHI, A.; HASHEMI, M.; HEJAZI, M.; HOSSEINI, V.; GUARDIA, M.; RAMEZANI, M. Biodegradable nano-polymers as delivery vehicles for therapeutic small non-coding ribonucleic acids. **Journal of Controlled Release** 245, 116–126, 2017.

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

THOMAS, C. E.; EHRHARDT, A.; KAY, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nature Rev. Genet.** 4, 346–358, 2003.

YIN, H.; KANASTY, R. L.; ELTOUKHY, A. A.; VEGAS, A. J.; J. DORKIN, J. R.; ANDERSON, D. G. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Rev. Genet.** 15, P. 15, 2014.

**CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA (Artigo I):**  
**O USO DE BIOPOLÍMEROS COMO VETORES NÃO-VIRAIS DE TRANSPORTE DE**  
**GENES: UM ESTUDO PROSPECTIVO**

---



**O USO DE BIOPOLÍMEROS COMO VETORES NÃO-VIRAIS DE TRANSPORTE DE  
GENES: UM ESTUDO PROSPECTIVO**

*Jailson de Araújo Santos<sup>1\*</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>1</sup>, Daniel Barbosa Liarte<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais – CT-UFPI, Teresina, Piauí.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia – CCN-UFPI, Teresina, Piauí.

## RESUMO

A transformação bacteriana e transfecção gênica podem ser entendidos como sendo resultados da introdução de material genético específico em células de interesse e a subsequente expressão gênica, adicionando à célula hospedeira um novo traço genético. Muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de investigar diferentes tipos de lipídeos e polímeros catiônicos como vetores não-virais promissores para a transferência de DNA. O presente estudo teve a finalidade de apresentar uma revisão bibliográfica e tecnológica acerca da utilização de materiais biopoliméricos nos processos de transformação bacteriana e transfecção gênica publicados e/ou depositados no intervalo de 2006 a 2017. A prospecção, realizada em julho de 2018, foi baseada em uma ampla pesquisa eletrônica em diferentes bancos de patentes (EPO, USPTO e INPI) e de periódicos (*Scopus*, *Web of Science* e *Scielo*). Os resultados demonstraram que existem patentes depositadas referentes ao uso de quitosana para transporte de genes. A análise dos artigos permitiu inferir que o uso de biopolímeros no processo de transformação bacteriana ou transfecção gênica é limitado uma vez que não foi encontrada uma alta diversidade de biopolímeros usados para essas finalidades. Além disso, observou-se que o princípio da utilização de diferentes materiais no processo de transfecção consiste na modificação da estrutura química do material, principalmente pela adição de grupos catiônicos. Já para o processo de transformação bacteriana, os materiais utilizados não necessitam serem quimicamente modificados. Dessa forma, concluiu-se que o uso de biopolímeros como complementos vetoriais não virais ainda é limitado, o que indicou a necessidade da realização de mais estudos envolvendo o uso de diferentes biopolímeros.

**Palavras-chave:** Clonagem. Vetor não-viral. Carregadores de Genes.

## ABSTRACT

Bacterial transformation and gene transfection can be understood as being the results of introducing specific genetic material into cells, resulting in gene expression and adding a new genetic trait to the host cell. Many studies have been carried out with the aim of investigating different types of lipids and cationic polymers as promising non-viral vectors for DNA transfer. The present study aimed to present a bibliographical and technological review about the use of bipolimeric materials in the processes of bacterial transformation and gene transfection from articles and patents published and/or deposited from 2006 to 2017. The survey, conducted in May 2018, consisted on extensive electronic researches in different patent bases (EPO, USPTO and INPI) and periodicals bases (Scopus, Web of Science and Scielo). The results showed that there are deposits of patents regarding the use of chitosan as gene carrier. The articles analysis allowed to infer that the use of biopolymers for bacterial transformation or gene transfection is limited due to the low diversity of biopolymers used for these purposes. In addition, it was observed that the use of different materials as non-viral vectors is based on chemical structure modifications of the material, mainly by the addition of cationic groups. On the other hand, in the bacterial transformation, the materials used as plasmid complements did not need to be chemical modified. Thus, the use of biopolymers as non-viral vectors is still limited to only a few polysaccharide types, which highlights the need for further studies involving the use of different biopolymers in the processes of gene transfer in bacterial and eukaryotic cells.

**Keywords:** Cloning. Non-viral vector. Genes Carriers.

## 1. INTRODUÇÃO:

A entrega de genes em células específicas é uma técnica promissora que inclui a introdução *in vitro* e *in vivo* de genes em células-alvo para fins experimentais (clonagem) e terapêuticos (terapia gênica). Para que os objetivos da terapia gênica sejam alcançados é necessário que a entrega de genes seja realizada de forma simples e eficiente (Yu et al., 2017).

A terapia gênica pode ser definida como o processo de tratamento de doenças humanas, inatas ou adquiridas, pela transferência de material genético para células específicas do paciente que resultará na produção de agentes bioativos ou a regulação de funções anormais da célula (Kim et al., 2007). Os avanços na biologia molecular e na biotecnologia, bem como a conclusão do Projeto Genoma Humano, levaram à identificação de numerosos genes causadores de doenças. Os resultados do tratamento de muitas dessas doenças foram obtidos a partir da terapia gênica (Singh et al., 2010) que proporciona, dentre outros: o aumento a síntese de proteínas, a alteração da expressão de genes existentes ou produção de proteínas citotóxicas ou enzimas ativadoras de pró-fármacos - por exemplo, para destruir células tumorais ou inibir a proliferação de células endoteliais (Pack et al., 2005).

O principal fator limitante da terapia gênica é a taxa de transfecção de genes, ou seja, a dificuldade de inserir novos genes nas células de organismos intactos, de tal forma que essas moléculas sejam incorporadas pelas células e possam desempenhar suas funções de forma eficiente (Mansouri et al., 2004). O DNA a ser transferido deve escapar aos processos que interferem na disposição de macromoléculas. Esses processos incluem a interação com componentes sanguíneos, células endoteliais vasculares e absorção pelo sistema reticuloendotelial. Além disso, a degradação

do DNA por nucleases é também um obstáculo potencial para a entrega do gene à célula alvo (Kim et al., 2007).

Os dois principais tipos de vetores que são utilizados na terapia gênica são baseados em sistemas de administração de genes virais ou não virais (Yu et al., 2017). O sistema de entrega de genes por vetores virais é o mais usado devido a atividade natural dos vírus de transportar eficientemente seu genoma de uma célula hospedeira para outra, entrar na nova célula-alvo, navegar até o núcleo da célula e iniciar a expressão de seu genoma. Entretanto, o uso de vírus na terapia gênica poderia ser limitado por vários fatores, tais como: o fato de apenas pequenas sequências de DNA poderem ser inseridas no genoma do vírus, o que limita a aplicação em larga escala, e potenciais problemas para os pacientes, tais como toxicidade, respostas imunes e respostas inflamatórias (Lim et al., 2006). As limitações dos vetores virais, particularmente no que diz respeito à segurança, levaram à avaliação e desenvolvimento de vetores alternativos baseados em sistemas de entrega não virais. (Mansouri et al., 2004)

De forma natural, a transformação genética de bactérias pode ocorrer através dos processos de recombinação homóloga de DNA livre, transdução e conjugação. Contudo, estes processos naturais apresentam como desvantagens: à difusão lenta de entrada de DNA hidrofílico através da membrana de bicamada lipídica hidrofóbica e à ligeira repulsão eletrostática entre o DNA aniônico e os grupos aniônicos da membrana de bicamada lipídica. Além disso, o DNA pode sofrer hidrólise ou ser degradado por qualquer processo enzimático durante o seu curso de transformação (Cehovin et al., 2013; Soni et al., 2015).

O processo de transfecção gênica introduz genes específicos em células eucariontes, principalmente células de mamíferos e humanas. Já a transformação bacteriana tem a finalidade de modificar geneticamente células procariontes de bactérias. De um modo geral, as duas

perspectivas têm em comum a necessidade de inserção da informação modificada ou corrigida nas células do organismo a ser transformado (Pack et al., 2005; Kaestner et al., 2015).

Para uma transferência eficiente do gene de interesse ao interior da célula é necessário a utilização de veículos adequados de transferência que protejam o DNA contra as barreiras celulares em seu caminho até o núcleo. Os vetores de clonagem são a principal ferramenta utilizada para a incorporação *in vitro* do gene de interesse ao interior das células vivas (Fayazpour et al., 2006; Calvete et al., 2015).

Os vetores não-virais de transporte de genes têm atraído bastante atenção por apresentarem vantagens como a facilidade de síntese, baixa resposta imune, capacidade de transferência de materiais genéticos com tamanhos irrestritos e segurança (Remaut et al., 2007). Dentre os principais vetores não virais destacam-se lipossomas, complexos de DNA com polímeros catiônicos e nanopartículas (Mao et al., 2009).

Sistemas não virais de polímeros catiônicos, cuja estrutura molecular contém vários grupos amina, têm sido amplamente utilizados como veículos transportadores de genes (Li & Huang, 2000). Esses vetores proporcionam uma capacidade ilimitada de complexação com o DNA, propriedades físico-químicas bem definidas e uma alta diversidade molecular que permite diferentes modificações estruturais que visam superar os obstáculos extra e intracelulares de carregamento de genes (Jeong et al., 2007).

Alguns requisitos são necessários para que um transportador polimérico seja eficiente na função de transporte de genes, por exemplo: o vetor deve apresentar estabilidade na formação do complexo com os plasmídeos, superar a ação dos agentes de defesa do hospedeiro e apresentar especificidade na liberação do material genético terapêutico para a célula-alvo desejada, através do reconhecimento superficial da célula (Mao et al., 2009).

Os polissacarídeos são moléculas longas de carboidratos formadas por unidades repetidas de monossacarídeos unidas por ligações glicosídicas. Eles são um dos principais constituintes do glicocálix e das matrizes extracelulares e possuem funções estruturais e de armazenamento (Nitta & Numata, 2013). As principais características dos polissacarídeos incluem a estabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, as quais influem no uso dos polissacarídeos e seus derivados para aplicações nas tecnologias de alimentos, campos biomédicos e ambientais (Schmitt et al., 1998; Aider, 2010). A presença de vários grupos deriváveis nas cadeias moleculares dos polissacarídeos permite que esses polímeros sejam facilmente modificados quimicamente e bioquimicamente. A maioria dos polissacarídeos naturais possui grupos hidrofílicos como os grupos hidroxila, carboxila e amino, que também afetam as cargas poliméricas e permitem que a reatividade dessas moléculas seja alta, ampliando assim a gama de aplicação de polissacarídeos em diversos estudos, incluindo o de transporte de genes (Nitta & Numata, 2013).

Dessa forma, o presente estudo teve a finalidade de apresentar uma revisão bibliográfica e tecnológica acerca da utilização de diferentes materiais como complementos vetoriais nos processos de transformação bacteriana e transfecção gênica publicados e/ou depositados no intervalo de 2006 a 2017.

## 2. METODOLOGIA

A prospecção nesse estudo, realizada em julho de 2018, foi baseada em uma ampla pesquisa eletrônica em diferentes bancos de patentes e de periódicos.

A prospecção de patentes foi realizada nas bases de busca gratuitas online: Banco Europeu de Patente - European Patent Office (EPO), Banco Americano de Marcas e Patentes - United States Patent and Trademark Office (USPTO) e Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) no Brasil. A busca das patentes foi realizada utilizando as palavras-chave: *biopolymer*, *polysaccharide*, *carbohydrate*, *transfection*, *bacterial transformation*, *gene delivery*, *non-viral vector*, as quais foram usadas separadamente e em diferentes combinações. Para especificar a busca nos bancos de base, as palavras foram procuradas compreendendo o “Título”, no intervalo de tempo de 2006 a 2017.

A prospecção dos artigos foi realizada nas bases de periódicos: *Scopus*, *Web of Science* e *Scielo*. A pesquisa foi executada utilizando as mesmas palavras-chave, compreendendo apenas “Título”, no mesmo intervalo de tempo e exclusivamente publicações de artigos regulares. Os artigos de revisão e os capítulos de livros foram excluídos.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Patentes

A análise dos depósitos de patentes por base revelou que a EPO, em comparação com as bases USPTO e INPI, foi a base que mais recebeu depósitos relacionados com o assunto estudado no intervalo de tempo investigado. As palavras-chave utilizadas na pesquisa foram distintas e os resultados encontrados são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Total de patentes depositadas nas bases EPO, USPTO e INPI entre 2006 e 2017.

Palavras-chave	EPO	USPTO	INPI
<i>polysaccharide</i>	8.056	391	123
<i>carbohydrate</i>	2.554	265	84
<i>biopolymer</i>	1.144	171	40
<i>gene delivery</i>	697	83	3
<i>non-viral vector</i>	36	0	1
<i>transfection</i>	885	122	27
<i>bacterial transformation</i>	19	0	5
<i>polysaccharide and gene delivery</i>	2	0	0
<i>polysaccharide and non-viral vector</i>	1	0	0
<i>polysaccharide and transfection</i>	1	0	0
<i>polysaccharide and bacterial transformation</i>	0	0	0
<i>carbohydrate and gene delivery</i>	0	0	0
<i>carbohydrate and non-viral vector</i>	0	0	0
<i>carbohydrate and transfection</i>	0	0	0
<i>carbohydrate and bacterial transformation</i>	0	0	0
<i>biopolymer and gene delivery</i>	0	0	0
<i>biopolymer and non-viral vector</i>	0	0	0
<i>biopolymer and transfection</i>	0	0	0
<i>biopolymer and bacterial transformation</i>	0	0	0
<i>polysaccharide and gene delivery and non-viral vector</i>	0	0	0
<i>carbohydrate and gene delivery and non-viral vector</i>	0	0	0
<i>biopolymer and gene delivery and non-viral vector</i>	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>13.395</b>	<b>1.032</b>	<b>283</b>

A partir da Tabela 1, observou-se que utilizando as palavras mais gerais: *polysaccharide*, *carbohydrate* e *biopolymer*, foi encontrado um grande número de depósitos nas três bases pesquisadas, sendo o maior número de patentes depositadas contendo a palavra *polysaccharide*. A medida que novas palavras foram acrescentadas, a quantidade de depósitos foi diminuindo consideravelmente. Isso ocorre por que as patentes que continham essas palavras em seus títulos tinham as mais diversas finalidades e com o direcionamento da pesquisa os depósitos tornam-se limitados.

Para os termos *gene delivery* e *non-viral vector* foram encontrados registros de patentes depositadas nas três bases, para o primeiro termo, e nas bases EPO e INPI, para o segundo termo. Dentre as patentes encontradas, a maioria continha o termo *gene delivery* nos títulos, o qual é um termo que abrange diferentes tipos de estudos.

Em relação aos processos de inserção de material genético em células, verificou-se que o termo *transfection* possui um maior registro de patentes depositadas comparado ao processo de transformação, quando pesquisado o termo *bacterial transformation*.

Observou-se que quando as palavras-chave foram usadas combinadas entre si, não foram encontrados resultados em nenhuma das bases de busca, com exceção para os termos *polysaccharide and gene delivery* (2 depósitos), *polysaccharide and non-viral vector* (1 depósito) e *polysaccharide and transfection* (1 depósito).

Os resultados da busca das patentes demonstraram que existem patentes depositadas referentes ao uso de biopolímeros naturais como complementos de vetor não-viral para transporte de genes. Observou-se um maior número de registros relacionados ao processo de transferência de genes para células eucariontes. Além disso, verificou-se que o principal biopolímero utilizado com a finalidade de transporte de genes é a quitosana.

As patentes Chinesas de Shubiao et al. (2014) e Xiaoli et al. (2013) apresentam duas invenções que proporcionam métodos para a preparação de complementos vetoriais de genes não-viral a base de polietilenoimina conjugada com quitosana. Os vetores mostraram boa biocompatibilidade e alta eficiência de transfecção de genes, sendo excelentes complementos de transfecção de genes e com perspectivas de uma vasta gama de aplicações.

Outra patente Chinesa referente a um transportador de genes à base de quitosana foi depositada por Zhang et al. (2016). O vetor consiste em um polímero resultado da combinação de polietilenoimina e polietilenoglicol com quitosana macromolecular (SRCS) de modo a obter um polímero SRCS-g-PEI-g-PEG sensível ao pH. O polímero apresentou boa biocompatibilidade e alta eficiência de transfecção de genes.

Além da quitosana, outros materiais também foram testados como possíveis complementos de vetores não virais para o processo de transfecção. A patente de Baumhof & Schlake et al. (2011) refere-se a uma molécula polimérica utilizada como veículo transportador gênico, o qual permite a transfecção eficiente de ácidos nucleicos em células *in vivo* e *in vitro*. E a invenção de Fotin-Mleczek & Baumhof (2009) descreve o uso de complexos de RNA com peptídeos catiônicos para transfecção e para imunoestimulação.

A invenção tecnológica de Ladeira et al. (2016) descreve um processo de transfecção de células-tronco espermatogoniais de peixes mediado por eletroporação na presença de nanotubos de carbono complexados com DNA. As células de peixe transfectadas por meio desta tecnologia demonstraram uma eficiência de expressão do gene de interesse em níveis superiores quando comparado a reagentes comerciais à base de lipídeos catiônicos, ao controle do ensaio de transfecção realizado com o nanocomplexo sem complemento de eletroporação e com os

resultados obtidos na transfecção mediada por eletroporação. Além disso o nanocomplexo induziu níveis relativamente baixos de morte celular.

O depósito de Baranauskas et al. (2015) refere-se ao processo de fabricação de nanotubos de paredes simples e/ou múltiplas de nanofibras por deposição química de vapores. Esses nanotubos foram funcionalizados com copolímero em tribloco poli(óxido de etileno)-poli(óxido de 10 propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) como facilitadores do processo de transfecção celular.

Kramps et al. (2016) descrevem uma invenção referente a um complexo de carregamento de veículo polimérico, que compreende componentes catiônicos reticulados com dissulfeto como um veículo polimérico, não tóxico e não imunogênico. O complexo de carregamento permite tanto a transfecção eficiente de ácidos nucleicos para dentro das células *in vivo* quanto *in vitro* e/ou a indução de uma resposta imunológica (inata e/ou adaptiva), dependendo do ácido nucleico que será transportado.

Jeu (2017) depositou uma invenção que se refere ao uso de peptídeos para a formação de complexos de transfecção e a liberação de uma carga de DNA para o interior de uma célula em cultura, célula de um animal ou de um ser humano.

Em relação ao uso de diferentes vetores não-virais para a transformação bacteriana, a invenção de Sousa et al. (2014) descreve um processo de obtenção de nanotubos de nitreto de boro (BNNT) e um processo para transformação bacteriana por choque térmico, de linhagens competentes de *Escherichia coli* utilizando nanopartículas de nitreto de boro como sistema de entrega de plasmídeos.

### 3.2 Artigos

Na prospecção dos artigos com publicações relacionadas ao tema, através do uso das palavras-chave isoladas ou em combinação, determinou-se a base de dados com maior quantidade de artigos publicados na área, os resultados referentes aos artigos publicados estão na Tabela 2.

**Tabela 2:** Quantidade de artigos publicados nas bases de dados *Scopus*, *Web of Science* e *SciELO* por intervalo de tempo.

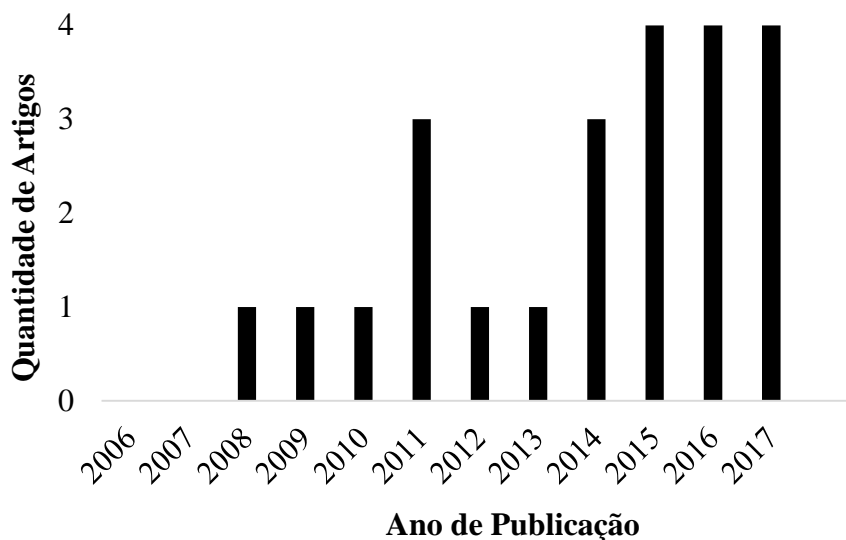
Artigos Publicados entre 2006 - 2017				
Palavras-chave	Base	Scopus	Web of Science	SciELO
	<i>polysaccharide</i>	13.919	11.870	42
	<i>carbohydrate</i>	11.991	10.913	87
	<i>biopolymer</i>	2.394	1.961	9
	<i>gene delivery</i>	4.232	3.938	1
	<i>non-viral vector</i>	207	186	1
	<i>transfection</i>	2.779	2.538	9
	<i>bacterial transformation</i>	130	120	1
	<i>polysaccharide and gene delivery</i>	12	11	0
	<i>polysaccharide and non-viral vector</i>	1	1	0
	<i>polysaccharide and transfection</i>	6	5	0
	<i>polysaccharide and bacterial transformation</i>	1	1	0
	<i>carbohydrate and gene delivery</i>	7	7	0
	<i>carbohydrate and non-viral vector</i>	0	0	0
	<i>carbohydrate and transfection</i>	1	1	0
	<i>carbohydrate and bacterial transformation</i>	0	0	0
	<i>biopolymer and gene delivery</i>	2	1	0
	<i>biopolymer and non-viral vector</i>	0	0	0
	<i>biopolymer and transfection</i>	0	0	0
	<i>biopolymer and bacterial transformation</i>	0	0	0
	<i>polysaccharide and gene delivery and non-viral vector</i>	0	0	0
	<i>carbohydrate and gene delivery and non-viral vector</i>	0	0	0
	<i>biopolymer and gene delivery and non-viral vector</i>	0	0	0
	<b>TOTAL</b>	<b>35.694</b>	<b>31.552</b>	<b>150</b>

A partir da Tabela 2 identificou-se que a base de dados com maior quantidade de artigos publicados na área é o *Scopus*, que apresentou valores superiores de publicação quando comparado com as outras bases analisadas.

Após a prospecção dos artigos, 25 artigos foram selecionados entre todos os artigos que continham em seus títulos as palavras “*gene delivery*”, “*transfection*”, “*bacterial transformation*” e/ou “*non-viral vector*”, os artigos foram escolhidos considerando o material utilizado e o objetivo do estudo. Em seguida, os artigos selecionados foram analisados para verificar (1) Evolução anual, (2) Distribuição mundial e (3) Discussão dos artigos. Uma vez que a prospecção foi realizada em julho de 2018, alguns artigos já publicados em 2018 foram utilizados para a discussão desse estudo.

### 3.2.1 Evolução anual

Fez-se o estudo da evolução anual de publicações no intervalo de 2006 a 2017, como mostra a Figura 1.

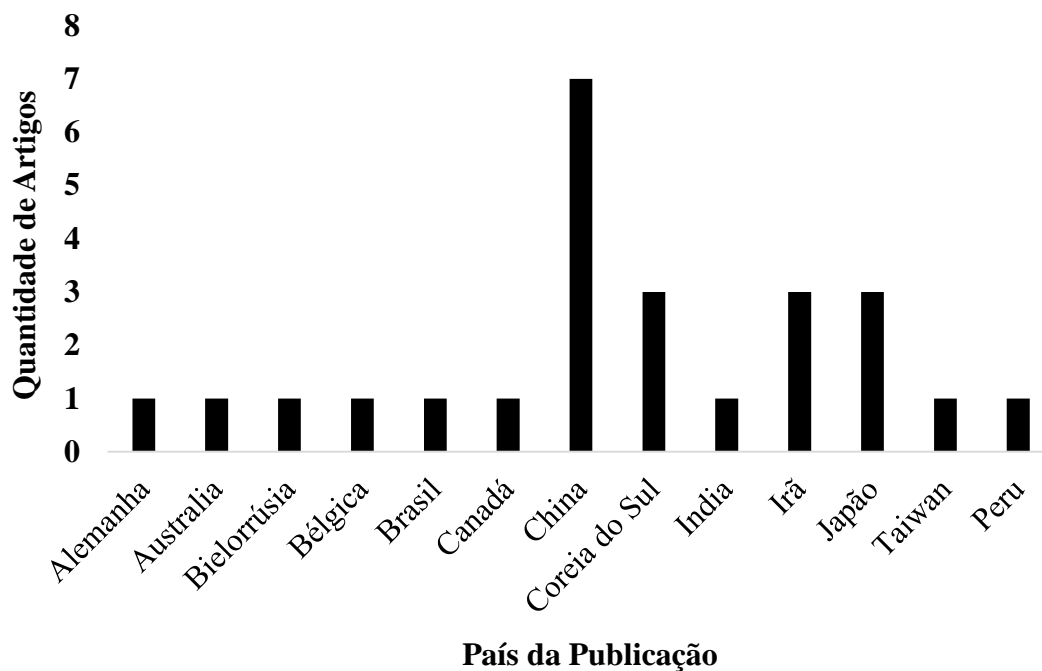


**Figura 1:** Evolução anual de número de artigos publicados.

A partir dos resultados apresentados na Figura 1 é possível observar que a utilização de diferentes materiais como transportadores de genes e como vetores não-virais é uma área nova e que vem sendo crescentemente estudada atualmente, sendo que os anos de 2015, 2016 e 2017 apresentaram as maiores quantidades de publicações sobre o conteúdo.

### 3.2.2 Distribuição mundial

Em relação aos países que mais publicaram artigos sobre o tema nos últimos anos, a Figura 2 apresenta a relação dos países e mostra que China foi o primeiro colocado (7 artigos), seguido do Japão, Irã, e Coreia do Sul (todos com 3 artigos publicados).



**Figura 2:** Países que mais publicaram artigos entre 2006 e 2018.

O resultado obtido em relação aos países que mais publicam sobre o tema, pode ser atribuído ao fato dos quatro países com maior número de publicações serem referências na área de desenvolvimento científico e tecnológico (C&T), pesquisa e educação qualificada (Guimarães, 2004).

### 3.2.3 Discussão dos artigos

Os 25 artigos descrevem o efeito de diferentes materiais usados como complementos de vetores não-virais em diferentes tipos de células nos processos de transfecção gênica e transformação bacteriana, bem como os fatores que influenciam tal processo, como o tipo de material, a citotoxicidade e as porcentagens de aumento da eficiência dos processos de transfecção e transformação.

As Tabelas 3 e 4 apresentam os principais fatores avaliados nos artigos em relação a citotoxicidade e eficiência de diferentes materiais nos processos de transfecção gênica e transformação bacteriana, respectivamente. Alguns parâmetros avaliados nos artigos foram omitidos ou não realizados em alguns dos estudos.

**Tabela 3:** Parâmetros avaliativos utilizados nos artigos da prospecção referentes ao processo de transfecção gênica.

Tipo de Material	Citotoxicidade	Eficiência de Transfecção	Referência
Nanopartículas de Quitosana-Polietilenoimina/DNA	Baixa	Alta	Lu et al., 2014
Polissacarídeo de alga <i>Porphyra yezoensis</i> (PYP).	Baixa	Alta	Yu et al., 2017
Nanopartículas de polietilenoimina pegilada	Baixa	Alta	Ghiamkazemi et al., 2010



conjugadas com folato e galactose		(49% – 93%)	
Hidrogel de dextrano aldeído e ε-poli (L-lisina)	Baixa	Alta (41% - 43%)	Togo et al., 2013
Lipossomas catiônicos modificados com polialilamina	Baixa	Alta	Oskuee et al., 2016
Copolímero biodegradável de ácido poliláctico-polietilenoglicol-poli (L-lisina)	Baixa	Alta (21.64% - 24.22%)	Fu et al., 2011
Crotamina	Baixa	—	Chen et al., 2012
Poli (oligo-D-arginina)	Baixa	Alta	Woo et al., 2015
Scaffolds de poli (ácido láctico-ácido co-glicólico)	—	Alta	Perisic et al., 2017
Polissacarídeo catiônico de dextrano-MMA (éster metil metacrilato) conjugado com o copolímero (2-dietilaminoetil-dextrano-metilmetacrilato)	Baixa	Alta	Eshita et al., 2009
Nanocomplexos de Polietilenoimina/pDNA com ácido hialurônico aniônico	Baixa	Alta	Cho et al., 2016
Fósforo catiônico de quarta geração (P4) contendo dendrímeros	Baixa	Alto (78%)	Shcharbin et al., 2011
Polietilenoimina Monosilada	Baixa	Alta	Hu et al., 2014
Celulose quaternizada	Baixa	Alta (>90%)	Song et al., 2008
Microemulsão água-em-óleo e nanopartículas lipídicas sólidas (Plurol oleique)	Baixa	Média	Karagöz et al., 2018
Nanopartículas de quitosana com siRNA	Baixa (10 a 20%)	Alta (70%)	Ragelle et al., 2014
Oligoquitosana conjugada com albumina de soro	Baixa (20%)	Alta (90%)	Kumari et al., 2018
Polietilenoimina modificada por polilisina	Baixa (10%)	Alta	Sheikh et al., 2017
Nanogel catiônico à base de polissacarídeo	Baixa	Alta	Toita et al., 2011
Dextrano modificado com octa-arginina	Baixa (20%)	Alta	Li et al., 2015

A análise dos artigos escolhidos (Tabela 3) permite identificar que o princípio da utilização de diferentes materiais como vetores não-viral para a transferência de genes em células eucariontes consiste na modificação da estrutura química do material, principalmente a adição de grupos catiônicos.

A polietilenoimina (PEI) é um dos sistemas não-virais de transferência de genes mais bem-sucedidos e eficientes que foram relatados até o momento. Em quatro dos doze artigos analisados (Cho et al., 2016; Lu et al., 2014; Hu et al., 2014; Ghiamkazemi et al., 2010) a PEI foi utilizada como polímero principal que foi modificado e utilizado como vetor de transporte de genes.

Ghiamkazemi et al. (2010) descreveram que a polietilenoimina (PEI) é altamente citotóxica em muitas linhagens celulares devido à sua alta carga superficial, não biodegradabilidade e não biocompatibilidade. Para melhorar a biodegradabilidade da PEI, os autores sintetizaram um copolímero de PEI com polietilenoglicol conjugado com ácido fólico e galactose. O copolímero sintetizado mostrou-se não citotóxico e com alta taxa de transfecção gênica.

Por outro lado, Sheikh et al., (2017) utilizaram um novo transportador gênico não viral baseado em polietilenoimina modificada por polilisina (PEI-PLL) que mediou a entrega do gene VEGF para proteger neurônios dopaminérgicos em cultura de células e em modelos de ratos com doença de Parkinson (DP). A utilização do vetor resultou no aumento da viabilidade celular, aumento no número de células positivas para Tirosina Hidroxilase (TH) e diminuição do apoptose celular.

Lu et al. (2014) utilizaram a quitosana como agente modificador da PEI. Os autores sintetizaram nanopartículas de quitosana com PEI (CP) e testaram a eficiência desse vetor não-viral no processo de transfecção. A eficiência de transfecção das nanopartículas CP/DNA foi

dependente da relação em peso de CP:DNA (m/m). A viabilidade celular média após o tratamento com nanopartículas de CP/DNA foi superior a 90%.

Outros dois artigos selecionados na prospecção investigaram o efeito de quitosana como vetor não viral para a transfecção gênica. Ragelle et al. (2014) desenvolveram nanopartículas à base de quitosana para administração intravenosa de RNA interferente (siRNA) capaz de alcançar alto silenciamento gênico sem citotoxicidade e estabilidade em meios biológicos, incluindo sangue. No estudo, os autores mostraram que tanto a adição de PEG, bem como o uso de quitosana de alto peso molecular, fortaleceram a estrutura das nanopartículas, proporcionando estabilidade e, posteriormente, grandes níveis de silenciamento gênico *in vitro*. Em seu estudo, Kumari et al. (2018) descrevem o potencial da albumina de soro bovino (BSA) conjugada com um oligossacárido natural, oligocitosano (OC), como uma abordagem promissora considerável para um vetor de entrega de genes não viral seguro e eficiente. O biopolímero BSA-OC mostrou a proteção do pDNA da degradação enzimática pela DNase I e apresentou boa estabilidade quando exposto a soro fetal bovino a 50%. Este veículo mostrou a capacidade de transfectar 90% das células e manter 80% da viabilidade celular.

Karagöz et al. (2018) preparam duas formulações: uma microemulsão de água-em-óleo (utilizando Peceol) e nanopartículas lipídicas sólidas (utilizando Plurol oleique) para investigar o efeito desses materiais no processo de transfecção gênica. A citotoxicidade e a eficiência da transfecção das formulações selecionadas foram testadas em células de fibroblastos de ratos de linhagem L929 e observou-se que os complexos demonstraram baixa toxicidade e boa capacidade de transfecção.

Dois tipos especiais de materiais usados como vetores para transferência de genes foram utilizados nos estudos de: Togo et al. (2013), os quais desenvolveram um material de hidrogel

biodegradável composto por 20% m/m de dextrano aldeído e 10% m/m  $\epsilon$ -poli (L-lisina) (ald-dex/PLL); e no estudo de Perisic et al. (2017), os quais testaram scaffolds biodegradáveis de poli (ácido láctico-ácido co-glicólico) (PLGA) clinicamente utilizados como transportadores transitórios para células geneticamente modificadas. Nos dois estudos foram observados uma alta taxa de transfecção gênica com o uso dos materiais.

Toiota et al. (2011) desenvolveram um novo sistema de entrega de genes usando um nanogel catiônico, à base de polissacarídeo composto por um nanogel de cicloamilose catiônica (nanogel C16-catCA) e fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), capaz de hidrolisar os fosfolipídios da membrana celular e assim causar poros facilitando a entrada de material genético na célula. Os autores observaram que o nanogel C16-catCA formou nanopartículas com PLA<sub>2</sub> e pDNA por meio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas que permitiram que o material genético fosse efetivamente internalizado nas células.

Song et al., (2008) analisaram o efeito da celulose quaternizada (CQ) no processo de transfecção gênica em células renais humanas 293T e observaram que os índices de citotoxicidade foram relativamente baixos comparando com o PEI e as taxas de transfecção foram altas. Tanto a citotoxicidade quanto a eficiência de transfecção das nanoestruturas de CQ/DNA aumentaram com o grau de substituição (GS) das CQs.

Yu et al. (2017) desenvolveram um novo transportador gênico não viral a base do polissacarídeo de *Porphyra yezoensis* (PYP), o qual foi obtido a partir dessa espécie de alga. Após modificação do polissacarídeo com etilenodiamina, o PYP cationizado (Ed-PYP) foi combinado com os plasmídeos Asc11, Brn2 e FoxA1 (os quais codificam fatores de transcrição para converter células 3T6 em neurônios) para formar partículas nanométricas esféricas (nanopartículas de Ed-PYP-pABF). Os autores verificaram uma boa atuação do polissacarídeo como vetor de transfecção

e concluíram que um transportador gênico à base do polissacarídeo forneceria uma nova plataforma para a entrega segura e eficiente de genes e, portanto, poderia ser aplicado para a diferenciação neural de fibroblastos, o que poderia possibilitar a regeneração nervosa em aplicações clínicas.

Li et al. (2015) utilizaram um polipeptídeo à base de peptídeos penetrante celular com polissacarídeo para melhorar a estabilidade e a transfecção gênica. A  $\alpha$ -ciclodextrina foi modificada com octa-arginina (CDR), que apresentou excelente capacidade de penetração celular. A molécula de dextrana foi modificada com azobenzeno por ligações ácido imina (Az-I-Dex). O polímero supramolecular CDR/Az-I-Dex complexado com DNA melhorou a estabilidade sob condições fisiológicas e proporcionou viabilidade celular de 80%. Além disso, os políplexos CDR/Az-I-Dex/DNA apresentaram uma eficiência de transfecção 6 a 300 vezes maior do que os políplexos CDR/DNA.

Em relação ao uso de materiais para aumentar a eficiência de transformação bacteriana, a Tabela 4 apresenta a relação dos artigos selecionados sobre o tema.

**Tabela 4:** Parâmetros avaliativos utilizados nos artigos da prospecção referentes ao processo de transformação bacteriana.

Tipo de Material	Citotoxicidade	Eficiência de Transformação	Referência
Nanoestruturas de DNA plasmidial com Líquido Iônico	Baixa	Alta (300-400%)	Soni et al., 2015
Quitosana quaternizada	Alta	Baixa	Kim et al., 2015
Nanopartículas de quitosana com DNA plasmidial	—	Alta	Abyadeh et al., 2017
Nanopartículas de ouro	Baixa	Alta	Kumari et al., 2017

Complexo de n-estearilamina, um lipídio catiônico e DNA plasmidial	—	Alta	Yun et al., 2016
--	---	------	------------------

Dos artigos selecionados, dois tiveram como objetivo estudar o efeito de nanoestruturas de líquido iônico e quitosana quaternizada com DNA plasmidial na eficiência de transformação bacteriana (Soni et al., 2015 e Kim et al., 2015, respectivamente). Soni et al. (2015) observaram um baixo índice de citotoxicidade e alta taxa de eficiência de transformação para o líquido iônico. Já para a quitosana quaternizada, Kim et al. (2015) observaram um efeito inibitório do material em relação ao crescimento bacteriano, com uma alta citotoxicidade e baixa eficiência de transformação.

Kumari et al. (2017) usaram características do efeito Yoshida e propriedades de nanopartículas de ouro para investigar seus efeitos na transformação de células bacterianas competentes e não competentes. Os resultados demonstraram que as nanopartículas de ouro não apresentaram efeito citotóxico e que a eficiência de transformação obtida com as células não competentes foi inferior em relação a eficiência obtida no método convencional utilizando células competentes na transformação de células Gram-positivas e Gram-negativas.

Abyadeh et. al. (2017) prepararam nanopartículas de quitosana com pDNA por métodos de eletropulverização para melhorar o processo de transformação bacteriana de células não competentes. Os resultados mostraram que a eficiência de transformação aumentou com a diminuição do peso molecular, relação nitrogênio e fósforo (N/P) e tamanho das nanopartículas de quitosana e que a viabilidade celular não diminuiu significativamente.

Yun et al. (2016) usaram um complexo de n-estearilamina, um lipídio catiônico, e DNA plasmidial para investigar um método para transformação e expressão de proteínas em *Escherichia*

*coli*. Quando as células de *E. coli* foram tratadas com o complexo plasmídico de lipídico catiônico, as eficiências de transformação foram aproximadamente de  $2-3 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias. Assim, os autores apresentaram um método simples para a transformação de *E. coli*, que não requer a preparação de células competentes. O presente método também encurta os procedimentos para transformação e expressão gênica em *E. coli*.

#### **4. CONCLUSÃO**

Através dos dados apresentados nessa prospecção pode-se concluir que o uso de biopolímeros no processo de transformação bacteriana ou transfecção gênica é recente e limitado, uma vez que, na busca de patentes depositadas ou artigos publicados, não foi encontrada uma alta diversidade de biopolímeros usados para essas finalidades. Portanto, esses resultados apontam a necessidade da realização de novos estudos envolvendo o uso de diferentes biopolímeros nos processos de transferência de genes em células procariontes e eucariontes.

## REFERÊNCIAS

ABYADEH, M.; SADRODDINY, E.; EBRAHIMI, A.; ESMAEILI, F.; LANDI, F. S.; AMANI, A. Electrospayed chitosan nanoparticles: facile and efficient approach for bacterial transformation. **International Nano Letters**, 7, 291–295, 2017.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. **LWT Food Sci. Technol**, v. 43, pp. 837–842, 2010.

BARANAUSKAS, V.; HOLLANDA, L. M.; LANCELLOTTI, M.; CERAGIOLI, H. J.; BORTOLETTO, C. N.; TORRICELLI, A. K.; SHISHIDO, S. M.; ALMEIDA, K. C. D.; FERREIRA, C. V.; ZANIN, H. G. Uso de nanotubos de carbono funcionalizados para transfecção celular. **INPI**, C1 1005774-9 E2, 2015.

BAUMHOF, P. & SCHLAKE, T. Conjugados de peptídeo/ polietilenoglicol ligados a dissulfeto para a transfecção de ácidos nucleicos. **INPI**, BR 112012008142-0 A8, 2011.

CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; SOUZA, C. B. Biotecnologia: Transformação Bacteriana por Método de Choque-Térmico. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, n. 26, jan./mar. 2015.

CEHOVIN A.; SIMPSON, P. J.; MCDOWELL, M. A.; BROWN, D. R.; NOSCHESI, R.; PALLETT, M.; BRADY, J.; BALDWIN, G. S.; LEA, S. M.; MATTHEWS, S. J.; PELICIC, V. Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. **Proc Natl Acad Sci**, v. 110, p. 3065-70, 2013.

CHEN, P.-C.; HAYASHI, M. A. F.; OLIVEIRA, E.B.; KARPEL, R. L. DNA-Interactive Properties of Crotamine, a Cell-Penetrating Polypeptide and a Potential Drug Carrier. **PLoS ONE**, v.7, p. 11, 2012.



CHO, S-H.; NOH, Y.-W.; CHO, M. Y.; LIM, Y. T. An Electrostatically Self-Assembled Ternary Nanocomplex as a Non-Viral Vector for the Delivery of Plasmid DNA into Human Adipose-Derived Stem Cells. **Molecules**, v. 21, p. 572, 2016.

ESHITA, Y.; HIGASHIHARA, J.; ONISHI, M.; MIZUNO, M.; YOSHIDA J.; TAKASAKI, T.; KUBOTA, N.; ONISHI, Y. Mechanism of the Introduction of Exogenous Genes into Cultured Cells Using DEAE-Dextran-MMA Graft Copolymer as a Non-Viral Gene Carrier. **Molecules**, v. 14, p. 2669-2683, 2009.

FAYAZPOUR, F.; LUCAS, B.; ALVAREZ-LORENZO, C.; SANDERS, N. N.; DEMEESTER, J.; SMEDT, S. C. Physicochemical and Transfection Properties of Cationic Hydroxyethylcellulose/DNA Nanoparticles. **Biomacromolecules**, 7, 2856-2862, 2006.

FOTIN-MLECZEK, M. & BAUMHOF, P. Complexos de rna e pepitídeos catiônicos para transfecção e para imunoestimulação. **INPI**, PI 0816405-3 A2, 2009.

FU, C.; SUN, X.; LIU, D.; CHEN, Z.; LU, Z.; ZHANG, N. Biodegradable Tri-Block Copolymer Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine)(PLA-PEG-PLL) as a Non-Viral Vector to Enhance Gene Transfection. **Int. J. Mol**, v. 12, p. 1371-1388, 2011.

GHIAMKAZEMI, S.; AMANZADEH, A.; DINARVAND, R.; RAFIEE-TEHRANI, M.; AMINI, M. Synthesis, and Characterization, and Evaluation of Cellular Effects of the FOL-PEG-g-PEI-GAL Nanoparticles as a Potential Non-Viral Vector for Gene Delivery. **Journal of Nanomaterials**, v. 2010, p.10, 2010.

GUIMARAES, J. A. A pesquisa médica e biomédica no Brasil: comparações com o desempenho científico brasileiro e mundial. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 303-327, 2004.

HU, Y.; XU, B.-H.; XU, J.-J.; SHOU, D.; GAO, J.-Q. Synthesis of Mannosylated Polyethylenimine and Its Potential Application as Cell-Targeting Non-Viral Vector for Gene Therapy. **Polymers**, v. 6, p. 2573-2587, 2014.

JEONG, J.; KIM, S.; PARK, T. Molecular design of functional polymers for gene therapy. **Prog. Polym. Sci.** v. 32, pp. 1239–1274, 2007.

JEU, X. M. D. Peptídeos de penetração na membrana para transfecção melhorada e composições e métodos para usar os mesmos. **INPI**, BR 11 2016 013516 4 A2, 2017.

KAESTNER, L.; SCHOLZ, A.; LIPP, P. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 25, 1171–1176, 2015.

KARAGÖZ, U.; KOTMAKÇI, M.; AKBABA, H.; ÇETINTAŞ, V. B.; KANTARCI, G. Preparation and characterization of non-viral gene delivery systems with pEGFP-C1 Plasmid DNA. **Braz. J. Pharm. Sci.**, 54, 1, 2018.

KIM, C.; SAIDY, N. R. N.; FU, R.; WANG, R. Chitosan Inhibits pBR322-AmpR transformation in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)**, 1-7, 2015.

KIM, T-H.; JIANG, H-L.; JERE, D.; PARL, I-K.; CHO, M-H.; NAH, J-W.; CHOI, Y-J.; AKAIKE, T.; CHO, C-S. Chemical modification of chitosan as a gene carrier *in vitro* and *in vivo*. **Prog. Polym. Sci.** v. 32, pp. 726–753, 2007.

KRAMPS, T.; BAUMHOF, P.; VOSS, S.; KALLEN, K-J. Complexação de ácidos nucleicos com componentes catiônicos reticulados com dissulfeto para transfecção e estimulação imunológica. **INPI**, BR 11 2013 002298 1 A2, 2016.

KUMARI, M.; PANDEY, S.; MISHRA, A.; NAUTIYAL, C. S. Finding a facile way for the bacterial DNA transformation by biosynthesized gold nanoparticles. **FEMS Microbiology Letters**, 364, 2017.

KUMARIA, M.; LIUB, C-H.; WU, W-C. Efficient gene delivery by oligochitosan conjugated serum albumin: Facile synthesis, polyplex stability, and transfection. **Carbohydrate Polymers**, 183, 37–49, 2018.

LADEIRA, L. O.; RESENDE, R. R.; TONELLI, F. M. P.; LACERDA, S. M. S. N.; FRANÇA, L. R. Processo de transfecção de células-tronco espermatozoniais de peixes mediado por eletroporação na presença de nanotubos de carbono funcionalizados complexados com DNA e complexo nanotubo-DNA. **INPI**, BR 102014013939-7 A2, 2016.

LI, S.; HUANG, L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. **Gene Ther.** v. 7, pp. 31–34, 2000.

LI, W.; LIU, Y.; DU, J.; REN, K.; WANG, Y. Cell penetrating peptide-based polyplexes shelled with polysaccharide to improve stability and gene transfection. **Nanoscale**, 7, 8476–8484, 2015.

LIM, M. J.; MIN, S-H.; LEE, J-J.; KIM, I. C.; KIM, J. T.; LEE, D. C.; KIM, N-S.; JEONG, S.; KIM, M. N.; KIM, K. D.; LIM, J-S.; HAN, S. B.; KIM, H. M.; HEO, D. S.; YEOM, Y. L. Targeted therapy of DNA tumor virus-associated cancers using virus-activated transcription factors. **Mol. Ther.** v. 13, pp. 899–909, 2006.

LU, H.; DAI, Y.; LV, L.; ZHAO, H. Chitosan-Graft-Polyethylenimine/DNA Nanoparticles as Novel Non-Viral Gene Delivery Vectors Targeting Osteoarthritis. **PLoS ONE**, v. 9, p. 12, 2014.

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

NITTA, S. K. & NUMATA, K. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. **Int. J. Mol. Sci.** v. 14, pp. 1629-1654, 2013.

OSKUEE, R. K.; MAHMOUDI, A.; GHOLAMI, L. RAHMATKHAH, A.; MALAEKEH-NIKOUEI, B. Cationic Liposomes Modified with Polyallylamine as a Gene Carrier: Preparation, Characterization and Transfection Efficiency Evaluation. **Adv Pharm Bull**, v. 6, p. 515-520, 2016.

PACK, D. W.; HOFFMAN, A. S.; PUN, S.; STAYTON, P. S. Design and development of polymers for gene delivery. **Nature Reviews – Drug Discovery**, v. 4, pp. 581-593, 2005.

PERISIC T, ZHANG Z, FOEHR P, HOPFNER U, KLUTZ K, BURGKART RH.; SLOBODIANSKI, A.; GOELDNER, M.; MACHENS, H. G.; SCHILLING, A. F. Biodegradable poly (lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds as carriers for genetically-modified fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 12, p. 16, 2017.

RAGELLE, H.; RIVA, R.; VANDERMEULEN, G.; NAEYE, B.; POURCELLE, V.; DUFF, C. S. L.; D'HAESE, C.; NYSTEN, B.; BRAECKMANS, K.; SMEDT, S. C.; JÉRÔME, C.; PRÉAT, V. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: Optimizing formulation to increase stability and efficiency. **Journal of Controlled Release**, 176, 54–63, 2014.

REMAUT, K. N. N. GEEST, S. B. G.; K. DEMEESTER, B.J.; SMEDT, S. C. Nucleic acid delivery: where material sciences and bio-sciences meet, **Mater. Sci. Eng. R**, 58, 118, p. 117–161, 2007.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and Technofunctional Properties of Protein-Polysaccharide Complexes: A Review. **Critical Rev. Food Sci. Nutr.** v. 38, pp. 689–753, 1998.

SHCHARBIN, D.; DZMITRUK, V.; SHAKHBAZAU, A.; GONCHAROVA, N.; SEVIARYN, I.; KOSMACHEVA, S.; POTAPNEV, M.; PEDZIWIATR-WERBICKA, E.; BRYSEWSKA, M.; TALABAEV, M.; CHERNOV, A.; KULCHITSKY, V.; CAMINADE, A-M.; MAJORAL, J.-P. Fourth Generation Phosphorus-Containing Dendrimers: Prospective Drug and Gene Delivery Carrier. **Pharmaceutics**, v. 3, p. 458-473, 2011.

SHEIKH, M. A.; MALIK, Y. S.; XING, Z.; GUO, Z.; TIAN, H.; ZHU, X.; CHEN, X. Polylysine-modified polyethylenimine (PEI-PLL) mediated VEGF gene delivery protects dopaminergic neurons in cell culture and in rat models of Parkinson's Disease (PD). **Acta Biomaterialia**, 54, 58–68, 2017.

SHUBIAO, Z.; HUIYING, C.; SHAOHUI, C.; HUA, H. Microenvironment double-response chitosan gene carrier as well as preparation method and application thereof. **EPO**, 2016.

SHUBIAO, Z.; HUIYING, C.; SHAOHUI, C.; YINAN, S. Method for cleanly preparing chitosan grafted polyethylenimine non-viral gene vector. **EPO**, 2014.

SINGH, M.; YADAV, A.; MA, X.; AMOAH, E. Plasmid DNA transformation in *Escherichia coli*: effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of CaCl<sub>2</sub> treated cells. **Int J Biochem Biotechnol.**, v. 6, n. 4, p. 561–568, 2010.

SONG, Y.; SUN, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, J.; ZHANG, L. Homogeneous quaternization of cellulose in NaOH/urea aqueous solutions as gene carriers. **Biomacromolecules**, 9, p. 2259–2264, 2008.

SONI, K. S.; SAMPA SARKAR, S.; MIRZADEH, N.; SELVAKANNAN, P. R.; BHARGAVA, S. K. Self-Assembled Functional Nanostructure of Plasmid DNA with Ionic Liquid [Bmim][PF<sub>6</sub>]: Enhanced Efficiency in Bacterial Gene Transformation. **Langmuir**, v. 31, p. 4722–4732, 2015.

SOUSA, E. M. B.; HOLLANDA, L. M.; LANCELLOTTI, M.; FERREIRA, T. H. Processo de obtenção de nanotubos de nitreto de boro, nanotubos assim obtidos e processo de transformação bacteriana utilizando nanotubos de nitreto de boro. **INPI**, P11104516-7 A2, 2014.

TOGO, Y.; TAKAHASHI, K.; SAITO, K.; KISO, H.; HUANG, B.; TSUKAMOTO, H.; HYON, S.-H.; BESSHO, K. Aldehyded Dextran and ε-Poly (L-lysine) Hydrogel as Nonviral Gene Carrier. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 5, 2013.

TOITA, S.; SAWADA, S-I.; AKIYOSHI, K. Polysaccharide nanogel gene delivery system with endosome-escaping function: Co-delivery of plasmid DNA and phospholipase A<sub>2</sub>. **Journal of Controlled Release**, 155, 54–59, 2011.

WOO, J.; BAE, S-H.; KIM, B.; PARK, J. S.; JUNG, S.; LEE, M.; KIM, Y-H.; CHOI, D. Cardiac Usage of Reducible Poly (oligo-D-arginine) As a Gene Carrier for Vascular Endothelial Growth Factor Expression. **PLoS ONE**, v. 10, p. 11, 2015.

XIAOLI, Z.; WEIJIA, L.; HAOBO, P.; JIANHUI, Y. Preparation method of chitosan grafted polyethyleneimine non-viral transgene vector. **EPO**, 2013.

YU, Q.; CHEN, J.; DENG, W.; CAO, X.; ADU-FRIMPONG, M.; YU, J.; XU, X. Neural differentiation of fibroblasts induced by intracellular codelivery of Ascl1, Brn2 and FoxA1 via a non-viral vector of cationic polysaccharide. **Biomed. Mater.** v. 13, p. 12, 2017.

YUN, C-H.; BAE, C-S.; AHN, T. Transformation of *Escherichia coli* and protein expression using lipoplex mimicry. **Protein Expression and Purification**, 127, 68-72, 2016.

**CAPÍTULO 2 - (Artigo II):**  
**CELULOSE E MESOCARPO DE BABAÇU COMO COMPLEMENTOS VETORIAIS**  
**PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA BACTERIANA**

---

**CELULOSE E MESOCARPO DE BABAÇU COMO COMPLEMENTOS VETORIAIS  
PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA BACTERIANA**

*Jailson de Araújo Santos<sup>1\*</sup>, Ana Maria Murta Santi<sup>3</sup>, Fábio de Oliveira Silva Ribeiro<sup>4</sup>, Silvane Maria Fonseca Murta<sup>3</sup>, Durcilene Alves da Silva<sup>4</sup>, Daniel Barbosa Liarte<sup>2</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Programa de pós-graduação em ciência e engenharia dos materiais - UFPI

<sup>2</sup> Departamento de Biologia - Universidade Federal do Piauí

<sup>3</sup> Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte-MG

<sup>4</sup> Laboratório de biotecnologia - BIOTEC, Campus de Parnaíba - UFPI



## RESUMO

O processo de transformação genética bacteriana é resultado da introdução de material genético específico em células bacterianas e a subsequente expressão gênica. Diferentes lipídios e polímeros catiônicos estão sendo testados como complementos de vetores não-virais promissores para a transferência de DNA, entretanto, relatos sobre o uso de celulose e mesocarpo de babaçu na transformação bacteriana não foram encontrados na literatura. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da celulose e do mesocarpo de babaçu, sem modificações químicas, no processo de transformação de células bacterianas. A caracterização dos materiais foi realizada por meio de análises de DRX, FTIR, análise elementar, potencial zeta, solubilidade, análise térmica, DLS e eletroforese em gel de agarose. Os ensaios de transformação bacteriana foram realizados utilizando o plasmídeo pGEM - T easy e bactérias *E. coli* TOP 10 F<sup>'</sup>. Investigou-se a citotoxicidade dos materiais e o efeito de diferentes concentrações de celulose, mesocarpo de babaçu e DNA plasmidial na eficiência de transformação bacteriana. O estudo apresentou a utilização de celulose e mesocarpo de babaçu como complementos vetoriais não-virais para a transformação do gene pGEM em células bacterianas. Foi determinado que tanto a celulose como o mesocarpo a concentrações de 0,050 mg/mL aumentaram a eficiência de transformação genética bacteriana. Portanto, os biopolímeros sem modificações químicas estruturais prévias forneceram resultados satisfatórios em estudos genéticos envolvendo a transferência de DNA em células bacterianas.

**Palavras-chave:** Celulose. Mesocarpo de babaçu. Clonagem. Transferência Gênica.

## ABSTRACT

The process of genetic transformation in bacteria results from the introduction of specific genetic material into bacteria cells and subsequent gene expression. Different lipids and cationic polymers have been tested as promising non-viral vectors complements to transfer DNA into cells, however, reports about the use of cellulose and babassu mesocarp in the transformation of bacteria were not found in the literature. Thus, this study aimed to evaluate the effect of cellulose and babassu mesocarp, without chemical modifications, in the transformation of bacteria cells. The biopolymers were characterized through X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), elemental analysis, zeta potential, solubility, thermal analysis, Dynamic light scattering (DLS) analysis, and agarose gel electrophoresis. The transformation of bacteria was performed using the plasmid pGEM-T easy and *E. coli* TOP 10 F' bacteria cells. It was investigated the cytotoxicity of the materials and the effect of different concentrations of cellulose, babassu mesocarp and plasmid DNA on the transformation efficiency. The study demonstrated the use of cellulose and babassu mesocarp as non-viral plasmid vectors complements to transformation of the pGEM gene into bacterial cells. It was determined that both cellulose and mesocarp at concentrations of 0.050 mg/mL increased the efficiency of genetic transformation of bacteria. Therefore, the biopolymers without prior structural chemical modifications provided satisfactory results in genetic studies involving the transfer of DNA into bacterial cells.

**Keywords:** Cellulose. Babassu Mesocarp. Cloning. Gene Transfer. Synthetic Vector.

## 1. INTRODUÇÃO:

O processo de transformação genética bacteriana pode ser entendido como sendo o resultado da introdução de material genético específico em células bacterianas e a subsequente expressão gênica, adicionando à célula hospedeira um novo traço genético. Essa tecnologia é uma das principais técnicas na biologia molecular com aplicações significativas na tecnologia de clonagem de genes e permite novas possibilidades ao melhoramento genético de diversas espécies de organismos existentes (Soni et al., 2015).

A transformação bacteriana é um processo essencial e indispensável para estudos na área de biologia molecular e na tecnologia do DNA recombinante. Essa tecnologia pode ser aplicada em diversos estudos da engenharia genética proporcionando estudar os mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação de sequências gênicas de interesse e conseqüentemente das proteínas codificadas, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis tais como a insulina humana (Johnson, 1983; Bristow, 1993), hormônio de crescimento (Flod, 1986), vacinas (Zajac et al., 1986) e enzimas industriais em grandes quantidades (Arbige & Pitcher, 1989).

Em alguns sistemas procariontes, a transformação genética pode ocorrer naturalmente através da recombinação homóloga de DNA livre, abundante em muitos ambientes, que é incorporado ao genoma da bactéria. Além disso, outro processo de transferência gênica em bactérias inclui a transdução, no qual é necessário utilizar um bacteriófago como vetor de transferência; o terceiro processo de transformação ocorre pelo contato direto entre duas bactérias com transferência de material genético, processo chamado de conjugação (Cehovin et al., 2013).

Existem várias limitações no uso das técnicas *in vitro* de transformação que abrem espaço para pesquisas futuras que visam superar essas barreiras (Das et al., 2017). Dentre as limitações temos a difusão lenta de entrada de DNA hidrofílico através da membrana de bicamada lipídica hidrofóbica e à ligeira repulsão eletrostática entre o DNA aniônico e os grupos aniônicos da membrana celular. Além disso, nos processos naturais, o DNA pode sofrer hidrólise ou ser degradado por qualquer processo enzimático durante o seu curso de transformação (Soni et al., 2015).

O material genético utilizado nas técnicas de eletroporação, biobalística, microinjeção, choque térmico e do método químico, que utiliza o cloreto de cálcio paralelamente a técnica de choque térmico, necessita ser manipulado fora da célula antes de ser inserido (Fayazpour et al., 2006). Dessa forma, para uma transferência eficiente do gene de interesse é necessário a utilização de veículos adequados de transferência, que protejam o DNA em seu caminho até o núcleo (Calvete et al., 2015).

Uma maneira de contornar estas limitações é tornar as células alvo mais competentes através do tratamento com produtos químicos que forneçam íons  $\text{Ca}^{2+}$  e em seguida realizar o choque térmico, esse é o estado fisiológico das células que lhes permite ligar e incorporar DNA exógeno de alto peso molecular. Supõem-se que estes cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) se liguem primeiro com DNA aniônico e que essas moléculas de DNA sejam transferidas através dos poros na membrana da célula formados durante o choque térmico (Singh et al. 2010). Outra estratégia consiste no transporte das moléculas de DNA em veículos carregadores de DNA, os quais são vetores que transferem eficientemente o material genético através da membrana e o protegem contra qualquer ação enzimática da célula (Soni et al., 2015).

Soni et al. (2015) relatam que muitos complementos vetoriais de transferência de DNA foram desenvolvidos e citam métodos utilizados por outros autores envolvendo o encapsulamento de DNA em surfactante catiônico, a utilização de vesículas de copolímero, capsídeos virais, superestruturas de proteínas, conjuntos lipídicos, nanocápsulas poliméricas e estrutura mesoporosa. Apesar de serem simples e usadas para muitas espécies, essas técnicas apresentam algumas limitações em relação a quantidade de material genético transferido, necessidade de utilização de equipamentos sofisticados, baixa especificidade e danos ao DNA (Kikuchi et al., 1999; Mingozi et al., 2011).

Muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de investigar diferentes tipos de lipídios e polímeros catiônicos como adjuntos plasmidial não-virais promissores para a transferência de DNA (Wagner et al., 1998; Brown et al., 2001). Descobriu-se que moléculas orgânicas que contêm grupos funcionais catiônicos proporcionam interação eletrostática devido à sua forte carga oposta e formam espontaneamente complexos interpolielectrolíticos com ácidos nucleicos carregados negativamente, chamados lipoplexos e poliplexos, respectivamente (Fayazpour et al., 2006). Dentre os polissacáridos catiônicos têm se destacado os dextrans catiônicos, celulosas catiônicas, guar catiônico e quitosana, os quais já são amplamente utilizados tanto na indústria de cosméticos como em sistemas de administração tópica de fármacos (Rodriguez et al., 2001). No entanto, estes sistemas baseados em lípidos/polímeros catiônicos são geralmente utilizados para o processo de transfecção eucariótica e as suas aplicações em células procarióticas são estritamente limitadas.

A celulose é um polímero linear com ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre unidades D-glicopirranose amplamente encontrado na natureza. Os derivados catiônicos da celulose têm inúmeras vantagens sobre vários biopolímeros, tais como biodegradabilidade, reciclabilidade,

reprodutibilidade, rentabilidade, propriedades antibacterianas e alta disponibilidade em diversas formas. Contudo, a fraca solubilidade e baixa reatividade da celulose dificultam a realização de estudos que visem aplicações biológicas desse polímero, incluindo os estudos de transformação bacteriana e transfecção gênica. Assim, a modificação química da celulose representa uma estratégia para superar estas limitações, preservando as características vantajosas do material (Sivakumar et al., 2013).

Song et al. (2008) relataram em seu estudo que os derivados de celulose quaternizados preparados em soluções aquosas de NaOH/ureia podem ser considerados como transportadores de genes não-virais promissores, uma vez que esses complexos exibiram níveis de transfecção efetivos em comparação com o DNA sozinho em células 293T.

*Orbignya phareolata* Mart, família *Acaraceae* [*Palmae*], é uma palmeira oleaginosa que produz o fruto popularmente conhecido como babaçu, coco de macaco, aguaça ou uauçu (Sousa, 2008). Essa palmeira é encontrada predominantemente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil que produz frutos contendo várias amêndoas que são comercializadas para fins industriais e também consumidas como alimento (Embrapa, 1984). O fruto do babaçu produz também a farinha do mesocarpo que, segundo relatos populares, tem propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. A farinha de babaçu é também um alimento rico em amido, vitaminas e sais minerais. O uso desse ingrediente como suplemento na alimentação escolar tem sido incentivado pelo governo federal em algumas comunidades do interior do Maranhão (Lago, 2002; Ferreira et al, 2006).

A farinha é obtida a partir da secagem e trituração do mesocarpo. O mesocarpo transformado em pó é peneirado, umedecido e finalmente torrado em fogo alto. O interesse na farinha de mesocarpo de babaçu está pautado nas suas propriedades medicinais, tais como anti-

inflamatória alterações nas funções gastrointestinais, redução nos níveis de colesterol, glicemia e insulina pós-prandial (Baldez et al., 2006).

Vieira et al. (2011) realizaram um estudo com os componentes mesocarpo e epicarpo do coco babaçu utilizados como novos biossorventes alternativos para remoção do corante têxtil ftalocianina de cobre de soluções aquosas. Os autores observaram que a composição dos subprodutos do mesocarpo é similar à de outros materiais lignocelulósicos e que ambos os componentes são efetivos na remoção do corante têxtil Turqueza Remazol. Contudo, mesmo apresentando excelentes propriedades há uma deficiência de estudos que tratem desse subproduto do babaçu.

Considerando o uso de diferentes matérias para aumentar a eficiência de transformação bacteriana e que o uso de celulose e do mesocarpo de babaçu puros na transformação bacteriana não foi encontrado na literatura, a hipótese desse estudo é que o uso desses biopolímeros como vetores de transferência irá aumentar a eficiência da transformação genética bacteriana por facilitar a permeabilização do DNA na membrana nas células através de interações eletrostáticas entre as moléculas e a estrutura da membrana.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo caracterizar e comparar as propriedades químicas da celulose e mesocarpo de babaçu puros e avaliar o efeito desses biopolímeros como complementos plasmidial no processo de transformação de células bacterianas.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiais

A celulose foi fornecida pela Fragon do Brasil Farmacêutica Ltd. (São Paulo, Brasil) e o mesocarpo de babaçu foi comprado em um estabelecimento de medicamentos localizado na cidade de Teresina-PI. O reagente cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil) trimetilamônio (CHPTAC – 60% em H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich) foi usado como reagente de eterificação sem purificação prévia. O meio de cultura Luria-Bertani (LB), CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub> foram adquiridos na Invitrogen<sup>®</sup>, Califórnia, USA. Além disso, *E. coli* TOP 10 F' e uma cepa recombinante com p-GEM – Teasy (SOD 282 – col 3) foram obtidas do laboratório de genômica funcional do Centro Pesquisa René Rachou - Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil. Todos os reagentes foram de grau analítico e utilizados sem purificação prévia.

### 2.2 Caracterização dos biopolímeros

As análises de difração de raios-X (DRX) foram utilizadas para verificar a microcristalinidade da celulose pura (C0), assim como verificar a cristalinidade do mesocarpo de babaçu puro (M0) no equipamento SHIMADZU XRD-6000 com radiação Cu-K $\alpha$ , operando na geometria convencional  $\theta$ - $2\theta$ , no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados/LIMAV da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Foi utilizado tubo de cobre a uma tensão de 40 kV e corrente de 30 mA, com  $2\theta$ . Os espectros de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das amostras de C0 e M0 foram obtidos com um espectrofotômetro de



infravermelho com transformada de Fourier modelo Vertex 70, Bruker. Os espécimes de teste foram analisados na região de varredura de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  com 64 acumulações, usando pastilhas de KBR para avaliação da precisão das análises. Os percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio das amostras foram medidos com um analisador elementar (Perkin-Elmer<sup>®</sup>, modelo PE 2400). A solubilidade da celulose e mesocarpo em água destilada e em diferentes solventes foi medida a 25 °C e a concentração dos polímeros foi de cerca de 1% (m/v). A termogravimetria (TG) e sua derivada (DTG) foram utilizadas para determinação da estabilidade térmica dos materiais. As curvas TG/DTG foram obtidas em um instrumento SDT Q600 V20.9 Build 20, em uma faixa de temperatura de 200,06 até 1400,04 °C, utilizando nitrogênio como gás de arraste. O potencial- $\zeta$  (zeta) das amostras em água destilada ( $c_{\text{polímero}} = 1 \text{ mg/mL}$ ) e as análises de dispersão de luz dinâmica (DLS) das estruturas funcionais de DNA-C0 e DNA-M0 foram feitas utilizando o equipamento Nano-ZS ZS90 (Malven Instruments, U.K.) a 25 °C.

### 2.3 Avaliação da interação DNA com Celulose e Mesocarpo

Eletroforese em gel de agarose foi realizada para monitorar a interação do DNA com a celulose e o mesocarpo de babaçu. Complexos de Celulose/DNA (C0/DNA) e Mesocarpo/DNA (M0/DNA) foram preparados adicionando-se um volume adequado de solução de celulose ou mesocarpo (em solução de NaCl 0,1 mol/L) à uma solução aquosa de DNA de plasmídeo p-GEM (40 ng). Em seguida, os complexos foram incubados a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, os complexos foram submetidos a eletroforese no gel de agarose a 1% (m/v) contendo GelRed na proporção de 1:50.000. Para estimar o tamanho dos fragmentos foi utilizado o padrão 1 kb DNA Ladder (Promega<sup>®</sup>, Wisconsin, USA). A eletroforese foi realizada em tampão Tris-borato-EDTA

(89 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA, pH 8,0) a 80 V durante 120 min. As imagens foram obtidas utilizando o equipamento ImageQuant Las 4000 (GE).

#### 2.4 Estudos de citotoxicidade das estruturas de DNA-Celulose e DNA-Mesocarpo em células de *E. coli*.

Antes dos estudos de transformação, a citotoxicidade dos materiais, em células bacterianas não competentes, foi determinada para estimar a concentração limiar de celulose e mesocarpo que não apresentassem qualquer toxicidade significativa para as células. Foram adicionadas diferentes concentrações dos materiais que variaram de 0 a 0,1 mg/mL a 3 mL de bactérias. Em seguida, as bactérias foram incubadas a 37 °C durante 6 horas sob agitação. Antes da incubação, a OD<sub>600</sub> das bactérias foi determinada. Após 3 e 6 horas de incubação, outras duas medições da OD<sub>600</sub> foram realizadas. Além disso, observou-se também o efeito dos materiais sob o crescimento de bactérias em placas com meio ágar sólido.

#### 2.5 Preparo das células competentes

As células de *E. coli* TOP 10 F' foram cultivadas em meio LB a 37 °C por 16 h sob agitação de 200 rpm (100 µL de células para 10 mL de meio LB líquido). Após a incubação, 1 mL de cultura de células foi adicionado a 100 ml de meio LB fresco. As células foram incubadas a 37 °C com agitação a 200 rpm e deixadas para crescer até atingir uma OD<sub>600</sub> entre 0,4-0,5. As células foram incubadas em agitação durante 15 minutos. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 4000 g por 7 minutos a 4 °C, então o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas

em 25 mL de CaCl<sub>2</sub> (100 mM/Hepes 10 mM) gelado e incubadas no gelo por 30 minutos. Em seguida, o passo de centrifugação foi repetido e as células foram ressuspensas em 1 mL de solução de CaCl<sub>2</sub>/glicerol (100 mM/Hepes 10%). Foram preparadas alíquotas de 50 µL de células competentes as quais foram armazenadas a -70 °C.

## 2.6 Transformação das células competentes

Para o estudo de transformação, estruturas de DNA complexadas com C0 ou M0 foram preparadas adicionando-se volumes apropriados das soluções dos materiais (1mg/mL em NaCl 0,1 mol/L) e de DNA em tubos de 1,5 mL e em seguida foram incubadas a 37 °C por 30 min. Então, 50 µL das células competentes foram homogeneizadas com DNA plasmidial, DNA-C0 e DNA-M0 em diferentes volumes testados em ensaios de concentrações de C0, M0 e DNA. As células foram incubadas em gelo durante 30 min e foram então aquecidas a 42 °C durante 45 s. Após o choque térmico, as células foram mantidas em gelo durante 2 min. Adicionou-se 1 mL de meio LB líquido e incubou-se as células em um agitador orbital a 37 °C/200 rpm durante 1 h. Esta cultura (100 µL) foi plaqueada em placa de meio LB sólido contendo 1 µg/mL de ampicilina e deixada para crescer durante a noite por no máximo 16 h. As imagens das placas foram obtidas utilizando o equipamento *ImageQuant Las 4000* (GE) e o número de colônias por placa foi determinado utilizando o programa gratuito *ImageJ*. Em seguida, a análise dos dados foi realizada utilizando o programa *Microsoft Excel*.

## 2.7 Eficiência de transformação

Para determinar a eficiência de transformação, calculou-se a unidade formadora de colônias (UFC) por nanograma de DNA. Para isso, contou-se o número de células transformadas com e sem as estruturas de DNA-C0 e DNA-M0 em placas de ágar LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, utilizando o programa gratuito *ImageJ*. Posteriormente, a análise dos dados foi realizada utilizando o programa *Microsoft Excel*.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Caracterizações dos materiais

A tabela 1 apresenta os resultados das caracterizações da celulose e mesocarpo obtidos após a análise elementar das amostras em termos de percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Além disso, a tabela apresenta os resultados das medições dos potenciais zetas das amostras.

**Tabela 1.** Resultados das análises elementar e de potencial zeta das amostras de celulose e mesocarpo de babaçu.

Amostras	Análise Elementar (%)			$\zeta^a$ (mV)
	C	H	N	
C0	41,32	6,29	0,05	-23,0
M0	39,37	6,18	0,46	-26,6

<sup>a</sup> Potencial- $\zeta$  determinado por uma solução aquosa de 1 mg/ml de material a 25 °C.

A partir dos dados apresentados na tabela 1, verificou-se que, dos elementos constituintes na amostra de celulose, os percentuais de carbono (41,32%) foram superiores aos de hidrogênio (6,29%) e nitrogênio (0,05%). Resultados semelhantes foram obtidos na análise elementar do mesocarpo de babaçu: 39,37 % de carbono, 6,18 % de hidrogênio e 0,46 % de nitrogênio. Os valores dos percentuais dos elementos carbono e hidrogênio, nas estruturas da celulose e mesocarpo, foram significativamente semelhantes sendo observado apenas diferença em relação ao percentual de nitrogênio, o qual foi superior na amostra de mesocarpo.

As análises dos potenciais zeta ( $\zeta$ ) das amostras (Tabela 1) indicaram que a celulose normal (C0) apresentou um valor do potencial negativo (-23,0 mV), assim como o mesocarpo normal (M0) cujo valor do potencial foi de -26,0 mV.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos após o teste de solubilidade realizado com as amostras de celulose (C0) e mesocarpo (M0) em água e diferentes solventes.

**Tabela 2.** Resultados do teste de solubilidade dos materiais

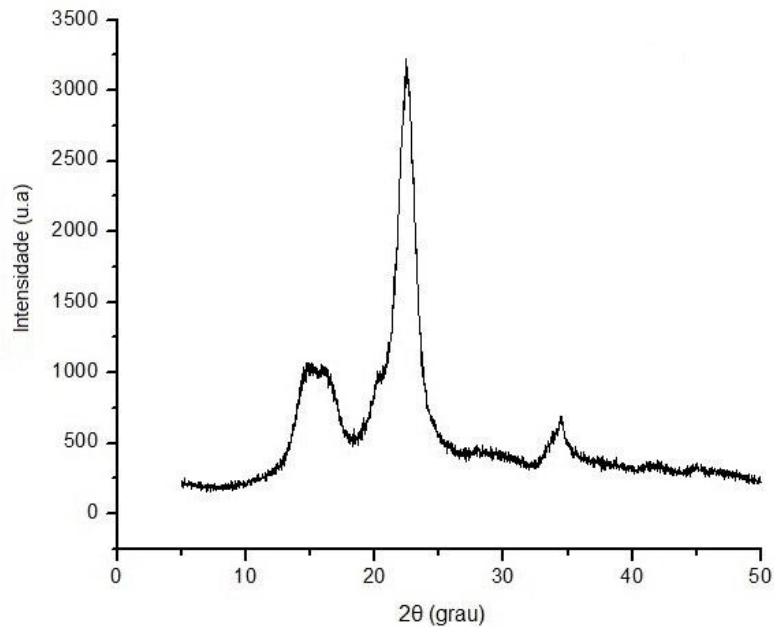
ID das Amostras	Solubilidade <sup>a</sup>						
	H <sub>2</sub> O	DMSO (100%)	CaCl <sub>2</sub> (1%)	Etanol (100%)	0,1 mol/L NaOH	0,1 mol/L NaCl	0,5 mol/L NaCl
C0	-	-Δ	-	-	-	+	-
M0	-	-Δ	-	-	-	+	-

<sup>a</sup> + solúvel, - não solúvel, -Δ não solúvel e inchaço, teste para uma solução de 1% (m/v) a 25 °C.

Analisando a tabela 2, é possível verificar que as amostras apresentaram boa solubilidade apenas em NaCl 0,1 mol/L. Para os demais solventes, a celulose e o mesocarpo foram insolúveis ou resultaram em um inchaço, formando uma massa precipitada.

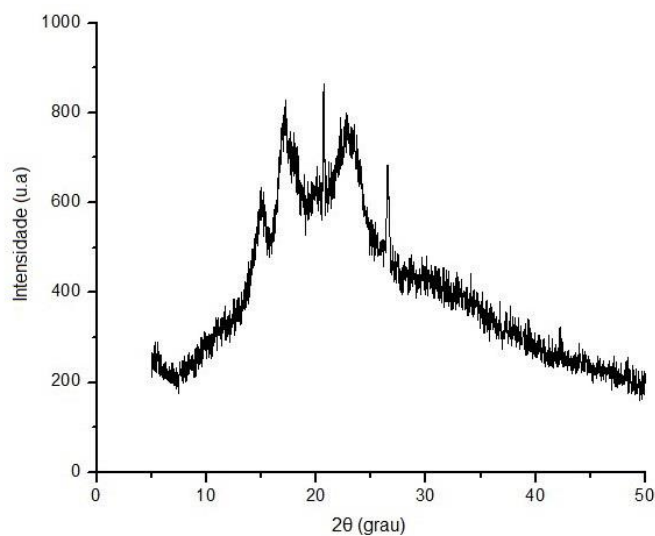
### 3.2 Difração de raios-X

Esta técnica foi utilizada para verificar a microcristalinidade da celulose e do mesocarpo utilizados nesse estudo. Na Figura 1 encontra-se o difratograma da celulose, onde podemos observar três planos 101 (pico aproximadamente em 15,68°), 002 (22,40°) e 040 (34,55°) bem distintos, os quais são característicos de celulose microcristalina (Ciolacu et al., 2011).



**Figura 1.** Difratoograma de raios-X da celulose (C0).

A cristalinidade da celulose é um fator importantíssimo que está relacionado com as propriedades físicas e a reatividade desse material com diferentes reagentes. Nas regiões cristalinas o arranjo atômico é mais ordenado, dessa forma as interações intermoleculares são mais intensas e a reatividade é menor. Nas regiões não cristalinas, onde o arranjo não é tão ordenado e as interações intermoleculares não são tão intensas, os grupos hidroxilas encontram-se mais disponíveis para reagirem (Ciolacu et al., 2011).



**Figura 2.** Difratoograma de raios-X do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.).

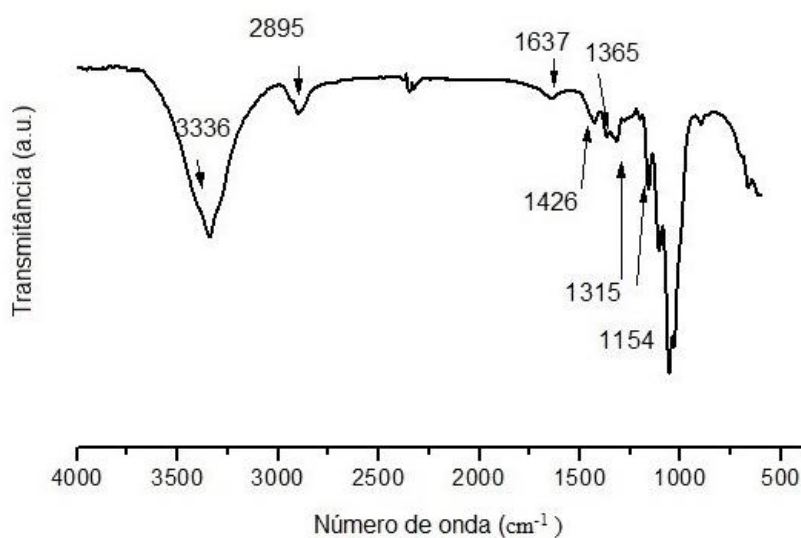
O pó do mesocarpo de babaçu apresentou um difratograma de raios-X característico de um material com estrutura amorfa (Figura 2). Ao contrário do pó do mesocarpo de babaçu, a celulose microcristalina (Figura 1) apresenta um padrão de estrutura cristalina. Quando os raios X interagem com um material cristalino ou amorfo eles geram um padrão de difração característico de cada material. Quanto maior o número de cristais em um plano de uma estrutura cristalina, mais intensos, pontiagudos e estreitos serão os picos na difração de raios X. As partes amorfas geram picos mais largos e menores (Neto, 2003).

### 3.3 Análise estrutural dos materiais

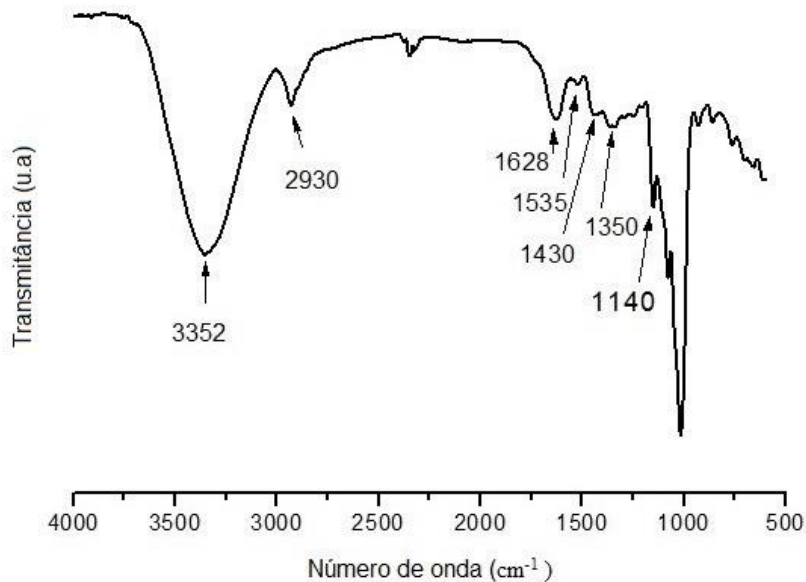
Os espectros de FTIR (Figuras 3 e 4) apresentam resultados das bandas de absorção referente aos grupos funcionais presentes nas estruturas da celulose e do mesocarpo de babaçu. As bandas largas e fortes a cerca de  $3336\text{ cm}^{-1}$  (Figura 3) e  $3352\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4) foram atribuídas a



vibrações do grupo OH. Observou-se na região entre  $2895\text{ cm}^{-1}$ , no espectro da celulose, e  $2930\text{ cm}^{-1}$ , no espectro do mesocarpo, a presença de bandas atribuídas a vibrações de grupos CH alifáticos, especificamente carbonos secundários e terciários ( $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ). As bandas em torno de  $1426\text{ cm}^{-1}$  (Figura 3) e  $1428\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4) foram atribuídas a vibrações de alongamento dos grupos C-N (Li et al., 2015). Observou-se bandas em torno de  $1637\text{ cm}^{-1}$  e  $1628\text{ cm}^{-1}$ , figuras 3 e 4, respectivamente, as quais foi atribuída a vibrações de grupos C=O de amidas, nesse caso específico, a amidas N, N-substituídas. A banda em torno de  $1628\text{ cm}^{-1}$  apresentou-se mais larga no espectro de mesocarpo comparada com a banda do espectro de celulose, isso é devido a diferença de percentuais do elemento nitrogênio (Tabela 1) o qual está em maior quantidade na estrutura química do mesocarpo. O duplete das regiões entre  $1365\text{ cm}^{-1}$  e  $1315\text{ cm}^{-1}$  (espectro da celulose) foi atribuído a deformação angular do grupo  $\text{CH}_3$ . A banda da região de  $1350\text{ cm}^{-1}$  (espectro do mesocarpo) foi atribuída a deformação angular do grupo  $\text{CH}_3$ . As bandas na região entre  $1060$  e  $1154\text{ cm}^{-1}$  (Figura 3) e  $1140\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4) foram atribuídas a vibrações de alongamento de ligações éter (Li et al., 2015).



**Figura 3.** Espectros de FTIR da celulose – C0.

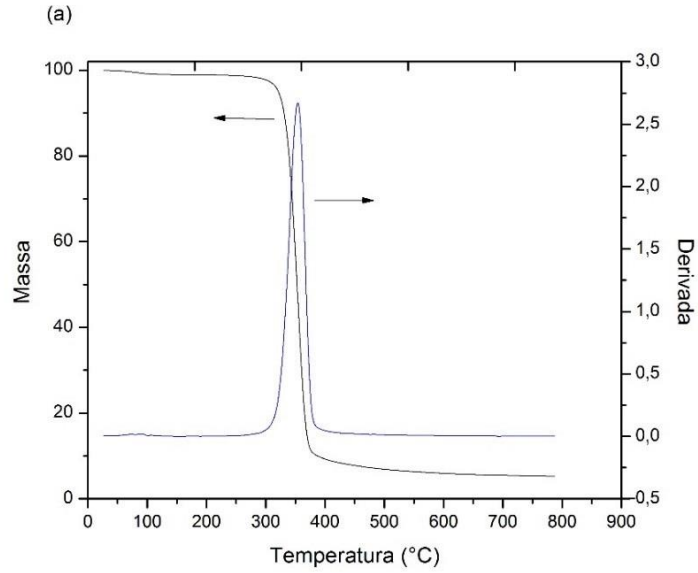


**Figura 4.** Espectros de FTIR do mesocarpo de babaçu – M0.

A partir dos resultados dos espectros de FTIR foi possível verificar a presença de grupos característicos da celulose e do mesocarpo os quais apresentam constituições químicas semelhantes, sendo que a principal diferença entre os dois espectros consistiu na posição das bandas de vibrações dos grupos funcionais.

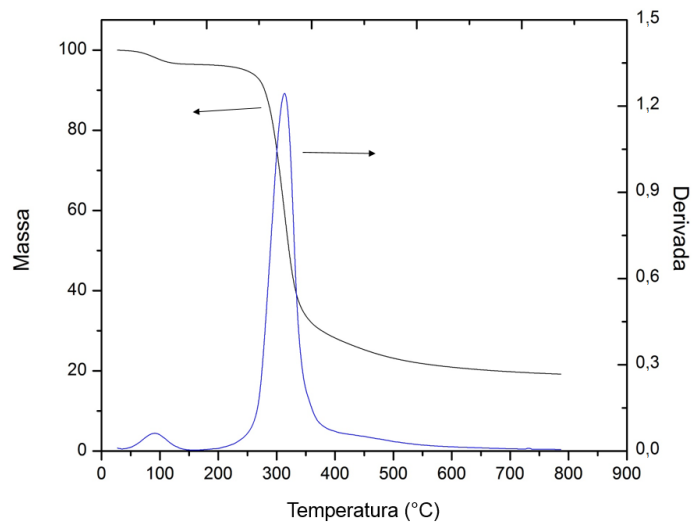
### 3.3 Análises termogravimétricas

A curva termogravimétrica da celulose pura (C0) está mostrada na figura 5. A curva mostrou um único evento de decomposição, na faixa de temperatura entre 300 e 380 °C, correspondendo a uma perda de massa total de 89 %, como podemos observar a partir da sua derivada. Verificou-se ainda que a celulose não se decompõe totalmente na faixa de temperatura acima descrita, uma vez que até 787 °C uma certa porcentagem em massa é liberada.



**Figura 5.** Curva termogravimétrica e derivada da celulose microcristalina (C0).

A figura 6 apresenta a curva termogravimétrica do mesocarpo de babaçu. Conforme apresentado na curva de TG/DTG do mesocarpo do babaçu, observa-se dois estágios de perda de massa. O primeiro, que vai de 48,36 a 129,13 °C, o segundo está na faixa de 247,40 a 340,38 °C.



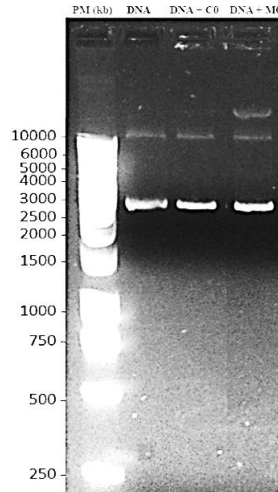
**Figura 6.** Curva termogravimétrica e derivada do mesocarpo de babaçu (M0).

Os eventos de perda de massa observados nas curvas termogravimétricas do mesocarpo estão associados a decomposição referente à liberação de pequenas estruturas de carbono e moléculas de água do material, ou simplesmente à perda de umidade da amostra (Vieira, 2011; Almeida, 2011). Essa grande quantidade de água presente no material está relacionada a grande quantidade de grupos OH presentes na estrutura química do mesocarpo como evidenciado no espectro de FTIR (Figura 6) pelo formato da banda larga e intensa em torno de  $3352\text{ cm}^{-1}$ .

O processo de degradação ocorre frequentemente a partir do segundo evento de perda de massa, como possível resultado da perda de estabilidade térmica pelo material. A degradação em altas temperaturas resulta na quebra das ligações C-C de polímeros orgânicos formando unidades monoméricas. A celulose apresenta estabilidade térmica moderada em virtude das características de sua estrutura cristalina.

### 3.5 Avaliação da interação entre DNA com celulose e mesocarpo

A Figura 7 apresenta o resultado da eletroforese em gel de agarose na qual os fragmentos de DNA sozinho e em solução com a celulose e o mesocarpo de babaçu foram separados de acordo com os seus tamanhos. A migração é proporcional ao tamanho e a carga, como o DNA tem carga negativa, o sentido da migração das bandas é em direção ao polo positivo.



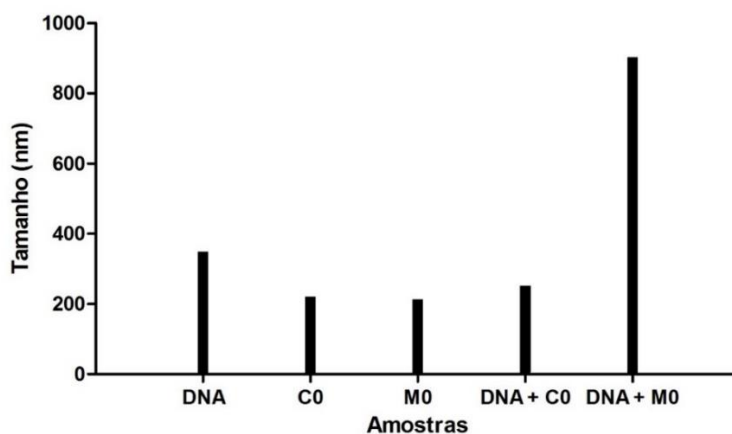
**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o padrão de migração do DNA sozinho e do DNA em solução com a celulose (C0) e mesocarpo (M0).

Em relação ao gel obtido, observou-se que duas bandas de fragmentos foram comuns tanto para o DNA plasmidial, DNA em solução com celulose, e DNA com mesocarpo de babaçu, uma na região de 3000 pb e outra na região de 10000 pb. Esses fragmentos foram atribuídos ao DNA que não interagiu com os materiais. O padrão de migração dos fragmentos de DNA em solução com o mesocarpo de babaçu mostrou a presença de uma banda com tamanho superior a 10000 pb a qual foi atribuída a interação entre o DNA e o mesocarpo de babaçu, resultando na formação de moléculas com maior peso molecular.

A forte interação entre o DNA e o mesocarpo de babaçu provavelmente resultou da interação entre o DNA aniônico e os grupos de nitrogênio catiônico presentes no mesocarpo, como mostra a Tabela 1. Esses resultados são reforçados com os dados obtidos com o ensaio de dispersão em luz dinâmica (DLS), o qual mostrou um aumento no tamanho de partículas resultante da interação entre DNA e mesocarpo de babaçu, e a presença de partículas com tamanhos relativamente semelhantes entre DNA e DNA com celulose (Figura 8).

### 3.6 Análise DLS das estruturas funcionais DNA-celulose e DNA-mesocarpo

A dispersão de luz dinâmica foi utilizada para estudar as alterações no raio hidrodinâmico do DNA plasmidial antes e depois da sua interação com a celulose e mesocarpo de babaçu. Os estudos de DLS revelaram que o raio hidrodinâmico do DNA plasmidial foi estimado em 348,5 nm, o raio da celulose (C0) foi de 220,2 nm e o raio estimado do mesocarpo (M0) foi de 213,5 nm. Após a interação com a celulose, o raio hidrodinâmico do complexo DNA-C0 foi estimado em 251,7 nm, em relação ao raio do complexo DNA- M0 foi estimado em 902,4 nm (Figura 8).

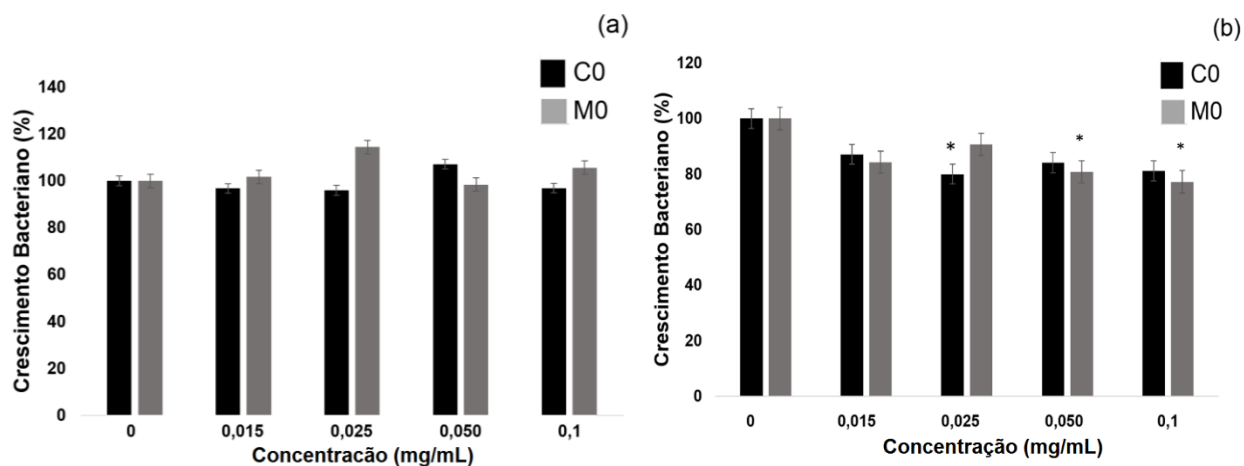


**Figura 8.** Resultados das análises de dispersão de luz dinâmica (DLS) realizado com as amostras: DNA, DNA + C0 – estruturas de DNA com celulose, DNA + M0 – estruturas de mesocarpo com DNA.

Soni et al. (2015) explicam que a mudança no raio do DNA é devido à forte ligação eletrostática dos materiais com o DNA. Dessa forma, o aumento no raio hidrodinâmico do DNA após interação com o mesocarpo, pode ser atribuído a incorporação de moléculas de M0 na superfície do DNA.

### 3.7 Estudo de citotoxicidade

No ensaio de citotoxicidade, bactérias *E. coli* TOP 10 F' foram incubadas com e sem os materiais (celulose e mesocarpo de babaçu) em diferentes concentrações variando entre 0 e 0,1 mg/mL (Figura 9).

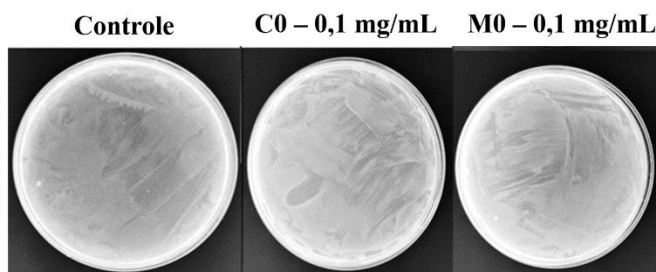


**Figura 9.** Resultados obtidos a partir de leituras da  $DO_{600}$  no ensaio de citotoxicidade dos materiais: celulose (C0) e mesocarpo (M0), em diferentes concentrações, sob o crescimento de bactérias *E. coli* Top 10 F' após 3 e 6 h de incubação, (a) e (b) respectivamente. \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

As leituras da  $DO_{600}$  indicaram que após 3 horas de incubação (Figura 9 a), nenhum efeito citotóxico significativo dos materiais, em todas as concentrações testadas, foi observado em relação ao crescimento bacteriano. Já após 6 horas de incubação (Figura 9 b), observou-se diferenças em relação ao efeito da celulose sob o crescimento bacteriano na concentração de 0,025 mg/mL. Para o mesocarpo, observou-se diferenças significativas em relação ao efeito do material no crescimento bacteriano para concentrações  $\geq$  a 0,050 mg/mL.

Além das leituras da  $DO_{600}$ , estudou-se também o efeito de diferentes concentrações de celulose e mesocarpo de babaçu no crescimento das bactérias em placas de ágar. Após a incubação das bactérias com os materiais, não foi verificado efeito citotóxico dos materiais até a maior

concentração testada (0,1 mg/mL), uma vez que as bactérias cresceram por toda a extensão das placas (Figura 10).



**Figura 10.** Imagens ópticas obtidas no ensaio de citotoxicidade dos materiais: celulose (C0) e mesocarpo (M0), em diferentes concentrações, sob o crescimento de bactérias *E. coli* Top 10 F' após 24 h de incubação. \*\*\* P<0.001, \*\* P<0.01, \* p<0.05.

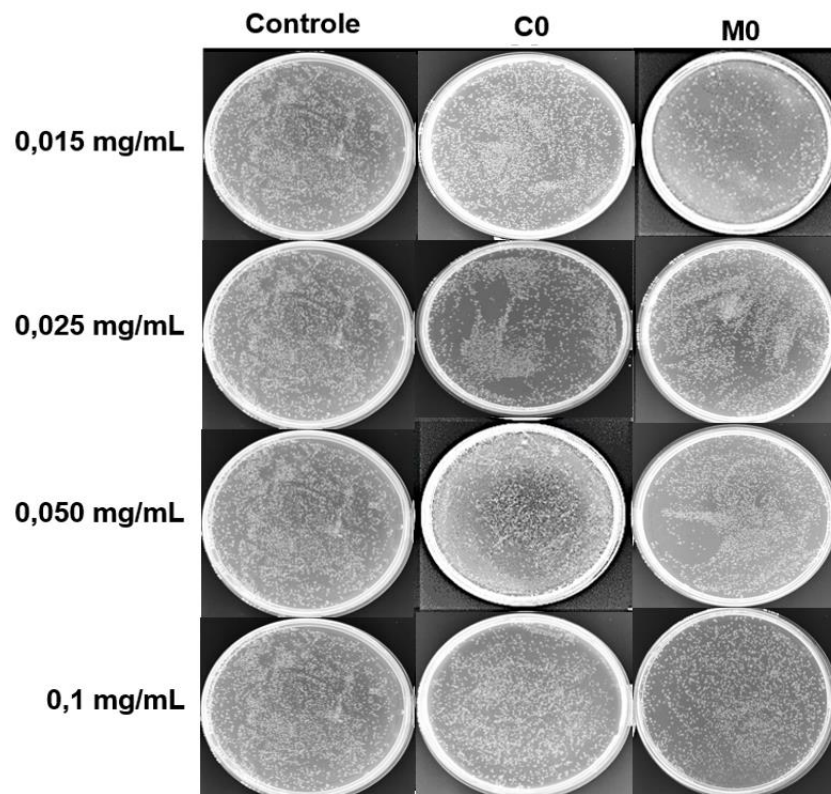
Esses resultados permitiram investigar o efeito de diferentes concentrações dos materiais (0,015 – 0,1 mg/mL) em solução com DNA nos ensaios de transformação e para investigar se o efeito citotóxico é alterado ou não na presença do material genético.

### 3.8 Transformação genética bacteriana

A influência de quantidades variáveis das soluções de celulose e mesocarpo com uma quantidade constante de DNA plasmidial e seu efeito sobre a eficiência de transformação genética bacteriana foram estudados. Nesse ensaio, as estruturas de DNA-C0 e DNA-M0 foram preparadas variando a concentração de C0 e M0 de 0,015 a 0,1 mg/mL enquanto foi mantida a concentração de DNA (8 ng/ $\mu$ L). A Figura 11 apresenta imagens ópticas das células transformadas, quando as concentrações dos materiais foram variadas e o volume do DNA mantido constante.



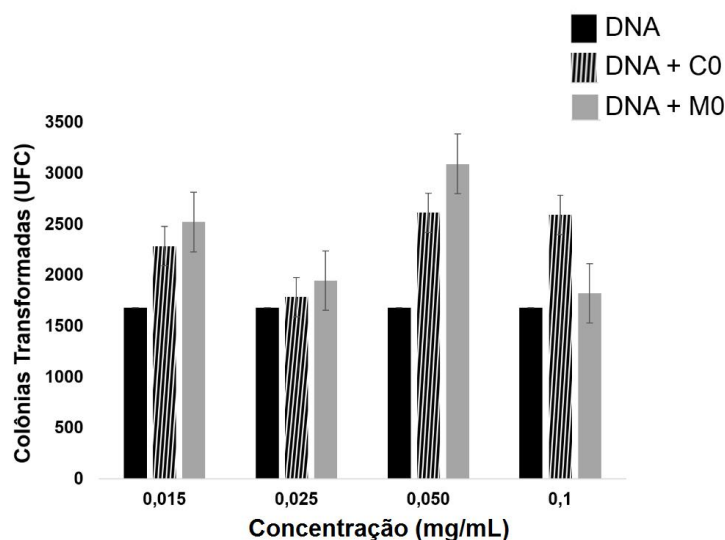
A partir desses ensaios foi observado a concentração de 0,1 mg/mL de celulose (C0) resultou em um aumento na transformação de *E. coli* Top 10 F' em relação ao controle. Para o mesocarpo de babaçu, observou-se que o efeito máximo de transformação foi obtido com a concentração de 0,050 mg/mL do material.



**Figura 11.** Imagem óptica de células de *E. coli* transformadas, mostrando o efeito de diferentes concentrações dos materiais: 0 (controle), 0,015, 0,025, 0,050 e 0,1 mg/mL de celulose (C0) e mesocarpo (M0).

Após analisar o crescimento das colônias transformadas nas placas de ágar (Figura 11) suplementadas com antibiótico (ampicilina), foi determinado que a concentração de 0,050 mg/mL de ambos os materiais celulose (C0) e mesocarpo (M0) resultaram, visualmente, em números de células transformadas superiores ao controle.

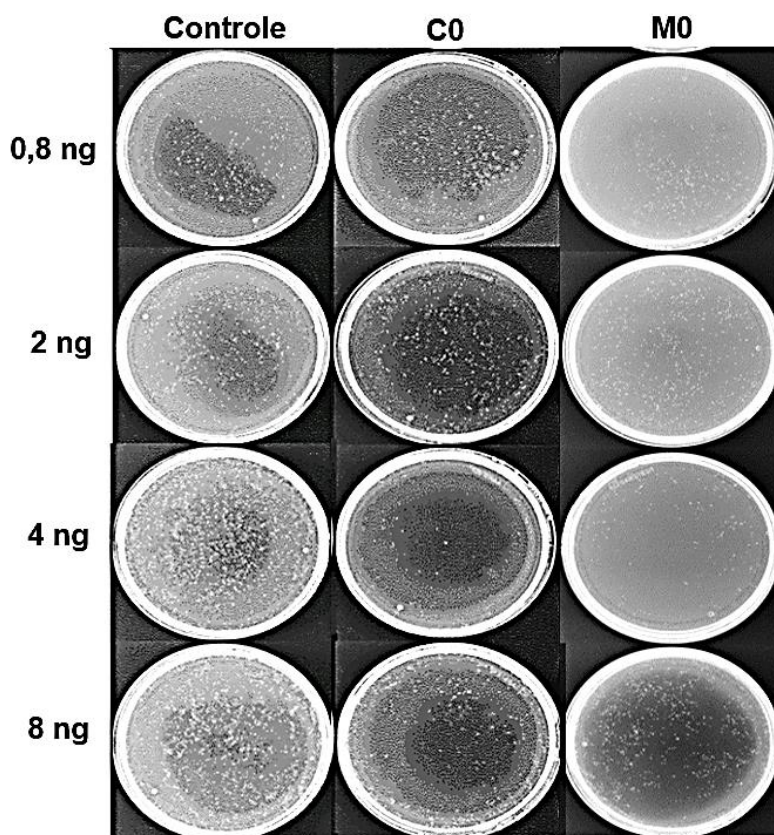
O desempenho de transformação das bactérias variando as concentrações dos materiais e mantendo a quantidade de DNA constante também foi avaliado com base no número de unidade formadora de colônias (UFC) como pode ser observado na Figura 12, a qual apresenta a quantidade de colônias transformadas. Analisando os dados do gráfico, verifica-se que para a celulose as maiores quantidades de colônias transformadas foram obtidas com as concentrações de 0,050 mg/mL e 0,1 mg/mL do material. Já para o mesocarpo, a maior quantidade de células transformadas foi obtida com a concentração de 0,050 mg/mL do material.



**Figura 12.** Unidade Formadora de Colônias no ensaio de transformação com diferentes concentrações dos materiais: celulose (C0) e mesocarpo (M0) (0 - 0,1 mg/mL) mantendo a quantidade de DNA constante (8ng/  $\mu$ L).

Um novo ensaio de transformação bacteriana foi realizado, dessa vez, mantendo-se a concentração de material constante e variando a quantidade de DNA a fim de verificar o efeito de diferentes concentrações de DNA na eficiência de transformação. As estruturas de DNA-C0 e DNA-M0 no ensaio de transformação com concentrações crescentes de DNA (0,8 a 8 ng) foram preparadas mantendo as concentrações dos materiais constantes (0,050 mg/mL), as quais foram

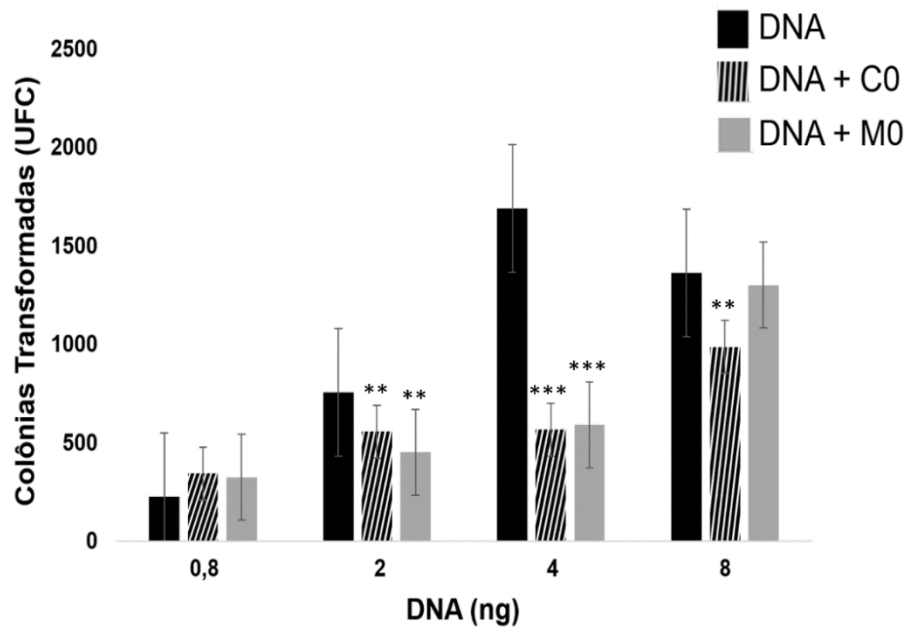
determinadas com base no ensaio de transformação realizado com diferentes concentrações dos materiais. A mesma quantidade de DNA plasmidial foi utilizada como controle para a transformação e o resultado de transformação usando o DNA plasmidial puro, DNA-C0 e o DNA-M0 é apresentado na Figura 13.



**Figura 13.** Imagem óptica de células de *E. coli* transformadas usando concentrações crescentes (0,8 - 8 ng) de DNA plasmidial na ausência e presença dos materiais (C0 - celulose e M0 – mesocarpo) em concentração constante de 0,050 mg/mL.

Analisando as imagens das placas (Figura 13) e complementando com os dados da representação gráfica do número de colônias formadas após o ensaio de transformação (Figura 14) é possível verificar que tanto usando a celulose como o mesocarpo, apenas a concentração de 0,8

ng de DNA proporcionou um resultado quantitativo superior ao do controle, já as concentrações de DNA superiores apresentaram valores de colônias transformadas inferiores ao controle.



**Figura 14.** Número de colônias transformadas após transformação bacteriana variando as quantidades de DNA (0,8 - 8 ng) e mantendo as concentrações dos materiais constantes (0,050 mg/mL de celulose – C0 e mesocarpo – M0). \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

O ensaio de concentração de DNA permitiu verificar que pequenas quantidades de DNA combinadas à celulose e/ou mesocarpo de babaçu resultaram em maior número de colônias transformadas em relação ao controle. Este resultado é satisfatório, uma vez que frequentemente na realização da transformação bacteriana, a quantidade de DNA disponível para a transformação é limitada. Assim, o uso dos materiais como complementos de DNA pode contribuir para aumentar a eficiência do processo e fornecer um maior número de colônias transformadas.

Kim et al. (2015) realizaram um estudo para investigar a eficiência de transformação com quitosana em comparação com método de choque térmico e choque térmico complementado com

quitosana. Os autores observaram que ambas as transformações mediadas por quitosana apresentaram uma eficiência de transformação significativamente baixa, em comparação com o método convencional de choque térmico. Embora quitosana tenha apresentado um efeito negativo na transformação, os autores verificaram que as células de *E. coli* DH5 $\alpha$  permaneceram viáveis.

Segundo Kim et al (2015), uma provável explicação para a inibição da transformação por materiais catiônicos (quitosana) seria a precipitação celular. Os autores observaram que a quitosana causou precipitação em células *E. coli* DH5 $\alpha$  por meio da atração das células, as quais possuem membranas carregadas negativamente e formaram complexos com a quitosana. O grau de precipitação pode estar positivamente correlacionado com a concentração de quitosana, tendo em vista que um maior grau de precipitação foi observado nas amostras com maiores concentrações de quitosana. Portanto, os autores especularam que a quitosana inibiu a transformação bacteriana agregando células DH5 $\alpha$  ou pDNA, ou ambos. No estudo, os autores utilizaram a concentração de 0,1 mg/mL, o dobro da concentração de celulose quaternizada utilizada no presente estudo (0,050 mg/mL).

Este estudo apresentou uma forma de se obter melhores resultados em termos de eficiência de transformação bacteriana utilizando celulose e mesocarpo de babaçu como complementos de vetores plasmidiais. Em termos de eficiência, considerando os resultados quantitativos do número de colônias transformadas obtidas, os biopolímeros apresentaram resultados satisfatórios e proporcionaram uma melhoria na eficiência da transformação bacteriana, mesmo quando pequenas quantidades de DNA foram utilizadas nos ensaios de transformação.

A relevância dos resultados obtidos consiste no fato de que os biopolímeros utilizados como complementos vetoriais não precisaram ser quimicamente modificados, como recomendam

a maioria dos estudos da literatura. O uso dos materiais puros proporciona, portanto, uma melhoria na eficiência de transformação bacteriana.

#### **4 CONCLUSÃO**

O estudo apresentou uma ampla caracterização e comparação da celulose e mesocarpo de babaçu puros em termos de cristalinidade, resistência térmica, padrão de carga, tamanho de partículas e interação eletrostática entre os biopolímeros e o material genético. Além de uma nova aplicação biológica de celulose e mesocarpo de babaçu como complementos plasmidiais não-virais para a transformação de genes em células bacterianas. O aumento no número de colônias transformadas após o processo de transformação bacteriana, quando foram utilizados celulose e mesocarpo de babaçu em diferentes concentrações e especificamente a concentrações de 0,050 mg/mL, demonstra que ambos os materiais podem ser utilizados como adjuntos ao vetor plasmidial como forma alternativa para aumentar a eficiência do processo de transformação. A utilização dos biopolímeros sem a necessidade de modificações químicas estruturais, proporciona melhores resultados em estudos genéticos que envolvem a transferência de DNA para células bacterianas.

## 5 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados satisfatórios obtidos nesse estudo referente ao uso de biopolímeros naturais no processo de transformação de bactérias, as perspectivas para trabalhos futuros incluem:

- O uso de outros materiais biopoliméricos como complementos vetoriais, como por exemplo a goma de cajueiro;
- Avaliar a capacidade de complemento vetorial dos materiais em ensaios de clonagem molecular e construção de bibliotecas;
- A realização de estudos para investigar o efeito de celulose e mesocarpo no processo de transfecção gênica em células eucariontes;
- A modificação química dos biopolímeros, por meio da reação de quaternização, para utilização dos materiais no processo de transfecção gênica;
- Ponderar e avaliar a capacidade dos materiais em proteger o DNA da ação das enzimas e as vias do tráfego intracelular em organismos eucariontes.

## REFERÊNCIAS

ABU BAKAR, A. H. B.; KOAY, Y. S.; CHING, Y. C.; ABDULLAH, L. C.; CHOONG, T. S. Y.; ALKHATIB, M.; MOBAREKEH, M. N.; ZAHRI, N. A. M. Removal of fluoride using quaternized palm kernel shell as adsorbents: Equilibrium isotherms and kinetics studies. **BioResources**. 11, 2, p. 4485-4511, 2016.

ALMEIDA, R.R.; LACERDAB, L. G.; MURAKAMIB, F.S.C.; BANNACHD, G.; DEMIATEA, I.M.; SOCCOL, C. R.; CARVALHO FILHO, M.A.S., SCHNITZLER, E. Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babassu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis, **Thermochimica Acta**, v. 519, p. 50-54, 2011.

ARBIGE, M. V.; PITCHER, W. H. Industrial enzymology: a look towards the future. **Trends in biotechnology**. 7, 12, p. 330-335, 1989.

BALDEZ, R. N.; MALAFAIA, O.; CZECZKO, N. G. Análise da cicatrização do cólon com uso do extrato aquoso da *Orbignyaphalerata* (Babaçu) em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, 2006.

BRISTOW, A.F. Recombinant-DNA-derived insulin analogues as potentially useful therapeutic agents. **Trends in Biotechnology**, 11, p. 301-305, 1993.

BROWN, M. D.; SCHATZLEIN, A. G.; UCHEGBU, I. F. Gene delivery with synthetic (non-viral) carriers. **Int. J. Pharm.** 23, p. 1-21, 2001.

CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; SOUZA, C. B. Biotecnologia: Transformação Bacteriana por Método de Choque-Térmico. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, n. 26, jan/mar. 2015.

CEHOVIN A.; SIMPSON, P. J.; MCDOWELL, M. A.; BROWN, D. R.; NOSCHESSE, R.; PALLETT, M.; BRADY, J.; BALDWIN, G. S.; LEA, S. M.; MATTHEWS, S. J.; PELICIC, V.



Specific DNA recognition mediated by a type IV pilin. **Proc Natl Acad Sci**, v. 110, p. 3065-70, 2013.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. I. Amorphous cellulose – structure and characterization. **Cellulose Chem. Technol.**, 45, 1-2, p. 13-21, 2011.

DAS, M.; RAYTHATA, H.; CHATTERJEE, S. Bacterial Transformation: What? Why? How? And When? **Annual Research & Review in Biology**, 16, 6, p. 1-11, 2017.

FAYAZPOUR, F.; LUCAS, B.; ALVAREZ-LORENZO, C.; SANDERS, N. N.; DEMEESTER, J.; SMEDT, S. C. Physicochemical and Transfection Properties of Cationic Hydroxyethylcellulose/DNA Nanoparticles. **Biomacromolecules**, 7, p. 2856-2862, 2006.

FERREIRA, E. C. F. et al. Análise da cicatrização da bexiga com o uso do extrato aquoso da *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 23, n.3, p. 33-39, 2006.

FLODTH, H. Human Growth Hormone Produced with Recombinant DNA Technology: Development and Production. **Acta Paediatrica**, 75, s325, p. 1-9, 1986.

JOHNSON, I. S. Human insulin from recombinant DNA technology. **Science**, 11, vol. 219, 4585, p. 632-637, 1983.

KIKUCHI, H.; SUZUKI, N.; EBIHARA, K.; MORITA, H.; ISHII, Y.; KIKUCHI, A.; SUGAYA, S.; SERIKAWA, T.; TANAKA, K. Gene delivery using liposome technology. **J. Controlled Release**, 62, p. 269–277, 1999.

KIM, C.; SAIDY, N. R. N.; FU, R.; WANG, R. Chitosan Inhibits pBR322-AmpR transformation in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)**, p. 1-7, 2015.

LAGO, R. T. **Babaçu livre e roças orgânicas – a luta das quebradeiras de coco babaçu do Maranhão em defesa dos babaçuais e em busca de formas alternativas de gestão dos recursos naturais**. 2002. 109 f. Dissertação (Mestrado em Agriculturas Familiares e Desenvolvimento Sustentável) – Universidade Federal do Pará, Belém. Orientadora: Maristela de Paula Andrade.

LI, G.; FU, Y.; SHAO, Z.; ZHANG, F.; QIN, M. Preparing cationic cellulose derivate in NaOH/Urea aqueous solution and its performance as filler modifier. **BioResources**, 10, 4, p. 7782-7794, 2015.

MINGOZZI, F.; HIGH, K. A. Therapeutic *in vivo* gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. **Nat. Rev. Genet**, 12, p. 341–355, 2011.

NETO, R.B. Raios-X. In. CANEVAROLO JR.; S.V.; ed. Técnicas de Caracterização de polímeros. São Paulo: **Artiber** Editora, p. 41-60, 2003.

RODRIGUEZ, R.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Rheological evaluation of the interactions between cationic celluloses and Carbopol 974P in water. **Biomacromolecules**, 3, p. 886-93, 2001.

SAJOMSANG, W.; TANTAYANON, S.; TANGSPASUTHADOL, V.; DALY, W. H. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization and antibacterial activity. **Carbohydr. Res.** 344, p. 2502–2511, 2009.

SINGH, M.; YADAV, A.; MA, X.; AMOAH, E. Plasmid DNA transformation in *Escherichia coli*: effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of CaCl<sub>2</sub> treated cells. **Int J Biochem Biotechnol.**, v. 6, n. 4, p. 561–568, 2010.

SIVAKUMAR, B.; ASWATHY, R. G.; NAGAOKA, Y.; SUZUKI, M.; FUKUDA, T.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; SAKTHIKUMAR, D. N. Multifunctional Carboxymethyl Cellulose-Based Magnetic Nanovector as a Theragnostic System for Folate Receptor Targeted

Chemotherapy, Imaging, and Hyperthermia against Cancer. American Chemical Society, **Langmuir**, 29, p. 3453–3466, 2013.

SONG, Y.; SUN, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, J.; ZHANG, L. Homogeneous quaternization of cell $\mu$ Lose in NaOH/urea aqueous solutions as gene carriers. **Biomacromolecules**, 9, p. 2259–2264, 2008.

SONI, K. S.; SAMPA SARKAR, S.; MIRZADEH, N.; SELVAKANNAN, P. R.; BHARGAVA, S. K. Self-Assembled Functional Nanostructure of Plasmid DNA with Ionic Liquid [Bmim][PF6]: Enhanced Efficiency in Bacterial Gene Transformation. **Langmuir**, v. 31, p. 4722–4732, 2015.

SOUSA, A. I. P. **Efeitos do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata*, *Arecaceae*) sobre a bioquímica sanguínea e animais com tumor de Ehrlich**. Dissertação de Mestrado em Saúde e Ambiente, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2008.

VIEIRA, A. P.; SANTANA, S. A. A.; BEZERRA, C. W. B.; SILVA, H. A. S.; CHAVES, J. A. P.; MELO, J. C. P.; SILVA, V. F.; C. AIROLDI. Epicarp and mesocarp of babassu (*Orbignya speciosa*): characterization and application in copper phtalocyanine dye removal. **Journal of Brazilian Chemical Society**. São Paulo, v. 22, n. 1, 2011.

WAGNER, E.; OGRIS, M.; ZAUNER, W. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. **Adv Drug Delivery Rev.** 30, p. 97-113. 1998.

ZAJAC, B. A.; WEST, D. J.; MCALEER, W. J.; SCOLNICK, E. M. Overview of clinical studies with hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. **Journal of Infection.** 13, Supplement A, p. 39-45, 1986.

# Anexos

---

Anexo I: Trabalhos gerados a partir desta dissertação

## ANEXO 1

### Artigo submetido à revista *Biomacromolecules*

**Título:** “Improvement of bacterial transformation efficiency using cellulose and babassu mesocarp as plasmid complements”

8/29/2018

Email – Jailson Santos – Outlook

Biomacromolecules <  
onbehalfof@manuscr  
iptcentral.com>  
Seg 27/08/2018, 09:50  
Você; eds... +7 pessoas ▾

27-Aug-2018

Dear Dr. da Silva Filho:

Your manuscript has been successfully submitted to *Biomacromolecules*.

Title: "Improvement of bacterial transformation efficiency using cellulose and babassu mesocarp as plasmid complements"

Authors: Santos, Jailson; Santi, Ana; Ribeiro, Fabio; Murta, Silvane; Silva, Durcilene; Liarte, Daniel; da Silva Filho, Edson; Osajima, Josy

Manuscript ID: bm-2018-012905.

Please reference the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your contact information, please log in to ACS Paragon Plus with your ACS ID at <http://paragonplus.acs.org/login> and select "Edit Your Profile" to update that information.

You can view the status of your manuscript by checking your "Authoring Activity" tab on ACS Paragon Plus after logging in to <http://paragonplus.acs.org/login>.

Thank you for submitting your manuscript to *Biomacromolecules*.

Sincerely,

*Biomacromolecules* Editorial Office



# II WORKSHOP DA Pós-Graduação em CIÊNCIA E ENGENHARIA DOS MATERIAIS

1<sup>st</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON MATERIALS SCIENCE OF PIAUÍ



## CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho "USING CELLULOSE AND BABASSU MESPCARP AS PLASMID DNA COMPLEMENTS TO IMPROVE BACTERIAL TRANSFORMATION EFFICIENCY" de autoria de JAILSON DE ARAÚJO SANTOS, apresentado na modalidade POSTER, recebeu 2º LUGAR no II Workshop do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia dos Materiais da UFPI / I International Conference on Materials Science of Piauí, realizado nos dias 16 e 17/08/2018, na Universidade Federal do Piauí.

Teresina (PI), 17 de Agosto de 2018.

Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto  
Coordenador da Pós-Graduação em Ciência e  
Engenharia dos Materiais – UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS



# CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho “O USO DE BIOPOLÍMEROS QUATERNIZADOS PARA TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E TRANSFEÇÃO GÊNICA: UM ESTUDO PROSPECTIVO” dos autores Jailson de Araújo Santos, Leudimar Aires Pereira, Daniel Barbosa Liarte e Edson Cavalcanti da Silva Filho, foi apresentado na modalidade POSTER no I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da UFPI, realizado de 21/09/2017 a 22/09/2017, na Universidade Federal do Piauí.

Teresina (PI), 22 de Setembro de 2017.

**Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto**  
Coordenador da Pós-Graduação em Ciência dos Materiais



# I EPQUIN

I Encontro Piauiense de Química  
e Inovação

De 23 a 25  
de Maio de 2018



Certificamos que o trabalho SÍTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MESOCARPO DE BABAÇU QUATERNIZADO de autoria de JAILSON DE ARAÚJO SANTOS, FÁBIO DE OLIVEIRA SILVA RIBEIRO, DURCILENE ALVES DA SILVA, DANIEL BARBOSA LIARTE, JOSY ANTEVELI OSAJIMA, EDSON CAVALCANTI DA SILVA FILHO foi apresentado na modalidade Pôster no 1º Encontro Piauiense de Química e Inovação, realizado nos dias 24 e 25 de Maio de 2018, na Universidade Federal do Piauí, Campus Parnaíba.

Parnaíba-PI, 25 de Maio de 2018.

Prof. Dra. Durcilene Alves da Silva  
Presidente da comissão do I EPQUIN

Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho  
Presidente da ABQ

