

SISTEMAS MICROFLUÍDICOS DE GOTAS PARA INCORPORAÇÃO DE DNA EM LIPOSSOMAS CATIÔNICOS PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA GÊNICA

M. T. VITOR¹, A. L. P. de LIMA² e L. G. de la TORRE³

^{1,2,3} Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos
E-mail para contato: latorre@feq.unicamp.br

RESUMO – A terapia gênica visa à inserção de ácidos nucleicos em células-alvo, porém uma melhor eficiência de transfecção se dá com menor tamanho e polidispersidade dos complexos. Sistemas microfluídicos baseados em gotas são capazes de promover uma mistura rápida, gerando complexos com estas características. Neste contexto, utilizou-se no sistema microfluídico de gotas o óleo biocompatível FC-40 como fase contínua e a solução aquosa de lipossoma catiônico juntamente com pDNA, como fase dispersa. Incorporou-se pDNA nos lipossomas fixando o número de capilaridade (Ca), número adimensional que relaciona as forças viscosas e a tensão superficial entre as duas fases imiscíveis, em 0,003. Os lipossomas após incorporação do pDNA continuaram com o tamanho de aproximadamente 80 nm, a polidispersidade aumentou de 0,18 para 0,20 e potencial zeta diminuiu de 60 para 45 mV. Assim, este sistema nos permitiu obter complexos com propriedades desejáveis para transfecção.

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 (Guang Liu e De Yao, 2002). Um dos fatores importantes para o sucesso da terapia gênica é o desenvolvimento de sistemas capazes de transferir o gene de interesse de forma eficiente para o interior das células em um processo denominado transfecção (Verma e Weitzman, 2005). Esses vetores podem ser virais ou não-virais, e dentre estes últimos, lipossomas catiônicos destacam-se nesta função (Miller, 1998).

Lipossomas catiônicos são sistemas auto-agregados formados por lipídios de natureza anfifílica que geram bicamadas, as quais na presença de água em excesso formam vesículas esféricas. Lipídios catiônicos garantem a carga positiva dos lipossomas, podendo assim interagir eletrostaticamente com ácidos nucleicos, carregados negativamente, obtendo-se complexos capazes de serem incorporados nas células (Miller, 1998). No entanto, a obtenção de complexos lipossoma catiônico/ácido nucléico requer reprodutibilidade das propriedades físico-químicas para garantir eficiência na aplicação biológica.

Neste contexto, a microfluídica é a ciência de sistemas que processam e manipulam pequenas quantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} litros), usando canais com dimensões de até centenas de micrômetros. Recentes avanços nesta ciência criaram novas perspectivas para as áreas de “gene delivery”. O ambiente dentro de sistemas microfluídicos permite um controle preciso da produção de carreadores de genes e de fármacos (Jahn *et al.*, 2007; Jahn *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2002). Nosso grupo de pesquisa (Balbino *et al.*, 2013b; Trevisan *et al.*, 2011) mostrou a viabilidade do uso de técnicas microfluídicas para a produção de lipossomas catiônicos compostos por fosfatidilcolina de ovo (EPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) na proporção 50/25/25% molar, através de dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica simples e dupla, demonstrando serem promissores no transporte de genes *in vitro* para o interior de células HeLa.

A complexação convencional entre nanopartículas e ácidos nucleicos é realizada na maioria das vezes por agitação no vórtex ou manual, gerando variabilidade na reprodução, criando lipoplexos com grande tamanho, alta polidispersidade e de baixa eficiência de transfecção (Colosimo *et al.*, 1999; Gao e Huang, 1995; Peters *et al.*, 1999). A fim de minimizar estes inconvenientes, dispositivos microfluídicos podem ser empregados (Koh *et al.*, 2010). Balbino *et al.* (2013a) utilizaram sistemas microfluídicos de focalização hidrodinâmica simples e em uma única fase para incorporar pDNA aos lipossomas catiônicos EPC/DOTAP/DOPE (50/25/25% molar), e como resultado obteve-se níveis similares de transfecção *in vitro* em células HeLa quando comparado com complexos formados por agitação no vórtex.

Tawfik e Griffiths (1998) utilizaram um sistema microfluídico para compartimentalizar amostras individualmente em gotas aquosas dispersas em uma fase contínua oleosa, tornando-se um método importante para melhorar ensaios químicos e biológicos. Os sistemas microfluídicos convencionais baseados em uma fase, contínuos e de fluxo laminar possuem baixo número de Reynolds, já os sistemas microfluídicos baseados em gotas são capazes de promover uma mistura rápida, particularmente quando há uma região de mistura em forma de serpentina, gerando lipoplexos de menor tamanho e polidispersidade (Hsieh *et al.*, 2009). A transfecção de células a partir de lipoplexos é particularmente sensível ao tamanho dos lipoplexos (Harris e Giorgio, 2005), pois cada linhagem celular possui um tamanho de lipoplexo ótimo para a transfecção (Hsieh *et al.*, 2009). Por exemplo, Hsieh *et al.* (2009) compararam um sistema microfluídico de gotas para complexar DNA aos lipossomas catiônicos compostos por DOTMA (cloreto de N-[1,2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamônio) e DOPE (1:1 m/m) com as técnicas convencionais de preparação de lipoplexos envolvendo agitação manual e por vórtex; e os resultados demonstraram que o sistema microfluídico possuía uma maior capacidade de complexar lipossomas catiônicos e DNA simultaneamente de forma constante e uniforme, gerando lipoplexos com propriedades físico-químicas mais reprodutíveis e com menor polidispersidade.

Neste contexto, o desenvolvimento de processos que promovam a complexação eletrostática entre vetores não-virais e o DNA de forma reprodutível e que permitam a formação de complexos com menor tamanho e polidispersidade, resultará consequentemente em transfecções mais eficientes, e isto será fundamental para o desenvolvimento da terapia gênica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Na produção de lipossomas catiônicos em microcanais foram usados os fosfolipídios: EPC, DOPE e DOTAP adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) e a água para injeção da Samtec (Ribeirão Preto, SP, Brasil). A complexação dos lipossomas com pDNA em sistema microfluídico de gotas foi estudado em óleo Fluorinert Eletronic Liquid FC-40 da 3M (Zwijndrecht, Bélgica) com 5% v/v de surfactante Pico-Surf 1 da Sphere Fluidics (Cambridge, Reino Unido).

2.2. Metodologia

Fabricação dos dispositivos microfluídicos: Para a produção de lipossoma foi utilizado canais microfluídicos em T, que possuem uma seção transversal retangular com profundidade de 100 μm e largura de 140 μm (Figura 1 A). Por outro lado, os dispositivos para produção de emulsão (Figura 1 B) possuem uma seção transversal com 50 μm de profundidade, e a largura do canal em formato de serpentina, no qual ocorre o processo de “mixing” e que é usado para o cálculo da velocidade média de escoamento do sistema, possui 200 μm . Os dispositivos foram produzidos no Laboratório de Microfabricação no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) utilizando a técnica de litografia macia em polidimetilsiloxano (PDMS), sendo então selados em vidro através de plasma de O_2 na superfície, como descrito por Moreira *et al.* (2009).

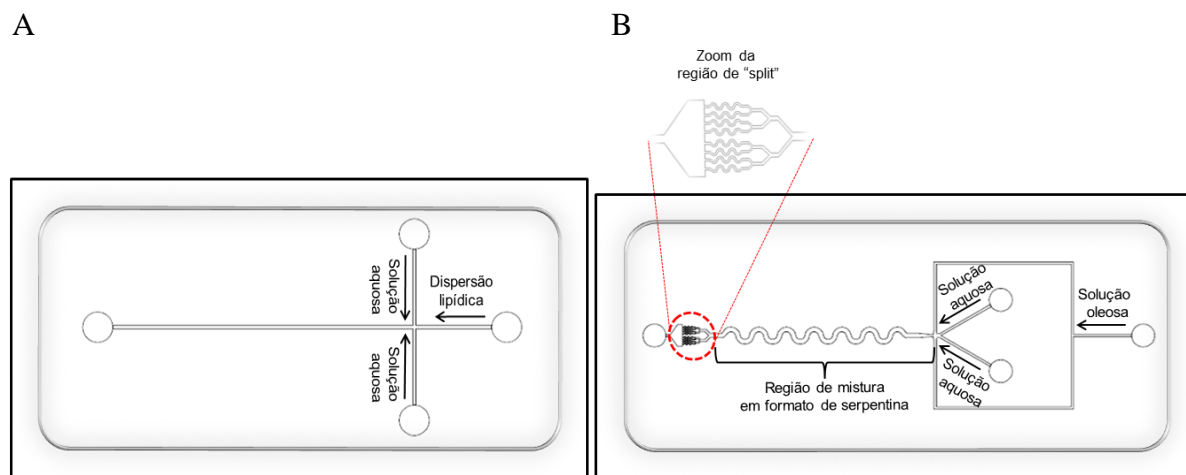


Figura 1 - Dispositivos microfluídicos utilizados no projeto para produção de lipossomas, por focalização hidrodinâmica simples em uma única fase (A) e para produção de gotas (emulsões água em óleo) (B). Figura 1 A adaptada de Balbino *et al.* (2013c).

Produção de lipossomas catiônicos em sistema microfluídico: Utilizou-se dispositivo microfluídico com focalização hidrodinâmica (Figura 1 A), de acordo com processo desenvolvido por Balbino *et al.* (2013a). A suspensão lipídica (EPC/DOTAP/DOPE, 50/25/25% molar) em etanol

anidro a 25 mM foi injetada no sistema a 10,92 $\mu\text{L}/\text{min}$ através de bombas seringas KDSscientific, modelo KDS-200 (Holliston, MA, EUA) e como fase aquosa foi utilizada água para injeção introduzida a 54,6 $\mu\text{L}/\text{min}$ no sistema.

Teste de estabilidade dos lipossomas na emulsão: Os lipossomas foram injetados no dispositivo microfluídico de gotas (Figura 1B) a uma vazão de 0,67 $\mu\text{L}/\text{min}$, enquanto a fase oleosa com óleo FC-40 e surfactante Pico-Surf 1, foi injetada a uma vazão de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ (vazões semelhantes às de Lee e Hsieh (2010)). Após o processamento, a emulsão obtida foi centrifugada a uma velocidade de 10000 rpm por 4 minutos, para separação da fase aquosa localizada na fase superior do centrifugado.

Investigação da razão entre vazão de entrada das soluções aquosas e vazão total (w_f): Os lipossomas (fase aquosa) e a fase oleosa (óleo FC-40 com Pico-Surf 1) foram injetados no dispositivo microfluídico de gotas (Figura 1B) a 25°C com o número de capilaridade fixo em $Ca=0,003$ (Q_{oleoso} fixo 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ como utilizado por Lee e Hsieh (2010)), e a vazão da fase aquosa (Q_{aquoso}) variando de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Variação da vazão da fase aquosa composta por lipossoma catiônico (Q_{aquoso}) para investigação do w_f do sistema de gotas. A vazão da fase oleosa composta por óleo FC-40 com 5% (v/v) de surfactante Pico-Surf 1 (Q_{oleoso}) é fixa em 2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Q_{oleoso} ($\mu\text{L}/\text{min}$)	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Q_{aquoso} ($\mu\text{L}/\text{min}$)	0,22	0,47	0,50	0,53	0,67	0,74	0,78	0,86	1,33	2,00	6,00
w_f	0,18	0,32	0,33	0,35	0,40	0,42	0,44	0,46	0,57	0,67	0,86

Preparação dos complexos pDNA/lipossoma catiônico em sistema microfluídico de gotas: Os complexos foram obtidos em sistema microfluídico de gotas na razão molar de cargas entre ácidos nucleicos (carga negativa) e lipídios catiônicos provindo dos lipossomas ($R_{+/-}$) 3. O sistema foi colocado durante a complexação sobre um sistema Peltier da Watronix, Inc. (Califórnia, EUA) para manter a temperatura da complexação em 4 °C. Condições descritas como ótimas por Balbino *et al.* (2012) e Balbino *et al.* (2013d). A operação do sistema para complexação foi realizada em $w_f = 0,33$, porém o número de capilaridade do sistema variou de 0,0008 a 0,005. O pDNA e os lipossomas catiônicos (soluções aquosas) e a solução oleosa composta de óleo FC40 acrescida de surfactante foram introduzidos nos seus respectivos canais do dispositivo (Figura 1B) através de bombas seringas em seringas de vidro Hamilton (Nevada, EUA). Após o processo de complexação, a emulsão obtida foi centrifugada a uma velocidade de 10000 rpm por 4 minutos, para separação da fase aquosa localizada na fase superior do centrifugado.

Determinação do número de capilaridade: O número de capilaridade (Ca) é um número adimensional que relaciona as forças viscosas e a tensão superficial entre as duas fases imiscíveis. $Ca = \mu_c U / \gamma$, onde μ_c é a viscosidade dinâmica da fase contínua, U é a velocidade média de escoamento e γ é a tensão superficial entre as duas fases imiscíveis. A viscosidade dinâmica da fase contínua (óleo FC40 com surfactante) foi obtida através da análise do material em reômetro Anton Paar, modelo Physica MCR301 (Graz, Áustria). A tensão interfacial foi obtida pelo método da gota pendente realizado no tensiômetro Teclis, modelo Tracker-S (Longessaigne, França).

Caracterização físico-química dos lipossomas catiônicos “vazios” e complexados com pDNA: Os lipossomas, “vazios” e complexados com pDNA, foram caracterizados nos seguintes aspectos: distribuição de tamanhos, polidispersidade e potencial zeta utilizando equipamento Zetasizer da Malvern Nano Series, modelo ZEN3600 (Worcestershire, Reino Unido). Todas as amostras foram diluídas em água para injeção a 25° C até 0,25 mM antes de serem analisadas em triplicata. Neste trabalho foram utilizadas duas distribuições de tamanho baseada em intensidade de luz espalhada e em número de partículas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estabilidade dos lipossomas após processamento em dispositivos microfluídicos de gotas

Em etapa anterior ao estudo da complexação eletrostática entre os lipossomas catiônicos e ácidos nucleicos, os lipossomas foram inseridos nos dois canais de entrada de solução aquosa no dispositivo microfluídico de gotas, para estudo da estabilidade destes durante o processo. Os lipossomas submetidos ao dispositivo microfluídico de gotas foram caracterizados em termos de tamanho, polidispersidade e potencial zeta conforme mostrado na Tabela 2. Através dos dados da Tabela 2 é possível verificar que os tamanhos (95,54 nm antes e 86,85 nm após), polidispersidade (0,144 antes e 0,164 após) e potencial zeta (60,5 mV antes e 57,1 mV após) dos lipossomas antes e após inserção no sistema microfluídico de gotas foram semelhantes. Dessa forma, percebeu-se que não havia variação nas características físico-químicas dos lipossomas quando submetidos ao sistema microfluídico de gotas.

Tabela 2 - Tamanho, polidispersidade e potencial zeta dos lipossomas antes e após inserção no dispositivo microfluídico de gotas. Ensaios realizados com lipossomas produzidos em água.

Lipossomas	Diâmetro médio (\pm S.D.) nm e distribuição (\pm S.D.) %		Polidispersidade Pdl ⁽ⁱⁱⁱ⁾	Potencial Zeta (\pm S.D.) mV
	Intensidade ⁽ⁱ⁾	Número ⁽ⁱⁱ⁾		
Antes de inserção no dispositivo	130,2 \pm 5,7 (100 \pm 0)	95,5 \pm 15,4 (100 \pm 0)	0,144 \pm 0,016	60,5 \pm 3,4
Após inserção no dispositivo	123,2 \pm 2,4 (100 \pm 0)	86,8 \pm 13,5 (100 \pm 0)	0,164 \pm 0,022	57,6 \pm 2,6

(i) Intensidade - média ponderada do diâmetro e distribuição (I-distribuição).

(ii) Número - média ponderada do diâmetro e distribuição (N-distribuição).

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

3.2. Investigação da razão entre vazão de entrada das soluções aquosas e vazão total (w_f)

Durante a investigação da razão entre vazão de entrada das soluções aquosas (neste caso os lipossomas) e vazão total, percebeu-se que em w_f acima de 0,44 o fluxo era laminar (Figura 2D). Em w_f entre 0,35 e 0,42, as gotas eram muito grandes (Figura 2C) de tal forma que os vórtices formados dentro da gota devido à geometria de serpentina, geravam menor convecção dentro do

sistema do que em gotas menores (Bringer *et al.*, 2004). Em w_f 0,18 e 0,32 formava gotas menores (Figura 2A), porém longe da região de “estrangulamento” onde a gota deveria ser formada e com uma periodicidade menor. Assim, tendo em vista o tamanho das gotas, local de formação das gotas, periodicidade de formação das gotas e tempo de processamento (maior w_f , maior vazão e menor tempo de operação), concluímos que era mais conveniente estabelecer $w_f = 0,33$ (Figura 2B) como condição ótima de obtenção das gotas no sistema.

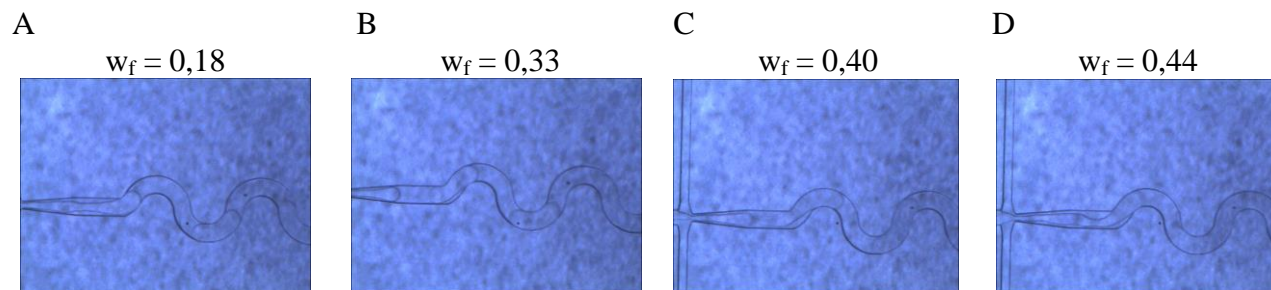


Figura 2 – Imagens da formação de gotas em sistema microfluídico em diversas razões entre vazão de entrada das soluções aquosas e vazão total (w_f): (A) 0,18, (B) 0,33, (C) 0,40 e (D) 0,44. Optamos por $w_f = 0,33$ como condição ótima de obtenção de gotas no sistema.

3.3. Investigação do número de Capilaridade (Ca) com $w_f = 0,33$ e $R_{+/-} = 3$ fixos

A investigação do número de capilaridade (Ca) variando de 0,0008 a 0,005, foi realizada no sistema microfluídico de gotas considerando w_f (razão entre vazão de entrada das soluções aquosas e vazão total) e $R_{+/-}$ (razão molar de cargas entre ácidos nucleicos e lipídios catiônicos) fixos em 0,33 em 3, respectivamente. Os complexos obtidos foram caracterizados em termos de tamanho, polidispersidade e potencial zeta conforme apresentado na Tabela 3. É possível perceber que em $Ca = 0,009$, 0,001 e 0,005 há formação de duas populações de nanopartículas analisando tamanho em intensidade e/ou número e polidispersidade acima de 0,25; o que poderia dificultar a transfecção já que estudos *in vitro* demonstraram que nanopartículas de tamanho entre 100 e 200 nm e polidispersidade menor que 0,2 (distribuição de tamanho homogênea) são mais facilmente internalizadas por células animais *in vitro*, supondo que elas despenderiam menos energia na captura (Muthu *et al.*, 2012; Rejman *et al.*, 2004). Já em $Ca = 0,0008$ e 0,003 há somente uma população de nanopartículas homogênea com polidispersidade abaixo de 0,2, porém o potencial zeta das nanopartículas ficou menor em $Ca = 0,003$ demonstrando que houve melhor incorporação de pDNA (carga negativa) aos lipossomas catiônicos. Além disso, em $Ca = 0,0008$ a bomba seringa é submetida a vazões muito baixas ($Q_{\text{aquoso}} = 0,25 \mu\text{L}/\text{min}$) que chegam ao seu limite operacional, dificultando a obtenção dos complexos. Dessa forma, pode-se optar para produção de lipoplexos para transfecção *in vitro* em células animais o sistema operando em $Ca=0,003$, pois apresentou somente um pico em intensidade e número, o potencial zeta ficou mais baixo mas não chegou a ser negativo, além de ocorrer a uma vazão mais alta o que facilita a operação do sistema.

Tabela 3 - Tamanho, polidispersidade e potencial zeta dos lipoplexos (lipossomas incorporados com pDNA) em sistema microfluídico de gotas fixando w_f (razão entre vazão de entrada das soluções aquosas e vazão total) em 0,33 e $R_{+/-}$ (razão molar de cargas entre ácidos nucleicos e lipídios catiônicos) em 3 e variando o número de capilaridade (Ca) de 0,0008 a 0,005.

Lipoplexos ($w_f = 0,33$ e $R_{+/-} = 3$)	Diâmetro médio (\pm S.D.) nm e distribuição (\pm S.D.) %		Polidispersidade Pdl ⁽ⁱⁱⁱ⁾	Potencial Zeta (\pm S.D.) mV
	Intensidade ⁽ⁱ⁾	Número ⁽ⁱⁱ⁾		
Ca = 0,0008	158,6 \pm 5,3 (100 \pm 0)	99,8 \pm 22,7 (100 \pm 0)	0,185 \pm 0,005	50,8 \pm 1,5
Ca = 0,0009	255,9 \pm 52,1 (66,0 \pm 17,1)	77,5 \pm 14,9 (94,5 \pm 0,6)	0,252 \pm 0,003	21,2 \pm 0,7
	92,0 \pm 20,9 (34,0 \pm 17,1)	236,3 \pm 49,1 (5,5 \pm 0,6)		
Ca = 0,001	131,6 \pm 12,1 (54,5 \pm 2,9)	104,8 \pm 5,4 (99,1 \pm 0,4)	0,461 \pm 0,013	28,5 \pm 0,8
	692,2 \pm 88,9 (45,5 \pm 2,9)	570,7 \pm 131,6 (0,9 \pm 0,4)		
Ca = 0,003	147,2 \pm 8,2 (100 \pm 0)	77,7 \pm 17,7 (100 \pm 0)	0,206 \pm 0,003	45,7 \pm 1,3
Ca = 0,005	206,1 \pm 23,0 (68,6 \pm 13,6)	68,0 \pm 8,7 (100 \pm 0)	0,258 \pm 0,005	50,4 \pm 1,2
	81,1 \pm 13,7 (31,4 \pm 13,6)			
Lipossomas	113,8 \pm 21,1 (100 \pm 0,0)	83,0 \pm 18,4 (100 \pm 0,0)	0,180 \pm 0,010	60,6 \pm 0,9

(i) Intensidade - média ponderada do diâmetro e distribuição (I-distribuição).

(ii) Número - média ponderada do diâmetro e distribuição (N-distribuição).

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

4. CONCLUSÃO

Sistema microfluídico de gotas para incorporação de pDNA em lipossomas catiônicos utilizando como condições operacionais $w_f = 0,33$ e $R_{+/-} = 3$ e Ca = 0,003, gera complexos com características físico-químicas (tamanho em número de aproximadamente 80 nm, polidispersidade 0,20 e potencial zeta 45 mV) desejáveis a uma transfecção *in vitro* eficiente em células de mamíferos.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos órgãos de fomento deste projeto: FAPESP, CNPq e CAPES; e ao Laboratório de Microfabricação no LNLS onde foram fabricados os microdispositivos.

6. REFERÊNCIAS

- BALBINO; AZZONI, A. R.; DE LA TORRE, L. G. Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 111, n. 0, p. 203-210, 2013a.
- BALBINO, T. A.; AOKI, N. T.; GASPERINI, A. A.; OLIVEIRA, C. L.; AZZONI, A. R.; CAVALCANTI, L. P.; 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*, 2013b.
- BALBINO, T. A.; AOKI, N. T.; GASPERINI, A. A. M.; OLIVEIRA, C. L. P.; AZZONI, A. R.; CAVALCANTI, L. P.; DE LA TORRE, L. G. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. *Chem. Eng. J.*, v. 226, n. 0, p. 423-433, 2013c.

- BALBINO, T. A.;GASPERINI, A. A. M.;OLIVEIRA, C. L. P.;AZZONI, A. R.;CAVALCANTI, L. P.; DE LA TORRE, L. G. Correlation of the Physicochemical and Structural Properties of pDNA/Cationic Liposome Complexes with Their in Vitro Transfection. *Langmuir*, v. 28, n. 31, p. 11535-11545, 2012.
- BRINGER, M. R.;GERDTS, C. J.;SONG, H.;TICE, J. D.; ISMAGILOV, R. F. Microfluidic systems for chemical kinetics that rely on chaotic mixing in droplets. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 362, n. 1818, p. 1087-1104, 2004.
- COLOSIMO, A.;SERAFINO, A.;SANGIUOLO, F.;DI SARIO, S.;BRUSCIA, E.;AMICUCCI, P.;NOVELLI, G.;DALLAPICCOLA, B.; MOSSA, G. 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.
- GAO, X.; HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.*, v. 2, n. 10, p. 710-722, 1995.
- GUANG LIU, W.; DE YAO, K. Chitosan and its derivatives—a promising non-viral vector for gene transfection. *J. Controlled Release*, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- HARRIS, S. S.; GIORGIO, T. D. Convective flow increases lipoplex delivery rate to in vitro cellular monolayers. *Gene Ther.*, v. 12, n. 6, p. 512-520, 2005.
- HSIEH, A. T.-H.;HORI, N.;MASSOUDI, R.;PAN, P. J.-H.;SASAKI, H.;LIN, Y. A.; LEE, A. P. Nonviral gene vector formation in monodispersed picolitre incubator for consistent gene delivery. *LChip*, v. 9, n. 18, p. 2638-2643, 2009.
- JAHN, A.;VREELAND, W. N.;DEVOE, D. L.;LOCASCIO, L. E.; GAITAN, M. Microfluidic Directed Formation of Liposomes of Controlled Size. *Langmuir*, v. 23, n. 11, p. 6289-6293, 2007.
- JAHN, A.;VREELAND, W. N.;GAITAN, M.; LOCASCIO, L. E. Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 126, n. 9, p. 2674-2675, 2004.
- KOH, C. G.;ZHANG, X.;LIU, S.;GOLAN, S.;YU, B.;YANG, X.;GUAN, J.;JIN, Y.;TALMON, Y.;MUTHUSAMY, N.;CHAN, K. K.;BYRD, J. C.;LEE, R. J.;MARCUCCHI, G.; LEE, L. J. Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotide lipopolyplex nanoparticles assembled by microfluidic hydrodynamic focusing. *J. Controlled Release*, v. 141, n. 1, p. 62-69, 2010.
- LEE, A. P. I. C. A.; HSIEH, A. T.-H. I. C. A. *Microfluidic device for forming monodisperse lipoplexes*. US 7811603, 2010.
- MILLER, A. D. Cationic liposome systems in gene therapy. *IDrugs*, v. 1, n. 5, p. 574-583, 1998.
- MOREIRA, N. H.;DE ALMEIDA, A. L. D. J.;DE OLIVEIRA PIAZZETA, M. H.;DE JESUS, D. P.;DEBLIRE, A.;GOBBI, Â. L.; DA SILVA, J. A. F. Fabrication of a multichannel PDMS/glass analytical microsystem with integrated electrodes for amperometric detection. *Lab on a Chip*, v. 9, n. 1, p. 115-121, 2009.
- MUTHU, M. S.;KULKARNI, S. A.;RAJU, A.; FENG, S. S. Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots. *Biomaterials*, v. 33, n. 12, p. 3494-3501, 2012.
- PETERS, M. T.;BRIGHAM, K. L.;KING, G. A.;MEYRICK, B. O.;GAO, X.; STECENKO, A. A. Optimization of cationic liposome-mediated gene transfer to human bronchial epithelial cells expressing wild-type or abnormal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Exp. Lung Res.*, v. 25, n. 3, p. 183-197, 1999.
- REJMAN, J.;OBERLE, V.;ZUHORN, I. S.; HOEKSTRA, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*, v. 377, n. Pt 1, p. 159-169, 2004.
- TAWFIK, D. S.; GRIFFITHS, A. D. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.*, v. 16, p. 652 - 656, 1998.
- TREVISAN, J. E.;CAVALCANTI, L. P.;OLIVEIRA, C. L. P.;DE LA TORRE, L. G.; SANTANA, M. H. A. Technological aspects of scalable processes for the production of functional liposomes for gene therapy. In: YUAN, X.-B. (Ed.). *Non-Viral Gene Therapy*. InTech, 2011. p.267-292.
- VERMA, I. M.; WEITZMAN, M. D. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem*, v. 74, p. 711-738, 2005.
- WAGNER, A.;VORAUER-UHL, K.;KREISMAYR, G.; KATINGER, H. The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method. *J Liposome Res*, v. 12, n. 3, p. 259-270, 2002