

## **SISTEMAS MICROFLUÍDICOS PARA INCORPORAÇÃO DE DNA EM NANOPARTICULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS**

K.R. COSTA<sup>1</sup>, A. RADAIC<sup>2</sup>, T. A. BALBINO<sup>1</sup>, M. B. DE JESUS<sup>2</sup>, L. G. DE LA TORRE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia

E-mail para contato: [latorre@feq.unicamp.br](mailto:latorre@feq.unicamp.br)

**RESUMO** – Este trabalho visou o desenvolvimento de sistemas microfluídicos para complexação eletrostática entre nanopartículas lipídica sólidas (SLNs) e DNA para aplicações em terapia gênica. As SLNs possuem um núcleo hidrofóbico composto por lipídeos sólidos a temperatura ambiente, que são estabilizados por tensoativos. A eficiência de incorporação das células é afetada pelo tamanho e polidispersidade dos complexos de DNA e nanopartículas catiônicas. Técnicas convencionais de complexação frequentemente geram complexos não adequados biologicamente. Por outro lado, sistemas microfluídicos permitem controle mais preciso das propriedades dos complexos e otimização da produção de carreadores de genes. As SLNs produzidas neste trabalho foram compostas por ácido esteárico, 1,2-di-oleoil-3-trimetilamônio-propano e Pluronic F68. A emulsão foi extrudada em uma miniextrusora para uniformizar o tamanho das nanopartículas. As amostras analisadas apresentaram baixa polidispersidade de  $(0,13 \pm 0,02)$ , diâmetro médio de  $(103,77 \pm 0,21)$  nm, e potencial zeta de  $(60,8 \pm 3,9)$  mV. Os dispositivos microfluídicos usados para produzir complexos de SLNs e DNA foram obtidos por técnicas de fotolitografia macia. Foram produzidos complexos pelos métodos convencional e microfluídico apresentaram de tamanho de partícula pequenos, polidispersidade baixo e potencial zeta positivo. Dessa forma, foi possível produzir complexos de DNA e SLNs com características físico-químicas adequadas para testes *in vitro* e *in vivo*.

### **1. INTRODUÇÃO**

A terapia gênica refere-se à inserção de ácidos nucleicos em células-alvo ou em órgãos com consequente expressão do material genético modificado. Porém, um fator importante para o sucesso da terapia gênica é o desenvolvimento de sistemas (vetores) capazes de transferir o gene de interesse de forma eficiente para o interior das células em um processo denominado transfecção. Esses vetores são geralmente classificados como virais e não-virais, e dentre estes últimos, vários vetores que empregam lipídeos em sua formulação podem ser aplicados na terapia gênica, incluindo lipossomas (De La Torre et al., 2009), emulsões e com menor frequência nanopartículas lipídicas sólidas.

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) são sistemas coloidais similares a emulsões convencionais, no entanto diferenciam-se por possuir um núcleo hidrofóbico composto por lipídeos que são sólidos a temperatura ambiente, sendo estabilizados pela presença de

tensoativos (Müller et al., 2002; Mehnert and Mahder, 2001). Estas dispersões combinam vantagens de diversos outros sistemas carreadores como nanopartículas poliméricas, lipossomas e emulsões, apresentando alta estabilidade ao longo da estocagem, biocompatibilidade (dependendo dos lipídeos utilizados), elevada capacidade de incorporação de compostos hidrofóbicos e possibilidade de proteção de compostos sensíveis e bioativos (Müller et al., 2002). Além disso, quando lipídeos catiônicos são incluídos na composição lipídica, as nanopartículas apresentam natureza catiônica, permitindo o carregamento de ácidos nucleicos (RNA, DNA) viabilizando aplicações em terapia gênica (De Jesus et al., 2013). A complexação convencional entre nanopartículas e ácidos nucleicos por agitação convencional em vórtex ou manual tem muitas variáveis, criando complexos com elevado tamanho, alta polidispersidade e de baixa eficiência de transfecção (Colosimo, A. *et al.*, 1999; Gao, X.; Huang, L., 1995; Peters, M. T. *et al.*, 1999). A fim de minimizar estes inconvenientes, dispositivos microfluídicos podem ser empregados (Koh, C. G. *et al.*, 2010). Microfluídica é a ciência e a tecnologia de sistemas que processam e manipulam pequenas quantidades de fluidos ( $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  litros), usando canais com dimensões de dezenas a centenas de micrômetros.

Neste contexto, a investigação de processos que permitam identificar a máxima incorporação de ácidos nucleicos em carreadores não-virais, tais como lipossomas e SLNs, podem contribuir na área de terapia gênica, resultando consequentemente em transfecções mais eficientes. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de produtos e processos farmacêuticos que veiculam tanto DNA como também RNA.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Ácido esteárico e Pluronic F68 e de 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) foram obtidos da Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA) e cedidos pelo Instituto de Biologia da Unicamp. PDMS e Sylgard 184 Elastomer foram adquirido da Dow Corning (Midland, MI, USA), vidros para selagem tubos de silicone foram obtidos do laboratório de microfabricação do CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

### 2.2 Metodologia

Preparo das Nanopartículas Lipídicas: Foram preparadas soluções aquosas 1mM de pluronic F68 (surfactante) e 2,5 mM de DOTAP (co-surfactante) em água bidestilada, em temperatura ambiente. As soluções foram aquecidas acima da temperatura de fusão do ácido esteárico (69°C). Tais soluções e água bidestilada foram adicionadas ao ácido esteárico previamente fundido de acordo com as proporções da Tabela 1 e o produto foi homogeneizado através de agitação vigorosa, formando uma microemulsão com característica catiônica. Todas as composições utilizadas podem ser encontradas na Tabela 1. Em seguida, a mini-extrusora (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA), com membrana de policarbonato com poros de 100 nm (Isopore™, Millipore), foi disposta em uma chapa de aquecimento de modo a manter a temperatura do sistema cerca de 5 °C acima da temperatura de fusão do lipídio sólido (de Jesus, *et al.*, 2013), e posteriormente a emulsão quente foi inserida na seringa doadora e extrudada por 15 vezes manualmente (de Jesus, *et al.*, 2013), com o objetivo de

uniformizar o tamanho das nanopartículas. As nanopartículas foram então levadas a um banho de gelo a 4°C e armazenadas para uso posterior.

Tabela 1- Composição das nanopartículas lipídica sólidas (SLNs) produzidas pela formação de uma microemulsão, seguida por uma etapa de extrusão para a redução e homogeneização de tamanho de partícula.

Composto	Molaridade *	Composição da solução Composto	H <sub>2</sub> O	Amostra de SLN
Ácido esteárico	7,0 mM	0,0020 g		0,0020 g
DOTAP	2,5 mM	0,0069 g	1000 µL	250 µL
Pluronic F68	1,0 mM	0,0010 g	1000 µL	100 µL
H <sub>2</sub> O				650 µL
Total da amostra:				1000 µL

\*Molaridade das soluções na amostra final

Caracterização das Nanopartículas Lipídicas: As SLNs foram caracterizadas através dos parâmetros físico-químicos distribuição de tamanhos e diâmetro médio hidrodinâmico, polidispersidade e densidade de carga (potencial zeta) utilizando o equipamento Zetasizer da Malvern. As amostras foram diluídas em água bidestilada em uma proporção de 5:95 a 1,0 mM e em seguida analisadas em triplicata.

Preparação dos dispositivos microfluídicos: O monômero frequentemente utilizado para construção dos dispositivos nessa técnica é o elastômero polidimetilsiloxano (PDMS). O procedimento consistia em inicialmente homogeneizar através de agitação manual o PDMS com o agente de cura (Sylgard 184 Elastomer) em uma relação m/m 10:1, e em seguida deixar a mistura em uma dessecadora conectada à vácuo por 40 min. Os moldes a serem utilizados foram previamente projetados utilizando o AutoCAD (Autodesk), foto-plotados com resolução de 8000 dpi e foi feita exposição UV utilizando o MJB-3 UV300 contact mask aligner (Karl-Suss, Garching, Germani) (BALBINO ET AL. 2013). Os moldes foram fixados a uma estrutura de metal e PDMS foi então despejado no molde. Em seguida os tubos de silicone foram anexados ao molde e para que suas localizações no dispositivo fossem corretas, foram usadas peças de acrílico que apresentavam mesma localização das entradas do dispositivo. O sistema foi deixado sobre uma chapa de aquecimento por 45 minutos para que ocorresse a cura do PDMS; após esse tempo o dispositivo foi cortado do tamanho desejado, retirado do molde e os pregos dos tubos de silicone foram removidos. A última etapa da técnica consistia na selagem irreversível do dispositivo com vidro através de plasma de O<sub>2</sub> na superfície do vidro e do dispositivo por 13 segundos, seguida da junção dos dois por pressão manual.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Produção das SLNs

As SLNs foram produzidas em condições pré-estabelecidas de acordo com o protocolo estabelecido por de Jesus, *et al.*(2013). Em termos de caracterização físico-química, as nanopartículas apresentaram índice de polidispersidade reduzido, com valor de  $0,13 \pm 0,02$ , e

potencial zeta positivo ( $+60,8 \pm 3,9$  mV), como apresentado na Tabela 2. Tais dados reafirmam o potencial das SLNs para complexação com ácidos nucleicos. Ácidos nucleicos possuem carga aniônica e por esse motivo são incapazes de sozinhos atravessarem a membrana de células, que também são aniônicas. Devido à característica catiônica das SLNs é possível a sua complexação com ácidos nucleicos através de interações eletrostáticas, viabilizando assim o carregamento do material genético para o interior de células.

Tabela 2- Propriedades físico-químicas de diâmetro médio ponderado por número, polidispersidade e potencial zeta das SLNs.

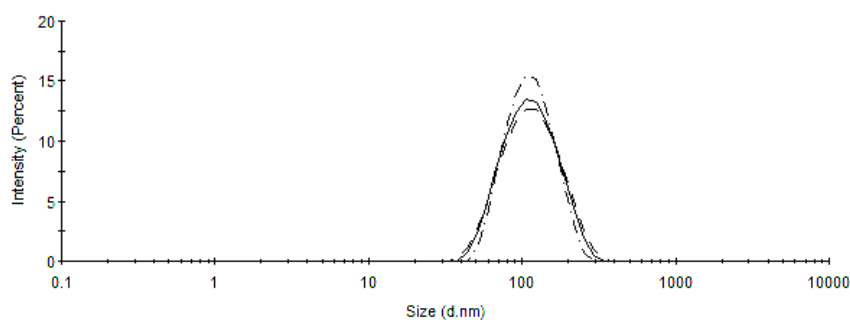
Diâmetro médio <sup>(ii)</sup> ( $\pm$ S.D.) nm	Polidispersidade Pdl <sup>(i)</sup>	Potencial Zeta ( $\pm$ S.D.) mV
$103,77 \pm 0,21$	$0,13 \pm 0,02$	$60,8 \pm 3,9$

(i) Pdl - polidispersidade das amostras, varia em ordem crescente entre 0 e 1.

(ii) Diâmetro médio equivale ao "z-average".

A Figura 2 os perfis de distribuição de tamanho (baseada em intensidade de luz espalhada) e densidade de carga (potencial zeta) em concordância com os valores apresentados na Tabela 2. O perfil de distribuição de tamanhos de partícula é característico de uma distribuição monomodal, com uma única população de nanopartículas próxima a 100 nm.

Figura 2- Distribuição de tamanho de partículas ponderadas por intensidade de luz das SLNs. Cada curva no gráfico representa a distribuição de tamanhos de uma triplicata ( $n = 3$ ).



### 3.2 Produção de complexos eletrostáticos entre pDNA e SLNs

Foram produzidos complexos entre DNA plasmídeo e as SLNs utilizando o método convencional bulk, no qual as duas soluções são misturadas por pipetagem, e os dispositivos microfluídicos. As propriedades físico-químicas dos complexos produzidos por pipetagem são apresentadas na Tabela 3. Para a análise, todas as amostras possuíam um volume de 50  $\mu$ L de SLNs diluídos em 1 mL de água bidestilada.

Tabela 3- Relação de cargas positivas e negativas dos complexos (N/P) em função das propriedades diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta. Os valores representam as médias de triplicatas  $\pm$  o desvio padrão (S.D.).

N/P	Diâmetro médio <sup>(ii)</sup> ( $\pm$ S.D.) nm	Polidispersidade Pdl <sup>(i)</sup>	Potencial Zeta ( $\pm$ S.D.) mV
5	222,47 $\pm$ 3,21	0,21 $\pm$ 0,03	45,2 $\pm$ 0,6
10	187,40 $\pm$ 9,23	0,20 $\pm$ 0,04	41,9 $\pm$ 2,1
20	157,87 $\pm$ 6,31	0,22 $\pm$ 0,01	45,2 $\pm$ 2,2
30	152,63 $\pm$ 6,19	0,19 $\pm$ 0,02	51,0 $\pm$ 4,3
40	143,50 $\pm$ 6,10	0,19 $\pm$ 0,04	48,6 $\pm$ 2,7

- (i) *Pdl - polidispersidade das amostras, varia em ordem crescente entre 0 e 1.*  
(ii) *Diâmetro médio equivale ao "z-average".*

Os resultados apresentados demonstram que os complexos formados apresentavam diminuição no seu diâmetro médio com o aumento na concentração de pDNA na amostra, a polidispersidade se manteve próxima em todas as formulações e o potencial zeta apresentou-se positivo, o que viabiliza assim o carregamento do material genético para o interior de células.

Os complexos produzidos utilizando os dispositivos microfluídicos seguiram as condições de operação de processo e apresentaram as propriedades físico-químicas conforme a Tabela 4. Foi utilizado um dispositivo microfluídico simples de focalização hidrodinâmica, no qual duas correntes de uma solução de SLNs comprimiam a corrente central contendo o DNA. As vazões de fluxos foram controladas por bombas seringa. É possível observar que os complexos obtidos pelo processo microfluídico apresentaram menores tamanhos de partículas e índices de polidispersidade que os complexos obtidos pelo método convencional. Estudos estão sendo conduzidos a fim de avaliar a melhor condição de N/P para ensaio de transfecção *in vitro*.

Tabela 4- Vazões das correntes injetadas no dispositivo microfluídico e relação de cargas positivas e negativas dos complexos (N/P) em função das propriedades diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta.

N/P	SLNs ( $\mu$ L/min)	DNA ( $\mu$ L/min)	Diâmetro médio <sup>(ii)</sup> ( $\pm$ S.D.) nm	Polidispersidade Pdl <sup>(i)</sup>	Potencial Zeta ( $\pm$ S.D.) mV
20	100	8,3	132,82 $\pm$ 0,97	0,21 $\pm$ 0,01	48,4 $\pm$ 1,4
40	100	4,2	110,75 $\pm$ 0,88	0,16 $\pm$ 0,02	26,5 $\pm$ 0,2

- (i) *Pdl - polidispersidade das amostras, varia em ordem crescente entre 0 e 1.*  
(ii) *Diâmetro médio equivale ao "z-average".*

## 4. CONCLUSÃO

A produção das nanopartículas lipídicas sólidas ocorreu sem grandes dificuldades exceto por eventuais rompimentos de membranas e a força manual intensa necessária para efetuar a extrusão. Os dispositivos microfluídicos (simples e com percursos) foram finalizados com sucesso. A caracterização das SLNs reafirmou o potencial do seu uso para a posterior produção de complexos DNA/SLN utilizando dispositivos microfluídicos.

## 5. REFERÊNCIAS

- BALBINO, T.A.; GASPERINI, A.; OLIVEIRA, C.L.P.; CAVALCATI, L.P.; AZZONI, A.R.; DE LA TORRE, L.G. Correlation between Physicochemical and Structural Properties with In vitro Transfection of pDNA/Cationic Liposomes Complexes. *Langmuir*. v. 28, p. 11535–11545, 2012
- BALBINO, T.A.; AOKI, N.T. ; GASPERINI, A.; OLIVEIRA, C.L.P.; CAVALCATI, L.P.; AZZONI, A.R.; DE LA TORRE, L.G. Continuous Flow Production of Cationic Liposomes at High Lipid Concentration in Microfluidic Devices for Gene Delivery Applications. *Chemical Engineering Journal*. v. 226, p. 423, 2013.
- COLOSIMO, A. *et al.* Gene transfection efficiency of tracheal epithelial cells by DC-Chol-DOPE/DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes*, v. 1419, n. 2, p. 186-194, 1999.
- DE JESUS, M. B., RADAIC, A., ZUHORN, I. S., & PAULA, E. Microemulsion extrusion technique: a new method to produce lipid nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(10), 1–15. 2013.
- DE LA TORRE LG, ROSADA RS, TROMBONE APF, FRANTZ FG, COELHO-CASTELO AAM, SILVA CL, SANTANA MHA. Synergy between structural stability and DNA-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE vesicles and DOTAP/DOPE lipoplexes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 73, 175-184, 2009.
- GAO, X.; HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, v. 2, n. 10, p. 710-722, 1995.
- KOH, C. G. *et al.* Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotide lipopolyplex nanoparticles assembled by microfluidic hydrodynamic focusing. *Journal of Controlled Release*, v. 141, n. 1, p. 62-69, 2010.
- LIMA, R.S. *et al.* Fabrication of PDMS microfluidic devices using soft lithography and plasma-based bonding. *Technical memorandum 062014 – CNPEM - Microfabrication laboratory*, p. 1-3, 2014.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Del Rev* 47:165-169. 2001
- MÜLLER, R.H. ; RADTKE, M.; WISSING SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Del Rev* 54: S131-S155. 2002
- PETERS, M. T. *et al.* Optimization of cationic liposome-mediated gene transfer to human bronchial epithelial cells expressing wild-type or abnormal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Experimental Lung Research*, v. 25, n. 3, p. 183-197, 1999.