

SISTEMA MICROFLUÍDICO PARA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA GLICOSILADA E TRIPOLIFOSFATO DE SÓDIO

T. D. MUSTAFÁ¹, A. C. S. N. PESSOA¹, G. PERLI¹, C. C. SIPOLI^{1,2} e L. G. de LA TORRE¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Engenharia Química

E-mail para contato: latorre@feq.unicamp.br

RESUMO – A quitosana é um biopolímero catiônico amplamente utilizado nas áreas farmacêutica e médica. A partir da glicosilação a quitosana apresenta uma maior aplicabilidade biológica por apresentar-se totalmente solúvel em água com pH neutro. Nanopartículas de quitosana podem ser obtidas por várias técnicas, dentre as quais destaca-se a microfluídica, que utiliza dispositivos capazes de processar pequenas quantidades de fluidos, permitindo operações contínuas e processos reprodutíveis. Este trabalho tem como principal objetivo o estudo da produção de nanopartículas de quitosana glicosilada utilizando o agente reticulante tripolifosfato de sódio para futuras aplicações em gene delivery. Para isso, estudou-se um dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica de geometria longa, empregando uma corrente central de água e correntes laterais formadas por soluções de quitosana glicosilada e tripolifosfato de sódio. A caracterização físico-química das nanopartículas foi realizada em termos de potencial zeta, tamanho e polidispersidade. Avaliou-se a influência do pH na formação de nanopartículas e as características mais favoráveis foram obtidas em condições ácidas (pH 4). Nesse caso, para uma concentração final de quitosana glicosilada de 0,4 mg/mL, foram produzidas nanopartículas com índice de polidispersidade de $0,03 \pm 0,02$ e 242 ± 2 nm de diâmetro médio.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, nanopartículas de quitosana têm mostrado grande aplicabilidade para os processos de veiculação de fármacos e ácidos nucleicos (*drug e gene delivery*) (Fan *et al.*, 2012). A terapia gênica consiste na introdução de ácidos nucleicos ao material genético intracelular do paciente a fim de induzir a produção de proteínas específicas, inibir a indução de um gene específico ou reverter mutações gênicas indesejáveis (Jeong *et al.*, 2007). O interesse na aplicação de polímeros naturais, em especial a quitosana (CHI), como vetores não virais de terapia gênica aumentou significativamente na última década por apresentarem diversas vantagens sobre compostos sintéticos, como baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Bulmer *et al.*, 2012).

No entanto, a aplicação de quitosana em sistemas biológicos é dificultada, pois seu grupo amino primário apresenta um valor de pKa de 6,5 e, conseqüentemente, a molécula é

insolúvel em água em pH fisiológico (7,4) (Strand *et al.*, 2008). Por sua vez, a quitosana glicosilada (GlyCHI) possui uma maior aplicabilidade biológica por apresentar-se totalmente solúvel em água com pH neutro (Yu *et al.*, 2008). Strand *et al.* (2008) comprovaram a eficácia de transfecção celular, ou seja, de entrega intracelular de ácidos nucleicos de interesse, a partir de oligômeros formados de GlyCHI.

Nanopartículas de quitosana podem ser produzidas por vários métodos, sendo que a gelificação ionotrópica está entre os mais utilizados. Essa técnica baseia-se na interação eletrostática da quitosana com polieletrólitos de íons opostos. Um poliânion bastante utilizado é o tripolifosfato de sódio (TPP) (Carrillo *et al.*, 2014). Além disso, a produção de nanopartículas por meio de dispositivos microfluídicos também vem sendo estudada. A microfluídica é caracterizada pelo estudo e manipulação de fluidos em escala micrométrica (Whitesides, 2006) e permite a síntese de nanopartículas com composição, morfologia, tamanho e distribuição de tamanho em processos reprodutíveis (Hasani-Sadradadi *et al.*, 2012; Karnik *et al.*, 2008). Deste modo, a microfluídica emerge como tecnologia promissora no desenvolvimento de processos para a produção de nanopartículas de quitosana.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi explorar os parâmetros operacionais de produção de nanopartículas de quitosana glicosilada utilizando o agente reticulante tripolifosfato de sódio em sistemas microfluídicos para futuras aplicações em terapia gênica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Quitosana glicosilada (GlyCHI) e tripolifosfato pentasódico (TPP), adquiridos da empresa Sigma Aldrich. Ácido acético glacial adquirido da Labsynth (Diadema, SP, Brasil). Para construção dos dispositivos microfluídicos, utilizou-se o Sylgard 184 Elastomer Kit da Dow Corning (Midland, MI, EUA).

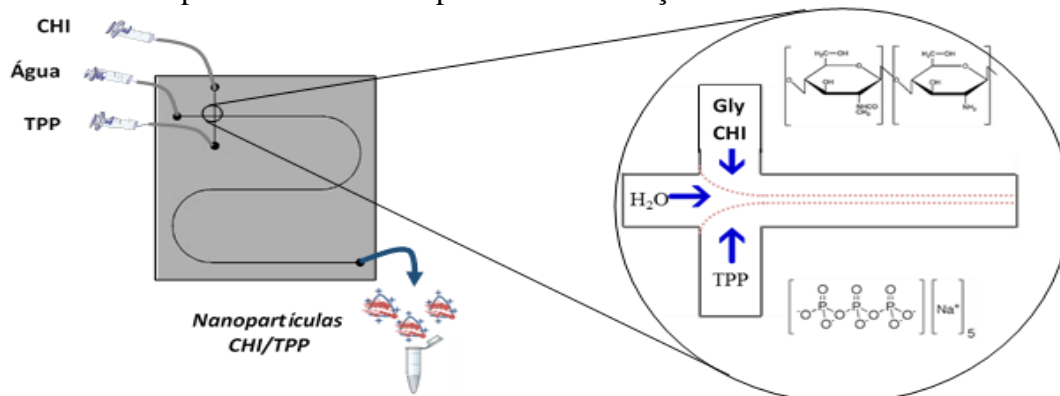
2.2 Métodos

Produção dos dispositivos: Os dispositivos foram construídos a partir de litografia macia em polidimetilsiloxano (PDMS), sendo selados com vidro através de plasma de O₂. Os microcanais apresentaram dimensões retangulares com 140 µm de largura e aproximadamente 50 µm de altura. Os microdispositivos foram preparados no Laboratório de Microfabricação no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM. Para este estudo, avaliou-se o dispositivo de focalização hidrodinâmica de geometria longa (Figura 1).

Produção das nanopartículas de quitosana: Com auxílio de bombas seringa do modelo PHD2000 (Infuse/Withdraw) da Harvard Apparatus, soluções de GlyCHI e TPP foram injetadas nas correntes laterais do dispositivo microfluídico, e água ultrapura foi inserida na corrente central (Figura 1). A razão entre a soma das vazões das correntes laterais com relação à vazão da corrente central foi definida pelo valor de FRR (*Flow Rate Ratio*).

Caracterização físico-química das nanopartículas: A caracterização das nanopartículas foi feita em termos de: (i) diâmetro médio e índice de polidispersidade (PDI), através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, e (ii) densidade de carga (potencial zeta), utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments.

Figura 1 – Esquema ilustrativo do dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica de geometria longa utilizado na produção de nanopartículas de GlyCHI e TPP. No detalhe, é possível observar o ponto de focalização das correntes.



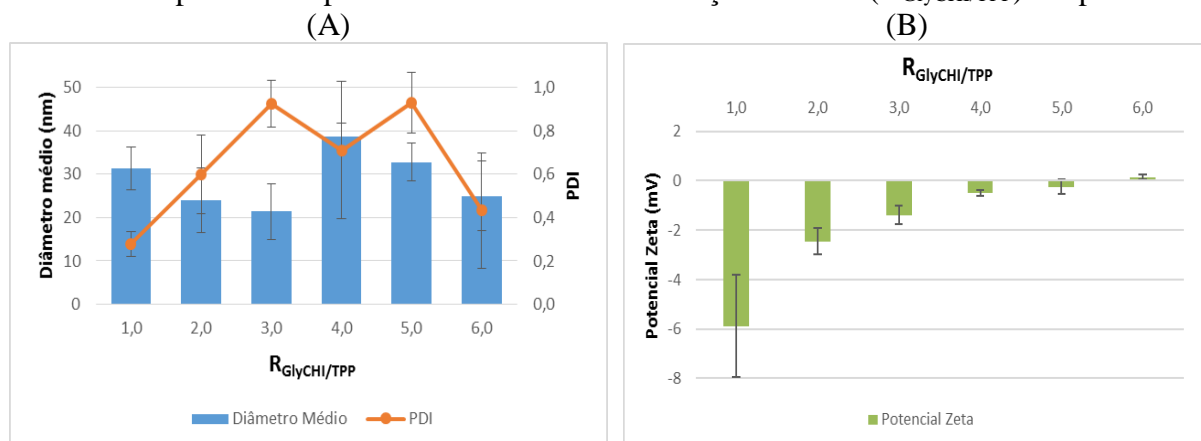
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o processo de produção de nanopartículas desenvolvido neste trabalho, o valor de FRR foi mantido constante e igual a 1,3, correspondente à vazão de cada corrente lateral ambas iguais a 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, e à vazão da corrente aquosa central de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. As outras variáveis operacionais envolvidas, como a relação mássica ($R_{\text{GlyCHI/TPP}}$) entre GlyCHI e TPP, as concentrações das soluções de GlyCHI e TPP e o pH das soluções utilizadas foram estudadas a fim de se obter as melhores condições operacionais.

3.1 Estudo da razão mássica entre GlyCHI e TPP ($R_{\text{GlyCHI/TPP}}$) em pH 7

Para avaliar a formação de nanopartículas de GlyCHI e TPP, o pH das soluções de água, GlyCHI e TPP foi mantido em 7, tendo em vista que a GlyCHI é solúvel neste pH. Após estudo prévio das condições de processo, a concentração final de GlyCHI foi fixada em 0,4 mg/mL. Os resultados da análise dessas amostras encontram-se nas figuras 2 (A) e 2 (B).

Figura 2 - Valores de (a) Diâmetro médio (ponderado por número) e Índice de Polidispersidade (PDI) e (b) Potencial Zeta (mV) obtidos a partir de nanopartículas produzidas para diferentes valores de relação mássica ($R_{\text{GlyCHI/TPP}}$) em pH 7.



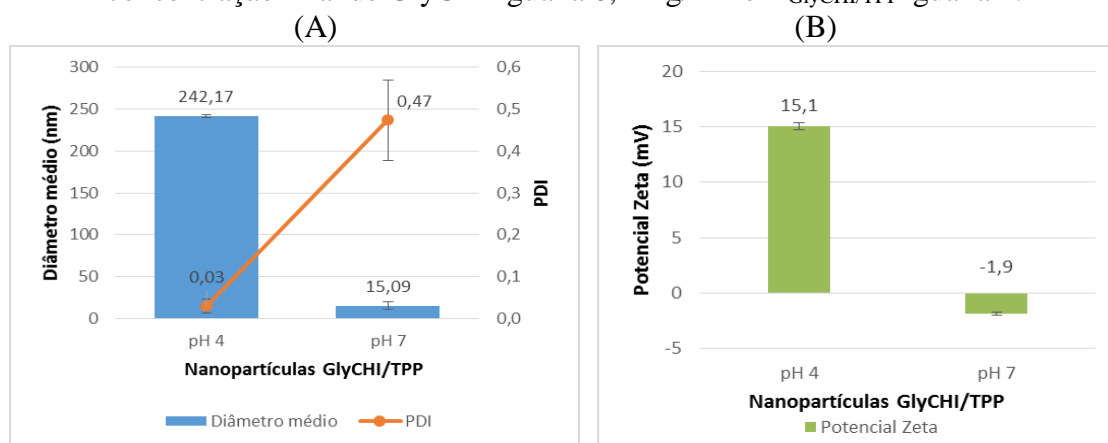
Como pode-se observar pela Figura 2, os valores de diâmetro médio das nanopartículas apresentaram valores muito próximos entre si e não seguiram alguma tendência com relação aos valores de $R_{\text{GlyCHI/TPP}}$. O potencial zeta das soluções coletadas aumentou com o valor de $R_{\text{GlyCHI/TPP}}$, como era esperado pelo aumento das cargas positivas provenientes dos grupos amino da GlyCHI (Lee *et al.*, 2004), porém apresentou-se negativo ou muito próximo de zero. Esse fator pode limitar a aplicabilidade biológica das nanopartículas produzidas, pois, além de não apresentarem estabilidade coloidal, os valores positivos de potencial zeta seriam desejáveis para aplicações de *gene delivery*, considerando a interação entre os vetores não virais catiônicos e a membrana celular negativa (la Fuente, de *et al.*, 2008).

Além disso, o índice de polidispersidade das partículas formadas apresentou-se elevado independentemente da razão mássica, chegando próximo a 1,0 em alguns casos. Com base nesses resultados, considerou-se que as partículas produzidas não se mostraram apropriadas para futuras investigações. Deste modo, estudou-se a influência do pH das soluções de água, GlyCHI e TPP para a produção de nanopartículas.

3.2 Estudo do efeito do pH na produção das nanopartículas

Para avaliar o efeito do pH nas características das nanopartículas de GlyCHI/TPP, as soluções de água, GlyCHI e TPP tiveram o pH ajustado para 4. A hipótese estabelecida para essa investigação foi de garantir que os grupamentos amina mantivessem sua característica catiônica, pela redução do pH, para favorecer as interações com o TPP. Nesse caso, manteve-se a condição do estudo anterior de concentração final de GlyCHI em 0,4 mg/mL e adotou-se o valor de $R_{\text{GlyCHI/TPP}}$ igual a 2. As características das amostras coletadas foram comparadas com os resultados obtidos no item anterior para $R_{\text{GlyCHI/TPP}}$ igual a 2, como apresentado nas Figuras 3 (A) e 3 (B).

Figura 3 – Valores de (A) Diâmetro médio e PDI (linha vermelha apenas para facilitar a visualização) e (B) Potencial Zeta (mV) para nanopartículas produzidas nos pHs 4 e 7 com concentração final de GlyCHI igual a 0,4 mg/mL e $R_{\text{GlyCHI/TPP}}$ igual a 2.



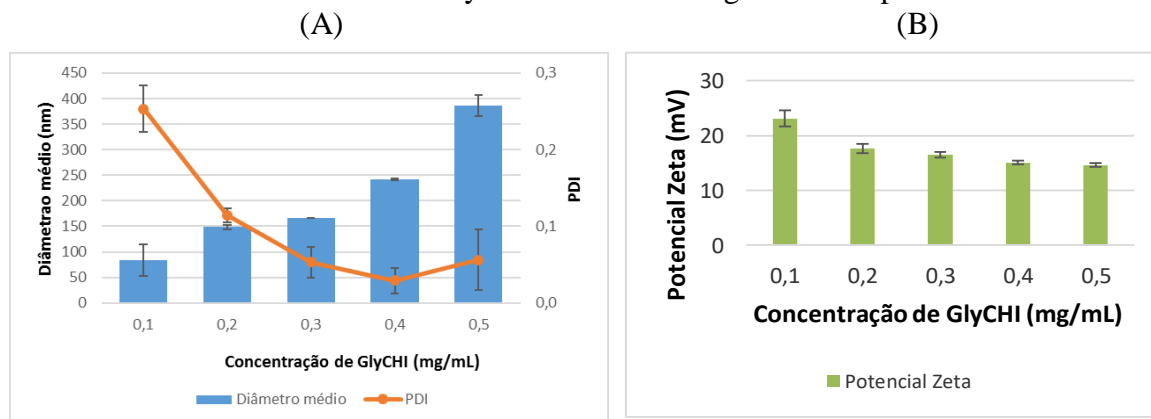
O estudo da variação de pH das soluções demonstrou uma grande influência sobre as características das partículas produzidas. Quando comparadas ao sistema em pH 7, as partículas GlyCHI/TPP produzidas em pH 4 apresentaram um valor de PDI muito menor e um valor de potencial zeta maior e positivo, como desejado. Isso pode ser justificado pelo fato de

que, em meio ácido, os grupamentos amina do polímero estão protonados e mais disponíveis para a interação eletrostática com os grupamentos fosfato do TPP. Em decorrência do aumento de diâmetro médio das partículas em pH 4, estudou-se como a concentração final de GlyCHI influencia no tamanho das partículas a fim de se obter os melhores parâmetros operacionais do processo.

3.3 Estudo da concentração final de GlyCHI em pH 4

A partir dos resultados obtidos nos itens anteriores, realizou-se um estudo da concentração final de GlyCHI. Esse estudo teve como objetivo encontrar a maior concentração de GlyCHI que permita a formação de nanopartículas com propriedades físico-químicas adequadas. Dessa forma, foram produzidas nanopartículas de GlyCHI/TPP mantendo-se $R_{\text{GlyCHI/TPP}}$ igual a 2, com pH das soluções de água, GlyCHI e TPP iguais a 4. A caracterização físico-química das amostras coletadas encontra-se nas Figuras 4 (A) e 4 (B).

Figura 4 – Valores de (A) Diâmetro médio (nm) e PDI e (B) Potencial Zeta (mV) obtidos a partir de nanopartículas produzidas para diferentes valores de concentração final de GlyCHI com $R_{\text{CHI/TPP}}$ igual a 2 em pH 4.



Pela análise da Figura 4 (A), pode-se observar que o tamanho das partículas tende a aumentar com o aumento da concentração de GlyCHI. Essa tendência é esperada porque uma maior concentração de GlyCHI no sistema favorece uma maior interação polímero-polímero (Evans e Wennerström, 1999), provavelmente levando o agente reticulante a complexar uma proporção mais alta de polímero por partícula, o que resulta em um maior tamanho de partícula.

Além disso, verificou-se que o PDI apresentou valores entre 0,25 e 0,03, que são muito interessantes para aplicações futuras em nanomedicina. Para a concentração de 0,4 mg/mL, foi obtido um valor de PDI de 0,03, indicando que a amostra é monodispersa, o que é desejável para garantir a reprodutibilidade da produção das nanopartículas.

Os valores de potencial zeta obtidos foram todos positivos, e observou-se uma diminuição do potencial zeta com o aumento da concentração de GlyCHI. Isso ocorre devido à maior interação polímero-polímero com o aumento da concentração, o que acarreta numa menor exposição das aminas protonadas da GlyCHI na disposição final das nanopartículas, resultando em uma carga superficial menos positiva (Bulmer *et al.*, 2012).

4. CONCLUSÕES

Os estudos realizados no presente trabalho demonstraram a produção de nanopartículas de GlyCHI/TPP a partir de um sistema microfluídico simples e com elevada reprodutibilidade. Embora a GlyCHI seja solúvel em pH 7, fato que poderia contribuir para a aplicabilidade biológica das nanopartículas, a produção em pH 4 mostrou-se mais favorável para a produção de nanopartículas de GlyCHI/TPP com baixa polidispersidade e potencialmente interessantes para aplicações em terapia gênica.

5. REFERÊNCIAS

- BULMER, C.; MARGARITIS, A.; XENOCOSTAS, A. Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. *Biochem. Eng. J.*, v. 68, p. 61–69, 2012.
- CARRILLO, C. *et al.* Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: Determination of loading efficiency. *Biomed. Pharmacother.*, v. 68, n. 6, p. 775–83, 2014.
- EVANS, D. F.; WENNERSTRÖM, H. **The Colloidal Domain: Where physics, chemistry, biology and technology meet**. 2nd. ed. [s.l.] WILEY-VCH, 1999.
- FAN, W. *et al.* Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, v. 90, p. 21–7, 2012.
- HASANI-SADRABADI, M. M. *et al.* Morphological Tuning of Polymeric Nanoparticles via Microfluidic Platform for Fuel Cell Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 134, p. 18904–18907, 2012.
- JEONG, J. H.; KIM, S. W.; PARK, T. G. Molecular design of functional polymers for gene therapy. *Prog. Polym. Sci.*, v. 32, n. 11, p. 1239–1274, 2007.
- KARNIK, R. *et al.* Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. *Nano Lett.*, v. 8, n. 9, p. 2906–2912, 2008.
- LA FUENTE, M. DE; SEIJO, B.; ALONSO, M. J. Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Ther.*, v. 15, n. 2008, p. 668–676, 2008.
- LEE, D.-W.; POWERS, K.; BANEY, R. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Polym.*, v. 58, n. 4, p. 371–377, 2004.
- STRAND, S. P. *et al.* Tailoring of chitosans for gene delivery: Novel self-branched glycosylated chitosan oligomers with improved functional properties. *Biomacromolecules*, v. 9, n. 11, p. 3268–3276, 2008.
- WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006.
- YU, J.-M. *et al.* Self-aggregated nanoparticles of cholesterol-modified glycol chitosan conjugate: Preparation, characterization, and preliminary assessment as a new drug delivery carrier. *Eur. Polym. J.*, v. 44, n. 3, p. 555–565, 2008.