

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

Maria Fernanda Pescarini Filippi

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(BETA-AMINO ÉSTER) PARA ENTREGA DE DNA

CAMPINAS 2019

Maria Fernanda Pescarini Filippi

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(BETA-AMINO ÉSTER) PARA ENTREGA DE DNA

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucimara Gaziola de la Torre Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA FERNANDA PESCARINI FILIPPI E ORIENTADA PELA PROF^ª. DR^ª. LUCIMARA GAZIOLA DE LA TORRE.

> CAMPINAS 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 33003017034P8

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

F478s	Filippi, Maria Fernanda Pescarini, 1990- Síntese de nanopartículas de Poli(Beta-amino éster) para entrega de DNA /Maria Fernanda Pescarini Filippi. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.
	Orientador: Lucimara Gaziola de la Torre. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	1. Nanopartículas. 2. Microfluídica. 3. Polímeros. I. Torre, Lucimara Gaziola de la, 1971 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Synthesis of Poly(Beta-amino ester) nanoparticles for DNA delivery Palavras-chave em inglês: Nanoparticles Microfluidics Polymers Área de concentração: Engenharia Química Titulação: Mestra em Engenharia Química Banca examinadora: Lucimara Gaziola de la Torre [Orientador] Rosiane Lopes da Cunha Roniérik Pioli Vieira Data de defesa: 11-02-2019 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida por Maria Fernanda Pescarini Filippi e aprovada em 11 de fevereiro de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

> Prof^a. Dr^a. Lucimara Gaziola de La Torre FEQ / UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Rosiane Lopes da Cunha FEA / UNICAMP

> Prof. Dr. Roniérik Pioli Vieira FEQ / UNICAMP

*A ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, o que há de mais precioso no mundo para mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família por estar sempre comigo. Aos meus pais, Wilson e Maria de Lourdes, por todo o apoio e amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e me incentivar a dar o meu melhor. Às minhas irmãs, Bi e Ni, pela eterna amizade e companheirismo. À minha tia Marisa, que é como uma segunda mãe. Aos meus avós, Dirceu e Lourdes, por estarem sempre por perto torcendo por mim. Vocês todos são a minha vida.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Lucimara, por, simplesmente, tudo. Sou muito grata pela compreensão e ajuda quando eu precisei. Obrigada por todos os ensinamentos, por tentar melhorar minhas fraquezas e ressaltar minhas virtudes. Obrigada pela ética e humanidade com que você trata o mundo. Sorte a minha tê-la como orientadora.

Agradeço a meu co-orientador, Prof. Marcelo Bispo, por abrir as portas do seu laboratório para mim e me deixar à vontade para trabalhar no meu ritmo. Obrigada por todas as conversas científicas e motivacionais.

Gostaria de agradecer à Prof^a.Liliane Maria Ferrareso Lona, suas alunas Ana e Joice e o técnico Fernando por toda a ajuda com as análises de GPC.

Agradeço à Prof^a. Maria Helena Andrade Santana por disponibilizar seu laboratório para análises de DLS e liofilização.

À Maria Helena Piazzetta do CNPEM pela ajuda com a construção dos microdispositivos, parte fundamental deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Amanda, Bruna, Franciele, Gabriel, Ismail, Leonardo, Luana, Marco, Naiara, Ohanna, Priscilla e Thiago agradeço pela ajuda técnica e pela companhia de sempre. Thays, obrigada por seu o meu porto seguro nos momentos mais difíceis.

Aos alunos da Prof^a Maria Helena, Daniel e Fabiane, pela força nessa reta final tão corrida, e ao Gilson, por toda a imensa ajuda e conversas sobre a vida.

Aos alunos do Prof. Bispo, agradeço por terem me acolhido tão bem. Em especial, agradeço ao Guilherme por ter me ajudado tanto no início e no final do mestrado, ao Allan por me ensinar diversas técnicas, e à Fer, que me ensinou praticamente tudo que eu sei sobre ensaios biológicos e se tornou uma pessoa

muito querida para mim. Samara, Tuanny, Aline, Juliana, Ricardo e Edmárcia, obrigada por todas as conversas e risadas!

Por fim, gostaria de agradecer ao Ivan, meu melhor amigo de sempre e hoje meu namorado. Você viveu comigo esse mestrado do começo ao fim. Esteve sempre ao meu lado, tentando me fazer feliz. Obrigada por todo o amor, cumplicidade e companheirismo. Obrigada por ser quem você é na minha vida.

Agradeço a todos por fazerem parte dessa etapa tão importante.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o estudo da síntese de nanopartículas de PBAE e DNA para futuras aplicações em terapia gênica. Nesta pesquisa, foi sintetizado o PBAE 557 com massa molar média de 3 kDa. A produção das nanopartículas foi realizada através da complexação eletrostática entre o PBAE e DNA em método convencional bulk (escala laboratorial) e também em microfluídica. Para isso, a metodologia bulk foi padronizada quanto à ordem de adição dos reagentes, tipo de mistura, tipo de pipetagem para adição dos componentes, razão mássica entre PBAE e DNA, tempo de complexação e crioprotetor para liofilização. Na microfluídica, foram exploradas configurações de processo e tratamento de superfície do dispositivo a fim de minimizar os efeitos de precipitação. A partir da configuração com uma corrente de água central, uma corrente lateral de DNA e a outra de PBAE, foi investigada a influência do método de mistura nas propriedades das nanopartículas através de dispositivos que possuem a difusão como controladora do processo ou a advecção caótica. Para nanopartículas de PBAE/DNA, concluiu-se que a mistura deve ocorrer de forma lenta e ordenada, em que prevalece a difusão. Além disso, uma geometria simples que apresenta pequeno tempo de residência e baixo índice de mistura é suficiente para organizar as moléculas inicialmente antes da mistura se completar em bulk, gerando nanopartículas com boas características físico-químicas e biológicas. O estudo do impacto das variáveis operacionais, como velocidade de escoamento e proporção entre as correntes comprovou que a síntese das nanopartículas deve se processar de forma lenta e evitando o contato direto entre os reagentes, o que foi verificado através da obtenção do diâmetro, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanopartículas e sua eficiência de transfecção em células PC3 (câncer de próstata) e PNT2 (células normais do epitélio da próstata). Sendo assim, este trabalho contribui para o entendimento da forma de associação eletrostática entre PBAE e DNA, apresentando variáveis importantes na síntese, que podem ser adaptadas visando à melhoria do vetor para terapia gênica.

Palavras-chave: Poli(β-amino éster), nanopartículas, terapia gênica, microfluídica.

ABSTRACT

This research focused on the study of the synthesis of PBAE and DNA nanoparticles for future applications in gene therapy. In this work, PBAE 557 with an average molecular weight of 3 kDa was synthesized. Nanoparticles were produced through electrostatic complexation between PBAE and DNA by bulk method and microfluidics. Bulk methodology was standardized regarding sequence of reagents addition, type of mixing, type of pipetting of components, mass ratio between PBAE and DNA, time of complexation and crioprotector for lyophilization. In microfluidic devices, process configurations and surface treatment were explored aiming to minimize precipitation effects. Using an aqueous central stream, a PBAE side stream and a DNA side stream, the influence of mixing conditions in nanoparticles properties was investigated through diffusion based devices and chaotic advection based device. It was found that for PBAE/DNA nanoparticles synthesis, mixing should preferably occur slowly and in an ordered way, in which diffusion controls the process. Furthermore, a simple device geometry, which presents low residence time and low mixing index is enough to previously organize molecules before the mixing is completed in bulk, generating nanoparticles with good physicochemical and biological characteristics. The study of the impact of operational variables, such as flow velocity and flow rate ratio, proved that nanoparticles synthesis should take place under slow conditions and avoiding direct contact between reagents, what was verified by nanoparticles diameter, polydispersity, zeta potential and transfection efficiency in PC3 cells (prostate cancer) and PNT2 cells (prostate normal epithelium cells). Therefore, this research contributes to the understanding of electrostatic association between PBAE and DNA, showing important features for synthesis, which can be adapted to create better gene therapy vectors.

Keywords: Poly(β -amino ester), nanoparticles, gene therapy, microfluidics.

LISTA DE FIGURAS

 Figura 1 - Sumário das nanopartículas exploradas como carreadores de fármacos para terapia do câncer e algumas das propriedades físico-químicas e morfológicas (de la Torre <i>et al.</i>, 2017)
Figura 5 - Amplificação de escala com dispositivos microfluídicos (Han <i>et al.</i> , 2017).
 Figura 6 - Fabricação de microdispositivo através de fotolitografia (Mcdonald; Whitesides, 2002). Figura 7 - Diagrama esquemático representando o escoamento de duas correntes miscíveis em microcanal com geometria em Y. À medida que ocorre o escoamento no sentido longitudinal, ocorre a difusão molecular no sentido transversal ao escoamento (adaptado de Oliveira <i>et al.</i>, 2016).
Figura 8 - Dispositivo em Y apresentando a faixa onde ocorre a mistura e,
 Figura 9 - Microdispositivos com misturadores passivos. (A) <i>herringbone</i>, Strooc; McGraw, 2004; (B) canal em curvas, Pessoa; Sipoli; de la Torre, 2017; (C) canal com barreiras, Pessoa; Sipoli; de la Torre, 2017
caótica (Stremler <i>et al.</i> , 2004)
 hidrodinâmica. (adaptado de Jahn <i>et al.</i>, 2004)
Figura 13 - Microdispositivos utilizados para a síntese de nanopartículas de quitosana. (A) geometria simples; (B) geometria simples com canal comprido; (C) canal em curvas; (D) canal em curvas com barreiras (adaptado de Pessoa; Sipoli; de la Torre, 2017)
Figura 14 - Síntese de nanopartículas de PLGA-PEG por nanoprecipitação (adaptado de Karnik <i>et al.</i> , 2008). (A) esquema do dispositivo, da posição das correntes e da ocorrência da nanoprecipitação. (B) Auto-agregação dos monômeros levando à formação da nanopartícula
Figura 15 - Esquema das correntes de PBAE e DNA utilizadas no dispositivo microfluídico para síntese de nanopartículas (Wilson <i>et al.</i> , 2017)41
Figura 16 - Esquema da síntese de nanopartículas de PBAE/DNA no microdispositivo e congelamento em nitrogênio líquido (Wilson <i>et al.</i> , 2017)41

Figura 17 - Esquema de microdispositivos que serão utilizados para síntese de nanopartículas de PBAE/DNA. (A) Dispositivo simples de focalização hidrodinâmica D-simples, em que o processo é controlado por difusão. (B) Dispositivo D-longo; (C) Dispositivo com canais com barreiras D-barreiras, em que o processo é controlado por advecção caótica (Pessoa, Sipoli, de la Torre, 2017).
 Figura 18 – Ilustração da reação de síntese de uma molécula de PBAE 55749 Figura 19 – Espectros de ressonância magnética nuclear de prótons (¹H) do polímero 557. (A) Espectro obtio após a primeira etapa de síntese; (B) Espectro obtido após a segunda etapa da síntese. A marcação indica os deslocamentos característicos da função acrilato (A) e seu posterior desaparecimento em função da funcionalização da cadeia que ocorre nas terminações acrílicas (B)50
 Figura 20 – Características físico-químicas das nanopartículas PBAE/DNA em função do tipo de mistura. (A) Diâmetro médio hidrodinâmico; (B) Potencial Zeta; (C) PDI. *A maioria dos dados de diâmetro e PDI obtidos não estavam de acordo com o <i>quality report</i> do equipamento
 Figura 21 – Características físico-químicas das nanopartículas PBAE/DNA de acordo com o tipo de pipetagem (normal ou reversa). (A) Diâmetro médio hidrodinâmico; (B) Potencial Zeta; (C) PDI
Figura 22 – Características físico-químicas das nanopartículas PBAE/DNA de acordo com a ordem de adição dos reagentes. (A) Diâmetro médio; (B) Potencial Zeta; (C) PDI
Figura 23 – Características físico-químicas de nanopartículas PBAE/DNA de acordo com a razão mássica. (A) Diâmetro médio hidrodinâmico e potencial zeta; (B) PDI.
Figura 24 – Ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose de nanopartículas PBAF/DNA de acordo com a razão mássica
Figura 25 – Características físico-químicas de nanopartículas PBAE/DNA frescas e liofilizadas
Figura 26 – Ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose de DNA livre e de nanopartículas PBAE/DNA liofilizadas, utilizando trealose como crioprotetor
Figura 27 – Características físico-químicas de nanopartículas PBAE/DNA de acordo com o tempo de complexação. (A) Diâmetro médio e Potencial Zeta; (B) PDI62
Figura 28 – Ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose para amostras de nanopartículas PBAE/DNA com diferentes tempos de complexação.
Figura 29 – Eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2 de nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas com diferentes tempos de complexação
Figura 30 – Configurações de processo para a síntese de nanopartículas PBAE/DNA em dispositivo microfluídico D-simples. (A) Corrente central de DNA e correntes laterais de PBAE. (B) Corrente central de PBAE e correntes laterais de DNA. Todas as correntes estão diluídas em tampão acetato de sódio pH 5. A vazão total das correntes é de Q _T = 30 µl/min
 Figura 31 – Distribuição de características físico-químicas de nanopartículas PBAE/DNA. (A) Distribuição de potencial zeta para o processo em que a corrente central é de DNA. (B) Distribuição de tamanho por número no processo em que a corrente central é de PBAE

- Figura 32 Configuração de processo para a síntese de nanopartículas de quitosana e ATP, na qual há uma corrente central aquosa que cria um caminho difusivo w_f. (Pessoa, Sipoli e de la Torre, 2017)......71

- Figura 36 Tratamento do microdispoditivo com Aquapel a fim de tornar a superfície do vidro hidrofóbica. A corrente central é constituída de água ultra pura (pH 7) e está numa vazão de 15 μl/min. As vazões de DNA e PBAE são de 7,5 μl/min. ...76

- Figura 39 Distribuições de tamanho por número das nanopartículas sintetizadas em dispositivos microfluídicos. (A) D-simples. (B) D-longo. (C) D-barreiras.......83

Figura 42 – Distribuição de tamanho em número das nanopartículas PBAE/DNA
oblidas atraves do dispositivo D-barreiras.
Figura 43 – Compilação de todos os resultados de características físico-químicas e
biológicas das nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em cada dispositivo e em
bulk. (A) Diâmetro médio. (B) Potencial zeta. (C) Indice de polidispersidade. (D)
Eficiência de transfecção em células PNT2. (E) Eficiência de transfecção em
células PC390
Figura 44 – Ensaio eletroforético de nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em
métodos diferentes na concentração final de PBAE de 70.3 µg/ml
Figura 45 – Imagens de microscopia do ensaio de fluorescência no final do canal de
cada dispositivo e seus respectivos índices de mistura (M).
Figura 46 – Características físico-químicas e biológicas de nanopartículas
PRAE/DNA sintetizadas em dispositivo microfluídico D-simples variando-se a
$Vazão total O_{-}$ (A) Diâmetro médio (B) Potopoial zota (C) PDL (D) Eficiência do
Vazao lotal QT. (A) Diametro medio. (B) Fotencial zeta. (C) FDI. (D) Eliciencia de trapatação em cólulos $PC2$ o $PNT2$
L'ALISTECÇÃO ETIL CETULAS FOS E FINIZ.
Figura 47 - Características hisico-químicas e biologicas de hanoparticulas
PBAE/DINA sintetizadas em dispositivo microfiuldico D-simples, variando-se o
FRR. (A) Diametro medio. (B) Potencial zeta. (C) PDI. (D) Eficiencia de
transfecção em células PC3 e PN12
Figura 48 – Imagem de microscopia do final do canal do dispositivo D-simples no
processo de síntese de nanopartículas PBAE/DNA em que FRR=598
Figura 49 – Imagens de microscopia das células PNT2 após ensaio de transfecção
com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas por diferentes métodos. (A) D-
simples; (B) D-longo; (C) D-barreiras; (D) Bulk
Figura 50 - Imagens de microscopia das células PC3 após ensaio de transfecção
com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas por diferentes métodos. (A) D-
simples; (B) D-longo; (C) D-barreiras; (D) Bulk.
Figura 51 – Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética de nanopartículas
PBAE/DNA sintetizadas por diferentes métodos
Figura 52 - Imagens de microscopia das células PNT2 após ensaio de transfecção
com nanonartículas PBAF/DNA sintetizadas em diferentes condições de vazão
(Δ) 60 µl/min: (B) 90 µl/min: (C) 120 µl/min 130
Figura 53 Imagons do microscopia das cólulas PC3 anós onsaio do transfocção
aom papapartículas PRAE/DNA sintotizadas om diferentes condições de vazão
$(\Lambda) \in \mathbb{Q}$ ul/min: (D) (Ω) ul/min: (C) 120 ul/min
(A) 60 μ /min; (B) 90 μ /min; (C) 120 μ /min
Figura 54 - Imagens de microscopia das celulas PINT2 apos ensaio de transfecção
com nanoparticulas PBAE/DINA sintetizadas em diferentes condições de FRR. (A)
0,5; (B) 1; (C) 2; (D) 5
Figura 55 - Imagens de microscopia das células PC3 após ensaio de transfecção
com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em diferentes condições de FRR. (A)
0,5; (B) 1; (C) 2; (D) 5
Figura 56 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas
PBAE/DNA sintetizadas por diferentes métodos (A) D-simples; (B) D-longo; (C) D-
barreiras; (D) <i>bulk</i> 134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de monômeros para síntese de PBAE (Sunshine	<i>et al</i> ., 2012). 24
Tabela 2 - Monômeros utilizados para a síntese dos PBAEs.	42
Tabela 3 – Índice de mistura para cada vazão total do processo	95
Tabela 4– Índice de mistura para cada FRR do processo	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1. INTRODUÇÃO	17
1.2. OBJETIVOS	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. TERAPIA GÊNICA	20
2.2. POLI(B-AMINO ÉSTER)	23
2.3. MICROFLUÍDICA	28
2.3.1. Materiais utilizados em microfluídica	31
2.3.2. Diferentes condições de escoamento em ambiente microfluídico.	33
2.3.3. Síntese de nanopartículas em sistemas microfluídicos	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. SÍNTESE DO PBAE	42
3.2. CARACTERIZAÇÃO DO PBAE	42
3.3. COMPLEXAÇÃO DO PBAE COM pDNA PELO MÉTODO CONVENC BULK	XIONAL
3.4. VERIFICAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO DNA	43
3.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS	44
3.5.1. Diâmetro e índice de polidispersidade	44
3.5.2. Potencial Zeta	44
3.5.3. Morfologia	44
3.6. CULTURA DE CÉLULAS	45
3.7. TRANSFECÇÃO	45
3.8. DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS	45
3.9. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS EM MICRODISPOSITIVOS	46
3.10. ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PBAE	49
4.2. INVESTIGAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA SÍNTESE DAS NANOPAR PBAE/DNA ATRAVÉS DO MÉTODO <i>BULK</i>	TÍCULAS 51
4.2.1. Avaliação de diferentes tipos de mistura: pipetagem e vórtex	51
4.2.2. Avaliação de diferentes maneiras de pipetagem de reagentes: no reversa	rmal ou 53

4.2.3. Avaliação da ordem de adição dos reagentes: adicionar PBAE no DNA DNA no PBAE	ou .55
4.2.4. Efeito da razão mássica PBAE/DNA nas propriedades coloidais	.56
4.2.5. Avaliação de etapa adicional de liofilização	.59
4.2.6. Avaliação da cinética de complexação entre PBAE e DNA nas propriedades coloidais e biológicas	.61
4.3. INVESTIGAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTICULAS PBAE/DNA ATRAVÉS DE TECNOLOGIA MICROFLUÍDICA	.65
4.3.1. Avaliação das configurações de processo	.66
4.3.2. Tratamento de superfície dos microcanais	.75
4.3.3. Efeito da difusão e advecção caótica na complexação	.77
4.3.4. Influência das variáveis operacionais na síntese de nanopartículas PBAE/DNA	.94
4.3.4.1. Vazão	.94
4.3.4.2. Relação entre as correntes de fluxo - FRR	.96
5. CONCLUSÃO	
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 101	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 102	
ANEXOS 114	

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. INTRODUÇÃO

A terapia gênica é uma técnica que apresenta a possibilidade de tratamento e vacinação para diversas doenças (PACK *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2016; DE LA TORRE *et al.*, 2009). Essa técnica consiste na entrega de genes a células-alvo visando à geração de uma resposta terapêutica (NAYEROSSADAT *et al.*, 2012).

Para que a terapia gênica ocorra, é necessário que a entrega do material genético seja feita de maneira eficiente (LUO *et al.*, 2003). Considerando que os ácidos nucleicos possuem características aniônicas e que podem ser facilmente degradados em ambiente extracelular, diversos vetores virais e não virais têm sido desenvolvidos e estudados.

Os vetores não virais apresentam algumas vantagens, como grande capacidade de armazenamento de genes, baixa imunogenicidade e síntese simples (YIN *et al.*, 2014). Esses vetores são formados normalmente por moléculas e polímeros de natureza catiônica. Eles interagem eletrostaticamente com o material genético, formando nanopartículas. Diversos polímeros tem sido investigados e o Poli(β-amino éster) (PBAE) mostra-se como promissor (LYNN; LANGER, 2000).

O PBAE é uma classe de polímeros biodegradáveis que pode ser sintetizado via adição de Michael. Diversos tipos de PBAEs estão sendo estudados como vetores para a terapia gênica e vem apresentando bons resultados (MANGRAVITI *et al.*, 2015; WILSON *et al.*, 2017; VUORIMAA *et al.*, 2011). Tzeng *et al.* (2011) verificaram que através do PBAE como carreador de DNA, é possível transfectar células cancerosas de glioblastoma de maneira eficiente, não afetando as células saudáveis correspondentes. Já Keeney *et al.* (2013) constataram que com vetores de PBAE/DNA os resultados apresentam melhor transfecção *in vivo* em órgãos intraperitoneais do que o DNA nu.

Uma possível via de produção de nanopartículas é a microfluídica, definida como a tecnologia que manipula fluidos em microdispositivos, que possuem canais em dimensões micrométricas (WHITESIDES, 2006). Através dela, é possível

sintetizar nanopartículas com propriedades reprodutíveis, como tamanho e polidispersidade (JOANICOT; AJDARI, 2005).

A microfluídica também permite a exploração de diversas geometrias e condições de processo que influenciam no modo como a mistura entre reagentes é conduzida e, assim, afeta a formação de nanopartículas. A mistura pode ser conduzida por difusão ou advecção caótica e a eficiência do processo depende do tipo de nanopartícula que se deseja sintetizar (BALBINO *et al.*, 2013; PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017).

Desta maneira, este estudo visa investigar condições de mistura diferentes, explorando processos baseados em difusão e em advecção caótica a fim de avaliar a formação de nanopartículas de PBAE/DNA para aplicações em terapia gênica.

1.2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo sintetizar nanopartículas de Poli(β-amino éster) contendo o DNA plasmidial pEGFP-N1 (expressa a proteína GFP) para futuras aplicações em terapia gênica. A síntese das nanopartículas foi avaliada via processo microfluídico e comparada com o método convencional *bulk*. As nanopartículas foram caracterizadas em termos de parâmetros físico-químicos e sua aplicação biológica foi avaliada quanto à capacidade de transfecção de células PC3 (câncer de próstata) e PNT2 (normais do epitélio da próstata). Para isso, foi seguida a estratégia de pesquisa listada abaixo.

Síntese do PBAE e escolha do polímero

O PBAE 557 foi escolhido como objeto de estudo após a realização de um estudo inicial realizado pelo grupo de pesquisa Nano-Cell interactions, coordenado pelo Professor Marcelo Bispo de Jesus, co-orientador desta dissertação. Nesse estudo (ANEXO I) foram utilizados os polímeros 556, 557 e 558 para sintetizar nanopartículas com DNA. Tais partículas foram avaliadas em relação a sua capacidade de transfecção e o melhor polímero foi selecionado. O PBAE 557 foi então sintetizado novamente para utilização em todo o trabalho.

Análise da associação PBAE/DNA em sistema bulk

A metodologia de síntese de nanopartículas PBAE/DNA foi inicialmente padronizada em sistema *bulk* quanto a diversas variáveis de processo, como ordem de adição dos reagentes, tipo de mistura, tempo de complexação e razão mássica. Para isso, o PBAE sintetizado foi complexado com o pDNA pEGFP-N1 (que codifica a proteína *Green Fluorescent Protein* – GFP), alterando-se tais variáveis. Para a escolha do melhor método, as características físico-químicas das nanopartículas foram avaliadas quanto ao diâmetro médio, a polidispersidade e o potencial zeta.

Associação PBAE/DNA em sistemas microfluídicos

A associação entre PBAE e DNA em sistemas microfluídicos foi explorada em três dispositivos diferentes: o D-simples e o D-longo, em que o processo é controlado por difusão, havendo diferença apenas no tempo de residência, e o Dbarreiras, em que o processo é controlado por advecção caótica.

Para isso, foi realizado inicialmente um estudo de configurações de processo. A partir da melhor configuração, a síntese das nanopartículas foi avaliada nos três dispositivos.

Foram analisadas as propriedades físico-químicas (tamanho, potencial zeta e índice de polidispersidade), bem como a interação do polímero com DNA, verificada através de eletroforese em gel de agarose, e a eficiência de transfecção de células PC3 e PNT2.

Comparação entre métodos de síntese

As nanopartículas sintetizadas em *bulk* e nos três dispositivos microfluídicos foram comparadas em termos das propriedades físico-químicas e capacidade de transfecção.

Investigação das condições de processo microfluídico

A síntese de nanopartículas no dispositivo microfluídico que apresentou melhor desempenho foi investigada em termos de algumas condições de processo (vazão total do sistema e proporção entre as correntes).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TERAPIA GÊNICA

A terapia gênica consiste na introdução de material genético em células específicas com o objetivo de gerar uma resposta terapêutica (NAYEROSSADAT *et al.*, 2012). Diversos tipos de material genético podem ser utilizados, destacando-se DNA plasmidial (pDNA) e RNA silenciador (siRNA). A utilização da terapia gênica proporciona a possibilidade de tratamento de diversas doenças adquiridas ou herdadas (PACK *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2016), bem como a vacinação (DE LA TORRE *et al.*, 2009) e a cada dia vem sendo mais detalhadamente investigada.

Para o sucesso desta técnica, o material genético deve ser entregue no interior das células de maneira eficiente (LUO *et al.*, 2003) e permitir a síntese da proteína transgene, para que o processo de transfecção seja completado. A presença de enzimas extracelulares e a natureza aniônica dos ácidos nucleicos contribuem negativamente para a entrega adequada (TWYMAN, 2005). Para superar essas barreiras, a entrega pode ser realizada através de vetores, que devem possuir algumas características importantes: o carreador deve ser de fácil produção, ser imunologicamente inerte, deve apresentar entrega sustentada ou expressão gênica eficiente, possuir especificidade com as células desejadas e não pode ser capaz de replicar seu próprio DNA (DANI, 1999; SOMIA; VERMA, 2000).

Com o objetivo de tentar atender às exigências, diversos tipos de vetores são desenvolvidos, sendo esses divididos em dois grandes grupos: os virais e os não virais. Os vetores virais têm alta especificidade com as células-alvo (ROBBINS; GHIVIZZANI, 1998), pois se explora a capacidade inata dos vírus em realizar a entrega intracelular do material genético. No entanto, estes sistemas podem apresentar problemas, tais como desencadear resposta imunológica, iniciar a produção de toxinas e a limitação na capacidade de carregamento de material genético (NAYEROSSADAT *et al.*, 2012). Esse grupo é constituído por vírus modificados no qual se encontram principalmente, os adenovírus, os retrovírus, os AAV (*adeno-associated vírus*) e os HSV (*herpes simplex vírus*). Cada um apresenta

Visando contornar as limitações dos sistemas virais, foram investigadas associações do material genético com polímeros naturais ou sintéticos, peptídeos e

lipídios, que permitissem a condensação de DNA ou RNA, gerando diversos tipos de carreadores, como micelas, lipossomas, vesículas, nanopartículas e nanoagregados (SPAIN *et al.*, 2011). Estes sistemas foram denominados vetores não virais. Apesar da entrega de genes ainda ser menos eficiente, esse grupo possui diversas vantagens, como a baixa imunogenicidade, maior capacidade de armazenamento do material genético e são sintetizados mais facilmente (YIN *et al.*, 2014). Na ausência de um ligante específico para direcionamento dos vetores para células específicas, polímeros e moléculas de natureza catiônica são empregados com o objetivo de permitir a associação eletrostática do material genético (natureza aniônica) e também garantir a interação com a membrana celular (também de natureza aniônica) (CARRILLO *et al.*, 2014). A associação com o material genético permite a formação de nanomateriais, com propriedades importantes, tais como tamanho, morfologia e densidade de superfície. Dentre as diferentes nanoestruturas, destacam-se as partículas poliméricas, as nanopartículas lipídicas sólidas, os hidrogéis e os lipossomas (Figura 1) (DE LA TORRE *et al.*, 2017).



Figura 1 - Sumário das nanopartículas exploradas como carreadores de fármacos para terapia do câncer e algumas das propriedades físico-químicas e morfológicas (de la Torre *et al.*, 2017).

Dentre os vetores não virais, destacam-se os lipoplexos, sendo formados a partir da complexação dos ácidos nucleicos com lipossomas, contendo lipídios, e os poliplexos, constituídos, principalmente, de polímeros catiônicos, como quitosana, poli(I-lisina) (PLL) e polietilenoimina (PEI) (EL-ANEED, 2004; WANG *et al.*, 2012). A quitosana é um polímero linear catiônico, biodegradável e sensível ao pH que interage eletrostaticamente com ácidos nucleicos, formando nanopartículas (SIPOLI *et al.*, 2015). Estudos mostram a eficiência da entrega de genes através de nanopartículas de quitosana (WU *et al.*, 2009; ROY *et al.*, 1999; AGARWAL *et al.*, 2015; DASH *et al.*, 2011; MITRA *et al.*, 2014). Como exemplo, Roy *et al.* (1999) administraram nanopartículas de quitosana contendo genes contra alergia a amendoim em ratos e verificaram a geração de proteção imunológica, que não ocorreu quando utilizou-se DNA nu. Já Mitra *et al.* (2014) mostraram que, a partir da eficiente expressão gênica *in vivo*, nanopartículas de quitosana e DNA são promissoras como vetores no tratamento de doenças oculares.

A PLL é um polímero sintético, formado pelo aminoácido lisina, carregado positivamente (KHMARA *et al.*, 2017), cuja utilização em terapia gênica vem sendo vastamente estudada nos últimos 30 anos (RAFTERY *et al.*, 2013). Cui *et al.* (2014), por exemplo, verificaram que nanopartículas de poli(I-lisina) contendo óxido férrico e dióxido de silício podem ser vetores para a entrega de siRNA, a partir de um experimento de silenciamento de genes em neurônios de ratos.

Já a PEI também é um polímero sintético, de caráter catiônico, que pode ser utilizada na sua forma linear ou ramificada. Devido à presença de muitas aminas, a polietilenoimina possui alta capacidade tamponante, permitindo sua complexação com ácidos nucleicos em uma vasta faixa de pH (MINTZER; SIMANEK, 2009; RAFTERY *et al.*, 2013). As nanopartículas de PEI são amplamente estudadas para aplicações em terapia gênica, como a pesquisa de Gharwan *et al.* (2003), que demonstrou que a expressão de um gene repórter foi significantemente maior através da administração com as nanopartículas do que com DNA nu.

Apesar de apresentarem altos níveis de transfecção, alguns polímeros, como a poli(I-lisina) e a polietilenoimina, podem ser citotóxicos (LYNN; LANGER, 2000). Assim, buscam-se alternativas de materiais que permitam a transfecção eficiente e possuam baixa toxicidade. Uma possibilidade promissora é o emprego do Poli(β-amino éster) (PBAE).

2.2. POLI(B-AMINO ÉSTER)

Poli(β amino éster) é uma classe de polímeros sintéticos de característica catiônica. São biodegradáveis, apresentam baixos níveis de toxicidade e podem ser usados como agentes de transfecção de maneira eficiente em diferentes tipos de células (MANGRAVITI *et al.*, 2015; WILSON *et al.*, 2017; VUORIMAA *et al.*, 2011).

O PBAE pode ser produzido de maneira simples, conforme apresentado na Figura 2. A síntese é realizada através da adição de Michael, que ocorre em duas etapas. Na primeira, a reação ocorre entre monômeros de diacrilato (Figura 2, letra B) e de aminas primárias ou bis-aminas (Figura 2, letra S) (JEONG *et al.*, 2007). Outros monômeros como aminoalcoóis podem também ser utilizados nesta etapa (GREEN *et al.*, 2009). Os monômeros polimerizam, formando a base do polímero. Posteriormente, na segunda etapa, ocorre a adição de aminas que finalizam as extremidades da cadeia polimérica (*end-caps*, Figura 2, letra E). Quando o diacrilato está em excesso, o polímero base possui extremidades de diacrilato. Quando há excesso de amina, as extremidades são constituídas de aminas (GREEN *et al.*, 2008; SUNSHINE *et al.*, 2012). A síntese é realizada em solventes, como tetrahidrofurano (THF), diclorometano (DCM) e dimetilsulfóxido (DMSO) (JEONG *et al.*, 2007).









Figura 2 - Esquema da síntese do PBAE via adição de Michael (adaptado de Sunshine *et al*, 2012). As letras B, S e E representam o diacrilato, a amina e a amina finalizadora, respectivamente.

Para a síntese do PBAE, é possível utilizar diferentes monômeros em combinações variadas, originando diversos tipos de PBAE. Alguns exemplos de monômeros usados estão representados na Tabela 1.

	Amina ou aminoálcool	Amina finalizadora	
Diachiato (B)	(S)	(<i>end-cap</i>) (E)	
1,4-butanodiol diacrilato (4) 0 0 0 0 0 0	3-amino-1- propanol (3)* H ₂ N OH	1,3 diamino propano (1)* H ₂ N [^] NH ₂	
1,5-Bis(acriloil oxi) pentano (5)*	4-amino-1- butanol (4)* H ₂ N OH	2-(3-aminopropil amino) etanol (6)* $H_2N \xrightarrow{N}_H$	
1,6-hexanodiol diacrilato (6) [*]	5-amino-1- pentanol (5)* H ₂ N OH	metilpiperazina (7)* $H_2N \longrightarrow N$ 1-(3-aminopropil) pirrolidina (8)* $H_2N \longrightarrow N$	
		1,4-(3-aminopropil) piperazina (10)* H ₂ N ^S -S ^N	

Tabela 1 -	Exemplos de	monômeros i	oara síntese (de PBAF	(Sunshine e	tal 2012	2)
		110110110100				<i>i ui., L</i> o i <i>i</i>	-/-

(*): A nomenclatura para identificar o polímero utilizado segue a seguinte ordem: diacrilato/aminoálcool/end-cap. Desta forma, os polímeros são identificados por números, por exemplo, PBAE 557, formado por 1,5-Bis(acriloil oxi) pentano, 5-amino-1- pentanol e 1-(3-amiopropil)-4-metilpiperazina.

Além disso, a modificação das moléculas utilizadas para finalizar as extremidades pode gerar polímeros com diferentes funcionalidades. Dependendo do monômero, o PBAE pode adquirir reatividade com grupos hidroxila, éteres, amidas, entre outros. Além disso, diferentes grupos finalizadores afetam as propriedades físicas do polímero e sua capacidade de transfecção (ZUGATES *et al.*, 2007). A finalização com monômeros de diamina, por exemplo, torna o PBAE um vetor para entrega de genes tão eficiente quanto um adenovírus (SUNSHINE *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm descrito a síntese deste polímero e realizado a sua caracterização, demonstrando que o PBAE possui grande potencial para ser utilizado como vetor para a terapia gênica (SUNSHINE *et al.*, 2012; TZENG *et al.*, 2011; GREEN *et al.*, 2008; GREEN *et al.*, 2009; LITTLE *et al.*, 2005; PFEIFER *et al.*, 2005; FIELDS *et al.*, 2012).

Lynn e Langer (2000), pesquisadores pioneiros na investigação do PBAE, mostraram a viabilidade da complexação deste polímero (caráter catiônico) com o DNA (caráter aniônico), formando nanopartículas de baixa citotoxicidade com diâmetros inferiores a 200 nm.

Além disso, esta classe de polímeros é biodegradável, devido à hidrólise do grupo éster, e apresenta citotoxicidade inferior a outros polímeros estudados para terapia gênica, como a PEI (GREEN *et al.*, 2009). Outra característica importante do PBAE é que este polímero é capaz de tamponar os endossomos celulares, prevenindo a fusão com os lisossomos, organelas responsáveis pela degradação de compostos no interior da célula. Sua capacidade tamponante também auxilia na diminuição da taxa de degradação das nanopartículas pelos lisossomos, já que a atividade das enzimas lisossomais é máxima em pH ácido. Desta forma, são obtidas maiores eficiências de transfecção (AKINK; LANGER, 2002).

A transfecção dessas nanopartículas de PBAE tem sido investigada em diversos tipos celulares e tecidos. Tzeng *et al.* (2011) verificaram que alguns tipos de PBAE possuem capacidade de atuar como vetores na transfecção de células cancerosas como glioblastoma de forma eficiente e não apresentam efeito em células saudáveis correspondentes. Sunshine *et al.* (2012) mostraram a transfecção eficiente utilizando PBAE em células do epitélio da retina, além de demonstrarem *in vivo* que houve melhor transfecção através da nanopartícula (PBAE/DNA) do que no caso do DNA nu (sem veiculação).

De maneira similar, Keeney *et al.* (2013) verificaram que o PBAE apresentou melhor efeito de transfecção em células humanas embrionárias de rim do que o reagente comumente utilizado, a Lipofectamina. A Lipofectamina é um reagente de transfecção lipídico que apresenta alta eficiência de transfecção, pela

sua elevada característica catiônica, mas também é muito citotóxico (KONGKANERAMIT *et al.*, 2008; DOKKA *et al.*, 2000). Estes mesmos autores também mostraram que para o caso do uso *in vivo* do PBAE, o DNA foi entregue em órgãos intraperitoneais mais eficientemente do que no caso do uso de DNA nu.

Adicionalmente, outros autores também investigaram como diferentes PBAEs influenciam na transfecção. Anderson *et al.* (2005) verificaram que a massa molecular do polímero e a proporção polímero/DNA são fatores críticos na eficiência de transfecção. A massa molecular é proporcional ao número de cátions do polímero, afetando, assim, a afinidade do DNA pelo polímero, visto que interagem eletrostaticamente. PBAEs de massa molecular muito baixa (abaixo de 10.000 Da) podem não complexar com o DNA efetivamente, enquanto polímeros com massa molecular elevada podem retardar a liberação do gene. Já a proporção PBAE/DNA influencia na carga superficial do poliplexo, interferindo na estabilidade das nanopartículas, na citotoxicidade e na captação (*uptake*) pelas células. Os autores ainda verificaram que os PBAEs que apresentaram melhores níveis de transfecção foram os que geraram nanopartículas com carga superficial (potencial Zeta) positiva, acima de 10mV (ANDERSON *et al.*, 2004; ANDERSON *et al.*, 2005; SCHAFFER *et al.*, 2000).

Outro fator que influencia na eficiência de transfecção é a finalização do polímero, que ocorre na segunda etapa da adição de Michael (Figura 2) (ANDERSON et al., 2005; ZUGATES et al., 2007). Zugates et al. (2007) utilizaram uma base de PBAE 45 (polímero não possui end-cap) e fizeram diversas modificações na amina finalizadora. Eles verificaram que o número de carbonos e os grupos funcionais das cadeias laterais influenciam nas propriedades das nanopartículas PBAE/DNA, na entrega destas nas células e na transfecção. Os melhores resultados encontrados foram com diaminas primárias. cuias nanopartículas possuíam menores tamanhos e a transfecção foi melhorada (ZUGATES et al., 2007).

O emprego do PBAE vem se estendendo além de aplicações para a entrega de genes, sendo também investigado como carreador de fármacos (SHEN *et al.*, 2009; AN *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2014). Neste contexto, Perni e Prokopovich (2017) estudaram a veiculação de dexametasona (anti-inflamatório) em cartilagens. O fármaco foi ligado covalentemente ao polímero e verificou-se que, comparada às

mesmas doses do fármaco comercial, a entrega através do PBAE foi duplicada e a retenção nos tecidos foi prolongada. Já Chen *et al.* (2016) investigaram os efeitos *in vivo* da administração de Paclitaxel via micelas de PBAE com Polietilenoglicol e poli lactide em câncer de mama e verificaram que a supressão do tumor foi maior do que com o fármaco livre.

Assim, considerando a capacidade do PBAE de carrear genes e fármacos, diversos autores investigam a possibilidade de utilizar este polímero como um sistema para *co-delivery*, no qual o material genético e fármacos são entregues às células ao mesmo tempo pelo mesmo vetor. Neste caso, esses sistemas podem ser altamente eficientes, já que atacam uma doença através da ação de duas ou mais moléculas bioativas (WANG *et al.*, 2016). Além disso, podem reduzir efeitos colaterais (LI *et al.*, 2016), já que os vetores contendo material genético possuem maior especificidade com as células que se deseja atingir do que os fármacos puros, atacando menos as células saudáveis.

Tang *et al.* (2015) criaram nanopartículas de PBAE com polietileno imina e polietilenoglicol que carream dois tipos de biomoléculas: siRNA e Paclitaxel. O estudo mostrou o acúmulo e retenção do fármaco e do material genético em câncer de mama, o que inibiu a metástase e o crescimento do tumor.

Outro estudo realizado por Tang *et al.* (2014) mostrou que partículas de PBAE com polietileno imina e RNA apresentaram entrega eficiente de doxorrubicina em células de câncer de mama, aumentando a citotoxicidade do fármaco. Além disso, as partículas aumentaram o acúmulo da droga no tumor *in vivo*, inibindo seu crescimento.

Nos casos de formação de nanopartículas PBAE/material genético todos os estudos fizeram a complexação em escala laboratorial, onde os reagentes são misturados normalmente em tubos, ocasionalmente sob agitação em vórtex e temperatura ambiente. No entanto, o modo de formação das nanopartículas pode influenciar nas propriedades finais como tamanho, carga de superfície e polidispersidade (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017; BALBINO *et al.*, 2013). Neste contexto, a microfluídica torna-se uma tecnologia promissora para a síntese de nanopartículas.

2.3. MICROFLUÍDICA

A microfluídica é a ciência e tecnologia que manipula fluidos em dispositivos com canais de dimensões de micrômetros, podendo ser aplicada a diversas áreas, como ótica, médica, química, engenharia química, física, separação e análise, biologia, ciência dos materiais e fabricação (WHITESIDES, 2006; ARYA *et al.*, 2013). Diversos tipos de dispositivos podem ser criados, como o exemplo apresentado na Figura 3.



Figura 3 - Dispositivo microfluídico. (http://www.potomac-laser.com/services/core/hot-embossing/, acessado em 17/10/2017).

A área de microfluídica apresenta grande potencial de mercado, estimando-se um crescimento de 18% ao ano e o valor de mercado de US\$ 6 bilhões até 2020 (http://www.yole.fr/Microfluidic_Applications_Technologies. aspx#.WFP0YFxAFQ8). Apesar de sua potencialidade técnica e econômica, a microfluídica ainda é pouco explorada no Brasil e na América Latina, não havendo empresas de base tecnológica desse setor nesses locais (http:// fluidicmems.com /list-of- microfluidics -lab-on-a-chip –and -biomems- companies/). Dessa forma, fazse necessário o desenvolvimento de novas tecnologias nesta área, além da formação de profissionais.

Esta tecnologia apresenta diversas vantagens em relação à macro escala, como utilização de pequenas quantidades de reagentes, pequeno contato do

pesquisador com as substâncias em estudo, possibilidade de mimetizar ambientes de células, paralelização de dispositivos, alto controle experimental, obtenção de dados em tempo real, entre outras (HALLDORSSON *et al.*, 2015). Além disso, a grande razão área/volume dos canais micrométricos intensifica efeitos de transferências de calor e massa, permitindo a diminuição do tempo de reação (BALBINO *et al.*, 2016).

As áreas médica e de bioprocessos vêm investigando intensamente a utilização da microfluídica, pois as características hidrodinâmicas impostas nestes sistemas permitem o controle de reagentes químicos, células, lipídios e ácidos nucléicos no espaço e no tempo (WHITESIDES, 2006; DRAGHICIU *et al.*, 2010; KURITA *et al.*, 2010; REINER *et al.*, 2010; BAEK *et al.*, 2011; YAMASHITA *et al.*, 2011). Desta forma, a microfluídica emerge como potencial para mudar significativamente a forma com que a biologia moderna é conduzida (BEEBE *et al.*, 2002), permitindo o desenvolvimento de novas ferramentas/dispositivos que contribuam de forma substancial nas áreas médica e biológica (HANSEN; QUAKE, 2003; YAGER *et al.*, 2006; EL-ALI *et al.*, 2006; WHITESIDES, 2006). Os dispositivos micrométricos projetados para realizar tarefas específicas têm demonstrado superioridade sobre seus análogos em macroescala (LUTZ *et al.*, 2003; SOMMER *et al.*, 2008) e em muitos casos, possibilita aplicações que não seriam viáveis na macroescala (SACKMANN *et al.*, 2014).

A microfluídica amplia as possibilidades de estudos celulares em condições dinâmicas, permitindo estudos de mecanismos de respostas, quimiotaxia e citotoxicidade, pois é capaz de mimetizar o microambiente celular. Além disso, permite o desenvolvimento de novas técnicas de isolamento e cultivo de células microbianas e animais (WEIBEL *et al.*, 2007). Tais dispositivos podem ainda avaliar a cinética das reações em tempo real por meio de sistemas de sensores, reduzindo o tempo de ensaio (ZHANG *et al.*, 2007). Sendo assim, a microfluídica mostra-se uma ferramenta promissora e, que se acoplada a técnicas de biofotônica, serão possíveis grandes avanços nas áreas biológica, médica e de engenharia.

Dentre várias aplicações, pode-se citar a cultura de células tronco neurais humanas em dispositivos geradores de gradiente de concentração (Figura 4A), ensaios de inibição enzimática em dispositivos de gotas (Figura 4B), a separação de bactérias de células sanguíneas humanas em sistemas microfluídicos de análise (Figura 4C) e a fermentação de microorganismos em dispositivos com microbiorreatores (Figura 4D) (CHUNG *et al.*, 2005; CAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2009; SHÄPPER *et al.*, 2010).



Figura 4 - Exemplos de dispositivos microfluídicos utilizados para diversas aplicações. (A) dispositivo gerador de gradiente utilizado para cultura de células tronco neurais humanas, Chung *et al.*, 2005. (B) dispositivo gerador de gotas para ensaio de inibição enzimática, Cai *et al.*, 2011. (C) Esquema de dispositivo utilizado para separação de bactérias de células sanguíneas humanas, Wu *et al.*, 2009. (D) Microbiorreator para fermentação de microorganismos, Schäpper *et al.*, 2010.

A microfluídica ainda está limitada à escala laboratorial. No entanto, há estudos que mostram que é possível ampliar a escala através da amplificação de processo. Han *et al.* (2017) criaram uma estratégia para aumentar o rendimento a nível industrial. Primeiramente, 8 dispositivos foram paralelizados formando um conjunto. Após, 10 conjuntos foram empilhados em um módulo e 5 módulos integrados formaram um sistema com um total de 400 canais (Figura 5) (HAN *et al.*, 2017).





2.3.1. Materiais utilizados em microfluídica

Os microdispositivos podem ser fabricados com diversos materiais. Devido às dimensões dos canais, as propriedades de superfície são amplificadas em relação à macroescala, pois a relação área superficial/volume é significativa na microfluídica. Desta forma, a escolha do material de construção dos microdispositivos é de grande importância. Além disso, essa escolha também depende da aplicação final (REN *et al.*, 2013).

Os primeiros dispositivos fabricados eram de silício ou vidro (WHITESIDES, 2006). O vidro é oticamente transparente e o silício é opaco. Ambos resistem a solventes orgânicos, são altamente termocondutivos e ainda muito utilizados (REN *et al.*, 2013). No entanto, o vidro e o silício não são permeáveis a gases, limitando sua aplicação biológica, principalmente para o cultivo de células animais e microorganismos aeróbios.

Dentre outros materiais utilizados para a construção de microdispositivos, podem-se citar o polimetilmetacrilato (PMMA) e o polidimetilsiloxano (PDMS) (SATO; KITAMORI, 2010).

O PMMA é um termoplástico rígido e transparente, que apresenta alta estabilidade química e mecânica, baixo preço, facilidade de produção e biocompatibilidade (MUCK *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2008). O método mais utilizado para a fabricação de microdispositivos de PMMA é o *hot embossing* (CHEN *et al.*, 2008).

Dentre os polímeros, o mais utilizado é o PDMS. Esse é um elastômero oticamente transparente, termicamente estável, flexível, biocompatível, não tóxico e permeável a gases, o que permite utilizá-lo em aplicações biológicas (MCDONALD; WHITESIDES, 2002; REN *et al.*, 2013). Apesar de suas diversas características desejáveis, o PDMS pode apresentar alguns problemas, especialmente devido à sua natureza hidrofóbica. Neste caso, o material pode adsorver pequenas moléculas hidrofóbicas, interferindo no tempo de reação e no resultado do processo (SIA; WHITESIDES, 2003). Além disso, diversos solventes orgânicos interagem com o polímero, intumescendo o PDMS, alterando as dimensões dos canais e, consequentemente, alterando o processo como um todo (LEE *et al.*, 2003).

A fim de evitar tais problemas, é possível realizar tratamentos de superfície, como tratamento com plasma de oxigênio para reduzir a hidrofobicidade do PDMS (TAN *et al.*, 2010), tratamento com alcoxisilanos que conferem ao PDMS propriedades do vidro (BEAL *et al.*, 2012) e com ultravioleta na presença de oxigênio que também reduz o caráter hidrofóbico do polímero (ZHOU *et al.*, 2010).

De modo geral, os dispositivos mais explorados em pesquisas são formados por PDMS/vidro. A base é de vidro e a construção (moldagem) dos canais ocorre no PDMS. Neste caso, moldes de silício são normalmente fabricados através de fotolitografia (Figura 6). Neste processo, uma camada de fotorresiste é aplicada a uma bolacha de silício e sobre ele é colocada uma máscara que contém um padrão (demarcação dos microcanais). Após submissão à radiação ultravioleta, o padrão é transferido para o fotorresiste, causando a cura do fotorresiste que ficou submetido à radiação. O molde em alto relevo dos microcanais é formado, pois o fotorresiste não curado é removido com um agente revelador. Com este molde formado, uma mistura de polímero (normalmente PDMS) com o respectivo agente reticulante é adicionado e polimerizado sobre o molde. Em seguida, o PDMS polimerizado é retirado do molde, já com a impressão dos microcanais em sua estrutura. O PDMS contendo os canais é então selado a um substrato de vidro via plasma de oxigênio (LIN *et al.*, 2001; MCDONALD; WHITESIDES, 2002; REN *et al.*, 2013).

Após a preparação do molde, a replicação é muito rápida, permitindo a obtenção de inúmeros dispositivos. Nesta situação, a fotolitografia é um método viável para a construção dos primeiros protótipos.



Figura 6 - Fabricação de microdispositivo através de fotolitografia (Mcdonald; Whitesides, 2002).

Os diferentes materiais e técnicas de microfabricação permitem o projeto de dispositivos com diferentes geometrias e explorar diversas condições fluidodinâmicas. Com isso, gradientes de concentração e diferentes formas de mistura podem ser investigados.

2.3.2. Diferentes condições de escoamento em ambiente microfluídico

Outra importante potencialidade da microfluídica é a exploração de diversas características dos dispositivos microfluídicos, como geometria, vazões e configuração de processo (que determina como ocorre a introdução dos reagentes no interior do dispositivo).

Na microfluídica, o fluxo de fluidos é laminar, caracterizado por números de Reynolds abaixo de 100 (ISMAGILOV *et al.*, 2000). O número de Reynolds (Re), que relaciona as forças inerciais e viscosas de um fluido, é definido pela Equação 1, em que v é a velocidade, d é o diâmetro característico do canal por onde escoa, ρ é a massa específica do fluido e μ é a sua viscosidade dinâmica.

$$Re = \frac{\rho dv}{\mu}$$

Equação 1

Em regime laminar, a mistura entre correntes de fluidos ocorre principalmente por difusão, que é um processo lento (KIM *et al.*, 2010). Em processos onde ocorre reação e a mistura deve ser eficiente, microdispositivos que apresentam a difusão como fenômeno controlador podem não ser eficazes. Aumentar o tempo espacial, isto é, o tempo de permanência das moléculas no microdispositivo para que a mistura ocorra pode ser uma primeira alternativa para contornar o problema. No entanto, algumas reações necessitariam de tempos espaciais muito grandes, fazendo com que as dimensões do dispositivo não estivessem mais dentro da escala micrométrica, não sendo uma tecnologia microfluídica (KARNIK *et al.*, 2014).

A Figura 7 abaixo representa o escoamento de dois fluidos em um canal de escoamento simples. Neste caso, à medida que as correntes se encontram, a convecção garante a transferência de massa no sentido longitudinal ao escoamento e a difusão ocorre no sentido transversal.



Figura 7 - Diagrama esquemático representando o escoamento de duas correntes miscíveis em microcanal com geometria em Y. À medida que ocorre o escoamento no sentido longitudinal, ocorre a difusão molecular no sentido transversal ao escoamento (adaptado de Oliveira *et al.*, 2016).

Ismagilov *et al.* (2000) identificaram a influência da velocidade de escoamento no processo de mistura. Neste caso, o número adimensional Peclet (Pe) foi utilizado. Esse número relaciona o transporte convectivo ao difusivo e é definido por

$$Pe = \frac{vH}{D}$$

em que v refere-se à velocidade média do fluxo, H é a altura do canal e D é o coeficiente de difusão. Quanto menor o Pe, mais significativa é a difusão.

Ismagilov *et al.* (2000) investigaram a mistura de duas soluções em um dispositivo simples de focalização hidrodinâmica (formato em Y). O produto da reação das soluções era um complexo fluorescente. Os autores verificaram que para altos valores de Pe, aumentando-se a velocidade dos fluidos, a largura da faixa em que ocorre a mistura diminui (Figura 8), tornando-a menos eficiente.



Figura 8 - Dispositivo em Y apresentando a faixa onde ocorre a mistura e, consequentemente, a reação (Ismagilov *et al.*, 2000).

Assim, a fim de elevar a qualidade da mistura nos microcanais, uma possível solução é o desenvolvimento de micromisturadores, que tem a função de perturbar o escoamento, acrescentando desvios das linhas de corrente do escoamento laminar, explorando a convecção (ou advecção) ou mesmo fontes externas de energia como fenômenos responsáveis pela mistura.

Neste caso, os misturadores podem ser ativos ou passivos. Misturadores ativos utilizam energia externa ao sistema para causar perturbações no escoamento, como ultrassom, acústica, vibrações que induzem a formação de bolhas e instabilidades eletrocinéticas (HESSEL *et al.*, 2005). Já em misturadores passivos a perturbação no escoamento ocorre através de mudanças na geometria dos canais, como *heringbone*, canais em curvas e canais com barreiras (STROOCK; MCGRAW,

Equação 2

2004; PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017) (Figura 9). Nestes dispositivos, a mistura é controlada principalmente pela advecção caótica.



Figura 9 - Microdispositivos com misturadores passivos. (A) *herringbone*, Strooc; McGraw, 2004; (B) canal em curvas, Pessoa; Sipoli; de la Torre, 2017; (C) canal com barreiras, Pessoa; Sipoli; de la Torre, 2017.

A advecção caótica pode ser definida como um fenômeno em que partículas adquirem trajetórias caóticas, estando em um campo de velocidade laminar, gerando uma maior área interfacial e, consequentemente, uma mistura mais rápida (STREMLER *et al.*, 2004). A advecção caótica pode ser explorada para diversos processos de mistura através de variações na geometria do microdispositivo e nas vazões dos reagentes. A Figura 10 apresenta as linhas de corrente para o fluxo em um canal em serpentina com diferentes números de Reynolds. Na Figura 10A pode-se observar que as linhas de corrente (linhas tracejadas) são concêntricas, caracterizando o escoamento tipicamente laminar onde as porções de fluido escoam em paralelo e prevalecendo a difusão como processo de mistura. Já na Figura 10B, as linhas de corrente (representadas pelas linhas tracejadas) não apresentam o mesmo padrão de escoamento. Nesse caso, apesar do escoamento ainda ser laminar, ocorre sobreposição das porções de fluidos, garantindo uma maior área de contato entre as porções de fluidos, fazendo
com que em uma menor distância no canal de escoamento (menor tempo espacial) a mistura completa entre fluidos ocorra.



Figura 10 - Fluxo em microcanal em serpentina. (A) Re=1; (B) Re=10, com advecção caótica (Stremler *et al.*, 2004).

2.3.3. Síntese de nanopartículas em sistemas microfluídicos

A potencialidade da microfluídica em gerar diferentes geometrias, com diversos padrões de escoamento, permite explorar a síntese de nanopartículas em diferentes condições. Nesse contexto, a tecnologia microfluídica permite o desenvolvimento de novos processos, viabilizando a síntese de nano e micropartículas com propriedades reprodutíveis, como tamanho e polidispersidade (JOANICOT; AJDARI, 2005).

Através da microfluídica, a mistura dos fluidos é controlada no espaço e no tempo e o processo é contínuo, ocorrendo a formação de nanopartículas através de, por exemplo, precipitação (GARG *et al.*, 2016).

Como exemplo, pode-se citar a síntese de lipossomas em dispositivos microfluídicos baseados em focalização hidrodinâmica (Figura 11). Lipossomas são sistemas lipídicos anfifílicos, que se auto-agregam em esferas de bicamada quando estão em ambiente aquoso (BALAZS; GODBEY, 2011). A focalização hidrodinâmica ocorre quando uma corrente central é comprimida por duas ou mais correntes laterais, auxiliando a mistura entre elas.

A síntese de lipossomas em sistema microfluídico foi investigada explorando-se a difusão. Neste contexto, Jahn *et al.* (2004) estudaram a formação de lipossomas em um dispositivo de focalização hidrodinâmica, em que uma corrente central de isopropanol com lipídios dispersos era focalizada por duas correntes laterais aquosas (Figura 11). Como o isopropanol é um solvente miscível

em água, ocorre a difusão destes componentes entre as correntes de fluido, deixando os lipídios em contato com a água. Devido ao seu caráter anfifílico, as moléculas se auto-agregam de maneira a diminuir o contato das caudas apolares hidrofóbicas com a água, formando bicamadas que formam vesículas esféricas, com um centro hidrofílico.



Figura 11 - Formação de lipossomas em dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica. (adaptado de Jahn *et al.*, 2004).

Balbino *et al.* (2013) investigaram a complexação de lipossomas com DNA plasmidial em dois dispositivos diferentes: um simples de focalização hidrodinâmica, em que o processo de síntese é baseado em difusão (Figura 12A), e o outro com barreiras nos canais, que geram regiões de contração e expansão, fazendo com que a mistura ocorra através da advecção caótica (Figura 12B). Os autores verificaram que o tipo de dispositivo influencia o modo de associação entre o pDNA e os lipossomas. Com a mistura mais eficiente no dispositivo com advecção caótica, o pDNA ficou mais fortemente associado aos lipossomas, o que resultou em uma transfecção menos eficiente em células HeLa. Assim, concluiu-se que a maneira como ocorre a mistura (por difusão ou advecção caótica) influencia no modo de associação entre DNA e lipossoma, interferindo nos resultados biológicos. Nesse caso, uma mistura mais eficaz gerou resultados biológicos menos eficientes (BALBINO *et al.*, 2013).



Figura 12 - Dispositivos microfluídicos para complexação de lipossomas catiônicos com pDNA. (A) dispositivo simples de focalização hidrodinâmica. (B) dispositivo com barreiras (Balbino *et al.*, 2013).

Outro exemplo que mostra como o modo de conduzir o processo é importante para os resultados finais é o estudo de Pessoa, Sipoli e de la Torre (2017). Os autores utilizaram 4 geometrias diferentes baseadas em focalização hidrodinâmica para investigar os diversos padrões de mistura para a síntese de nanopartículas de quitosana/ATP: um dispositivo simples de focalização hidrodinâmica, outro mais longo, outro em curvas e o último em curvas com barreiras (Figura 13).



Figura 13 - Microdispositivos utilizados para a síntese de nanopartículas de quitosana. (A) geometria simples; (B) geometria simples com canal comprido; (C) canal em curvas; (D) canal em curvas com barreiras (adaptado de Pessoa; Sipoli; de la Torre, 2017).

Os autores verificaram que em geometrias mais complexas (canal em curvas e canal com barreiras) em que ocorre advecção caótica, existe a formação de microestruturas que precipitam e entopem o microcanal e geram nanopartículas com alta polidispersidade, limitando aplicações biológicas. Além disso, concluíram que o processo de formação de nanopartículas de quitosana deve se proceder de forma

lenta e ser controlado pela difusão, como nos dispositivos de focalização hidrodinâmica (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017).

Em relação a nanopartículas de polímeros sintéticos, Karnik et al. (2008) uma metodologia simples e reprodutível da produção de estabeleceram nanopartículas de PLGA-PEG (Poli ácido láctico co-glicólico – Polietilenoglicol) através de nanoprecipitação em um dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica. A síntese ocorreu com a rápida mistura entre uma corrente central orgânica de PLGA-PEG em acetonitrila e duas correntes laterais de água (Figura 14A). À medida que ocorre a difusão da água na acetonitrila, os monômeros do copolímero PLGA-PEG começam a se agregar de forma a diminuir a interação do PLGA, hidrofóbico, com a água. A ponta hidrofílica do monômero, composta por PEG, fica em contato com a água. Dessa forma, com a auto-agregação dos monômeros, ocorre a formação das nanopartículas (Figura 14B) (KARNIK et al., 2008). A condição fluidodinâmica durante o escoamento garante que o processo difusivo da acetonitrila em água ocorra de forma reprodutível ao longo do tempo e espaço. Esta característica garante a formação de nanopartículas com baixa polidispersidade. Variações nas condições de processo como velocidade de escoamento, proporção entre as vazões e concentração dos polímeros permite a investigação da sua influência no diâmetro das nanopartículas formadas.



Figura 14 - Síntese de nanopartículas de PLGA-PEG por nanoprecipitação (adaptado de Karnik *et al.*, 2008). (A) esquema do dispositivo, da posição das correntes e da ocorrência da nanoprecipitação. (B) Auto-agregação dos monômeros levando à formação da nanopartícula.

Recentemente, nanopartículas de PBAE/DNA também foram sintetizadas em dispositivo microfluídico. A literatura apresenta apenas um trabalho que investiga esta síntese em microfluídica (WILSON *et al.*, 2017). O PBAE 446 foi sintetizado através da adição de Michael, como descrito no item 2.2. O dispositivo de PDMS utilizado era de focalização hidrodinâmica e continha três correntes de PBAE+acetato de sódio e uma corrente de DNA+acetato de sódio (Figura 15). Após a formação das nanopartículas, estas foram gotejadas em nitrogênio líquido para congelamento instantâneo (Figura 16) e depois foram liofilizadas.



Figura 15 - Esquema das correntes de PBAE e DNA utilizadas no dispositivo microfluídico para síntese de nanopartículas (Wilson *et al.*, 2017).



Figura 16 - Esquema da síntese de nanopartículas de PBAE/DNA no microdispositivo e congelamento em nitrogênio líquido (Wilson *et al.*, 2017).

As nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas apresentaram eficiente transfecção em três linhagens de células cancerosas (GB319, B16 e MDA-MB-231) e a liofilização não apresentou efeitos significativos (WILSON *et al.*, 2017).

No trabalho de Wilson *et al.* (2017), os autores compararam as eficiências de transfecção de nanopartículas sintetizadas em *bulk* e em microfluídica. No entanto, não existe estudo que avalia o efeito da mistura das nanopartículas de PBAE/DNA em diferentes processos microfluídicos. Desta forma, o presente trabalho teve grande importância na avaliação do efeito de mistura por difusão e advecção caótica na síntese destas nanopartículas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SÍNTESE DO PBAE

A síntese do PBAE foi realizada de acordo com a metodologia apresentada por Mangraviti *et al* (2015). Primeiramente, um polímero base é sintetizado através da Adição de Michael, em que um aminoálcool (S) é adicionado a um diacrilato (B) na proporção de 1:1,2 em mol. A reação ocorre a 90°C durante 24 horas, sob agitação. Posteriormente, o polímero é solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido), e pequenas moléculas que contém aminas (E) são adicionadas e a reação se processa à temperatura ambiente durante uma hora sob agitação. Foi sintetizado o PBAE 557, que apresentou melhores níveis de transfecção segundo o grupo de pesquisa Nano-Cell interactions (Anexo I). A Figura 2, apresentada no item 2.2, contém um esquema da reação e a Tabela 2 apresenta os monômeros utilizados.

В		S		E		
Nome	Marca	Nome	Marca	Nome	Marca	PDAE
1,5-Bis(acriloil oxi) pentano	Chem Cruz/ TCI	5-Amino - 1-pentanol	Chem Cruz	1-(3-amino propil)- 4-metil piperazina	Alfa Aesar	557

Tabela 2 - Monômeros utilizados para a síntese dos PBAEs.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DO PBAE

A massa molar do polímero sintetizado foi obtida através de cromatografia de permeação em gel (GPC). As amostras foram solubilizadas em THF a uma concentração de 10 mg/mL. Após filtrar, as amostras foram submetidas à cromatografia no equipamento OmniSEC (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Os resultados foram obtidos em relação ao padrão de poliestireno. O equipamento forneceu os dados de massa molar numérica média e ponderal média e a polidispersidade foi calculada dividindo-se a ponderal pela numérica. Para todos os ensaios posteriores, foi utilizado o PBAE sintetizado de menor polidispersidade. Para confirmar a estrutura química do polímero, foi utilizada a ressonância magnética nuclear de próton (¹H). Para isso, o PBAE 557 foi dissolvido em DMSO deuterado na concentração de 1 mM e os espectros foram obtidos no equipamento RMN Bruker Avance III 400 MHz. Foram obtidos espectros após a primeira etapa da reação e após o término da segunda.

3.3. COMPLEXAÇÃO DO PBAE COM pDNA PELO MÉTODO CONVENCIONAL BULK

Primeiramente, o plasmídeo pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, EUA) foi amplificado e purificado conforme descrito por Radaic, de Paula e de Jesus (2014), utilizando o kit *PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit-Maxiprep* (Invitrogen, EUA). A concentração e pureza do DNA foram obtidas através do leitor de placas Cytation5 (Biotek, EUA) a 260 nm. Os plasmídeos foram aceitos para uso quando o índice A260/A280 era maior que 1,8.

Para a preparação da amostra de nanopartículas, o PBAE e o pDNA foram diluídos separadamente em tampão acetato de sódio 25 mM (pH 5). Para a complexação, as soluções foram misturadas e esperou-se o tempo de incubação.

Foram realizados diversos ensaios em *bulk*, para os quais foram empregadas metodologias diferentes, variando ordem de adição dos reagentes (PBAE adicionado no pDNA ou o inverso), razão mássica (de 0,25 a 90), tipo de mistura (pipetagem ou vórtex), tipo de pipetagem para adição dos reagentes (normal ou reversa) e tempo de complexação (0 a 40 minutos).

3.4. VERIFICAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO DNA

A verificação da complexação do polímero com o pDNA foi realizada através de ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose. Para isso, em uma cuba eletroforética, foram preparados 70ml de gel de agarose com tampão TAE, corado com brometo de etídio. Cada amostra continha 1 µg de DNA e a respectiva massa de PBAE, dependendo da razão mássica. Antes de serem inseridas no gel, adicionou-se às amostras glicerol (1%). Foi inserida uma amostra de pDNA puro (sem polímero) para controle. Na cuba, as nanopartículas foram

submetidas a uma diferença de potencial de 60V durante 45 minutos. A leitura do gel foi feita no foto documentador ChemiDoc (Bio-Rad®).

3.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

3.5.1. Diâmetro e índice de polidispersidade

O diâmetro das nanopartículas e o índice de polidispersidade foram obtidos através do espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering* – DLS) no equipamento Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Para a realização das medidas, amostras de nanopartículas já sintetizadas, contendo 1 μ g de DNA e a respectiva massa de PBAE (de acordo com a razão mássica) foram diluídas em água para completar um volume de 800 μ l e os dados coletados a 25°C.

3.5.2. Potencial Zeta

O potencial zeta das nanopartículas foi medido através da velocidade de mobilidade eletroforética, através da exposição das amostras a um campo elétrico no equipamento Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Para a realização das medidas, foram utilizadas amostras iguais às do item 3.5.1. A medida foi feita a 25°C.

3.5.3. Morfologia

A morfologia das nanopartículas foi verificada através da microscopia eletrônica de transmissão no microscópio Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI Company). As amostras foram diluídas em tampão acetato de sódio 25 mM e inseridas em uma grade de cobre. Após, foram coradas com acetato de uranila 2%. A grade foi mantida sob vácuo até a realização da leitura.

A verificação da morfologia foi realizada apenas para uma condição de síntese de nanopartículas em microfluídica.

3.6. CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas células de câncer de próstata (PC3) e células epiteliais normais da próstata (PNT-2). A cultura foi realizada em meio RPMI 1640 (Lonza), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativo (Sigma) e 1% de uma combinação de penicilina (Sigma) e estreptomicina (Sigma). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂ e foram repicadas três vezes por semana até atingirem a confluência.

3.7. TRANSFECÇÃO

A avaliação da transfecção foi realizada através do monitoramento da expressão da proteína GFP através do plasmídeo pEGFP-N1 presente nas nanopartículas.

Primeiramente, 100.000 células por poço foram plaqueadas em placas de 12 poços. No dia seguinte, o meio suplementado em que as células foram cultivadas foi retirado. Após, as nanopartículas sintetizadas foram adicionadas às células em meio de cultura RPMI 1640 (Lonza) não suplementado. Após um tempo mínimo de 4 horas de contato das partículas com as células, a solução adicionada foi removida e o meio suplementado foi novamente colocado. Após 24 horas, foram obtidas imagens das células através do microscópio invertido Cytation 5 (Biotek, EUA). Já a avaliação da eficiência de transfecção foi feita por citometria de fluxo, onde amostras foram analisadas (10.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton Dickinson), utilizando-se o programa CellQuest 2.8. A análise da porcentagem das diferentes populações GFP positivas foi feita utilizando-se o programa FlowJo (Treestar – versão 7.6.1 para Windows).

3.8. DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS

A fabricação dos dispositivos microfluídicos foi realizada no Laboratório de Microfabricação (LMF) no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). A metodologia empregada foi a litografia macia, descrita pelo grupo de pesquisa LaNBDA (BALBINO *et al.*, 2013). Foram utilizados os moldes já

empregados pelo grupo (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017), tendo sido necessária apenas a réplica dos dispositivos.

3.9. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS EM MICRODISPOSITIVOS

A metodologia para a síntese de nanopartículas através da microfluídica foi baseada no procedimento empregado para a formação de lipossomas em dispositivos microfluídicos descrito pelo grupo de pesquisa LaNBDA (BALBINO *et al.*, 2013) e em Wilson *et al.* (2017). O processo de síntese foi aperfeiçoado ao longo do trabalho, visto que não há na literatura método estabelecido para a produção do complexo PBAE/DNA e estudos da otimização do processo.

Para a síntese das nanopartículas em microfluídica, foram utilizados três dispositivos. Dois deles têm o processo controlado por difusão (Figura 17 A e B), divergindo apenas no tempo de residência. O outro (Figura 17C) tem o processo controlado por advecção caótica. Os dispositivos foram estudados previamente para a síntese de nanopartículas de quitosana/ATP (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017)

O dispositivo que apresentou melhor desempenho em relação às propriedades físico-químicas e biológicas das nanopartículas sintetizadas foi investigado mais detalhadamente em relação às condições de processo (vazão do sistema e proporção entre as correntes).



Figura 17 - Esquema de microdispositivos que foram utilizados para síntese de nanopartículas de PBAE/DNA. (A) Dispositivo simples de focalização hidrodinâmica D-simples, em que o processo é controlado por difusão. (B) Dispositivo D-longo; (C) Dispositivo com canais com barreiras D-barreiras, em que o processo é controlado por advecção caótica (Pessoa, Sipoli, de la Torre, 2017).

3.10. ENSAIOS DE FLUORESCÊNCIA

Para se avaliar a eficiência da mistura em cada dispositivo, foram realizados ensaios de fluorescência, em que se adicionou o corante sulforodamina B a uma concentração de 0,01M na corrente central aquosa. Uma das correntes laterais era de tampão acetato de sódio com PBAE e a outra apenas com acetato de sódio. Com as imagens obtidas por microscopia, foi possível quantificar a eficiência da mistura através do índice de mistura (M). Baseando-se na intensidade de pixels das imagens, o software ImageJ gera um perfil de intensidade ao longo de uma secção transversal do canal. A intensidade de pixels é proporcional à concentração do corante e a partir da qual se pode calcular o M (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017). Para o cálculo, primeiramente obtém-se a variância da amostra, dada por:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (c_i - \overline{c_m})^2}{N}}$$

Equação 3

na qual c_i é a intensidade de fluorescência em um ponto i, $\overline{c_m}$ é a intensidade de fluorescência média da amostra e N é o número de eventos no espaço amostral. Com a variância, pode-se calcular o índice de mistura através da Equação 4:

$$M = 1 - \sqrt{\frac{\sigma^2}{\sigma_{max}^2}}$$

Equação 4

em que σ_{max} é a máxima variância encontrada na amostra.

Um índice de mistura M=1 indica uma mistura completa, já M=0, indica que não houve mistura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta dissertação de mestrado é o trabalho inicial envolvendo a formação de nanopartículas com PBAE do grupo de pesquisa LaNBDA, coordenado pela Professora Doutora Lucimara Gaziola de la Torre. Este também é um dos trabalhos iniciais de pesquisa desenvolvidos pelo Laboratório Nano-Cell Interactions coordenado pelo Professor Marcelo Bispo de Jesus e também co-orientador desta dissertação.

Assim, este trabalho tem como principal objetivo a investigação da complexação entre PBAE e DNA e a consequente formação de nanopartículas que podem ser utilizadas como vetores para terapia gênica. Como a literatura descreve diferentes protocolos de complexação entre DNA e PBAE, a primeira etapa desta investigação teve como meta avaliar e padronizar o método de síntese das nanopartículas em sistema *bulk*, para, posteriormente, migrar para a microfluídica, usada como ferramenta para observar, analisar e entender o processo de formação das nanopartículas PBAE/DNA. Dessa forma, é possível definir a melhor rota de síntese, bem como as características físico-químicas necessárias para futuras aplicações em terapia gênica.

Para isso, o PBAE 557 foi definido como objeto de estudo. Esta escolha foi feita a partir de uma triagem inicial realizada pelo grupo Nano-Cell, que investigou três diferentes PBAEs (556, 557 e 558). Esses polímeros foram previamente selecionados tendo como base a eficiência de transfecção em células da retina, reportada por Sunshine *et al.* (2012). Nesta investigação preliminar, os polímeros foram complexados em processo *bulk* com DNA plasmidial pGFP N1 nas razões mássicas 30, 45 e 60 (massa do polímero/massa de DNA) e as nanopartículas resultantes foram utilizadas para tratar células PC3 (*prostate cancer* - câncer de próstata) e PNT2 (*normal prostate epithelium* - normais do epitélio da próstata). Através de análise da eficiência de transfecção nessas células, verificou-se que o polímero 557 apresenta níveis maiores (~60% para PC3 e 40% para PNT2), o que o torna mais promissor para ser um vetor de ácidos nucleicos para esse tipo de célula. Além disso, também foi possível observar que a razão mássica 30 obteve melhores resultados. Estes resultados estão apresentados no Anexo I.

4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PBAE

O PBAE 557 foi sintetizado através da adição de Michael realizada em duas etapas. Na primeira, forma-se a cadeia central, constituída pelos monômeros 1,5-Bis(acriloil oxi) pentano (representado pelo número 5) e 5-Amino -1-pentanol (representado também pelo número 5). Na segunda etapa ocorre a finalização das laterais da cadeia central com a adição do *end-cap* 1-(3-amino propil)-4-metil piperazina (representado pelo número 7) (Figura 18).



Figura 18 – Ilustração da reação de síntese de uma molécula de PBAE 557.

Para verificar se a síntese ocorreu de forma eficiente e a estrutura química do polímero, utilizou-se a técnica de ressonância magnética nuclear de prótons (¹H) após cada etapa da síntese, conforme apresentado na Figura 19.

O primeiro espectro de H (Figura 19A) foi obtido após a primeira etapa da reação, em que ocorre a formação e crescimento da cadeia principal. É possível observar deslocamentos químicos referentes à função acrilato ao redor de 6ppm, destacados na Figura 19A. Já o segundo espectro de H (Figura 19B) foi obtido após a segunda etapa da reação, em que ocorre a funcionalização das terminações acrílicas com o *end-cap*. Essa funcionalização é comprovada pelo desaparecimento dos deslocamentos da função acrílica em 6ppm, o que sugere que as terminações fizeram parte da reação com o *end-cap*.



Figura 19 – Espectros de ressonância magnética nuclear de prótons (¹H) do polímero 557. (A) Espectro obtido após a primeira etapa de síntese; (B) Espectro obtido após a segunda etapa da síntese. A marcação indica os deslocamentos característicos da função acrilato (A) e seu posterior desaparecimento em função da funcionalização da cadeia que ocorre nas terminações acrílicas (B).

Os H espectros encontrados estão de acordo com a literatura, que também verifica a eficácia da primeira etapa da síntese de PBAE pelos deslocamentos característicos da função acrilato entre 5,8 e 6,5 ppm e a funcionalização com *end-cap* através do desaparecimento desses deslocamentos (TZENG; GREEN, 2013).

Após confirmar a estrutura química do PBAE 557 sintetizado, o polímero foi caracterizado de acordo com a massa molar através da técnica de cromatografia de permeação em gel, utilizando poliestireno como padrão. O polímero foi sintetizado em 6 replicatas independentes, sendo em seguida avaliado em termos da massa molar. Assim, a massa molar média variou de 2,0 a 3,8 kDa e a dispersidade ficou em uma faixa de 1,3 a 2,1. Os resultados de massa molar e dispersidade estão de acordo com o descrito na literatura científica, que apresenta massas molares de PBAEs variando de 2 a 120 kDa, dependendo dos monômeros utilizados e condições do processo de síntese (LYNN *et al.*, 2001; BHISE *et al.*, 2010). Além disso, PBAEs obtidos através de adição de Michael geralmente

apresentam polidispersidade relativamente alta (PDI>1,3) (LIU et al., 2018; ELTOUKHY et al., 2013; KIM et al., 2005).

Desta forma, o procedimento adotado permitiu a síntese adequada do polímero 557, possibilitando os estudos da formação das nanopartículas PBAE/DNA.

4.2. INVESTIGAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS PBAE/DNA ATRAVÉS DO MÉTODO *BULK*

Após a síntese e caracterização do polímero PBAE 557, buscou-se investigar e padronizar a síntese das nanopartículas PBAE/DNA em sistema *bulk*, formadas a partir da complexação eletrostática entre o polímero e o ácido nucleico.

Diversos trabalhos da literatura reportam a síntese dessas nanopartículas em *bulk*. No entanto, existem diversas divergências entre os métodos, como, por exemplo, quanto à forma de mistura, ordem de adição dos reagentes, e tempo de complexação. Em função disso, neste trabalho, o impacto de cada variável nas características físico-químicas das nanopartículas foi estudado, até que um padrão de metodologia foi estabelecido para as demais sínteses utilizadas para comparação com o método microfluídico (Item 4.3). Desta forma, é possível identificar os principais parâmetros que influenciam na formação das nanopartículas.

4.2.1. Avaliação de diferentes tipos de mistura: pipetagem e vórtex

A literatura apresenta divergências em relação à maneira de se misturar o PBAE com o DNA para a síntese de nanopartículas. Há trabalhos que utilizam simples pipetagem (SUNSHINE *et al.*, 2012; ELTOUKHY *et al.*, 2012), outros que sugerem realizar uma mistura de maneira mais vigorosa (VUORIMAA *et al.*, 2011; ZUGATES *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2013; BISHOP *et al.*, 2013; RATA-AGUILAR *et al.*, 2015) e ainda há aqueles que utilizam vórtex (LYNN; LANGER, 2000; GREEN *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2016).

A fim de verificar qual método resulta em melhores características físicoquímicas, foram testadas 4 condições de mistura diferentes: vórtex em alta velocidade por 30 e 10 segundos, vórtex em velocidade média por 10 segundos e pipetagem. A pipetagem foi realizada de modo a simular uma condição de mistura mais branda, com mínima influência convectiva. Já a mistura utilizando o equipamento de laboratório - o vórtex, promove a mistura do fluido a partir de um movimento mecânico oscilatório, que transmite essa energia para o tubo que contém fluido. Assim, no interior dos tubos, vórtices são criados, permitindo a mistura do fluido com grande contribuição convectiva. Comparativamente à pipetagem, a mistura via vórtex foi considerada mais vigorosa.

Assim, a partir das duas técnicas laboratoriais de mistura, pode-se avaliar o respectivo efeito nas propriedades coloidais como diâmetro hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersidade. Estes resultados estão apresentados na Figura 20.



Figura 20 – Características físico-químicas das nanopartículas PBAE/DNA em função do tipo de mistura. (A) Diâmetro médio hidrodinâmico; (B) Potencial Zeta; (C) PDI. *A maioria dos dados de diâmetro e PDI obtidos não estavam de acordo com o *quality report* do equipamento.

A partir da Figura 20, pode-se observar que o tipo de mistura apresenta influência significativa nas propriedades coloidais. Uma mistura mais vigorosa, como o vórtex, favorece maior agregação, gerando nanopartículas com maiores diâmetros, chegando à escala de micrômetros (Figura 19A). É também interessante notar que a intensidade e tempo de aplicação do vórtex também influenciam no diâmetro. O

maior tempo de agitação (30 segundos) e a maior velocidade geram partículas de maior diâmetro. Em contrapartida, a polidispersidade também se mantém mais elevada (Figura 20C), comparativamente aos outros métodos, indicando que este processo gera complexos PBAE/DNA desorganizados. Essa desorganização gera agregados de menor potencial zeta, sugerindo a reticulação entre partículas.

Já em uma condição de mistura mais amena, como na pipetagem, o diâmetro hidrodinâmico é menor, cerca de 600 nm (Figura 20A), e com menor PDI (Figura 20C), sugerindo que a associação PBAE/DNA ocorre de forma proporcional e homogênea. Esse comportamento é refletido pelo potencial zeta, que alcança maiores valores (Figura 20B), comparativamente.

Desta forma, uma mistura mais vigorosa gera nanopartículas não uniformes, dado o índice de polidispersidade elevado. Além disso, nota-se que o desvio padrão das medidas é maior no caso de agitação por vórtex, o que mostra que a agregação ocorre de forma mais aleatória do que no caso da pipetagem, que apresenta desvios menores.

É importante ressaltar que a maior parte dos dados de diâmetro e PDI não estavam de acordo com o *quality report* do equipamento de DLS para o caso de vórtex. Isso ocorre quando a correlação matemática do Zetasizer não se aplica às amostras, o que pode ocorrer quando se tem uma amostra muito heterogênea, como acontece no caso de agitação por vórtex em alta velocidade, que apresenta valor elevado de polidispersidade.

A partir desses experimentos, pode-se inferir que agitações mais brandas geram complexos PBAE/DNA com menores diâmetros, polidispersidade e maior potencial zeta. Assim, considerando os resultados obtidos, padronizou-se a pipetagem como técnica laboratorial para agitação dos componentes.

4.2.2. Avaliação de diferentes maneiras de pipetagem de reagentes: normal ou reversa

A maneira como se realiza a pipetagem para adição dos componentes pode ser fonte de erro e não reprodutibilidade de resultados. Para líquidos viscosos, como é o caso da solução de PBAE, recomenda-se a utilização de pipetagem reversa (MARX, 2014), em que se pega um excesso de líquido na ponteira que não é dispensado na amostra. Isso é feito para evitar que uma porção de líquido que pode ter ficado aderida à ponteira não seja dispensada, que poderia ocasionar erros de volume e, consequentemente, inconsistência nos resultados. Essas diferenças podem ser significativas quando se trata de material viscoso, como o caso da solução de PBAE.

Em geral, os trabalhos sobre nanopartículas de PBAE não fornecem esse tipo de detalhe da metodologia. Dessa forma, buscou-se investigar se a pipetagem tem influência nas características das nanopartículas. Foram sintetizadas nanopartículas de PBAE/DNA utilizando pipetagem normal ou reversa para a solução polimérica. As medidas das propriedades estão ilustradas na Figura 21.



Figura 21 – Características físico-químicas das nanopartículas PBAE/DNA de acordo com o tipo de pipetagem (normal ou reversa). (A) Diâmetro médio hidrodinâmico; (B) Potencial Zeta; (C) PDI.

Apesar de os desvios padrão serem maiores no caso de pipetagem normal, não há diferença estatística entre as medidas das diferentes pipetagens. Para o índice de polidispersidade, há uma pequena diferença que pode ser considerada irrelevante (de 0,14 para 0,18).

Embora o tipo de pipetagem não se mostrou influente sobre as propriedades coloidais das nanopartículas, a pipetagem normal foi realizada com cautela, evitando a perda de material na ponteira e também o excesso de gotas que podem ficar aderidas na parte externa da ponteira. Assim, para um procedimento mais simples e menos detalhado, optou-se por padronizar a síntese das nanopartículas PBAE/DNA utilizando a pipetagem reversa.

4.2.3. Avaliação da ordem de adição dos reagentes: adicionar PBAE no DNA ou DNA no PBAE

Nos trabalhos presentes na literatura que abordam a síntese de nanopartículas PBAE/DNA através do método *bulk* não há concordância sobre a ordem de adição dos reagentes. Há estudos que sugerem adicionar o PBAE no DNA (GREEN *et al.*, 2009; ANDERSON *et al.*, 2014; BISHOP *et al.*, 2013; AKINC *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2016), outros indicam adicionar o DNA no PBAE (RATA-AGUILAR *et al.*, 2015; LYNN; LANGER, 2000) e há também aqueles que não mencionam a ordem de adição (SUNSHINE *et al.*, 2012; TZENG *et al.*, 2011; VUORIMAA *et al.*, 2011; ZUGATES *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2013).

Além disso, para outros polímeros, como a polietilenoimina (PEI), a ordem de adição é de grande importância. Foi verificado que adicionar o polímero no DNA pode ser até 10 vezes mais eficiente para se obter as melhores propriedades finais das nanopartículas (KOH *et al.*, 2009). Em contraste, um estudo com co-polímeros de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) mostrou que ao se adicionar o DNA na solução de polímero, foram obtidas nanopartículas menores que 200 nm de diâmetro, enquanto ao se alterar a sequência de adição, foram obtidas nanopartículas muito maiores (>800 nm) e múltiplos agregados foram formados, prejudicando a aplicação (TWAITES *et al.*, 2004).

Com a discrepância da literatura e os diferentes comportamentos de diversos polímeros, fez-se importante investigar como a ordem de adição pode influenciar nas propriedades das nanopartículas PBAE/DNA. Assim, as nanopartículas foram sintetizadas em *bulk* adicionando-se o PBAE no DNA e outras amostras foram preparadas na ordem inversa, colocando o DNA no PBAE. As características físico-químicas encontradas por DLS estão representadas na Figura 22.



Figura 22 – Características físico-químicas das nanopartículas PBAE/DNA de acordo com a ordem de adição dos reagentes. (A) Diâmetro médio; (B) Potencial Zeta; (C) PDI.

Com os resultados obtidos verificou-se que não há diferença estatística entre as características obtidas pelas diferentes sequências de adição do polímero e ácido nucleico. Portanto, pode-se concluir que para a síntese de nanopartículas do PBAE 557 com DNA a ordem de adição dos reagentes não interfere nas propriedades físico-químicas finais.

4.2.4. Efeito da razão mássica PBAE/DNA nas propriedades coloidais

O grupo de pesquisa do Professor Marcelo Bispo de Jesus (Nano-Cell Interactions Lab) mostrou que diferentes razões mássicas entre PBAE e DNA nas nanopartículas levam a eficiências de transfecção distintas (Anexo I).

Com o intuito de investigar essa divergência, sintetizaram-se nanopartículas com diversas razões mássicas e suas características físico-químicas foram avaliadas. As razões mássicas estudadas variaram na faixa de 0,25 a 90 (Figura 23).



Figura 23 – Características físico-químicas de nanopartículas PBAE/DNA de acordo com a razão mássica. (A) Diâmetro médio hidrodinâmico e potencial zeta; (B) PDI.

Conforme ilustrado na Figura 23, as características físico-químicas das nanopartículas variam com a razão mássica. Abaixo da razão 1, há excesso de DNA, de modo que sua carga negativa prevalece, fazendo com que o potencial zeta seja negativo. Nesse caso, a aplicação para terapia gênica pode ser prejudicada, já que a membrana celular possui caráter aniônico, o que dificultaria a internalização de partículas carregadas negativamente.

Entre as razões mássicas 1 e 5, existe uma região de isoneutralidade, em que o potencial zeta é próximo de 0. Devido ao baixo valor absoluto do potencial zeta, o sistema coloidal é mais instável, o que faz com que haja maior agregação entre as partículas e, consequentemente, maior tamanho, chegando até à escala de micrômetros. Quando o potencial zeta é mais elevado, as nanopartículas tendem a se repelir, evitando, assim, a agregação entre elas e a formação de complexos maiores (HEURTAULT *et al.*, 2003).

Na faixa de razão mássica de 10 a 45, nota-se uma estabilidade no diâmetro e no potencial zeta, que sugere que, nessa região, há uma complexação organizada do PBAE com o DNA. É importante salientar que de 15 a 45 os desvios padrão são mais baixos, o que sugere uma uniformidade maior das amostras. A partir da razão mássica 60, há, provavelmente, um excesso de PBAE que pode estar se agregando e formando partículas maiores. Já o índice de polidispersidade se mantém estável entre as razões 1 e 90.

Ponderando os resultados obtidos, considera-se a faixa de 15 a 45 ideal para atingir as melhores características físico-químicas.

Os resultados obtidos estão de acordo com o que foi reportado na literatura. A faixa ótima de razão mássica depende do tipo de PBAE. No entanto, para razões mássicas muito baixas, as nanopartículas possuem carga negativa ou positiva fraca, o que faz com que se agreguem e formem complexos maiores. Aumentando-se a razão mássica, a carga positiva é intensificada e formam-se nanopartículas menores (WU *et al.*, 2006).

Também foi verificada a associação do DNA com o PBAE através de ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose (Figura 24). Foi demonstrado que para todas as razões mássicas maiores que 5, em que a nanopartícula resultante é positiva, não há liberação do DNA.





Figura 24 – Ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose de nanopartículas PBAE/DNA de acordo com a razão mássica.

Embora as propriedades físico-químicas na faixa de razão mássica de 15 a 45 sejam adequadas, como já mostrado pelo grupo Nano-Cell, a transfecção de células PC3 e PNT2 é melhor quando mediada por nanopartículas de razão mássica 30 (Anexo I). Sendo assim, definiu-se a razão mássica 30 para os próximos estudos em sistemas microfluídicos.

4.2.5. Avaliação de etapa adicional de liofilização

Nanopartículas do polímero PBAE apresentam grande vantagem na transfecção de células, pois possuem grande capacidade de entregar o material genético nas células e são biodegradáveis, em função da hidrólise do grupo éster (GREEN *et al.*, 2009). Tais nanopartículas poliméricas são normalmente sintetizadas em suspensões aquosas. No entanto, as partículas são fisicamente instáveis no meio aquoso e podem sofrer agregação e degradação dependendo do tempo de estocagem, danificando as propriedades originais e prejudicando seu uso. Dessa forma, através da liofilização, é possível manter a amostra intacta para futuros usos (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016).

A liofilização é um processo de congelamento e secagem que consiste em três etapas: primeiramente a amostra é rapidamente congelada, em ultrafreezer (–90°C) ou com nitrogênio líquido (-190°C). Após, a amostra é submetida à sublimação e depois ocorre a dessorção de água remanescente sob vácuo (NIREESHA *et al.*, 2013). Durante a etapa de congelamento, ocorre a formação de cristais de gelo. A cristalização pode induzir ao cisalhamento mecânico das nanopartículas, causando desestabilização e modificando suas propriedades. Para evitar que isso ocorra, adiciona-se um crioprotetor à amostra antes de congelá-la. O crioprotetor forma uma matriz onde as nanopartículas ficam imobilizadas, protegendo-as do cisalhamento. Dentre os crioprotetores mais utilizados para nanopartículas poliméricas estão a sacarose e a trealose. A trealose apresenta algumas vantagens, como ser menos higroscópica e menos reativa quimicamente (FONTE; REIS; SARMENTO, 2016).

A literatura apresenta trabalhos que utilizam trealose (PFEIFER *et al.*, 2005) como crioprotetor de nanopartículas de PBAE e também outros que usam sacarose (TZENG *et al.*, 2011). A fim de padronizar um protocolo de liofilização adequado para as nanopartículas PBAE/DNA deste trabalho, testou-se a utilização de trealose como crioprotetor. As propriedades físico-químicas das nanopartículas foram averiguadas antes e depois da liofilização (Figura 25). Também foi feito ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose para verificar se a liofilização teria algum efeito sobre a associação entre PBAE e DNA (Figura 26). Caso houvesse DNA livre, isto é, não associado à nanopartícula, este iria migrar no gel e uma banda similar ao do DNA livre seria identificada. A concentração de trealose utilizada foi de 4% (massa/volume) (DE JESUS *et al.*, 2014).



Figura 25 – Características físico-químicas de nanopartículas PBAE/DNA frescas e liofilizadas.



Figura 26 – Ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose de DNA livre e de nanopartículas PBAE/DNA liofilizadas, utilizando trealose como crioprotetor.

Analisando os resultados obtidos, observa-se que há diferença entre o tamanho das nanopartículas. Porém, essa diferença é muito pequena. Já para o potencial zeta houve uma grande queda do valor da amostra fresca e liofilizada. Tal fato pode ter ocorrido devido à possível formação de ligações de hidrogênio entre a trealose e as nanopartículas. A carga positiva das nanopartículas é proveniente da protonação da amina do PBAE em pH ácido. Se a trealose faz ligações de hidrogênio com esses grupos, a carga positiva é parcialmente neutralizada e a carga da superfície diminui, ocasionando o decréscimo no valor do potencial zeta (POZO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2009). O próprio processo de secagem, com remoção e adição de água, pode ainda alterar a organização/associação das moléculas, levando a alteração das propriedades coloidais. No entanto, a diminuição da carga positiva não causa liberação do DNA, como pode ser visto através da eletroforese (Figura 26).

Assim, confirmou-se que a trealose é um crioprotetor adequado para nanopartículas PBAE/DNA e, portanto, foi utilizada em todos os processos de liofilização.

4.2.6. Avaliação da cinética de complexação entre PBAE e DNA nas propriedades coloidais e biológicas

A literatura apresenta trabalhos de síntese de nanopartículas PBAE/DNA com diferentes tempos de complexação. A maioria deles varia entre 5 e 30 minutos (ZUGATES *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2013; GREEN *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2006; RATA-AGUILAR *et al.*, 2015). Há também trabalhos que não mencionam o tempo de

complexação. Então, a fim de entender como o tempo de complexação influencia as propriedades das nanopartículas, variou-se a duração da associação entre o PBAE e o DNA de 0 a 40 minutos. Para que a mesma amostra pudesse ser utilizada em diferentes ensaios (físico-químicos e biológicos), foi necessário liofilizá-las, para que não houvesse qualquer interferência nos resultados em função do tempo de estocagem. Como já padronizado no item 4.2.5, foi utilizada trealose como crioprotetor, na concentração de 4% (massa/volume).

Assim, para cada tempo, as características físico-químicas, como diâmetro médio hidrodinâmico, polidispersidade e potencial zeta foram determinados (Figura 27).



Figura 27 – Características físico-químicas de nanopartículas PBAE/DNA de acordo com o tempo de complexação. (A) Diâmetro médio e Potencial Zeta; (B) PDI.

Não é possível identificar uma tendência de comportamento das propriedades das nanopartículas em função do tempo de complexação.

Aparentemente, os dados oscilam em torno de um valor médio. No entanto, não se sabe sua influência nas características biológicas.

A fim de verificar se o tempo de complexação interfere na associação do DNA com o polímero, as amostras foram submetidas a um ensaio de eletroforese em gel de agarose durante 45 minutos (Figura 28). A primeira banda corresponde ao DNA plasmidial puro para comparação e os números referem-se aos tempos de complexação.



Figura 28 – Ensaio de retardo na mobilidade eletroforética em gel de agarose para amostras de nanopartículas PBAE/DNA com diferentes tempos de complexação.

Assim, a Figura 28 mostra que apenas o DNA puro (controle) corre no gel. Isso indica que nas demais amostras a associação entre o PBAE e o DNA foi efetiva, de maneira que o DNA não foi liberado durante a complexação ou enquanto era submetido ao ensaio eletroforético. É interessante destacar que no tempo de 0 minutos também não houve arraste, o que sugere que a complexação ocorre muito rapidamente, podendo ser até instantânea. Esse resultado diverge do que é descrito na literatura, que diz que é necessário aguardar de 5 a 30 minutos, em média, para que a complexação entre PBAE e DNA seja completa, como já mencionado anteriormente. Esta afirmação também é confirmada pela análise do diâmetro em função do tempo de complexação (Figura 27).

Sabendo-se que o DNA está associado ao PBAE nas nanopartículas sintetizadas, buscou-se investigar a transfecção em células cancerosas e saudáveis. Para isso, foram utilizadas células PC3 (câncer de próstata) e PNT2 (normais do epitélio da próstata). Os resultados de eficiência de transfecção estão reportados na Figura 29. Para a realização do ensaio, foram utilizadas as amostras já liofilizadas.



Figura 29 – Eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2 de nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas com diferentes tempos de complexação.

Não houve diferença significativa entre as transfecções das diferentes amostras de nanopartículas sintetizadas com tempos de complexação distintos. Tal resultado demonstra que as propriedades das nanopartículas sintetizadas não interferem na atividade biológica. Portanto, uma faixa de diâmetro entre 350 e 550 nm (Figura 27A) não influencia os resultados de transfecção, o que está de acordo com outros estudos publicados, que mostram que, apesar de nanopartículas de tamanhos menores poderem ser internalizadas mais rapidamente pelas células, essa faixa de variação não prejudicaria a transfecção (GRATTON *et al.*, 2008).

Dessa forma, conclui-se que o período de 0 a 40 minutos é apropriado para a síntese das nanopartículas PBAE/DNA, já que as características físicoquímicas resultantes são adequadas para a transfecção das células. Tal intervalo de tempo sugere que a síntese desse tipo de nanopartícula é um processo robusto e fornece uma margem de segurança para o processo, que não necessita ser estritamente controlado.

Apesar de não haver influência do tempo nas transfecções, nota-se uma diferença entre a eficiência de transfecção das células PNT2 e PC3, consistentemente maior nas células cancerígenas. O resultado pode estar associado à própria natureza da célula tumoral e normal. Células tumorais possuem mutações genéticas que podem influenciar processos como a endocitose, geralmente favorecendo a captação de nutrientes e outras moléculas para acompanhar o crescimento desses tecidos. Isso faz com que a internalização de material genético

e a posterior transfecção sejam diferentes em células cancerosas e saudáveis (KONG et al., 2017).

Além disso, através desse ensaio, também foi possível comprovar que a liofilização não possui impacto negativo na eficiência de transfecção, visto que atingiu níveis semelhantes aos previamente estudados (Anexo I).

Com todos os estudos realizados, foi possível padronizar a síntese das nanopartículas PBAE/DNA em sistema *bulk*. Como algumas variáveis não têm influência sobre as propriedades físico-químicas, a metodologia foi selecionada arbitrariamente. A metodologia adotada foi, então, utilizar pipetagem para agitação, pipetagem reversa para dispensar o polímero no frasco, adicionar o DNA ao PBAE, tempo de complexação de 20 minutos, razão mássica PBAE/DNA de 30 e trealose como crioprotetor na concentração de 4% (massa/volume).

4.3. INVESTIGAÇÃO DA SÍNTESE DE NANOPARTICULAS PBAE/DNA ATRAVÉS DE TECNOLOGIA MICROFLUÍDICA

A microfluídica é uma técnica em que a operação do processo ocorre em regime contínuo. Como os escoamentos em sistemas microfluídicos operam normalmente em regime laminar, os microdispositivos são modelos de reatores não ideais, com perfil de velocidade e de concentração. A análise dos eventos ao longo do microcanal possibilita associar o tempo espacial com a evolução do processo, permitindo analisar os aspectos importantes que podem influenciar, por exemplo, em uma complexação eletrostática. Neste caso, a análise combinada de transferência de massa por difusão e convecção deve ser realizada. Esse recurso não é possível para processos que ocorrem em batelada. Como a relação área/volume em processos microfluídicos é muito maior quando comparada à macroescala, análises de interações com a superfície dos microcanais também se tornam importantes.

Desta forma, visando investigar mais profundamente os mecanismos de interação eletrostática entre o DNA e o PBAE, utilizou-se a tecnologia microfluídica como ferramenta de observação. Através de sistemas microfluídicos, foi possível alterar diversos componentes do processo de síntese a fim de se analisar individualmente seu efeito nas propriedades físico-químicas e biológicas das nanopartículas. Existe apenas um trabalho na literatura que estuda a síntese de nanopartículas PBAE/DNA em microfluídica. Nesse estudo realizado por Wilson *et al.* (2017), um dispositivo de focalização hidrodinâmica 3D foi utilizado. Diferentemente desta dissertação, o objetivo do trabalho foi sintetizar nanopartículas PBAE/DNA em uma escala consideravelmente alta (45ml/h) e verificar a durabilidade das amostras liofilizadas e estocadas durante um período de tempo. Os mecanismos de interação entre o polímero e o ácido nucleico não foram investigados, e as variáveis de processo foram analisadas superficialmente.

Processos de síntese de nanopartículas poliméricas em dispositivos microfluídicos 2D de focalização hidrodinâmica têm sido muito explorados na literatura (BALBINO et al., 2013; PESSOA, SIPOLI, DE LA TORRE, 2017). No entanto, não há trabalhos utilizando geometria 2D e a síntese de nanopartículas baseadas em PBAE. Dessa forma, sabendo-se que a focalização hidrodinâmica é comumente utilizada para a síntese de nanopartículas poliméricas, nesta dissertação. foram estudados dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica 2D (D-simples e D-longo). Além disso, no intuito de investigar o efeito do tipo de mistura na complexação entre PBAE e DNA, foi também empregado um dispositivo com projeção de cotovelos e barreiras, que explora a advecção caótica e gera uma mistura mais eficiente (D-barreiras). Todos os dispositivos já haviam sido utilizados pelo grupo de pesquisa LaNBDA (BALBINO; AZZONI; DE LA TORRE, 2013; PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017) para a síntese de lipossomas catiônicos e seus complexos e também para nanopartículas de quitosana. Esses dispositivos são canaletas que permitem o escoamento contínuo e são construídos a partir de técnica de litografia macia e possuem três paredes do polímero PDMS (de caráter hidrofóbico) e uma base de vidro (de caráter hidrofílico).

4.3.1. Avaliação das configurações de processo

A fim de se avaliar o comportamento da complexação em diferentes formas de contatos entre os reagentes, foram analisadas duas configurações de processo. Foi utilizado um dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica em formato T simples (D-simples), cujos canais possuem 140 μ m de largura, 50 μ m de altura e 34 mm de comprimento da focalização até a saída (Figura 17A). Como não há trabalhos que reportam esse processo, a vazão total do sistema (Q_T = 30 μ l/min) foi escolhida baseada em estudos de síntese microfluídica de nanopartículas de PEI e DNA (CHEE *et al.*, 2009; DEBU; BECK-BROICHSITTER; KISSEL, 2012). Para esse estudo inicial, manteve-se a proporção entre as correntes laterais e a corrente central a igual a 1. Essa proporção é definida pelo FRR (*flow rate ratio*), dado pela Equação 5.

$$FRR = \frac{\sum Q_{laterais}}{Q_{central}}$$

Equação 5

Na primeira configuração, a corrente central era constituída de DNA com tampão acetato de sódio (pH 5) e as correntes laterais eram de PBAE 557 também diluído em tampão acetato de sódio pH 5 (Figura 30A). Os reagentes foram submetidos a um pH ácido seguindo a metodologia *bulk* e o procedimento proposto por Wilson *et al.* (2017). Sendo o FRR = 1, a vazão de DNA é de 15 µl/min e a das correntes de PBAE de 7,5 µl/min cada uma. Na segunda configuração, as correntes foram invertidas, de modo que as laterais eram constituídas de DNA + tampão acetato de sódio e o PBAE diluído no mesmo tampão estava localizado na corrente central (Figura 30B). Nesse caso, o valor das vazões é de 15 µl/min para o PBAE e 7,5 µl/min para cada corrente de DNA. Para ambas as configurações de processo, as concentrações finais de DNA (9,4 µg/ml) e de PBAE (281,25 µg/ml) eram a mesma e foi estabelecida a razão mássica PBAE/DNA de 30, como anteriormente identificado como a de melhor resultado nos ensaios biológicos.





Figura 30 – Configurações de processo para a síntese de nanopartículas PBAE/DNA em dispositivo microfluídico D-simples. (A) Corrente central de DNA e correntes laterais de PBAE. (B) Corrente central de PBAE e correntes laterais de DNA. Todas as correntes estão diluídas em tampão acetato de sódio pH 5. A vazão total das correntes é de $Q_T = 30 \mu l/min$.

Através da Figura 30, nota-se que há uma intensa precipitação nos dois casos. A precipitação ocorre a partir da fronteira entre as correntes e se acumula na região de escoamento do DNA. Uma vez que a precipitação ocorreu após o encontro das correntes de PBAE e DNA, acredita-se que tanto o PBAE quanto o DNA estejam precipitando.

Sendo o caráter do PBAE hidrofóbico, a primeira hipótese é de que o polímero estaria sendo adsorvido no PDMS, também de caráter hidrofóbico. No entanto, trabalhos relatam que a precipitação de polímeros em canais de PDMS, como a PLGA, ocorre apenas para massas molares acima de 45 kDa (RHEE *et al.*, 2011), que equivale a 15 vezes a massa molar do PBAE 557 utilizado.

A outra provável hipótese, então, é que o PBAE estaria precipitando no vidro, no qual o dispositivo está selado. Como o PBAE está em meio ácido, possui caráter catiônico, podendo, então, estar interagindo eletrostaticamente com o vidro que é aniônico. Com o encontro das outras correntes, ocorre um distúrbio no sistema, de modo a iniciar a formação de precipitado e adesão no vidro.

Já o DNA está sob uma condição em que é susceptível à precipitação. Em baixos valores de pH, o DNA perde ligações de hidrogênio, tornando-se menos estável e menos solúvel (THAPLYAL; BEVILACQUA, 2014). Dessa maneira, ao encontrar a corrente de PBAE, o contato direto faz com que haja uma associação desbalanceada entre os reagentes, a qual atua como força motriz para a precipitação. Essa associação desbalanceada também já foi identificada pelo grupo de pesquisa, investigando a formação de nanopartículas de quitosana e ATP (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017).

Ao longo do tempo, a observação em microscópio invertido indica que o precipitado aumenta nas duas condições de processo. Isso ocorre porque conforme o material se deposita no dispositivo, ocorre agregação de PBAE e precipitação de DNA de forma descontrolada, como num processo de nucleação, aumentando o volume do precipitado ao longo do tempo.

É interessante notar que o fenômeno de precipitação ocorre na região mais próxima ao DNA. No caso em que o DNA está na região central, é nessa mesma região que se observam os precipitados (Figura 30A) e quando o DNA está nas correntes laterais, o mesmo ocorre (Figura 30B). Este comportamento pode provavelmente ser consequência de efeitos de difusão. O plasmídeo de DNA utilizado possui 4728 pares de base. Estima-se que, para DNA dupla fita, cada base equivale a 650 Da (MANIATIS; JEFFREY; VAN de SANDE, 1975). Sendo assim, a massa molar do pDNA é de cerca de 3000 kDa. Já a massa molar do polímero PBAE 557 é de, em média, 3 kDa, como descrito no item 4.1. Dessa forma, o DNA é aproximadamente mil vezes maior que o polímero. Como a difusividade é inversamente proporcional ao tamanho, o PBAE se difunde mais rapidamente do que o DNA. Além disso, o fluxo difusivo, dado pela Primeira Lei de Fick (Equação 6), está diretamente associado ao gradiente de concentração.

$$J_{A,Z} = -D_{AB} \frac{dC_A}{dz}$$

Equação 6

J se refere ao fluxo, D_{AB} é o coeficiente de difusão e $\frac{dC_A}{dz}$ é a variação da concentração ao longo do eixo z.

Sendo a concentração do PBAE 30 vezes maior que a concentração do DNA (em função da razão mássica 30), o fluxo difusivo de PBAE é maior que o de ácido nucleico. Portanto, entende-se que a precipitação ocorre na região de escoamento do DNA devido à combinação de dois fatores, a difusividade mais rápida do polímero em função de sua baixa massa molar e o fluxo difusivo mais intenso do PBAE em função de sua maior variação de concentração.

Apesar das precipitações encontradas, as características físico-químicas das nanopartículas formadas foram analisadas por DLS. Para o processo com DNA na corrente central, obteve-se 713,3 ± 41,0 nm de diâmetro médio, 0,305 ± 0,207 de

PDI e 31,0 \pm 3,5 mV de potencial zeta. Os valores de diâmetro e PDI são apenas representativos, já que não estavam adequados aos critérios do equipamento. Já para o processo em que a corrente central era de PBAE, encontrou-se um diâmetro médio de 373,3 \pm 7,4 nm, PDI de 0,176 \pm 0,012 e potencial zeta de 13,8 \pm 15,2 mV.

Analisando os dados adquiridos, nota-se que as propriedades de tamanho e PDI do processo em que o DNA está na corrente central apresentam grandes valores de erro. O mesmo ocorre para o potencial zeta do processo com o polímero no centro. Isso era esperado, já que houve intensa precipitação e a agregação entre o PBAE e o DNA ocorreu de forma desbalanceada, gerando nanopartículas não uniformes. Apesar de alguns valores se apresentarem adequados, como o diâmetro do processo com polímero central e o potencial zeta do processo com DNA central, a distribuição de tamanhos é bastante larga, com tamanhos variando entre 100 e 1000 nm, como mostrada na Figura 31.



Figura 31 – Distribuição de características físico-químicas de nanopartículas PBAE/DNA. (A) Distribuição de potencial zeta para o processo em que a corrente central é de DNA. (B) Distribuição de tamanho por número no processo em que a corrente central é de PBAE.

Visando modificar o modo de contato das correntes de maneira a diminuir a precipitação, testou-se a inclusão de uma corrente de tampão acetato de sódio central (Figura 33), a fim de se criar uma barreira difusiva para os componentes, de modo a gerar uma associação mais gradativa e balanceada entre as moléculas. O mesmo procedimento foi empregado para evitar a formação de precipitados na síntese de nanopartículas de quitosana/ATP pelo grupo de pesquisa LANBDA (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017). No trabalho de Pessoa, Sipoli e de la Torre (2017), a introdução de uma corrente central aquosa acidificada aumentou o comprimento de difusão (w_f, Figura 32) entre as moléculas de quitosana e ATP, que criou, em conjunto com a velocidade do fluxo, um tempo espacial maior para a formação das nanopartículas. Isso evitou a formação de microestruturas que precipitavam no microcanal.





Sendo assim, para a nova configuração de processo na síntese de nanopartículas PBAE/DNA, as correntes de DNA e de polímero foram diluídas no mesmo tampão acetato de sódio (pH 5) da corrente central. Manteve-se a mesma vazão total de 30 μ l/min e FRR de 1, sendo assim, a vazão de tampão de 15 μ l/min e a vazão da corrente de polímero e de DNA de 7,5 μ l/min.



Figura 33 – Configuração de processo para síntese de nanopartículas PBAE/DNA em dispositivo microfluídico D-simples. A corrente central é constituída de tampão acetato de sódio (pH 5) e está numa vazão de 15 µl/min. As vazões de DNA e PBAE são de 7,5 µl/min.

A partir da Figura 33, nota-se que mesmo com a barreira difusiva, que faz com que o DNA e o PBAE se encontrem mais lentamente, houve precipitação. No entanto, nesta configuração de processo, a precipitação ocorreu na região central, na corrente de tampão acetato. O PBAE, possivelmente, mantém sua interação com o vidro em função de suas cargas. Assim, à medida que as moléculas de PBAE e DNA se encontram, aliado à afinidade eletrostática entre o PBAE e o vidro, complexos PBAE/DNA podem se formar, mas de forma desorganizada, com o PBAE parcialmente aderido à superfície do microcanal, induzindo a precipitação com a formação de macroagregados, aumentando com o tempo, devido ao processo de escoamento contínuo.

Apesar da formação de macroagregados, as características físicoquímicas também foram adquiridas. O diâmetro médio é de 860,3 \pm 147,1 nm, o PDI é 0,475 \pm 0,110 e o potencial zeta 0,2 \pm 0,2 mV. Todos os valores obtidos não obedeciam aos critérios do equipamento, confirmando o desbalanço eletrostático na formação das nanopartículas.

Como esperado, devido ao processo intenso de precipitação e agregação desbalanceada, as nanopartículas possuem grande tamanho, alto índice de polidispersidade e potencial zeta inadequado.

De maneira a comprovar as hipóteses e a fim de reduzir a precipitação, substituiu-se a corrente de tampão por água ultra pura (pH 7) (Figura 34), nas mesmas condições de processamento ($Q_T = 30 \mu l/min e FRR = 1$).


Figura 34 - Configuração de processo para síntese de nanopartículas PBAE/DNA em dispositivo microfluídico D-simples. A corrente central é constituída de água ultra pura (pH 7) e está numa vazão de 15 µl/min. As vazões de DNA e PBAE são de 7,5 µl/min.

Analisando o processo apresentado na Figura 34, é possível comprovar a hipótese da precipitação do DNA em função do pH 5. Ao encontrar a água, que está em pH 7, o DNA se depara com uma condição mais favorável à sua solubilidade, de maneira que na fronteira DNA/água, não se observa precipitação, pela presença de um gradiente de pH. Ao longo do canal, a mistura vai acontecendo e o pH no final do processo vai se igualando a 5, pela própria presença do tampão acetato. No entanto, conforme ocorre a mistura, o DNA solubilizado complexa-se com o PBAE de maneira lenta e ordenada.

Já o PBAE continua interagindo eletrostaticamente com o vidro. O PBAE tem sua solubilidade diminuída em pHs maiores. Desta forma, na fronteira água/PBAE, ocorre uma leve formação de precipitado (Figura 34) Como não há precipitação do DNA, que tem grande tamanho, ocorre apenas o acúmulo do polímero no vidro. Assim, a precipitação é mais leve, como pode ser observado na Figura 34. Em relação às propriedades físico-químicas, obteve-se um diâmetro médio de 666,9 ± 133,3 nm, índice de polidispersidade de 0,307 ± 0,011 e potencial zeta de 20,1 ± 0,1 mV, sendo que todos os resultados estavam de acordo com os parâmetros do equipamento.



Figura 35 - Resumo dos fenômemos e características físico-químicas das nanopartículas PBAE/DNA para cada configuração de processo. (A) Corrente central de DNA e laterais de PBAE. (B) Corrente central de PBAE e laterais de DNA. (C) Corrente central de tampão acetato de sódio e laterais de PBAE e DNA. (D) Corrente central de água e laterais de PBAE e DNA. * Resultados em que houve falha na leitura.

Comparando todas as propriedades das nanopartículas obtidas (Figura 35), a configuração de processo que obteve melhores características foi a que possui corrente central de polímero. No entanto, houve intensa formação de precipitados, o que não garante as condições impostas, como razão mássica, e

compromete a reprodutibilidade. Sendo assim, definiu-se como a melhor configuração de processo aquela cuja corrente central é constituída por água, em que há pequena formação de precipitados e as propriedades físico-químicas estão adequadas, com desvios padrão baixos.

4.3.2. Tratamento de superfície dos microcanais

Como foi visto anteriormente, na melhor configuração de processo, em que há uma corrente de água central, ainda há ocorrência da precipitação do PBAE em função da interação com o vidro. Assim, a fim de excluir esse fenômeno, a estratégia foi de realizar um tratamento de superfície para tornar o vidro hidrofóbico. Desta forma, os microcanais foram tratados com Aquapel®, um produto industrializado utilizado para o tratamento de vidros de veículos automotivos para repelir gotículas de chuva. A repulsão da água ocorre pela adsorção de um polímero no vidro que muda a característica hidrofílica da superfície. O Aquapel se liga ao vidro, tornando a superfície hidrofóbica (SABHACHANDANI *et al.*, 2016). Portanto, ao utilizá-lo no microdispositivo, espera-se que não haja mais precipitação do polímero.

O tratamento se deu pela passagem do Aquapel pelos microcanais e a passagem de ar para retirar o excesso, como descrito na literatura (KÖSTER *et al.*, 2008). Após o tratamento, utilizou-se a configuração com água na corrente central e as mesmas condições de processo, sendo a vazão total $Q_T = 30 \mu$ l/min e o FRR = 1 (Figura 36).



Figura 36 – Tratamento do microdispoditivo com Aquapel a fim de tornar a superfície do vidro hidrofóbica. A corrente central é constituída de água ultra pura (pH 7) e está numa vazão de 15 µl/min. As vazões de DNA e PBAE são de 7,5 µl/min.

Analisando a Figura 36, observa-se que o tratamento foi eficiente, visto que não há mais precipitação do PBAE. Como a superfície do vidro tornou-se hidrofóbica, não há mais interação do polímero carregado positivamente, evitando a precipitação. No entanto, nota-se uma leve precipitação do DNA. Visto que não ocorreu anteriormente, claramente nota-se a forte influência do tratamento de superfície na formação de microagregados de DNA.

Alguns fatores podem ter influenciado a formação de precipitados. Em meios ácidos, as bases do DNA são protonadas, induzindo à desnaturação. Isso faz com que o núcleo hidrofóbico da molécula seja exposto, aumentando a afinidade com a superfície hidrofóbica do vidro (ALLEMAND *et al.*, 1997). Além disso, as interações hidrofóbicas são favorecidas pela força iônica do íon Na⁺, advindo do tampão acetato de sódio. Adicionalmente, como o DNA está em pH 5, ainda está susceptível à precipitação. Ao encontrar a corrente de água como uma condição favorável a sua solubilidade, ocorre um fenômeno de aglomeração (*crowding*), em que as moléculas migram para a água ao mesmo tempo, gerando desestabilidade. Não sendo possível acomodar todas as moléculas de DNA na água, ele tende a precipitar. Sendo assim, a combinação do fenômeno de aglomeração com as interações hidrofóbicas do DNA com a superfície do vidro tratado, faz com que haja precipitação.

Acredita-se que no caso do não tratamento do vidro, apesar de também acontecer a aglomeração do DNA na corrente de água, a precipitação não ocorre, pois o vidro, de caráter aniônico, repele o DNA, também aniônico. Sendo assim, preferencialmente, o DNA se mantém em solução. Além disso, supõe-se que as interações hidrofóbicas do DNA com o PDMS são mais fracas do que com o tratamento do Aquapel. Para verificar a hipótese, sugere-se a realização de um ensaio de ângulo de contato, no qual poderia ser verificada a intensidade da interação entre o DNA e diferentes superfícies, como o vidro, o PDMS e o vidro tratado.

As propriedades das nanopartículas sintetizadas nessa configuração foram obtidas por DLS. O diâmetro médio encontrado é de $388,0 \pm 5,4$ nm, o índice de polidispersidade é $0,136 \pm 0,029$ e o potencial zeta é $33,5 \pm 0,7$ mV. Analisando

esses resultados, verifica-se que as características estão adequadas para que as nanopartículas atuem como vetores de ácidos nucleicos em células, apesar de ainda haver leve precipitação. O tamanho está dentro da faixa já encontrada no item 4.2.6 (processo *bulk*) que possibilita a transfecção de células PC3 e PNT2, o potencial zeta é positivo, o que facilita a interação da nanopartícula com a membrana celular e a polidispersidade é baixa, mostrando a uniformidade das nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas.

4.3.3. Efeito da difusão e advecção caótica na complexação

A fim de investigar mais profundamente a forma como ocorre a complexação entre o PBAE e o DNA, foram empregados três dispositivos microfluídicos com geometrias diferentes para um estudo comparativo. Um deles é o D-Simples, que possui *design* em T e já foi utilizado anteriormente no estudo de configuração de processo. O outro é o dispositivo D-Longo, também em formato de T, mas com o canal mais longo e o último é o D-barreiras, que possui cotovelos e dentes ao longo de todo o canal (Figura 17). Nos dois primeiros (D-simples e D-longo), o processo de mistura é controlado pela difusão. A diferença entre eles é o tempo de residência, maior para o D-longo. Já no D-barreiras, o processo é controlado pela advecção caótica. Isso ocorre devido aos cotovelos e dentes que alteram a direção e velocidade do fluxo, promovendo o cruzamento das linhas de corrente, o que intensifica o processo de mistura.

Para as variáveis de processo investigadas, o efeito nas nanopartículas foi avaliado ao final do processamento, em termos de diâmetro médio, polidispersidade, potencial zeta, eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2 e incorporação do DNA através de eletroforese. Todos os dispositivos foram previamente tratados com Aquapel, para tornar as superfícies internas dos microcanais hidrofóbicas. Assim, avaliou-se o efeito da concentração dos reagentes e a vazão total, visando investigar a influência dessas variáveis no fenômeno de precipitação e nas propriedades físico-químicas e biológicas das nanopartículas geradas. Para todos os testes, utilizou-se a configuração de processo com a corrente de água no centro, FRR = 1 e razão mássica PBAE/DNA de 30. Para fins de comparação, foram sintetizadas nanopartículas pelo método *bulk*, com a mesma concentração e proporção entre reagentes e água de cada experimento. Para

permitir a avaliação adequada, foi necessário realizar o processamento com trealose e, em seguida, realizar a liofilização, a fim de garantir a estabilidade das amostras, como já estudado no item 4.2.5 para a síntese em *bulk*. Sendo assim, o crioprotetor trealose foi adicionado à corrente de DNA, como empregado na literatura (WILSON *et al.*, 2017), de forma a se obter a concentração final de 4% (massa/volume) na amostra coletada, já com as nanopartículas sintetizadas. Nas amostras sintetizadas em *bulk* também foi utilizada trealose na concentração de 4%.

Primeiramente, utilizou-se a vazão total anteriormente testada de $Q_T = 30 \mu$ l/min e uma concentração final de PBAE de 562,5 μ g/ml e de DNA de 18,75 μ g/ml. A Figura 37 apresenta imagens dos processos, obtidas através da microscopia, as propriedades físico-químicas e os resultados de transfecção.





Figura 37 – Imagens dos processos e características físico-químicas e biológicas das nanopartículas PBAE/DNA obtidas em cada dispositivo e em *bulk*, em que a concentração final de PBAE é de 562,5 μ g/ml e Q_T = 30 μ l/min. (A) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-simples. (B) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-longo. (C) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-barreiras. (D) Diâmetro médio. (E) PDI. (F) Potencial Zeta. (G) Eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2.

Através das imagens de microscopia obtidas dos dispositivos durante o processo (Figura 37 A, B e C), vê-se que há a formação de precipitados, da mesma forma como identificado no item 4.3.2. O DNA precipita devido ao fenômeno de aglomeração na corrente de água, combinado com sua interação com a superfície hidrofóbica do vidro tratado, como já discutido no item 4.3.2. No entanto, nota-se que a precipitação é mais intensa que anteriormente. Tal fato está associado à concentração do DNA, que nesse caso é o dobro da concentração empregada previamente. Além disso, o PBAE que não estava precipitando, volta a apresentar leve precipitação durante todo o canal, desde a entrada da corrente. O fenômeno pode ter ocorrido porque a concentração empregada nesse ensaio é duas vezes a concentração utilizada anteriormente nos estudos de configuração de processo. Dessa maneira acredita-se que o PBAE, devido à alta concentração, apresente interações com o PDMS, em função do caráter hidrofóbico de ambos os polímeros. Como esperado, o mesmo comportamento é verificado nos três dispositivos, já que

as dimensões desses até a focalização são as mesmas, bem como a constituição das correntes e do dispositivo em si.

Em função da ocorrência da precipitação, a complexação entre PBAE e DNA acontece de maneira desbalanceada. Isso gera nanopartículas não uniformes, com altos PDIs, como no D-simples e no D-longo, justificando a grande diferença encontrada nos ensaios de transfecção. Além disso, não é possível encontrar uma tendência de comportamento das propriedades físico-químicas em relação à forma de mistura, talvez pelo elevado valor de concentração dos reagentes. O baixo potencial zeta pode estar associado à precipitação do PBAE e as baixas eficiências de transfecção para os três dispositivos provavelmente também foram prejudicadas pela formação de precipitados tanto do PBAE, quanto do DNA. Já as nanopartículas sintetizadas em *bulk* apresentaram altas eficiências de transfecção, como já demonstrado pelo grupo de pesquisa Nano-Cell (Anexo I).

Com o intuito de minimizar a precipitação e gerar nanopartículas com propriedades uniformes e que possam ser utilizadas de maneira eficiente na transfecção, reduziu-se a concentração de PBAE e de DNA pela metade, comparativamente ao avaliado anteriormente. Assim, a concentração de PBAE final utilizada foi de 281,25 μ g/ml. Os outros parâmetros foram mantidos os mesmos: vazão total Q_T de 30 μ l/min, FRR de 1, razão mássica de 30 e concentração final de trealose de 4% (massa/volume). A Figura 38 apresenta os resultados obtidos.





Figura 38 - Imagens dos processos e características físico-químicas e biológicas das nanopartículas PBAE/DNA obtidas em cada dispositivo e em *bulk*, em que a concentração final de PBAE é de 281,25 μ g/ml e Q_T = 30 μ l/min. (A) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-simples. (B) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-longo. (C) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-barreiras. (D) Diâmetro médio. (E) PDI. (F) Potencial Zeta. (G) Eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2.

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que não há mais precipitação do PBAE. Tal fato era esperado, já que neste caso foi utilizada a mesma concentração do processo de estudo de tratamento de superfície.

Embora a precipitação do DNA já fosse prevista, ela mostra-se mais intensa neste ensaio do que no item 4.3.2, mesmo as concentrações sendo iguais. A introdução da trealose pode ter auxiliado no aumento da precipitação. A trealose pode causar a desnaturação do DNA, através da exposição de suas bases, que ocorre em função da maior afinidade do DNA pela trealose do que pela água (BEZRUKAVNIKOV *et al.*, 2014). Além disso, como a trealose é um carboidrato solúvel em água, pode afetar a solubilidade do DNA e sua susceptibilidade à precipitação pode ocorrer. Dessa forma, a trealose, associada aos outros fenômenos já discutidos anteriormente (aglomeração e interações hidrofóbicas com o Aquapel), podem ter induzido a precipitação do DNA.

Apesar da precipitação, as nanopartículas formadas apresentaram diâmetros médios entre 250 e 400 nm, que está dentro da faixa aceitável e encontrada nos processos *bulk*, não possuindo, a princípio, impacto negativo na transfecção. No entanto, analisando as distribuições de tamanho, verifica-se que estas são largas, com nanopartículas variando de 30 a 1000 nm (Figura 39). A não uniformidade das nanopartículas pode ainda ser consequência da precipitação encontrada nos microcanais e que leva a uma agregação desbalanceada.





Figura 39 – Distribuições de tamanho por número das nanopartículas sintetizadas em dispositivos microfluídicos. (A) D-simples. (B) D-longo. (C) D-barreiras.

Um resultado interessante é que tanto para as células PNT2 quanto para PC3, não houve diferença estatística entre as eficiências de transfecção pelas nanopartículas do D-simples e do D-barreiras, o que pode ser um indicativo de que o método de mistura, apesar de gerar partículas com características físico-químicas estatisticamente diferentes, não se observa diferença nas biológicas, como observado para o método *bulk*. No caso do D-longo, vê-se que as características físico-químicas assim, infere-se que a baixa eficiência de transfecção provavelmente foi causada devido a erros experimentais. A hipótese pode ser verificada repetindo-se o mesmo experimento e completando a análise com triplicatas independentes.

Já o método *bulk* resultou em eficiências de transfecção estatisticamente mais altas do que as nanopartículas dos dispositivos microfluídicos. Nesse caso, é possível que a presença de precipitação tenha tido impacto negativo, de modo que resulte em menos DNA nas partículas, diminuindo a transfecção.

Assim, como nova tentativa para minimizar a precipitação, outro ensaio foi então realizado diminuindo a concentração final dos reagentes. A concentração de PBAE foi de 140,625 µg/ml, a de DNA de 4,7 µg/ml, o FRR foi mantido em 1, a razão mássica continuou 30, a concentração final de trealose utilizada foi de 4% e a vazão total empregada foi de 90µl/min (aumentou-se a vazão total do escoamento). A Figura 40 contém os resultados encontrados.



Figura 40 - Imagens dos processos e características físico-químicas e biológicas das nanopartículas PBAE/DNA obtidas em cada dispositivo e em *bulk*, em que a concentração final de PBAE é de 140,625 μ g/ml e Q_T = 90 μ l/min. (A) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-simples.

(B) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-longo. (C) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-barreiras. (D) Diâmetro médio. (E) PDI. (F) Potencial Zeta. (G) Eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2.

Analisando a Figura 40, observa-se que a redução da concentração de DNA levou à diminuição da precipitação, como já era esperado. Diminuindo a concentração, reduz-se a quantidade de moléculas de DNA que se aglomeram ao mesmo tempo na água, facilitando a sua dispersão na corrente central aquosa, diante do processo de focalização hidrodinâmica.

Com a redução da precipitação, os desvios padrão associados a todas as características físico-químicas e à eficiência de transfecção apresentaram valores menores. Isso demonstra maior uniformidade entre as amostras processadas no ambiente microfluídico.

O diâmetro médio apresentou-se dentro da faixa adequada para a transfecção de células PC3 e PNT2. Não houve diferença estatística entre os valores do D-simples e D-barreiras, apenas para o D-longo. No entanto, a diferença é muito pequena e pode ser desconsiderada.

Em relação à eficiência de transfecção, tanto para as células PNT2 quanto para a PC3, houve uma pequena diferença estatística entre o D-simples e o *bulk*. Acredita-se que essa diferença seria eliminada a partir da execução de triplicatas. Novamente, isso indica que o modo de complexação entre o PBAE e o DNA não influencia nas características biológicas das nanopartículas.

Foi realizado, então, um último ensaio variando-se a concentração dos reagentes. A concentração de PBAE final empregada foi de 70,3 µg/ml, a de DNA era de 2,34 µg/ml, manteve-se o FRR de 1, a razão mássica de 30, a concentração de trealose final de 4% e a vazão total utilizada foi de 120 µl/min (aumentou-se a vazão total do escoamento). A Figura 41 apresenta os resultados obtidos. Imagens de microscopia das células transfectadas estão no Anexo II.



Figura 41 - Imagens dos processos e características físico-químicas e biológicas das nanopartículas PBAE/DNA obtidas em cada dispositivo e em *bulk*, em que a concentração final de PBAE é de 70,3 μ g/ml e Q_T = 120 μ l/min. (A) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-simples. (B) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-longo. (C) Imagem de microscopia da focalização do dispositivo D-barreiras. (D) Diâmetro médio. (E) PDI. (F) Potencial Zeta. (G) Eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2.

A partir da Figura 41, nota-se que, diminuindo ainda mais a concentração dos reagentes, minimiza-se a precipitação. Como já apresentado anteriormente, isso ocorre devido à minimização do fenômeno de aglomeração do DNA na água, visto que em concentrações menores, há menos moléculas do ácido nucleico competindo pela água, o que, consequentemente, favorece a solubilidade e, portanto, reduz a interação com a superfície hidrofóbica do vidro, levando à menor formação de precipitados.

Os diâmetros médios obtidos estão dentro da faixa adequada para transfecção para os três dispositivos e para o *bulk*. No entanto, nota-se uma eficiência de transfecção consideravelmente inferior para as nanopartículas sintetizadas no D-barreiras. O resultado não era esperado, visto que os três dispositivos vinham apresentando resultados similares. Analisando, então, a distribuição de tamanho das nanopartículas produzidas no D-barreiras (Figura 42), verifica-se que as amostras não são uniformes, havendo grande variação de tamanho, chegando a mais de 700 nm. Isso pode ter influenciado na eficiência de transfecção, que apresentou resultado não consistente com os demais em função da não uniformidade da amostra. Apesar de alguns estudos mostrarem a não interferência de uma extensa faixa de diâmetros das nanopartículas na transfecção (GRATTON *et al.*, 2008), o efeito do tamanho depende do tipo de célula (PRABHA *et al.*, 2014). Sendo assim, em uma amostra polidispersa, pode haver partículas de tamanhos não adequados à transfecção das células PC3 e PNT2.

A não uniformidade das nanopartículas pode ter sido gerada em função da advecção caótica, em que a sobreposição das linhas de corrente pode levar a uma complexação eletrostática mais desorganizada. O resultado está de acordo com os estudos em *bulk*, nos quais foi identificado que a simples pipetagem gera nanopartículas mais uniformes do que as produzidas por vórtex (item 4.2.1).

Size Distribution by Number



Figura 42 – Distribuição de tamanho em número das nanopartículas PBAE/DNA obtidas através do dispositivo D-barreiras.

Com o intuito de avaliar qual a melhor forma de mistura para a síntese de nanopartículas PBAE/DNA e realizar novos ensaios alterando variáveis de processo, todos os dispositivos foram comparados, em todas as condições impostas. Para facilitar a visualização, a Figura 43 apresenta todos os resultados compilados.







Ε

Figura 43 – Compilação de todos os resultados de características físico-químicas e biológicas das nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em cada dispositivo e em *bulk*. (A) Diâmetro médio. (B) Potencial zeta. (C) Índice de polidispersidade. (D) Eficiência de transfecção em células PNT2. (E) Eficiência de transfecção em células PC3.

Analisando os resultados obtidos, nota-se que o tamanho das nanopartículas não segue uma tendência em função da concentração dos reagentes. Como a vazão foi alterada para as duas condições de menor concentração, não se pode fazer uma relação direta com a concentração. Além disso, nos três casos de concentrações mais elevadas, ocorre a formação de precipitados. A precipitação é um processo aleatório, podendo influenciar no processo de forma a gerar nanopartículas de diversos tamanhos. Assim, não é possível avaliar os efeitos do tipo de mistura no diâmetro, visto que a formação das nanopartículas ocorre de maneira desbalanceada.

Como já explicitado anteriormente, na condição de maior concentração dos reagentes, houve intensa precipitação, tanto do PBAE quanto do DNA. Como houve precipitação do polímero, de carga positiva, possivelmente isso contribuiu para os menores valores de potencial zeta das nanopartículas dos três dispositivos, o que não foi observado no *bulk*. À medida que a concentração diminui, o Potencial zeta volta a ter valores altos para os dispositivos, que se assemelham aos valores do bulk. Para as duas condições de concentrações menores (concentração do PBAE de 70 e 140 µg/ml), o potencial zeta é menor do que quando a concentração do PBAE é 281µg/ml. Isso pode ter ocorrido em função do aumento do tamanho. Aumentando-se o diâmetro, a carga exposta resultante é menor, diminuindo o potencial zeta.

Em relação ao índice de polidispersidade, para a maior concentração, foram obtidos PDIs com altos valores de erro, o mesmo que ocorreu com o diâmetro. O resultado pode ser sido influenciado pela associação desbalanceada entre os reagentes nessa condição, levando a amostras não uniformes.

Finalmente, avaliando as eficiências de transfecção, é possível observar no ensaio de maior concentração, a transfecção foi prejudicada em função do fenômeno da precipitação nos canais, o que não acontece no método *bulk*. Se os reagentes precipitam, a agregação pode ser desestabilizada, induzindo à formação de nanopartículas aleatórias, de tamanhos e cargas superficiais diferentes. Além disso, elas podem conter diferentes quantidades de DNA, o que pode afetar a eficiência de transfecção (SIPOLI *et al.*, 2015b) Já para concentrações mais baixas, a eficiência de transfecção é similar entre os métodos. No entanto, para casos onde ainda ocorre precipitação, como o processo se dá de maneira aleatória, não se pode estabelecer uma correlação entre o método de síntese e a eficiência de transfecção.

É interessante notar que a eficiência de transfecção de nanopartículas sintetizadas em *bulk* não se manteve constante de um ensaio para o outro. O que pode ocorrer é que a agregação acontece de forma distinta em função da concentração dos reagentes, de forma que as nanopartículas contenham diferentes quantidades de ácidos nucleicos, o que pode interferir diretamente na transfecção. Além disso, outros ensaios já haviam demonstrado que a síntese através desse método ocorre de forma aleatória, o que não garante a reprodutibilidade.

A fim de se determinar um dispositivo para realizar futuros ensaios, selecionou-se a condição de menor concentração (concentração final de PBAE de 70,3 μg/ml) para fazer uma análise mais criteriosa da mistura em cada dispositivo e da associação do PBAE com o DNA. Tal condição foi selecionada por apresentar características físico-químicas e biológicas apropriadas e por ser a condição onde ocorre mínima precipitação.

Para verificar a associação do DNA com o polímero, amostras de nanopartículas de cada processo foram submetidas a um ensaio de retardo de mobilidade eletroforética em gel de agarose. Como controle, foi utilizado o mesmo plasmídeo pGFP-N1 livre. A partir da Figura 44, verifica-se que em todos os casos o DNA se encontra associado eletrostaticamente ao polímero, não havendo liberação do ácido nucleico.



Figura 44 – Ensaio eletroforético de nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em métodos diferentes na concentração final de PBAE de 70,3 µg/ml.

Também foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de transmissão a fim de verificar a morfologia das nanopartículas. Como o ensaio foi realizado apenas uma vez, ainda é necessário ajustar a concentração e o *grid* utilizado. As imagens estão apresentadas apenas no Anexo III em função de sua baixa qualidade, não tendo sido utilizadas para análises.

Para avaliar a eficiência da mistura em cada dispositivo, foram realizados ensaios de fluorescência e depois calculou-se o índice de mistura (M) para cada caso. Foi utilizada uma concentração de sulforodamina de 0,01M na corrente central de água e as correntes laterais eram constituídas de tampão acetato, sendo que em uma delas foi adicionado PBAE. Outros estudos similares não utilizaram o polímero em nenhuma corrente (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017). No entanto, como a viscosidade do PBAE pode influenciar na mistura, optou-se por utilizá-lo e ter uma simulação do sistema mais condizente com a realidade. Foi utilizada a mesma concentração final de PBAE (70,3 μ g/ml), a mesma vazão total Q_T = 120 μ l/min e FRR=1.

O índice de mistura foi calculado na saída dos três dispositivos, a fim de verificar se os reagentes foram expostos a uma mistura completa até saírem do microdispositivo. A Figura 45 apresenta as imagens de fluorescência e o M para cada dispositivo.



Figura 45 – Imagens de microscopia do ensaio de fluorescência no final do canal de cada dispositivo e seus respectivos índices de mistura (M).

A partir da Figura 45, vê-se que o índice de mistura é menor para o Dsimples e similar para o D-longo e para o D-barreiras. O D-longo possui o comprimento do canal maior em relação ao D-simples, o que eleva o tempo de residência e, consequentemente, favorece uma mistura melhor. Já o D-barreiras possui dentes que criam regiões similares ao processo submetido a vórtex, que intensificam a mistura. Como já discutido anteriormente, a alteração das linhas de corrente (que antes eram contínuas) na advecção caótica, causa uma distribuição não balanceada das cargas localmente, afetando a associação entre polímero e ácido nucleico, comportamento similar à síntese de nanopartículas de quitosana/ATP (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017). Assim, apesar do melhor índice de mistura, para as nanopartículas PBAE/DNA, esse efeito é prejudicial, levando a nanopartículas não uniformes, com baixa eficiência de transfecção (Figura 41 e Figura 42).

Já para o D-longo, como não há o efeito da advecção caótica, tem-se que a diferença entre ele e o D-simples é o tempo de residência. Em ambos os dispositivos a associação eletrostática entre PBAE e DNA é controlada pela difusão, o que faz com que a mistura ocorra de forma lenta e ordenada. O maior tempo de contato entre os reagentes favorece uma mistura melhor, o que é comprovado pelo índice de mistura calculado. Porém, nota-se que, tanto as propriedades físico-químicas quanto a eficiência de transfecção são aproximadas para o D-simples e D-longo, havendo pequena diferença, que pode ser decorrência da variabilidade de processo. Para o *bulk*, os resultados das propriedades também são similares aos dispositivos D-simples e D-longo. No entanto, os desvios padrão das variáveis de tamanho, potencial zeta e transfecção são maiores para a síntese em *bulk*. Isso sugere que a síntese mais aleatória no sistema *bulk* leva a amostras menos uniformes.

Avaliando-se todos os resultados obtidos, constatou-se que no D-simples a mistura não é completa (34%), o que sugere que ela se complete no frasco após a coleta da amostra, como em um processo *bulk*. No entanto, o menor desvio padrão das propriedades físico-químicas e biológicas sugere a síntese de amostras mais uniformes. Isso indica que a condução inicial da mistura por difusão no processamento microfluídico organiza de maneira mais adequada as nanopartículas, o que pode favorecer a obtenção de melhores características e de eficiências de transfecção, não sendo necessário que a mistura se complete no microcanal. De qualquer forma, a comprovação desta hipótese deve ser realizada a partir de várias outras repetições.

Sendo assim, em função dos resultados obtidos e da maior facilidade de operação em relação ao D-longo, o dispositivo D-simples foi selecionado para avaliar outras variáveis do processo microfluídico.

4.3.4. Influência das variáveis operacionais na síntese de nanopartículas PBAE/DNA

4.3.4.1. Vazão

Visando entender a influência da velocidade de escoamento na mistura e na síntese das nanopartículas de PBAE/DNA, foram realizados dois ensaios adicionais variando-se a vazão total Q_T e mantendo-se todos os demais parâmetros constantes. Foi utilizado o dispositivo D-simples, com razão mássica de 30, FRR = 1, concentração final de trealose 4%, concentração final de PBAE de 70,3 µg/ml e as vazões empregadas foram de 60 e 90 μ l/min em cada experimento. Os resultados foram comparados com os dados anteriores do processo em que Q_T = 120 μ l/min (Figura 46). O índice de mistura também foi obtido no final do canal para cada caso e está apresentado na Tabela 3.



Figura 46 – Características físico-químicas e biológicas de nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em dispositivo microfluídico D-simples, variando-se a vazão total Q_T. (A) Diâmetro médio. (B) Potencial zeta. (C) PDI. (D) Eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2.

|--|

Q_T (µl/min)	М
60	0,42
90	0,38
120	0,34

A partir dos resultados obtidos, verifica-se que o índice de mistura diminui à medida que a vazão total aumenta. Quanto maior a vazão, menor o tempo de residência dos reagentes no microdispositivo, o que leva a uma mistura menos eficiente, e, portanto, menor índice de mistura. Para velocidades mais altas, a contribuição convectiva na mistura aumenta, de forma a prejudicar a difusão, o que se reflete no índice de mistura mais baixo (ISMAGILOV *et al.*, 2000). Analisando a Figura 46, observam-se menores valores de PDI e desvios padrão das propriedades físico-químicas para as condições de vazão mais altas (90 e 120 µl/min). Quando se tem velocidades de escoamento mais elevadas, o índice de mistura é menor, o que sugere que a mistura por difusão ocorra mais lentamente. Com base nos resultados, isso indica que, no caso de nanopartículas PBAE/DNA, essa mistura mais lenta favorece a síntese de nanopartículas mais uniformes.

Em função da maior uniformidade das nanopartículas em vazões mais altas, a eficiência de transfecção também é favorecida, apresentando maiores valores para as condições de vazão de 90 e 120 µl/min do que para 60 µl/min. No caso da eficiência de transfecção das células PC3 para a vazão 120µl/min, nota-se um decréscimo não condizente com o esperado. Isso pode ter ocorrido em função de algum erro experimental, que deverá ser revisado posteriormente.

4.3.4.2. Relação entre as correntes de fluxo - FRR

Outra variável importante a ser avaliada é a proporção entre as correntes, dada pelo FRR. O FRR relaciona as vazões laterais com a vazão central. Assim, maior FRR indica que a vazão da corrente central aquosa é menor e a barreira difusiva também, de forma que a mistura das correntes laterais contendo PBAE e DNA ocorrerá mais rapidamente.

Foram realizados quatro ensaios adicionais a fim de investigar os efeitos do FRR na mistura e na síntese de nanopartículas PBAE/DNA. Para todos os estudos, utilizou-se a concentração final de PBAE de 70,3 µg/ml, razão mássica de 30, vazão total de 120 µl/min e concentração final de trealose de 4%. O FRR foi variado entre 0,5, 2 e 5. Os resultados foram comparados com os dados anteriores do processo em que FRR=1 (Figura 47). O índice de mistura também foi obtido no final do canal para cada caso e está apresentado na Tabela 4.



Figura 47 - Características físico-químicas e biológicas de nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em dispositivo microfluídico D-simples, variando-se o FRR. (A) Diâmetro médio. (B) Potencial zeta. (C) PDI. (D) Eficiência de transfecção em células PC3 e PNT2.

Tabela 4– Índice de mistura para cada FRR do processo

Q⊤ (μl/min)	М
0,5	0,33
1	0,34
2	0,55
5	0,58

Analisando os índices de mistura obtidos, observa-se que aumentam à medida que o FRR também aumenta. Isso ocorre, pois quando o FRR é mais elevado, a somatória das vazões das correntes laterais é maior em relação à corrente central. Tal fato faz com que a barreira difusiva (corrente central aquosa) seja mais intensamente focalizada pelas correntes laterais, diminuindo sua extensão e aumentando a probabilidade de contato direto entre os reagentes. Assim, como o caminho difusivo percorrido pelas moléculas é menor, a difusão ocorre de forma mais rápida, melhorando a eficiência da mistura.

Em relação às propriedades das nanopartículas, vê-se que a eficiência de transfecção decresce com o aumento do FRR, exceto para FRR=5. Como já

discutido anteriormente no item 4.3.4.1, para as nanopartículas de PBAE/DNA, uma mistura mais lenta favorece a obtenção de melhores propriedades, o que está de acordo com os resultados obtidos.

No caso do FRR=5, nota-se a formação de precipitados (Figura 48), que não acontece nos demais ensaios. Isso ocorre porque nessa condição a barreira difusiva tem pequeno impacto, de forma que o contato entre PBAE e DNA aconteça mais rapidamente. Teoricamente, aumentando-se o FRR indefinidamente, a configuração de processo sem a corrente central aquosa seria atingida, similar ao processo investigado no item 4.3.1, em que ocorre intensa precipitação.



Figura 48 – Imagem de microscopia do final do canal do dispositivo D-simples no processo de síntese de nanopartículas PBAE/DNA em que FRR=5.

Sendo assim, o contato mais direto entre os reagentes prejudica a formação de nanopartículas uniformes e favorece a formação de precipitados. Como esse é um processo aleatório, pode ter influenciado no resultado da eficiência de transfecção, em função da variabilidade das características físico-químicas e da concentração de DNA nas nanopartículas. É possível que haja nanopartículas de diâmetros não apropriados para a transfecção de células PC3 e PNT2. É possível que sejam internalizadas, mas dependendo das características, a célula se utiliza de vias diferentes para isso, o que leva as nanopartículas a diferentes compartimentos intracelulares, nos quais pode ocorrer a degradação do DNA, de forma a não se completar o processo de transfecção (NEUHAUS *et al.*, 2016).

5. CONCLUSÃO

Esta dissertação teve como objetivo realizar um estudo sistemático da síntese de nanopartículas PBAE/DNA e os efeitos das variáveis de processo nas características físico-químicas e biológicas. Para isso, foi necessário, primeiramente, estabelecer um método de síntese *bulk*, não padronizado na literatura. A partir disso, foi possível utilizar a microfluídica como uma ferramenta de observação, a partir da qual se investigaram diversas condições de processamento, tipos de mistura e variáveis de processo.

De modo geral, concluiu-se que a síntese de nanopartículas de PBAE 557 e DNA deve ocorrer de maneira lenta, através da difusão, sendo necessária uma barreira difusiva no processo microfluídico. Devido a isso, vazões mais baixas, FRR mais altos e a advecção caótica, que levam a misturas mais rápidas, têm impacto negativo nas propriedades físico-químicas e biológicas das nanopartículas.

Através do conhecimento adquirido nesse trabalho, foi possível entender como ocorre a complexação eletrostática entre o PBAE e o DNA, o que não foi investigado na literatura. Assim, sabendo-se os efeitos das variáveis de processo, é possível alterá-las de maneira consistente a fim de otimizar os vetores de ácidos nucleicos. Aliado a isso, é necessário o estudo mais aprofundado do comportamento celular frente às diferentes características das nanopartículas.

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

• O estudo em *bulk* da forma de mistura (pipetagem ou vórtex) forneceu um indicativo de que uma mistura mais vigorosa afeta negativamente as características das nanopartículas, comportamento similar à síntese através de advecção caótica;

• Na síntese em *bulk*, não há influência da ordem de adição dos reagentes, podendo-se adicionar polímero no DNA ou DNA no polímero;

• A razão mássica entre PBAE e DNA exerce papel fundamental nas características físico-químicas das nanopartículas, sendo mais adequadas na faixa de 15 a 45.

 A faixa de diâmetros entre 350 e 550 nm não teve influência na transfecção, considerando amostras uniformes;

 A variação do tempo de complexação na faixa de 0 a 40 minutos não influencia a eficiência de transfecção, o que indica uma rota robusta de síntese das nanopartículas do PBAE 557 com DNA, o que potencializa sua aplicação; A liofilização das nanopartículas com o crioprotetor trealose não tem impacto negativo na eficiência de transfecção, o que confere maior viabilidade de aplicação das nanopartículas, considerando que podem ser estocadas;

 Há grande influência da condição operacional no fenômeno da precipitação. Além da configuração de processo adequada (corrente de água central), é necessário realizar o tratamento de superfície, tornando o vidro hidrofóbico. Adicionalmente, deve-se operar em baixas concentrações, evitando a precipitação do DNA em função do efeito de aglomeração na água e interação com a superfície hidrofóbica;

• O modo de contato entre os reagentes influencia as propriedades finais das nanopartículas, sendo prejudicial um contato mais direto;

 Condições de processo que levam a uma associação desbalanceada entre DNA e polímero acarretam amostras menos uniformes, impactando na eficiência de transfecção;

 Vazões mais baixas e FRR mais elevado levam a uma mistura mais rápida, que influencia negativamente nas propriedades das nanopartículas;

 A organização inicial das moléculas pela focalização hidrodinâmica favorece a obtenção de nanopartículas mais uniformes, mesmo que a mistura se complete em *bulk*.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando ao melhor entendimento da síntese de nanopartículas PBAE/DNA e a influência de suas propriedades na aplicação biológica, sugere-se para trabalhos futuros:

- Realizar ensaios microfluídicos de síntese variando-se apenas a concentração, mantendo todos os demais parâmetros constantes;
- Realizar triplicatas de todos os experimentos a fim de se eliminar os resultados obtidos em função de variabilidades de processo e se ter uma avaliação mais embasada;
- Quantificar o DNA nas nanopartículas sintetizadas por tecnologia microfluídica em cada condição de processo, para verificar se as variáveis interferem nessa concentração, que pode influenciar na eficiência de transfecção;
- Submeter as nanopartículas a ensaios de acessibilidade do DNA, considerando que o método de complexação pode interferir na interação entre DNA e polímero, de forma que sua acessibilidade seja afetada e, consequentemente, a transfecção;
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas através de ensaios de MTT;
- Investigar como as propriedades físico-químicas influenciam no tráfego intracelular;
- Combinar alterações em variáveis de processo de forma a entender qual exerce maior influência sobre a síntese de nanopartículas PBAE/DNA;
- Repetir a microscopia eletrônica de transmissão, ajustando a concentração de nanopartículas e selecionando o melhor *grid*, a partir das quais será possível verificar a morfologia e sua influência na transfecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S. *et al.* Versatility of Chitosan: A Short Review. Journal of Pharma **Research**, v. 4, n. 3, p. 125–134, 2015.
- AKINC, A.; LANGER, R. Measuring the pH environment of DNA delivered using nonviral vectors: Implications for lysosomal trafficking. Biotechnology
 And Bioengineering, v. 78, n. 5, p.503-508, 2002.
- AKINC, A. *et al.* Synthesis of Poly(β-amino ester)s Optimized for Highly Effective Gene Delivery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 14, n. 5, p.979-988, 2003.
- ALLEMAND, J. F. *et al.* pH-dependent specific binding and combing of DNA. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 4, p.2064-2070, 1997.
- AN, T. *et al.* Hyaluronic acid-coated poly(β-amino) ester nanoparticles as carrier of doxorubicin for overcoming drug resistance in breast cancer cells. **RSC** ADV., v. 6, p. 38624-38636, 2016.
- ANDERSON, D. G. *et al.* A polymer library approach to suicide gene therapy for cancer. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 101, n. 45, p.16028-16033, 2004.
- ANDERSON, D. G. *et al.* Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(β-amino esters). **Molecular Therapy**, v. 11, n. 3, p.426-434, 2005.
- ARYA, S. *et al.* Microfluidic Mechanics and Applications: a Review. Journal of Nano- And Electronic Physics, v. 5, p.2077-772, 2013.
- BAEK, J. *et al.* Investigation of Indium Phosphide Nanocrystal Synthesis Using a High-Temperature and High-Pressure Continuous Flow Microreactor.
 Angewandte Chemie-International Edition, v. 50, n. 3, p. 627-630, 2011.
- BALAZS, D. A.; GODBEY, W. T. Liposomes for Use in Gene Delivery. Journal Of Drug Delivery, v. 2011, p.1-12, 2011.
- BALBINO, T. A. *et al.* Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy.
 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 111, p. 203-210, 2013.
- BALBINO, T. A. *et al.* Microfluidic Assembly of pDNA/Cationic Liposome Lipoplexes with High pDNA Loading for Gene Delivery. **Langmuir**, v. 32,

n. 7, p.1799-1807, 2016.

- BEAL, J. H. L. *et al.* A rapid, inexpensive surface treatment for enhanced functionality of polydimethylsiloxane microfluidic channels.
 Biomicrofluidics, v. 6, n. 3, p.036503-036503-11, 2012.
- BEEBE, D. J. *et al.* Physics and application of microfluidics in biology. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** 4, 261–286, 2002.
- BEZRUKAVNIKOV, S. *et al.* Trehalose facilitates DNA melting: a single-molecule optical tweezers study. **Soft Matter**, v. 10, n. 37, p.7269-7277, 2014.
- BISHOP, C. J. *et al.* The Effect and Role of Carbon Atoms in Poly(β-amino ester)s for DNA Binding and Gene Delivery. Journal Of The American Chemical Society, v. 135, n. 18, p.6951-6957, 2013.
- BHISE, N. S. *et al.* The relationship between terminal functionalization and molecular weight of a gene delivery polymer and transfection efficacy in mammary epithelial 2-D cultures and 3-D organotypic cultures. **Biomaterials**, v. 31, n. 31, p.8088-8096, 2010.
- CAI, L. *et al.* Droplet-Based Microfluidic Flow Injection System with Large-Scale Concentration Gradient by a Single Nanoliter-Scale Injection for Enzyme Inhibition Assay. **Analytical Chemistry,** v. 84, n. 1, p.446-452, 2012.
- CARRILLO, C. *et al.* Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems:
 Determination of loading efficiency. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.
 68, n. 6, p.775-783, 2014.
- CHEE, G. K. *et al.* Delivery of polyethylenimine/DNA complexes assembled in a microfluidics device. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 5, p. 1333–1342, 2009.
- CHEN, Y. *et al.* Inhibition of breast cancer metastasis by paclitaxel-loaded pH responsive poly(β-amino ester) copolymer micelles. **Nanomedicine**, v. 12, n. 2, p.147-164, 2017.
- CHEN, Y. *et al.* Fabrication, modification, and application of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips. **Electrophoresis,** v. 29, n. 9, p.1801-1814, 2008.
- CHUNG, B. G. *et al.* Human neural stem cell growth and differentiation in a gradient-generating microfluidic device. **Lab On A Chip,** v. 5, n. 4, p.401-406, 2005.

- CUI, X. *et al.* Cationic Poly-L-Lysine–Fe2O3/SiO2 Nanoparticles Loaded with Small Interference RNA: Application to Silencing Gene Expression in Primary Rat Neurons. Journal Of Nanoscience And Nanotechnology, v. 14, n. 4, p.2810-2815, 2014.
- DANI, S. U. The challenge of vector development in gene therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 133–145, 1999.
- DASH, M. *et al.* Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.
- DEBUS, H.; BECK-BROICHSITTER, M.; KISSEL, T. Optimized preparation of pDNA/poly(ethylene imine) polyplexes using a microfluidic system. Lab on a Chip, v. 12, n. 14, p. 2498, 2012.
- DE JESUS, M. B. *et al.* Inclusion of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine in solid lipid nanoparticles inhibits their transfection efficiency. **J Biomed Nanotechnol.**, p.355-365, 2014.
- DE LA TORRE, L. G. *et al.* The synergy between structural stability and DNAbinding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE liposomes and DOTAP/DOPE lipoplexes, **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, 175-184, 2009.
- DE LA TORRE, L. G. *et al.* Nanomedicina e os desafios da Engenharia Química. **Revista Brasileira de Engenharia Química,** v. 32, n. 3, p.16-23, 2017.
- DOKKA, S. *et al.* High-efficiency gene transfection of macrophages by lipoplexes. **International Journal Of Pharmaceutics,** v. 206, n. 1-2, p.97-104, 2000.
- DRAGHICIU, L. *et al.* Manipulation of nanoparticles within a microfluidic system based on SU-8 polymer for bio-applications. **Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials,** v. 169, n. 1-3, p. 186-192, 2010.
- EL-ALI, J. et al. Cells on chips. Nature, v. 442, p. 403–411, 2006.
- EL-ANEED, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **Journal Of Controlled Release,** v. 94, n. 1, p.1-14, 2004.
- ELTOUKHY, A. A. *et al.* Effect of molecular weight of amine end-modified poly(βamino ester)s on gene delivery efficiency and toxicity. **Biomaterials**, v. 33, n. 13, p.3594-3603, 2012.

- ELTOUKHY, A. A. *et al.* Degradable Terpolymers with Alkyl Side Chains Demonstrate Enhanced Gene Delivery Potency and Nanoparticle Stability. **Advanced Materials**, v. 25, n. 10, p.1487-1493, 2013.
- FIELDS, R. J. *et al.* Surface modified poly(β amino ester)-containing nanoparticles for plasmid DNA delivery. Journal of Controlled Release, v. 164, p. 41–48, 2012.
- FONTE, P.; REIS, S.; SARMENTO, B. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. Journal Of Controlled Release, v. 225, p.75-86, 2016.
- GARG, S. *et al.* Microfluidics: a transformational tool for nanomedicine development and production. **Journal of Drug Targeting**. v. 24, p. 821-835, 2016.
- GHARWAN, H *et al.* Nonviral gene transfer into fetal mouse livers (a comparison between the cationic polymer PEI and naked DNA). **Gene Therapy**, v. 10, n. 9, p.810-817, 2003.
- GRATTON, S. E. A. *et al.* The effect of particle design on cellular internalization pathways. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 33, p.11613-11618, 2008.
- GREEN, J. J. *et al.* A Combinatorial Polymer Library Approach Yields Insight into Nonviral Gene Delivery. **Accounts of Chemical Research**, v. 4, p. 749– 759, 2008.
- GREEN, J. J. *et al.* Poly(β-amino esters): Procedures for Synthesis and Gene Delivery. **Methods in molecular biology**, v. 480, p. 53-63, 2009.
- HALLDORSSON, S. *et al.* Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 63, p. 218-231, 2015.
- HAN, T. *et al.* Factory-on-chip: Modularised microfluidic reactors for continuous mass production of functional materials. Chemical Engineering Journal, v. 326, p.765-773, 2017.
- HANSEN, C.; QUAKE, S. R. Microfluidics in structural biology: smaller, faster...better. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 13, p. 538–544, 2003.
- HESSEL, V. *et al.* Micromixers—a review on passive and active mixing principles. **Chemical Engineering Science,** v. 60, n. 8-9, p.2479-2501,

2005.

- HEURTAULT, B. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p.4283-4300, 2003.
- ISMAGILOV, R. F. *et al.* Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels. **Applied Physics Letters,** v. 76, n. 17, p.2376-2378, 2000.
- JAHN, A. *et al.* Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 126, n. 9, p.2674-2675, 2004.
- JEONG, J. H. *et al.* Molecular design of functional polymers for gene therapy. **Progress In Polymer Science,** v. 32, n. 11, p.1239-1274, 2007.
- JOANICOT, M.; AJDARI, A. Applied physics droplet control for microfluidics. Science. v. 309, p. 887-888, 2005.
- KARNIK, R. *et al.* Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles. **Nano Letters**v. 8, n. 9, p.2906-2912, 2008.
- KARNIK, R. Microfluidic Mixing. Encyclopedia Of Microfluidics And Nanofluidics, p.1-13, 2014.
- KEENEY, M. *et al.* Development of Poly(β-amino ester)-Based Biodegradable Nanoparticles for Nonviral Delivery of Minicircle DNA. **Acs Nano**, v. 7, n. 8, p.7241-7250, 2013.
- KHMARA, I. *et al.* Preparation of poly-L-lysine functionalized magnetic nanoparticles and their influence on viability of cancer cells. **Journal Of Magnetism And Magnetic Materials,** v. 427, p.114-121, 2017.
- KIM, T. *et al.* Synthesis of biodegradable crosslinked poly(β-amino ester) for gene delivery and its modification, inducing enhanced transfection efficiency and stepwise degradation. **Bioconjugate Chem**,v. 16, p. 1140– 1148, 2005.
- KIM, S. *et al.* Biological applications of microfluidic gradient devices. **Integrative Biology,** v. 2, n. 11-12, p.584-603, 2010.
- KIM, J.; SUNSHINE, J. C.; GREEN, J. J. Differential Polymer Structure Tunes Mechanism of Cellular Uptake and Transfection Routes of Poly(β-amino ester) Polyplexes in Human Breast Cancer Cells. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, n. 1, p.43-51, 2013.

- KOH, C. G. *et al.* Delivery of Polyethylenimine/DNA Complexes Assembled in a Microfluidics Device. Molecular Pharmaceutics, v. 6, n. 5, p.1333-1342, 2009.
- KONG, Y. *et al.* Uptake of DNA by cancer cells without a transfection reagent. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p.1-7, 2017.
- KONGKANERAMIT, L. *et al.* Dependence of Reactive Oxygen Species and FLICE Inhibitory Protein on Lipofectamine-Induced Apoptosis in Human Lung Epithelial Cells. Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics, v. 325, n. 3, p.969-977, 2008.
- KÖSTER, S.H. *et al.* Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. **Lab On A Chip**, v. 8, n. 7, p.1110-1115, 2008.
- KURITA, H. *et al.* Fluorescence observation and manipulation of individual DNA molecules in a microfluidic channel. International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), 7-10, p.295-299, 2010.
- LEE, J. N. G. *et al.* Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 23, p.6544-6554, 2003.
- LI, N. *et al.* Polymer assembly: promising carriers as co-delivery systems for cancer therapy. **Progress in Polymer Science**, v. 58, p. 1-26, 2016.
- LIN, C. *et al.* A fast prototyping process for fabrication of microfluidic systems on soda-lime glass. Journal Of Micromechanics And Microengineering, v. 11, n. 6, p.726-732, 2001.
- LITTLE, S. R. *et al.* Formulation and characterization of poly (β amino ester) microparticles for genetic vaccine delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 107, p. 449–462, 2005.
- LIU, Y. *et al.* Poly(β-Amino Esters): Synthesis, Formulations, and Their Biomedical Applications. **Advanced Healthcare Materials**, 2018.
- LUO, D. *et al.* A self-assembled, modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 333-341, 2003.
- LUTZ, B. R. *et al.* Microfluidics without microfabrication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 100, n. 8, p. 4395-4398, 2003.

- LYNN, D. M.; LANGER, R. Degradable Poly(β-amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. Journal Of The American Chemical Society, v. 122, n. 44, p.10761-10768, 2000.
- LYNN, D. M. *et al.* Accelerated Discovery of Synthetic Transfection Vectors: Parallel Synthesis and Screening of a Degradable Polymer Library. Journal Of The American Chemical Society, v. 123, n. 33, p.8155-8156, 2001.
- MANGRAVITI, A. *et al.* Polymeric Nanoparticles for Nonviral Gene Therapy Extend Brain Tumor Survival in Vivo. **Acs Author Choice,** v. 9, p. 1236-1249, 2015.
- MANIATIS, T.; JEFFREY, A.; VAN DESANDE, H. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. **Biochemistry**, v. 14, n. 17, p.3787-3794, 1975.
- MARX, V. Pouring over liquid handling. **Nature Methods**, v.10, n. 3, p.33-38, 2014.
- MCDONALD, J. C.; WHITESIDES, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. Accounts Of Chemical Research, v. 35, n. 7, p.491-499, 2002.
- MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. Nonviral Vectors for Gene Delivery. **Chemical Reviews,** v. 109, n. 2, p.259-302, 2009.
- MITRA, R. N. *et al.* Synthesis and Characterization of Glycol Chitosan DNA Nanoparticles for Retinal Gene Delivery. **Chemmedchem**, v. 9, n. 1, p.189-196, 2013.
- MUCK, A. Jr. *et al.* Fabrication of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips by atmospheric molding. **Anal Chem,** v. 76, n. 8, p.2290-2297, 2004.
- NAYEROSSADAT, N. *et al.* Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. **Advenced Biomedical Research**, v. 1, p.1-27, 2012.
- NEUHAUS, B. *et al.* Nanoparticles as transfection agents: a comprehensive study with ten different cell lines. **Rsc Advances**, v. 6, n. 22, p.18102-18112, 2016.
- NIREESHA, G.R. *et al.* Lyophilization/Freeze Drying A Review. International Journal Of Novel Trends In Pharmaceutical Sciences, v. 3, p.87-98, 2013.
- OLIVEIRA, A. F. *et al.* Microfluidic tools toward industrial biotechnology. **Biotechnology Progress,** v. 32, n. 6, p.1372-1389, 2016.
- PACK, D. W. *et al.* Design and development of polymers for gene delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p.581-593, 2005.
- PERNI, S.; PROKOPOVICH, P. Poly-beta-amino-esters nano-vehicles based drug delivery system for cartilage. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 13, n. 2, p.539-548, 2017.
- PESSOA, A. C. S. N.; SIPOLI, C. C.; DE LA TORRE, L. G. Effects of diffusion and mixing pattern on microfluidic-assisted synthesis of chitosan/ATP nanoparticles. Lab On A Chip, v. 17, p.2281-2293, 2017.
- PFEIFER, B. A. *et al.* Poly(ester-anhydride):poly(β-amino ester) micro- and nanospheres: DNA encapsulation and cellular transfection. International Journal of Pharmaceutics, v. 304, p. 210–219, 2005.
- POZO-RODRÍGUEZ, A. *et al.* Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p.181-189, 2009.
- PRABHA, S. I. *et al.* Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, v. 44, n. 1, p.83-91, 28, 2014.
- RADAIC, A.; PAULA, E. DE; JESUS, M. B. DE. Factorial Design and Development of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Gene Delivery. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 14, n. xx, p. 1–8, 2014.
- RAFTERY, R. *et al.* A. Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 5, p. 5611–47, 2013.
- RATA-AGUILAR, A. *et al.* Complexation and release of DNA in polyplexes formed with reducible linear poly(β-amino esters). Colloids And Surfaces
 B: Biointerfaces, v. 133, p.339-346, 2015.
- REINER, J. E. *et al.* Accurate Optical Analysis of Single-Molecule Entrapment in Nanoscale Vesicles. **Analytical Chemistry,** v. 82, n. 1, p. 180-188, 2010.
- REN, K. *et al.* Materials for Microfluidic Chip Fabrication. **Accounts Of Chemical Research,** v. 46, n. 11, p.2396-2406, 2013.
- RHEE, M. et al. Synthesis of Size-Tunable Polymeric Nanoparticles Enabled by

3DHydrodynamicFlowFocusinginSingle-LayerMicrochannels.Advanced Materials, v. 23, n. 12, p.79-83, 2011.

- ROBBINS, P. D.; GHIVIZZANIi, S. C. Viral vectors for gene therapy. Pharmacology & Therapeutics, v. 80, p. 35-47, 1998.
- ROY, K. *et al.* Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. **Nature Medicine**, v. 5, n. 4, p.387-391, 1999.
- SABHACHANDANI, P. *et al.* Generation and functional assessment of 3D multicellular spheroids in droplet based microfluidics platform. Lab On A Chip, v. 16, n. 3, p.497-505, 2016.
- SACKMANN, E. K. The present and future role of microfluidics in biomedical research. **Nature**, v.507, p. 181, 2014.
- SATO, K.; KITAMORI, T. Development of Fundamental Technologies for Micro Bioreactors. **Nano/micro Biotechnology**, p.251-265, 2009.
- SCHAFFER, D. V. *et al.* Vector Unpacking as a Potential Barrier for Receptor-Mediated Polyplex Gene Delivery. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 67, n. 5, p.598-606, 2000.
- SCHÄPPER, D. *et al.* Development of a single-use microbioreactor for cultivation of microorganisms. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 3, p.891-898, 2010.
- SHEN, Y. *et al.* Degradable poly(β-amino ester) nanoparticles for cancer cytoplasmic drug delivery. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 5, p. 192 201, 2009.
- SIA, S. K.; WHITESIDES, G. M. Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. **Electrophoresis**, v. 24, n. 21, p.3563-3576, 2003.
- SIPOLI, C. C. *et al.* Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p.65-73, 2015.
- SIPOLI, C. C. *et al.* Chitosan nanoparticles produced with the gradual temperature decrease technique for sustained gene delivery. Biochemical Engineering Journal, v. 103, p. 114–121, 2015b.

SOMIA, N.; VERMA, I. Gene therapy: trials and tribulations. Nature Reviews

Genetics, v. 1, p. 91-99, 2000.

- SOMMER, G. J. *et al.* Introduction to microfluidics. In: TIAN, W.-C. &FINEHOUT,
 E. (Ed.). Microfluidics for biological applications. New York: Springer
 Science, 2008. cap. 1, p.1-34.
- SPAIN, S. G. et al. Comprehensive Biomaterials. p. 389-410, 2011.
- STREMLER, M. A. *et al.* Designing for chaos: applications of chaotic advection at the microscale. Philosophical Transactions Of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v. 362, n. 1818, p.1019-1036, 2004.
- STROOCK, A. D.; MCGRAW, G. J. Investigation of the staggered herringbone mixer with a simple analytical model. Philosophical Transactions Of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v. 362, n. 1818, p.971-986, 2004.
- SUNSHINE, J. C. *et al.* Poly(β-Amino Ester)-Nanoparticle Mediated Transfection of Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro and In Vivo. **PLOS ONE**, v. 7, p. e37543, 2012.
- TAN, S. H. *et al.* Oxygen plasma treatment for reducing hydrophobicity of a sealed polydimethylsiloxane microchannel. **Biomicrofluidics**, v. 4, n. 3, p.032204-032204-8, 2010.
- TANG, S. *et al.* Co-delivery of doxorubicin and RNA using pH-sensitive poly (βamino ester) nanoparticles for reversal of multidrug resistance of breast cancer. **Biomaterials**, v. 35, p. 6047-6059, 2014.
- TANG, S. *et al.* Inhibition of metastasis and growth of breast cancer by pHsensitive poly (β-amino ester) nanoparticles co-delivering two siRNA and paclitaxel. **Biomaterials,** v. 48, p.1-15, 2015.
- THAPLYAL, P. BEVILACQUA, P. C. Experimental Approaches for Measuring pKa's in RNA and DNA. **Methods In Enzymology**, p.189-219, 2014.
- TWAITES, B. R. *et al.* Thermo and pH responsive polymers as gene delivery vectors: effect of polymer architecture on DNA complexation in vitro. **Journal Of Controlled Release**, v. 97, n. 3, p.551-566, 2004.
- TWYMAN, R.M. Gene transfer to animal cells (advanced methods). Garland Science/BIOS Scientific Publishers, 2005.
- TZENG, S. Y. *et al.* Non-viral gene delivery nanoparticles based on Poly(β -amino

esters) for treatment of glioblastoma. **Biomaterials**, v. 32, p. 5402–5410, 2011.

- VUORIMAA, E. *et al.* Poly(β-amino ester)-DNA complexes: Time-resolved fluorescence and cellular transfection studies. Journal Of Controlled Release, v. 154, p. 171-176, 2011.
- WANG, S. *et al.* Hyaluronic acid-coated PEI-PLGA nanoparticles mediated codelivery of doxorubicin and miR-542-3p for triple negative breast cancer therapy. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, v. 12, p. 411-420, 2016.
- WANG, T. *et al.* Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies. International Journal of Pharmaceutics, v. 427, p. 3-20, 2012.
- WEIBEL, D. B. *et al.* Microfabrication meets microbiology. **Nature Reviews Microbiology,** v. 5, n. 3, p. 209-218, 2007.
- WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, p. 368-373, 2006.
- WILSON, D. R. *et al.* Continuous microfluidic assembly of biodegradable poly(beta-amino ester)/DNA nanoparticles for enhanced gene delivery. Journal of Biomedical Materials Research, v. 105, p. 1813-1825, 2017.
- WU, P.; LIU, Y.; JIANG, X. Hyperbranched Poly(amino ester)s with Different Terminal Amine Groups for DNA Delivery. Biomacromolecules, v. 7, n. 6, p.1879-1883, 2006.
- WU, P. *et al.* A Novel Methotrexate Delivery System Based on Chitosan-Methotrexate Covalently Conjugated Nanoparticles. Journal Of Biomedical Nanotechnology, v. 5, n. 5, p.557-564, 2009.
- YAGER, P. *et al.* Microfluidic diagnostic technologies for global public health. **Nature** 442, 412–418, 2006.
- YAMASHITA, T. *et al.* Cultivation and recovery of vascular endothelial cells in microchannels of a separable micro-chemical chip. **Biomaterials**, v. 32, n. 10, p. 2459-2465, 2011.
- YIN, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetic**, v. 15, p. 541-555, 2014.
- ZHANG, Z. et al. Microbioreactors for bioprocess development. Journal of the

Association for Laboratory Automation, v. 12, n. 3, p. 143-151, 2007.

- ZHOU, D. *et al.* Highly branched poly(β-amino ester)s for skin gene therapy. **Journal Of Controlled Release**, v. 244, p. 336-346, 2016.
- ZHOU, J. *et al.* Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. **Electrophoresis**, v. 31, n. 1, p.2-16, 2010.
- ZUGATES, G. T. *et al.* Gene Delivery Properties of End-Modified Poly(β-amino ester)s. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 6, p.1887-1896, 2007.
- http://www.yole.fr/Microfluidic_Applications_Technologies.aspx#.WFP0YFxAFQ8, acessado em 01/10/2017.
- http://fluidicmems.com/list-of-microfluidics-lab-on-a-chip-and-biomemscompanies/, acessado em 05/10/2017.

ANEXOS

ANEXO I

Artigo submetido à revista Journal of Colloid and Interface Science, realizado em colaboração com o laboratório Nano-Cell Interactions, coordenado pelo Professor Marcelo Bispo de Jesus.

Neste artigo, apresenta-se uma verificação inicial de eficiências de transfecção de nanopartículas de PBAE/DNA em células PC3 e PNT2, a partir da qual se concluiu que o PBAE 557 é o polímero mais promissor para ser utilizado como vetor de genes para células da próstata. Também foi possível identificar a razão mássica 30 (massa PBAE/massa DNA) como a mais adequada para a síntese das nanopartículas.

PBAE polyplexes preferential transfection into prostate cancer cells

Maria Fernanda Perscarini Filippi^{1,2}, Bruna Soldera¹, Guilherme Capiraço Campese¹,

Lucimara G. de la Torre², Marcelo Bispo de Jesus^{1*}

¹Nano-Cell interactions Lab., University of Campinas, Institute of Biology, Department of Biochemistry and Tissue Biology, 13083-862, Campinas, Brazil.

² Department of Material and Bioprocess Engineering, School of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

* dejesus@unicamp.br

Graphical Abstract



Abstract

Gene therapy is an important area in medicine that presents the possibility of treating diseases, like cancer. The delivery of nucleic acids to cancer cells is a promising therapeutic approach and attempted by many vectors. Poly(β -amino ester) (PBAE) is a cationic class of biodegradable polymers that are capable of complexing with DNA forming nanoparticles. Owning their easy to perform synthesis, PBAEs presenting different physicochemical properties can be obtained. These polymers are expected to exhibit different transfection results in each type of cell, due to the variability in properties and specific behavior of cells. Few studies have explored the PBAE for gene delivery in cancer cells; however, the comparison of PBAE gene delivery capability between prostate cancer and non-cancer cells remains unclear. Hence, we were compared the transfection efficiency among three PBAE (556, 557 and 558) polyplexes in prostate cancer PC3 and non-cancer PNT2 cells. The 557 polymer showed the highest distinction between cancer and non-cancer cells. Therefore, we performed a physicochemical characterization, including the molecular weight of the polymer and size, zeta potential, polydispersity and morphology of nanoparticles. Our work presents a starting point in the development of an optimized PBAE vector for prostate cancer cells. *Keywords:* Poly(β-amino ester), nanoparticles, gene therapy, prostate cancer

1. Introduction

Cancer is one of the leading health concerns around the world, and prostate cancer is the second most common cancer among men [1]. Among several kinds of treatment such as chemotherapy, radiotherapy, and surgery, gene therapy has emerged as a promising alternative. Gene therapy consists in the delivery of nucleic acids to specific cells with a therapeutic finality [2]. For the treatment to be efficient, genetic material must be protected and intracellularly delivered effectively [3]. Therefore, many studies have focused on the development of gene delivery systems, which ideally should be easy to produce, immunologically inert, specific to target cells, and have an unlimited size capacity and efficient gene expression [4]. To fulfill these requirements, many vectors have been developed, including non-viral vectors. One of the most common non-viral systems is the polyplexes, formed by the electrostatic complexation between genetic material and cationic polymers [5], such as polymeric nanoparticles. Polymeric nanoparticles can be synthesized using several polymers, and Poly(β -amino ester) (PBAE) has emerged as a promising one.

PBAE is a class of cationic and biodegradable polymers that present low toxicity in many cell lines compared to other polymers [6]. Many types of PBAE have been investigated as gene therapy vectors and have presented high transfection efficiency in cancer cells [7,8]. After testing a variety of PBAEs, PBAE 457 presented good transfection results (up to 60%) in glioblastoma cells and had no significant effect on healthy cells [9]. Despite PBAE polyplexes being possible efficient vectors, the efficacy of the treatment is cell-dependent. Among 18 different PBAEs tested, 455 nanoparticles achieved the highest transfection efficiency in human embryonic kidney cells (70-80%). In contrast, the same nanoparticles performed low transfection efficiency in mouse embryonic fibroblasts (20-25%) [10]. Although many works have explored PBAEs as gene carriers, it is still unclear how PBAE perform as gene delivery in human prostate cancer cells (PC3) compared to healthy prostate cells (PNT2).

In this regard, this paper aims to investigate the response of cancer and non-cancer prostate cells towards PBAEs nanoparticles treatment. Here, we compared transfection efficiency of three different PBAEs in PC3 and PNT2 cells. After selecting the most efficient polymer, we characterized its physicochemical properties to better understand how the physicochemical properties could influence the transfection efficiency.

2. Materials and Methods

2.1 Synthesis of the polymers

End-modified PBAEs 556, 557 and 558 were synthesized according to Mangraviti *et al* (2015) [7]. The polymer synthesis occurs in two steps: polymerization and end-cap modification. First, the main chain was formed via Michael's addition, in which an amine (5-Amino-1-pentanol, Chem Cruz[®]) was added to a diacrylate (1,5-Bis(acryloyloxy)pentane,

Chem Cruz[®]) at 1:1.2 molar ratio. The reaction was kept under stirring during 24 h at 90°C. Second, the polymer was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO), and the end-cap modification was performed using 2-(3-Aminopropylamino)ethanol (E6) (Sigma-Aldrich[®]) for 556, 1-(3-aminopropyl)-4-methylpiperazine (E7) (Alfa Aesar[®]) for 557 and 1-(3-Aminopropyl)pyrrolidine (E8) (Alfa Aesar[®]) for 558. The reaction occurred at room temperature during one hour.

2.2 pDNA purification and complexation

In this study two plasmids were used pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) and pBR322. pEGFP-N1 was used to assess transfection efficiency, which encodes EGFP under the control of the cytomegalovirus promoter. pBR322 was used as a control in cytotoxicity assays because lacks eukaryotic promoters, therefore the GFP toxicity is avoided. Both plasmids were amplified and purified using PureLink[™] HiPure Plasmid DNA Purification Kit-Maxiprep (Invitrogen, Maryland, USA) according to manufactures instructions. The plasmid concentration and purity were determined using a TAKE3 plate and a Cytation 5 multi-mode plate reader (Biotek, Winooski, VT, USA) at 260 nm (A260). The plasmids were accepted for further use when A260nm/A280nm ratio was greater than 1.8. After, both pDNA and PBAE were solubilized in sodium acetate buffer 25mM pH 5. Next, the PBAE solution was added to the pDNA solution, and the polyplexes were incubated for 20 minutes. Polyplexes were always freshly prepared for transfection.

2.3 Cell Culture

For transfection efficiency studies two cell lines were used, human prostate cancer cells (PC3) and normal human epithelial prostate cells (PNT2). Both cell lines were cultivated in RPMI 1640 (Lonza) medium, supplemented with 10% of bovine fetal serum and (Sigma) and 1% of a combination of Penicillin (Sigma) and Streptomycin (Sigma). Cells were maintained at 37° C, with 5% of CO₂ atmosphere and subcultured every 2 days.

2.4 Transfection

For transfection efficiency evaluation, 100,000 cells were plated per well in a 12-well plate. After 24 hours, the medium was replaced with bare media and cells were treated with

the polyplexes. After 4 hours of incubation, the solution was replaced with complete media. The next day, the percentage of EGFP-positive cells was assessed by flow cytometry in the cytometer FACSCalibur (Beckton Dickinson) and data analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

2.5 Citotoxicity

For cytotoxic evaluation, PC3 and PNT2 cells were plated (10,000 per well) in 96-well plates. After 24 hours, cells were treated with polyplexes in eight different concentrations of 557 (from $0.6 \times 10^{-2} \mu g/\mu L$ to $0.77 \mu g/\mu L$). Polyplexes containing pBR322 plasmid were used to avoid toxicity related to GFP overexpression. After 24 h, media was replaced with MTT solution (0.5 mg/ml) and cells were incubated for one and half hour. Next, formazan crystals were dissolved in 100 µl of DMSO. The solutions were homogenized for 5 min on a plate shaker, and the absorbance was measured at 570 nm with Cytation 5 multi-mode plate reader (Biotek, Winooski, VT, USA). Cell viability was plotted as a percentage of the control, and the mean values were calculated from three independent experiments.

2.6 Polymer characterization

PBAE 557 was characterized according to chemical structure and molecular weight. Chemical structure was confirmed by Nuclear Magnetic Resonance (¹H). 557 was dissolved in deuterated DMSO in a concentration of 1mM and submitted to NMR Avance III 400 MHz equipent to obtain the spectra. This procedure was permormed after the first step of polymer synthesis and after the second step. Molecular weight was determined by gel permeation chromatography (GPC). 557 was dissolved in tetrahydrofuran (THF) in a concentration of 10 mg/ml and filtered. After, the sample was submitted to chromatography and data was calculated relating to polystyrene standards.

2.7 PBAE polyplexes characterization

Polyplexes formed by the complexation of 557 and pDNA were characterized by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). For DLS, 1 µg of pDNA was solubilized in sodium acetate buffer 25 mM pH5. The same buffer was added to 30 µg of PBAE. The polymer solution was added to the DNA solution and gently mixed.

After 20 minutes of incubation, the solution was completed with water to reach 800 μ l and the sample was analyzed in a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical, Malvern, United Kingdom). For TEM, the polyplex was prepared over a piece of parafilm. First, two droplets of sodium acetate buffer containing 3 μ l were dropped in the parafilm. 0.1 μ g of pDNA was added to one and 3 μ g of 557 was added to the other (mass ratio 30 m/m). The droplets were mixed and incubated for 20 minutes. 5 μ l of the polyplex was placed over a copper grid coated with Formvar® and 5 μ l of uranyl acetate 5% was added to the polyplex. The sample was kept in vacuum chamber until it was submitted to TEM analysis in a LEO 906 microscope (Leo, Thoenwood, NY). 20 images of the sample were obtained.

3. Results

3.1 Polymer 557 achieved higher transfection efficiency than 556 and 558

To compare the transfection efficiency of PBAE in cancer and non-cancer cells, polyplexes using different PBAE polymers (556, 557, 558) were transfected in PC3 and PNT2 cells using three different mass ratios (30, 45 and 60 m/m) (Figure 1). The choice was made based on the transfection efficiency of these polymers in retinal cells, according to Sunshine (2012). The commercial transfection agent Lipofectamine 2000 was used as positive control.

Transfection efficiency of 556 polyplexes was positively correlated with polyplex mass ratio in both PC3 and PNT2 cells (FigurA), reaching transfection efficiencies of 50-60% in both cells for mass ratio 60. In contrast, for 557 polyplexes (FigurB), transfection efficiency was negatively correlated with mass ratio. Interestingly, 557 transfection efficiency at mass ratio 30 was significantly higher in cancer cells compared with non-cancer cells. In addition, 557 performed slightly higher transfection efficiency in cancer cells (~60%) than Lipofectamine (~50%). Moreover, Lipofectamine performed similar transfection efficiencies in both cancer and non-cancer cells. The toxicity of 558 polyplexes (data not shown) in both cell lines precludes the transfection efficiency at tested molar ratios (FigurC).

From a therapeutic perspective, it is interesting to note that 557 polyplexes were capable to achieve high transfection levels (~60%) in cancer cells, which were significantly higher than non-cancer cells (~30%). Therefore, we decide to further investigate the cytotoxicity and physicochemical properties of 557 polyplexes.



Figure 1. Transfection efficiency of different mass ratios of PBAE polyplexes in PC3 and PNT2 cell. A – 556 PBAE polymer; **B** – 557 PBAE polymer; **C** – 558 PBAE polymer. PC3 and PNT2 cells were plated in 12 well plates 24h before transfection reaching 70% confluency in the moment of the procedure. The PBAE polyplexes were prepared by dissolving 1 μ g of pDNA and the PBAE, according to the mass ratio, in acetate buffer pH 5 (25 mM), the PBAE was added to pDNA solution and allowed to self-assembly for 20 minutes. Incomplete RPMI media was added to the polymer complex solution in a 1:10 Acetate:RPMI volume ratio to the final volume of 500 μ L. After 4h incubation, transfection media was replaced by complete media. After 24 hours, the cells were resuspended using trypsin and analyzed by flow cytometry in FACSCaliburTM cytometer (BD Bioscience) recording 10.000 events per sample. Lipofectamine 2000 was used as a positive control, and the cells were treated according to the manufacturer protocol. Each value is represented as the average ± SD of three independent experiments.

3.2 557 polymer and the corresponding polyplex are less cytotoxic for both cell lines

Next, we investigated the cytotoxic effects of the free polymer and 557 polyplexes complexed with pBR322 plasmid in PC3 and PNT2 cells at the mass ratio of 30 m/m. pBR322 was used in cytotoxicity assays to avoid GFP toxicity. The results are shown in FigureA for PC3 and in FigureB for PNT2. Free polymer 557 (without pDNA) was also tested with equivalent concentrations. Free polymer was more toxic than the corresponding polyplexes in both cell lines. Non-cancer cells (PNT2) was more sensitive than cancer (PC3) cells for both 557 polymer and polyplexes complexed with pBR322 plasmid (Table 5). The concentration of polymer used at 557 30 m/m transfection is approximately 200 times lower than the IC50 in PNT2 cells and more than 400 times lower than the IC50 in PC3 cells.



Figure 2. Cell viability assay of PC3 and PNT2 cells treated with 557 30 w/w PBAE Polyplex and 557 PBAE Polymer. A – PC3; B – PNT2. Cells were plated in 96 well plates 24h before treatment. The PBAE polyplexes were prepared at 30 w/w mass ratio by dissolving pDNA and the PBAE sample in equal amounts of acetate buffer pH 5 (25 mM), the PBAE was added to pDNA solution and allowed to electrostatic complexation for 20 minutes. The PBAE polymer, used as control, followed the same procedure but without pDNA. Incomplete RPMI media was added to the polymer complex solution in a 1:10 Acetate:RPMI volume ratio to the final volume of 200 μ L. After 24 h, ten microliters of 5mg/mL MTT stock solution was added to each well and incubated for 1 hour. Formazan crystals were solubilized with 100 μ L of DMSO, and the 530 nm absorbance was recorded at a plate reader. Each value is represented as the average ± SD of three independent experiments.

Cable 5: Values of IC50 for 557 free and the corresponding polyplexes in PC3 and PNT2 cells.		
PC3	PNT2	
25.74 ± 3.40 μg/μl	11.98 ± 2.13 μg/μl	
10.58 ± 4.02 μg/μl	5.53 ± 1.06 μg/μl	
	<u>d the corresponding po</u> PC3 25.74 ± 3.40 μg/μl 10.58 ± 4.02 μg/μl	

3.3 Physicochemical characterization of the polymer 557

To further characterize the 557 polymer, we performed nuclear magnetic resonance (NMR) to confirm the polymer chemical structure and gel permeation chromatography (GPC) to determine the molecular weight.

Two NMR spectra were acquired, one for each step of the 557 synthesis (Figure). The first H spectrum (FigureA) was obtained after the first step of polymerization, in which the main carbon chain is formed and increases as the reaction between the amine (5-amino-1-pentanol) and the diacrylate (1,5- pentanediol diacrylate) takes place. It is possible to observe on the spectrum chemical shifts for acrylic function around 6 p.p.m.. The functionalization of acrylic-terminated main chain with 1-(3-aminopropyl)-4-methylpiperazine was confirmed by NMR spectroscopy through the loss of the acrylate peaks specific to the monomer close to 6 p.p.m. (FigureB). The end-capping characterization of the 557 polymer is in accordance with previous study (Tzeng and Green, 2013).

Next, the molecular weight of the 557 polymer was determined by GPC. We synthesized 557 seven times and submitted a sample of each to GPC analysis. The molecular weight of 557 varied from 2 to 5.4 kDa, relative to polystyrene standards.



Figure 3. H1-NMR spectrum of 557 polymer synthesis steps. A – Product of reaction between 5-amino-1pentanol and 1,5-pentanediol diacrylate (55); **B** – End-capping functionalization with 1-(3-aminopropyl)-4methylpiperazine (557). 10 mg of the sample was diluted in DMSO-d6 and analyzed in a 400 MHz NMR Bruker Avance III Spectrometer, using the residual DMSO-d5 signal at 2.50 ppm as the internal calibration reference.

3.4 557 polyplexes characterization

After the physicochemical characterization of the 557 polymer, we further investigated the physicochemical properties of 557:pDNA polyplexes. As the polyplexes formed nanoparticles, we measured size, polydispersity and Zeta potential by dynamic light scattering (DLS). 557 polyplexes size is 390.5 ± 174.3 nm, with a polydispersity of 0.159 ± 0.046 and Zeta potential +28.7 ± 3.1 mV. Further insight into the nanoparticle morphology and size distribution was gained by Transmission electronic microscopy (TEM). The polyplexes are mainly spherical (FigureA) and through the Gaussian curve, we calculated mean size (73.52 ± 33.45 nm) and polydispersity (0.207) (FigureB). Differences between average diameter obtained from dynamic light scattering and TEM are consequence of different techniques. However, in both TEM and dynamic light scattering the polydispersity are similar and close to 0.2. Although the polyplexes morphology is rounded, we can observe some aggregation (Figure 4A), inherent of the laboratorial complexation process.



Figure 4. Size distribution of 557 polyplexes accessed by TEM. A – Representative images of 557 polyplexes at 16700x and 21560x magnification. The 30 w/w polyplexes were prepared by solubilizing 557 polymer and pDNA contents in equal amounts of acetate buffer pH 5 (25 mM) and adding the polymer solution in the pDNA solution. After 20 minutes, the nanoparticles were added to a Formvar® coated copper microscopy grid and stained with uranyl acetate staining solution. After drying for 24 hours, the grids were analyzed in the LEO 906 Carl Zeiss Transmission Electron Microscope and the sizes of the nanoparticles were determined using ParticleSizer ImageJ script. **B** – Size distribution histogram of 557 PBAE Polyplexes.

4. Discussion

Transfection efficiency is a multistep process and depends on several factors including cell type, nanomaterial physicochemical properties, incubation time and cytotoxicity

[11]. In this regard, we compared three different PBAEs for gene delivery in prostate cancer and non-cancer cells. The 558 polyplexes transfection efficiency was neglectable (Figure 1C), probably because of the high levels of cytotoxicity, since we observed alterations on cell morphology and lower number of cells on cells treated with 558, which preclude the use of this polymer as gene vector for this type of cell. Conversely, both 556 and 557 polyplexes achieved high transfection efficiencies (Figures 1A and B). Interestingly, 557 showed significantly higher transfection efficiency on PC3 cancer cells compared with PNT2 noncancer cells (Figure 1A). From a therapeutic perspective, this difference is an interesting outcome towards a cell-specific delivery. Furthermore, being able to target cancer cells and affect less healthy cells may reduce side effects, that are present in other types of treatment, such as chemotherapy [12, 13]. Hence, we have chosen 557 to be the object of further studies. To increase transfection in tumor cells and consequently improving the therapeutic outcomes, it is important to understand the underlying mechanisms of gene delivery into the specific cell. Transfection efficiency is a trade between the physicochemical properties of the nanoparticle and uptake and intracellular processing depending on the cell line. Polymer composition and structure might influence cell uptake. In the case of PBAE, it has been already shown that end-capping the main PBAE chain enhances cell transfection efficiency [14]. Here, we have tested three different end-caps (2-(3-Aminopropylamino) ethanol, 1-(3aminopropyl)-4-methylpiperazine and 1-(3-Aminopropyl)pyrrolidine) and found that 557 (endcapped with E7) had better transfection performance. This result is in accordance with previous studies, that show that one of the end caps that presents better transfection results in many cell lines is E7 [15-17]. Therefore, knowing the properties of the polymer and nanoparticles and how they may interfere in transfection, opens the perspective to tailor them to achieve therapeutic success.

Regarding nanoparticles transfection efficiency, the size is one parameter that might influence transfection and can be adjusted to improve results [18]. In this work, we used polyplexes with average hydrodynamic diameter of 390.5 nm. Many authors have reported good transfection results in different cell lines with PBAE nanoparticles ranging, mostly, from

50 to 250 nm [19-22]. Although we had polyplexes with higher diameter than reported from the literature, it was possible observe differences in transfection, specially for cancer and noncancer cells. This average diameter can probably be the result of the laboratorial and hand shaken procedure.

It is possible to optimize gene carriers through the modification of process complexation, including complexation time, order in which the reagents are combined, volume of reagents and method of addition (pipetting or dropwise addition). These conditions may influence polyplexes characteristics (i.e. size and Zeta potential), and, consequently, transfection efficiency [23]. Moreover, different strategies for complexation may result in different polyplex structures that may influence transfection. Recently, PBAE nanoparticles synthesis was investigated using microfluidictechnology, enabling the regulation of the velocity in which complexation between polymer and pDNA occurs, what might affect size, polydispersity, DNA accessibility, among other properties [24].

Besides the 557 PBAE:pDNA polyplexes physicochemical properties, here we reinforce that it is compulsory to investigate the treatment response of each cell line independently and adapt polyplexes properties accordingly. Thus, this study exhibits for the first time the response of PC3 and PNT2 cells towards PBAE polyplexes treatment.

Conclusion

In this work, we compared three PBAE polyplexes and determined that PBAE 557 nanoparticles performed an intrinsic preference for gene delivery in prostate cancer cells, compared with healthy cells. Other studies have shown similar results, but using different cell lines and different PBAE polymers [9]. Although 557 polyplexes are slightly bigger (~390nm) than previous PBAE polyplexes (50-250 nm) reported in the literature [19-22], the high transfection efficiency reached emphasize that more data are required to determine the real effect of size in transfection efficiency mediated by PBAE. Our results may be used as a starting point for further studies to develop a specific and optimized PBAE vector for prostate cancer cells.

References

- [1] D. Robinson, E.M. Van Allen, Y.M. Wu, N. Schultz, R. J. Lonigro, J.M. Mosquera, B. Montgomery, M.E. Taplin, C.C. Pritchard, G. Attard, H. Beltran, W. Abida, R.K. Bradley, J. Vinson, X. Cao, P. Vats, L.P. Kunju, M. Hussain, F.Y. Feng, S.A. Tomlins, K.A. Cooney, D.C. Smith, C. Brennan, J. Siddiqui, R. Mehra, Y. Chen, D.E. Rathkopf, M.J. Morris, S.B. Solomon, J.C. Durack, V.E. Reuter, A. Gopalan, J. Gao, M. Loda, R.T. Lis, M. Bowden, S.P. Balk, G. Gaviola, C. Sougnez, M. Gupta, E.Y. Yu, E.A. Mostaghel, H.H. Cheng, H. Mulcahy, L.D. True, S.R. Plymate, H. Dvinge, R. Ferraldeschi, P. Flohr, S. Miranda, Z. Zafeiriou, N. Tunariu, J. Mateo, R. Perez-Lopez, F. Demichelis, B.D. Robinson, M. Schiffman, D.M. Nanus, S.T. Tagawa, A. Sigaras, K.W. Eng, O. Elemento, A. Sboner, E.I. Heath, H.I. Scher, K.J. Pienta, P. Kantoff, J.S. de Bono, M.A. Rubin, P.S. Nelson, L.A. Garraway, C.L. Sawyers, A.M. Chinnaiyan, Cells 161 (2015) 1215-1228.
- [2] R.C. Mulligan, AAAS 260 (1993) 926-932.
- [3] D. Luo, E. Han, N. Belcheva, W.M. Saltzman, J. Control. Release 9 (2003) 333-341.
- [4] N. Somia, M. Verma, Nat. Ver. Genet. 1 (2000) 91-99.
- [5] T. Wang, J.R. Upponi, V.P. Torchilin, Int. J. Pharm. 427 (2012) 3-20.
- [6] J.J. Green, G.T. Zugates, R. Langer, D.G. Anderson, Methods Mol. Biol. 480 (2009) 53-63.
- [7] A. Mangraviti, S.Y. Tzeng, K.L. Kozielski, Y. Wang, Y. Jin, D. Gullotti, M. Pedone, N. Buaron, A. Liu, D.R. Wilson, S.K. Hansen, F.J. Rodriguez, G.D. Gao, F. DiMeco, H. Brem, A. Olivi, B. Tyler, J.J. Green, ACS Nano 9 (2015) 1236-1249.
- [8] E. Vuorimaa, T. Ketola, J.J. Green, M. Hanzlíková, H. Lemmetyinen, R. Langer, D.G. Anderson, A. Urtti, M. Yliperttula, J. Control. Release 154 (2011) 171-176.
- [9] S.Y. Tzeng, H. Guerrero-Cázares, E.E. Martinez, J.C. Sunshine, A. Quiñones-Hinojosa, J.J. Green, Biomaterials 32 (2011) 5402-5410.
- [10] M. Keeney, S.G. Ong, A. Padilla, Z. Yao, S. Goodman, J.C. Wu, F. Yang, ACS Nano 7 (2013) 7241-7250.
- [11] M.B. de Jesus, Y.L. Kapila, Cellular Mechanisms in Nanomaterial Internalization, Intracellular Trafficking, and Toxicity. in: N. Durán, S.S. Guterres, O.L. Alves (Eds.), Nanotoxicology, Springer New York, New York, NY, 201–227, 2014.
- [12] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 1649-1659.
- [13] C.F. Cheok, Cell Cycle 11 (2012) 2227-2228.
- [14] G.T. Zugates, W. Peng, A. Zumbuehl, S. Jhunjhunwala, Y.H. Huang, R. Langer, J.A. Sawicki, D.G. Anderson, Mol. Ther. 15 (2007) 1306-1312.
- [15] H. Guerrero-Cázares, S.Y. Tzeng, N.P. Young. A.O. Abutaleb, A. Quiñones-Hinojosa, J.J. Green, ACS Nano 8 (2014) 5141–5153.
- [16] J.C. Sunshine, M.I. Akanda, D. Li, K.L. Kozielski, J.J. Green, Biomacromolecules 12 (2011) 3592– 3600.
- [17] S.Y. Tzeng, J.J. Green, Adv. Healthcare Mater. 2 (2013) 468-480.
- [18] S. Prabha, G. Arya, R. Chandra, B. Ahmed, S. Nimesh, Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. 44 (2016) 83-91.
- [19] C.J. Bishop, T. Ketola, S.Y. Tzeng, J.C. Sunshine, A. Urtti, H. Lemmetyinen, E. Vuorimaa-Laukkanen, M. Yliperttula, J.J. Green, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 6951-6957.
- [20] S. Tang, Q. Yin, Z. Zhang, W. Gu, L. Chen, H. Yu, Y. Huang, X. Chen, M. Xu, Y. Li, Biomaterials 35 (2014) 6047-6059.

- [21] A.A. Eltoukhy, D.J. Siegwart, C.A. Alabi, J.S. Rajan, R. Langer, D.G. Anderson, Biomaterials 13 (2012) 3594-3603.
- [22] L. Cutlar, D. Zhou, Y. Gao, T. Zhao, U. Greiser, W. Wang, W. Wang, Biomacromolecules 16 (2015) 2609-2617.
- [23] D. Pezzoli, E. Giupponi, D. Mantovani, G. Candiani, Sci. Rep. 7 (2017).

[24] D.R. Wilson, A. Mosenia, M.P. Suprenant, R. Upadhhya, D. Routkevitch, R.A. Meyer, A.

Quinones-Hinojosa, J.J. Green, J. Biomed. Mater. Res. A. 105 (2017)

ANEXO II

Para a condição de processo com corrente central aquosa e concentração final de PBAE de 70,3µg/ml, foram obtidas imagens de microscopia das células PNT2 (Figura 49) e PC3 (Figura 50) transfectadas através de nanopartículas sintetizadas nos três dispositivos e em *bulk*. Também foi realizado ensaio de retardo de mobilidade eletroforética em gel de agarose (Figura 51).



Figura 49 – Imagens de microscopia das células PNT2 após ensaio de transfecção com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas por diferentes métodos. (A) D-simples; (B) D-longo; (C) D-barreiras; (D) *Bulk.*



Figura 50 - Imagens de microscopia das células PC3 após ensaio de transfecção com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas por diferentes métodos. (A) D-simples; (B) D-longo; (C) D-barreiras; (D) *Bulk*.



Figura 51 – Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética de nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas por diferentes métodos.

Para a condição de processo com corrente central aquosa e concentração final de PBAE de 70,3µg/ml, no estudo da variação das vazões e do FRR também foram obtidas imagens de microscopia das células PNT2 (Figura 52 eFigura 54Figura 49) e PC3 (Figura 53 e Figura 55) transfectadas.



Figura 52 - Imagens de microscopia das células PNT2 após ensaio de transfecção com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em diferentes condições de vazão. (A) 60 μ l/min; (B) 90 μ l/min; (C) 120 μ l/min.



Figura 53 - Imagens de microscopia das células PC3 após ensaio de transfecção com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em diferentes condições de vazão. (A) 60 μ l/min; (B) 90 μ l/min; (C) 120 μ l/min.



Figura 54 - Imagens de microscopia das células PNT2 após ensaio de transfecção com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em diferentes condições de FRR. (A) 0,5; (B) 1; (C) 2; (D) 5.



Figura 55 - Imagens de microscopia das células PC3 após ensaio de transfecção com nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas em diferentes condições de FRR. (A) 0,5; (B) 1; (C) 2; (D) 5.

ANEXO III

Para a condição de processo com corrente central aquosa e concentração final de PBAE de 70,3µg/ml, a morfologia das nanopartículas foi verificada através de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 56).



Figura 56 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas PBAE/DNA sintetizadas por diferentes métodos (A) D-simples; (B) D-longo; (C) D-barreiras; (D) *bulk.*