

João David Panão da Costa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Chitosan-based Nanoparticles for Gene Delivery” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Ana Rita Pereira, Dra. Maria Eugénia Amaral e da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Front page figure caption: Image illustrating nanoparticle (red) gene delivery to cells (blue).

João David Panão da Costa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Chitosan-based Nanoparticles for Gene Delivery” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Ana Rita Pereira, Dra. Maria Eugénia Amaral e da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017

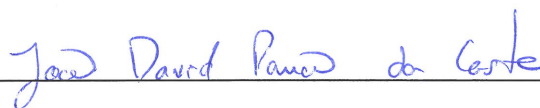


UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João David Panão da Costa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012144155, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Chitosan-based Nanoparticles for Gene Delivery” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de setembro de 2017.



(João David Panão da Costa)

Agradecimentos

Quero deixar uma palavra de gratidão a todos os meus colegas e professores que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a minha aprendizagem e crescimento. Uma palavra especial para os meus colegas e amigos Pimentel, Jaílson, Márcio e Diogo, com quem partilhei muitos momentos e gargalhadas que guardarei para a vida. A eles desejo a maior sorte do mundo.

À minha orientadora do estágio em Farmácia Comunitária, Dr.^a Ana Rita Pereira, assim como a toda a equipa técnica da “Farmácia São Tomé” que se mostraram sempre disponíveis para me ajudar e que confiaram em mim desde o início. Obrigado pelos bons momentos passados.

À minha orientadora do estágio em Indústria Farmacêutica, Sr.^a Eng.^a Maria Eugénia Amaral, e a toda a equipa do departamento da Garantia da Qualidade da “Farmalabor” pela forma como me integraram na equipa, pelos conhecimentos transmitidos e pelo espírito de entreajuda e partilha, que tanto enriqueceram esta experiência.

À minha orientadora da monografia, Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro, que acompanhou a minha evolução ao longo destes anos no laboratório. Obrigado por proporcionar este primeiro contacto com a investigação científica e por permitir que o “bichinho” da Ciência crescesse em mim.

À Sandra e à Edna, obrigado por partilharem comigo toda a vossa experiência e conhecimentos e, acima de tudo, pela amizade e pelos momentos partilhados no “Nanolab”.

Aos meus avós, madrinha e amigos pelo contributo prestado ao longo destes anos e por me acompanharem nesta caminhada. Sem o vosso apoio seria sem dúvida muito mais difícil.

À minha namorada Carolina, agradeço todo o amor e paciência. Obrigado por teres estado sempre presente quando mais precisava e por me deixares sempre com um sorriso na cara. Contigo ao meu lado, tudo é mais fácil.

Deixo ainda, de uma forma muito especial, um agradecimento à minha mãe, ao meu pai e meu irmão, que sempre foram um dos principais pilares na minha vida. Agradeço toda a motivação e oportunidades que me deram, assim como todos os momentos que passámos em família. Obrigado por todos os esforços e sacrifícios que fizeram por mim e espero, algum dia, poder retribuir.

Índice

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	1
1. Introdução.....	2
2. Análise SWOT	4
2.1. Pontos Fortes	4
a) Época do ano	4
b) Tecnologia na Farmácia São Tomé	4
c) Frequência, plano de estágio e integração na equipa e tarefas da farmácia.....	5
d) Presença de apenas um estagiário.....	5
2.2. Pontos Fracos	6
a) Dificuldade na interpretação de receitas manuais.....	6
b) Dificuldades no aconselhamento nos diversos produtos dermocosméticos	6
2.3. Oportunidades de Melhoria	6
a) Nomes comerciais de medicamentos	6
b) Formação sobre as atividades de <i>back-office</i>	7
2.4. Ameaças	7
a) Utentes mal informados	7
b) Falta de confiança nos estagiários.....	8
3. Casos Práticos.....	9
4. Considerações Finais	11
PARTE II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica	13
Lista de Abreviaturas	14
1. Introdução.....	15
2. Enquadramento Teórico.....	15
2.1. Indústria Farmacêutica	15
2.2. Grupo Medinfar.....	16
2.3. Farmalabor.....	16
2.4. Garantia da Qualidade	17
3. Estágio.....	20
4. Análise SWOT	21
4.1. Pontos Fortes	21
a) Receção e integração dos estagiários.....	21
b) Instalações e localização	21
c) Departamento multidisciplinar.....	21
d) Equipa	22
e) Contacto com outros setores da empresa.....	22

4.2.	Pontos Fracos	23
a)	Dificuldade em integrar toda a componente regulamentar	23
b)	Duração do estágio	23
4.3.	Oportunidades de Melhoria	23
a)	Plano de estudos	23
b)	Realidade profissional de uma Indústria Farmacêutica	24
4.4.	Ameaças	24
a)	Trabalho sobre pressão.....	24
b)	Dependência da disponibilidade de profissionais.....	25
5.	Considerações Finais	26
6.	Bibliografia.....	27
PARTE III – Chitosan-based Nanoparticles for Gene Delivery.....		28
Abstract		29
Resumo		30
Abbreviations.....		31
1.	Introduction.....	32
2.	Materials and Methods.....	37
2.1.	Materials.....	37
2.2.	Methods	37
2.2.1.	Nanoparticle production	37
2.2.1.1.	Chitosan- α -Casein Nanoparticle Production	37
2.2.1.1.1.	Stability test.....	38
2.2.1.2.	ChiCas NPs Production followed by DNA adsorption.....	38
2.2.1.3.	ChiCas NPs Production with incorporated DNA.....	39
2.2.2.	Size and Zeta potential measurements.....	39
2.2.3.	DNA complexation assay: agarose gel retardation assay.....	39
2.2.4.	Nanoparticle production for Transfection studies	40
2.2.5.	Transfection studies	43
3.	Results.....	44
3.1.	Nanoparticle production and stability tests.....	44
3.2.	Characterization of ChiCas NPs loaded with DNA	48
3.3.	Transfection studies	50
4.	Discussion	52
5.	Conclusion and future perspectives.....	55
6.	References	56

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

I. Introdução

O farmacêutico, enquanto especialista do medicamento, realiza um papel fundamental na promoção da saúde pública. Deve, em todos os momentos, zelar pelo bem-estar do doente e contribuir ativamente para melhorar a qualidade de vida do cidadão em geral. O desempenho desta atividade de forma rigorosa, responsável e competente, quer a nível técnico e científico, quer a nível ético e deontológico, faz da farmácia comunitária um local de confiança e confiança para todos os utentes.

Deste modo, as farmácias e os farmacêuticos tornaram-se indispensáveis para o bom funcionamento do sistema de saúde, não só na medida em que são responsáveis pela dispensa de medicamentos e outros produtos com valor em saúde, mas também pela prestação de serviços farmacêuticos, promoção do uso racional dos fármacos e manipulação de medicamentos.

As Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária definem indicação farmacêutica como “...o ato profissional pelo qual o farmacêutico se responsabiliza pela seleção de um medicamento não sujeito a receita médica e/ou indicação de medidas não farmacológicas, com o objetivo de aliviar ou resolver um problema de saúde considerado como um transtorno menor ou sintoma menor, entendido como problema de saúde de carácter não grave, auto-limitante, de curta duração, que não apresente relação com manifestações clínicas de outros problemas de saúde do doente.”(ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2009). Uma indicação farmacêutica de excelência aliada à formação contínua dos profissionais e a um investimento tanto a nível tecnológico, como económico, permitiram que a farmácia comunitária portuguesa se adaptasse às diversas conjunturas ao longo dos anos, tornando-se numa instituição robusta, credível e de confiança. Isso possibilitou que esta tomasse um lugar de destaque em relação a outros prestadores de serviços, dispensadores de produtos e, também, dentro da sociedade.

“As funções assumidas pelo farmacêutico na sociedade portuguesa traduzem-se numa afirmação crescente que ultrapassa o seu papel enquanto técnico do medicamento. O aconselhamento sobre o uso racional dos fármacos e a monitorização dos utentes inscrevem-se na necessidade de encontrar formas mais coerentes de funcionamento do sistema de saúde em Portugal e no mundo” (Faria, [s.d.]). É enquanto agente de saúde pública e especialista do medicamento que o farmacêutico tem de valorizar o seu papel dentro da população, dirigindo os seus esforços e dinamismo para a pessoa do doente, prevenção da doença e promoção da saúde, tendo sempre em vista uma prática profissional de qualidade, eficaz e segura.

Em suma, é imperativo que o farmacêutico realize as suas funções de forma competente, crítica e responsável, pois as suas ações vão ter um impacto preponderante para

além do espaço físico da farmácia, produzindo efeitos em toda a sociedade. Neste sentido, o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas possui enorme relevância na formação académica do jovem farmacêutico, não só pela aprendizagem teórica transmitida na faculdade, mas também pela oportunidade de consolidar todos esses conhecimentos adquiridos através da realização de estágios curriculares no segundo semestre do quinto ano. O estágio curricular em Farmácia Comunitária tem especial importância por permitir vivenciar o quotidiano de uma farmácia, possibilitar um primeiro contacto com a população e estimular o crescimento do estudante a nível profissional e social.

A Farmácia São Tomé, em Condeixa-a-Nova, foi o local escolhido para a realização do meu estágio curricular, uma vez que se trata de uma farmácia perto do meu local de residência, com um perfil que considerei apropriado para a minha aprendizagem enquanto estagiário. O estágio decorreu entre os dias 9 de janeiro e 29 de abril, sob a orientação da Dr.^a Ana Rita Pereira.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes

a) Época do ano

Como já foi referido, o estágio decorreu entre o início de janeiro e o fim de abril. Este alargado período de tempo permitiu que eu fosse confrontado com uma variedade de situações resultantes das diferentes condições climatéricas e problemas de saúde sazonais. No início do estágio, deparei-me com bastantes casos de gripe, constipações e febre, assim como dores de garganta, tosse e congestão nasal. Na fase final do estágio, constatei um crescendo de problemas do foro alérgico e uma maior saída de protetores solares e outros produtos relacionados com o tempo quente. Esta panóplia de situações permitiu-me aprofundar o conhecimento sobre as possíveis terapêuticas para dispensa na farmácia, assim como o aconselhamento adequado ao caso concreto.

b) Tecnologia na Farmácia São Tomé

A Farmácia São Tomé tem ao seu dispor um robot de farmácia, ROWA, associado à empresa Glintt. Este robot permite otimizar a arrumação dos medicamentos bem como a dispensa destes aos utentes. Encontra-se dividido em filas, cada uma com prateleiras e em cada prateleira uma posição correspondente, onde são arrumadas as embalagens pelo braço do robot. No que toca à dispensa de medicamentos, segue a regra “*first in, first out*”, uma vez que o operador introduz manualmente os prazos de validade aquando da introdução da caixa na esteira rolante de entrada. Desta forma, todo o processo de armazenamento de medicamentos, a sua dispensa ao utente e o controlo dos prazos de validade é muito mais eficaz, poupando-se espaço de armazém e simplifica o processo de dispensa. É assim de fácil compreensão o valor de um investimento como este, pois o auxílio do robot permitiu aligeirar o método de arrumação dos medicamentos e diminuir o tempo de atendimento por utente, libertando os profissionais para outras tarefas.

Uma tecnologia também notória na zona do atendimento é o “*Cashguard*”, no qual é introduzido o pagamento e cedido o troco automaticamente, minimizando o tempo operacional, a ocorrência de erros humanos, permitindo rastreabilidade de pagamentos e o aumento da segurança monetária.

Durante o meu estágio, contactei com toda esta moderna tecnologia, compreendendo a importância de uma constante adaptação e inovação tecnológica por parte das farmácias portuguesas.

c) Frequência, plano de estágio e integração na equipa e tarefas da farmácia

Começo por salientar o ótimo ambiente vivido na Farmácia de São Tomé e o forte espírito de entreatajuda que foram, sem dúvida, uma mais-valia neste estágio. Toda a equipa demonstrou sempre grande disponibilidade e vontade de me transmitir os conhecimentos essenciais para o correto desempenho de todas as atividades, depositando em mim a confiança e a autonomia necessárias para o exercício de todas as tarefas e para o meu desenvolvimento profissional.

Este estágio na Farmácia São Tomé iniciou-se pelo desenvolvimento de atividades na área do aprovisionamento, armazenamento e gestão de *stocks*. Estes conhecimentos demonstraram ser bastante úteis no início do estágio, uma vez que me permitiu dominar todo o conjunto de operações que asseguram a reposição do *stock* de produtos, bem como o bom funcionamento do *back-office* que é feito em farmácia.

Desta forma, quando iniciei a prática farmacêutica ao balcão, já sabia como funcionava o circuito do medicamento, a gestão de *stocks* e os locais de arrumação ou exposição dos produtos, diminuindo o tempo gasto na procura dos mesmos durante o atendimento, tornando-o assim mais rápido e dinâmico. No início, acompanhei um farmacêutico na realização de atendimento ao público, o que fez com que rapidamente me tornasse autónomo. É claro que quando existia alguma dúvida, alguém da equipa estava sempre disposto a esclarecer-me, contribuindo para o meu processo de aprendizagem.

Ao longo do estágio tive ainda a oportunidade de realizar tarefas no âmbito da medição de indicadores bioquímicos e fisiológicos e entrega de medicamentos a lares, clínicas e creches.

d) Presença de apenas um estagiário

Ser o único estagiário naquela farmácia foi dos pontos que considero mais importantes do meu estágio, uma vez que possibilitou que tivesse um acompanhamento personalizado e atento por parte de toda a equipa, que, provavelmente, não aconteceria se houvesse outros estagiários. Senti a necessidade de me tornar independente e autónomo rapidamente. Desde cedo que me foi inculcido um elevado sentido de responsabilidade, dinamização e autonomia

na realização das tarefas por parte de toda a equipa. Esta confiança em mim depositada resultou numa rápida evolução e permitiu uma melhor consolidação de processos.

2.2. Pontos Fracos

a) Dificuldade na interpretação de receitas manuais

Apesar de aparecerem cada vez menos receitas manuais nas farmácias, em casos de falência informática, prescrição no domicílio ou inadaptação do prescriptor ao sistema informático, os prescritores ainda recorrem a este tipo de receitas.

Uma das dificuldades que senti foi perceber o que estava prescrito em determinadas receitas, devido à caligrafia de alguns médicos, tendo que recorrer à ajuda de elementos da equipa técnica da farmácia para entender o princípio ativo ou a posologia prescrita. Situações como esta afetavam a qualidade do atendimento devido ao tempo despendido e às várias interrupções necessárias para uma correta interpretação da receita.

b) Dificuldades no aconselhamento nos diversos produtos dermocosméticos

A existência de uma vasta gama de marcas na área da dermocosmética e de diversas gamas e produtos dentro das mesmas, dificultou o aconselhamento nesta área, uma vez que, para um aconselhamento correto para cada indicação, é necessário conhecer aprofundadamente cada produto. A experiência ganha ao longo do tempo permitiu-me obter um maior conhecimento sobre cada produto específico, o que tornou a tarefa mais fácil e com um melhor direcionamento do utente para uma determinada marca ou gama de produtos.

2.3. Oportunidades de Melhoria

a) Nomes comerciais de medicamentos

Ao longo da nossa formação académica, a nomenclatura das substâncias químicas é lecionada segundo a Denominação Comum Internacional. Na minha opinião, é a forma mais correta de ensinar e a mais fácil de aprender para os estudantes. Contudo, durante o período inicial do meu estágio, senti alguma dificuldade em associar esta denominação aos nomes

comerciais dos medicamentos. Alguns utentes, polimedicados e com uma extensa guia de tratamento, pediam um fármaco com um determinado nome comercial e por vezes era difícil para mim encontrar o princípio ativo correspondente na prescrição. Com a experiência adquirida ao longo do estágio, fui sendo capaz de assimilar esses conhecimentos, conseguindo cada vez mais fazer essas associações quando era necessário.

b) Formação sobre as atividades de *back-office*

No decorrer do estágio pude constatar que, para que haja um bom funcionamento do atendimento ao público, bem como de toda a farmácia, é crucial que as atividades de *back-office* sejam desempenhadas de uma forma eficiente e responsável, pois a otimização destas tarefas está na base da sustentabilidade da farmácia. Notei alguma dificuldade em executar e perceber estas atividades de *back-office*, que apesar de complexas, são fundamentais para a farmácia. Penso que seria um aspeto onde a nossa formação académica poderia melhorar, nomeadamente no âmbito da gestão económica e financeira de uma farmácia.

Por outro lado, apesar da formação ministrada aos estudantes sobre o Sifarma 2000[®], senti algumas dificuldades iniciais na adaptação a este programa, dificuldades estas que foram sendo ultrapassadas com o contacto diário com o *software*.

2.4. Ameaças

a) Utesntes mal informados

Atualmente, quase todas as pessoas têm ao seu alcance uma enorme variedade de fontes de informação. Se por um lado, tal facto requer que o farmacêutico se mantenha constantemente atualizado, por outro gera situações em que os utentes se encontram mal informados. Por vezes, é difícil lidar com estes casos, sendo necessário ter alguma sensibilidade para fazer a pessoa perceber que as informações adquiridas através dos meios de comunicação familiares e amigos, podem estar incorretas e que o mais seguro é confiar no conhecimento e trabalho do farmacêutico.

b) Falta de confiança nos estagiários

Durante o tempo que estive no atendimento ao público, alguns utentes fizeram questão de serem atendidos pelos profissionais da equipa da farmácia. Embora pouco frequente, tal situação colocou um entrave ao desenvolvimento das minhas competências ao balcão.

Houve também casos em que o utente exigia uma “segunda opinião” de outro elemento da equipa sobre a informação que eu lhe estava a transmitir. Este problema ocorreu principalmente nos casos em que nos recusávamos a ceder antibióticos sem prescrição médica ou quando tentávamos explicar o significado do preço de referência do grupo homogéneo do medicamento em causa, constante na guia de tratamento. Embora percebesse a perspetiva do doente, confesso que a falta de autoconfiança afetou o meu desempenho em alguns atendimentos.

3. Casos Práticos

Ao longo do meu estágio curricular, foram muitas as oportunidades que tive de contactar diretamente com os utentes, facultando o acompanhamento e o aconselhamento da forma que julgava ser a mais correta, sempre com o máximo de rigor e de responsabilidade.

Das situações de aconselhamento farmacêutico que me surgiram durante o estágio, decidi salientar os seguintes casos práticos:

Caso Prático 1:

Um senhor de 30 anos, dirigiu-se à farmácia no período da manhã, refere que está com diarreia desde a tarde do dia anterior e pede algo que pare, o quanto antes, aquela situação, pois vai ter várias reuniões importantes nessa tarde.

IF: Primeiramente questionei o utente se tinha sentido, em alguma ocasião, febre, dores fortes na zona abdominal ou se relacionava o sucedido com algum alimento ingerido, respondendo o mesmo que não, a todas as questões. Referiu também que não toma qualquer tipo de medicação regular e que não tem problemas gastrointestinais recorrentes, mas que se tinha sentido nervoso nos últimos dias.

Comecei por sugerir medidas não farmacológicas como a hidratação. De seguida, recomendei a toma de UL-250 cápsulas (250 mg de células liofilizadas de *Saccharomyces boulardii*), uma cápsula, três vezes ao dia, para normalizar a flora intestinal. Adicionalmente, recomendei também Imodium Rapid (2 mg de cloridrato de loperamida) orodispersível. No que toca à posologia, referi que, a dose inicial é de dois comprimidos, tomando, posteriormente, um comprimido após cada dejeção diarreica. Também salientei que a dose máxima diária é de oito comprimidos e que, caso a situação se agravasse, ou seja, se aparecessem fezes com sangue, purulentas, gordurosas, se tivesse febre, vômitos ou, mesmo se tomando o Imodium, a diarreia permanecesse, deveria dirigir-se ao serviço de urgências.

Caso Prático 2:

Uma senhora, com 50 anos, dirigiu-se à Farmácia referindo que apresenta, há aproximadamente 3 dias, uma afta na bochecha com dor ao toque, que já compromete tanto uma adequada alimentação, bem como uma correta higiene oral.

IF: Primeiramente, tentei perceber qual a causa da úlcera, perguntando se existia algum fator traumático local ou se a senhora tinha comido alimentos mais propensos para o aparecimento deste tipo de lesões. A senhora referiu que não conseguia associar nenhuma destas causas ao surgimento da úlcera.

Aconselhei a utilização de Urgo Aftas para aplicação localizada sobre a afta. Este irá atuar como uma película protetora, aliviando a dor e favorecendo a cicatrização. Deve ser aplicado sempre que necessário, até 4 vezes ao dia, de preferência antes das refeições.

A utilização de um colutório de 0.12 % de clorhexidina para redução da carga bacteriana oral total também foi recomendado. Este deve ser apenas utilizado durante o período máximo de 15 dias, após o qual os efeitos secundários da clorhexidina começam a surgir. No que toca à posologia, indiquei 10 ml duas vezes ao dia, após escovagem dentária.

Salientei que este tipo de úlceras se tratam de lesões auto-limitantes, que acabam por se resolver entre 10 a 13 dias. Se tal não acontecer, sugeri a marcação de uma consulta de Medicina Dentária.

Caso Prático 3:

Um jovem de 20 anos, dirigiu-se à Farmácia referindo que sente uma dor localizada na parte superior do joelho resultante de uma intensa prática desportiva. Menciona ainda que esta lesão já se arrasta há algum tempo, mas que ultimamente tem piorado, e que tem de estar apto a jogar no fim de semana.

IF: Sendo impossível cessar o exercício físico, comecei por aconselhar algumas medidas não farmacológicas, essenciais para uma boa prática desportiva, nomeadamente realizar um bom aquecimento, fazer alongamentos antes e depois do treino e colocar gelo no local afetado após a prática desportiva, durante 15 minutos. Referi ainda que, por se tratar de uma lesão numa articulação, seria prudente não recorrer de imediato a ações farmacológicas sistémicas, iniciando-se por ações locais. Salientei que seria importante aplicar um gel de aquecimento no joelho momentos antes dos treinos, para se sentir melhor durante o exercício físico, assim como colocar uma pomada anti-inflamatória, por exemplo de diclofenac, após fazer o gelo no joelho. Finalmente, destaquei que se a situação se agravasse ou se prolongasse por muito tempo, deveria dirigir-se a um médico.

4. Considerações Finais

O estágio na Farmácia São Tomé foi, sem dúvida, uma etapa fundamental para a minha formação enquanto futuro farmacêutico. Durante o tempo que estive nesta farmácia, tive a oportunidade de aplicar, consolidar e desenvolver os conhecimentos adquiridos ao longo do curso e de perceber a importância do papel do farmacêutico na promoção da saúde pública e na sociedade.

No decorrer do estágio, senti-me sempre motivado em aprender e tentei diariamente ajudar no desempenho das tarefas da farmácia.

Este estágio permitiu não só a minha evolução a nível académico e científico, mas também ao nível das vertentes social e humana, principalmente pelo contacto que tive com a população.

Durante este período, pude contactar com a realidade do quotidiano de uma farmácia comunitária. O excelente ambiente vivido aliado à confiança em mim depositada desde o início pela equipa da farmácia, permitiu-me assumir algumas responsabilidades, tendo contribuído bastante para o meu desenvolvimento e crescimento enquanto pessoa e futuro profissional.

Finalmente, considero que foi um estágio extremamente positivo e enriquecedor, não só pela quantidade de ensinamentos e experiências adquiridas, mas também pelos bons momentos passados na Farmácia São Tomé.

5. Bibliografia

FARIA, Elisabete - **Farmácia Comunitária** [Em linha] [Consult. 7 jun. 2017]. Disponível em WWW:<URL:url:http://www.ordemfarmaceuticos.pt>.

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)**. 3ª edição ed.

PARTE II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

Lista de Abreviaturas

BPF – Boas Práticas de Fabrico

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GQ – Garantia da Qualidade

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

RQP – Revisão da Qualidade do Produto

SGQ – Sistemas de Gestão de Qualidade

I. Introdução

Durante os cinco anos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) procura formar profissionais técnica, científica e humanamente competentes, aptos para desempenhar a profissão farmacêutica de forma única, destacada e responsável.

A realização do estágio curricular no final do curso possibilita o contacto com a realidade da profissão, tendo por isso uma enorme relevância.

Desta forma, estando ciente de que o farmacêutico é um profissional capaz de executar todas as competências associadas ao medicamento, e perante a oportunidade de realizar um segundo estágio em Farmácia Hospitalar, Análises Clínicas ou Indústria Farmacêutica, optei por terminar esta última etapa do meu curso no setor industrial. A área da Indústria Farmacêutica sempre me despertou interesse e curiosidade, e não tive dúvidas que este seria o percurso correto para aprender e realizar o meu primeiro contacto com o meio profissional.

O presente relatório tem como objetivo descrever e refletir sobre os conhecimentos adquiridos ao longo do estágio na unidade industrial “FARMALABOR – Produtos Farmacêuticos, S.A.”. Este estágio foi orientado pela responsável do departamento da Garantia da Qualidade (GQ), Sr.^a Eng.^a Maria Eugénia Amaral, e decorreu entre os dias 2 de maio e 28 de julho.

2. Enquadramento Teórico

2.1. Indústria Farmacêutica

“A Missão da Indústria Farmacêutica é fomentar a inovação e o desenvolvimento de terapêuticas que respondam às necessidades de tratamento e prevenção de novas patologias, bem como disponibilizar medicamentos que constituam uma melhoria para a saúde e qualidade de vida das populações. Ao levar a cabo a sua missão, a Indústria Farmacêutica defende elevados padrões éticos e de qualidade, a que se aliam a responsabilidade social e o dever de solidariedade.” (Apifarma, [s.d.]).

Esta Indústria é um dos setores de atividade mais regulamentados do mercado. A legislação, as Boas Práticas e os códigos éticos e deontológicos que a regem, garantem o controlo rigoroso dos processos. Toda esta regulamentação, aliada à constante aposta da

Indústria Farmacêutica na inovação e desenvolvimento de novas terapêuticas, têm como intuito final um aumento de qualidade da saúde pública.

2.2. Grupo Medinfar

A Medinfar é uma empresa de Indústria Farmacêutica de capitais privados portugueses. Fundada em 1970 e com sede em Lisboa, a Medinfar aumentou a sua capacidade de produção em 2001, ao adquirir a Farmalabor, em Condeixa-a-Nova, à empresa internacional Grünenthal.

A Investigação e Desenvolvimento, o fabrico de Produtos Farmacêuticos, Cosméticos, Suplementos e o departamento de Marketing e Vendas são alguns dos pilares que sustentam o grupo e o impulsionam para a internacionalização em mais de 50 países (*Grupo Medinfar*, [s.d.]). Tendo como foco principal a melhoria contínua da qualidade dos seus serviços e produtos, a política do Grupo Medinfar assenta na satisfação das necessidades dos seus clientes e na responsabilidade social, quer na vertente ambiental, quer na da segurança.

A competitividade adquirida por esta empresa resulta do forte investimento nas suas unidades de negócio, na modernização tecnológica e no constante melhoramento da sua diversificada gama de produtos. A sua aposta na tecnologia, nos recursos humanos e no compromisso com a Qualidade é decisiva para permitir responder às solicitações do mercado farmacêutico a nível mundial.

2.3. Farmalabor

Inicialmente, com a designação de Euro-Labor, esta indústria do setor farmacêutico foi fundada na cidade de Coimbra, no ano de 1962. Começou por se dedicar apenas ao fabrico de medicamentos para uso exclusivo. Só em 1985 iniciou a produção de medicamentos para clientes, tornando-se necessária a construção de uma nova unidade fabril, devido ao crescimento da atividade. A construção foi finalizada em 1990, localizando-se na Zona Industrial de Condeixa-a-Nova, onde se encontra até à data.

Nesse mesmo ano, a Euro-Labor associou-se a um grupo internacional, a Grünenthal, que em 1995 adquire a totalidade do capital social da empresa. Posteriormente, em 2001, já com o nome de Farmalabor, foi vendida ao Grupo Português, Medinfar. Atualmente, a Farmalabor conta com cerca de 120 colaboradores, mais de 50 clientes nacionais e internacionais e uma capacidade bruta anual de 50 milhões de unidades.

A sua atividade assenta na produção de produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos por fabrico para terceiros (“*Contract Manufacturing*”), disponibilizando aos seus clientes uma extensa gama de soluções, desde a conceção até ao produto acabado, passando por todas as fases analíticas, permitindo um serviço personalizado à medida das necessidades de cada cliente (*Farmalabor*, [s.d.]).

É uma empresa que aposta em jovens profissionais portugueses e procura dotar-se de uma infraestrutura humana alinhada com as exigências do negócio, de forma a que a cadeia de confiança e compromisso seja assegurada.

A Farmalabor possui uma estrutura organizacional composta por:

- Direção
- Direção Técnica
- Direção Industrial
 - Assessoria
 - Planeamento
 - Garantia da Qualidade
 - Ambiente e Segurança
- Setores
 - Armazém/Logística
 - Manutenção Industrial
 - Controlo de Qualidade
 - Produção (Formas Sólidas, Líquidas e Pastosas e Embalagem)

2.4. Garantia da Qualidade

A saúde da população está dependente da disponibilidade de medicamentos que cumpram os critérios padrão de qualidade, eficácia e segurança.

A Garantia da Qualidade é o conjunto de todas as operações efetuadas no interior de uma organização, tendo como objetivo assegurar que os produtos produzidos cumprem os requisitos e mantêm a qualidade necessária para a sua utilização. É um conceito muito abrangente, que envolve todas as atividades que possam ter influência na qualidade dos produtos ou serviços.

A legislação farmacêutica e os requisitos regulamentares aplicáveis à Indústria Farmacêutica têm sofrido uma rápida evolução nos últimos anos, resultante das constantes

alterações na área, incluindo a contínua inovação tecnológica e uma maior exigência imposta pelo mercado.

Deste modo, uma política assente na Garantia da Qualidade permite uma redução do número de produtos não-conformes e da taxa de erros associados, rentabilizando os recursos e minimizando os custos. Isto é essencial para que se fortaleça a capacidade competitiva de uma empresa e se assegure o seu sucesso num mercado cada vez mais rigoroso.

Neste sentido, e reconhecendo a relevância de garantir a melhoria constante da qualidade de produtos e serviços, empresas como a Farmalabor têm adotado Sistemas de Gestão de Qualidade (SGQ) com o objetivo de gerar confiança no cumprimento sistemático da legislação, das normas aplicáveis, dos requisitos do cliente e dos requisitos internos da empresa.

O SGQ contempla um conjunto de atividades coordenadas e interligadas para controlar e orientar a empresa, tendo em vista a prevenção de erros e a contínua melhoria da eficiência e eficácia do seu desempenho ao longo das atividades do ciclo do medicamento. O SGQ é, desta forma, transversal a todas as atividades que possam ter impacto na qualidade dos produtos.

Assim, é de extrema importância e responsabilidade algumas das atividades realizadas na Garantia da Qualidade:

- Controlo de alterações: Para garantir uma contínua adequação das instalações e equipamentos, a eficiência dos processos, a qualidade do produto farmacêutico e a conformidade com os documentos submetidos pela concessão da autorização de mercado, o aparecimento de propostas de alterações é comum e necessário. A Garantia da Qualidade é responsável pela avaliação do potencial impacto das alterações solicitadas e das suas consequências na qualidade do produto, atendendo às Boas Práticas de Fabrico (BPF) em vigor, bem como ao acompanhamento das ações necessárias à alteração.
- Controlo de desvios e não conformidades: Um desvio é qualquer alteração não planeada ou não satisfação de um requisito. A causa é investigada e identificada, o seu impacto ao nível da qualidade do produto é avaliado e são estabelecidas as ações corretivas e/ou preventivas necessárias, cuja eficácia é posteriormente avaliada.
- Validação do processo de fabrico: É uma exigência das Boas Práticas de Fabrico (BPF), que pretende evidenciar documentalmente que determinado processo, operado dentro de parâmetros estabelecidos, é confiável e reprodutível, resultando num produto de alta

qualidade. Qualquer alteração significativa das instalações, do equipamento e dos processos passíveis de afetar a qualidade do produto deve estar validada.

- Validação de higienização: Visa assegurar que, após a execução dos procedimentos de limpeza, os resíduos dos produtos fabricados previamente, resíduos do próprio agente de limpeza e resíduos microbiológicos estão dentro dos limites aceitáveis. Esta validação pretende obter a evidência documental que o processo de higienização diminui os riscos de contaminação cruzada em produtos subsequentes e garante a qualidade do produto acabado.

- Gestão de Risco: O risco é definido como a combinação da probabilidade de ocorrência de uma falha, a probabilidade de esta vir a ser detetada e a sua severidade. A gestão do risco de qualidade é um processo sistemático para deteção, avaliação, controlo, comunicação e revisão de danos que afetem a qualidade de um fármaco em todo o seu ciclo de vida. O nível de esforço empregue em todo o processo deve ser proporcional ao nível do risco.

- Qualificação de fornecedores: Tem como objetivo garantir que os fabricantes e fornecedores de substâncias ativas e excipientes têm capacidade e competência para cumprir os requisitos internos e legais inerentes à indústria farmacêutica, uma vez que o fabrico e distribuição influenciam a qualidade, segurança e eficácia dos produtos. Esta qualificação consiste num processo de avaliação do desempenho do fabricante e do fornecedor ao longo do tempo, desde a fase de seleção, passando pela avaliação contínua e auditorias.

- Revisão da Qualidade do Produto (RQP): Constitui um requisito regulamentar para todos os fabricantes de produtos farmacêuticos e consiste na revisão periódica da qualidade dos produtos. Funciona como uma ferramenta capaz de atestar que cada lote fabricado cumpre os requisitos e demonstrar que os produtos de qualidade são fabricados de forma reprodutível ao longo do tempo.

- Gestão de documentos e registos: Consiste na elaboração, revisão, aprovação, distribuição, alteração, arquivo e eliminação de documentos. A gestão documental é considerada um dos pilares do sistema da qualidade, uma vez que permite que o cumprimento dos requisitos estabelecidos seja evidenciado, a informação relativa às várias atividades seja atualizada e do conhecimento dos colaboradores da empresa e ainda, estimula a melhoria contínua dos processos e do sistema como um todo. Com a sistematização de cada atividade

e o seu desenvolvimento de forma controlada, uniforme e integrada, a qualidade do produto ou serviço da empresa tende a ser assegurada, contribuindo, desta forma, para a sua competitividade.

3. Estágio

O estágio na Farmalabor decorreu no departamento da Garantia da Qualidade, embora tenha tido a oportunidade de, durante cerca de uma semana, visitar e acompanhar de perto a área da produção, nomeadamente a secção das formas sólidas, a secção das formas líquidas e pastosas, bem como a secção da embalagem.

Numa primeira fase, tive a oportunidade de tomar conhecimento de documentos internos como o Manual da Instalação Fabril, o Plano Mestre de Validação e de procedimentos gerais de qualidade, como o Controlo de Alterações, Desvios e Não-conformidades, Validação do Processo de Fabrico, Acesso e circulação, Controlo de documentos e registos, Revisão da Qualidade do Produto (RQP), Gestão de Risco da Qualidade, entre outros.

Conforme previsto no plano de estágio, recebi formação individualizada de cada elemento da equipa da Garantia da Qualidade sobre as atividades que realizam no seu quotidiano.

Durante o meu estágio, dediquei-me à elaboração e revisão de Instruções de Fabrico e de Embalagem, à investigação de desvios e não-conformidades, à realização de validações de higienização e ao auxílio na elaboração de programas de gestão de risco.

Gostaria de destacar que fui muito bem acolhido por toda a organização e, em especial pela equipa da Garantia da Qualidade. Toda a equipa contribuiu para que esta experiência fosse a mais enriquecedora e gratificante possível, tendo demonstrado sempre disponibilidade e vontade de transmitir os conhecimentos necessários para o correto desempenho de todas as tarefas e esclarecimento de qualquer dúvida, depositando em mim a confiança e autonomia necessárias para o exercício de todas as atividades.

4. Análise SWOT

4.1. Pontos Fortes

a) Recepção e integração dos estagiários

O Grupo Medinfar tem por costume dedicar um dia à recepção dos novos estagiários, para apresentação da empresa, com destaque para a sua história, crescimento e as atividades pelas quais é responsável atualmente. Também é dada uma formação sobre higiene e segurança no trabalho, e apresentado o plano de estágio.

Todo este programa é vantajoso para os estagiários, já que, sendo um mundo totalmente diferente do experienciado até ao momento, é fulcral que a integração no mesmo se dê de forma gradual e adequada.

b) Instalações e localização

Quanto às instalações, em geral apresentam boas condições e estão sempre muito bem higienizadas. É importante também referir que possui uma cantina, com três pratos à escolha e um bar sempre disponível para servir café no intervalo da manhã, da tarde e do almoço. É de salientar que, durante todo o meu estágio, o almoço foi sempre oferecido, algo que não é comum aos estagiários não remunerados.

A Farmalabor situa-se na zona industrial de Condeixa-a-Nova, o que, na minha situação, a torna bastante conveniente, uma vez que se situa perto da minha residência.

c) Departamento multidisciplinar

Uma das vantagens de ter estagiado no departamento da Garantia da Qualidade foi o facto de este trabalhar em estreita colaboração com todos os outros sectores da empresa. A garantia da qualidade é necessária ao longo de todas as atividades do ciclo do medicamento. Isto permitiu-me alargar os horizontes e ter uma visão geral do que é realizado nas outras secções da empresa.

d) Equipa

Na minha opinião, o trabalho de equipa é um elemento fundamental para que se atinja um determinado objetivo. Sendo a Garantia da Qualidade uma equipa multidisciplinar, o contributo de cada individuo é essencial para o sucesso da empresa.

O conceito de “equipa” foi uma noção sempre presente nestes meses que estive na Garantia da Qualidade. A prova disso é a grande interligação entre os vários profissionais, o que permite a resolução dos problemas de forma bastante rápida e eficaz.

De facto, ao longo do meu estágio, qualquer membro da equipa se mostrou disposto a ensinar sobre as atividades pelas quais são responsáveis e a esclarecer qualquer dúvida, permitindo-me assim consolidar conhecimentos e reter novos conceitos.

e) Contacto com outros setores da empresa

Como referido anteriormente, a Garantia da Qualidade é transversal às várias atividades desenvolvidas na empresa e o entendimento dessa interligação é fundamental para o sucesso da empresa.

Para tal, durante cerca de uma semana, tive a oportunidade de visitar a Área da Produção – Secção das formas sólidas e Secção das formas líquidas e pastosas. Pude observar e participar na execução de vários processos de fabrico, como Misturas, Granulações, Secagens, Compressões, Enchimento de Cápsulas, Enchimento de Bisnagas, entre outros; contactar com as Boas Práticas de Fabrico e as normas de segurança; inteirar-me dos Controlos-Em-Processo realizados; analisar a adequabilidade das instalações, equipamentos e sistemas de suporte às operações efetuadas e aos requisitos exigidos.

Foi de certo uma vantagem estagiar numa empresa com capacidade de fabricar e acondicionar uma variedade tão grande de formas farmacêuticas, tanto líquidas (soluções, suspensões, xaropes), como pastosas (cremes, geles, supositórios) e até sólidas (comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, pellets, saquetas com pó/granulado).

Considero que esta semana foi fulcral para entender a aplicação prática dos documentos emanados pela Garantia da Qualidade, bem como tomar consciência da dinâmica, da organização e da cooperação entre os vários setores da empresa, cuja harmonia de funcionamento em muito se deve, inevitavelmente, ao trabalho desenvolvido pelo departamento da Garantia da Qualidade.

4.2. Pontos Fracos

a) Dificuldade em integrar toda a componente regulamentar

A Indústria Farmacêutica é reconhecida como um dos setores de atividade mais regulados do mercado, sendo incontáveis as orientações, requisitos e normas aplicáveis, o que torna a GQ complexa e exigente, obrigando a uma atualização constante.

Apesar de, ao longo da minha formação académica ter tido a oportunidade de estudar matérias de carácter regulamentar, bem como a legislação e as normas a que a Indústria Farmacêutica está sujeita, uma das dificuldades com que me defrontei foi não ter presente constantemente, todos os regulamentos, e a forma complexa de os aplicar sistematicamente.

Contudo, com o decorrer dos dias e com a integração no método de trabalho da equipa técnica, fui ganhando experiência e sendo capaz de me adaptar às diferentes circunstâncias.

b) Duração do estágio

Na minha opinião, o estágio em Indústria Farmacêutica deveria ter uma duração superior à atual. O tempo destinado ao estágio na indústria pode dificultar a integração do estagiário na empresa, tendo impacto tanto para as equipas como para a fábrica. Seria benéfico para a empresa e para o estagiário, se o estudante tivesse mais tempo para desenvolver um trabalho significativo, após a primeira fase de adaptação e de aquisição de conhecimentos.

Para além disso, a integração de um estagiário num departamento cria, sem dúvida, uma certa entropia na equipa e nas tarefas a realizar. A entidade precisa de tempo suficiente para adaptar as atividades ao perfil do estagiário, de modo a que este seja o mais rentável para a empresa.

4.3. Oportunidades de Melhoria

a) Plano de estudos

Uma vez que o meu estágio decorreu principalmente no departamento da GQ, senti que o plano de estudos da unidade curricular de Gestão e Garantia da Qualidade poderia ser ainda mais direcionado para a prática do quotidiano de uma empresa.

Na minha opinião, seria interessante aprender mais sobre, por exemplo, validações de higienização e de processo de fabrico, controlo de alterações, desvios e gestão de risco, de forma a complementar os conteúdos programáticos. Penso que seria uma mais-valia integrar estes temas no plano de estudos e estudá-los mais aprofundadamente.

b) Realidade profissional de uma Indústria Farmacêutica

Uma dificuldade que senti quando comecei o estágio na Farmalabor foi o desconhecimento da realidade profissional de uma Indústria Farmacêutica. Só no decorrer do estágio pude perceber como uma indústria funciona e de como os vários sectores se interligam. A meu ver, seria importante que um estudante, quando termina o curso, tivesse em sua posse toda a informação necessária para poder decidir a saída profissional pela qual pretende enveredar. Embora perceba que no caso das Indústrias Farmacêuticas seja complicado a existência de mais estágios curriculares acessíveis a mais estudantes, estes permitiriam uma decisão mais segura e fundamentada, por parte do aluno, sobre qual das diversas vertentes profissionais da área de Ciências Farmacêuticas seguir.

4.4. Ameaças

a) Trabalho sobre pressão

As atividades da Garantia da Qualidade estão frequentemente interligadas com o Setor da Produção, havendo assim necessidade de executar tarefas de elevadíssima responsabilidade, num curto espaço de tempo. Desta forma, neste departamento é necessário estar habituado a trabalhar sobre pressão, não podendo errar em nenhum pormenor, pois qualquer engano pode causar não-conformidades, ou até provocar perdas financeiras avultadas à empresa.

Como estagiário, embora não tivesse grandes responsabilidades, senti a pressão de execução de algumas tarefas prioritárias e fundamentais, que por muito simples que sejam, exigem um elevado nível de concentração e não permitem qualquer margem de erro.

Ao longo do estágio fui sendo capaz de me habituar a este tipo de trabalho, que em muito contribuiu para ganhar maturidade e crescer como profissional.

b) Dependência da disponibilidade de profissionais

Como é normal, um estagiário, para realizar as suas tarefas, está dependente dos elementos da equipa onde está inserido, que muitas vezes têm situações prioritárias a tratar. Durante o meu estágio, embora raros, houve momentos em que não fui capaz de avançar com as minhas atividades por falta de disponibilidade dos profissionais, quer para me esclarecer questões/dúvidas, quer para me atribuir novos trabalhos.

5. Considerações Finais

O Farmacêutico como agente de saúde pública e especialista do medicamento, deve ter um papel na sua atividade e profissão, não só a nível da dispensa e do primeiro/último contacto com os utentes, mas também, tudo aquilo que é intrínseco ao medicamento, desde a investigação e desenvolvimento dos produtos, ao seu próprio fabrico e introdução no mercado.

A Indústria Farmacêutica é uma área em constante mudança e repleta de desafios, onde o farmacêutico tem as capacidades e competências necessárias para superar os obstáculos diários e se impor, acrescentando valor a este setor.

O estágio curricular na Farmalabor foi o meu primeiro contacto com a realidade profissional de uma Indústria Farmacêutica, área que há muito me suscitava interesse.

Esta oportunidade permitiu-me aplicar e consolidar muitos dos conhecimentos adquiridos durante o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, ao mesmo tempo que me proporcionou novas aprendizagens e competências. O facto de ter tido a oportunidade de contactar com outros setores para além da Garantia da Qualidade foi, sem dúvida, gratificante, dado que permitiu ter uma visão alargada das atividades inerentes à Indústria Farmacêutica.

Finalmente, gostaria de deixar uma palavra de agradecimento ao Grupo Medinfar, à Farmalabor e a todos os seus colaboradores, que me acolheram da melhor maneira possível e demonstraram sempre disponibilidade em contribuir para minha aprendizagem, em particular à Sr.^a Eng.^a Maria Eugénia Amaral, minha orientadora do estágio, e a toda a equipa do departamento da Garantia da Qualidade.

E por último, mas não menos importante, uma palavra de apreço também para a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por permitir que esta oportunidade se concretizasse.

6. Bibliografia

Apifarma - [Em linha] [Consult. 20 ago. 2017]. Disponível em <http://www.apifarma.pt>>.

Farmalabor - [Em linha] [Consult. 20 ago. 2017]. Disponível em: www.medinfar.pt/farmalabor>.

Grupo Medinfar - [Em linha] [Consult. 20 ago. 2017]. Disponível em: www.medinfar.pt>.

PARTE III

CHITOSAN-BASED NANOPARTICLES FOR GENE DELIVERY

Abstract

Gene therapy is designated to introduce nucleic acids into the cells of a patient to compensate for abnormal genes or to produce a beneficial protein. Moreover, gene therapy presents great advantages for the vaccine field, since DNA vaccines are expected to generate both humoral and cellular immune responses, supporting prophylactic, as well as therapeutic vaccination strategies. Comparatively to viral gene delivery systems, non-viral vectors are a safer alternative, with minimal side effects, highly stable and susceptible to physical/chemical modifications. Among these gene carriers, the cationic polymer chitosan has gained attention as a non-viral gene delivery system due to its biodegradability, biocompatibility, low toxicity and ability to interact with the negatively charged DNA molecules, easily forming polyplexes. Nevertheless, some authors claim that the interaction between the opposing charges of the amino groups of chitosan and the phosphate groups in the nucleic acid originates very stable complexes, precluding the unloading of the DNA and causing low transfection. To overcome this limitation, we hypothesized that the addition of casein, as well as glucan, into the nanoparticle's structure would facilitate a proper gene transfer.

The work herein presented aims to produce Chitosan- α -Casein Nanoparticles (ChiCas NPs) and to test their ability as a gene delivery system using preliminary *in vitro* transfection studies. Results demonstrate that ChiCas NPs, presenting small and homogenous sizes with minor variations between different formulations (ranging between 230 nm and 390 nm) and highly positive zeta potentials (> 32 mV), have suitable characteristics and stability to be a good candidate for a gene delivery system. In fact, results from DNA complexation assays confirmed the successful production of NPs-DNA complexes, either with DNA adsorbed to the NPs surface, or with DNA incorporated within the NPs. Preliminary studies with several NPs-DNA formulations and ratios suggested a low transfection efficiency, comparatively to the positive control.

To conclude, the results presented suggest that ChiCas NPs have high ability to form complexes with DNA, however, further investigation is needed to optimize ChiCas NPs: DNA ratios for successful plasmid DNA-based vaccination.

Keywords: Gene delivery system, chitosan nanoparticles, transfection, pDNA vaccine, α -casein, glucan.

Resumo

A terapia genética caracteriza-se pela entrega de ácidos nucleicos às células de um indivíduo para compensar genes anormais ou com o objetivo de produzir uma proteína benéfica. Além disso, a terapia genética apresenta grandes vantagens para a área da vacinação, uma vez que é esperado que as vacinas de DNA gerem uma resposta imune tanto humoral, como celular, propiciando estratégias de vacinação profiláticas e também terapêuticas. Comparativamente aos sistemas de entrega viral, os vetores não-virais são uma alternativa mais segura, com poucos efeitos secundários, muito estáveis e suscetíveis a modificações físico-químicas. Entre estes sistemas transportadores, o quitosano, um polímero catiónico, tem suscitado interesse como vetor não-viral devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e capacidade de interagir com as moléculas de DNA carregadas negativamente, formando facilmente políplexos. No entanto, alguns autores afirmam que a interação entre as cargas opostas dos grupos amino do quitosano e dos grupos fosfato no ácido nucleico origina complexos muito estáveis, impedindo a libertação do DNA e causando baixa transfecção. Para superar esta limitação, formulámos a hipótese de que a adição de caseína, assim como o glucano, na estrutura das nanopartículas facilitaria uma transferência do DNA mais adequada.

O trabalho aqui apresentado visa produzir Nanopartículas de Quitosano- α -Caseína (ChiCas NPs) e testar sua capacidade como um sistema de entrega de DNA através de estudos *in vitro* de transfecção. Os resultados obtidos demonstram que as ChiCas NPs, apresentando tamanhos pequenos e homogêneos com pequenas variações entre as diferentes formulações (variando entre 230 nm e 390 nm) e potenciais zeta marcadamente positivos (> 32 mV), possuem características e estabilidade adequadas para serem um bom candidato para um sistema de entrega génica. Deste modo, os resultados dos ensaios de complexação de DNA confirmaram a produção com sucesso de complexos NPs:DNA, seja com DNA adsorvido à superfície das NPs, ou com DNA incorporado nas NPs. Nos estudos preliminares com várias formulações constituídas por diferentes rácios de NPs:DNA observou-se uma baixa eficiência de transfecção, comparativamente ao controlo positivo.

Para concluir, os resultados apresentados sugerem que as ChiCas NPs têm a capacidade de atuar como um sistema de entrega de genes, no entanto, é necessária uma investigação mais aprofundada para otimizar os rácios ChiCas NPs:DNA e assim obter uma formulação de DNA plasmídico bem-sucedida.

Palavras-chave: Sistemas de entrega de genes, nanopartículas de quitosano, transfecção, vacina de pDNA, α -caseína, glucano.

Abbreviations

ATP – Adenosine Triphosphate

ChiCas NPs – Chitosan- α -Casein Nanoparticles

ChiCasGluc NPs – Chitosan- α -Casein-Glucan Nanoparticles

ChiTPP NPs – Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA – Deoxyribonucleic Acid

DLS – Dynamic Light Scattering

ELS – Electrophoretic Light Scattering

NPs – Nanoparticles

PBS – Phosphate Buffered Saline

pDNA – Plasmid DNA

PI – Polydispersity Index

RLU – Relative Light Units

SGF – Simulated Gastric Fluid

SIF – Simulated Intestinal Fluid

SNES – Simulated Nasal Electrolyte Solution

TPP – Tripolyphosphate

I. Introduction

Gene therapy is founded on the concept that human disease might be treated through the transfer of genetic material to the affected cells of a patient, to correct or supplement malfunctioning genes, responsible for the development of the health problem (Mansouri *et al.*, 2004). Furthermore, gene therapy presents great advantages for the vaccine field, since DNA vaccines are expected to produce *in situ* the interest antigen and generate both, humoral and cellular immune responses, supporting prophylactic, as well as therapeutic vaccination strategies (Jesus *et al.*, 2017).

In spite of significant developments, the progress in gene therapy still suffers from the lack of efficient gene delivery systems (Park e Kim, 2012). A fine-tuned delivery system may increase safety, as well as achieve a long-lasting expression of the gene of interest (Sharma *et al.*, 2014). Furthermore, the perfect gene delivery system must be able to protect the DNA until it reaches its target cells, avoiding the processes responsible for the elimination of macromolecules, like the degradation by serum nucleases and the interaction with blood components (Nitta e Numata, 2013). It is also crucial that the system is sufficiently small to be internalized by the cell, capable of escaping endosome-lysosome digestion after endocytosis and reach the nucleus' interior (Mansouri *et al.*, 2004).

Presently, the gene therapy vectors used to carry foreign DNA into the cell are divided in two categories: viral vectors and non-viral vectors. Though viral carriers are capable of efficiently promote gene transfer, their clinical use have been limited due to safety concerns (Garaiova *et al.*, 2012). On the other hand, non-viral delivery systems show minimal side effects and reliable stability at a low cost, being susceptible to physical/chemical modifications (Lebre *et al.*, 2016). Despite the advantages of not being pathogenic nor immunogenic and capable of delivering large amounts of DNA, these vectors display a lack of specificity and low efficiency in introducing and maintaining exogenous gene expression (Thomas e Klibanov, 2003).

These vectors are constituted by two principal elements: the delivery component and the plasmid DNA molecule. To produce delivery carriers, DNA has been complexed with several different kinds of macromolecules (Kay, 2011). Until now, no gene delivery system currently contains all the desirable features, since all wanted characteristics exist scattered throughout various individual vectors, each having its benefits and limitations (Thomas e Klibanov, 2003).

The non-viral approach for delivery systems are mainly composed of cationic polymers or cationic lipids, which interact through electrostatic attraction with the negatively charged

DNA, that, respectively, leads to the formation of polyplexes and lipoplexes (Morille *et al.*, 2008). In contrast to lipoplexes, cationic polymers can self-assemble and allow a better control of their macroscopic characteristics, being easily manipulated through chemical modification, in order to accomplish greater efficiency or achieve cell targeting. Additionally, polyplexes do not require adjuvants for an efficient delivery and are less vulnerable to be disrupted by serum proteins, when compared to liposome /DNA complexes (Thomas e Klibanov, 2003).

In eukaryotic cells, gene transfer is a complex process of numerous barriers and any of them can be the rate-limiting step, depending on the polycation's nature (Morille *et al.*, 2008). The first phase to be considered is the condensation of DNA, where the interaction of the polycation around the DNA phosphate groups will condense the genetic material, creating compact and ordered particles (Liu *et al.*, 2001). At a critical polycation:DNA ratio, the polyanion rearranges itself to enable its condensation by the polycation. This phenomenon is decisive for the formation of a viable nanoparticle and it is critical to achieve an efficient transfection (Thomas e Klibanov, 2003).

The second step consists in the particles' uptake by the cell. To accomplish an affective connection between the cell and the complex, the latter must be sufficiently small in size and possess a marked positive charge (Erbacher, Remy e Behr, 1999). Both features are important to facilitate a stable interaction between the polycationic particle and the anionic cell-surface glycoproteins, promoting a spontaneous, non-specific, charge-mediated endocytosis and subsequent internalization (Morille *et al.*, 2008). However, when administered directly into the blood, the complexes tend to be instantly neutralized by the negatively charged blood cells and plasma proteins, leading to their aggregation and raising some concerns regarding their *in vivo* applications (Thomas e Klibanov, 2003).

Endosomal escape is a vital process to reach a successful gene transfer and it is the step where, apparently, the majority of delivery systems are stopped (Garaiova *et al.*, 2012). The accumulation of the nanoparticles within the endosomes, eventually, leads to their degradation by the acidic pH and lysosomal hydrolytic enzymes (Thomas e Klibanov, 2003). Thus, endosome capture represents a serious barrier to transfect genes efficiently, being crucial ensuring the complexes release from this compartment at an early stage (Morille *et al.*, 2008).

Once the polyplex is free in the cytoplasm, it must surpass its final barrier and enter the nucleus, where the transcription machinery is present. Lechardeur and co-workers (Lechardeur *et al.*, 1999) estimated that the half-life of naked pDNA in the cytoplasm of COS cells ranges between 50 to 90 minutes. Therefore, pDNA needs to be both protected from cytoplasmic nucleases and available to cross the nuclear envelope (Morille *et al.*, 2008).

The final phase of gene expression is vector unpacking. At this stage, the complexes must disassemble and allow the genetic material to be accessed by the transcription apparatus (Thomas e Klivanov, 2003).

Several natural and synthetic cationic systems have been employed as gene delivery vectors. Among them, some macromolecules stand out, such as polyethylenimine, polylysine and polysaccharides (for instance, chitosan) (Kay, 2011; Park e Kim, 2012).

Chitosan is the polysaccharide most commonly used for nanoparticle production and it is obtained from the partial deacetylated chitin (Paiva *et al.*, 2013). This linear heteropolymer of beta-(1–4) linked D-glucosamine and N-acetyl-d-glucosamine has attracted a lot of attention due to its high number of applications and natural abundance at a reasonable cost, as well as its favorable biological properties, like biodegradability, biocompatibility and low toxicity (Baldrick, 2010; Duceppe e Tabrizian, 2010). When referring to chitosan, it includes many polymers, which differ in their molecular weight (50 kDa – 2000 kDa) and degree of N-deacetylation (40 – 98 %) (Hejazi e Amiji, 2003). In addition, this biopolymer has mucoadhesive properties (Agnihotri, Mallikarjuna e Aminabhavi, 2004), along with the ability to stimulate the immune system's cells (Borges *et al.*, 2007). Chitosan is a weak base with pKa around 6.5, being insoluble in neutral and alkaline pH values. However, in acidic medium, chitosan becomes a hydrophilic, soluble polycation, linear in structure and with high positive charge density, due to the protonation of the amine groups (Anal *et al.*, 2008; Nitta e Numata, 2013). Its characteristic charge allied to its ability to produce nanoparticles under mild conditions, without requiring harmful organic solvents, makes chitosan a suitable polymer to successfully achieve intermolecular complexation with proteins, nucleic acids and even antigens (Lebre *et al.*, 2012).

Thus, chitosan-based nanoparticles have been widely studied, being frequently, via electrostatic interaction, cross-linked with other molecules, to suit the most numerous purposes. For instance, chitosan has been associated with alginate or poly- ϵ -caprolactone to form polyplexes intended for antigen delivery systems in mucosal vaccines against the hepatitis B virus (Jesus *et al.*, 2016; Lebre *et al.*, 2012). Similarly, chitosan nanoparticles have been prepared using others cross-linking agents, such as sulfate ions (Lebre *et al.*, 2016) or tripolyphosphate (TPP) ions (Nasti *et al.*, 2009). In addition, some studies have shown that chitosan can interact with proteins and DNA to produce reliable delivery systems (Anal *et al.*, 2008; Lebre *et al.*, 2016).

Regarding chitosan nanoparticles as a non-viral vector for gene delivery, it has been described that the strength of the electrostatic bonds between the polycation and DNA precludes their separation in the interior of the cell, consequently impeding the DNA's

transcription (Mao *et al.*, 2001). An equilibrium between the stability of the polyplexes and the intracellular unpacking of the DNA must be reached to ensure both DNA protection and achieve high values of gene expression (Lebre *et al.*, 2016). Although chitosan has successfully transfected cells *in vitro* (Lebre *et al.*, 2016), the efficiency of gene transfer has revealed to be lower than that observed in other approaches (Gao *et al.*, 2008). Among all the existing barriers to gene delivery, a possible explanation for these results might be that the interaction between the opposing charges of the amino groups of chitosan and the phosphate groups in the nucleic acid originates very stable complexes, precluding the unloading of the DNA and causing low transfection. To overcome this limitation, previous studies reported whether the association of proteins to chitosan nanoparticles would modulate the interaction of the complexes with the DNA and even the cell, and enhance gene transfer (Lebre *et al.*, 2016). In this report, the main goal was to produce and test a delivery system for gene delivery based on chitosan NPs. However, instead of using human serum albumin combined to chitosan NPs, like was tested before in our laboratory (Lebre *et al.*, 2016), we tested a new approach, where α -casein from bovine milk was used to directly cross-link with chitosan and form Chitosan- α -Casein NPs (ChiCas NPs) and these particles have been used to form the complexes with DNA.

Casein is an inexpensive, non-toxic phosphoprotein and, although it may have some immunogenic/allergenic activity, it has a wide variety of uses. Mainly four subtypes exist in cow milk, α 1-, α 2-, β - and κ -casein, in a 4:1:4:1 proportion (Elzoghby, Abo El-Fotoh e Elgindy, 2011). As a natural product, casein is biodegradable, biocompatible and heat stable, with an active surface that enables modifications for specific cell targeting (Elzoghby, Samy and Elgindy, 2012). At pH levels above the isoelectric point (\sim 4.6), casein carries a negative charge and can interact with positively charged polysaccharides like chitosan, creating nanocomplexes (Anal *et al.*, 2008).

However, there are very few studies about chitosan/casein nanoparticles. In our laboratory, it has already been developed some work around this type of NPs complexes, and along with the studies advanced by Anal and-coworkers (Anal *et al.*, 2008) and Lebre and co-workers (Lebre *et al.*, 2016), they were the starting point for the experiments herein described.

Since our group centers its work around vaccination, the goal of this study was to successfully produce a gene delivery system for DNA vaccination. Therefore, in addition to the mucoadhesive and immunostimulant character of Chitosan- α -Casein Nanoparticles (ChiCas NPs), we sought targeting these complexes to the cells of the immune system, using a second polymer, glucan, to better activate an immune response. In fact, glucan is a

polysaccharide that can be extracted from *Saccharomyces cerevisiae* and can be recognized by immune cells' surface receptors, dectin-1 (Soto *et al.*, 2016). These cells are important targets for gene therapy and particularly for DNA vaccination, given their role in mediating inflammation and promoting cellular and humoral immune responses (Tesz *et al.*, 2011).

Thus, in the work herein presented, glucan was added to the ChiCas NPs and its transfection ability was also tested and compared to simple ChiCas NPs.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Chitosan (ChitoClear™ - degree of deacetylation 95 %; viscosity 8 cP (1 % solution)) was obtained from Primex Bio-Chemicals AS (Avaldsnes, Norway). D-luciferin sodium salt, Penta-Sodium Triphosphate (TPP), α -casein (> 70 %) and adenosine triphosphate (ATP) were purchased from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). Pierce™ BCA protein assay kit was purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). Glucan (P-CURDL) was obtained from Megazyme and Tween 80® from Riedel de Haen™. pDNA encoding luciferase (pCMVluc) was amplified in *E. coli* bacteria and further purified using QIAGEN Plasmid Giga Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The purified pDNA was diluted with MilliQ water and its concentration/purity was determined by UV spectrophotometry, measuring the absorbance at 260/280 nm. All other chemicals and reagents, obtained from normal suppliers, were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Nanoparticle production

2.2.1.1. Chitosan- α -Casein Nanoparticle Production

The Chitosan- α -Casein Nanoparticles (ChiCas NPs) production was based on the electrostatic interaction of these two molecules, following a technique presented by Anal *et al.*, 2008 with some modifications studied in our laboratory. Briefly, the ChiCas NPs were produced by adding, dropwise, 600 μ L of a 0.4 % w/v α -Casein solution to 2 mL of Chitosan solution (0.1 % w/v, in 25 mM sodium acetate buffer, pH = 5.0), under high speed vortexing (homogenizer Ystral X120, Ballrechten-Dottingen, DE). The mixture was kept in the homogenizer for one minute, followed by half hour of magnetic stirring maturation.

2.2.1.1.1. Stability test

After their production, the ChiCas NPs were left at 4 °C or 20 °C for several weeks, in the original medium. During this period, the particle size and polydispersity index (PI) were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) in a Delsa™ Nano C particle analyzer (Beckman Coulter, Madrid, ES).

It was also evaluated the nanoparticles' stability when dispersed in different buffers and media, they were suspended in a 1:1 (v/v) ratio in Simulated Gastric Fluid (SGF, pH = 1.2), Simulated Intestinal Fluid (SIF, pH = 6.8), Simulated Nasal Electrolyte Solution (SNES, pH = 6.8), Acetate Buffer (pH = 5.0), Phosphate Buffered Saline (PBS, pH = 7.4) and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, pH = 7.4) at 37 °C. Then, the transmittance of the particle suspensions was measured at 500 nm, at different time points, over 20 minutes. For comparison, the classical Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles (ChiTPP NPs), were used. The production method of ChiTPP NPs was the same as ChiCas NPs, however, instead of the α -Casein solution, 450 μ L of a 0.16 % w/v TPP solution were added to the chitosan solution.

2.2.1.2. ChiCas NPs Production followed by DNA adsorption

A 1000 μ g/ml DNA solution was added to the ChiCas NPs suspension, according to the ratios of NPs:DNA selected (Table I), to obtain NPs with DNA adsorbed to their surface. After the addition of the DNA, an extra 30 min agitation in a rotary agitator was included.

Table I: Conditions tested for ChiCas NPs with DNA adsorbed to the surface.

Formulation (Ratio Nps:DNA)	NPs ChiCas	DNA (1000 μ g/ml)
α (5:1)	500 μ L	169 μ L
β (7.5:1)	500 μ L	112.5 μ L
γ (10:1)	500 μ L	84.5 μ L

2.2.1.3. ChiCas NPs Production with incorporated DNA

To incorporate the DNA within the ChiCas NPs, a 1000 µg/ml DNA solution was combined with the Casein solution. The concentration of Casein had to be adjusted so that its final concentration would still be 0.4 %. The resulting Casein-DNA solution was homogenized for 30 min in a rotary agitator, and then the method was concluded just like the production of ChiCas NPs. The different formulations tested are shown in table 2.

Table 2: Conditions tested for ChiCas NPs with incorporated DNA.

Formulation (Ratio Nps:DNA)	Chitosan Solution (0.1 %)	α-Casein Solution (0.45 %)	α-Casein Solution (0.5 %)	DNA (1000 µg/ml)	MilliQ Water
I (550:1)	2 ml	533.33 µL	---	8 µL	58.67 µL
II (275:1)	2 ml	533.33 µL	---	16 µL	50.67 µL
III (137.5:1)	2 ml	533.33 µL	---	32 µL	34.67 µL
IV (73.3:1)	2 ml	---	480 µL	60 µL	60 µL
V (36.6:1)	2 ml	---	480 µL	120 µL	0 µL

2.2.2. Size and Zeta potential measurements

Delsa™ Nano C particle analyzer (Beckman Coulter, Madrid, ES) was used to measure the particle size by Dynamic Light Scattering (DLS), and the zeta potential by electrophoretic light scattering (ELS). Both analyses were performed at 25 °C and scattered light collected at a 165 ° angle. Particle suspensions were characterized after production, in the original medium.

2.2.3. DNA complexation assay: agarose gel retardation assay

An electrophoresis in agarose gel was performed to analyze the Nanoparticle-DNA complexes. Samples were diluted with purified water at a 1:4 ratio and to 10 µL of each resulting sample was added 2 µL of a loading buffer, containing bromophenol blue, to control the run. Then, from each sample, 6 µL were transferred to individual wells, each aliquot corresponding to 5.05 µg of DNA, in a 1 % agarose gel, stained with 1 % SYBR® Safe for the electrophoresis run (horizontal DNA electrophoresis System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After 45 min at 100 V, the data was analyzed in a UV transilluminator (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK).

2.2.4. Nanoparticle production for Transfection studies

Among the transfection studies performed, various NPs-DNA formulations (Table 3) and NPs:DNA ratios (Table 4 and 5) were tested, besides the ones initially developed and characterized. In addition to the two formulations of ChiCas NPs already described, it was produced another approach, by adding glucan to the formulations. The Chitosan- α -Casein-Glucan Nanoparticles (ChiCasGluc NPs) followed by DNA adsorption and the ChiCasGluc NPs with incorporated DNA were formulated similarly to the correspondent ChiCas NPs, with the only difference being the addition of the Glucan solution to the Casein-DNA solution and maturing the obtained solution for 1 h, in scintillation cups with magnetic stirring, for both DNA loading technique. In these transfection studies, it was used two concentrations of glucan, 0.05 % and 0.1 %. All the components and materials used in these studies were sterile.

Table 3: Formulations tested in the transfection studies. These formulations were produced as previously described.

A	ChiCas NPs followed by DNA adsorption
B	ChiCas NPs with incorporated DNA
C	ChiCasGluc NPs followed by DNA adsorption (0.05 % Glucan)
D	ChiCasGluc NPs followed by DNA adsorption (0.1 % Glucan)
E	ChiCasGluc NPs with incorporated DNA (0.05 % Glucan)
F	ChiCasGluc NPs with incorporated DNA (0.1 % Glucan)

Table 4: NPs-DNA formulations with surface adsorbed DNA, used in the transfection studies: NPs:DNA ratios and production formula.

	NPs Production								DNA Adsorption		
	NPs:DNA Ratio	Chitosan Solution (0.1 %)	α -Casein Solution (1 %)	α -Casein Solution (4.6 %)	Glucan Solution (0.5 %)	Glucan Solution (0.575 %)	MilliQ Water	Final Volume	Volume of ChiCas NPs used for DNA incubation	DNA (1000 μ g/ml)	DNA (2566 μ g/ml)
A	10:1	2 ml	---	52.2 μ L	---	---	547.8 μ L	2.6 ml	150 μ L	---	5.85 μ L
	7.5:1	2 ml	---	52.2 μ L	---	---	547.8 μ L	2.6 ml	100 μ L	---	5.18 μ L
	5:1	2 ml	---	52.2 μ L	---	---	547.8 μ L	2.6 ml	100 μ L	---	7.8 μ L
	3.5:1	2 ml	---	52.2 μ L	---	---	547.8 μ L	2.6 ml	100 μ L	---	11.1 μ L
C	36.7:1	2 ml	240 μ L	---	60 μ L	---	300 μ L	2.6 ml	500 μ L	23.1 μ L	---
	22:1	2 ml	240 μ L	---	60 μ L	---	300 μ L	2.6 ml	500 μ L	38.5 μ L	---
D	10:1	2 ml	---	52.2 μ L	---	104 μ L	443.8 μ L	2.6 ml	150 μ L	---	5.85 μ L
	7.5:1	2 ml	---	52.2 μ L	---	104 μ L	443.8 μ L	2.6 ml	100 μ L	---	5.18 μ L
	5:1	2 ml	---	52.2 μ L	---	104 μ L	443.8 μ L	2.6 ml	100 μ L	---	7.8 μ L
	3.5:1	2 ml	---	52.2 μ L	---	104 μ L	443.8 μ L	2.6 ml	100 μ L	---	11.1 μ L

Table 5: NPs-DNA formulations with incorporated DNA, used in the transfection studies: NPs:DNA ratios and production formula.

NPs-DNA Production										
	NPs:DNA Ratio	Chitosan Solution (0.1 %)	α -Casein Solution (1 %)	α -Casein Solution (4.6 %)	Glucan Solution (0.5 %)	Glucan Solution (0.575 %)	Incorporated DNA (1000 μ g/ml)	Incorporated DNA (2566 μ g/ml)	MilliQ Water	Final Volume
B	275:1	2 ml	240 μ L	---	---	---	16 μ L	---	344 μ L	2.6 ml
	73.3:1	2 ml	240 μ L	---	---	---	60 μ L	---	300 μ L	2.6 ml
	36.6:1	2 ml	240 μ L	---	---	---	120 μ L	---	240 μ L	2.6 ml
	22:1	2 ml	240 μ L	---	---	---	200 μ L	---	160 μ L	2.6 ml
	7.5:1	76.67 μ L	---	2 μ L	---	---	---	8.83 μ L	12.17 μ L	23 μ L
	5:1	76.67 μ L	---	2 μ L	---	---	---	13.25 μ L	7.75 μ L	23 μ L
E	3.5:1	76.67 μ L	---	2 μ L	---	---	---	19 μ L	2 μ L	23 μ L
	275:1	2 ml	240 μ L	---	60 μ L	---	16 μ L	---	284 μ L	2.6 ml
	73.3:1	2 ml	240 μ L	---	60 μ L	---	60 μ L	---	240 μ L	2.6 ml
	36.6:1	2 ml	240 μ L	---	60 μ L	---	120 μ L	---	180 μ L	2.6 ml
	22:1	2 ml	240 μ L	---	60 μ L	---	200 μ L	---	100 μ L	2.6 ml
	7.5:1	76.67 μ L	---	2 μ L	---	---	---	8.83 μ L	10,17 μ L	23 μ L
F	5:1	76.67 μ L	---	2 μ L	---	---	---	13.25 μ L	5,75 μ L	23 μ L
	3.5:1	76.67 μ L	---	2 μ L	---	---	---	19 μ L	---	23 μ L
	275:1	2 ml	240 μ L	---	120 μ L	---	16 μ L	---	224 μ L	2.6 ml
	137.5:1	2 ml	240 μ L	---	120 μ L	---	32 μ L	---	208 μ L	2.6 ml
	73.3:1	2 ml	240 μ L	---	120 μ L	---	60 μ L	---	180 μ L	2.6 ml
36.6:1	2 ml	240 μ L	---	120 μ L	---	120 μ L	---	120 μ L	2.6 ml	

2.2.5. Transfection studies

To evaluate the suitability of the NPs-DNA formulations to mediate gene transfer, transfection studies were performed. The protocol of the current transfection experiment was adapted from previous papers (Cordeiro *et al.*, 2017; Jesus, Borchard e Borges, 2013; Lebre *et al.*, 2016). Briefly, COS-7 cells at approximately 80 % confluence were seeded in a volume of 500 μL at a density of 2×10^4 cells/well in a 48-well plate and incubated for 24 h, at 37 °C with 5 % CO_2 . Then, the medium was replaced with DMEM-HG without serum and the formulations containing 1 μg of DNA were added to each well. Acetate buffer was used as the negative control and calcium phosphate/DNA precipitate was used as positive control of the assay (data not shown). To test the impact of Tween 80[®] in the transfection efficacy, some duplicates of the formulations were mixed with Tween 80[®] to a final concentration of 1 % (v/v), prior to the addition to cells. After a 4 h period of incubation, in 5 % CO_2 atmosphere, at 37 °C, the medium was replaced once again with DMEM-HG and the cells were incubated for another 48 h to 72 h. Following the incubation, cells were washed twice with PBS and lysed with 150 μL of lysis buffer [1 mM dithiothreitol; 1 mM EDTA; 25 mM Tris-phosphate; 8 mM MgCl_2 ; 15 % glycerol; 1 % (v/v) Triton[™] X-100, (pH 7.8)]. To favor cellular lysis, the plates were placed, for 15 min, in a -80 °C environment. The content of each well was centrifuged at 10 000 rpm, in Eppendorf tubes, for 5 min, at 4 °C. Then, 50 μL of the supernatant from each Eppendorf was transferred to a 96-well plate, that was kept on ice until the reading. To each well was added 100 μL of a 167 μM D-Luciferin sodium salt solution and 100 μL of a 2 mM ATP (Sigma Aldrich Corp., MO, USA) solution, both at 37 °C, immediately before luminescence quantification. The evaluation of luciferase expression was assessed by measuring light production by luciferase in a luminometer (Synergy HT, multimode microplate reader, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

From each resulting supernatant, the total protein content was measured, to standardize the luminescence values. Therefore, the BCA protein assay was performed, using a α -casein solution as standard, that was diluted to achieve a working range from 20 to 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. According to the manufacturer's protocol, 25 μL of each sample or standard were transferred to a 96-well plate and was added 200 μL of the Working Reagent to each well. The plate was incubated for 30 min, at 37 °C, and then cooled at room temperature. The absorbance was measured on a plate reader (Multiskan EX Microplate, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), at 562 nm (570 nm). The units used to express the obtained data were RLU (Relative Light Units) of luciferase per mg of total cell protein.

3. Results

3.1. Nanoparticle production and stability tests

After the optimization of the NPs production method, the Chi:Cas ratio of 1:1.20 ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$) was selected, considering homogeneity and smaller sizes. The NPs produced presented a diameter of 284.53 ± 3.40 nm, polydispersity (PI) values of 0.216 ± 0.015 nm and a positive surface charge of 41.74 ± 0.35 mV.

The ChiCas NPs were subjected to two stability tests. The first one was a long-term stability test in which the NPs were kept for 34 weeks, either in an environment of 4 °C or 20 °C. During this period, the particle size and PI was measured at different time points, as shown in figure 1. At both temperatures tested, NPs were stable regarding its size and dispersity index, for the complete duration of the assay.

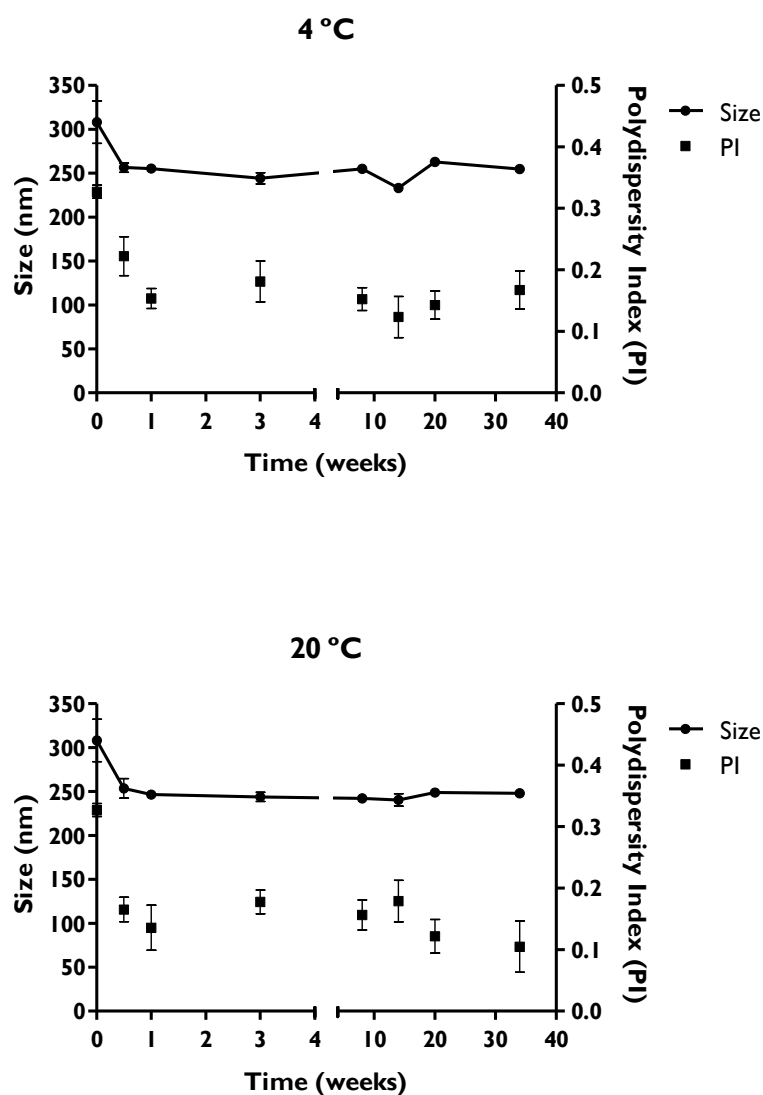


Figure 1: Stability test of ChiCas NPs stored at 4 °C (A) and 20 °C (B), showing the mean size (nm) and PI of ChiCas NPs, at different time points; Data (Mean \pm SD) are illustrative of one measurement of an assay performed in triplicate.

A second stability study was performed in diverse simulated biological fluids and different buffers, at 37 °C (Figure 2). This evaluation allowed us to simulate the physical stability of the particles on the different administration route environments. ChiTPP NPs were used for comparison, since they have been extensively described in the literature (Fernández-Urrusuno *et al.*, 1999; Nasti *et al.*, 2009) and were previously studied in our laboratory.

Initially, the measurement of the transmittance, when suspended in Acetate Buffer (starting point) showed a higher transmittance value (around 60 %) for ChiTPP NPs, when compared to ChiCas NPs (around 30 %). This shows that both nanoparticle suspensions had different optical transmittance at the starting point. These points were used as the reference

transmittance to evaluate the stability of each nanoparticle suspension when combined with the different buffers/media. Importantly, all results were achieved with the same dilution factor.

In cell culture media DMEM, ChiCas NPs and ChiTPP NPs suffered an accentuated decrease of transmittance. This phenomenon might be explained by the interaction of the positive charged NPs with the negatively charged proteins from the cell culture medium (Senior, Trimble e Maskiewicz, 1991), possibly increasing the size the particles.

In SGF, both formulations were not physically stable, showing transmittance values around 100 %, meaning NPs dissolve at harsh gastric pH conditions. This result suggests they are not a suitable delivery system for the oral route.

The ChiCas and ChiTPP NPs, when combined with SIF, SNES or PBS, add a similar performance as when they were kept in the original medium, the Acetate Buffer. The transmittance was, approximately, the same throughout the 20 minutes, that indicates a stable behavior in all these fluids. Regarding these four media, none of them stands out, but clearly the NPs are more stable in buffers with pH closer to 7.

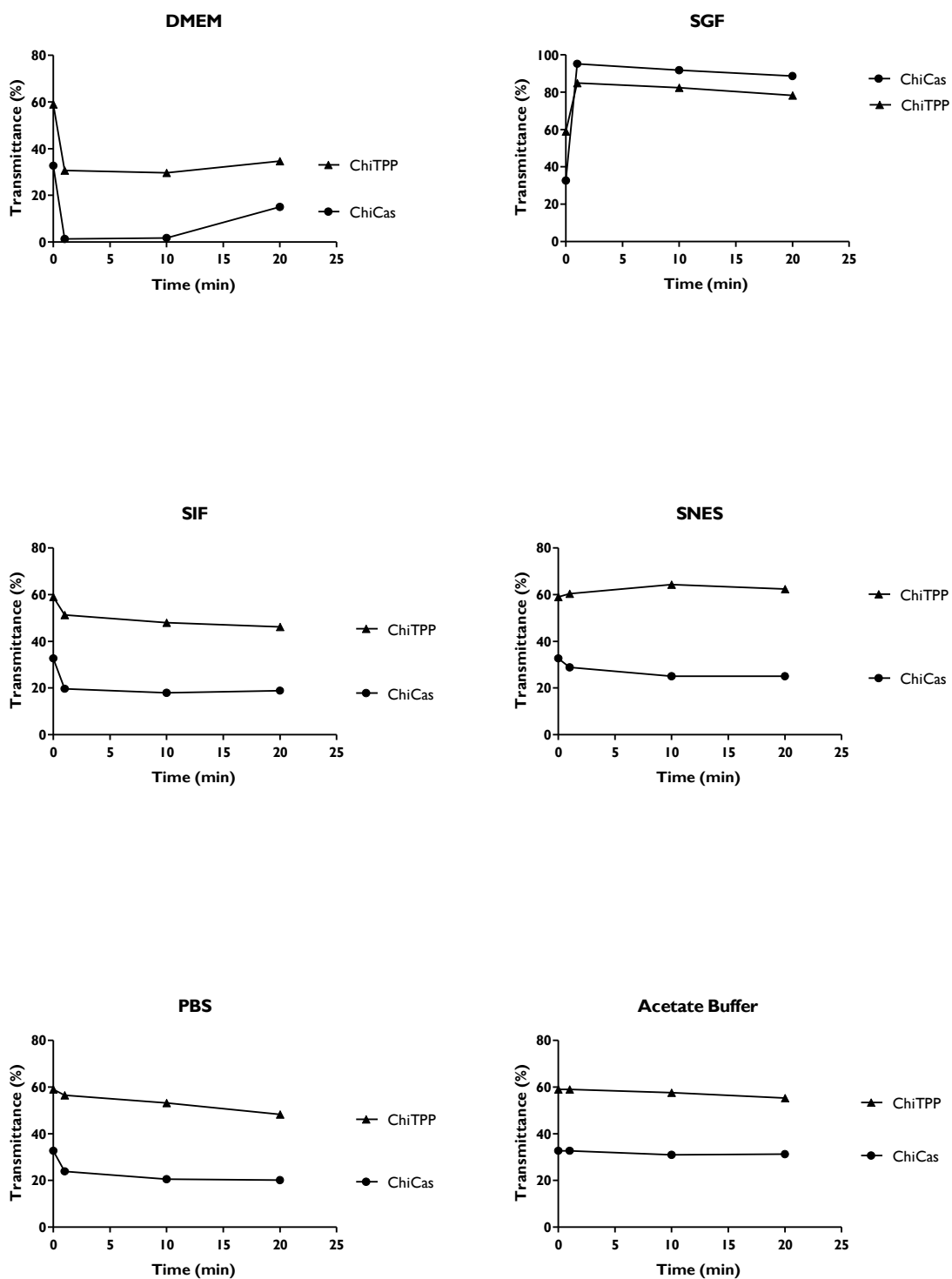


Figure 2: Stability test of ChiCas NPs and ChiTPP NPs in different media, at different time points, at 37 °C. The transmittance (%) was measured at 500 nm. Data (Mean \pm SD) are illustrative of a measurement of an assay performed in triplicate. The starting point, in all the graphics, corresponds to the transmittance expressed in the original medium, the Acetate Buffer, at 37 °C. All the measurements with the buffers/media over the time were made using the same dilution as the one used for the starting point.

3.2. Characterization of ChiCas NPs loaded with DNA

After obtaining a reliable formulation, the following step, and the main goal of this study, was to test ChiCas NPs as DNA vectors. To load the DNA into the NPs, two approaches were tested. The first one consisted in adsorbing the DNA to the surface of matured ChiCas NPs. The second concept was to incorporate the DNA within the ChiCas NPs, by combining it with the α -Casein solution. The NPs resulting from both methods of production were characterized in terms of size, PI and zeta potential (Table 6 and 7, respectively), as well as subjected to a gel retardation assay (Figure 3 and 4, respectively).

Table 6: Characterization of ChiCas NPs with DNA adsorbed to the surface (see Table I from methods). Data (Mean \pm SD) are illustrative of one measurement of an assay performed in triplicate.

Formulation (Ratio NPs:DNA)	Size (nm)	PI	Zeta Potential (mV)
α (5:1)	389.3 \pm 6.9	0.255 \pm 0.011	+ 31.74 \pm 0.31
β (7.5:1)	230.9 \pm 6.6	0.175 \pm 0.024	+ 37.01 \pm 0.37
γ (10:1)	253.8 \pm 1.4	0.203 \pm 0.016	+ 36.73 \pm 0.25

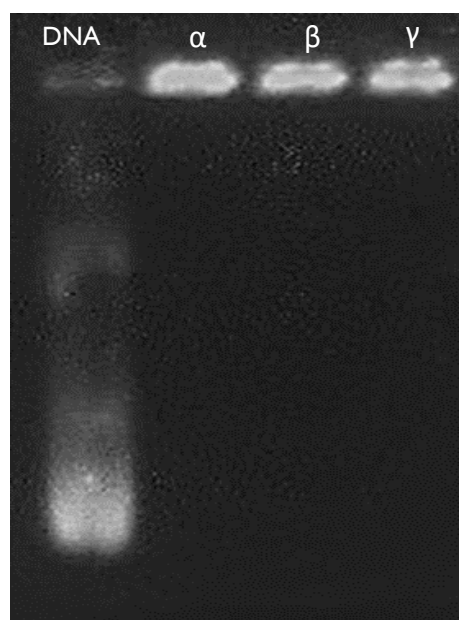


Figure 3: Electrophoresis in agarose gel illustrating the DNA loading capacity on the surface of ChiCas NPs. The NPs:DNA ratios tested were: α) 5:1; β) 7.5:1; γ) 10:1 (see Table 6). Control is presented on the first lane (DNA). Each well contains 5.05 μ g of DNA.

Regarding the characterization of ChiCas NPs with DNA adsorbed to the surface, of the three NPs:DNA ratios tested, the 5:1 ratio had the least favorable features, being larger in size, with higher PI and lower zeta potential. The other two ratios presented a satisfactory diameter, with an acceptable particle homogeneity and a positive surface charge. The electrophoresis in agarose gel demonstrates that all the DNA was adsorbed to the NPs, since it was retained in the well.

Table 7: Characterization of ChiCas NPs with incorporated DNA (see Table 2 from methods). Data (Mean \pm SD) are illustrative of one measurement of an assay performed in triplicate.

Ratio (NPs:DNA)	Size (nm)	PI	Zeta Potential (mV)
I (550:1)	289.0 \pm 5.7	0.272 \pm 0.010	+ 37.75 \pm 0.32
II (275:1)	288.2 \pm 3.9	0.231 \pm 0.019	+ 35.88 \pm 0.41
III (137.5:1)	289.9 \pm 2.6	0.251 \pm 0.008	+ 37.27 \pm 0.23
IV (73.3:1)	302.7 \pm 2.5	0.213 \pm 0.008	+ 35.06 \pm 0.29
V (36.6:1)	318.4 \pm 5.8	0.242 \pm 0.015	+ 37.03 \pm 0.37

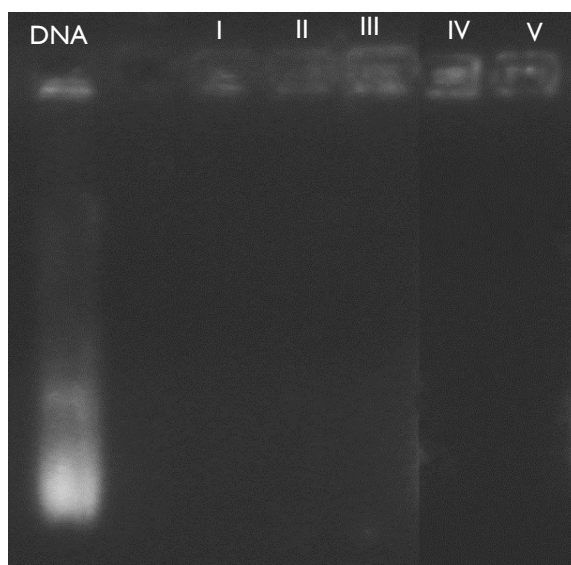


Figure 4: Electrophoresis in agarose gel illustrating the DNA loading capacity within ChiCas NPs. The NPs:DNA ratios tested were: I) 550:1; II) 275:1; III) 137.5:1; IV) 73.3:1; V) 36.6:1 (see Table 7). Control is presented on the first lane (DNA). Each well contains 5.05 μ g of DNA.

After analyzing the results obtained from the characterization of ChiCas NPs with incorporated DNA, all the NPs:DNA ratios had relatively good dispersity and the zeta potential was markedly positive. Concerning the size of the NPs, as the NPs:DNA ratio diminishes, the particle diameter increases, progressively. The same also applies to the electrophoresis in agarose gel, where the NPs with more DNA in its structure show a higher light intensity.

3.3. Transfection studies

With all the particulate systems efficiently produced and characterized, the next phase was to evaluate the ability of each formulation to facilitate cell transfection.

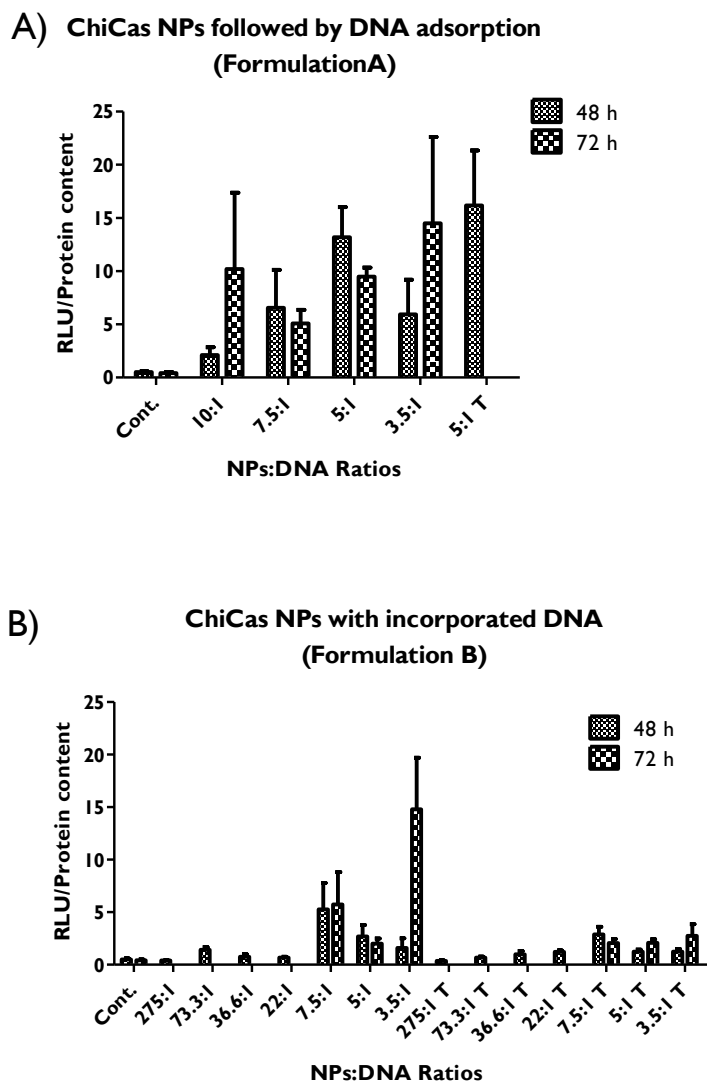


Figure 5: Transfection efficiency of ChiCas NPs without Glucan: A) ChiCas NPs followed by DNA adsorption; B) ChiCas NPs with incorporated DNA. Results were compared with Acetate Buffer (negative control). Transfection is presented in relative light units (RLU) / μg protein. Data represents a minimum of 4 replicates. The letter “T” represents the NP:DNA ratios in which 1 % (v/v) Tween 80[®] was added.

Formulation A and B (see Table 4), ChiCas NPs with adsorbed DNA and ChiCas NPs with incorporated DNA, respectively, were tested at different NP:DNA ratios and were also tested in the presence of Tween 80[®] (1 %) to assess the influence of this surfactant in the improvement of transfection efficiency. The NP:DNA ratio of Formulation A that led to a better transfection result was the 5:1 ratio (Figure 5A), whereas the best ratio of Formulation B was the 3.5:1 ratio (Figure 5B).

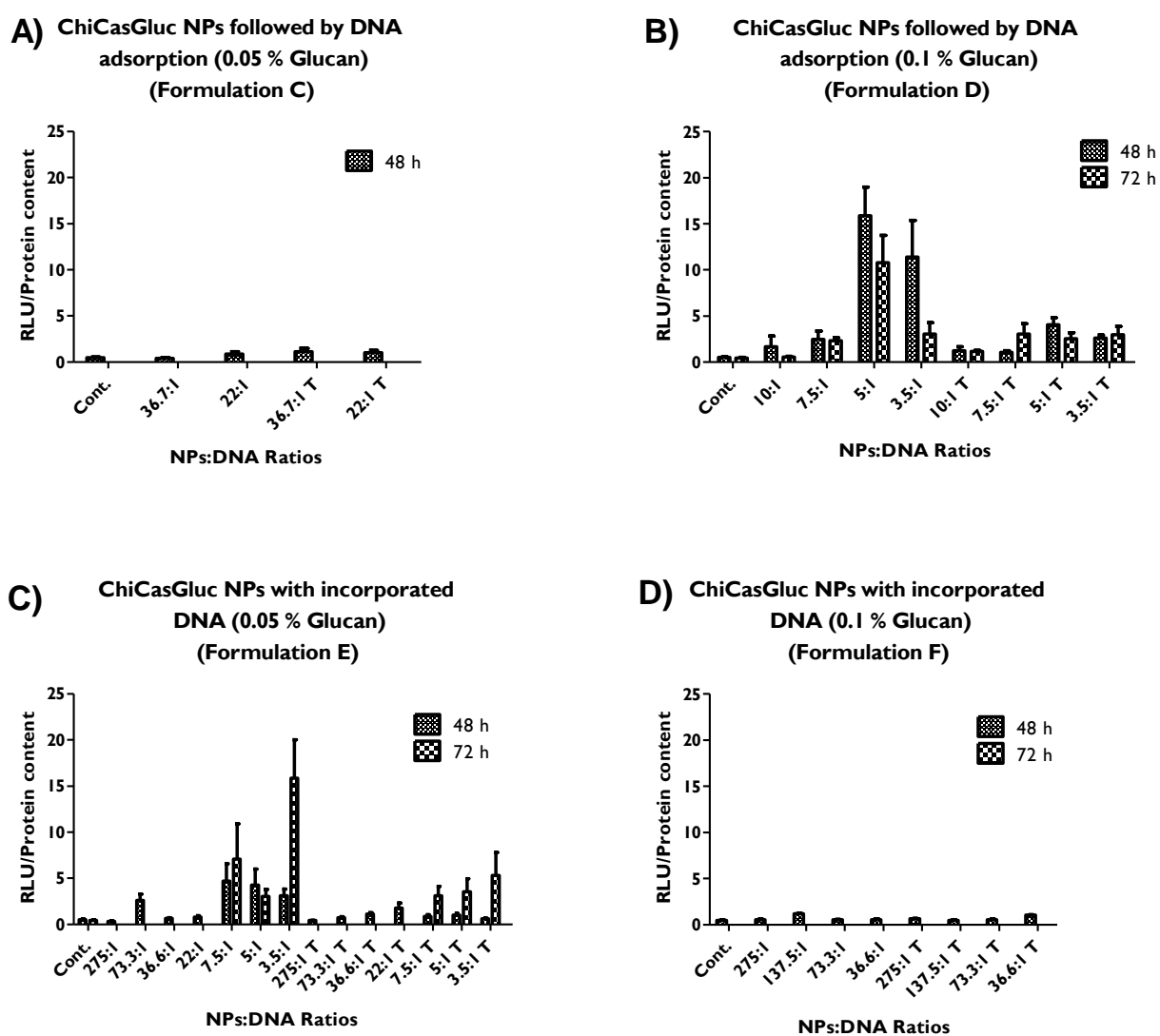


Figure 6: Transfection efficiency of ChiCas NPs with Glucan A) ChiCasGluc NPs followed by DNA adsorption (0.05 % Glucan); B) ChiCasGluc NPs followed by DNA adsorption (0.1 % Glucan); C) ChiCasGluc NPs with incorporated DNA (0.05 % Glucan); D) ChiCasGluc NPs with incorporated DNA (0.1 % Glucan). Results were compared with Acetate Buffer (negative control). Transfection is presented in relative light units (RLU) / μg protein. Data represents a minimum of 4 replicates. The letter “T” represents the NPs:DNA ratios in which 1 % (v/v) Tween 80[®] was added.

The second part of the transfection studies was the assessment of formulations containing another polymer in its constitution, the glucan. While Formulations C and F (see Table 4) showed no improvement in transfection rates as compared to negative controls (Figure 6A and 6D), Formulation D and E exhibited better transfection activity, with some of the ratios standing out. Respectively, the best ratios of these two formulations were 5:1 and 3.5:1, both surpassing 15 RLU/Protein Content (Figure 6B and 6 C).

4. Discussion

In the present study, nanoparticles were prepared through electrostatic interaction between the highly cationic chitosan and the phosphoprotein casein. The NPs produced had matching characteristics with the results obtained by other reports that described a similar NP production technique. For instance, Anal and co-workers reported comparable particle sizes ranging between 250 nm and 350 nm, in the 5.0–6.0 pH range (Anal *et al.*, 2008). Given that the values of PI measured are around 0.2, there is indication that the nanoparticles' sizes are homogenous. In fact, particle suspensions with a zeta potential over (+/-) 30 mV, like the surface charge displayed by the ChiCas NPs, have shown to avoid aggregation, leading to a more stable formulation (Lebre *et al.*, 2012). This positive zeta potential is also favorable when developing nanoparticulate delivery systems, since it increases the interaction with the negatively charged cell membranes (Morille *et al.*, 2008).

To evaluate the stability of the ChiCas NPs in suspension, studies were made to assess their performance in long-term storage, either at a constant temperature of 4 °C or 20 °C. The results from both environments were very similar, showing a stable size and dispersity index, over 34 weeks. Despite the slight decrease in the first days, the particle diameter remained steady around 250 nm, with a PI rarely surpassing the 0.2 threshold, until the end of the experiment. No sediment or particle aggregation was observed throughout the test, matching the results reported by Anal and co-workers (Anal *et al.*, 2008). In terms of future applications, these NPs presented an acceptable stability, even without refrigeration, making them suitable for long-term storage or distribution.

Similarly to what was observed by Lebre and co-workers (Lebre *et al.*, 2016), plasmid DNA encoding luciferase spontaneously formed complexes with ChiCas NPs because of electrostatic interactions between molecules of opposing charges. After analyzing the results summarized in table 6, ChiCas NPs with DNA adsorbed to the surface conserved roughly the same characteristics as ChiCas NPs, apart from the larger size displayed by 5:1 NPs:DNA ratio and the less positive zeta potential exhibited by all ratios, probably due to the presence of the negatively charged DNA on the particle's surface. These NPs:DNA ratios were submitted to an agarose gel electrophoresis to evaluate their stability. As shown in figure 3, the gel retardation assay revealed that ChiCas NPs could fully adsorb all DNA, in every ratio. Even though a strong bond between the NPs and the DNA would improve DNA protection, it would also preclude a proper gene expression (Jesus *et al.*, 2017).

As demonstrated in table 7, ChiCas NPs with incorporated DNA had the same features as ChiCas NPs with DNA adsorbed to the surface, showing a PI slightly above 0.2 and a zeta potential lower than ChiCas NPs. Regarding the nanoparticles' diameter, the gradual DNA increase throughout the ratios led to an increase in size. This may be due to the integration of DNA molecules within the NPs' structure that causes a steric growth of the particle.

Moreover, the fact that, in both gel retardation assays, the amount of DNA present in each lane was uniformed, allows the comparison between them: the agarose gel corresponding to the ChiCas NPs with incorporated DNA exhibited much less light intensity than the ChiCas NPs with DNA adsorbed to the surface one, indicating a successful incorporation of DNA inside the NPs. Furthermore, the intensity among the various ratios slightly differs, suggesting that in higher NPs:DNA ratios, the DNA is more strongly condensed due to the increased number and strength of the electrostatic bonds. The author might hypothesize that the high degree of DNA condensation limits its intercalation with the fluorescent marker, leading to a diminished light intensity.

As previously mentioned, plasmid DNA encoding luciferase was the reporter gene used in the transfection studies.

Comparison between Formulation A and B, clearly shows a better performance of Formulation A (ChiCas followed by DNA adsorption), with all ratios reaching relatively high transfection levels in comparison to the negative control, in either time points (48 h and 72h) (Figure 5). In contrast, formulation B had few NPs:DNA ratios with acceptable luciferase expression, only standing out the 3.5:1 ratio after 72 h of incubation. In both formulations, the conditions with better results were the NPs containing the most DNA in their structure, suggesting an enhanced intracellular DNA unpacking in these smaller NPs:DNA ratios.

The same was observed in the transfection studies of ChiCasGlu NPs (Figure 6), where NPs:DNA ratios above 10:1 had insignificant transfection activity. Such results indicate that the bond between the particles and the DNA is too robust to allow the unloading of the plasmid inside the cell, which was also reported by Lebre and co-workers (Lebre *et al.*, 2016). Lower transfection values at higher NPs:DNA ratios can also be associated with the competition of excess NPs in the suspension that also bind to the surface of the cell, preventing an efficient internalization of the complexes (Strand *et al.*, 2010). These remarks explain why Formulations C, F and the higher ratios of Formulation E had such low luciferase expression, with transfection levels close to the ones reached by the negative control.

As illustrated in figure 6, of all ChiCasGlu NPs formulations, Formulation D and E were the ones achieving better results, exhibiting identical graphics to Formulation A and B, respectively. Thus, in these transfection studies, the addition of glucan to the NPs did not

represent a meaningful improvement of transfection activity, specifically in COS-7 cells, because theoretically this cell line does not express the glucan receptor, dectin-1.

To sum up, the formulation with ChiCas NPs adsorbed with DNA (Formulation A) was the one with better overall results, having relatively high transfection levels in all ratios, with several of them above 10 RLU/Protein content. This indicates that, of all the formulations tested, Formulation A is the one that probably possesses the most appropriate balance between intracellular DNA release and proper DNA protection, required for successfully achieve gene transfer (Strand *et al.*, 2010).

In this experiment, the transfection activity was measured in two different time points, after 48 h and 72 h of incubation of the cells, with the objective of drawing a conclusion about the evolution of luciferase expression over time. However, taking all data into account, there was no correlation between the time of incubation and the transfection levels achieved.

Moreover, in the studies performed, another variable was tested to improve the transfection efficiency: the presence of Tween 80[®]. In fact, chitosan-based vectors usually present a low charge density around the physiological pH that leads to poor stability, low solubility and aggregation of NPs (Strand *et al.*, 2010). This was also observed by us, when performing stability studies in DMEM, since the ChiCas NPs formed large aggregates. In pharmaceutical industry, the non-ionic surfactant Tween 80[®] is one of the most used, and it may avoid the formation of large aggregates, and sterically preventing the binding of each molecule of DNA to more than one NP (Pozo-Rodríguez, del *et al.*, 2007). Therefore, almost every ratio tested was also tested with 1 % (v/v) Tween 80[®], to evaluate the impact of this polysorbate in the transfection efficacy. However, the formulations tested in the presence of the surfactant generally showed transfection levels equal or below the levels of the corresponding formulation without Tween 80[®]. In these transfection studies, there was no observable benefit for the application of polysorbate 80 to any of the formulations.

5. Conclusion and future perspectives

The future of the vaccine's field is exciting and the continuous advances in biotechnology are expected to lead us into the world of DNA vaccines.

However, despite the several approaches that have been investigated to improve the immune response's potency induced by DNA vaccines, they still have a major limitation: low *in vivo* transfection. As a non-viral vector for gene delivery, chitosan nanoparticles have shown great technological potential, nevertheless it is still imperative overcoming their improper ability to condense DNA and poor results of *in vitro* transfection studies. In this study, it was combined the advantageous properties of chitosan with the casein's ability to modulate the interaction between the chitosan and the DNA and boost transfection levels.

Moreover, to achieve a gene delivery system suitable for specific cell targeting towards macrophages and dendritic cells, enhancing cellular and humoral immune responses, glucan was incorporated into the nanoparticles structure. The results obtained from the preliminary transfection tests did not show an increase of gene transfer when glucan was added to the NPs, possibly because COS-7 do not express dectin-I receptor. Further ahead, new transfection studies with cell lines that express the dectin-I receptor may be carried out to truly assess whether the addition of glucan to the nanocarriers can accomplish an effective immune cell targeting.

To conclude, an appropriate design of the chitosan-based nanoparticles is essential to produce a successful gene delivery, as a simple change in the formulation influences its performance. Overall, our results illustrate that ChiCas NPs are capable to act as a gene delivery system yet, further investigation is required to optimize ChiCas NPs for a successful plasmid DNA-based vaccination.

6. References

- AGNIHOTRI, Sunil A.; MALLIKARJUNA, Nadagouda N.; AMINABHAVI, Tejraj M. - Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**. 100:1 (2004) 5–28.
- ANAL, Anil Kumar *et al.* - Preparation and characterization of nanoparticles formed by chitosan-caseinate interactions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 64:1 (2008) 104–110.
- BALDRICK, Paul - The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 56:3 (2010) 290–299.
- BORGES, Olga *et al.* - Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. **International Journal of Pharmaceutics**. 337:1–2 (2007) 254–264.
- CORDEIRO, Rosemeyre A. *et al.* - High transfection efficiency promoted by tailor-made cationic tri-block copolymer-based nanoparticles. **Acta Biomaterialia**. 47: (2017) 113–123.
- DUCEPPE, Nicolas; TABRIZIAN, Maryam - Advances in using chitosan-based nanoparticles for in vitro and in vivo drug and gene delivery. **Expert opinion on drug delivery**. England. (Electronic). 7:10 (2010) 1191–1207.
- ELZOGHBY, Ahmed O.; ABO EL-FOTOH, Wael S.; ELGINDY, Nazik A. - Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**. (2011) 206–216.
- ELZOGHBY, Ahmed O.; SAMY, Wael M.; ELGINDY, Nazik A. - Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**. 161:1 (2012) 38–49.
- ERBACHER, P.; REMY, J. S.; BEHR, J. P. - Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway. **Gene therapy**. 6:October 2015 (1999) 138–145.
- FERNÁNDEZ-URRUSUNO, Rocío *et al.* - Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. **Pharmaceutical Research**. 16:10 (1999) 1576–1581.
- GAO, Yu *et al.* - Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency. **International journal of pharmaceutics**. Netherlands. 359:1–2 (2008) 241–246.
- GARAIOVA, Zuzana *et al.* - Cellular uptake of DNA-chitosan nanoparticles: The role of clathrin- and caveolae-mediated pathways. **International Journal of Biological Macromolecules**. 51:5 (2012) 1043–1051.

- HEJAZI, Radi; AMIJI, Mansoor - Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**. 89:2 (2003) 151–165.
- JESUS, S.; BORCHARD, G.; BORGES, O. - Freeze Dried Chitosan/ Poly-ε -Caprolactone and Poly-ε -Caprolactone Nanoparticles: Evaluation of their Potential as DNA and Antigen Delivery Systems. **Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy**. 4:7 (2013) 1–11.
- JESUS, Sandra *et al.* - Immune response elicited by an intranasally delivered HBsAg low-dose adsorbed to poly-ε -caprolactone based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. 504:1–2 (2016) 59–69.
- JESUS, Sandra *et al.* - Poly-ε -caprolactone/chitosan nanoparticles provide strong adjuvant effect for hepatitis B antigen. **Nanomedicine (London, England)**. (2017).
- KAY, Mark A. - State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. **Nature Reviews Genetics**. 12:5 (2011) 316–328.
- LEBRE, F. *et al.* - Intranasal Administration of Novel Chitosan Nanoparticle/DNA Complexes Induces Antibody Response to Hepatitis B Surface Antigen in Mice. **Molecular Pharmaceutics**. 13:2 (2016) 472–482.
- LEBRE, Filipa *et al.* - **Chitosan-Based Nanoparticles as a Hepatitis B Antigen Delivery System** [Em linha]. 1. ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2012 Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00007-1>. ISBN 9780123918581.
- LECHARDEUR, D. *et al.* - Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol : a potential barrier to gene transfer. (1999) 482–497.
- LIU, Ge *et al.* - Biological Properties of Poly-L-lysine-DNA Complexes Generated by Cooperative Binding of the Polycation. **Journal of Biological Chemistry**. 276:37 (2001) 34379–34387.
- MANSOURI, Sania *et al.* - Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 57:1 (2004) 1–8.
- MAO, Hai Quan *et al.* - Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**. 70:3 (2001) 399–421.
- MORILLE, Marie *et al.* - Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. **Biomaterials**. 29:24–25 (2008) 3477–3496.
- NASTI, Alessandro *et al.* - Chitosan/TPP and chitosan/TPP-hyaluronic acid nanoparticles: Systematic optimisation of the preparative process and preliminary biological evaluation. **Pharmaceutical Research**. 26:8 (2009) 1918–1930.
- NITTA, Sachiko Kaihara; NUMATA, Keiji - Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene

- delivery and tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**. 14:1 (2013) 1629–1654.
- PAIVA, D. *et al.* - Chitosan conjugates for DNA delivery. **Physical Chemistry Chemical Physics**. (15:2013) 11893–11899.
- PARK, Juhee; KIM, Won Jong - Current status of gene delivery: spotlight on nanomaterial-polymer hybrids. **Journal of drug targeting**. 20:8 (2012) 648–66.
- POZO-RODRÍGUEZ, A. DEL *et al.* - Solid lipid nanoparticles: Formulation factors affecting cell transfection capacity. **International Journal of Pharmaceutics**. 339:1–2 (2007) 261–268.
- SENIOR, Judith; TRIMBLE, Kevin; MASKIEWICZ, Richard - Interaction of positively-charged liposomes with blood: implications for their application in vivo. **BBA - Biomembranes**. 1070:1 (1991) 173–179.
- SHARMA, Ashish Ranjan *et al.* - Next generation delivery system for proteins and genes of therapeutic purpose: Why and how? **BioMed Research International**. (2014).
- SOTO, Ernesto R. *et al.* - Targeted Delivery of Glucan Particle Encapsulated Gallium Nanoparticles Inhibits HIV Growth in Human Macrophages. **Journal of Drug Delivery**. 2016:Article ID 8520629 (2016) 8 pages.
- STRAND, Sabina P. *et al.* - Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. **Biomaterials**. 31:5 (2010) 975–987.
- TESZ, Gregory J. *et al.* - Glucan particles for selective delivery of siRNA to phagocytic cells in mice. **The Biochemical journal**. 436:2 (2011) 351–362.
- THOMAS, M.; KLIBANOV, A. M. - Non-viral gene therapy: Polycation-mediated DNA delivery. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 62:1 (2003) 27–34.