



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

AMANDA DA COSTA E SILVA DE NORONHA PESSOA

**MICROFLUÍDICA COMO PLATAFORMA TECNOLÓGICA PARA PRODUÇÃO DE
MICRO E NANOCARREADORES LIPÍDICOS PARA APLICAÇÕES EM
NANOMEDICINA**

***MICROFLUIDICS AS TECHNOLOGICAL PLATFORM FOR PRODUCTION OF
LIPID MICRO- AND NANOCARRIERS FOR NANOMEDICINE APPLICATIONS***

CAMPINAS

2020

AMANDA DA COSTA E SILVA DE NORONHA PESSOA

**MICROFLUÍDICA COMO PLATAFORMA TECNOLÓGICA PARA PRODUÇÃO DE
MICRO E NANOCARREADORES LIPÍDICOS PARA APLICAÇÕES EM
NANOMEDICINA**

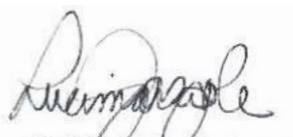
***MICROFLUIDICS AS TECHNOLOGICAL PLATFORM FOR PRODUCTION OF
LIPID MICRO- AND NANOCARRIERS FOR NANOMEDICINE APPLICATIONS***

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Thesis presented to the School of Chemical Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Chemical Engineering.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucimara Gaziola de La Torre

Este trabalho corresponde à versão final da tese de doutorado defendida pela aluna Amanda da Costa e Silva de Noronha Pessoa e orientada pela Prof.^a Dr.^a Lucimara Gaziola de la Torre.



Assinatura da orientadora

CAMPINAS

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

P439m Pessoa, Amanda da Costa e Silva de Noronha, 1991-
Microfluídica como plataforma tecnológica para produção de micro e nanocarreadores lipídicos para aplicações em nanomedicina / Amanda da Costa e Silva de Noronha Pessoa. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Lucimara Gaziola de la Torre.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microfluídica. 2. Lipossomas. 3. Microbolhas. 4. PEG - Poli(etilenoglicol). 5. Carreadores de moléculas. 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: Microfluidics as technological platform for production of lipid micro and nanocarriers for nanomedicine applications

Palavras-chave em inglês:

Microfluidics

Liposomes

Microbubbles

PEG - Poly(ethyleneglycol)

Molecule Carriers

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Lucimara Gaziola de la Torre [Orientador]

Rosiane Lopes da Cunha

Sang Won Han

Adriano Rodrigues Azzoni

Mario Ricardo Gongora Rubio

Data de defesa: 07-04-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2818-6340>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8033946911095527>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese de Doutorado defendida por Amanda da Costa e Silva de Noronha Pessoa e aprovada no dia 07 de abril de 2020 pela comissão examinadora constituída pelos doutores:

Prof^a. Dr^a. Lucimara Gaziola de la Torre
FEQ/UNICAMP (por videoconferência)

Prof^a. Dr^a. Rosiane Lopes da Cunha
FEA/UNICAMP (por videoconferência)

Prof. Dr. Sang Won Han
UNIFESP (por videoconferência)

Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni
Escola Politécnica da USP (por videoconferência)

Dr. Mario Ricardo Gongora Rubio
IPT – Instituto de Pesquisas tecnológicas de São Paulo (por videoconferência)

* A Ata de Defesa, com as respectivas assinaturas dos membros da Comissão Examinadora, encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me motivaram durante toda minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar mais um ciclo tão importante da minha vida, não posso deixar de agradecer à minha família, que se manteve presente diariamente, me transmitindo energia positiva, apoio e amor incondicionais durante todos os 6 anos de pós-graduação. Estar longe fisicamente da família é a parte mais difícil dessa jornada, mas a cada reencontro, a cada abraço e a cada uma das inúmeras mensagens de apoio, eu voltava à Campinas com a certeza de que estava no caminho certo. Aos meus irmãos, Rodolfo e Luiz Filho, às minhas cunhadas Giulli e Carol, e aos meus sobrinhos Rodolfinho, Gabriel e Isabella, amores da minha vida, obrigada por cada abraço e todo carinho sempre. Aos meus pais, não tenho nem palavras para descrever como o apoio de vocês foi imprescindível nessa jornada. Aqui expresso a minha gratidão imensurável por ter vocês em minha vida, a companhia e presença de vocês em cada etapa me deram mais forças para continuar, e se estou finalizando esse doutorado, é por vocês e para vocês. Amo vocês!

Gostaria de agradecer à minha orientadora, prof.^a Dr.^a Lucimara, pela confiança em meu trabalho, pela disponibilidade e inúmeras discussões, pelo apoio tanto no âmbito profissional como pessoal, e pelos constantes ensinamentos nesses últimos 6 anos de pós-graduação. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. Patrick Tabeling, por me receber em seu laboratório em Paris, pelo acompanhamento, discussões e aprendizados, e me dar a oportunidade de vivenciar uma experiência profissional em um excelente ambiente de trabalho.

Ao prof. Marcelo Bispo de Jesus, do Instituto de Biologia da UNICAMP, e toda a sua equipe, pela constante disposição e importantíssima colaboração com os ensaios biológicos. Em especial, às alunas Fernanda, Raquel e Tuanny, pela amizade e acolhimento em seu laboratório, pelos almoços descontraídos e pelos inúmeros conhecimentos compartilhados.

Aos membros da banca, prof.^a Dr.^a Rosiane Lopes da Cunha, prof. Dr. Sang Won Han, prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni e ao prof. Dr. Mario Ricardo Gongora Rubio, agradeço por aceitarem gentilmente fazer parte das discussões para contribuir com essa pesquisa.

Aos amigos “veteranos” de pós-graduação Aline, Micaela, Tiago e Caroline, pela amizade construída desde o início do mestrado e pelos constantes

ensinamentos. Foi uma honra trabalhar com profissionais e amigos especiais como vocês!

Aos amigos que fiz durante minha estadia na França, Tatiana, Cesaré, Maryam, Maria, Ilham e Marjan que foram muito importantes para fazer dessa experiência uma das melhores da minha vida. Um agradecimento especial à Micaela, que foi um apoio incondicional durante esse período de intercâmbio.

Aos amigos da pós-graduação Bruna, Laise, Thiago e João, que me acompanharam durante todo esse período, pelas constantes trocas de experiências e saídas que fizeram essa fase mais divertida e leve!

À minha amiga Thays, que compartilhou tantos momentos de alegrias e tristezas, que me auxiliou nos ensaios biológicos, mas também me fez companhia em todos os momentos desse doutorado. Muito obrigada pela constante motivação, pelos ensinamentos e pela grande amizade que espero que só se fortaleça com o passar dos anos.

A todos do Laboratório de Nano & Biotecnologia para Desenvolvidos Avançados (LaNBDA): Ismail, Maria Fernanda, Daniel, Priscilla, Franciele, Bruna, Elaine e Ohanna pela colaboração e pelos momentos compartilhados dentro e fora da UNICAMP. Ao Gabriel Perli, por compartilhar discussões tanto fenomenológicas sobre os lipossomas como filosóficas sobre a vida, foi um prazer trabalhar com você. Um agradecimento especial ao Gilson, que sempre nos auxiliou profissional e pessoalmente, e se tornou um grande amigo.

A todos meus amigos de Curitiba, que mesmo à distância, se mantiveram presentes, durante todos esses anos longe de casa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) – código de financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): processos FAPESP 2017/08636-2 e 2018/05278-0 (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE).

Por fim, e mais importante, gostaria de agradecer a Deus por me guiar durante todos os dias dessa incrível jornada.

RESUMO

Carreadores não-virais, especialmente os baseados em lipídeos, têm sido bastante utilizados como sistemas de liberação sustentada de genes e fármacos para o tratamento de doenças no âmbito das terapias medicamentosa e gênica. Dentre os métodos de obtenção, o campo da microfluídica viabiliza a produção de sistemas nanoparticulados uniformes e em processos reprodutíveis. Nesse contexto, esse trabalho visou desenvolver processos microfluídicos para a produção de micro e nanocarreadores lipídicos, compreendendo lipossomas catiônicos funcionalizados com polietilenoglicol (PEG) (*stealth*) e, ainda, microbolhas revestidas por lipídeos. Na primeira etapa desse projeto, por meio de dispositivos microfluídicos baseados em focalização hidrodinâmica, verificou-se que o aumento da força iônica levou à alteração do mecanismo de auto-agregação lipídica, evitando a formação de micelas e promovendo a síntese de lipossomas catiônicos *stealth* (SCL) (contendo 1% de lipídeo DSPE-PEG₂₀₀₀) monodispersos. Condições de elevada força iônica resultaram na formação de SCL com diâmetro médio em torno de 140 nm e índice de polidispersidade (PDI) abaixo de 0,2. Os SCL foram caracterizados através das técnicas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM), indicando a formação de SCL multilamelares concomitantemente ao aumento da força iônica. Por fim, estudou-se a complexação destes nanocarreadores lipídicos com material genético (DNA plasmidial) e avaliou-se a capacidade de entrega gênica a partir da transfecção em células de câncer de próstata (PC3) e em células normais do epitélio da próstata (PNT2). Na segunda etapa desse trabalho, diferentes dispositivos microfluídicos foram estudados para formação de microbolhas estabilizadas por lipídeos. Investigou-se a influência dos parâmetros de processo para otimização da produção de microbolhas monodispersas, visando futuras aplicações como agentes de contraste para imagem ultrassônica ou como vetores de liberação gênica. Assim, este estudo contribuiu para a fundamentação fenomenológica e para o desenvolvimento de processos microfluídicos para síntese de carreadores lipídicos. Esta tecnologia destaca-se como ferramenta promissora para diversas aplicações na área da nanomedicina.

Palavras chave: Microfluídica, lipossomas, microbolhas, agente carreador, PEG, funcionalização de superfície, entrega gênica.

ABSTRACT

Non-viral carriers, especially lipid-based ones, have been used as sustained drug and gene delivery systems for the treatment of diseases in the fields of drug and gene therapy. Among the production methods, microfluidic platforms allow the synthesis of nanoparticulate systems with uniform properties in reproducible processes. In this context, this work aimed at developing microfluidic processes for production of lipid-based micro and nanocarriers, regarding cationic liposomes functionalized with poly(ethylene glycol) (PEG) (stealth) and lipid-coated microbubbles. In the first phase of this project, through microfluidic devices based on hydrodynamic focusing, we discovered that the increase in ionic strength leads to the modulation of lipid self-assembly mechanism, preventing micelle formation and promoting the synthesis of monodisperse stealth cationic liposomes (SCL) (with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀ lipid). High ionic strength conditions resulted in SCL with mean diameter of 140 nm and polydispersity index (PDI) lower than 0.2. The SCL were further characterized by small-angle X-ray scattering (SAXS) and transmission electron cryomicroscopy (cryo-TEM) techniques, indicating the formation of multilamellar SCL concomitantly to the increase in ionic strength. Finally, we studied the complexation of these lipid nanocarriers with genetic material (plasmidial DNA) and we assessed their gene delivery ability in terms of transfection efficiency in prostate cancer cells (PC3) and normal prostate epithelium cells (PNT2). In the second stage of this project, different microfluidic devices were studied for the formation of monodisperse lipid-stabilized microbubbles. We investigated the influence of process parameters for the optimization of monodisperse microbubbles production, aiming at future applications as ultrasound contrast agents and as gene delivery vectors. Thus, this study contributed to the phenomenological understanding and to the development of microfluidic processes for synthesis of lipid carriers. This technology stands out as a promising tool for different applications in the field of nanomedicine.

Keywords: Microfluidics; liposomes; microbubbles; carriers; PEG; surface functionalization; gene delivery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 2

Figura 2.1. (A) Quimiostato microfluídico utilizado para o crescimento de bactérias. (B) Dispositivo do tipo *organ-on-a-chip* para biomimetizar a barreira alvéolo-capilar de um pulmão humano, o qual foi fabricado a partir do co-cultivo de células epiteliais alveolares humanas e células endoteliais microvasculares pulmonares em lados opostos de uma membrana de PDMS porosa flexível revestida com matriz extracelular. Barra de escala: 200 μm . (C) Dispositivo microfluídico tridimensional sequencial fabricado com capilares de vidro para nanoprecipitação de nanopartículas do tipo *core-shell*.27

Figura 2.2. Algumas configurações de dispositivos microfluídicos. (A) Geometrias para canais de entrada: formato *Y-junction* (esquerda), geometria tipo *co-flow* (centro) e focalização hidrodinâmica. (B) Sistemas para a mistura de fluidos imiscíveis, resultando na formação de gotas: (i) focalização hidrodinâmica, (ii) fluxo coaxial, e fluxo cruzado nos formatos (iii) *T-junction* e (iv) *Y-junction*.29

Figura 2.3. Diversidade de sistemas nanoparticulados explorados para liberação de fármacos e genes. O quadro à direita apresenta diferentes possibilidades de funcionalização superficial.31

Figura 2.4. (A) Estrutura geral de fosfolipídeos: como exemplo, o lipídeo fosfatidilcolina. (B) Representação da estrutura de um lipossoma para veiculação de fármacos e genes.33

Figura 2.5. Estrutura de fosfolipídeos EPC, DOTAP e DOPE utilizados para formação de lipossomas catiônicos (CL), incluindo DSPE-PEG que foi empregado neste trabalho de tese.35

Figura 2.6. Esquema da formação de lipossomas em microcanais através da técnica da focalização hidrodinâmica.36

Figura 2.7. Esquema apresentando a estrutura de lipossomas PEGuilados (*stealth*) que podem ser superficialmente funcionalizados para promover a endocitose mediada por receptor usando ligantes direcionados, como anticorpos, peptídeos, proteínas, carboidratos, dentre outras moléculas.38

Figura 2.8. (A) Esquema de representação de uma microbolha revestida por monocamada lipídica, e possibilitando diversas funcionalizações superficiais, como PEG, anticorpos e até lipossomas. (B) Diagrama representando terapia gênica mediada por destruição da microbolha por ultrassom.41

Capítulo 3

Figure 3.1. Intensity (a), volume (b), and number-weighted (c) size distributions of SCL with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀ produced in hydrodynamic focusing devices applying water as side streams. The lines represent independent replicates (n=3). Cryo-TEM image with size distribution histogram (gaussian fit R²>0.98) presenting the aggregates generated by this system (scale bar indicates 100 nm) (d). Optical microscopy image of the microfluidic system, showing the formation of microaggregates (red arrow) after 10 min of processing (scale bar indicates 100 μm) (e).51

Figure 3.2. Microscopic images with time evolution of SCL (with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) synthesis applying side streams composed of PBS of 10 mM (A), showing the presence of microaggregates (red arrows), and PBS of 50 mM (B). The scale bar indicates 100 μm55

Figure 3.3. Effects of increasing ionic strength for the synthesis of SCLs (with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) by applying side streams composed of PBS from 0 (only ultrapure water) to 50 mM. Physicochemical characterization in terms of intensity-weighted hydrodynamic mean diameter (a), zeta potential (b) and polydispersity index (PDI) (c). The error bars indicate the standard deviation of independent triplicates.56

Figure 3.4. Intensity-weighted size distribution of stealth cationic liposomes (SCL) (1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) prepared with increasing ionic strength of the side streams by applying PBS from 0 (only ultrapure water) to 50 mM. The lines represent independent replicates (n=3).59

Figure 3.5. Hypothetical illustration of the effects of low (a) and high (b) ionic strength conditions on the formation of stealth cationic liposomes (SCLs) with the inclusion of poly(ethylene glycol) (PEG)-lipids via microfluidic hydrodynamic flow-focusing platforms.61

Figure 3.6. Intensity-weighted size distributions of SCL with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀ produced with PBS 50 mM via bulk mixing process (a) and via microfluidic hydrodynamic focusing devices (b). The lines represent independent replicates (n=3).63

Capítulo 4

Figura 4.1. Características físico-químicas de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em concentrações de PBS de 50 mM e submetidos ao pós tratamento de diálise e concentração. (a) Diâmetro hidrodinâmico médio ponderado por intensidade de partículas, (b) Índice de polidispersidade (PDI) e (c) Potencial zeta. As barras de erro representam o desvio padrão entre triplicatas independentes. (*) Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre pares.86

Figura 4.2. Distribuição de tamanhos ponderada por intensidade de partículas para lipossomas catiônicos *stealth* (SCL) (com 1% (molar) de DSPE-PEG), preparados em PBS 50 mM. (a) Amostra original; (b) após diálise em membrana MWCO 3,5 kDa; e (c) após concentrador a vácuo. As linhas representam distribuições de tamanho para triplicatas independentes.87

Figura 4.3. Intensidade de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em água (*water*) e em diferentes concentrações de PBS entre 10 e 50 mM. A amostra de DSPE-PEG₂₀₀₀ corresponde à amostra de micelas. Os SCL preparados em PBS foram previamente dialisados, e todas as amostras foram submetidas à concentração a vácuo para análise por SAXS.89

Figura 4.4. (a) Imagens obtidas por criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM) de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em PBS 10 mM. A barra de escala indica 100 nm. (b) Histograma da análise de distribuição de tamanho de partículas (n=200). (c) Distribuição de tamanhos ponderada por número de partículas obtida pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os SCL foram preparados em PBS 10 mM empregando dispositivos microfluídicos e, em seguida, foram dialisados e submetidos à concentração a vácuo, previamente às análises de cryo-TEM e DLS.91

Figura 4.5. (a) Imagens obtidas por criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM) de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em PBS 50 mM. Setas vermelhas evidenciam a presença de SCL multilamelares. As barras de escala indicam 100 nm. (b) Histograma da análise de distribuição de tamanho de partículas (n=77). Os SCL preparados em PBS 50 mM foram dialisados e, em seguida, submetidos à concentração a vácuo para análise por cryo-TEM.92

Figura 4.6. Características físico-químicas de lipoplexos nas razões molares de carga (R_{\pm}) entre 1,5 e 10, formados com lipossomas catiônicos *stealth* (SCL – 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em PBS 50 mM. (a) Diâmetro hidrodinâmico médio ponderado por intensidade de partículas, (b) Índice de polidispersidade (PDI) e (c) Potencial zeta. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de triplicatas independentes. (*) Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) para lipoplexos quando comparados com os SCL (não complexados) ou entre pares.95

Figura 4.7. Caracterização de lipoplexos (LPX) formados por SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em PBS 50 mM em R_{\pm} de 3. (a) Distribuição de tamanhos ponderada por intensidade e (b) número de partículas, antes do processo de concentração a vácuo. As linhas correspondem a triplicatas independentes (c) Imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM). As setas vermelhas evidenciam a presença do pDNA entre as bicamadas lipídicas. As barras de escala indicam 100 nm. Após complexação, os LPX foram submetidos à concentração a vácuo para análise por cryo-TEM.97

Figura 4.8. Eletroforese em gel de agarose para avaliação da incorporação de pDNA em lipossomas catiônicos (CL) e lipossomas catiônicos *stealth* (SCL – 1% de DSPE-PEG), ambos preparados em microfluídica. Os CL foram sintetizados com correntes laterais de água, enquanto os SCL em PBS 10

e 50 mM. Controle positivo (pDNA +) composto por DNA livre, seguido por lipoplexos preparados em bulk na razão molar de cargas (R_{\pm}) de 3.98

Figura 4.9. Imagens de microscopia de fluorescência de células PC3 transfectadas com pDNA codificante para GFP (filtro para FITC), utilizando os nanocarreadores: (a) CL sintetizados em água, (b) SCL sintetizados em PBS 10 mM e (c) SCL sintetizados em PBS 50 mM. Todos os lipoplexos foram formados em bulk em R_{\pm} de 3. Imagens em campo claro (à esquerda) e de fluorescência com filtro para FITC (à direita). As barras de escala indicam 500 μm100

Figura 4.10. Ensaios de transfecção em células PNT2 e PC3 de lipoplexos com R_{\pm} de 3, avaliando-se CL, e SCL sintetizados em PBS 10 mM e 50 mM. (a) Eficiência de transfecção e (b) Intensidade de fluorescência. Controle negativo (CTRL) e positivo (Lipofectamina® 2000). As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duplicatas independentes.101

Figura 4.11. Imagens de microscopia de fluorescência para células (a) PNT2 e (b) PC3 marcados com corante Hoechst (filtro para DAPI), marcador de DNA. Setas vermelhas indicam presença de DNA além dos núcleos celulares.103

Capítulo 5

Figure 5.1. (a) Schematic drawing of the microfluidic step-emulsification geometry used to produce microbubbles. The chip has channels with heights of 1 μm (blue) and 20 μm (grey). (b) Optical image of the microchannel array at the end of the microfluidic chip, containing 5 μm wide channels for bubble production (scale bar: 100 μm).111

Figure 5.2. Microfluidic chip based on hydrodynamic focusing developed for microbubble synthesis. (a) The nozzle width varied between 5, 10 and 20 μm , and the outlet channel had an expansion chamber of 300 μm of width. (b) Zoom at the co-flow geometry developed to increase the stability of the production. In both conditions, lipids are dispersed in the continuous aqueous phase.113

Figure 5.3. Microfluidic system for polymerized shell microbubble (PSM) synthesis using step-emulsification chip. (a) Confocal micrograph of the microfluidic channels using rhodamine B dye to demonstrate the step from 1 μm to 20 μm between the gas inlet and reservoir outlet channels. (b) Optical image of the microfluidic array channel during the microbubbles production. (c) Optical image of the collected microbubbles after UV-polymerization. (d) Size distribution histogram of PSM produced through this set-up.117

Figure 5.4. Optimized microfluidic synthesis of polymerized shell microbubble (PSM) using step-emulsification devices and oxygen plasma surface treatment. (a) Optical image of the microfluidic array channel during the microbubbles production. Zoomed image was taken with a high-speed camera. (b) Productivity of microbubbles within the microfluidic chip. The gas inlet pressure (P_{gas}) was kept at 2 bar while liquid inlet pressure (P_{liq}) varied. (c) Optical image of the collected microbubbles after UV-polymerization (PSM) and (d) corresponding size distribution histogram for process condition of $P_{\text{gas}}/P_{\text{liq}}$ of 0.6.118

Figure 5.5. (a) Hydrodynamic focusing microfluidic chip used for lipid-coated microbubbles, with size distribution of the microbubbles produced. (b) Optical micrograph of the polymerized shell microbubbles (PSMs) 24h after UV-polymerization. (c) Size distribution histogram of PSMs after 24h.120

Figure 5.6. Surface tension measurements of various phospholipid compositions (0,5% of total lipid concentrations) in different aqueous phases: deionized water with 10% (m/m) sucrose (Suc) and glycerol:propylene glycol:water (GPW) solution (10:10:80 %). The error bars indicate standard deviation of independent triplicates.122

Figure 5.7. Optimization for microfluidic synthesis of DSPC:DSPE-PEG₂₀₀₀-coated (0.5wt%) microbubbles. Air-filled microbubbles produced using side streams composed of (a) lipids dispersed in 10wt% sucrose aqueous solution and (b) lipids dispersed in PBS 10 mM containing 10wt% of sucrose. (c) Investigation of gas inlet containing air and perfluorohexane ($\text{C}_6\text{F}_{14}(\text{g})$) and lipids dispersed in PBS 10 mM with 10% sucrose. All microfluidic conditions applied gas inlet pressure of 220 mbar and liquid inlet flow rate of 30 $\mu\text{L}/\text{min}$124

Figure 5.8. (a) Co-flow microfluidic geometry for synthesis of lipid-coated microbubbles (DSPC:DSPE-PEG₂₀₀₀ in deionized water with 10% sucrose), using PBS 10 mM as stabilizing flows (scale bar: 100 μ m). (b) Fluorescence analysis showing FITC-tagged lipids adsorbed at the surface of the microbubbles (scale bar: 100 μ m). (c) Microbubbles characterized after collection in a tube, with (d) corresponding size distribution histogram (scale bar: 30 μ m).....127

Figure 5.9. (a) Optical micrographs of the microbubbles collected on top of a glass slide directly from the co-flow microfluidic production set-up. (b) Size distribution histograms evaluating the stability of the final characteristics of the microbubbles during collection.128

Apêndice I

Figura I.1. Possíveis rotas para síntese de fosfolipídeos funcionalizados.152

Figura I.2. Esquema representando complexos funcionalizados para a entrega de siRNA. A sequência peptídica RGD favorece interações específicas com os receptores celulares da família das integrinas, sendo os receptores $\alpha_v\beta_3$ geralmente recorrentes em células tumorais. Assim, os complexos são internalizados pelas células por endocitose mediada pelos receptores $\alpha_v\beta_3$, proporcionando a liberação do siRNA do endossoma/lisossoma e uma eficiente modulação da expressão gênica. 153

Figura I.3. Esquema da reação de derivatização do lipídeo (DSPE) funcionalizado com polietilenoglicol (PEG) e succinimidil (NHS), sendo derivatizado com o peptídeo RGD cíclico (cRGD).156

Figura I.4. Espectros de massas (ESI-TOF-MS) do lipídeo DSPE-PEG derivatizado com cRGD. (a) Espectro total. (b) Distribuição ampliada, na qual as setas vermelhas indicam lipídeo derivatizado DSPE-PEG-cRGD, com intervalos de m/z igual a 5.157

Figura I.5. Espectro de Massas (MALDI-TOF-MS) do lipídeo DSPE-PEG após derivatização com o peptídeo cRGDfK (a) utilizando o primeiro método em PBS e (b) o segundo método, em solvente dimetilformamida.159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ζ	Potencial Zeta (mV)
<i>bulk</i> :	Método convencional de produção
CL	Lipossomas Catiônicos
cRGD	Peptídeo RGD cíclico, baseado na sequência de aminoácidos arginina, glicina e aspartato
cryo-TEM	<i>Transmission Electron Cryomicroscopy</i> – Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão
DLS:	<i>Dynamic Light Scattering</i> – Espalhamento de luz dinâmico
DOPE:	1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidiletanolamina
DOTAP	1,2-dioleil-3-trimetilamônio-propano
DSPC	1,2-diestearil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
DSPE	1,2-diestearil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
DSPE-PEG ₂₀₀₀	1,2-diestearil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000]
EPC	L- α -fosfatidilcolina de ovo
FRR	<i>Flow Rate Ratio</i> – Razão entre taxas de fluxo
PBS	Tampão Fosfato Salino
PC3	Células de câncer de próstata
PDI	Índice de polidispersidade
PDMS	Polidimetilsiloxano
pDNA	Ácido desoxirribonucleico plasmidial
PEG	Polietilenoglicol
PNT2	Células normais do epitélio da próstata
Q _T	Vazão volumétrica total do sistema
R _±	Razão molar de cargas, relacionando moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos e cargas negativas do material genético
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i> – Espalhamento de raios X a baixo ângulo
SCL	Lipossomas catiônicos <i>stealth</i> , funcionalizados com PEG

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	19
1.1. Objetivos	21
1.1.1. Objetivos Específicos.....	21
1.2. Apresentação da Tese	22
2. Revisão Bibliográfica	24
2.1. Microfluídica	24
2.1.1. Fundamentos do escoamento em microescala	24
2.1.2. Microfluídica e a formação de sistemas particulados.....	28
2.2. Nanocarreadores catiônicos e complexação com DNA	30
2.3. Carreadores lipídicos	32
2.3.1. Lipossomas catiônicos.....	33
2.3.2. Funcionalização superficial de carreadores.....	37
2.3.3. Microbolhas revestidas por lipídeos.....	40
3. Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices	44
Abstract.....	44
3.1. Introduction.....	45
3.2. Material and Methods	47
3.2.1. Material	47
3.2.2. Methods	48
3.2.2.1. Microfabrication.....	48
3.2.2.2. Cationic and Stealth Liposomes microfluidic production	48
3.2.2.3. Physicochemical characterization	49
3.2.2.4. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)	49
3.3. Results and Discussion	50
3.3.1. Synthesis applying side streams of ultrapure water	50
3.3.2. Ionic strength modulation.....	54
3.3.2.1. Microaggregation	54
3.3.2.2. SCL physicochemical properties.....	56
3.3.2.3. SCL size distribution	59
3.3.3. Proposed mechanism for microfluidic synthesis of SCL	60
3.3.4. Bulk versus Microfluidics.....	62

3.4. Conclusions.....	64
Acknowledgements	65
4. Caracterização Estrutural e Morfológica de Lipossomas Catiônicos <i>Stealth</i> Produzidos em condições de Elevada Força Iônica	73
Resumo	73
4.1. Introdução	74
4.2. Material e métodos	76
4.2.1. Material	76
4.2.2. Métodos	77
4.2.2.1. Produção de dispositivos microfluídicos	77
4.2.2.2. Produção de Lipossomas Catiônicos <i>Stealth</i> (SCL)	78
4.2.2.3. Diálise	78
4.2.2.4. Amplificação do DNA plasmidial	79
4.2.2.5. Preparo de lipoplexos	79
4.2.2.6. Eletroforese em gel de agarose	80
4.2.2.7. Transfecção celular de lipoplexos.....	80
4.2.2.8. Ensaio de coloração de Hoechst	81
4.2.2.9. Caracterização Físico-Química dos Nanocarreadores	81
4.2.2.10. Morfologia	82
4.2.2.11. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	83
4.2.2.12. Análise Estatística.....	84
4.3. Resultados	84
4.3.1. Efeito da força iônica na estrutura e morfologia dos SCL	85
4.3.1.1. Caracterização estrutural	88
4.3.1.2. Caracterização morfológica	90
4.3.2. Efeito da complexação com material genético.....	94
4.3.3. Efeitos na transfecção celular	99

4.4. Conclusões.....	103
Material suplementar	105
5. Lipid-Coated Microbubbles Produced via Microfluidics aiming at Ultrasonic Imaging and Gene Delivery Applications	108
Abstract.....	108
5.1. Introduction.....	109
5.2. Material and Methods.....	110
5.2.1. Material	110
5.2.2. Methods	110
5.2.2.1. Design and fabrication of microfluidic chips.....	110
5.2.2.2. Production of lipid-coated microbubbles	112
5.2.2.3. Characterization.....	114
5.3. Results and Discussion	115
5.3.1. Optimization of polymerized shell microbubbles production	115
5.3.1.1. Step-emulsification devices	115
5.3.1.2. Hydrodynamic focusing devices.....	119
5.3.2. Evaluation of process parameters on microfluidic synthesis of lipid-coated microbubbles	121
5.3.2.1. Continuous phase components.....	121
5.3.2.2. Microfluidic process parameters	123
5.4. Final Remarks	129
6. Discussão Geral	130
7. Conclusões	133
8. Perspectivas de Trabalhos Futuros.....	135
9. Referências	137
APÊNDICE I – Estudos exploratórios para síntese do lipídeo DSPE-PEG-cRGDfk para formação de lipossomas para liberação gênica direcionada .	151
1. Introdução	151
2. Material e métodos.....	154
2.1. Material	154
2.2. Métodos	154
2.2.1. Derivatização do lipídeo DSPE-PEG-NHS com peptídeo cRGDfK.	154

3. Resultados	155
3.1 Derivatização química de lipídeo DSPE-PEG com peptídeo cíclico cRGD	155
4. Conclusões Parciais	160
ANEXO I – Depósito de Patente Nacional (2017)	161
ANEXO II – Artigo Publicado na Revista Científica <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> (2019)	162
ANEXO III – Licença de publicação de artigo na tese	163
ANEXO IV – Capítulo aceito para publicação no livro “DNA Vaccines: Methods and Protocols” (previsto para 2020).....	164

1. Introdução Geral

A microfluídica é uma área multidisciplinar que se baseia no processamento de pequenas quantidades de fluidos, utilizando dispositivos de escala micrométrica (WHITESIDES, 2006). Devido às reduzidas dimensões, sistemas microfluídicos envolvem propriedades hidrodinâmicas únicas, possibilitando operações de modo contínuo e escoamento em regime laminar (CONVERY; GADEGAARD, 2019). Em virtude da grande variedade de matéria-prima que pode ser manipulada para fins específicos, os dispositivos microfluídicos se destacam como ferramentas interessantes nas mais diversas áreas, incluindo biotecnologia e nanomedicina, mais especificamente na produção de nanopartículas e nanoagregados para aplicações terapêuticas (BJÖRNMALM; YAN; CARUSO, 2014; ZHANG; ZHU; SHEN, 2018).

Dentre as diferentes aplicações, a terapia gênica é um campo que tem utilizado extensivamente sistemas nanoparticulados como carreadores não virais de ácidos nucleicos (BUCK et al., 2019). A terapia gênica consiste na transferência de material genético a células e órgãos-alvo de forma a modular a expressão gênica terapêutica de interesse, visando ao tratamento e à prevenção de doenças (SHIRLEY et al., 2020). Contudo, o sucesso dessa técnica é limitado pelas barreiras que naturalmente existem para a transfecção celular, ou seja, de entrega do gene de interesse no interior e ao núcleo das células-alvo (EVERS et al., 2018). Assim, carreadores têm sido investigados por proporcionarem proteção ao material genético contra degradação enzimática, alta estabilidade, grande disponibilidade de matéria-prima e baixo custo (PENG et al., 2020).

Vetores não virais podem ser formados a partir de lipídeos, polissacarídeos ou proteínas, destacando-se os de natureza catiônica, por apresentarem capacidade de interagir eletrostaticamente com os ácidos nucleicos, formando complexos eficientes para liberação gênica (BORDET; BEHAR-COHEN, 2019). Dentre os vetores lipídicos, os lipossomas catiônicos (CL), os quais consistem em vesículas formadas pela auto-agregação de lipídeos, têm atraído interesse por possibilitarem a condensação e carreamento de genes às células (BALBINO; AZZONI; DE LA TORRE, 2013; DE JESUS; ZUHORN, 2015).

Ademais, nanocarreadores não virais possibilitam modificações de superfície, como pela funcionalização com polímeros como o polietilenoglicol (PEG), o que

resulta em lipossomas (*stealth*) com uma maior estabilidade estérica e prolonga o tempo de circulação na corrente sanguínea (SUK et al., 2016). A funcionalização superficial, a qual geralmente utiliza lipídeos PEGuilados acoplados a ligantes específicos, torna possível a veiculação gênica sítio-específica (*targeted delivery*) e promove transfecções celulares mais eficientes (NIEBERLER et al., 2017).

Essa funcionalização superficial também tem sido explorada para outros vetores lipídicos, mais especificamente microbolhas revestidas por monocamada lipídica (TIAN et al., 2020; ZHOU et al., 2020). Sistemas lipídicos do tipo microbolhas são alternativas com potencial para serem aplicados como agentes de contraste para imagem ultrassônica ou como vetores de entrega gênica. Revestimentos finos compostos de surfactantes, como fosfolipídeos, são empregados para estabilizar a superfície de microbolhas, de forma a evitar a dissolução do gás, promover maior estabilidade e reduzir a probabilidade de coalescência (CHU et al., 2019). Dependendo da frequência aplicada, ultrassom também pode ser usado para fragmentar ou destruir microbolhas, oferecendo a possibilidade de entrega local de fármacos e genes (TIAN et al., 2020).

Frente às técnicas convencionais, a utilização de processos microfluídicos para a síntese de carreadores permite avanços tecnológicos envolvendo métodos novos e aperfeiçoados para sua produção (ZHANG; ZHU; SHEN, 2018). Dispositivos microfluídicos possibilitam a produção de partículas com propriedades físico-químicas de interesse em processos reprodutíveis, como tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta (MAEKI et al., 2018).

Nosso grupo de pesquisa já reportou o sucesso da utilização de dispositivos microfluídicos para síntese de lipossomas catiônicos unilamelares com diâmetros nanométricos (BALBINO et al., 2013, 2016; BALBINO; AZZONI; DE LA TORRE, 2013). Porém, a formação de lipossomas PEGuilados empregando dispositivos microfluídicos ainda é tema de poucos estudos reportados na literatura. Neste contexto, o grande desafio desta pesquisa foi compreender o mecanismo de formação de carreadores lipídicos revestidos com PEG (*stealth*), explorando e aprofundando diferentes parâmetros de processo microfluídico. Isto é fundamental para possibilitar aplicações mais avançadas, como a inclusão de ligantes específicos, viabilizando o desenvolvimento de sistemas mais aperfeiçoados para terapia gênica.

Processos capazes de produzir sistemas carreadores funcionalizados podem resultar em produtos terapêuticos mais viáveis tecnológica e biologicamente. A investigação de novas micro e nanoestruturas carreadoras, como lipossomas funcionalizados e microbolhas estabilizadas com lipídeos, se mostram de significativa importância como estratégias para viabilizar a prospecção e desenvolvimento de tecnologias comerciais de vetores de material genético para aplicações médicas e, mais especificamente, em nanomedicina.

1.1. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo contribuir nas áreas de microfluídica e nanomedicina, como um estudo fundamental da síntese microfluídica de micro e nanocarreadores de material genético baseados em lipídeos, compreendendo lipossomas catiônicos *stealth* (SCL) e microbolhas estabilizadas por lipídeos.

Para alcançar esse objetivo, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos.

1.1.1. Objetivos Específicos

- Investigação de processo microfluídico para a síntese de lipossomas catiônicos *stealth* (SCL), funcionalizados com PEG:
 - Investigação do efeito da força iônica como variável de processo para formação de SCL com características uniformes;
 - Estudo da fundamentação fenomenológica, caracterização físico-química, estrutural e morfológica dos nanocarreadores formados em diferentes condições de força iônica;
 - Avaliação dos fenômenos coloidais da complexação com DNA plasmidial (pDNA) sobre a atividade biológica, incluindo citotoxicidade e transfecção em células de câncer de próstata (PC3).

- Avaliação de dispositivos microfluídicos para síntese de sistemas lipídicos de microbolhas:
 - Influência e otimização de parâmetros de processo visando à obtenção de microbolhas monodispersas e em processos reprodutíveis.

1.2. Apresentação da Tese

Este trabalho está apresentado na forma de capítulos, dentre os quais um deles (*Capítulo 3*) se refere a um artigo já publicado em revista científica internacional e os demais a trabalhos em fase de elaboração para submissão.

No Capítulo 2, *Revisão Bibliográfica*, descrevem-se os fundamentos teóricos referentes à aplicação da microfluídica como plataforma para a síntese de carreadores lipídicos, compreendendo lipossomas e microbolhas revestidas por lipídeos, visando aplicações nanomédicas, mais especialmente de liberação gênica.

No Capítulo 3, *Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices*, o desenvolvimento de um processo microfluídico para viabilizar a síntese de lipossomas catiônicos *stealth* (SCL) é apresentado. São descritas as limitações inerentes à síntese microfluídica de SCL, dentre elas a formação concomitante de micelas oblatas, e a investigação da força iônica como variável de processo capaz de modular a auto-agregação lipídica para formação de lipossomas monodispersos em processos reprodutíveis. Este trabalho foi desenvolvido em autoria conjunta com o aluno Gabriel Perli, no qual ambos os autores contribuíram igualmente, e culminou no depósito de uma patente nacional (BR10 2017 025862 9 – Anexo I) e em manuscrito publicado na revista científica *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Anexos II e III). Além disso, o protocolo microfluídico desenvolvido para a síntese de CL e SCL foi aceito para publicação em um capítulo do livro “*DNA Vaccines: Methods and Protocols*”, que está previsto para publicação em 2020 (Anexo IV).

No Capítulo 4, *Caracterização estrutural e morfológica de lipossomas catiônicos stealth produzidos em condições de elevada força iônica*, utilizaram-se técnicas de caracterização estrutural (SAXS) e morfológica (cryo-TEM) para elucidar os efeitos da força iônica sobre as características físico-químicas finais dos SCL obtidos por sistemas microfluídicos. Além disso, avaliou-se a formação de lipoplexos formados com material genético (pDNA) e SCL produzidos em diferentes condições de força iônica para avaliação biológica em termos de transfecção em células de câncer de próstata (PC3). Esta etapa foi realizada com contribuições do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus, do Instituto de Biologia da Unicamp, que possuem ampla experiência na transfecção de células de mamíferos; e em

colaboração com o Dr. Antônio A. Malfatti-Gasperini, do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

No Capítulo 5, *Lipid-coated microbubbles produced via microfluidics aiming at ultrasonic imaging and gene delivery applications*, se refere às atividades desenvolvidas durante estágio de pesquisa na *École Supérieure de Physique et Chimie Industrielles* (ESPCI Paris), no laboratório *Microfluidique, MEMs et Nanostructures* (MMN) sob supervisão do Prof. Patrick Tabeling. Neste, investigaram-se diferentes dispositivos microfluídicos para síntese de microbolhas revestidas por lipídeos de forma monodispersa e reprodutível, com perspectiva para futuras aplicações em imagem ultrassônica ou vetores de liberação gênica.

O Capítulo 6, *Discussão Geral*, apresenta uma discussão sobre os temas e as principais descobertas envolvidas nesta tese de doutorado. Nos Capítulos 7 e 8, são apresentadas as *Conclusões* e as *Perspectivas de trabalhos futuros* decorrentes desta tese de doutorado. Toda a bibliografia utilizada neste trabalho está apresentada no Capítulo 9, *Referências*.

Por fim, o *Apêndice I* descreve o estudo exploratório envolvendo diferentes protocolos para derivatização química do lipídeo DSPE-PEG₂₀₀₀ com o peptídeo cíclico baseado na sequência dos aminoácidos arginina, glicina e aspartato (cRGD). Este estudo preliminar foi realizado visando à produção de lipossomas funcionalizados para entrega gênica direcionada para receptores de integrinas do tipo $\alpha_v\beta_3$ presentes em células tumorais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Microfluídica

A microfluídica pode ser definida como a ciência e tecnologia que estuda o processamento de pequenas quantidades de fluidos (de micro até picolitros), permitindo sua manipulação em canais na escala micrométrica (10^{-6} m) (WHITESIDES, 2006). Este campo tecnológico oferece a possibilidade de integração de sistemas multidisciplinares e da realização de separações e detecções com alta resolução e sensibilidade, além de favorecer o uso de uma quantidade reduzida de amostras e reagentes e permitir a diminuição do tempo de análise experimental (CONVERY; GADEGAARD, 2019; MA et al., 2017; SQUIRES; QUAKE, 2005; WHITESIDES, 2006).

Sistemas microfluídicos exploram suas reduzidas dimensões concomitantemente a propriedades hidrodinâmicas particulares, como o escoamento em regime laminar, o que proporciona maior previsibilidade e controle da dinâmica espaço-temporal de fluidos (QIAN et al., 2019; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014). Além disso, a razão área superficial/volume muitas vezes maior que em outros sistemas convencionais possibilita reduzir as resistências envolvidas nos processos de transferência de massa e energia nos processos microfluídicos (CONVERY; GADEGAARD, 2019; LEE et al., 2011).

2.1.1. Fundamentos do escoamento em microescala

Enquanto em sistemas em macroescala a mistura é realizada pelo regime turbulento através da mistura convectiva, os processos microfluídicos geralmente operam em condições de regime laminar, nas quais a mistura ocorre por forte influência da difusão molecular (CONVERY; GADEGAARD, 2019; STROOCK et al., 2002; TABELING, 2009; WHITESIDES, 2006). O escoamento em microescala é regido principalmente pelos mecanismos de transferência de massa de difusão e convecção e por um balanço entre as forças viscosas, inerciais e interfaciais (OLIVEIRA et al., 2016; SQUIRES; QUAKE, 2005). A relevância entre estas pode ser determinada por relações adimensionais, sendo as mais relevantes em

microescala o número de Reynolds (Re), número de Péclet (Pe) e número capilar (Ca).

O Re é um dos números adimensionais mais importantes em mecânica dos fluidos e representa a razão entre as forças inerciais e viscosas do sistema, indicando o limite entre o regime laminar ($Re < 2000$) e turbulento ($Re > 4000$). O Re pode ser definido como (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; CONVERY; GADEGAARD, 2019; WEIBEL; WHITESIDES, 2006):

$$Re = \frac{\rho v_o D_h}{\mu} \quad (\text{Equação 1})$$

onde ρ e μ são a densidade e viscosidade do fluido, v_o é a velocidade de escoamento do fluido e D_h é o diâmetro hidráulico, que depende da geometria da seção transversal do microcanal. Devido à escala micrométrica dos canais, os processos microfluídicos geralmente operam em reduzido número de Reynolds, indicando a predominância das forças viscosas no sistema e o escoamento no regime laminar. Neste regime, o fenômeno mais significativo de transferência de massa é a difusão molecular entre os fluidos (CONVERY; GADEGAARD, 2019; SQUIRES; QUAKE, 2005; WHITESIDES, 2006).

O Pe representa a razão entre efeitos convectivos e difusivos de transferência de massa, definindo a mistura ideal entre os fluidos. Este pode ser definido como $Pe = v_o D_h / D$, onde D é o coeficiente de difusão da partícula estudada (JEN et al., 2003). Devido às reduzidas dimensões, a microfluídica envolve valores reduzidos de Pe , indicando processos de mistura mais previsíveis (ATENCIA; BEEBE, 2005; OLIVEIRA et al., 2016).

O Ca é um parâmetro muito importante para desenvolvimento e manipulação de emulsões em sistemas microfluídicos, pois está relacionado à tensão superficial ou interfacial (γ) de fluidos. A tensão superficial descreve a tendência de um fluido de modificar a interface entre superfície-ar através da redução da energia livre, enquanto a tensão interfacial é o mesmo fenômeno, porém aplicado para fluidos imiscíveis (como água e óleo, por exemplo) (CONVERY; GADEGAARD, 2019; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014). Além disso, forças de capilaridade dominam forças gravitacionais em microescala (TABELING, 2009). A capilaridade é um fenômeno de tensão superficial definido como a força que promove o movimento de um fluido através de meios porosos ou capilares estreitos, permitindo a ascensão de

fluidos na direção oposta à gravidade (CONVERY; GADEGAARD, 2019; SQUIRES; QUAKE, 2005). O Ca é a razão entre forças viscosas e capilares e é expresso por $Ca = U\mu/\gamma$, onde μ é a viscosidade do fluido. Assim, baixos valores de Ca resultam em gotas esféricas devido à maior influência da tensão superficial ou interfacial (OLIVEIRA et al., 2016).

Essas propriedades hidrodinâmicas singulares permitem que plataformas microfluídicas possam ser empregadas em diferentes campos de pesquisa com o objetivo de agilizar os protocolos de ensaios complexos, reduzir significativamente o volume de amostras investigadas, reduzir o custo com reagentes e oferece benefícios no desenvolvimento de diagnóstico e de novas ferramentas de pesquisa (GALE et al., 2018; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014; ZHANG; ZHU; SHEN, 2018). Por exemplo, dispositivos desenvolvidos para cultivo de bactérias (Figura 2.1A), dispositivos do tipo *organ-on-a-chip* empregando uma membrana de PDMS porosa flexível para biomimetizar o microssistema do pulmão humano (Figura 2.1B) e dispositivos integrados para produção de nanopartículas através da técnica de nanoprecipitação (Figura 2.1C).

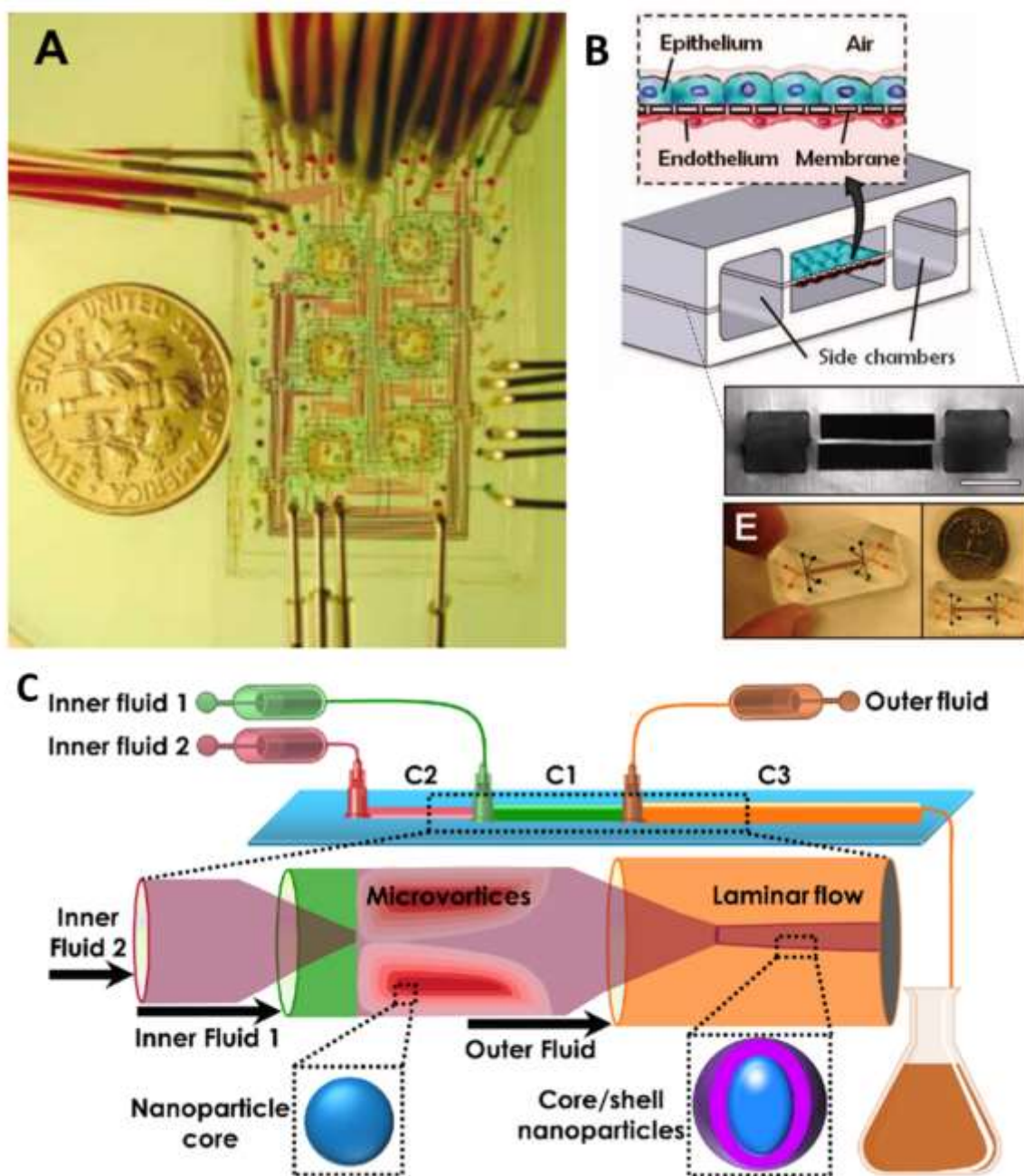


Figura 2.1. (A) Quimiostato microfluídico utilizado para o crescimento de bactérias. (B) Dispositivo do tipo *organ-on-a-chip* para biomimetizar a barreira alvéolo-capilar de um pulmão humano, o qual foi fabricado a partir do co-cultivo de células epiteliais alveolares humanas e células endoteliais microvasculares pulmonares em lados opostos de uma membrana de PDMS porosa flexível revestida com matriz extracelular. Barra de escala: 200 μm . (C) Dispositivo microfluídico tridimensional sequencial fabricado com capilares de vidro para nanoprecipitação de nanopartículas do tipo *core-shell*.

Fonte: (A) Balagaddé et al. (2005), (B) Adaptado de Huh et al. (2010), (C) Liu et al. (2017)

Os avanços na microfabricação permitem que tais sistemas sejam produzidos com diferentes materiais e geometrias específicas para aplicação em diversas áreas. Para aplicações biológicas, os materiais utilizados em microfluídica devem possuir características como biocompatibilidade, estabilidade química e física e baixa

toxicidade. Dentre eles, destacam-se o vidro e alguns polímeros, como o polidimetilsiloxano (PDMS) e o polimetilmetacrilato (PMMA), que são amplamente utilizados para a fabricação de microdispositivos, além de possuírem transparência, o que facilita o monitoramento por microscopia. As técnicas de microfabricação englobam, entre outras, a impressão e estampagem a quente, fotolitografia, ablação a laser, litografia de raio-X, sendo a litografia macia um dos métodos mais comumente aplicados na fabricação de microcanais em microdispositivos construídos com PDMS (CONVERY; GADEGAARD, 2019; DE LA TORRE et al., 2014; GALE et al., 2018).

A flexibilidade de manipular diferentes materiais para aplicações específicas tornou os dispositivos microfluídicos ferramentas importantes para as áreas de nanomedicina e biotecnologia, desde o desenvolvimento de microbiorreatores, de processos de separação e da obtenção de partículas para fins terapêuticos (BJÖRNMALM; YAN; CARUSO, 2014; ZHANG; ZHU; SHEN, 2018).

2.1.2. Microfluídica e a formação de sistemas particulados

A microfluídica possibilita o desenvolvimento de métodos novos e aperfeiçoados para a síntese e caracterização de sistemas micro e nanoparticulados (BJÖRNMALM; YAN; CARUSO, 2014; MA et al., 2017). O emprego de dispositivos microfluídicos promove maior reprodutibilidade e maior controle dos parâmetros de processo e das características do produto final quando comparadas às tecnologias convencionais de produção de nanopartículas (BABU et al., 2014; ZHANG; ZHU; SHEN, 2018). Por meio de processos microfluídicos, torna-se possível superar obstáculos existentes nos métodos convencionais, muitas vezes dispensando etapas adicionais para redução e homogeneização de partículas (ZHANG; ZHU; SHEN, 2018)

Em virtude das dimensões reduzidas e dependendo da geometria dos dispositivos microfluídicos, menores tempos de mistura podem ser alcançados devido à pequena distância de difusão entre os componentes da mistura. A utilização de sistemas de focalização hidrodinâmica (Figura 2.2A), por exemplo, possibilita o aperfeiçoamento da mistura e promove parâmetros reacionais homogêneos (LU et al., 2016). Nesse sistema, a solução central é focalizada por correntes laterais, o que diminui o comprimento de difusão que ocorre em torno da

corrente central, resultando na formação de partículas com maior uniformidade (MA et al., 2017; MAEKI et al., 2018). Quando aplicados fluidos imiscíveis para desenvolvimento de emulsões, esta plataforma também proporciona a síntese de gotas e bolhas uniformes com elevada reprodutibilidade (Figura 2.2B) (MA et al., 2017).

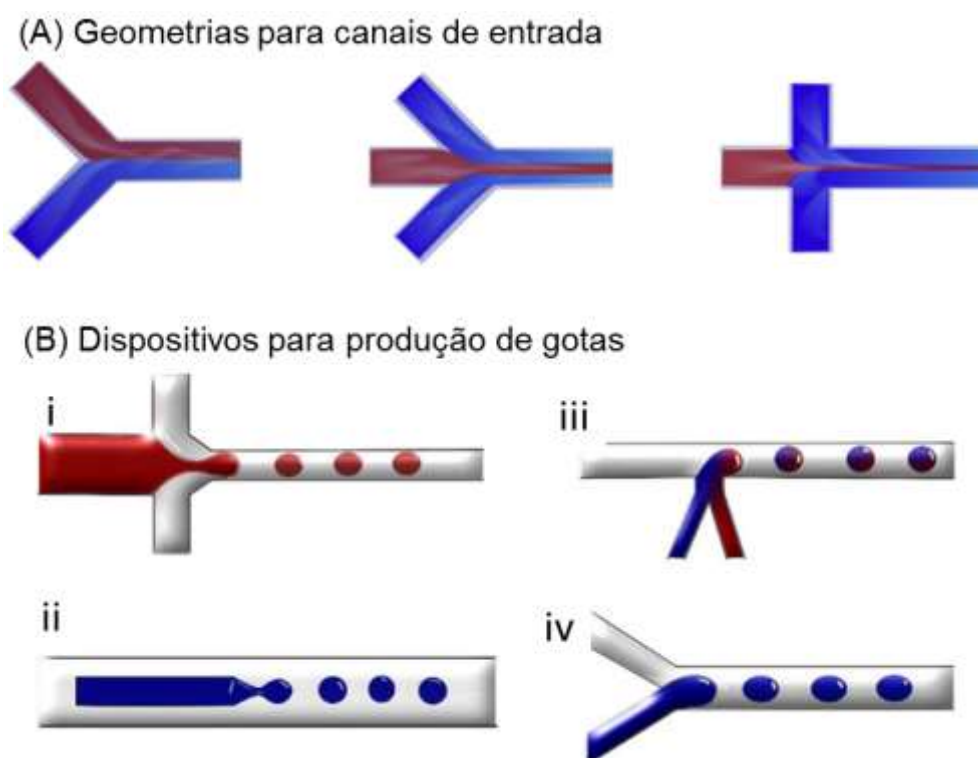


Figura 2.2. Algumas configurações de dispositivos microfluídicos. (A) Geometrias para canais de entrada: formato *Y-junction* (esquerda), geometria tipo *co-flow* (centro) e focalização hidrodinâmica. (B) Sistemas para a mistura de fluidos imiscíveis, resultando na formação de gotas: (i) focalização hidrodinâmica, (ii) fluxo coaxial, e fluxo cruzado nos formatos (iii) *T-junction* e (iv) *Y-junction*. Fonte: (a) Maeki et al. (2018), (b) Oliveira et al. (2016).

Sistemas microfluídicos com operação em regime contínuo têm se mostrado promissores na obtenção de diferentes estruturas em escala nanométrica, como complexos poliméricos, lipossomas, micelas e nanopartículas homogêneas (EVERS et al., 2018; MAEKI et al., 2018). Essas nanoestruturas podem ser obtidas por meio de formação ou auto-agregação, em processos com controle sobre tamanho, polidispersidade, composição e morfologia dos compostos formados.

Por sua vez, principalmente pela possibilidade de carregar compostos de interesse como carga terapêutica, sistemas nanoparticulados têm sido extensivamente estudados e empregados nas áreas farmacêutica, alimentícia,

engenharia de tecidos e nanomedicina, podendo-se destacar sua aplicação como vetores não virais em sistemas de liberação de genes no âmbito da terapia gênica (ZHANG; ZHU; SHEN, 2018).

2.2. Nanocarreadores catiônicos e complexação com DNA

A terapia gênica é uma área muito explorada visando ao tratamento ou à prevenção de doenças (BUCK et al., 2019). Sua estratégia compreende a transferência intracelular de material genético, tais como DNA e RNA, de forma a modular as funções celulares para corrigir genes responsáveis por determinadas doenças, através da expressão ou supressão da biossíntese de proteínas terapêuticas (SHIRLEY et al., 2020). Porém, o sucesso dessa técnica é limitado pela dificuldade de transdução ou transfecção celular, ou seja, de entrega do material genético no interior das células-alvo. Importantes fatores para essa limitação incluem: não-especificidade para as células-alvo, dificuldade de transporte através da membrana celular, susceptibilidade à digestão enzimática por nucleases e endolisossomos quando administrados em sua forma livre (*naked DNA*), e tráfego intracelular do material genético até o núcleo da célula (EVERS et al., 2018; MANSOURI et al., 2004).

Assim, tornou-se necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação de ácidos nucleicos com controle das propriedades físico-químicas, capacidade de proteção do DNA e elevada eficiência de transfecção. Nesse contexto, a nanotecnologia tem atraído interesse por compreender a síntese, desenvolvimento e aplicação de materiais e dispositivos que possuem pelo menos uma das dimensões em escala nanométrica (1-100 nm) (PENG et al., 2020).

De forma geral, os vetores empregados em terapia gênica podem ser classificados como virais e não virais. Os vetores virais consistem em vírus modificados que mantêm a capacidade de infectar células, mas não de se replicar (CARRILLO et al., 2014; SHIRLEY et al., 2020). Eles são os agentes de transdução mais eficientes em terapia gênica, devido aos mecanismos virais de inserção celular, de liberação de ácidos nucleicos e de transporte nuclear (BORDET; BEHAR-COHEN, 2019). Porém, a utilização de vetores virais apresenta limitações como alto custo de produção, restrição do tamanho do material genético a ser carregado, falta

de versatilidade e preocupações com segurança quanto à imunogenicidade, toxicidade e mutagenicidade (BUCK et al., 2019; SHIRLEY et al., 2020).

Por outro lado, os vetores não virais são derivados de materiais como peptídeos, lipídios e polímeros naturais e sintéticos, e podem ser empregados em diversos formatos, como emulsões, vesículas, micelas, lipossomas, micro e nanopartículas, micro e nanoesferas, micro e nanobolhas, e complexos polieletrólíticos (BORDET; BEHAR-COHEN, 2019) (Figura 2.3). Eles têm sido amplamente estudados e empregados em terapia gênica por apresentarem vantagens como alta estabilidade, grande variabilidade de materiais, baixa imunogenicidade e baixo custo (BORDET; BEHAR-COHEN, 2019; CARRILLO et al., 2014; SPAIN et al., 2011). Além disso, pode-se destacar a possibilidade de customização da estrutura do nanocarreador, a partir da funcionalização superficial com moléculas de interesse (Figura 2.3).

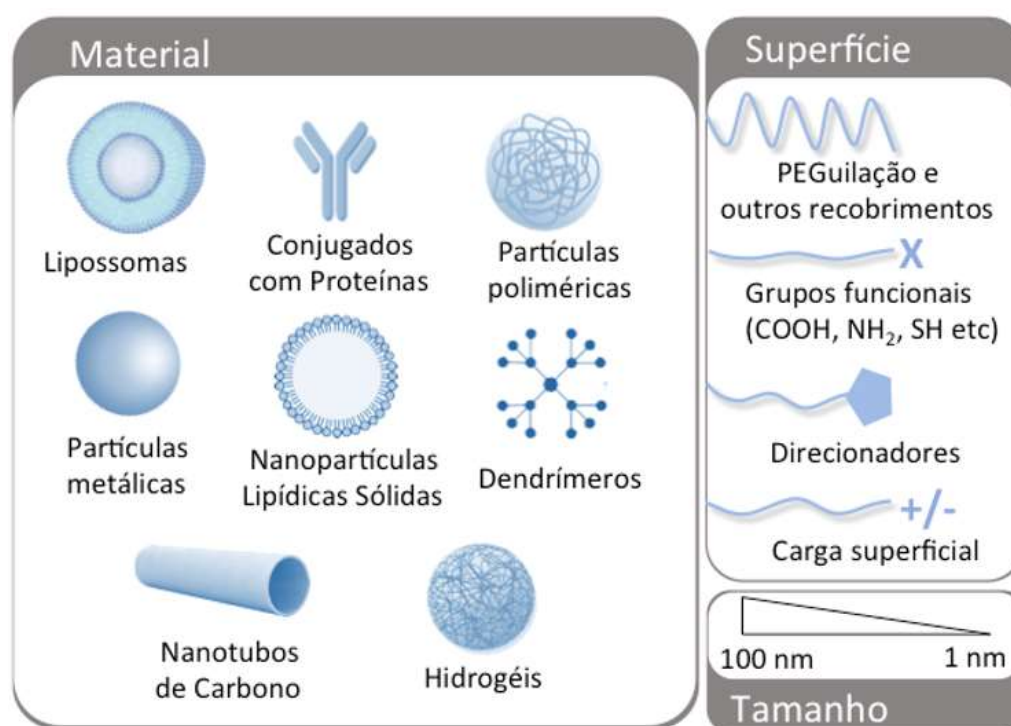


Figura 2.3. Diversidade de sistemas nanoparticulados explorados para liberação de fármacos e genes. O quadro à direita apresenta diferentes possibilidades de funcionalização superficial. Fonte: De La Torre; Balbino; Sipoli (2017).

Dentre os sistemas não-virais, pode-se destacar a aplicação de nanoagregados formados por lipídeos, principalmente os sintéticos de natureza catiônica. Estas moléculas apresentam a capacidade de complexação eletrostática

com os ácidos nucleicos, formando nanocarreadores eficientes na aplicação como vetores não virais de liberação do material genético (EVERS et al., 2018; RAFTERY; O'BRIEN; CRYAN, 2013). Essa associação se baseia na interação eletrostática entre os grupos positivamente carregados das moléculas catiônicas e os grupos fosfato negativamente carregados presentes no material genético, levando à compactação do material genético. Logo, cria-se uma estrutura com os ácidos nucleicos condensados que serve como barreira protetora contra nucleases e macrófagos, reduzindo sua degradação no organismo (EVERS et al., 2018). Porém, quando comparado aos vetores virais, a grande limitação desses sistemas está na relativa baixa eficiência de transfecção (RAFTERY; O'BRIEN; CRYAN, 2013; SPAIN et al., 2011).

Propriedades mesoscópicas do sistema coloidal podem interferir na eficiência de transfecção, tais como tamanho de partícula, polidispersidade, densidade de carga superficial, e razão molar de cargas entre carreador e material genético (ZHANG; ZHANG, 2020). Além disso, o processo espontâneo de complexação influencia diretamente na condensação do material genético nas estruturas carreadoras. Dependendo de diversos fatores, como concentração das soluções, força iônica do meio, ordem de mistura, temperatura de complexação e tipo de carreador, partículas com diferentes propriedades físico-químicas, estruturais e morfológicas podem ser obtidas (BUCK et al., 2019). Tais diferenças podem resultar em diferentes respostas biológicas. Assim, o desenvolvimento de diferentes processos que permitam a formação de partículas uniformes e de forma reprodutiva, resultará, conseqüentemente, em testes biológicos mais eficientes.

Nesse contexto, a microfluídica emerge como uma estratégia promissora que pode ser explorada para aumentar a produtividade e, conseqüentemente, o desenvolvimento de processos inovadores, tais como a síntese de sistemas baseados em auto-agregação de lipídeos para a formação de lipossomas.

2.3. Carreadores lipídicos

Os lipídeos são moléculas que apresentam caráter anfifílico, ou seja, que apresentam porções hidrofílicas (cabeça polar) e hidrofóbicas (cauda composta de ácidos graxos) em sua estrutura química (HAS; SUNTHAR, 2019). A principal classe de lipídeos formadores de membrana são os glicerofosfolipídeos, os quais são

constituídos por uma molécula de glicerol ligada covalentemente a uma cabeça polar fosforilada e a uma cauda apolar composta por duas cadeias de ácidos graxos saturados e/ou insaturados (Figura 2.4A).

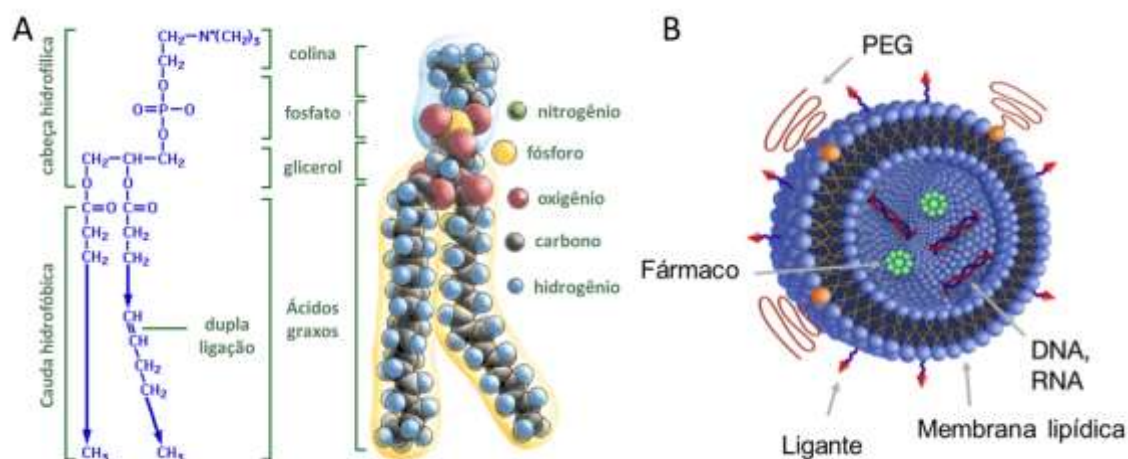


Figura 2.4. (A) Estrutura geral de fosfolídeos: como exemplo, o lipídeo fosfatidilcolina. (B) Representação da estrutura de um lipossoma para veiculação de fármacos e genes. Fonte: (A) Adaptado de David P. Chynoweth (University of Florida Agricultural and Biological Engineering) (B) Adaptado de Maeki et al. (2018).

A característica anfipática dos lipídeos permite sua auto-agregação molecular na presença de água, formando diversas estruturas, como bicamadas lipídicas planares, micelas e/ou vesículas, como lipossomas (KANG; KIM; LEAL, 2016). As bicamadas lipídicas são termodinamicamente instáveis devido à exposição das cadeias hidrofóbicas de hidrocarbonetos à fase aquosa. Assim, devido sua característica mecânica elástica, as moléculas lipídicas, inicialmente, se auto-agregam formando agregados lamelares semelhantes a discos (*disk-like*), os quais crescem a partir da fusão com outros discos e, posteriormente, se curvam e fecham em vesículas esféricas, como lipossomas (Figura 2.4B) (HAS; SUNTHAR, 2019; LASIČ, 1987).

2.3.1. Lipossomas catiônicos

Os lipossomas (Figura 2.4B) são agregados lipídicos formados a partir da auto-organização de lipídeos em excesso de água, gerando vesículas concêntricas uni ou multilamelares (BANGHAM, 1993). São estruturas aproximadamente esféricas com cerne aquoso circundado por uma ou mais bicamadas lipídicas, que se formam para alcançarem estados entropicamente mais favoráveis de energia livre

(HAS; SUNTHAR, 2019; KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012). Pelo fato das lamelas mimetizarem membranas celulares, os lipossomas possuem várias características de interesse biológico, que incluem interações com biomembranas e com diversas células, facilitando a internalização e entrega de fármacos e ácidos nucleicos no interior de células (LASIC, 1998; MIN et al., 2015; PENG et al., 2020).

Os lipossomas catiônicos (CL), que possuem algum lipídeo catiônico sintético em sua formulação, apresentam-se como uma alternativa para a veiculação de ácidos nucleicos, pois interagem eletrostaticamente e permitem a proteção destes contra a degradação enzimática (EVERS et al., 2018; FELGNER et al., 1994, 1987). A utilização do fosfolipídeo catiônico 1,2-dioleil-3-trimetilamônio propano (DOTAP) na composição de lipossomas para fins de liberação de DNA foi reportada primeiramente em 1997 (TEMPLETON et al., 1997). Lipossomas carregados positivamente facilitam a condensação do material genético formando complexos eletrostáticos, chamados lipoplexos (EVERS et al., 2018). Ensaio de transfecção com esses complexos podem ser otimizados principalmente pela variação da relação entre as cargas positivas e negativas, provenientes do lipídeo catiônico e dos grupos fosfato do material genético. Em aplicações em terapia e vacinação gênicas, os CL têm recebido grande atenção e têm sido investigados por nosso grupo de pesquisa (BALBINO et al., 2016, 2017).

Lipossomas catiônicos (CL) formados por DOTAP, fosfatidilcolina de ovo (EPC) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE) (Figura 2.5) foram primeiramente estudados por Perrie; Frederik; Gregoriadis (2001), para vacinação contra Hepatite B. Esta formulação se utiliza de DOTAP como lipídeo catiônico para promover o carregamento de ácidos nucleicos; EPC, uma fosfatidilcolina natural como fosfolipídeo estrutural para a formação dos lipossomas; e DOPE como fosfolipídeo auxiliador (do inglês, *helper*) (Figura 2.5). O último é designado como auxiliador pois, após internalização celular do carreador por endocitose e formação do endossomo, o DOPE promove a formação de fases lipídicas não-bicamadas quando os lipídeos celulares do endossoma e da membrana lipossomal se misturam (DE JESUS et al., 2014). Estas características fusogênicas facilitam, assim, a desestabilização da membrana do endossomo e a liberação do material genético ao citoplasma, o que resulta em uma transfecção celular mais eficiente (DE JESUS et al., 2014; FELGNER et al., 1994).

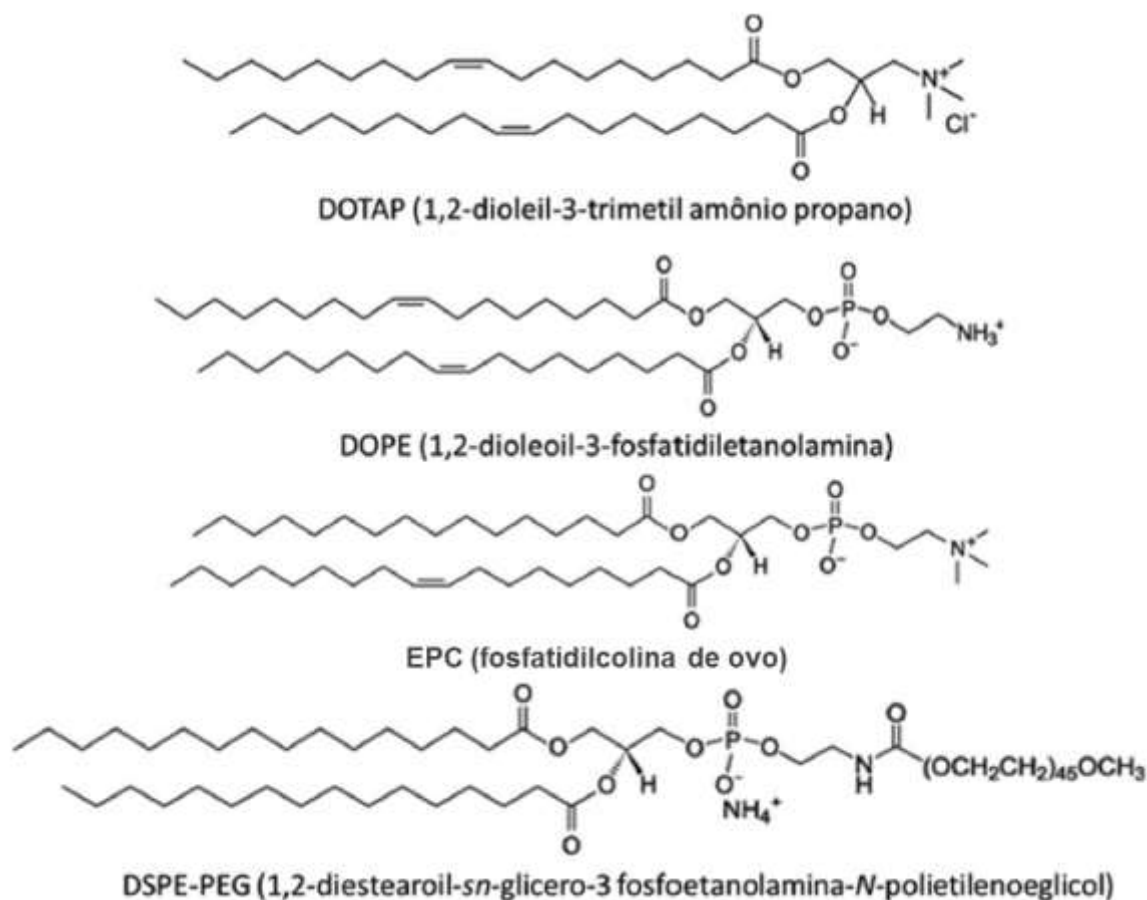


Figura 2.5. Estrutura de fosfolipídeos EPC, DOTAP e DOPE utilizados para formação de lipossomas catiônicos (CL), incluindo DSPE-PEG que foi empregado neste trabalho de tese. Fonte: Avanti Polar Lipids. Disponível em: <<http://avantilipids.com>>

Subsequentemente, nosso grupo de pesquisa reportou a formação de CL na proporção molar de 50:25:25% de EPC:DOPE:DOTAP, respectivamente, para desenvolvimento de nanocarreadores para vacinação contra tuberculose (ROSADA et al., 2008, 2012). Além disso, reporta-se que a inclusão de EPC na formulação lipídica DOTAP:DOPE foi imprescindível para reduzir a citotoxicidade *in vitro* em células da linhagem de macrófagos J744 e demonstraram potencialidade para administração pela rota intranasal (DE LA TORRE et al., 2009).

A partir disso, o emprego de dispositivos microfluídicos para a formação de CL nessas proporções foi amplamente estudado por nosso grupo de pesquisa (BALBINO et al., 2013, 2016; BALBINO; AZZONI; DE LA TORRE, 2013). Conforme ilustrado na Figura 2.6, a formação de lipossomas nesses processos microfluídicos ocorre pela auto-agregação das moléculas de lipídeo através do contato de dois fluidos solúveis entre si, um aquoso e outro alcoólico (contendo os lipídeos). Conforme a difusão entre as espécies ocorre, os lipídeos se tornam cada vez menos

solúveis no meio aquoso e começam a se autoagregar, formando fragmentos de bicamadas lipídicas. À medida que esses fragmentos de bicamadas lipídicas crescem, eles se unem a fim de diminuir a área superficial das extremidades hidrofóbicas, por fim agregando-se em vesículas esféricas com uma bicamada (lipossomas unilamelares) que separa um meio aquoso do meio externo (BALBINO et al., 2013).

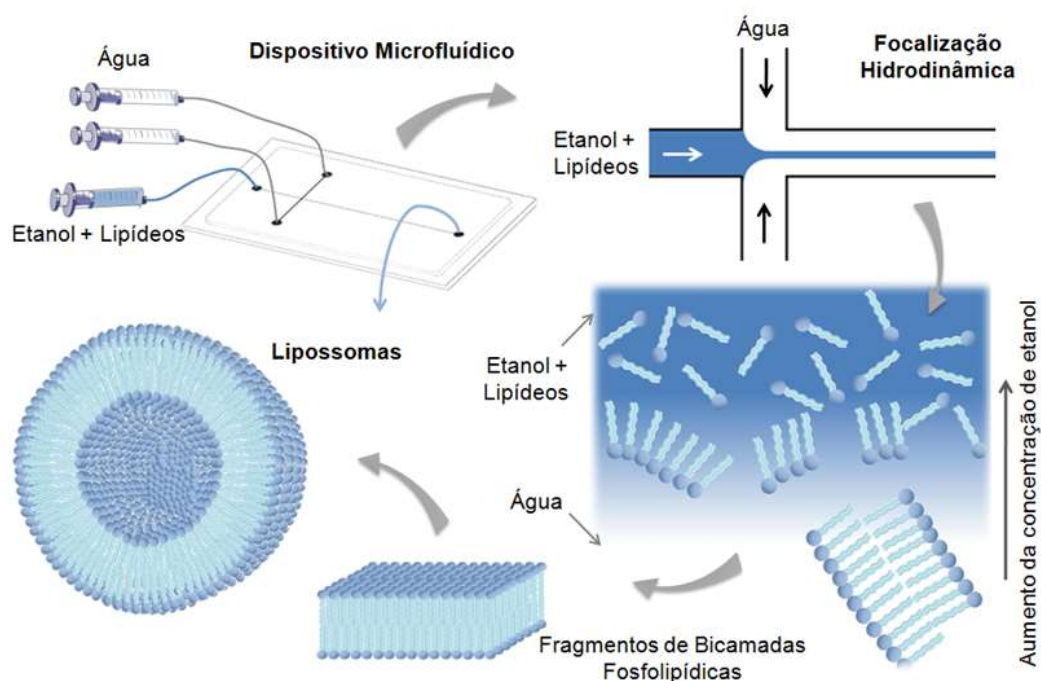


Figura 2.6. Esquema da formação de lipossomas em microcanais através da técnica da focalização hidrodinâmica.

Fonte: Adaptado de Balbino et al. (2013).

Posteriormente, nosso grupo de pesquisa também reportou o emprego de dispositivos microfluídicos para estudar a complexação de CL com DNA, assim como sua transfecção *in vitro* de células HeLa (células epiteliais de carcinoma humano), para aplicação na área de *gene delivery* (BALBINO et al., 2016, 2017; BALBINO; AZZONI; DE LA TORRE, 2013). De modo geral, os dispositivos baseados em focalização hidrodinâmica estudados foram capazes de produzir complexos CL/pDNA de tamanho e polidispersidade controlados para aplicações em terapia e vacinação gênicas (BALBINO; AZZONI; DE LA TORRE, 2013).

De fato, trabalhos recentes são reportados na literatura empregando microdispositivos de focalização hidrodinâmica para produção de lipossomas em etapa única para aplicações como carreadores de fármacos e genes (AGHAEI; SOLAIMANY NAZAR, 2019; CHEN et al., 2019; LIN; MALMSTADT, 2019; ZIZZARI

et al., 2017). Evidencia-se, portanto, a contemporaneidade do tema e a potencialidade de emprego da microfluídica como plataforma para investigação da síntese de lipossomas, visando aplicações como carreadores de material genético.

Porém, esses carreadores podem ser facilmente reconhecidos como partículas exógenas pela ligação de proteínas séricas e eliminados pelo sistema mononuclear fagocitário, quando administradas sistemicamente (ALLEN; CHONN, 1987). Assim, modificações de superfície são estratégias interessantes para estabilizar e blindar os nanocarreadores frente a estas células fagocitárias, proporcionando o acúmulo nas células e órgãos-alvo e favorecendo a internalização e processamento do material carregado pelas células (ALLEN; HANSEN, 1991; ISHIDA; IDEN; ALLEN, 1999).

2.3.2. Funcionalização superficial de carreadores

O polietilenoglicol (PEG) é um dos polímeros mais empregados como ligante superficial de nanoestruturas estabilizadas na área de liberação de fármacos e genes (JO et al., 2016; SUK et al., 2016). As cadeias do PEG atuam como uma barreira protetora na superfície do nanocarreador, aumentando sua estabilidade estérica e prolongando o tempo de circulação na corrente sanguínea (EVERS et al., 2018). Porém, foram reportadas algumas limitações quanto à PEGuilação de carreadores para terapia gênica. Dentre elas, o uso de uma proporção maior que 8% (molar) de DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figura 2.5) foi associada a uma possível desestabilização do lipossoma. Além disso, reportou-se maior imunogenicidade de carreadores funcionalizados com PEG, após dosagens múltiplas (BUCK et al., 2019).

A PEGuilação como estabilização superficial de lipossomas caracteriza a formação os lipossomas *stealth* (ALLEN; CHONN, 1987; EDWARDS et al., 1997), ou lipossomas de segunda geração (Figura 2.7). Além disso, a conformação estrutural das cadeias do PEG depende da massa molar do polímero e da distância média entre cadeias poliméricas vizinhas na superfície. Denota-se como uma conformação polimérica estendida (*brush*) (Figura 2.7) quando a densidade polimérica é elevada e as cadeias adjacentes de PEG estão próximas podendo se sobrepor; enquanto uma conformação enovelada (*mushroom*) é adotada quando a distância entre cadeias adjacentes evita sua sobreposição, geralmente empregando cadeias poliméricas de menor massa molar (SUK et al., 2016).

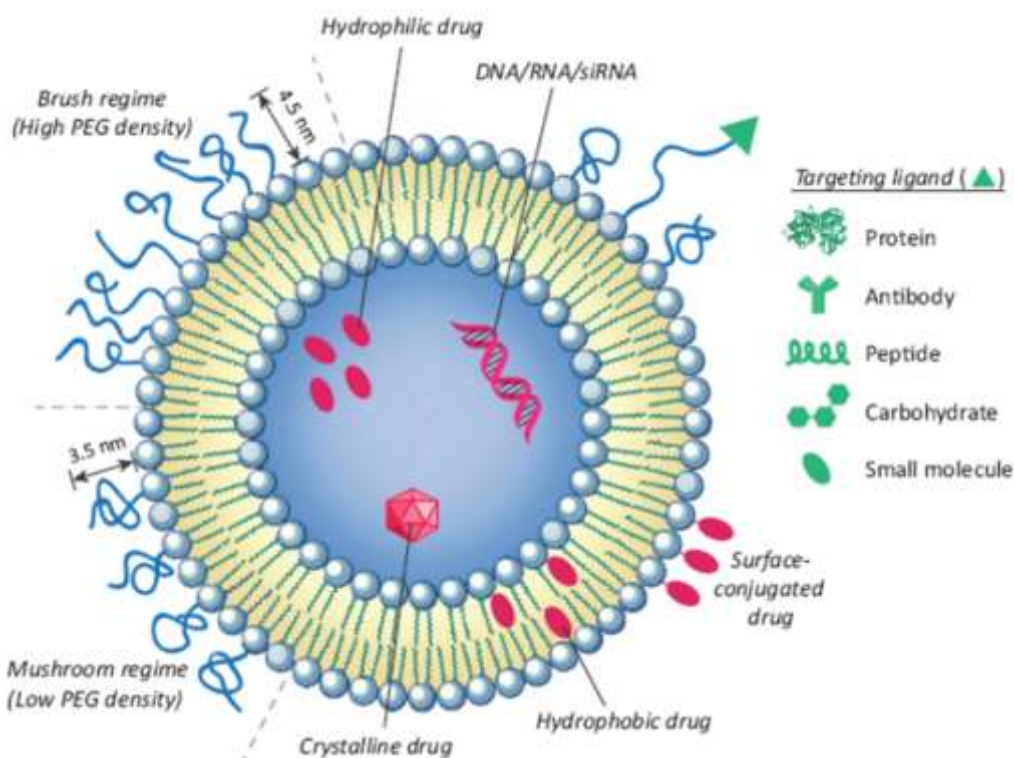


Figura 2.7. Esquema apresentando a estrutura de lipossomas PEGuilados (*stealth*) que podem ser superficialmente funcionalizados para promover a endocitose mediada por receptor usando ligantes direcionados, como anticorpos, peptídeos, proteínas, carboidratos, dentre outras moléculas.

Fonte: Çağdaş; Sezer; Bucak (2014).

Estes fatores são importantes para determinar a eficiência do recobrimento e o espaçamento entre a superfície do carreador e o ligante específico (SUK et al., 2016). De forma geral, estudos reportam que o emprego de cadeias de PEG de massa molar igual ou maior que 2000 Da são eficientes para blindar a superfície de nanopartículas e aprimorar o tempo de circulação no sangue quando administrados sistemicamente (SUK et al., 2016).

A formação de lipossomas PEGuilados empregando dispositivos microfluídicos ainda é tema de poucos estudos reportados na literatura e diferentes parâmetros de processo ainda podem ser explorados. Trabalhos envolvendo a produção de lipossomas funcionalizados com PEG empregando dispositivos microfluídicos baseados em focalização hidrodinâmica (ANDAR et al., 2014; HOOD et al., 2013a, 2013b, 2014; RAN; MIDDELBERG; ZHAO, 2016) e do tipo *staggered herringbone* (do inglês, espinha de peixe escalonada) (CHEUNG; AL-JAMAL, 2019; EŞ et al., 2019; SEDIGHI et al., 2019) são reportados na literatura.

Porém, apesar de obterem êxito em diversas aplicações em entrega gênica, nanocarreadores lipídicos funcionalizados com PEG podem apresentar baixa

eficiência relativa de transfecção devido à falta de especificidade com as células-alvo (BUCK et al., 2019). Dada a importância da associação nanocarreadores/células, a modificação química da superfície dos mesmos (Figura 2.7) com moléculas que favoreçam suas interações específicas com receptores celulares se torna uma abordagem viável para proporcionar uma entrega terapêutica sítio-direcionada (*targeted delivery*) (ISHIDA; IDEN; ALLEN, 1999; RAN; MIDDELBERG; ZHAO, 2016).

2.3.2.1. Ligantes específicos para entrega sítio-direcionada

Na área da nanomedicina, a inclusão de funcionalidades adicionais à superfície destes carreadores, como o direcionamento sítio-específico, se apresenta como uma alternativa promissora para que fármacos e genes sejam eficientemente entregues para células-alvo (JO et al., 2016). Assim, torna-se importante o desenvolvimento de sistemas carreadores com capacidade elevada de carregamento de material genético e que permitam modificações extensivas para ultrapassar barreiras intra e extracelulares, na terapia gênica (JO et al., 2016; RAFTERY; O'BRIEN; CRYAN, 2013).

Dentre as diversas interações moleculares que podem mediar a adesão celular, muitos estudos empregam peptídeos que ativam o conjunto de receptores de superfície celular de integrinas, especialmente os baseados na sequência dos três aminoácidos: arginina, glicina e aspartato (RGD) (MARELLI et al., 2013; NIEBERLER et al., 2017). As integrinas $\alpha_v\beta_3$ são seletivamente expressas em diversas células tumorais e endoteliais, que constituem vasos sanguíneos tumorais, e são os receptores predominantes dos peptídeos RGD (HUANG et al., 2015). Como os receptores de integrinas reconhecem o RGD como sequência primária (embora outras conformações possam modular esta afinidade, como peptídeos cíclicos e lineares, por exemplo), torna-se possível a entrega gênica sítio-específica (*targeted delivery*), resultando em transfecções *in vitro* e *in vivo* mais eficientes (MISRA et al., 2014).

Estudos recentes envolvendo a entrega de siRNA (small interfering RNA) relatam que a formação de lipossomas com derivatização covalente do lipídeo 1,2-distearoil-sn-glicerofosfolina (DSPC) com o peptídeo RGD cíclico (cRGD) reduziu substancialmente o crescimento de células endoteliais tumorais para ensaios *in vivo*

de siRNA (SAKURAI et al., 2014). Neste estudo, os complexos baseados em carreadores lipídicos ancoradas com o peptídeo RGD apresentaram populações monodispersas, com tamanhos menores que 150 nm (SAKURAI et al., 2014). Em outro estudo, lipossomas funcionalizados com peptídeos RGD foram empregados como sistemas de liberação de fármacos para o tratamento de tumores ósseos (ZHAO et al., 2019). Estes lipossomas funcionalizados apresentaram afinidade com células metastáticas ósseas, melhoria da citotoxicidade e mostrou-se possível realizar o tratamento de células metastáticas com fármacos como paclitaxel (ZHAO et al., 2019).

Assim, tendo em vista a experiência do grupo de pesquisa envolvendo lipossomas, é de significativa importância o avanço no desenvolvimento de nanoagregados funcionalizados e que sejam produzidos em dispositivos microfluídicos, visando à obtenção de carreadores mais especializados e eficientes para entrega gênica direcionada. Processos capazes de produzir sistemas carreadores funcionalizados podem resultar em produtos terapêuticos mais viáveis tecnológica e biologicamente.

Na literatura, a microfluídica se mostra como uma alternativa eficiente para a produção de carreadores lipídicos funcionalizados com direcionamento tumoral. Além de lipossomas e nanopartículas lipídicas (HOOD et al., 2013b; RAFIQUE et al., 2019; RAN; MIDDELBERG; ZHAO, 2016), microbolhas revestidas com lipídeos funcionalizados também são produzidas através de dispositivos microfluídicos, incluindo microbolhas funcionalizadas com o peptídeo cRGD (TALU et al., 2007). Estes sistemas de microbolhas com revestimento lipídico vêm sendo amplamente estudados para desenvolvimento de terapias de precisão, como vetores de liberação de fármacos e genes e agentes de contraste em imagem ultrassônica (TIAN et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

2.3.3. Microbolhas revestidas por lipídeos

Bolhas de gás de tamanho entre 1 μm e 7 μm , são altamente compressíveis e podem se expandir ou contrair quando expostas a um pulso acústico (LIN; CHEN; CHEN, 2016). Essas oscilações produzem eco que aumenta o contraste de imagem e esses sinais de ultrassom podem melhorar a distinção visual entre o vaso sanguíneo e tecidos adjacentes (GNYAWALI et al., 2017). Conseqüentemente,

microbolhas tem sido aplicadas como agentes de contraste ultrassonográficos (TIAN et al., 2020).

Uma camada de surfactante pode aumentar a estabilidade da bolha ao reduzir a tensão superficial e aumentar a resistência à ruptura quando submetida a ultrassom (Figura 2.8A) (CHU et al., 2019). Apesar de serem menos estáveis que revestimentos poliméricos, os lipídeos resultam em bolhas mais ecogênicas, além de possuírem a habilidade de adsorver espontaneamente à interface gás-líquido e se auto-agregarem em uma monocamada de revestimento (Figura 2.8A). Quando fosfolipídeos são empregados, a monocamada é formada com caudas hidrofóbicas em contato com o núcleo gasoso, deixando os grupos carregados das cabeças polares para interagir com o meio aquoso (HETTIARACHCHI et al., 2007). Ainda, microbolhas revestidas por mistura de lipídeos com polímeros, como o PEG, demonstraram melhorar a estabilidade e evitar coalescência (SEGERS et al., 2018a) (Figura 2.8A).

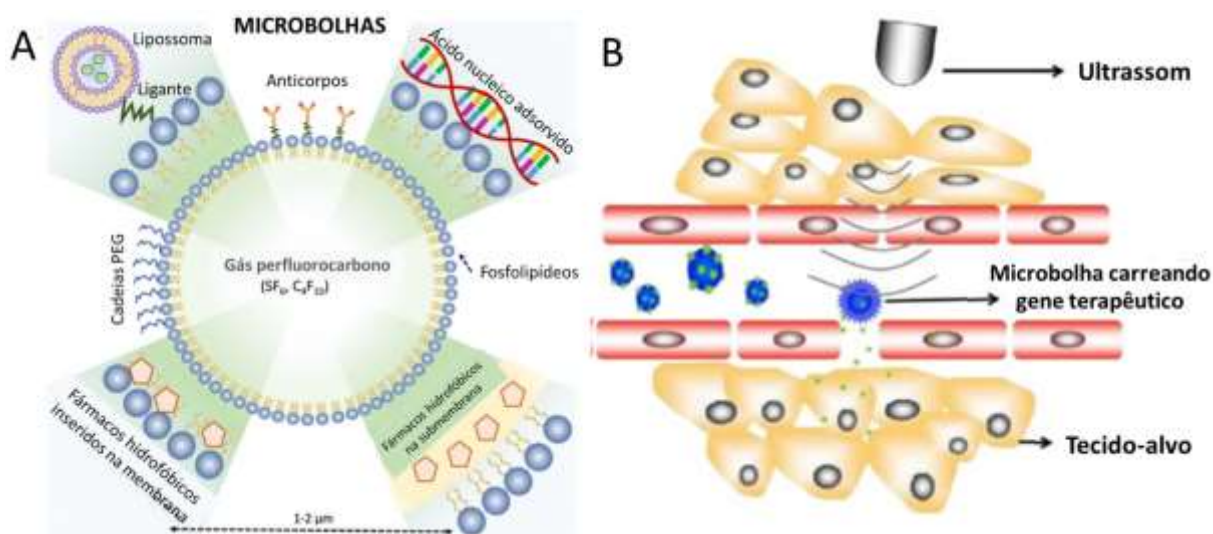


Figura 2.8. (A) Esquema de representação de uma microbolha revestida por monocamada lipídica, e possibilitando diversas funcionalizações superficiais, como PEG, anticorpos e até lipossomas. (B) Diagrama representando terapia gênica mediada por destruição da microbolha por ultrassom. Fonte: (A) Adaptado de Couture et al. (2014); (B) Adaptado de Chen et al. (2013)

Dependendo da frequência e pressão impostas, ondas ultrassônicas também podem ser empregadas para fragmentar ou destruir microbolhas dentro da região analisada (Figura 2.8B). Este fenômeno leva a um aumento da permeabilidade da membrana celular, permitindo o uso de microbolhas como agentes terapêuticos para entrega de genes e fármacos (TIAN et al., 2020). A literatura reporta que para esses

sistemas, o material genético carregado e liberado por microbolhas mostrou-se intacto e estável após destruição de microbolha por ultrassom (UNGER et al., 2001). Além disso, diferentes mecanismos de incorporação celular podem facilitar a entrega da carga terapêutica. Por exemplo, a fusão de um revestimento lipídico de microbolhas com a bicamada lipídica da membrana celular pode promover a liberação diretamente ao citosol (MURA; NICOLAS; COUVREUR, 2013; TIAN et al., 2020).

Além disso, estratégias para estabilizar a interface gás-líquido incluem a utilização de gases com elevada massa molar, como perfluorocarbonos (PFC), de forma a evitar a difusividade do gás por entre a monocamada lipídica de revestimento e aprimorar o tempo de circulação de microbolhas no organismo (FRINKING et al., 2020).

Porém, uma limitação importante do uso de microbolhas como carreadores e agentes de contraste é o fato do comportamento de ressonância das bolhas depender diretamente do tamanho destas (DOLLET; MARMOTTANT; GARBIN, 2019; SEGERS et al., 2018b). Uma suspensão de microbolhas com um elevado índice de polidispersidade resulta em perda de sinal devido a diferentes frequências de ressonância geradas, e em uma menor eficiência de transfecção para aplicações terapêuticas (LIN; CHEN; CHEN, 2016). Dessa forma, destaca-se a importância da utilização de vetores monodispersos, visando garantir uma faixa mais estreita de ressonância e uma maior sensibilidade para técnicas de imagem e terapia (SEGERS et al., 2018b).

Neste contexto, a microfluídica se destaca como uma ferramenta importante para a produção de microbolhas com tamanho preciso e monodispersidade, de forma a possibilitar a redução do tamanho das bolhas obtidas a partir do controle da pressão do gás, velocidade de escoamento da fase contínua e geometria do microcanal (CHU et al., 2019; LIN; CHEN; CHEN, 2016). Apesar das forças viscosas e inércia também desempenharem papéis importantes, a geração de microbolhas em canais microfluídicos é principalmente controlada através do confinamento da interface do fluido (ANNA, 2016; CHU et al., 2019). Assim, plataformas microfluídicas têm sido amplamente estudadas para a formação de microbolhas monodispersas para aplicações terapêuticas e diagnósticas no campo da medicina (FRINKING et al., 2020; FU et al., 2019).

Tendo em vista o exposto até aqui, dispositivos microfluídicos para a formação de carreadores lipídicos se destacam como estratégias promissoras para a

produção de produtos de alto valor agregado e para superar obstáculos encontrados em processos convencionais, como baixa reprodutibilidade e controle sobre as características físico-químicas finais. Assim, o desenvolvimento de novas partículas carreadoras continua sendo uma importante estratégia para viabilizar processos de obtenção de produtos veiculadores de material genético para aplicações em nanomedicina, especialmente em terapia e vacinação gênicas.

3. Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices

Gabriel Perli^{1†}, Amanda C. S. N. Pessoa^{1†}, Tiago A. Balbino², Lucimara G. de la Torre^{1*}.

¹ University of Campinas, UNICAMP, Brazil.

² Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ/COPPE, Brazil.

* Corresponding author: ltorre@g.unicamp.br

† These authors contributed equally.

Published in Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 279 (2019) 233-241 (Anexo II).

National Patent Filing: BR10 2017 025862 9 (Anexo I)

Abstract

In this work, we describe a hydrodynamic flow-focusing microfluidic process to produce stealth cationic liposomes (SCL), stabilized with poly(ethylene glycol) (PEG), with uniform and reproducible features. Through cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) characterization and real-time monitoring, we verified the formation of multi-sized lipid self-aggregates, which can be attributed to micelles formation. These structures tend to undergo deposition within the PDMS/glass microchannels through intermolecular interactions with the glass walls, hindering not only the process reproducibility but also the final biological application of the SCL products. In view of this, we propose the modulation of ionic strength of the side streams aiming to ionically shield the glass surface, decrease the intermolecular interactions of the lipid polar heads, and, essentially, to promote the bilayer-driven self-assembly of SCL with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀ lipid. Herein, we applied phosphate-buffered saline (PBS) from 10 to 50 mM concentration as side streams, and evaluated its effects on SCL final physicochemical properties in terms of size distribution, mean diameter, zeta potential and polydispersity index (PDI). We present evidences indicating that the ionic strength can be used as a microfluidic process parameter to modulate the lipids self-assembly kinetics whilst preventing

micelles formation. Finally, the proposed diffusion-based microfluidic system with high ionic strength enables the formation of monodisperse (PDI < 0.2) SCL of around 140 nm with monomodal size distributions and enhanced properties when compared to usual bulk mixing.

Abbreviations

CL	Cationic Liposomes
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DSPE	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
EPC	Egg Phosphatidylcholine
PBS	Phosphate-buffered saline
PDI	Polydispersity Index
PEG	Poly(ethylene glycol)
SCL	Stealth Cationic Liposomes

3.1. Introduction

Liposomes are lipid aggregates that, in aqueous environments, spontaneously self-assemble into concentric lipid vesicles. They are approximately spherical structures with an aqueous core surrounded by one or more phospholipid bilayers (KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012). Cationic liposomes (CL), which contain positively charged lipids, have the ability of condensing and protecting drugs and nucleic acids against enzymatic degradation, as well as efficiently interacting with anionic cell membranes to deliver the therapeutic cargo (BALBINO et al., 2016; CORSI et al., 2003; MONCK et al., 2000). In this way, CL are widely investigated as non-viral vectors for drug and gene delivery applications (LIECHTY et al., 2010; MONCK et al., 2000).

However, these vectors can be rapidly degraded and cleared from the bloodstream by the cells of the immune system. To develop long-circulating liposomes, significant efforts have been undertaken to functionalize their surfaces with hydrophilic polymers (DRUMMOND et al., 1999; IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006). Poly(ethylene glycol) (PEG) is one of the most applied surface ligands to promote a shielding brush layer to form stealth cationic liposomes (SCL)

(ALLEN et al., 1991; ALLEN; HANSEN, 1991; HOOD et al., 2013b). In this case, lipids are chemically modified in order to link PEG chain to the hydrophilic head (ALLEN et al., 1991). After liposome self-assembly, PEG provides a protective surface shield, leading to improved liposome steric stability and extended systemic circulation time (ALLEN; HANSEN, 1991; IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006; JÚNIOR et al., 2007; N. NISHI, K. KOGA, C. OHSHIMA, K. YAMAMOTO, 1988). Further, PEG-lipid may provide unlimited possibilities of SCL surface decoration through chemical modifications, enabling the construction of nanoaggregates with specific targeting (CHEN et al., 2012; HOOD et al., 2013b; MICKLER et al., 2011; MIURA et al., 2013).

In spite of the favorable opportunities, synthesis of monodisperse well-defined SCL remains a challenge (CARUGO et al., 2016). The foremost problems are the facts that current protocols used for SCL production require a post-operational set up for size reduction (LAPINSKI et al., 2007) and homogenization (MAULUCCI et al., 2005) of the lipid structures. Mostly, because PEG-lipid may induce random lipid self-assembly, leading to the formation of multi-shaped lipid structures, mainly micelle-like aggregates (JOHNSSON; EDWARDS, 2003).

Recent advances in the field of liposome production strive to develop techniques that produce these nanoaggregates with specific characteristics in a lower number of processing steps (MEURE; FOSTER; DEGHANI, 2008; WHITESIDES, 2006). In this respect, microfluidics corresponds to a promising strategy to overcome these major challenges (CARUGO et al., 2016; WHITESIDES, 2006).

Microfluidics is an interdisciplinary technological tool that manipulates small amount of fluids in microscale channels. These conditions can provide unique hydrodynamic properties, including laminar flow regime and minimized heat and mass transfer resistances (MARRE; JENSEN, 2010; WEIBEL; WHITESIDES, 2006), enabling the continuous formation of well-structured products.

Microfluidic hydrodynamic flow focusing platforms have proven to enhance CL's physicochemical characteristics when compared to conventional bulk synthesis, including monodispersity and average hydrodynamic diameter of around 100 nm (BALBINO et al., 2013, 2017; CARUGO et al., 2016; HOOD; DEVOE, 2015; JAHN et al., 2010). By applying aqueous side streams to focus an alcoholic stream comprised by the phospholipid dispersion, the alcoholic concentration gradient across the

microchannel width leads to a gradual decrease in the lipids solubility (BALBINO et al., 2013; HOOD; DEVOE, 2015; JAHN et al., 2010). This phenomenon results in their spontaneous self-assembly into phospholipid bilayers fragments that tend to bend to form liposomes with an aqueous core (BALBINO et al., 2013; HOOD; DEVOE, 2015; JAHN et al., 2010).

As far we know, only a few studies have addressed the viability of the stealth liposome production in microfluidic devices. In addition, the mechanism of lipid self-assembly and micelles formation was not explored or reported by the authors (ANDAR et al., 2014; HOOD et al., 2013b; HOOD; DEVOE, 2015). Considering the probable coexistence of micelle-like aggregates and liposomes in the presence of PEG-lipids (JOHNSSON; EDWARDS, 2003), a further investigation of microfluidic processes for SCL synthesis can provide new insights towards the involved lipid aggregation phenomena.

In this work, we aimed to understand which parameters would modulate the synthesis of SCL in microfluidic platforms. We present an experimental study of the phenomena involved in SCL synthesis, such as micelles formation and microaggregation, describing also the effects of surface and ionic strength on the lipids self-aggregation mechanisms. By adjusting the ionic strength as a microfluidic process variable, we allowed the continuous synthesis of well-structured monodisperse SCLs with tightly patterned size and monomodal size distribution profiles, with reproducible features. Finally, we highlight the substantial role of diffusion-based microfluidic processes when compared to conventional bulk mixing to produce monodisperse SCL suitable for the most varied applications, such as drug and gene delivery.

3.2. Material and Methods

3.2.1. Material

Liposomes were composed of egg phosphatidylcholine (EPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) from Lipoid (Germany). Stealth cationic liposomes were produced including 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE) conjugated with methoxy(polyethylene glycol) of MW = 2000 (PEG₂₀₀₀) from Avanti Polar Lipids (USA). We used phosphate-buffered saline (PBS) from Laborclin, ethanol (99.5%)

and isopropanol from Labsynth (Diadema, SP, Brazil), and Sylgard 184 Silicon Elastomer Kit from Dow Corning (USA).

3.2.2. Methods

3.2.2.1. Microfabrication

The polydimethylsiloxane (PDMS)/glass microfluidic devices were produced applying soft lithography, using O₂ plasma surface activation for irreversible bonding between PDMS microchannel layers and glass slides (MOREIRA et al., 2009). The hydrodynamic focusing devices were fabricated with a rectangular cross section of 140 μm wide and 50 μm deep.

3.2.2.2. Cationic and Stealth Liposomes microfluidic production

The cationic liposomes (CL) were composed of EPC/DOTAP/DOPE phospholipids at molar proportions of 2:1:1, as reported previously (BALBINO et al., 2013, 2017). The stealth cationic liposomes (SCL) were produced using a lipid dispersion of 50:25:24:1 % (molar) of EPC/DOTAP/DOPE/DSPE-PEG₂₀₀₀ lipids respectively, with a total lipid concentration of 25 mM. The lipids were dispersed in anhydrous ethanol, which was prepared using 4-Å molecular sieves (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and subsequently filtered by 0.22 μm membranes. The solution was sonicated multiple times, between each lipid addition, for 15 min at 35 °C using an ultrasonic bath (Ultrasonic Cleaner 8890, Cole-Parmer) and stored at -4 °C freezer. Prior to all experiments, the lipid solution was sonicated in water bath for 15 min at 35 °C.

The microfluidic synthesis of SCL was carried out under the Flow Rate Ratio (FRR) of 10, which is defined as the ratio of the sum of the side streams volumetric flow rates related to the flow rate of the central stream. More precisely, for all microfluidic experiments we used infusion syringe pumps (PHD2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) to adjust the flow rates at 10.92 μL/min for the central ethanolic stream and 54.60 μL/min for side streams composed of ultrapure water or PBS at varied concentrations from 10 to 50 mM. The real-time images were taken with an inverted microscope (Inverted Research Microscope Eclipse Ti-U, Nikon, Tokyo, Japan). Bulk synthesis was performed by mixing the lipid dispersion with water or PBS in a 2 mL tube, maintaining the volumetric proportions of 1:10 for

lipid dispersion and solvent, respectively, which was further submitted to ultrasonication for 15 min at 35 °C.

3.2.2.3. Physicochemical characterization

Average hydrodynamic diameter and polydispersity

Stealth liposomes were characterized in terms of average hydrodynamic diameter, polydispersity and size distribution by dynamic light scattering (DLS), using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, UK) with backscattering detection angle of 173°, a He/Ne laser at 633 nm, and a 4.0 mW power source. For DLS measurements, all samples were diluted to a final lipid concentration of 0.2 mM, leading to varying final buffer concentrations from 0 to 4.4 mM, for samples prepared with water and PBS 50 mM, respectively. The results are presented in triplicate of independent experiments, with size distribution weighted by intensity, volume and number. All DLS measurements, including duration of a single measurement, intercept, mean count rate and mean signal-to-noise ratio, are presented in Table S1 in the supplementary material.

Zeta potential

The zeta potential results are based on the measurement of the velocity of liposomes electrophoretic mobility using the laser Doppler anemometry technique. All samples were diluted in ultrapure water at final lipid concentration of 0.2 mM and the measurements were performed in triplicates at 25 °C using Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, UK).

3.2.2.4. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)

Cryogenic Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM) was performed to investigate the morphology of the stealth liposomes produced via microfluidic devices. Grids were prepared using an automated vitrification system (Vitrobot Mark IV, FEI, The Netherlands), in which they were exposed to glow discharge treatment (easiGlow discharge system, Pelco) with 15 mA current during 25 s. The samples were prepared under controlled temperature (22 °C) and humidity (100%) conditions to prevent from evaporation. Carbon-coated copper grids of 300 mesh (Ted Pella) were covered with one droplet (3 µL) of samples for 3 s. Next, the samples were

analyzed using a Jeol JEM-2100 microscope at 200 kV with a defocus range between -2 and -4 μm , using a F-416 CMOS camera (TVIPS, Germany).

3.3. Results and Discussion

3.3.1. Synthesis applying side streams of ultrapure water

Taking into account the previous work from our research group for cationic liposomes (CL) synthesis (BALBINO et al., 2013, 2017), we evaluated a similar process configuration applying water to hydrodynamically focus a central organic stream composed of EPC/DOTAP/DOPE lipids and 1% (molar) of DSPE-PEG₂₀₀₀ lipid to confer Stealth properties to the liposomes. The resulting stealth cationic liposomes (SCL) produced by this microfluidic system were characterized in terms of size, polydispersity index and zeta potential and compared to CL (without PEG), as shown in Table 3.1.

Table 3.1. Physicochemical characterization of cationic liposomes (CL) and stealth cationic liposomes (SCL; with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) produced in microfluidic hydrodynamic focusing devices with water as side streams.

Liposome	Intensity-weighted Mean Diameter (nm \pm SD)	Volume-weighted Mean Diameter (nm \pm SD)	Number-weighted Mean Diameter (nm \pm SD)	Polydispersity Index (PDI \pm SD)	Zeta Potential (mV \pm SD)
Cationic Liposomes	140.6 \pm 3.1	163.4 \pm 10.5	135.8 \pm 7.7	0.17 \pm 0.02	64.1 \pm 5.4
Stealth Cationic Liposomes	62.9 \pm 13.6	39.3 \pm 41.2	17.5 \pm 4.2	0.48 \pm 0.14	29.4 \pm 3.5

SD represents the standard deviation of independent triplicates

As expected from previous report (BALBINO et al., 2013), this microfluidic process configuration resulted in monodisperse CL (PDI < 0.2) with size around 140 nm and positive zeta potential (Table 1). The CL's high uniformity is confirmed by analyzing the size results in terms of intensity, volume and number, which indicate one relevant population of liposomes with narrow standard deviation and monomodal size distribution profiles (Figure 3.S1, supplementary material). Nonetheless, when 1% of DSPE-PEG lipid was introduced to the organic phase dispersion, we obtained SCL with high polydispersity (PDI > 0.4) and mean hydrodynamic diameter varying

from 63 to 17 nm for intensity- and number-weighted size distributions, respectively (Table 1). These results are confirmed by the size distribution profiles presented in Figure 3.1 (a, b and c), demonstrating the formation of highly polydisperse self-aggregates. It is worth mentioning that the scattered light intensity (Figure 3.1a) is a function of the sixth power of the particle diameter, which mainly reflects the presence of particles. Converted after using the Mie theory, the corresponding volume- and number-weighted scatterings (Figure 3.1b and c, respectively) are proportional to the particle's diameter to the third and first powers, respectively (DE LA TORRE et al., 2014; EGELHAAF et al., 1996). This means that despite the presence of larger liposomes in the final product, which definitely affect the intensity light scattering distribution (Figure 3.1a) and the mean hydrodynamic diameter result, the main relevant population of self-aggregates is composed of significant small structures, as revealed by the volume- and number-weighted distributions (Figure 3.1b and c).

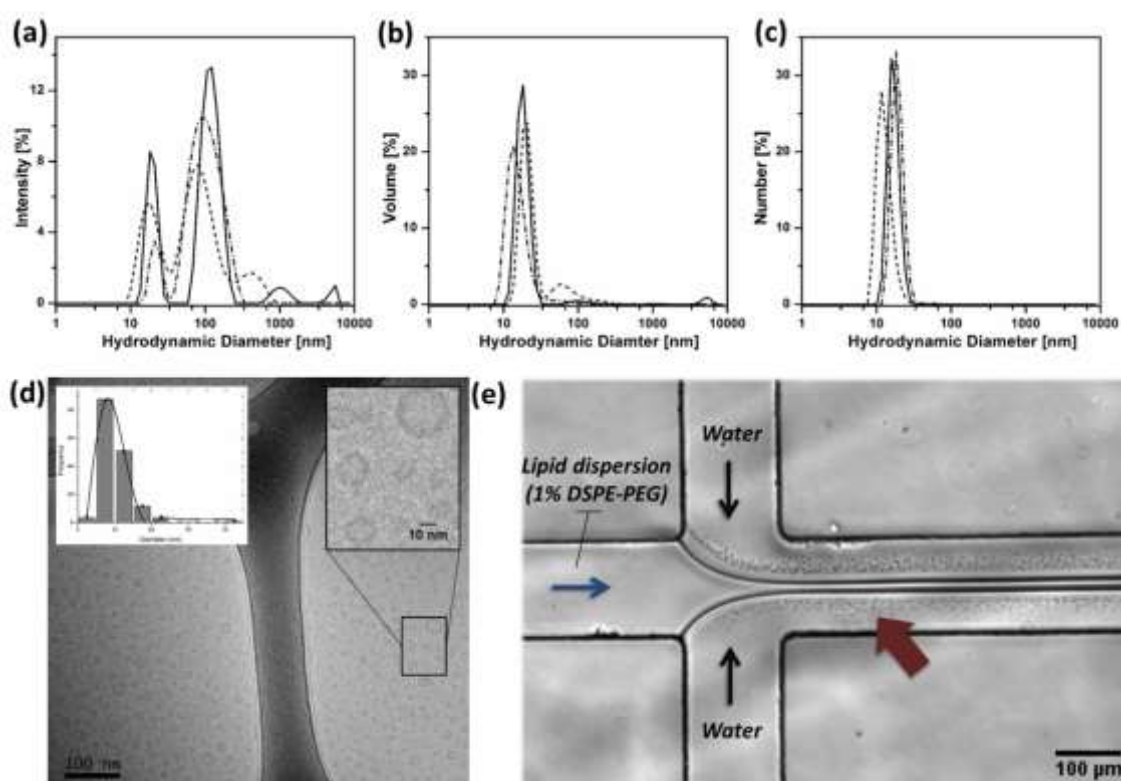


Figure 3.1. Intensity (a), volume (b), and number-weighted (c) size distributions of SCL with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀ produced in hydrodynamic focusing devices applying water as side streams. The lines represent independent replicates (n=3). Cryo-TEM image with size distribution histogram (gaussian fit $R^2 > 0.98$) presenting the aggregates generated by this system (scale bar indicates 100 nm) (d). Optical microscopy image of the microfluidic system, showing the formation of microaggregates (red arrow) after 10 min of processing (scale bar indicates 100 μm) (e).

Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) analysis (Figure 3.1d) revealed the presence of multi-shaped polydisperse aggregates with the main presence of small structures of approximately 12 ± 6 nm in size (measured with software ImageJ), corroborating the DLS results (Figure 3.1a, b and c). We present in the supplementary material a panel of cryo-TEM micrographs, including a complete size distribution histogram, for better interpretation of the data (Figure 3.S2). Indeed, it has been previously shown through cryo-TEM characterization that phospholipids suspensions containing DSPE-PEG₂₀₀₀ tend to form micelles (JOHNSSON; EDWARDS, 2003) apparently in the range of 10-20 nm, which could present discoidal and spherical shapes. The coexistence of liposomes and micelles in low DSPE-PEG₂₀₀₀ concentrations was previously demonstrated (EDWARDS et al., 1997; JOHNSSON; EDWARDS, 2003), also supporting our intensity-weighted DLS results (Figure 3.1a) and cryo-TEM characterization (Figure 3.1d). These results suggest that under these process parameters, lipids self-aggregation mechanisms were disturbed, leading to the uncontrolled formation of multi-shaped micelles, small aggregates and liposomes, simultaneously. Since we are dealing with a percentage of 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀, these self-aggregates might be randomly composed of the lipids EPC, DOTAP, DOPE and DSPE-PEG₂₀₀₀. Altogether, these observations indicate that the microfluidic process applying side streams composed of water suffers from poor reproducibility due to the main formation of micelles, making it impossible to ensure that PEG-lipid could be successfully incorporated to the liposome structure to form the desired SCLs.

In addition, through real time monitoring of the microfluidic process, another phenomenon was revealed: the formation and deposition of lipid microaggregates within the microchannel (Figure 3.1e, red arrow). This event started simultaneously to the synthesis process and increased over time. Since this event is not evident when only CLs are produced, our experimental observations reveal that the PEG-lipids strongly influence on microaggregates generation. The lipid self-assembly mechanism is governed by the alcoholic concentration gradient established between the central and side streams (BALBINO et al., 2013). The continuous diffusion between water and ethanol across the microchannel width leads to a gradual decrease in the lipids' solubility, inducing the lipids to self-assemble into bilayer fragments and bend to form liposomes with an aqueous core (BALBINO et al., 2013). However, in the present scenario, these instabilities along with the incorporation of

PEG-lipids seem to disturb the bilayer-driven self-assembly mechanism, leading to the simultaneous lipid deposition on the glass wall. As shown in Figure 3.1e, these thermodynamic instabilities occur at the regions with lower local ethanolic concentrations, where lipid solubility is critical, resulting in the observed microaggregates a few micrometers away from the frontiers between the two liquid flows. This observation is in good agreement with numerical modeling simulations regarding the concentration gradient observed under similar FRR using flow focusing microfluidic chips (JAHN et al., 2010).

Alexandrova et al. (2011) (ALEXANDROVA, 2007) reported that phospholipid dispersions can form wetting films on the glass surface due to electrostatic interactions between cationic phospholipids and anionic glass wall (long-range forces). These lipid aggregates evolve mediated by van der Waals interactions from the phospholipids' nonpolar tails. The hydrophobic interactions among the hydrocarbon tails lead to both zwitterionic and cationic lipids adhesion, extending the microaggregates formation on the microchannel glass surface.

To further investigate this phenomenon, we synthesized SCL (1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) under tailored surface, and hydrophobic conditions, by applying perfluorodecyltrichlorosilane (FDTs) coating or PDMS-based devices. In addition, we performed water static contact angle measurements to validate the FDTs coating to the glass wall. Briefly, our findings presented in Figure 3.S3 (electronic supplementary material) revealed that the microaggregation is not exclusively caused by the intermolecular interactions between charged lipids and the walls of the microfluidic devices. With these experimental results, we hypothesize that the affinity of PEG-conjugated lipids to the surrounding water streams may lead to an elevated driving force for lipids diffusion at the frontier between the focused streams, governing the self-aggregation mechanisms into large aggregates.

Considering both the formation of micelles (Figure 3.1d) and the microaggregation, the competition between these self-aggregation mechanisms may produce random lipid aggregates that at first deposit onto the microchannel surface and are further released to the bulk stream, resulting in the high polydispersity of the final product (Table 1, Figure 3.1a).

To correlate these experimental evidences, we increased DSPE-PEG₂₀₀₀ concentration to 5% (molar), and we verified a notable increment on microaggregates formation and accumulation within the microchannels (data not shown). Indeed, the

hydrophilic character of the PEG branches might also play an important role on disturbing not only the bilayer self-assembly mechanism but also increasing the hydrogen bonding interactions with the silica surface (ALEXANDROVA, 2007; ALEXANDROVA et al., 2011). Particularly at the focusing stream, the fraction of PEG-lipids is rapidly hydrated by the side streams, promoting instabilities for the bilayer-driven mechanism of liposomes formation and leading to the main production of micelles and small lipid aggregates.

In view of this, we identified two major obstacles involving the microfluidic synthesis of SCLs: (i) the deposition and accumulation of lipids and microaggregates on the microchannel glass surface, and (ii) the predominant formation of random micelles and small aggregates. Aiming to address these limitations, we evaluated the modulation of the hydrophilicity of PEG-lipids by increasing the ionic strength of the system for SCL synthesis.

3.3.2. Ionic strength modulation

We aimed to evaluate ionic strength as a process variable to modulate the hydrophilicity of PEG-lipids and to reduce the formation of microaggregates. We hypothesized that by increasing the ionic strength of the side stream solutions, the salting out effect would minimize PEG affinity to the aqueous stream, promoting as well an ionic shielding of the silica surface. To address this question, we investigated the effects of phosphate-buffered saline (PBS) with inlet concentrations ranging from 10 to 50 mM.

3.3.2.1. Microaggregation

To evaluate the effects of ionic strength on microaggregates formation, we performed SCL synthesis using the standard PDMS/glass microfluidic devices. Corroborating our hypothesis, real-time monitoring through optical microscopy showed the significant reduction in microaggregation for both systems with 10 mM (Figure 3.2a) and 50 mM (Figure 3.2b) PBS solutions as side streams, when compared to ultrapure water (Figure 3.1e). In addition, as shown in Figure 3.2, we performed a time evolution analysis of the formation of microaggregates,

phenomenon that can be prevented only under high ionic strength conditions (Figure 3.2b).

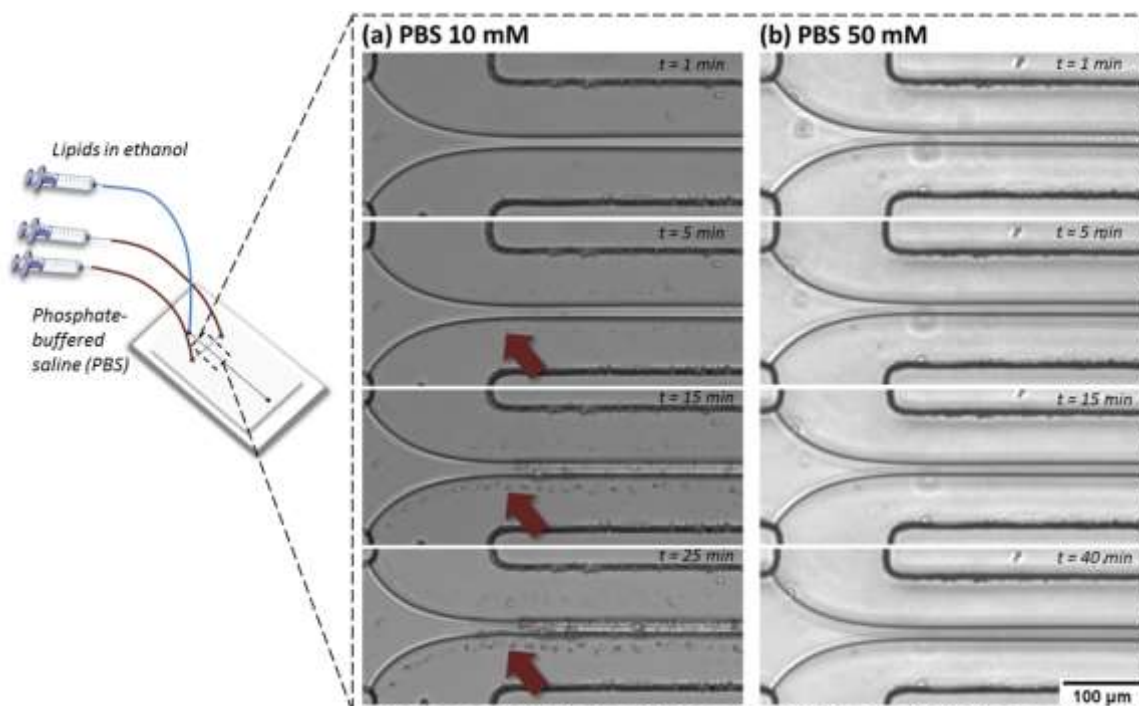


Figure 3.2. Microscopic images with time evolution of SCL (with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) synthesis applying side streams composed of PBS of 10 mM (A), showing the presence of microaggregates (red arrows), and PBS of 50 mM (B). The scale bar indicates 100 μm.

As far as microaggregates formation is concerned, since the phospholipids adsorption on the glass surface involves hydrogen-bond, charge-charge and van der Waals interactions, this phenomenon is significantly sensitive to medium conditions such as pH and ionic strength (ALEXANDROVA, 2007; ALEXANDROVA et al., 2011). In presence of high electrolyte concentrations, the microchannel glass surface possesses a high number of bound cations, forming an ion layer onto the silica surface (MYERS, 1999). In this scenario, for the phospholipid deposition to occur, adsorbed counterions must be displaced from the glass wall by phospholipids. However, since this ionic-equilibrium is disfavored, the ion exchange followed by lipid retention on the glass surface would be significantly reduced (MYERS, 1999). This suggests that the higher the ionic strength, the better shielding condition to avoid lipids interaction with the glass surface.

Considering that PBS at 10 mM (pH 7.4) is more commonly employed for biological assays than higher concentrations, this condition could be assumed to be the straightforward operational set-up for SCL synthesis. However, as shown in

Figure 3.2a, under this condition, the formation of lipid aggregates on the microchannel glass surface occurs within the first 5 minutes of processing and increase over time. Surprisingly, the concentration of PBS 10 mM seems insufficient to completely shield the glass surface and avoid lipid intermolecular interactions with the silica surface. On the other hand, the absence of microaggregation under the conditions of high ionic strength (PBS 50 mM) even after 40 min of processing (Figure 3.2b) implies that, in this case, the majority of the lipid molecules are undergoing bilayer-driven self-assembly, instead of micelles and microaggregates formation mechanisms.

Interestingly, these results indicate that ionic strength can act not only on the glass shielding to avoid microaggregation deposition, but also on tuning the self-assembly process to form liposomes inside the microchannels. To verify the effects of different PBS concentrations on the incorporation of PEG-lipid to the SCL structure, we evaluated the physicochemical properties of the produced SCL through DLS.

3.3.2.2. SCL physicochemical properties

To the best of our knowledge, there are no published studies addressing the modulation of ionic strength as a process parameter for microfluidic synthesis of SCLs. In this context, we performed a complete investigation regarding the effects of ionic strength on the SCL physicochemical features, in terms of size, zeta potential and PDI (Figure 3.3).

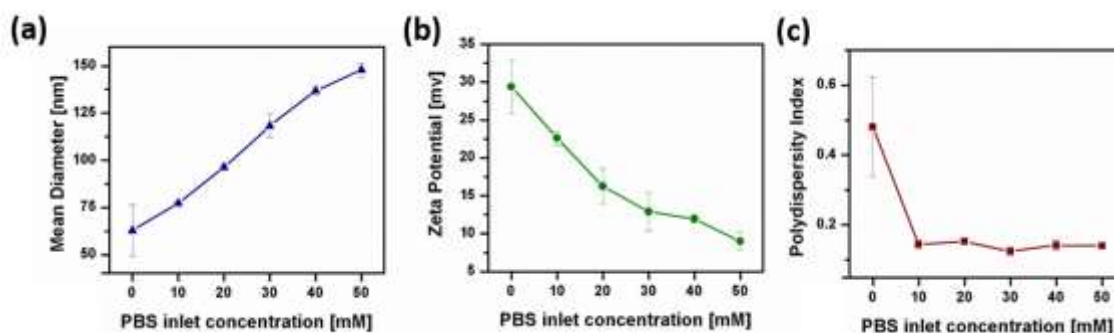


Figure 3.3. Effects of increasing ionic strength for the synthesis of SCLs (with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) by applying side streams composed of PBS from 0 (only ultrapure water) to 50 mM. Physicochemical characterization in terms of intensity-weighted hydrodynamic mean diameter (a), zeta potential (b) and polydispersity index (PDI) (c). The error bars indicate the standard deviation of independent triplicates. Adapted from Perli et al. (2019).

The investigation of SCL size with the increasing ionic strength revealed a straight-line correlation (Figure 3.3a). The rise of the SCLs diameter can be mainly explained by the reduction of phospholipids solubility and the shielding of cationic phospholipids head groups by the ions (CLAESSENS et al., 2004). The reduction of phospholipid solubility occurs due to the salting-out effect, as the bulk water reorientation takes place accompanying the salt addition (CLAESSENS et al., 2004). Whenever the salt concentration is increased, the water molecules initially attached to the lipids relocate to solvate the added ions, causing a disturbance in the hydration shell of the phospholipids (ENDO; PFENNIGSDORFF; GOSS, 2012). This water migration phenomenon promotes the decrease in phospholipids solubility, assisting the hydrophobic effect and increasing the number of packed lipids in the SCLs (KALRA et al., 2001).

Further, the microfluidic-assisted liposomes assembly contains 25% of cationic lipids at the molar fraction. By using PBS solution at the side streams, the amino groups of the lipids are shielded by the anions, diminishing the electrostatic repulsion among them and promoting the lipids approaching. In a contact distance, van Der Waals forces play a greater role in liposomes formation and outweigh the electrostatic repulsion. Considering this effect during the self-assembly process, it also increases the number of aggregated phospholipid molecules, resulting in larger SCLs (Figure 3.3a) (CLAESSENS et al., 2004). Thus, these first findings demonstrated that the ionic strength adjustment represents an important microfluidic parameter to synthesize SCLs with well-defined hydrodynamic diameter.

In sequence, we assessed the effect of the buffer concentration in zeta potential of the SCLs (Figure 3.3b). The results revealed an approximately linear decrease of zeta potential as buffer concentration rises, which is entirely supported by Gouy-Chapman theory (CROMMELIN, 1984; YANG et al., 2017). According to previous reports, the zeta potential declines as the valence of added ions and electrolyte concentration rise in the medium (CARRIÓN, F.J, A. DE LA MAZA, 1993; CARRIÓN; DE LA MAZA; PARRA, 1994; CROMMELIN, 1984; WIACEK, 2007; YANG et al., 2017). Taking into account the cationic membrane surface, it is expected the generation of an electric double layer around the SCLs. An increment of electrolyte in the aqueous dispersant medium increases the anion concentration nearby the lipid vesicles, causing the shrink of the ionic atmosphere and a more

effective electrostatic shielding (CLAESSENS et al., 2004; OLIVER, 1965). As shown in Figure 3.3b, this phenomenon led to the fall on zeta potential, as expected.

Additionally, electrostatic and steric stabilization are the two fundamental mechanisms responsible for SCL physical stability. Electrostatic stabilization is proportional to zeta potential and based on liposomes mutual repulsion due to the arrangement of charged species in the medium (CROMMELIN, 1984; DERJAGUIN; LANDAU, 1993; HUNTER, 1981; VERWEY; OVERBEEK, 1955). As shown in Figure 3.3b, a higher ionic strength resulted in SCL with lower zeta potential which could represent a decrease in colloidal stability. However, even after 11 months of storage at 4 °C in PBS 50 mM the physical properties of SCL were preserved (Figure 3.S4). The present result validates the effect of steric stabilization, responsible for preventing the fusion or coalescence of SCL. This finding also confirms the appropriate incorporation of the DSPE-PEG lipid within the stealth liposome structure, as the formation of micelles was not observed even after long-term storage.

Turning now to the effect of increasing ionic strength on the polydispersity index (PDI), remarkable results were observed. Increasing PBS concentration at the side streams led to a sharp fall in PDI values, when compared to the ultrapure water (Figure 3.3c). Above all, ionic strength conditions allowed the microfluidic synthesis of monodisperse SCLs ($PDI < 0.2$). This outcome may be also explained by the tuning of the lipid self-assembly kinetics. The effects of both lipid solubility decrease and cationic phospholipid shielding work synergistically to provoke the phospholipids approaching, ensuring lipid self-assembly in a shorter period of time, when compared to the conventional process that uses water or low buffer concentration in the side streams. This interpretation of our experimental findings is fully supported by a theoretical estimation performed by Murakoshi and collaborators (NABIKA; FUKASAWA; MURAKOSHI, 2006). In this work, the authors demonstrated that under high electrolyte concentration the phospholipid-phospholipid interactions are governed by van der Waals forces, since the repulsive interactions are significantly diminished, due to the ionic shielding. Our hypothesis is that microfluidic hydrodynamic focusing allied to the ionic strength tailoring reduces the solubility and electrostatic repulsion of the phospholipids, ensuring higher control of lipid self-assembly in a proper spatial-time within the microchannels.

3.3.2.3. SCL size distribution

Despite the low PDI results obtained for all the conditions of applying buffer as side streams, we showed that under the condition of PBS 10 mM microaggregation still occurs within the microchannels (Figure 3.2a). Taking this into account, we wondered how the ionic strength would act precisely on the size distribution of the produced SCL, since this aspect directly reflects on the self-aggregation mechanism developed for each condition. As showed in Figure 3.4, we evaluated the intensity-weighted size distribution of SCL (1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) produced with increasing the ionic strength of side streams composed of PBS from 0 (ultrapure water only) to 50 mM. The corresponding number-weighted size distributions are presented in Figure 3.S5 (supplementary material).

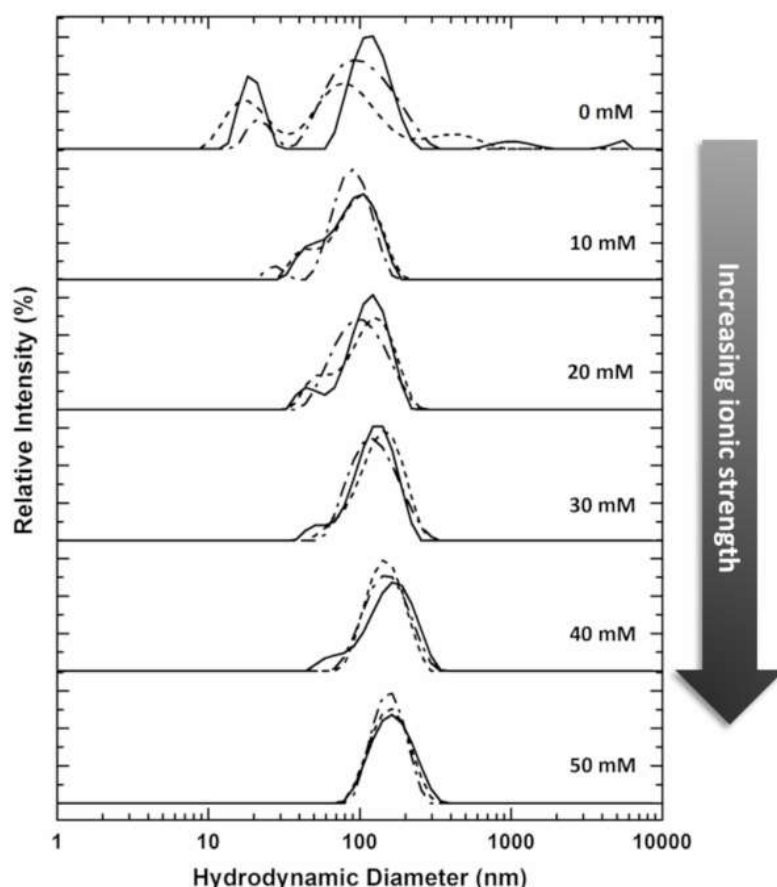


Figure 3.4. Intensity-weighted size distribution of stealth cationic liposomes (SCL) (1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) prepared with increasing ionic strength of the side streams by applying PBS from 0 (only ultrapure water) to 50 mM. The lines represent independent replicates (n=3).

The results in Figure 3.4 show that as the buffer concentration increases, the formation of micelle-like aggregates decreases, leading to narrower size distributions, further supporting the findings presented in this manuscript so far. Interestingly, the size distribution results for PBS 10 mM evidence the presence of small structures, related to micelle-like self-aggregates (Figure 3.4 and Figure 3.S5). This observation is a strong evidence that the microaggregates observed for this condition (Figure 3.2a) may be mainly composed of disordered micelles, which can interact with other lipids and tend to form microaggregates on the glass surface. In view of this, we can affirm that the synthesis of SCL with high uniformity and monomodal size distributions is only possible under high ionic strength conditions.

This outcome suggests that the buffer plays a dominant role on the self-aggregation kinetics of SCL formation. High ionic strength conditions may favor the bilayer-driven lipid self-assembly for synthesis of SCL with monomodal size distributions (Figure 3.4, 50 mM), whilst preventing the formation of micelles and microaggregates within the microchannels (Figure 3.2b). Indeed, this outcome is also supported by the number-weighted size distributions (Figure 3.S5), which reveal that an increase in ionic strength culminate in the production of SCL with good correlations with the intensity-weighted distributions, suggesting the optimized incorporation of DSPE-PEG lipid into the SCL structure.

The most striking result to emerge from this data is that we experimentally demonstrated that the buffer plays a dominant role on the self-aggregation route developed by the lipids. In this way, we can assert that the utilization of high ionic strength side streams is essential to ensure the microfluidic synthesis of monodisperse SCL without micelles and lipid aggregates deposition on the microchannel glass surface.

3.3.3. Proposed mechanism for microfluidic synthesis of SCL

To better understand the findings reported herein, we seek to propose a general mechanism regarding the microfluidic production of SCL under different ionic strength conditions (Figure 3.5).

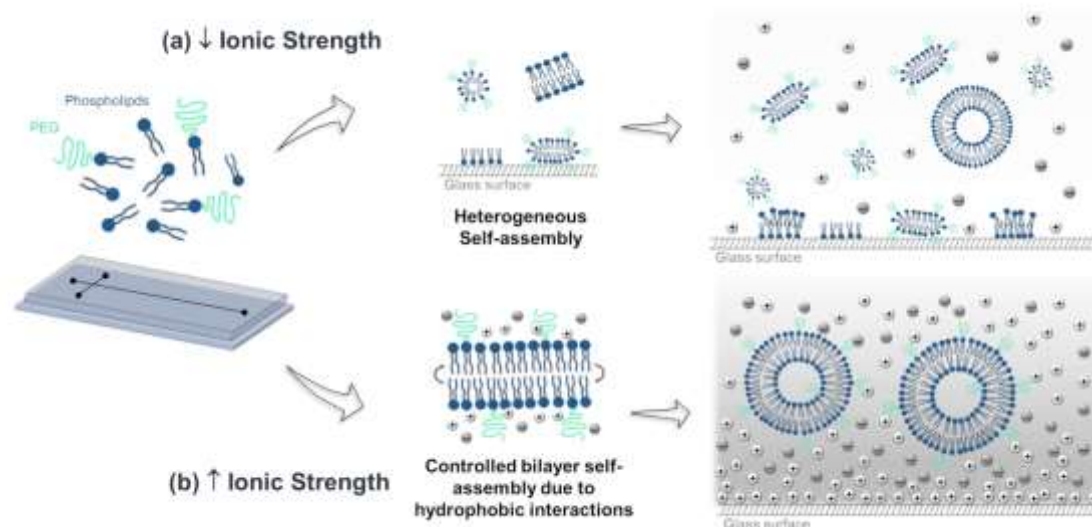


Figure 3.5. Hypothetical illustration of the effects of low (a) and high (b) ionic strength conditions on the formation of stealth cationic liposomes (SCLs) with the inclusion of poly(ethylene glycol) (PEG)-lipids via microfluidic hydrodynamic flow-focusing platforms.

As discussed before (Figure 3.1e), under low ionic strength conditions, our optical microscopy analyses revealed the evolution of lipid deposition on the glass surface since the first minutes of processing (Figure 3.5a). At the hydrodynamic focusing region, the confluence of the laminar flows from the side streams creates an aqueous microenvironment where phospholipids gradually become poorly soluble. The alcoholic concentration gradient developed between the streams induces lipids to follow self-aggregation routes, which are expected to produce monodisperse nano-sized liposomes (BALBINO et al., 2013). For SCLs, however, as the PEG-lipids are quickly hydrated by the side streams composed of water at the focusing region, this leads to the disordered formation of disk-like fragments or oblate micelles (Figure 3.5a) (JAHN et al., 2010). This unstable microenvironment may promote the competition between different self-aggregation mechanisms. While a fraction of the lipid molecules tend to self-assemble into bilayers to form vesicles, the majority tend to heterogeneously self-assemble into polydisperse micelles and lipid aggregates that are deposited on the glass base (Figure 3.1d, Figure 3.5a). Further, due to the flow conditions, a fraction of these aggregates might detach from the silica surface resulting in highly polydisperse self-aggregates (Table 1, PDI>0.4) mainly ranging around 17 nm (Figure 3.1c; number-weighted) in size.

Moreover, we showed that strategies to tune the surface with perfluorodecyltrichlorosilane (FDTs) or PDMS-based microdevices were not

sufficient to avoid microaggregation or to successfully promote a controlled lipid self-assembly, resulting in polydisperse aggregates (Figure 3.S3a-b). As an alternative strategy, we demonstrated that ionic strength can be used as a process parameter to shield the glass surface and avoid lipid intermolecular interactions with the silica wall (Figure 3.2). In presence of high electrolyte concentrations, the microchannel glass surface possesses a high number of bound cations, forming an ion layer onto the silica surface. However, microaggregation still occurs on a smaller scale under low PBS concentrations (Figure 3.2a). These findings imply that the modulation of mass transfer across the hydrodynamic flow-focusing region represents a more relevant aspect for the microfluidic synthesis of SCL when compared to the surface effects.

In view of this, we assessed high ionic strength side streams (Figure 3.5b) in order to reduce the affinity of the PEG-lipids with the aqueous side streams, particularly at the streams frontier, decreasing its diffusion driving force and preventing the formation of micelles and disordered aggregates. Hence, the molecular diffusion in the transverse direction of the flows across the alcoholic concentration gradient must occur in a tuned way. This optimized mass transfer regime can also contribute to the modulation of the lipid self-assembly kinetics. As discussed before, the ions reduce the hydrophilic interactions between the polar heads of the phospholipids and, consequently, may favor the hydrophobic interactions between the nonpolar tails (Figure 3.5b). This phenomenon leads to the bilayer-driven self-assembly into vesicles and promote the formation of monodisperse SCL inside the microchannels (Figure 3.2b and Figure 3.4).

In the present work, the strategy applying high ionic strength did not only act on shielding the surface to avoid microaggregation but also enabled an appropriate incorporation of the DSPE-PEG lipid to produce well-defined monodisperse SCLs. Overall, we demonstrated that side streams with high ionic strength represent a significant microfluidic process parameter for the formation of monodisperse SCL with tuned physicochemical properties.

3.3.4. Bulk versus Microfluidics

Considering our findings that ionic strength plays an important role on SCL formation kinetics, we wondered whether uniform SCL would still be achieved if we altered the developed mixing pattern. As far as we know, no previous work has

provided comparisons between SCL produced by conventional bulk methods and microfluidics. Evaluating these distinct mixing processes (SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014) could give substantial information about whether SCL uniform self-assembly is mainly conducted by the increase in buffer concentration or arisen from the synergistic combination of high ionic strength and microfluidics.

Hence, we compared the SCL synthesis under high ionic strength conditions (PBS 50 mM) in microfluidic hydrodynamic flow-focusing platforms and conventional bulk mixing process, performed by pipette mixing and ultrasonication. This analysis was performed under equivalent conditions, characterized by the same concentration of phospholipids and identical proportion of the liquid solutions of 1:10 of ethanolic lipid dispersion to PBS 50 mM, respectively.

Our results demonstrated that even under high ionic strength conditions, SCL formed by bulk mixing are composed of two or more populations of self-aggregates (Figure 3.6a), while the diffusion-based microfluidic platform resulted in monodisperse well-structured SCL (Figure 3.6b).

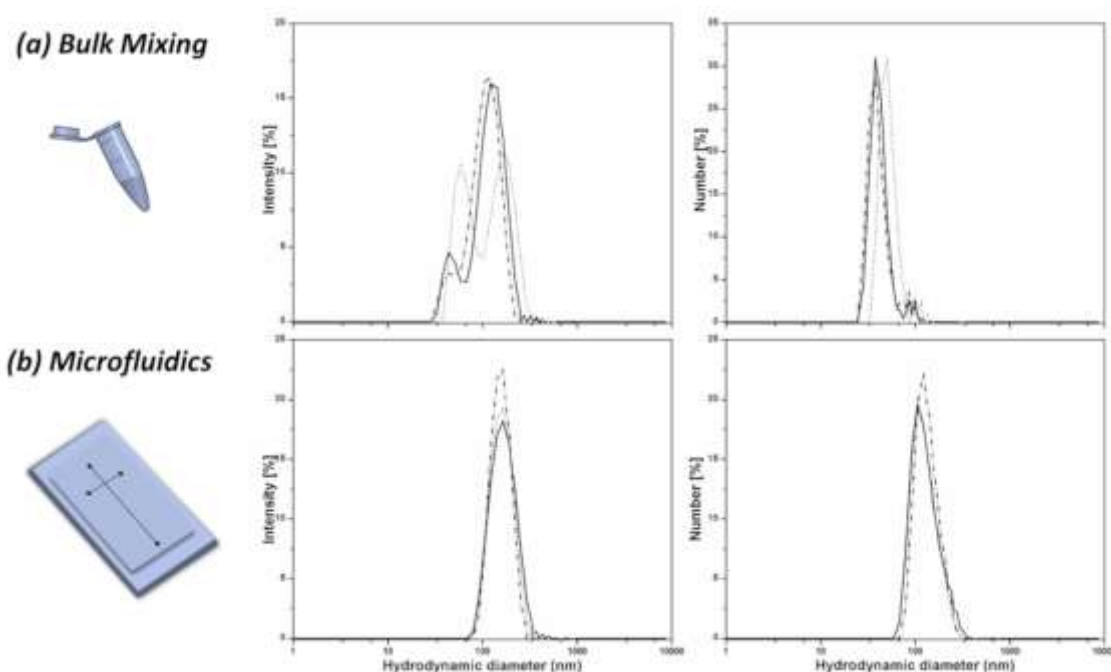


Figure 3.6. Intensity-weighted size distributions of SCL with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀ produced with PBS 50 mM via bulk mixing process (a) and via microfluidic hydrodynamic focusing devices (b). The lines represent independent replicates (n=3).

This observation suggests that the increase in ionic strength alone is not responsible for the properly modulation of the SCL self-assembly (Figure 3.6). These

findings enhance our understanding of liposomes production through microfluidic hydrodynamic focusing. They support the fact that lipids self-assembly is governed by molecular diffusion, as well as provide insights that the mass transfer along the hydrodynamic flow-focusing must occur gradually and in a reproducible manner.

In this manuscript, the most optimized mass transfer was achieved by using a salt saturated solution (PBS 50 mM) as side streams, which reduces the diffusivity of water, ethanol and lipid molecules across the liquid frontiers. Combining mass transfer phenomena with electrostatic shielding of cationic phospholipids, the phospholipid self-assembly kinetics was significantly modulated to produce SCLs with tuned zeta potential, size and monomodal size distributions.

3.4. Conclusions

Herein, for the first time, we have demonstrated the potential of using microfluidic hydrodynamic flow-focusing approaches allied to high ionic strength as a process variable for the synthesis of stealth cationic liposomes (SCL) with uniform and reproducible features. We showed that by adjusting the ionic strength it is possible to promote optimal mass-transfer conditions and, more importantly, to tune the lipid self-aggregation kinetics to achieve synthesis of monomodal SCL. We also demonstrated tailoring of ionic strength as a simple and innovative process alternative to ionically shield the microchannel glass surface, avoiding micelle-like self-assembly and lipid surface deposition. Most importantly, when compared to conventional bulk mixing processes, the controlled diffusion-based mass transfer developed by microfluidics revealed to play a dominant role on SCL self-assembly. By applying high ionic strength side streams, all these physicochemical phenomena act synergistically to ensure the microfluidic synthesis of well-structured monodisperse SCLs with tightly patterned size, zeta potential and size distribution profiles.

Certainly, our findings go beyond the previous reports, collaborating on new perspectives to exploit a simple and robust parameter as ionic strength for the synthesis of precisely tuned SCLs for advanced applications in which polydispersity is critical, including administration as drug and gene delivery agents. It is worth mentioning that, if necessary, post-processing purification steps to decrease the sample's ionic strength can be easily accomplished with dialysis or other available

techniques. Nevertheless, further theoretical investigations would be necessary to support these empirical findings and provide a deeper understanding of the effects of ionic strength on microfluidic-assisted production of SCL.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Processes no. 2016/10337-0 and 2017/08636-2) and University of Campinas – UNICAMP (Campinas, Brazil). We performed the DLS measurements with collaboration of Prof. Dr. Maria Helena Andrade Santana from UNICAMP. The microfluidic devices were fabricated at the Microfabrication Laboratory (LMF). The Cryo-TEM analyses were performed with collaboration of Ismail Es at the Electron Microscopy Laboratory (LME). The mentioned laboratories are part of the Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano) from the Brazilian Center of Research in Energy and Materials (CNPEM).

Supplementary Material

Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices

Gabriel Perli[†], Amanda C. S. N. Pessoa^{2†}, Tiago A. Balbino³, Lucimara G. de la Torre^{2*}.

¹ University of Campinas, UNICAMP, Institute of Chemistry, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

² University of Campinas, UNICAMP, School of Chemical Engineering, PO BOX 6066 13086-090, Campinas, SP, Brazil.

³ Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ/COPPE, Nanotechnology Engineering Program, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

[†] These authors contributed equally.

* Corresponding author: ltorre@g.unicamp.br

Abbreviations

CL	Cationic Liposomes
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
DSPE	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
EPC	Egg Phosphatidylcholine
PBS	Phosphate-buffered saline
PDI	Polydispersity Index
PEG	Poly(ethylene glycol)
SCL	Stealth Cationic Liposomes

Synthesis applying side streams of ultrapure water

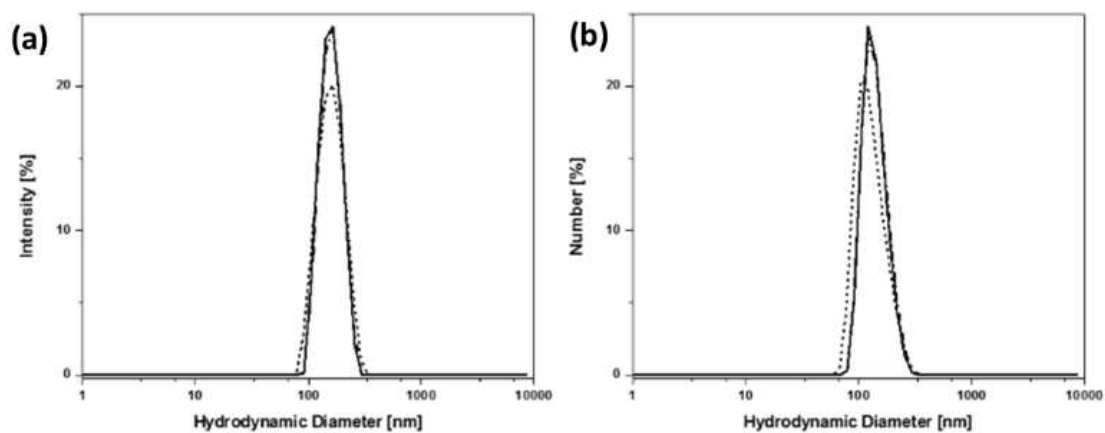


Figure 3.S1. Intensity (a), and number-weighted (b) size distributions of cationic liposomes (CL) composed by EPC:DOTAP:DOPE (2:1:1) produced in hydrodynamic focusing devices applying ultrapure water as side streams. The lines represent independent replicates (n=3).

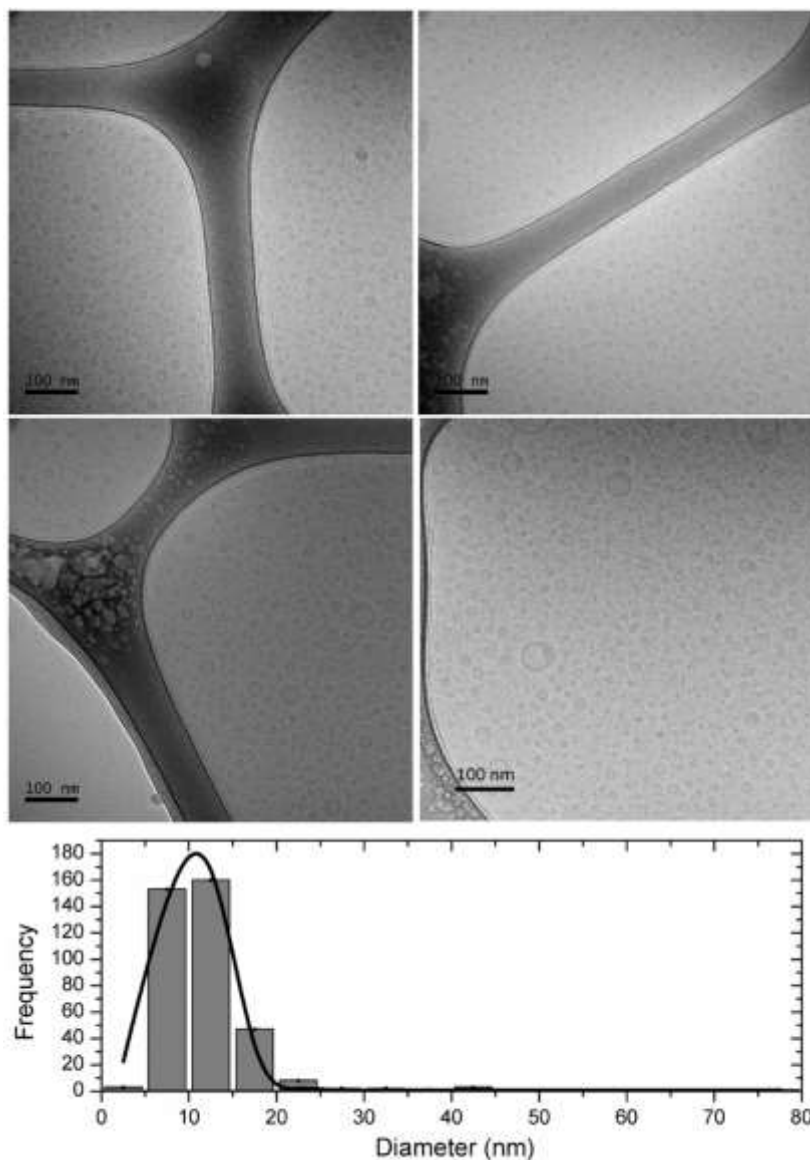


Figure 3.S2. Cryo-TEM images of SCL (1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) produced in hydrodynamic focusing devices applying water as side streams (scale bars indicate 100 nm). Size distribution analysis (histogram and gaussian fit with $R^2 > 0.98$) performed for all presented images.

Surface modification

We exploited the synthesis of SCL, containing 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀, under tailored surface, and hydrophobic conditions. First, we chemically treated the glass surface of the microchannels with perfluorodecyltrichlorosilane (FDTs) coating to assess less adherent conditions. As a second approach, we replaced the glass slide with a PDMS base in order to minimize hydrogen bonds or electrostatic interactions between the lipids and the walls.

We followed an established protocol for chemical surface modification of silica using FDTs (BREISCH et al., 2004). Briefly, a few minutes after sealing the glass/PDMS devices via O₂ plasma activation, we filled the microchannels with a solution of 0.1% FDTs prepared in dried toluene, at room temperature. This procedure was repeated three times, the devices were cleaned with isopropanol and placed in an oven overnight.

We expected that by tailoring the physicochemical properties of the microchannel surfaces, it would be possible to eliminate the formation and surface deposition of microaggregates as observed in Figure 3.1e, thus providing better conditions for SCL synthesis. However, following the process configuration using side streams of ultrapure water, we could still verify the formation of microaggregates for both modified microfluidic devices, resulting in self-aggregates with high PDI of 0.5 and 0.3, respectively for FDTs-treated and PDMS-based microdevices (Figure 3.S3a-b). In addition, number-weighted size measurements showed the prevalence of self-aggregates smaller than 20 nm, more specifically with average diameter of 18.5 ± 7.3 nm and of 7.4 ± 0.5 nm for FDTs and PDMS microdevices, which may be attributed to the formation of micelles.

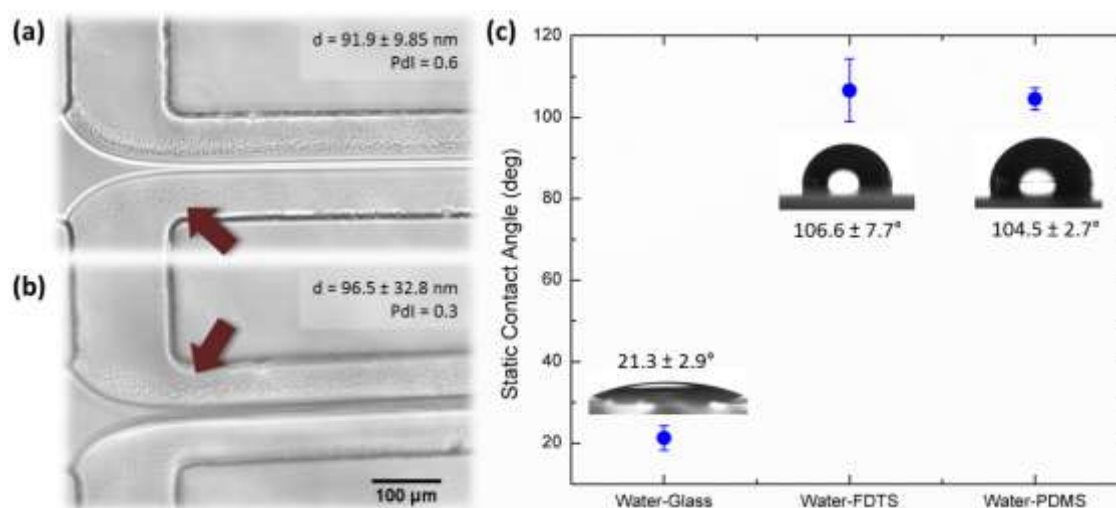


Figure 3.S3. Microscopy images after 15 min of processing of SCLs (with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀) synthesis applying side streams composed by water using FDTs-treated (a) and PDMS/PDMS (b) microdevices, showing the presence of microaggregates (red arrow) for both systems. Average intensity-weighted hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) results with standard deviation (SD) are presented. The scale bar indicates 100 μ m. (c) Water static contact angle (θ) measurements of glass, FDTs-treated glass and PDMS. Measurements were performed in triplicates and are presented as mean \pm standard deviation.

In order to validate our surface modification protocol, we assessed the water static contact angle of FDTs-treated glass slide using Drop Shape Analyzer DSA30 from KRÜSS GmbH (Germany). Briefly, a glass slide was submerged for 15 minutes into a solution of 0.1% FDTs in dried toluene. Next, the slide was cleaned with isopropanol and placed in an oven overnight. For comparison, we also measured the water contact angle of glass and PDMS. As shown in Figure 3.S3c, the FDTs-treated surface presented a water contact angle as high as for PDMS, demonstrating that both surfaces are highly hydrophobic.

SCL physicochemical properties

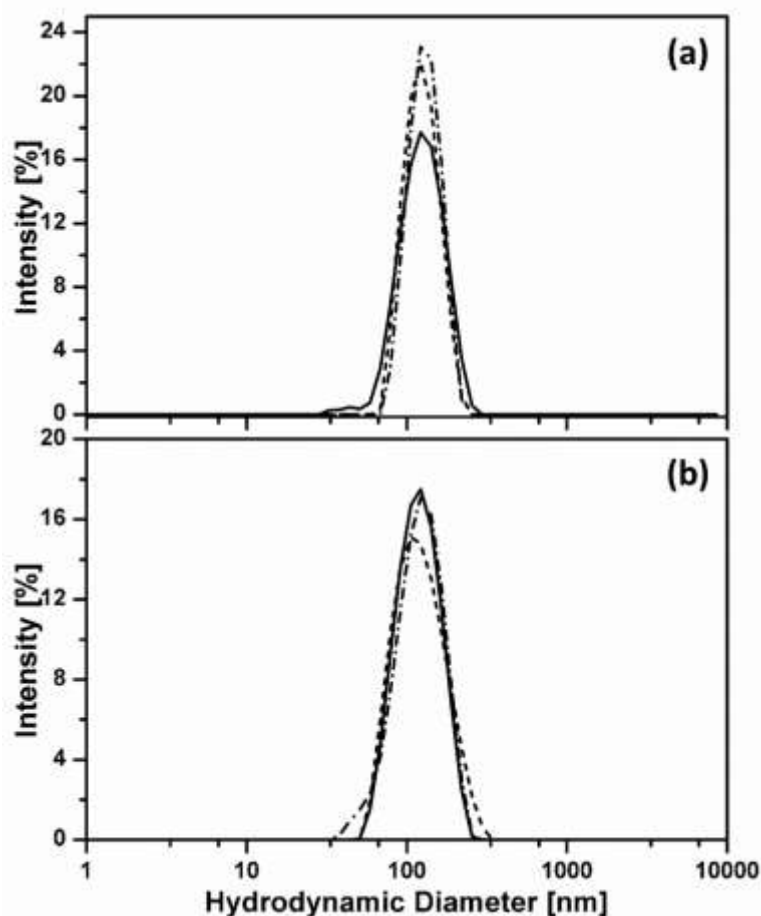


Figure 3.S4. Intensity-weighted size distributions of stealth cationic liposomes (SCL) with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀ produced with PBS 50 mM via hydrodynamic focusing microfluidic devices, characterized after one day of production (a) and after 11 months of storage (b) at 4 °C in PBS 50 mM. The lines represent three DLS measurements of the same sample (n=3).

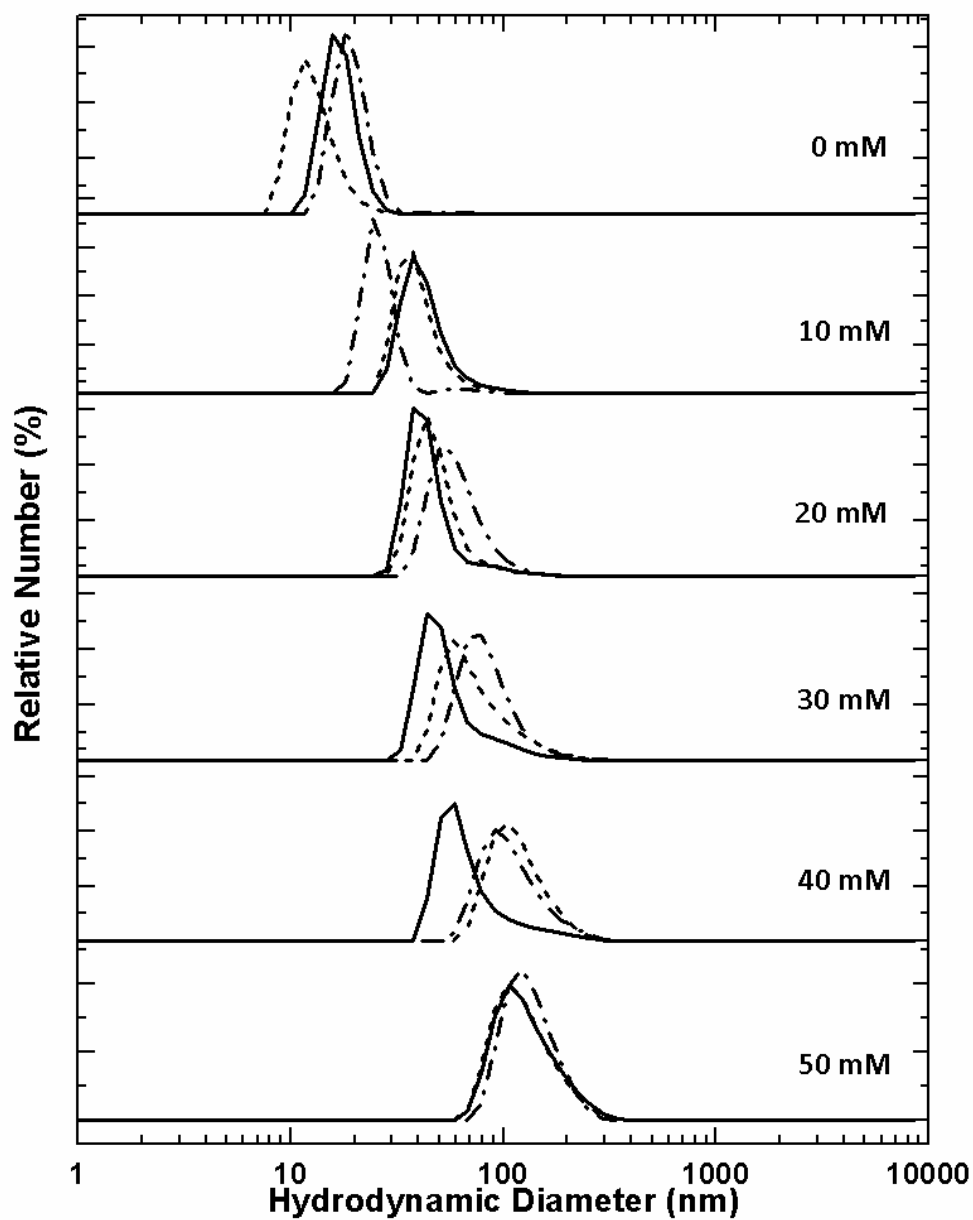
SCL size distribution

Figure 3.S5. Number-weighted size distributions of stealth cationic liposomes (SCL) (1% of DSPE-PEG2000) prepared with increasing ionic strength of the side streams by applying PBS from 0 (only ultrapure water) to 50 mM. The lines represent independent replicates (n=3).

Table S1 – Dynamic Light Scattering measurements of the studied cationic liposomes (CL) and stealth cationic liposomes (SCL, with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀)

Sample	Total lipid dilution (mM)	Z-ave (nm)	Mean Z-ave (nm)	st. dev (nm)	PDI	Mean PDI	st. dev	Mean duration (s)	Intercept	Mean Count Rate (kcp/s)	Signal-to-noise ratio
CL-Water	0.2	143.90	141.17	2.53	0.205	0.188	0.195	0.009	0.948	183.6	0.896
		138.90			0.188				0.948	186.9	0.898
		140.70			0.192				0.948	188.6	0.897
CL-Water	0.2	143.90	143.27	2.01	0.190	0.178	0.018	10	0.939	245.9	0.881
		144.90			0.160				0.944	243.1	0.891
		141.00			0.178				0.939	240.5	0.883
CL-Water	0.2	138.40	137.43	1.00	0.137	0.147	0.016	10	0.954	197.8	0.908
		136.40			0.166				0.956	192.9	0.914
		137.50			0.139				0.953	196.6	0.908
SCL-Water	0.2	55.09	57.45	2.14	0.689	0.532	0.391	0.085	0.919	327.3	0.842
		57.99			0.532				0.920	326.4	0.855
		59.26			0.552				0.924	338.7	0.851
SCL-Water	0.2	79.37	79.52	1.36	0.373	0.355	0.340	0.042	0.939	210.7	0.881
		78.24			0.355				0.941	208.3	0.885
		80.94			0.291				0.946	208.6	0.895
SCL-Water	0.2	61.89	51.60	8.92	0.317	0.572	0.512	0.154	0.901	307.8	0.889
		46.53			0.572				0.907	289.6	0.820
		46.37			0.626				0.901	296.2	0.811
SCL-Water-FDTS	0.2	81.00	91.88	9.85	0.696	0.633	0.062	10	0.900	352.7	0.808
		94.43			0.633				0.874	170.5	0.761
		100.20			0.572				0.841	185.8	0.707
SCL-Water-PDMS	0.2	123.80	96.55	32.80	0.264	0.267	0.309	0.075	0.882	208.4	0.767
		105.70			0.267				0.879	199.7	0.761
		60.15			0.395				0.899	181.3	0.800
SCL-PBS10	0.2	78.52	77.08	0.84	0.132	0.146	0.137	0.008	0.956	178.1	0.914
		76.64			0.132				0.955	175.9	0.906
		78.03			0.163				0.951	182.4	0.906
SCL-PBS10	0.2	75.46	76.57	1.13	0.163	0.180	0.131	0.015	0.953	180.7	0.910
		76.55			0.135				0.954	180.7	0.909
		77.71			0.129				0.956	179.3	0.911
SCL-PBS10	0.2	77.29	78.15	0.88	0.129	0.154	0.143	0.013	0.953	178.9	0.910
		78.21			0.146				0.955	178.6	0.912
		78.95			0.137				0.943	302.3	0.889
SCL-PBS20	0.2	98.11	97.01	0.73	0.137	0.154	0.147	0.009	0.946	301.1	0.893
		98.34			0.150				0.941	302.5	0.884
		96.97			0.134				0.944	284.6	0.891
SCL-PBS20	0.2	94.09	94.87	0.83	0.134	0.155	0.150	0.003	0.946	288.5	0.896
		95.74			0.160				0.945	288.5	0.892
		94.78			0.167				0.944	302.9	0.891
SCL-PBS20	0.2	96.36	96.63	0.27	0.167	0.154	0.156	0.010	0.944	301.2	0.891
		96.90			0.148				0.941	303.0	0.885
		96.62			0.108				0.900	153.1	0.922
SCL-PBS30	0.2	116.50	113.30	2.79	0.108	0.118	0.116	0.007	0.955	152.4	0.913
		112.00			0.121				0.958	151.7	0.919
		111.40			0.137				0.955	164.2	0.912
SCL-PBS30	0.2	117.10	134.93	1.88	0.137	0.126	0.126	0.011	0.955	161.0	0.909
		113.90			0.115				0.959	163.7	0.917
		113.80			0.144				0.957	179.9	0.915
SCL-PBS30	0.2	127.70	126.40	1.47	0.144	0.113	0.130	0.016	0.952	182.3	0.906
		126.70			0.133				0.955	179.6	0.913
		124.80			0.152				0.930	247.6	0.902
SCL-PBS40	0.2	140.20	140.00	0.53	0.152	0.143	0.148	0.004	0.949	248.7	0.900
		139.40			0.147				0.951	247.2	0.904
		140.40			0.153				0.953	224.8	0.906
SCL-PBS40	0.2	135.70	130.53	0.72	0.153	0.139	0.144	0.008	0.952	223.3	0.906
		136.90			0.140				0.950	224.1	0.901
		137.00			0.162				0.954	226.5	0.908
SCL-PBS40	0.2	134.50	134.13	0.81	0.162	0.125	0.134	0.025	0.953	226.9	0.909
		133.20			0.115				0.930	226.2	0.902
		134.70			0.135				0.938	256.7	0.880
SCL-PBS50	0.2	154.70	151.80	3.06	0.135	0.136	0.132	0.006	0.945	252.2	0.891
		152.10			0.126				0.941	251.7	0.885
		148.60			0.147				0.942	251.5	0.887
SCL-PBS50	0.2	148.40	146.63	1.91	0.147	0.139	0.144	0.005	0.943	251.2	0.890
		146.90			0.147				0.943	251.2	0.889
		144.60			0.141				0.948	239.0	0.899
SCL-PBS50	0.2	145.70	144.87	0.81	0.141	0.139	0.142	0.004	0.950	237.0	0.902
		145.10			0.147				0.952	238.9	0.906
		144.10			0.190				0.934	173.1	0.911
SCL-PBS50-BULK	0.2	99.75	100.82	0.96	0.190	0.197	0.206	0.022	0.955	174.5	0.912
		101.10			0.231				0.955	173.0	0.912
		101.80			0.207				0.934	188.5	0.909
SCL-PBS50-BULK	0.2	98.43	99.81	1.20	0.207	0.241	0.217	0.021	0.958	185.5	0.917
		100.50			0.203				0.955	186.9	0.912
		100.30			0.215				0.960	186.0	0.919
SCL-PBS50-BULK	0.2	95.94	95.08	0.75	0.215	0.220	0.210	0.014	0.956	185.7	0.915
		94.73			0.194				0.952	186.5	0.908
		94.57			0.194				0.952	186.5	0.908

4. Caracterização Estrutural e Morfológica de Lipossomas Catiônicos *Stealth* Produzidos em condições de Elevada Força Iônica

Amanda C. S. N. Pessoa¹, Gabriel Perli², Thays França Naves¹, Antônio A. Malfatti-Gasperini³, Marcelo Bispo de Jesus⁴, Lucimara G. de la Torre^{1*}.

¹ Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

³ Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Brasil.

⁴ Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

* Autor correspondente: ltorre@g.unicamp.br

Resumo

Lipossomas catiônicos *stealth* (SCL), estabilizados superficialmente com polietilenoglicol (PEG), representam alternativas relevantes para o desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos e genes. O revestimento superficial com PEG proporciona uma maior estabilidade estérica e tempo de circulação prolongado no organismo. Neste trabalho, explorou-se a caracterização estrutural e morfológica de SCL formados em dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica empregando diferentes condições de força iônica do sistema. As análises de criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM) e de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) indicaram um aumento da fração de lipossomas com estrutura multilamelar concomitantemente ao aumento da força iônica do sistema. Por fim, avaliou-se a complexação destes SCL com DNA plasmidial codificante para proteína verde fluorescente (GFP). Ensaio de eletroforese evidenciaram uma elevada retenção do material genético na estrutura dos SCL. Análises de cryo-TEM e SAXS elucidaram a estrutura dos lipoplexos composta por bicamadas duplas, a partir da complexação do pDNA com a estrutura lipossomal. A avaliação biológica dos lipoplexos foi realizada em termos de transfecção celular e expressão de GFP,

em células normais do epitélio da próstata (PNT2) e em células de câncer de próstata (PC3). Porém, devido à presença de contaminação das linhagens celulares, os ensaios biológicos devem ser repetidos para confirmar os resultados exploratórios observados.

4.1. Introdução

Lipossomas são nanoestruturas lipídicas que apresentam composição e estrutura semelhante a membranas celulares e têm sido extensivamente estudados como vetores para entrega terapêutica (RAN; MIDDELBERG; ZHAO, 2016). Estes nanocarreadores possibilitam proteção da carga terapêutica, biocompatibilidade e direcionamento específico através de estratégias de funcionalização da superfície (FORBES et al., 2019). O recobrimento superficial de lipossomas com polímeros como o polietilenoglicol (PEG) tem sido amplamente empregado com objetivo de blindar estes nanocarreadores frente a células do sistema mononuclear fagocitário, aprimorando ainda sua estabilidade e prolongando o tempo de circulação destes quando administrados de forma sistêmica em organismos vivos (KLIBANOV et al., 1990; SUK et al., 2016).

A utilização de dispositivos microfluídicos permite a síntese de lipossomas em um microambiente confinado, possibilitando um maior controle sobre as propriedades físico-químicas finais dos nanocarreadores, como tamanho, dispersão, lamelaridade e carga superficial (CARUGO et al., 2016). Trabalhos recentes envolvendo a produção de lipossomas funcionalizados com PEG empregando dispositivos microfluídicos do tipo *staggered herringbone* (do inglês, espinha de peixe escalonada) reportam a síntese de lipossomas entre 100 e 200 nm com baixa polidispersidade ($PDI < 0.2$) (CHEUNG; AL-JAMAL, 2019; EŞ et al., 2019; SEDIGHI et al., 2019).

Uma alternativa microfluídica mais simples e robusta se baseia na utilização de dispositivos de focalização hidrodinâmica, na qual a mistura é regida pelo escoamento laminar e influenciada fortemente pela difusão molecular (LU et al., 2016). Estes sistemas são reportados na literatura por permitirem a síntese contínua de lipossomas funcionalizados com polietilenoglicol (PEG) (ANDAR et al., 2014; HOOD et al., 2013a, 2013b, 2014).

Visando aplicações para liberação controlada de genes, estudamos a formação microfluídica de lipossomas catiônicos funcionalizados com polietilenoglicol (PEG) (lipossomas catiônicos *stealth* – SCL), utilizando a focalização hidrodinâmica como estratégia de processo, como reportado previamente (*Capítulo 3*). Neste estudo, demonstrou-se que a força iônica tem papel significativo na formação de SCL monodispersos em sistemas microfluídicos (PERLI et al., 2019). A força iônica (I), que reflete a concentração molar de íons em solução, pode ser definida como: $I = \frac{1}{2} \sum (c \cdot z^2)$, na qual c é a concentração molar do íon e z é sua carga (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

No sistema microfluídico utilizado para a formação de SCL, construído em polidimetilsiloxano (PDMS)/vidro, o aumento da força iônica do sistema mostrou atuar em três âmbitos principais: (i) a blindagem das cargas da superfície vítrea, de forma a evitar interações intermoleculares entre os lipídeos e superfície aniônica; (ii) balancear as forças de hidratação dos lipídeos para com as correntes laterais, atuando assim na redução da força motriz de transferência de massa e evitando a deposição dos lipídeos em forma de micelas e microagregados; e (iii) reduzir a repulsão das cabeças polares positivamente carregadas dos fosfolipídeos e, assim, favorecer as interações hidrofóbicas entre as caudas apolares, governando a auto-agregação lipídica para formação de fragmentos de bicamadas e, conseqüentemente, de SCL (PERLI et al., 2019).

Ainda, no *Capítulo 3* desta tese (PERLI et al., 2019), foi revelado que o aumento da concentração de tampão fosfato salino (PBS) de 10 mM para 50 mM, e conseqüentemente elevando a força iônica, resultou na formação de SCL com maiores diâmetros médios. Quando ponderados por número de partículas (*Capítulo 3*, material suplementar), foi possível evidenciar a tendência de aumento do diâmetro dos SCL contendo 1% (molar) de DSPE-PEG produzidos em microfluídica em diferentes concentrações de PBS. Verificou-se um deslocamento da curva de distribuição de tamanhos, que sugere que os sais atuam na alteração da auto-agregação lipídica para síntese de SCL maiores e mais uniformes, minimizando a formação de micelas, favorecido pela presença de DSPE-PEG. Ademais, a elevada força iônica proporcionou o desenvolvimento de processos altamente reprodutíveis (PERLI et al., 2019).

Dessa forma, o presente capítulo visa estender o estudo da formação de SCL em dispositivos microfluídicos, para futuro desenvolvimento de sistemas não-virais de liberação gênica com entrega direcionada (*targeted delivery*). Neste, objetivou-se verificar os efeitos de diferentes variáveis no mecanismo de auto-agregação lipídica para formação de SCL, e, conseqüentemente, em sua eficiência de entrega de material genético. Dentre os parâmetros avaliados, estudou-se efeito da força iônica na estrutura final dos SCL produzidos utilizando dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica, os efeitos da complexação com pDNA e eficiência de transfecção celular em células de câncer de próstata (PC3). Empregou-se a técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) para avaliação estrutural dos lipossomas e esses resultados foram validados com a técnica de criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM) para verificar a morfologia dos SCL sintetizados em processos microfluídicos em elevada força iônica.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material

Lipossomas catiônicos (CL) foram produzidos utilizando 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina natural de ovo (EPC) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP), adquiridos da Lipoid (Alemanha). O fosfolípido 1,2-diestearil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) derivatizado com polietilenoglicol (PEG) (MW 2000) (DSPE-PEG₂₀₀₀) foi adquirido da Avanti Polar Lipids (EUA). Tampão fosfato salino (PBS) foi adquirido da Laborclin. Peneira molecular de 3-Å 8-12 mesh e etanol foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Para formação de complexos, utilizou-se DNA plasmidial (pDNA) modelo EGFP obtido por fermentação bacteriana e purificado segundo o kit PureLink HiPure Plasmid Maxiprep (Invitrogen, EUA). Para a construção dos dispositivos microfluídicos em polidimetilsiloxano (PDMS) empregou o Sylgard 184 Elastomer Kit da Dow Corning (Midland, MI, EUA).

4.2.2. Métodos

4.2.2.1. Produção de dispositivos microfluídicos

Os microdispositivos utilizados neste trabalho contemplaram geometrias de focalização hidrodinâmica simples. A produção dos dispositivos microfluídicos foi realizada em polidimetilsiloxano (PDMS)/vidro no Laboratório de Microfabricação (LMF) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Inicialmente, a geometria dos canais foi desenvolvida usando o programa AutoCAD (Autodesk), com dimensões de 140 μm de largura e aproximadamente 50 μm de altura. Os desenhos projetados foram impressos em máscara plástica negativa (fotolito) e utilizados para construção do molde negativo. Uma placa de silício revestida com uma camada de fotoresiste SU-8 (MicroChem Corp, USA), com espessura de aproximadamente 50 μm , foi exposta à radiação de luz UV por entre o fotolito contendo a geometria microfluídica. Em seguida, este molde foi transferido para placas de aquecimento de 65 °C e 95 °C. O fotoresiste que não foi polimerizado por UV foi removido, posteriormente, na etapa de revelação, resultando em uma placa de silício contendo a geometria microfluídica em alto relevo. Este molde, por fim, foi empregado no processo de litografia macia para a replicação de microdispositivos de PDMS/vidro.

Para replicação, PDMS foi preparado na proporção de 10:1 de polímero e agente reticulante, respectivamente, homogeneizado, derramado sobre o molde negativo contendo a geometria microfluídica e degaseificado utilizando-se dissecador a vácuo. Em seguida, o molde foi curado em placa de 100 °C por 40 min e recortado no formato de interesse para produção do dispositivo. As lâminas de vidro foram, primeiramente, imersas em água contendo detergente e submetidas à sonicação por 30 min. Após limpeza com acetona e isopropanol, as lâminas foram secas com ar comprimido e selecionadas para preparo dos dispositivos.

A placa resultante de PDMS com microcanais e a de vidro foram submetidas a tratamento de superfície utilizando uma câmara de plasma de oxigênio. A selagem irreversível é realizada colocando as superfícies em contato imediatamente após o tratamento com plasma, resultando nos dispositivos microfluídicos de PDMS/vidro.

4.2.2.2. Produção de Lipossomas Catiônicos *Stealth* (SCL)

Os lipossomas catiônicos funcionalizados com PEG (*stealth*) foram produzidos a partir do preparo da solução-mãe lipídica na concentração de 25 mM contendo DSPE-PEG na proporção de 1% (molar) (*capítulo 3*)(PERLI et al., 2019). Foram avaliados os efeitos da força iônica, empregando correntes laterais compostas por tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,2) sobre as características físico-químicas dos lipossomas obtidos. Utilizou-se tampão fosfato salino (PBS) comercial diluído em água para concentrações entre 10 e 50 mM, correspondendo ao aumento proporcional da força iônica do tampão de aproximadamente 170 a 850 mM, respectivamente. Vale ressaltar que o PBS comercial aqui utilizado é composto por cloreto de cálcio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato dissódico (Na₂HPO₄) e fosfato monopotássico (KH₂PO₄).

Brevemente, a produção de lipossomas foi realizada em concentração lipídica final de 2,27 mM, a partir de vazões de 10,92 e 54,6 µL/min nas correntes central e laterais, respectivamente. Para isso, empregaram-se bombas seringas, modelo PHD2000 (Infuse/Withdraw), da Harvard Apparatus (Holliston, MA, EUA). Como modelo, foram produzidos lipossomas catiônicos (CL) contendo EPC:DOTAP:DOPE iguais a 50:25:25, seguindo a metodologia previamente estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa (BALBINO et al., 2013).

O processo convencional (*bulk*) foi realizado com proporções de DSPE-PEG de 1% (molar), no qual a dispersão lipídica (suspensa em etanol anidro) foi dispensada em excesso de água ou em PBS e a mistura foi realizada através de banho ultrassônico (Cole-Parmer, EUA) com frequência de 40 kHz por 30 min. Para a caracterização físico-química, todas as amostras foram diluídas em água ultrapura para uma concentração final de 0,2 mM, baseada nos lipídeos em solução.

4.2.2.3. Diálise

A diálise dos nanocarreadores foi realizada a fim de remover o tampão e, assim, viabilizar a caracterização destes sem influência dos íons em solução. Para isso, utilizamos sacos de diálise de celulose regenerada com MWCO 3500 Da (Spectrum Labs, EUA). Brevemente, as membranas foram mantidas em água destilada por no mínimo 30 min, seguindo recomendações do fabricante, e

subsequentemente lavadas abundantemente com água ultrapura. Utilizando cliques para vedação das laterais da membrana, a amostra foi adicionada ao interior do saco de diálise e este foi imerso em um frasco erlenmeyer de 2000 mL contendo água ultrapura. A diálise foi realizada durante 24 h, trocando-se a água ultrapura a cada 8 h. As amostras dialisadas foram coletadas e armazenadas a 4°C em geladeira.

4.2.2.4. Amplificação do DNA plasmidial

O DNA utilizado nessa pesquisa foi o plasmídeo pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, EUA), DNA codificante para proteína verde fluorescente (GFP). Sua amplificação e purificação foi realizada conforme Radaic, Paula e Jesus (2014). As bactérias transformadas foram incubadas em meio Luria-Bertani (LB) na concentração de 20 g/L e na presença do antibiótico de seleção canamicina (50 µg/mL), em incubadora do tipo shaker a 37 °C, sob agitação de 120 rpm, *overnight*. Em seguida, as células foram centrifugadas a 12.000 rpm (16260 ×G) por 10 min. O plasmídeo foi, então, isolado e purificado utilizando o kit *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit-Maxiprep* K2100-07 (Invitrogen, EUA). A concentração final de plasmídeo foi determinada através do leitor de placas Cytation5 (Biotek, EUA) a 260 nm (A260), e a purificação foi determinada pela razão A260/A280, isto é, entre as absorvâncias medidas a 260 e 280 nm, respectivamente.

4.2.2.5. Preparo de lipoplexos

A complexação entre nanocarreadores (CL e SCL) e material genético (pDNA) foi realizada pelo processo convencional (bulk), em diferentes razões molares de carga (R_{\pm}). Esta é definida como a relação entre moles de cargas positivas provenientes dos lipídeos catiônicos e moles de cargas negativas provenientes do material genético (oriundos dos grupamentos fosfato). Vale ressaltar que foram utilizadas amostras de SCL após o processo de diálise de retirada do tampão, para, assim, permitir uma maior disponibilidade de cargas superficiais dos nanocarreadores para complexação eletrostática com o pDNA.

Em fluxo laminar, a solução de pDNA foi adicionada à solução de lipossomas em diferentes R_{\pm} , e a mistura foi realizada através de homogeneização com

micropipeta, em banho de gelo. Como modelo para ensaios biológicos, adotou-se a razão R_{\pm} de 3 para ensaios de comparação entre diferentes nanocarreadores, baseado em publicações anteriores do nosso grupo de pesquisa utilizando lipossomas catiônicos (BALBINO et al., 2012).

4.2.2.6. Eletroforese em gel de agarose

Os lipoplexos foram avaliados quanto a sua capacidade carreadora, através de eletroforese em gel de agarose. O ensaio foi realizado empregando 1 μ g de pDNA por poço e variando o volume de nanocarreador de acordo com a R_{\pm} analisada. O gel de agarose foi preparado a 1% (m/m) em 70 mL de solução tampão TAE (1X), corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), utilizando-se uma cuba eletroforética (GNA-100, Amersham Biosciences, Suécia). Para estes ensaios, adicionou-se glicerol 10% (m/m) às amostras (0,2 μ L/ μ L de amostra) previamente a serem inseridas no gel e utilizou-se uma amostra contendo 1 μ g de pDNA livre como controle positivo. A eletroforese ocorreu sob uma tensão de 60 V por 45 min. As bandas de pDNA foram visualizadas e fotografadas utilizando o fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio-imaging systems, Israel) para aquisição de imagens. As bandas foram quantificadas utilizando-se o software ImageJ (National Institute of Health, EUA).

4.2.2.7. Transfecção celular de lipoplexos

A avaliação biológica dos complexos foi feita por ensaios de transfecção celular utilizando-se as células de câncer de próstata (PC3) e células normais do epitélio da próstata (PNT2), para comparação.

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Lonza) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativo (Sigma-Aldrich, EUA) e 1% (v/v) de antibiótico, o qual é composto por combinação de penicilina e estreptomicina (ambas da Sigma-Aldrich, EUA). As células foram incubadas a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂ em incubadora REVCO Ultima II (Thermo Scientific, França).

Os ensaios de transfecção celular foram realizados em placas de cultura de células de 12 poços com densidade de 100.000 células por poço. Após 24h de incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS e o meio de cultura livre de

soro e antibióticos foi adicionado (400 µL/poço). A transfecção foi realizada adicionando 100 µL de lipoplexos (CL-DNA e SCL-DNA) contendo quantidades iguais (1 µg) de pDNA por poço, e as células foram incubadas por 4 h a 37 °C. Utilizou-se como controle negativo (CTRL) a cultura de células sem tratamento e como controle positivo empregou-se o reagente de transfecção comercial Lipofectamina® 2000 (Invitrogen, EUA). Após incubação, o meio de transfecção foi substituído por meio suplementado novamente. As células foram observadas, após 24 h, utilizando-se o microscópio invertido Cytation5 (Biotek, EUA). A eficiência de transfecção celular foi determinada por citometria de fluxo (FACS/Calibur Flow Cytometer, Becton Dickinson, Mansfield, EUA) e a porcentagem de transfecção foi feita utilizando-se o programa FlowJo (Treestar).

4.2.2.8. Ensaio de coloração de Hoechst

O ensaio de coloração de Hoechst é realizado para verificar a contaminação de células por micoplasmas, que são bactérias do gênero *Mycoplasma*. Células PC3 foram semeadas em placas de cultura de células de 12 poços com densidade de 100.000 células por poço. Após 8h, trocou-se o meio completo para meio RPMI incompleto, suplementado apenas com 10% (v/v) de soro fetal bovino, sem antibiótico. As células foram incubadas por 48h a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi removido e foi adicionado uma mistura de corante Hoechst 33258 (bisbenzimidaz H 33258, Sigma) e meio DMEM FluoroBrite™ na proporção de 1:1000 (v/v), respectivamente. Após 30 min de incubação, a mistura foi removida, adicionou-se meio DMEM FluoroBrite™ e os poços foram observados por microscopia de fluorescência empregando o microscópio Cytation5 (Biotek, EUA) com filtro para DAPI/Hoechst.

4.2.2.9. Caracterização Físico-Química dos Nanocarreadores

Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Índice de Polidispersidade

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade dos nanocarreadores foram medidos utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, Reino Unido) através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* – DLS) ponderado por número e

intensidade de partículas. As medidas foram realizadas utilizando laser He-Ne a 633 nm e fonte de energia de 4,0 mW, com detecção em ângulo de espalhamento de 173° (*backscattering*).

Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta dos nanocarreadores foi obtido através da medida da velocidade de mobilidade eletroforética das partículas carregadas a partir da aplicação de um campo elétrico através das amostras analisadas, utilizando a técnica de anemometria laser Doppler. As medidas foram realizadas em triplicata para três amostras independentes, em água a 25 °C, utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, Reino Unido).

4.2.2.10. Morfologia

A investigação da morfologia dos lipossomas (CL e SCL) e lipoplexos foi realizada através de criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM). Primeiramente, grids de cobre (300 mesh) revestidos com carbono (Ted Pella) foram tratados com descarga luminescente através do sistema easiGlow (Pelco) com 15 mA de corrente durante 25 s. Os grids foram em seguida preparados usando um sistema de vitrificação automatizado (Vitrobot Mark IV, FEI, Holanda), em ambiente controlado, à temperatura de 22 °C e 100% de umidade, de forma a evitar evaporação. As amostras (3 μ L) foram depositadas lateralmente nos grids e o sistema Vitrobot operou utilizando os parâmetros de tempo de blot de 3s, força de blot -3 e tempo de espera de 5 s antes do início do processo. As amostras foram analisadas em condição de baixa dosagem, com uma gama de desfocagem de -1 e -4 μ m, utilizando o equipamento Thermo Scientific Talos Arctica™ operando a 200 kV. A aquisição de imagens foi realizada através de câmera F-416 CMOS (TVIPS, Alemanha). Para estes ensaios, as amostras foram dialisadas e concentradas para uma concentração lipídica de aproximadamente 10 mM, utilizando-se um concentrador a vácuo (Savant SpeedVac DNA 110, Marshall Scientific, EUA) para remoção do solvente por evaporação. Esta análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) nas instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), com suporte técnico do Dr. Marcelo A. de Farias.

4.2.2.11. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo (do inglês *Small Angle X-ray Scattering* – SAXS) foi utilizada para caracterizar os lipossomas e lipoplexos em diferentes condições de força iônica. A técnica de SAXS pode fornecer informações estruturais como o perfil de densidade eletrônica da bicamada lipídica, além de informações sobre o empacotamento das bicamadas, tais como a fração de vesículas uni e multilamelares dos nanocarreadores. Para esta técnica, as amostras foram previamente dialisadas e concentradas para uma concentração lipídica de aproximadamente 10 mM, utilizando-se um concentrador a vácuo (Savant SpeedVac DNA 110, Marshall Scientific, EUA) para remoção do solvente por evaporação.

Os experimentos foram realizados na linha de luz SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), operando em uma energia de 8 keV e com distância entre amostra-detector de 880 mm. A intensidade medida é exibida em função do vetor de espalhamento q (também chamado de vetor de transferência de momentum do fóton espalhado), cujo módulo é dado por $q = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$, sendo λ o comprimento de onda de radiação e 2θ o ângulo de espalhamento. O intervalo em q avaliado foi entre $0,1 \text{ nm}^{-1}$ e $5,0 \text{ nm}^{-1}$.

A análise dos dados está sendo realizada utilizando modelos matemáticos desenvolvidos em colaboração com Dr. Antônio A. Malfatti-Gasperini do LNLS/CNPEM e já reportados na literatura pelo nosso grupo de pesquisa (BALBINO et al., 2012, 2016; EŞ et al., 2019; GASPERINI et al., 2015). Resumidamente, o modelo consiste em escrever a intensidade espalhada – $I(q)$ – como o produto de duas contribuições, o Fator de Forma – $F(q)$ – e o Fator de Estrutura – $S(q)$. O Fator de Forma fornece informações sobre o perfil de densidade eletrônica da bicamada lipídica, dando informações sobre a espessura da bicamada e posições médias das moléculas constituintes da bicamada. O Fator de Estrutura fornece informações sobre o (eventual) empacotamento das bicamadas. Em um sistema multilamelar, por exemplo, o fator de estrutura fornece o número médio de bicamadas, a distância média entre elas e o parâmetro de Caillé, que é uma medida da correlação entre bicamadas empilhadas. Com uma modelagem apropriada, é possível obter a fração de material em um sistema lipossomal que se encontra empilhado (fase multilamelar) ou sem empilhamento de bicamadas (fase unilamelar). É importante

entender que, para a técnica de SAXS, um lipossoma multilamelar onde as bicamadas não se encontram próximas (distâncias muito maiores que a espessura das bicamadas) ou ordenadas (empilhamento com distâncias muito diferentes entre si) vão se comportar como sistemas unilamelares ou com um alto parâmetro de Caillé, o que pode dificultar a obtenção da fração de fase multilamelar do sistema. Vale ainda dizer que o Fator de Forma pode ser modificado de forma a simular o espalhamento de uma micela oblata (achatada).

4.2.2.12. Análise Estatística

Os resultados para diâmetro médio, índice de polidispersidade e potencial zeta dos SCL e complexos formados com pDNA foram expressos em média das triplicatas \pm desvio padrão (DP). A significância estatística foi determinada empregando o teste t de *Student* bicaudal através do software Minitab, com nível de confiança de $p < 0,05$.

4.3. Resultados

A formação de lipossomas catiônicos (CL) em microfluídica foi descrita anteriormente por nosso grupo de pesquisa (BALBINO et al., 2013) empregando dispositivo de focalização hidrodinâmica simples, correntes laterais de água e dispersão lipídica de EPC:DOTAP:DOPE em etanol anidro. Em dispositivo de focalização hidrodinâmica, a contra-difusão entre as correntes laterais aquosas e central alcoólica (contendo os lipídeos) leva à diminuição gradual da solubilidade dos lipídeos e, conseqüentemente, à auto-agregação em bicamadas lipídicas, formando-se, por fim, lipossomas catiônicos (BALBINO et al., 2013).

Tendo isso em vista, a investigação da formação de lipossomas catiônicos *stealth* (SCL) aplicou a mesma metodologia de focalização hidrodinâmica investigada anteriormente por nosso grupo de pesquisa, incluindo o lipídeo 1,2-diestearil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DSPE) derivatizado com polietilenoglicol (PEG) (DSPE-PEG₂₀₀₀), na proporção de 1% (molar) para a formação de SCL. O efeito da força iônica na estrutura dos SCL foi investigado e, por fim, sua capacidade de incorporar material genético foi avaliada.

4.3.1. Efeito da força iônica na estrutura e morfologia dos SCL

Com intuito de melhor caracterizar os efeitos da força iônica no processo de auto-agregação lipídica, foram empregadas técnicas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) para avaliação estrutural e criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM) para análise morfológica dos SCL sintetizados em microfluídica sob diferentes condições de força iônica.

Para tornar estas caracterizações possíveis, foi necessário realizar um pós processamento das amostras. Primeiramente, empregamos diálise para remoção do tampão e, posteriormente, concentração da amostra utilizando um concentrador a vácuo até atingir concentrações lipídicas próximas a 10 mM. Esta concentração foi determinada de acordo com protocolos anteriores de caracterização desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa para as técnicas de cryo-TEM e SAXS (BALBINO et al., 2012, 2013, 2016; EŞ et al., 2019).

A Figura 4.1 apresenta as características físico-químicas dos nanocarreadores depois dessas duas etapas de pós-processamento, para amostras de SCL preparadas em PBS 50 mM. Como controle, os resultados foram comparados às características dos SCL após a síntese microfluídica (amostras ainda em PBS, denominadas com a legenda “original”) (Figura 4.1). Os resultados para as amostras preparadas em concentrações de PBS entre 10 a 40 mM estão apresentados na Figura 4.S1 (material suplementar).

Vale ressaltar que para a caracterização físico-química, todas as amostras foram diluídas em água ultrapura para uma concentração final de 0,2 mM, baseada nos lipídeos em suspensão, permitindo, assim, a comparação dos lipossomas sem pós-processamento (originais) com os SCL após diálise e concentração.

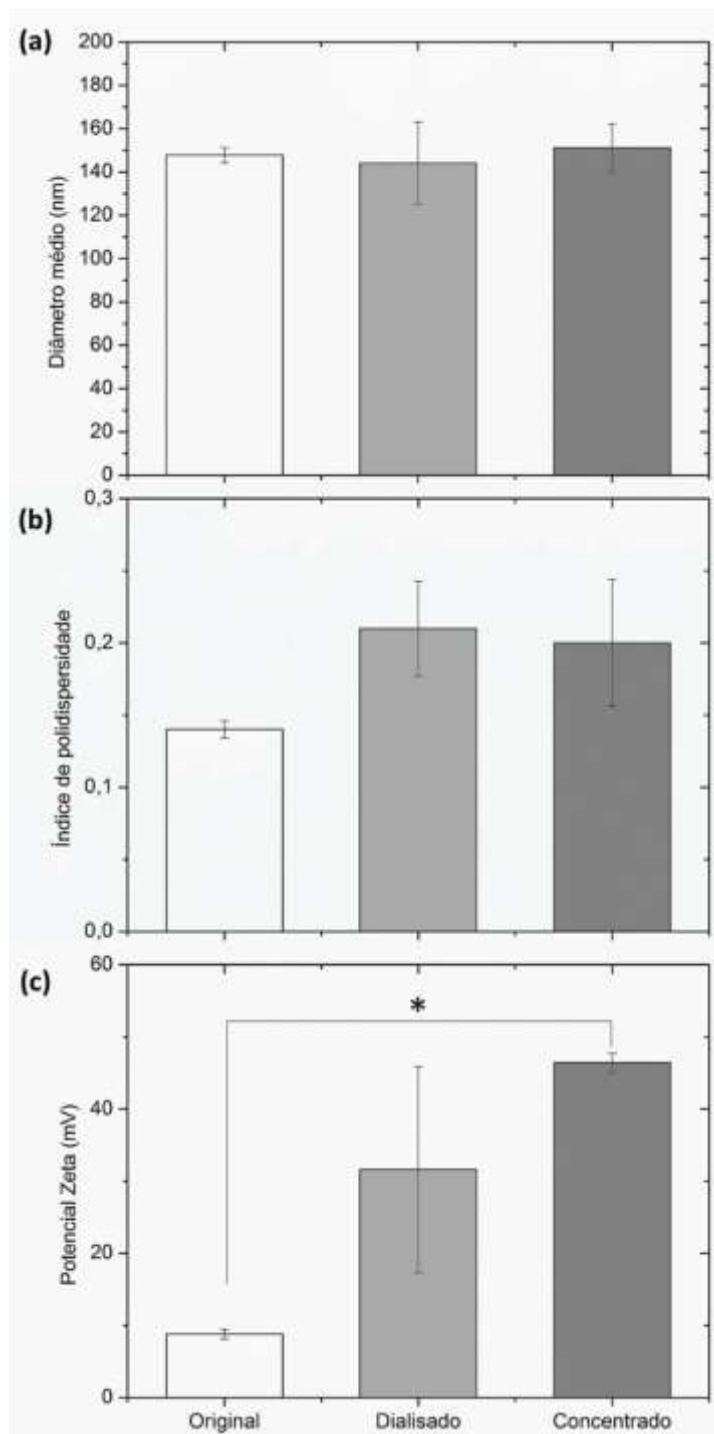


Figura 4.1. Características físico-químicas de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em concentrações de PBS de 50 mM e submetidos ao pós tratamento de diálise e concentração. (a) Diâmetro hidrodinâmico médio ponderado por intensidade de partículas, (b) Índice de polidispersidade (PDI) e (c) Potencial zeta. As barras de erro representam o desvio padrão entre triplicatas independentes. (*) Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre pares.

A partir desses resultados, não foram observadas diferenças significativas para o diâmetro médio dos SCL mesmo após utilização do concentrador a vácuo (Figura 4.1a), corroborando resultados prévios de concentração de lipossomas (EŞ et al., 2019). Além disso, confirmou-se novamente a tendência de aumento do

tamanho do SCL com o aumento da força iônica (Figura 4.S1a, material suplementar), apresentada anteriormente no *capítulo 3* deste trabalho (PERLI et al., 2019).

Para os SCL preparados em PBS 50 mM, o PDI não foi alterado significativamente após o pós processamento (Figura 4.1b). Por outro lado, ao avaliar os SCL preparados em diferentes condições de força iônica, o PDI mostrou-se mais elevado para as amostras após o processo de concentração, principalmente para SCL preparados em concentrações de PBS acima de 20 mM (Figura 4.S1b, material suplementar). Isto provavelmente é inerente ao processo de remoção do solvente, o que já foi reportado anteriormente para o uso do concentrador a vácuo (EŞ et al., 2019). Não obstante, o PDI manteve-se abaixo de 0,25 para todas as amostras, evidenciando que o pós-processamento estudado é um protocolo promissor para possibilitar a caracterização dos SCL (Figura 4.S1b, material suplementar).

Já o aumento significativo do potencial zeta (Figura 4.1c) para os SCL após a diálise e concentração se deve ao fato da remoção dos íons em solução, causando a dessolvatação das cabeças polares e positivamente carregadas dos lipídeos catiônicos. Resulta-se assim em uma densidade de cargas superficial positiva, alterando a espessura da dupla cama elétrica, consequentemente levando a uma maior mobilidade eletroforética (YANG et al., 2017).

Avaliamos também a influência do pós-processamento em termos de distribuição de tamanhos para amostra de SCL preparada em PBS 50 mM. Como apresentado na Figura 4.2, pode-se observar que não houve alteração significativa da distribuição de tamanhos para as amostras de SCL original, após diálise e após concentração a vácuo (Figura 4.2a, b e c, respectivamente).

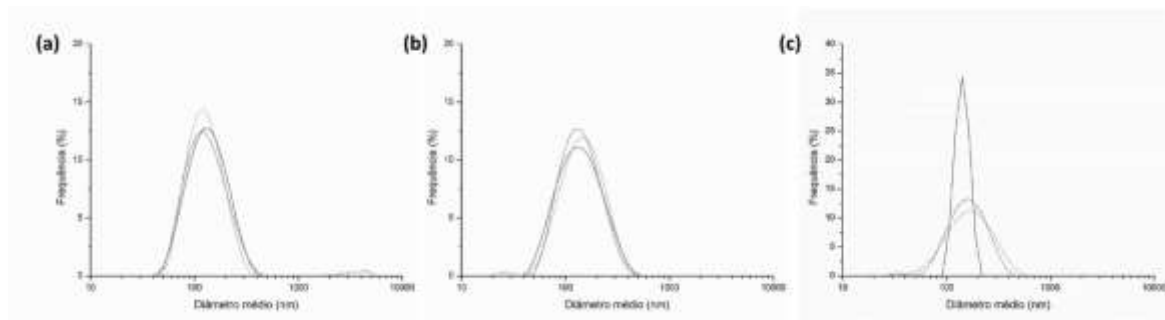


Figura 4.2. Distribuição de tamanhos ponderada por intensidade de partículas para lipossomas catiônicos *stealth* (SCL) (com 1% (molar) de DSPE-PEG), preparados em PBS 50 mM. (a) Amostra original; (b) após diálise em membrana MWCO 3,5 kDa; e (c) após concentrador a vácuo. As linhas representam distribuições de tamanho para triplicatas independentes.

À vista disso, o pós-processamento aqui estudado pode ser inferido como apropriado para preparo das amostras lipossomais para caracterização e possivelmente sem comprometer a estrutura final dos SCL formados em microfluídica. O processo de diálise já é consagrado na literatura, enquanto a concentração a vácuo se mostra uma alternativa promissora para aplicações que requerem baixas concentrações lipídicas, especialmente nos âmbitos da microfluídica e da nanomedicina.

4.3.1.1. Caracterização estrutural

A estrutura dos SCL sintetizados com aumento da concentração de PBS entre 10 e 50 mM foi analisada através da técnica de SAXS (Figura 4.3). Esta é uma ferramenta relevante para a investigação estrutural de sistemas anfifílicos na escala nanométrica, fornecendo informações importantes como periodicidade e tamanho de membranas lipídicas (BALBINO et al., 2012). Todos os SCL preparadas em tampão foram previamente dialisados e concentrados, conforme pós-processamento discutido anteriormente (Figura 4.1).

A Figura 4.3 mostra os perfis de intensidade espalhada para SCL contendo 1% (molar) de DSPE-PEG formadas em água com diferentes concentrações do tampão PBS (linhas coloridas). Para fins de comparação, também foram feitas medidas de DSPE-PEG puro (linha preta). Já é de conhecimento da literatura que este lipídeo, pela presença da cadeia de PEG em sua molécula, tende à formação de micelas (JOHNSSON; EDWARDS, 2003). Estas micelas esféricas possuem um mínimo de intensidade bastante pronunciado em q próximo de $0,8 \text{ nm}^{-1}$ (a posição exata depende do tamanho dos lipídeos constituintes da micela).

Quando DSPE-PEG é utilizado em composições contendo fosfolipídeos, existe a tendência de formação de micelas oblatas (Figura 4.3). Estas micelas são compostas por bicamadas isoladas (vide esquema ilustrativo na Figura 4.3). O espalhamento de uma bicamada isolada é arredondado e regular; oscilações ou mudanças de inclinação indicam a presença de sistemas multilamelares ou a possibilidade de serem micelas oblatas. A partir da Figura 4.3, pode-se notar que os sistemas lipídicos contendo 1% (molar) de DSPE-PEG possuem um perfil de espalhamento típico de sistemas em bicamadas, como aqueles formados por

micelas oblatas ou lipossomas. Este espalhamento é caracterizado pela presença de lobo que se estende até $q \sim 2.5$ a 3 nm^{-1} (dependendo dos lipídeos usados na formulação), seguido de vários lobos de menor intensidade, muitas vezes não visíveis por causa do baixo poder de espalhamento dos fosfolipídeos.

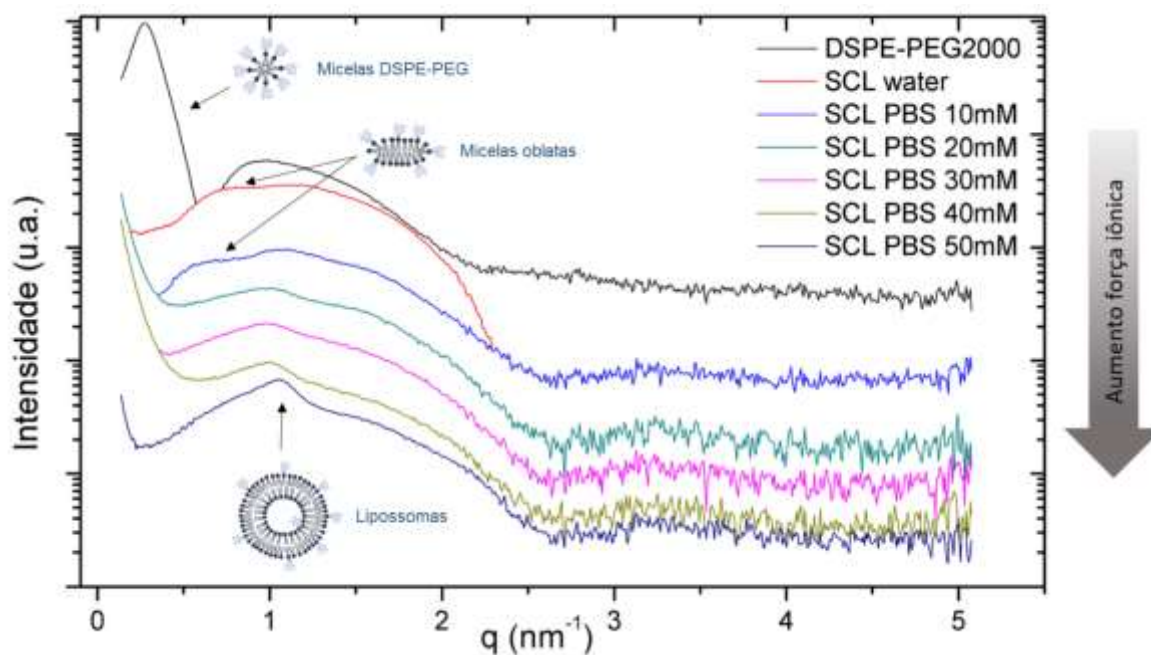


Figura 4.3. Intensidade de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em água (*water*) e em diferentes concentrações de PBS entre 10 e 50 mM. A amostra de DSPE-PEG₂₀₀₀ corresponde à amostra de micelas. Os SCL preparados em PBS foram previamente dialisados, e todas as amostras foram submetidas à concentração a vácuo para análise por SAXS.

Uma análise preliminar dos resultados de SAXS (Figura 4.3) indica a presença de oscilações nas amostras de SCL preparadas em água e PBS 10 mM, típicas de amostras em forma de micelas oblatas. Já para as amostras em maior força iônica, estas oscilações desaparecem e dão lugar a um pico na faixa do vetor de espalhamento $q = 1 \text{ nm}^{-1}$. Este pico está relacionado à mudança dos parâmetros lamelares dos SCL sob influência da força iônica, ou seja, a um aumento da fração de agregados do sistema que possui bicamadas consecutivas na estrutura lipossomal. Esse padrão de espalhamento com contribuição do fator de estrutura se assemelha ao apresentado anteriormente para formação de lipoplexos multilamelares (BALBINO et al., 2012, 2016). Observa-se que com o aumento da força iônica acarreta em um pico em $q = 1 \text{ nm}^{-1}$ mais pronunciado, sugerindo que provavelmente há um concomitante aumento na fração de SCL multilamelares para essas condições.

Vale ressaltar que esta análise qualitativa de SAXS corrobora nossa hipótese prévia (PERLI et al., 2019) de que a produção microfluídica de lipossomas catiônicos incluindo DSPE-PEG leva a formação simultânea de micelas e vesículas em condições de baixa força iônica. Além disso, estes resultados indicam que o aumento da força iônica promove a formação predominante de vesículas em detrimento das micelas e, ainda, favorece o aumento da lamelaridade dos nanoagregados (Figura 4.3).

A análise utilizando modelos matemáticos, para certificar essas suposições e extrair informações quantitativas como fração de vesículas uni e multilamelares, número e tamanho aproximado das bicamadas, está sendo desenvolvida em colaboração com o Dr. Antônio A. Malfatti-Gasperini, do LNLS/CNPEM, que possui ampla experiência com avaliação de lipossomas utilizando a técnica de SAXS (BALBINO et al., 2012, 2013, 2016; EŞ et al., 2019; GASPERINI et al., 2015).

Por fim, é importante evidenciar que a análise por SAXS fornece informações quanto à lamelaridade das vesículas, porém, esta técnica requer que os sistemas apresentem um certo grau de organização (por exemplo, padronização das distâncias entre as lamelas) para poder vislumbrar e extrair essas informações. Dessa forma, esta análise deve ser complementada com outras técnicas de caracterização morfológica, como criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM).

4.3.1.2. Caracterização morfológica

Visando melhor caracterizar a hipótese da alteração do mecanismo de auto-agregação com o aumento da força iônica, empregamos análises de cryo-TEM para verificar a morfologia dos SCL produzidos em microfluídica. Para comparação, imagens de cryo-TEM da amostra de SCL contendo 1% (molar) de DSPE-PEG preparada com correntes laterais de água ultrapura está reportada no *Capítulo 3* deste trabalho (PERLI et al., 2019), a qual apresenta a formação de nanoagregados e micelas de aproximadamente 12 ± 6 nm.

Os SCL preparados em PBS 10 mM estão apresentados na Figura 4.4a. Pode-se observar que este processo resultou na síntese de SCL com morfologia esférica, exibindo uma maior prevalência de nanoagregados unilamelares e, em menor proporção, com duas ou mais bicamadas. A análise da distribuição de

tamanhos pelo software ImageJ® revelou a presença de nanoagregados de $50,4 \pm 18,4$ nm de diâmetro médio, com coeficiente de variação (CV) de 0,36 (Figura 4.4b). Estes resultados estão de acordo com a análise de DLS ponderada por número de partículas para os SCL formados em PBS 10 mM após diálise e concentração, com diâmetro médio de $54,4 \pm 5,4$ nm (Figura 4.4c).

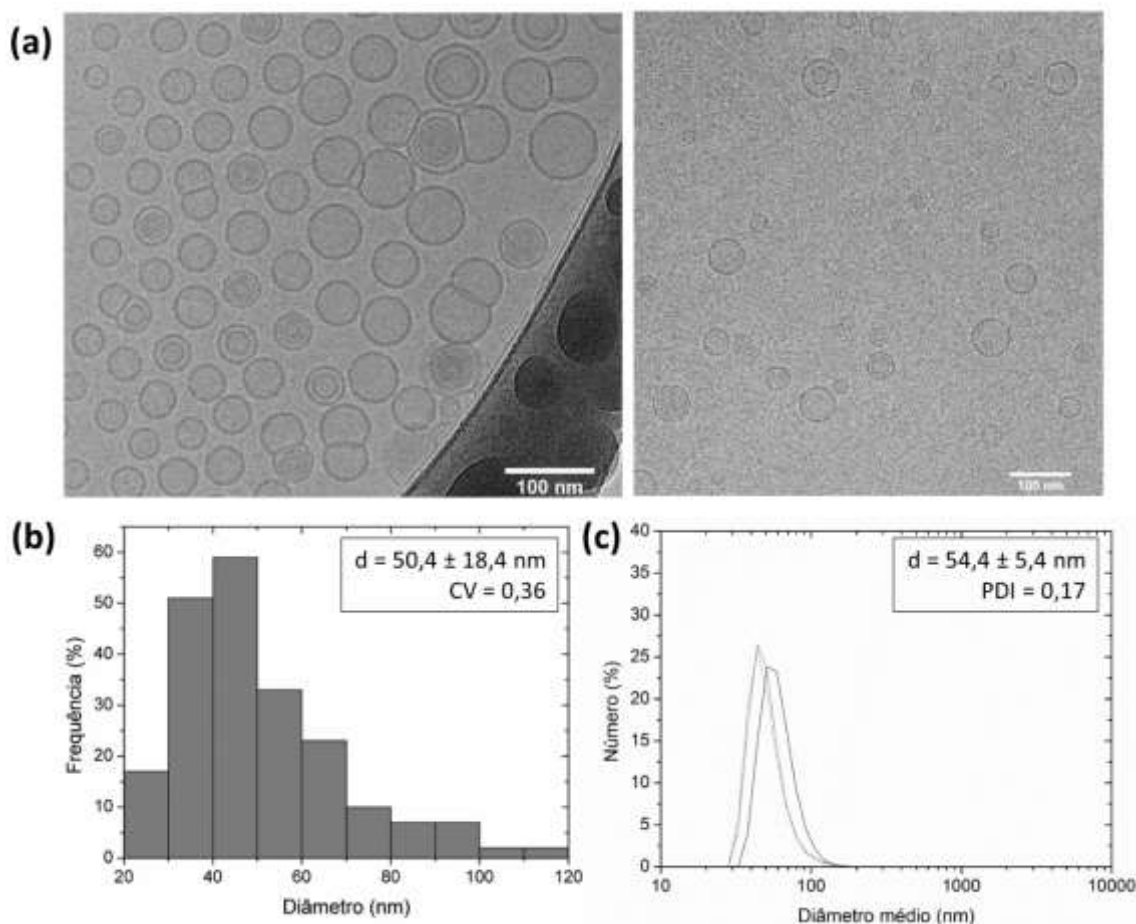


Figura 4.4. (a) Imagens obtidas por criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM) de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em PBS 10 mM. A barra de escala indica 100 nm. (b) Histograma da análise de distribuição de tamanho de partículas ($n=200$). (c) Distribuição de tamanhos ponderada por número de partículas obtida pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os SCL foram preparados em PBS 10 mM empregando dispositivos microfluídicos e, em seguida, foram dialisados e submetidos à concentração a vácuo, previamente às análises de cryo-TEM e DLS.

Comparativamente, a caracterização dos SCL sintetizados em PBS 50 mM por cryo-TEM revelou a formação de uma grande proporção de nanoagregados multilamelares (Figura 4.5a). Isto sugere que o aumento da força iônica do sistema pode, provavelmente, contribuir concomitantemente com o aumento do teor de lamelaridade dos lipossomas. De fato, estas observações por cryo-TEM corroboram as suposições atribuídas à análise por SAXS, que evidenciou uma fração estrutural significativa de lipossomas multilamelares nestas condições (Figura 4.3).

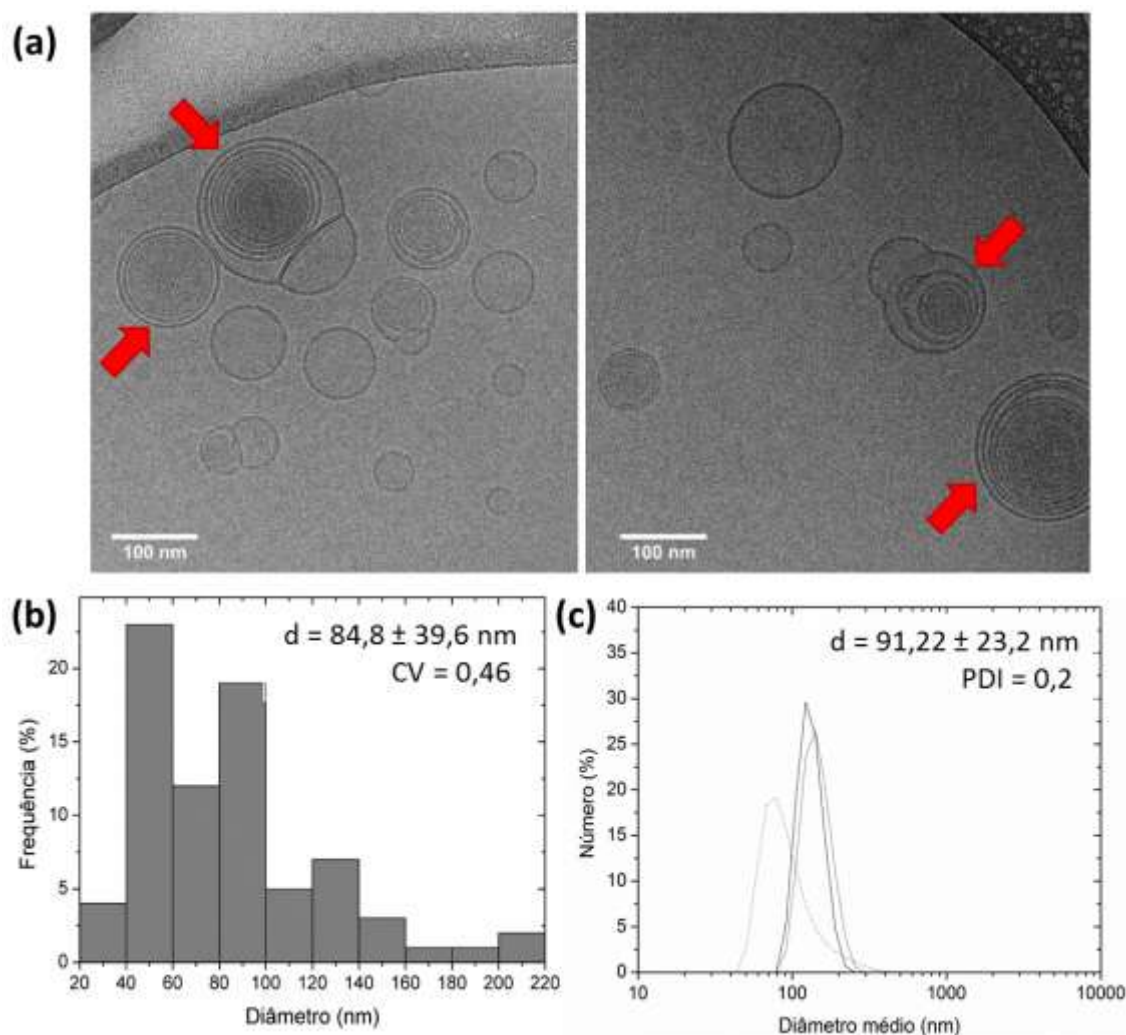


Figura 4.5. (a) Imagens obtidas por criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM) de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em PBS 50 mM. Setas vermelhas evidenciam a presença de SCL multilamelares. As barras de escala indicam 100 nm. (b) Histograma da análise de distribuição de tamanho de partículas ($n=77$). Os SCL preparados em PBS 50 mM foram dialisados e, em seguida, submetidos à concentração a vácuo para análise por cryo-TEM.

Além disso, a distribuição de tamanhos foi obtida com auxílio do software ImageJ® (Figura 4.5b) indicou a presença de SCL com aproximadamente $84,8 \pm 39,6 \text{ nm}$ (CV de 0,46) de diâmetro médio, resultados similares aos obtidos por DLS ponderado por número de partículas de $91,22 \pm 23,2 \text{ nm}$ de diâmetro hidrodinâmico para SCL nessas condições após concentração (Figura 4.5c).

Nosso grupo de pesquisa reportou recentemente a formação de SCL contendo 1% (molar) de DSPE-PEG em dispositivos microfluídicos do tipo *staggered herringbone* (do inglês, espinha de peixe escalonada) (EŞ et al., 2019). Estes sistemas empregam depressões e barreiras nos canais microfluídicos que proporcionam o desenvolvimento de mistura baseada em advecção caótica, a qual representa o transporte multidirecional de uma substância por entre um fluido em

movimento (CAPRETTO et al., 2011). Os autores realizaram análises de SAXS e cryo-TEM e demonstram a formação de SCL unilamelares utilizando correntes aquosas. Porém, o processo só se mostrou viável em condições de razão entre taxas de fluxo (FRR) de 1, equivalente a uma proporção de etanol de 50% (v/v) no SCL final (EŞ et al., 2019).

Diferentemente, o processo aqui estudado empregando força iônica utiliza dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica baseados em difusão molecular e emprega FRR de 10, equivalente a aproximadamente 9% (v/v) de etanol no SCL final. No presente cenário, o gradiente de concentração de etanol formado transversalmente às correntes de fluxo é a força motriz de transferência de massa e leva à auto-agregação lipídica em bicamadas de forma gradual e contínua. Os íons presentes nas correntes laterais de PBS reduzem a repulsão entre as cabeças polares positivamente carregadas dos fosfolípidos e favorecem as interações hidrofóbicas entre suas caudas apolares. De fato, quanto maior a força iônica do sistema, maior a blindagem das cargas superficiais dos SCL e, mais intensamente, se favorece a interação hidrofóbica das cadeias alquila dos lípidos e promove a formação de bicamadas justapostas. Provavelmente, altera-se, assim, a cinética de auto-agregação dos fosfolípidos, e, conseqüentemente, leva-se à síntese de lipossomas multilamelares.

Dessa forma, pode-se inferir que tanto a força iônica quanto o mecanismo de mistura desenvolvido no processo microfluídico, além do teor de etanol presente na mistura, provavelmente são fatores importantes que exercem influência sobre o processo de auto-agregação lipídica para formação de lipossomas em microcanais.

Por fim, com o intuito de confirmar a influência da força iônica na auto-agregação lipídica eliminando a influência do lípido DSPE-PEG, a estrutura e morfologia dos CL sintetizados em PBS (50 mM) também foram avaliadas (Figura 4.S2, material suplementar). As análises por SAXS e cryo-TEM desta amostra evidenciam que nestas condições há prevalência da produção de lipossomas multilamelares, da mesma forma que apresentado para SCL contendo 1% (molar) de DSPE-PEG, demonstrando os efeitos da força iônica na formação de lipossomas em dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica.

Assim, a partir da caracterização estrutural e morfológica dos CL e SCL, foram exibidas evidências da modificação do mecanismo de auto-agregação lipídica de acordo com o aumento da condição de força iônica combinado ao processo de

difusão em dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica. Estas observações nos levaram à concepção de novas perguntas referentes à investigação da influência destes fatores sobre a complexação com material genético e quanto à eficiência de entrega gênica destes lipoplexos.

4.3.2. Efeito da complexação com material genético

Lipoplexos foram formados com pDNA codificante para proteína verde fluorescente (GFP) em processo convencional (*bulk*). Foram estudados SCL contendo 1% (molar) de DSPE-PEG produzidos em microfluídica na presença de tampão, dialisados para remoção do tampão e posteriormente complexados com pDNA nas razões molares de carga (R_{\pm}) de 1.5, 3, 5 e 10. A Figura 4.6 apresenta as características físico-químicas de lipoplexos formados empregando SCL preparados em PBS 50 mM, obtidas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

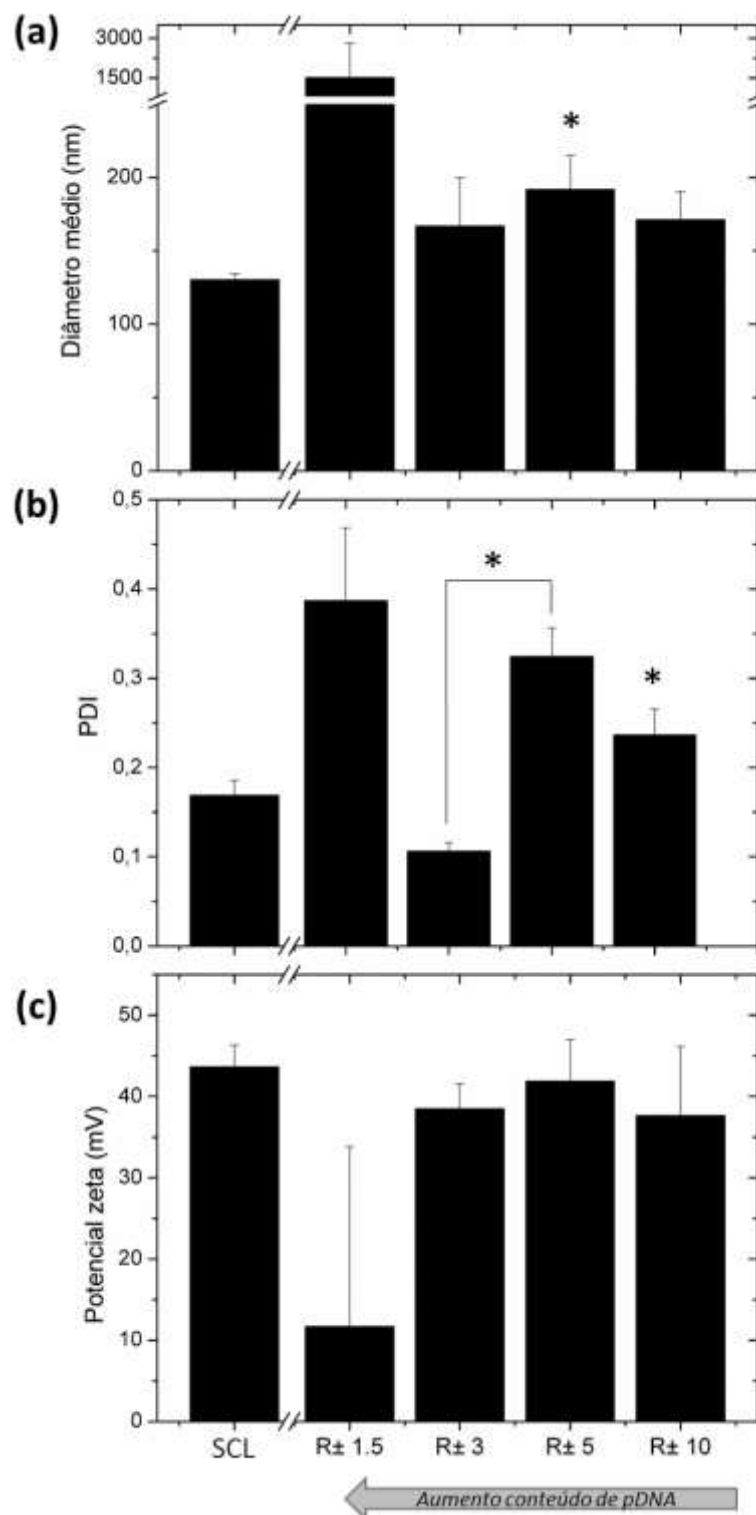


Figura 4.6. Características físico-químicas de lipoplexos nas razões molares de carga (R_{\pm}) entre 1,5 e 10, formados com lipossomas catiônicos *stealth* (SCL – 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em PBS 50 mM. (a) Diâmetro hidrodinâmico médio ponderado por intensidade de partículas, (b) Índice de polidispersidade (PDI) e (c) Potencial zeta. As barras de erro correspondem ao desvio padrão de triplicatas independentes. (*) Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) para lipoplexos quando comparados com os SCL (não complexados) ou entre pares.

Observa-se que o lipoplexo formado na razão de R_{\pm} de 1,5, cujo conteúdo de material genético é mais elevado, apresenta maior diâmetro (Figura 4.6a) e índice de polidispersidade (Figura 4.6b), evidenciando que em condições próximas à região de isoneutralidade de cargas, a formação de lipoplexos de forma reprodutível é comprometida. Para maiores valores de R_{\pm} , os lipoplexos formados apresentaram diâmetros médios entre 150 e 200 nm e potencial zeta positivos (Figura 4.6c) entre +37 mV e +42 mV, não apresentando diferenças estatísticas entre si.

É importante ressaltar que a condição de R_{\pm} de 3 mostrou-se a mais interessante, ao resultar em lipoplexos com o menor PDI de 0.13, em processos reprodutíveis, e estatisticamente diferente quando comparados com a condição de R_{\pm} de 5. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos reportados na literatura para a formação de lipoplexos empregando CL (BALBINO et al., 2012). Ademais, a técnica de DLS também proporcionou a avaliação da distribuição de tamanhos para estes lipoplexos (R_{\pm} de 3), antes do pós-processamento com concentrador a vácuo, evidenciando a formação de partículas de forma monomodal tanto quando analisadas por intensidade (Figura 4.7a) como por número de partículas (Figura 4.7b).

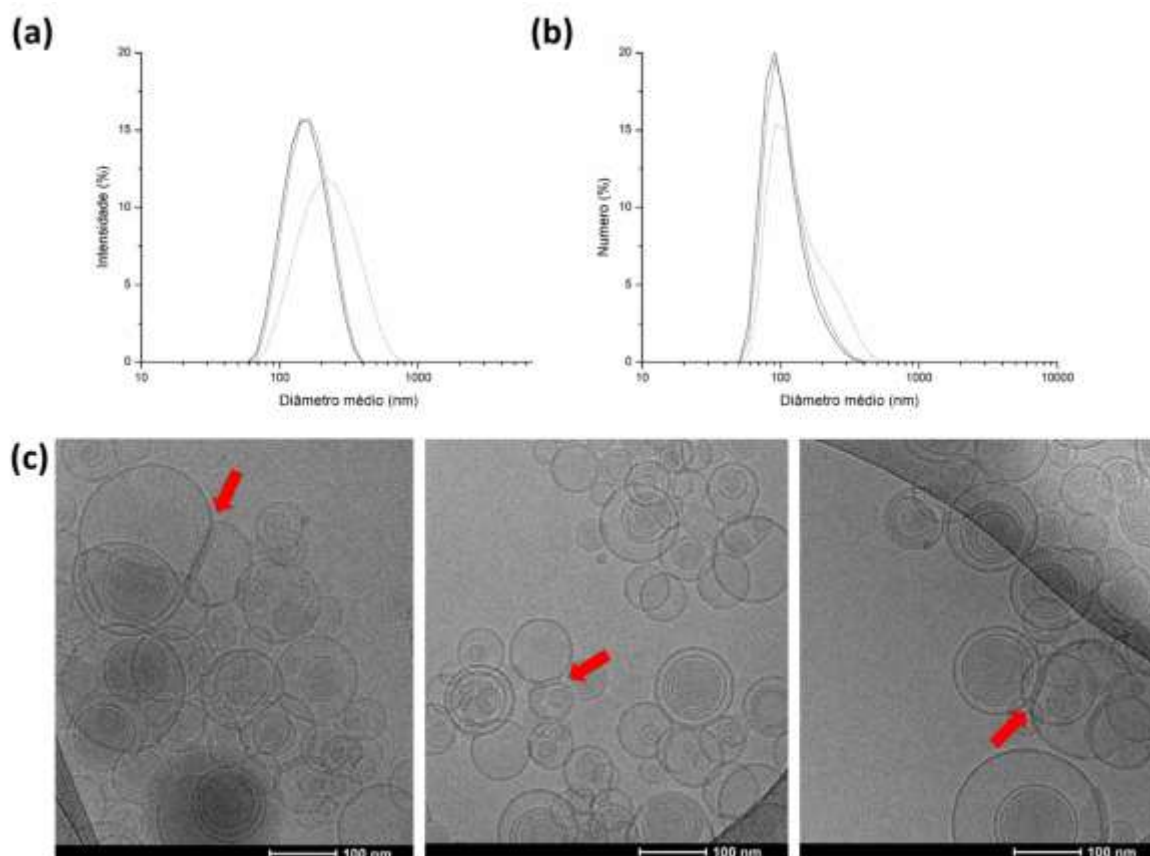


Figura 4.7. Caracterização de lipoplexos (LPX) formados por SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em PBS 50 mM em R_{\pm} de 3. (a) Distribuição de tamanhos ponderada por intensidade e (b) número de partículas, antes do processo de concentração a vácuo. As linhas correspondem a triplicatas independentes (c) Imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM). As setas vermelhas evidenciam a presença do pDNA entre as bicamadas lipídicas. As barras de escala indicam 100 nm. Após complexação, os LPX foram submetidos à concentração a vácuo para análise por cryo-TEM.

A técnica de cryo-TEM foi utilizada, em seguida, para a caracterização morfológica dos lipoplexos de R_{\pm} de 3 (Figura 4.7c). Apesar da presença de lipoplexos de tamanhos variados, o objetivo principal dessa análise foi verificar se a presença do lipídeo PEGuilado teria influência sobre a morfologia final do complexo com o material genético, tendo em vista sua elevada massa molar e sua disposição na superfície do SCL. Pode-se observar a presença de lipoplexos multilamelares e a formação de bicamadas duplas devido à presença do pDNA (Figura 4.7c, setas vermelhas), o que também foi confirmado pela análise de SAXS (Figura 4.S3, material suplementar). Assim como reportado previamente na literatura (BALBINO et al., 2012; KANG; KIM; LEAL, 2016), o DNA se inseriu no lipoplexo entre bicamadas consecutivas levando à fusão de duas bicamadas lipídicas justapostas (Figura 4.7c, setas vermelhas).

Em seguida, a eficiência de incorporação de pDNA na estrutura dos lipoplexos foi avaliada através de ensaio de eletroforese em gel de agarose (Figura 4.8). Nesta análise, investigou-se lipoplexos preparados na condição de R_{\pm} de 3 com SCL (1% (molar) de DSPE-PEG), que foram sintetizados em PBS 10 e 50 mM. Todas as amostras de SCL foram dialisadas previamente à formação dos lipoplexos por método convencional (*bulk*). Como modelo, adotou-se lipoplexo formado com CL, o qual foi sintetizado em microfluídica com correntes laterais aquosas (BALBINO et al., 2013).

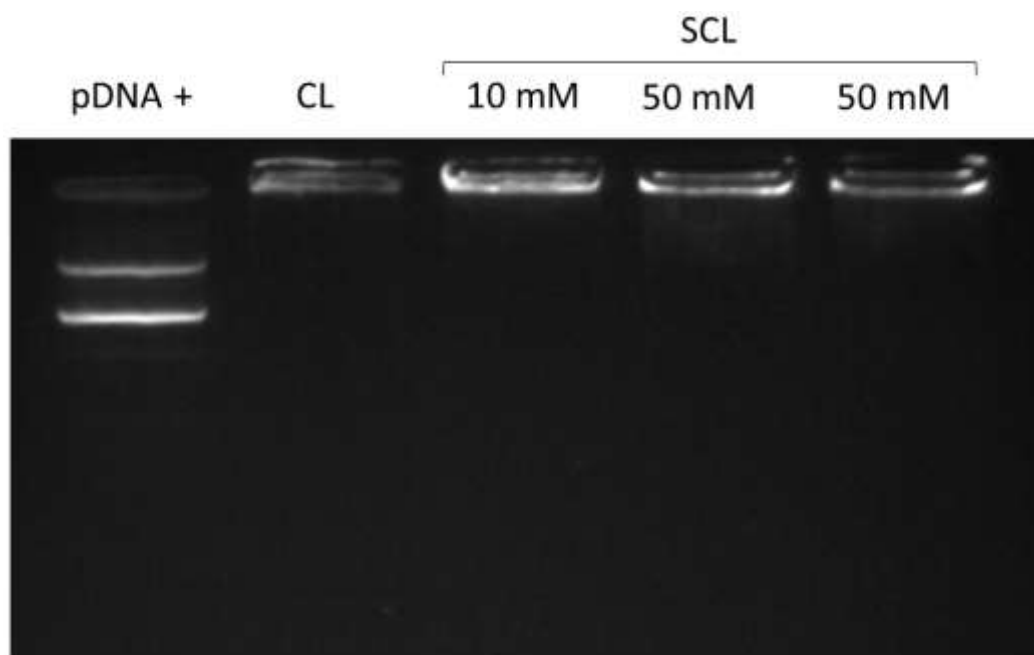


Figura 4.8. Eletroforese em gel de agarose para avaliação da incorporação de pDNA em lipossomas catiônicos (CL) e lipossomas catiônicos *stealth* (SCL – 1% de DSPE-PEG), ambos preparados em microfluídica. Os CL foram sintetizados com correntes laterais de água, enquanto os SCL em PBS 10 e 50 mM. Controle positivo (pDNA +) composto por DNA livre, seguido por lipoplexos preparados em bulk na razão molar de cargas (R_{\pm}) de 3.

As bandas (Figura 4.8) foram quantificadas através do software ImageJ®, demonstrando que para todas as condições ocorreu uma elevada eficiência de incorporação de DNA (>92%). Mais especificamente, a condição de SCL (10 mM) $R_{\pm}3$ apresentou eficiência de incorporação de pDNA de 96,8%, enquanto as amostras de SCL (50 mM) $R_{\pm}3$ exibiram $92,4 \pm 4,5\%$ de eficiência de incorporação de pDNA.

A partir dos resultados apresentados até aqui, evidencia-se que os SCL preparados em microfluídica possuem elevado potencial para aplicações como nanocarreadores de material genético em estudos de liberação gênica (*gene*

delivery). Dessa forma, em seguida, foram realizados ensaios de transfecção celular *in vitro*.

4.3.3. Efeitos na transfecção celular

A transfecção celular dos lipoplexos foi realizada em células de câncer de próstata (PC3) e células normais do epitélio da próstata (PNT2), como comparação. Utilizamos como modelo lipoplexos formados por CL (BALBINO et al., 2013) complexados com pDNA em R_{\pm} de 3. Comparativamente, avaliou-se a transfecção de lipoplexos compostos por SCL (1% (molar) de DSPE-PEG) sintetizados em sistemas microfluídicos em PBS 10 mM e 50 mM. Todas as amostras de SCL foram dialisadas previamente à formação dos lipoplexos por método convencional (*bulk*) e complexadas com pDNA em R_{\pm} de 3.

As células foram tratadas com os lipoplexos durante o tempo de 4h e observadas após 24 h de incubação, utilizando-se microscópio invertido de fluorescência. A Figura 4.9 exhibe as células PC3 transfectadas com pDNA codificante para proteína verde fluorescente (GFP). A partir da fluorescência da proteína GFP, verifica-se que todas as formulações de lipoplexos, empregando CL (Figura 4.9a) ou SCL produzidos em PBS 10 mM (Figura 4.9b) e 50 mM (Figura 4.9c), demonstraram eficiência de transfecção celular.

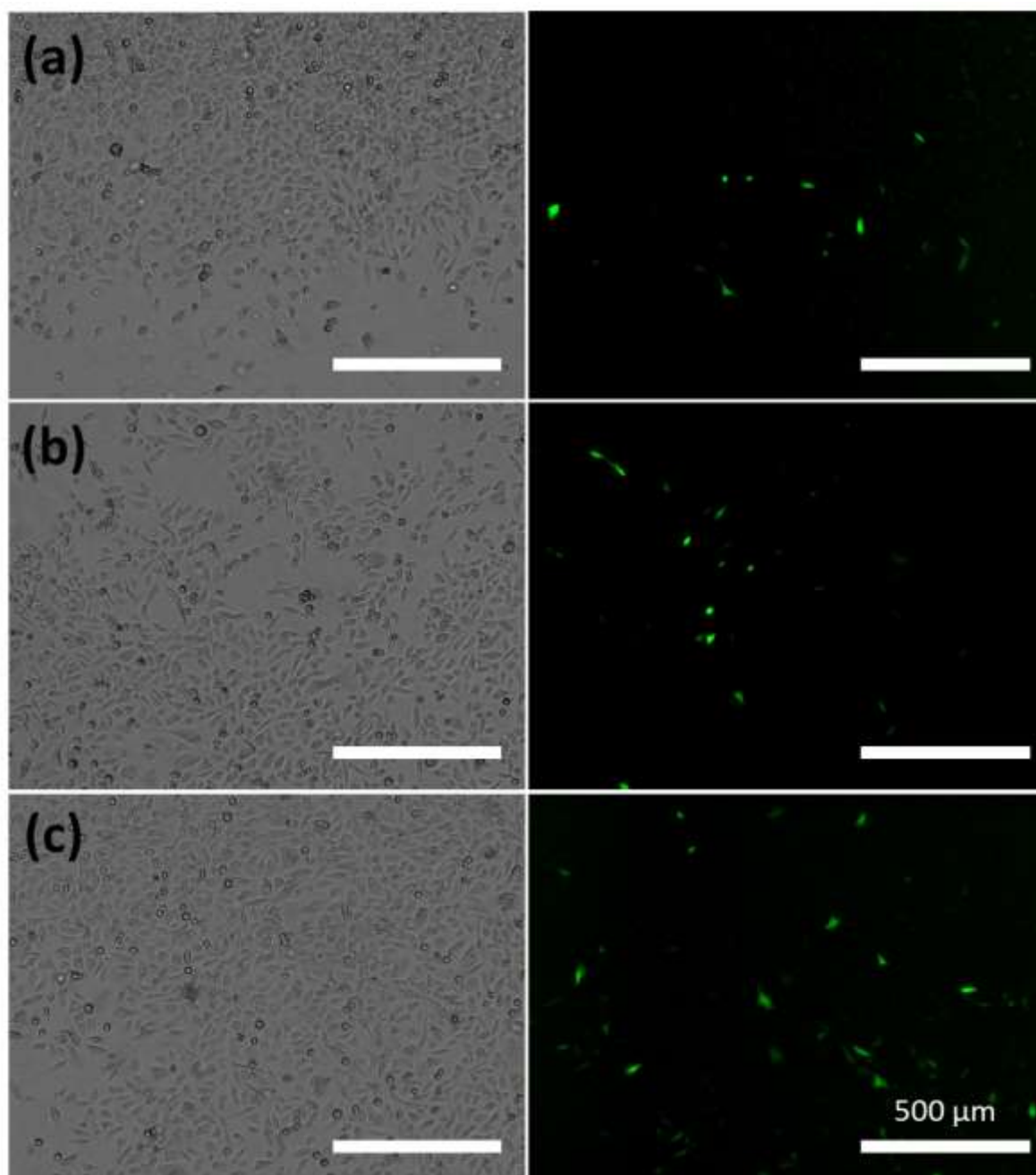


Figura 4.9. Imagens de microscopia de fluorescência de células PC3 transfectadas com pDNA codificante para GFP (filtro para FITC), utilizando os nanocarreadores: (a) CL sintetizados em água, (b) SCL sintetizados em PBS 10 mM e (c) SCL sintetizados em PBS 50 mM. Todos os lipoplexos foram formados em bulk em R_{\pm} de 3. Imagens em campo claro (à esquerda) e de fluorescência com filtro para FITC (à direita). As barras de escala indicam 500 μm .

A transfecção celular foi determinada por citometria de fluxo e a porcentagem de transfecção foi analisada utilizando-se o programa FlowJo. A eficiência de transfecção (%) se refere ao número de células que expressaram GFP (células transfectadas), enquanto a intensidade de fluorescência reflete o efeito do aumento da fluorescência da proteína expressa pelas células. Como controle negativo (CTRL) a cultura de células não recebeu nenhum tratamento, e como controle positivo

empregou-se o reagente de transfecção comercial Lipofectamina® 2000. A Figura 4.10 apresenta os resultados de eficiência de transfecção e intensidade de transfecção para os lipoplexos formados com CL sintetizados em água e SCL sintetizados em PBS 10 mM e 50 mM, para células PC3 e PNT2.

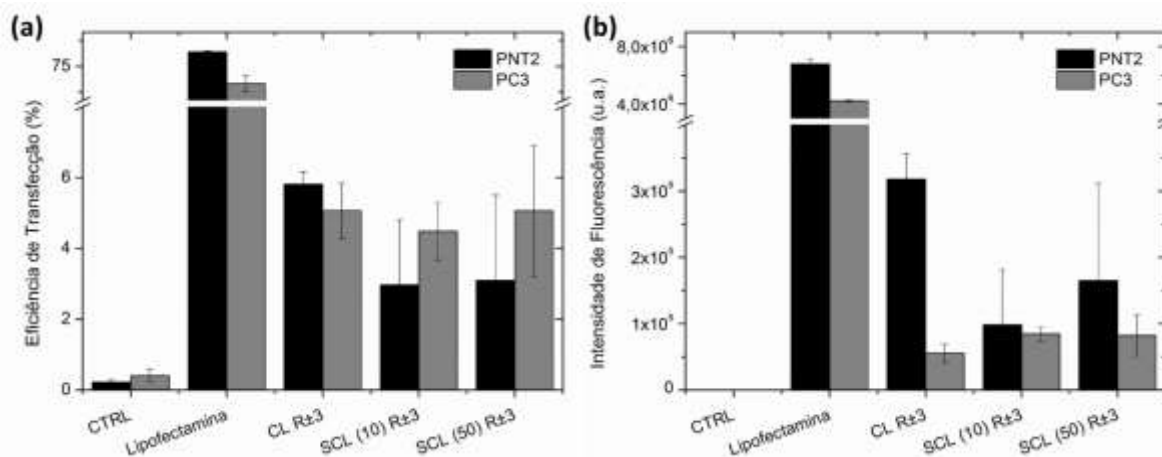


Figura 4.10. Ensaio de transfecção em células PNT2 e PC3 de lipoplexos com R± de 3, avaliando-se CL, e SCL sintetizados em PBS 10 mM e 50 mM. (a) Eficiência de transfecção e (b) Intensidade de fluorescência. Controle negativo (CTRL) e positivo (Lipofectamina® 2000). As barras de erro correspondem ao desvio padrão de duplicatas independentes.

Pode-se observar que não houve diferença estatística entre as taxas de transfecção celular para cada lipoplexo estudado, entre as duas linhagens celulares (Figura 4.10a-b). Esperava-se que o lipoplexo adotado como modelo, formado por CL, apresentasse eficiências de transfecção acima de 20% para células PC3, conforme reportado na literatura (BALBINO et al., 2016; EŞ et al., 2019), porém, neste estudo resultou-se em $5,1 \pm 0,8$ % de transfecção celular. Vale ressaltar que as características físico-químicas (DLS) dos CL sintetizados em água (Capítulo 3, Table 1) corroboram os estudos anteriores (BALBINO et al., 2016; EŞ et al., 2019) e, provavelmente não corresponde ao motivo da discrepância dos resultados de transfecção celular com os trabalhos reportados na literatura.

Por outro lado, os índices médios de transfecção para os lipoplexos formados com SCL em PBS 10 mM e 50 mM de $5,0 \pm 0,6$ % e $5,8 \pm 1,4$ %, respectivamente, corroboraram os resultados reportados por EŞ et al. (2019), empregando SCL unilamelares. Em vista disso, mostra-se que a característica de multilamelaridade dos SCL sintetizados em condições de elevada força iônica possivelmente não interfira na eficiência de transfecção destes nanocarreadores, quando comparados com os SCL unilamelares.

Visando otimizar o protocolo de transfecção celular e superar as limitações observadas para os ensaios biológicos, foi realizado um estudo exploratório verificando o tempo de transfecção celular, o qual se refere ao tempo de contato entre os lipoplexos e as células. Para isso, utilizamos como modelo lipoplexos formados por CL (sem PEG) e DNA em R_{\pm} de 3 e avaliaram-se tempos de transfecção de 4h, 6h e 8h em células tumorais PC3 (Figura 4.S4). Diferentemente das condições de 4h e 6h (Figura 4.S4a-b), o ensaio empregando tempo de transfecção de 8h se mostrou relativamente tóxico e resultou em morte celular (Figura 4.S4c). A intensidade de fluorescência da expressão de GFP foi quantificada e normalizada para o número de células PC3, utilizando o software ImageJ® (Figura 4.S4d). Foi possível observar que não houve diferença entre as intensidades de fluorescência provenientes da expressão de GFP para as duas amostras, evidenciando que ambas possibilitaram a transfecção celular dos lipoplexos SCL/pDNA. Porém, vale ressaltar que estes resultados são inconclusivos para eficiência de transfecção celular, a qual se refere ao número de células transfectadas que expressam a GFP. Ensaios de citometria de fluxo são necessários para confirmar quantitativamente estas observações.

Além disso, otimizações do protocolo de transfecção celular ainda estão sendo avaliadas. Primeiramente, pode-se avaliar maiores tempos de expressão, como 48h e 72h, para encontrar o pico de expressão gênica do gene repórter para a GFP. Ainda, pode-se explorar a variação da carga mássica de DNA plasmidial, a qual neste estudo foi padronizada em 1 μ g por poço. Dessa forma, será possível ampliar e aprimorar a avaliação biológica destes carreadores para futuras aplicações em liberação gênica.

Buscando compreender melhor as limitações observadas com os ensaios biológicos, verificou-se a integridade das linhagens celulares utilizadas neste estudo através do ensaio de coloração por Hoechst para controle de contaminação por micoplasma (Figura 4.11).

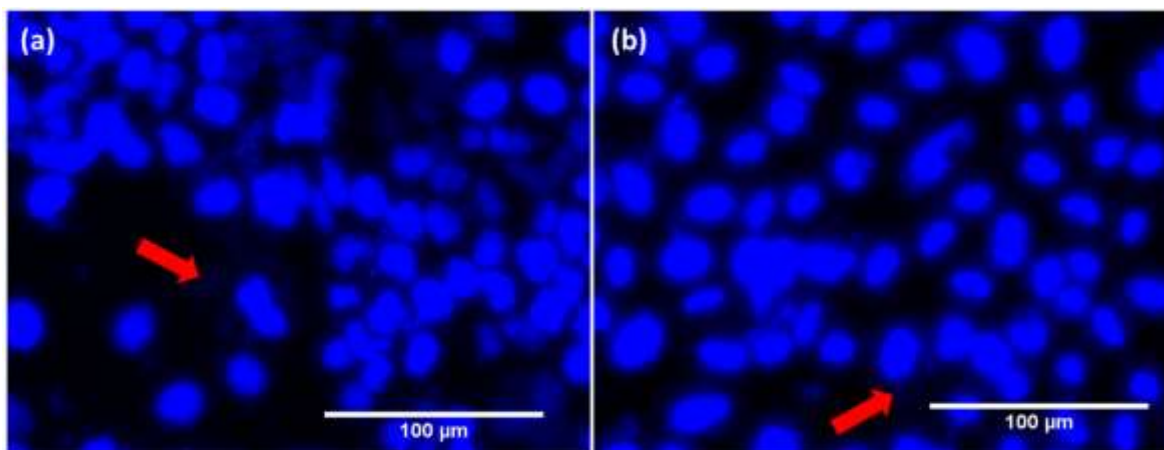


Figura 4.11. Imagens de microscopia de fluorescência para células (a) PNT2 e (b) PC3 marcados com corante Hoechst (filtro para DAPI), marcador de DNA. Setas vermelhas indicam presença de DNA além dos núcleos celulares.

Conforme apresentado na Figura 4.11, pode-se observar marcações fluorescentes indicando a presença de DNA além dos núcleos celulares (setas vermelhas) tanto para células PNT2 (Figura 4.11a) quanto PC3 (Figura 4.11b), sugerindo contaminação por micoplasma. Devido a este resultado positivo, as células foram descartadas e, infelizmente, não houve tempo hábil para repetir e finalizar os ensaios de transfecção dos lipoplexos em células PNT2 e PC3. Esta evidência pode ainda justificar as baixas eficiências de transfecção celular apresentadas anteriormente (Figura 4.10), tendo em vista que as linhagens celulares não estavam íntegras no momento dos ensaios de transfecção.

Por fim, a partir dos conhecimentos adquiridos para a síntese de SCL em processos microfluídicos com aumento da força iônica, visou-se explorar a produção de lipossomas para entrega gênica direcionada (*targeted delivery*) para células tumorais metastáticas considerando a funcionalização do SCL com peptídeos cRGDfK (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys), os quais são ativam receptores de superfície celular de integrinas expressos em células tumorais (HUANG et al., 2015). Os resultados preliminares deste estudo exploratório para síntese de lipossomas de terceira geração, estão descritos no Apêndice I.

4.4. Conclusões

A partir dos resultados apresentados neste capítulo, foi possível concluir:

- O pós-processamento de diálise e concentração para preparo das amostras lipossomais para ensaios de caracterização se mostrou promissor na preservação da estrutura final dos SCL formados em microfluídica;
- A análise preliminar dos resultados de SAXS para SCL sugeriu o aumento da fração de SCL multilamelares concomitante ao aumento da força iônica do sistema. De fato, imagens obtidas por cryo-TEM demonstraram uma maior proporção de SCL multilamelares para a condição de PBS 50 mM. Assim, a partir da caracterização estrutural e morfológica, foram exibidas evidências da modificação do mecanismo de auto-agregação lipídica de acordo com o aumento da força iônica, combinado ao processo de difusão em dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica.
- Análises de cryo-TEM e SAXS sugerem que lipoplexos de SCL e pDNA se organizam estruturalmente inserindo o material genético entre bicamadas consecutivas. Para razões molares de carga (R_{\pm}) acima de 3, foi possível preparar lipoplexos com SCL (50 mM) e pDNA na faixa de 150-200 nm, PDI entre 0,13 e 0,28 e potencial zeta em torno de +40 mV. Avaliação de eletroforese em gel de agarose mostrou que lipoplexos exibem elevada eficiência de incorporação de pDNA em sua estrutura final.
- Avaliação biológica demonstrou que não houve diferenças significativas entre as transfecções em células PC3 e PNT2 utilizando lipoplexos de SCL sintetizados em PBS 10 e 50 mM. Porém, como as células apresentaram contaminação por micoplasma, os ensaios biológicos devem ser repetidos para confirmar os resultados exploratórios observados.

Material suplementar

4. Caracterização Estrutural e Morfológica de Lipossomas Catiônicos *Stealth* Produzidos em condições de Elevada Força Iônica

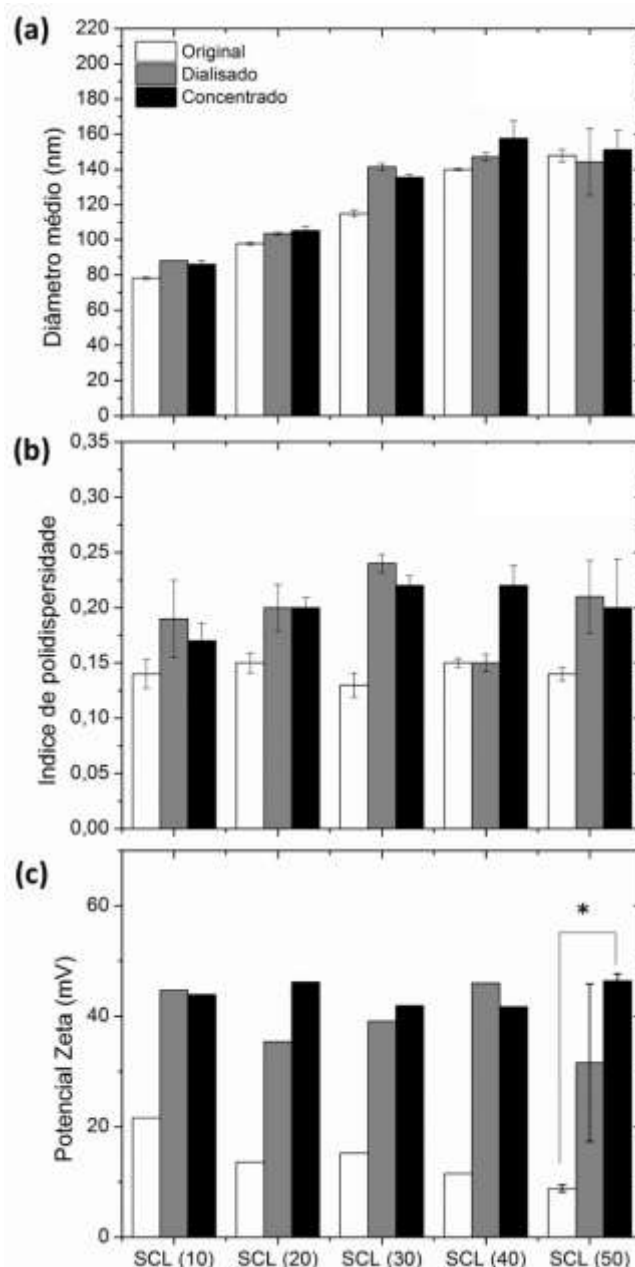


Figura 4.S1. Características físico-químicas de SCL (contendo 1% (molar) de DSPE-PEG) preparados em diferentes concentrações de PBS entre 10 e 50 mM e submetidos ao pós tratamento de diálise e concentração. (a) Diâmetro hidrodinâmico médio ponderado por intensidade de partículas, (b) Índice de polidispersidade (PDI) e (c) Potencial zeta. As barras de erro representam o desvio padrão entre três medidas para uma mesma amostra; exceto para SCL (50), para a qual representam triplicatas independentes. (*) Representa valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre pares.

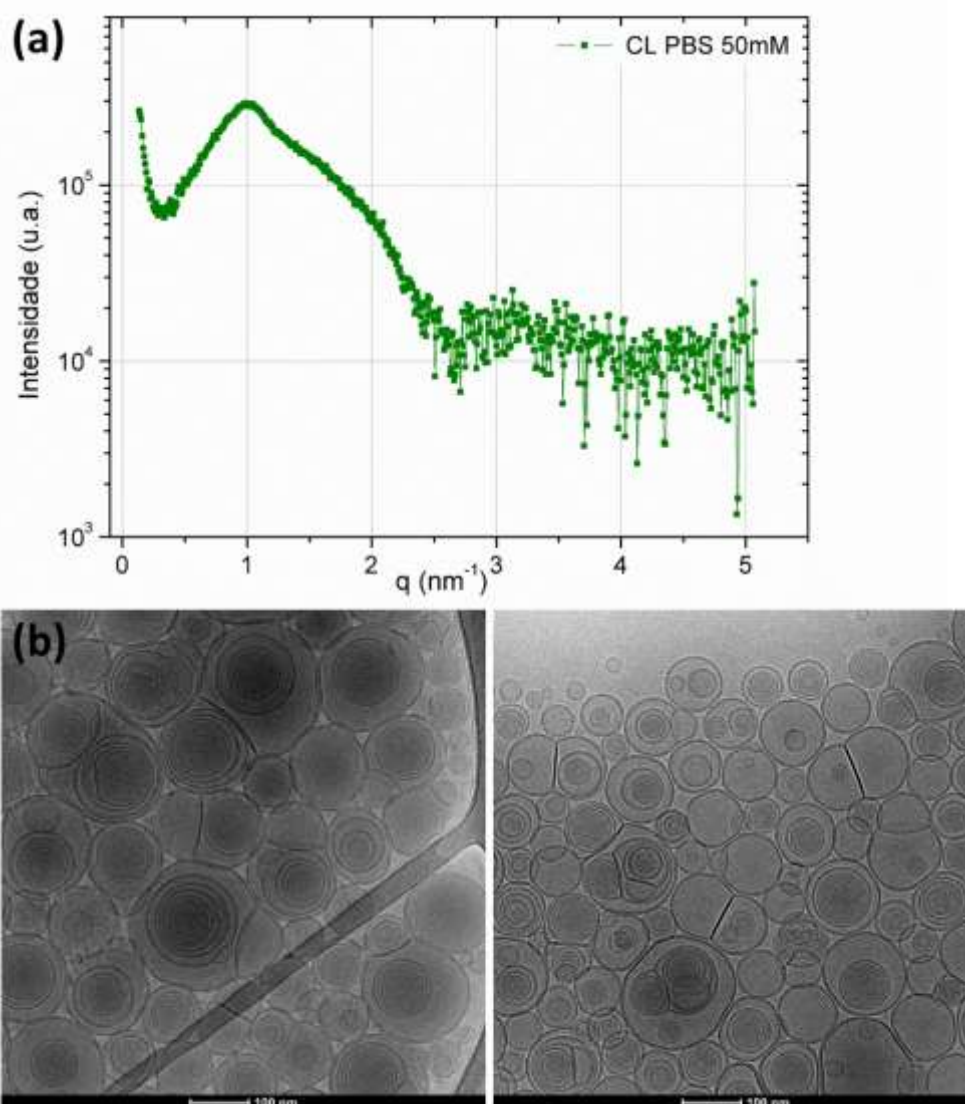


Figura 4.S2. (a) Intensidade de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) de lipossomas catiônicos (CL) preparados em PBS 50 mM. (b) Imagens obtidas por criomicroscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM), evidenciando a presença de CL multilamelares. As barras de escala indicam 100 nm. Os CL preparados em PBS 50 mM foram dialisados e submetidos à concentração a vácuo para análise por SAXS e cryo-TEM.

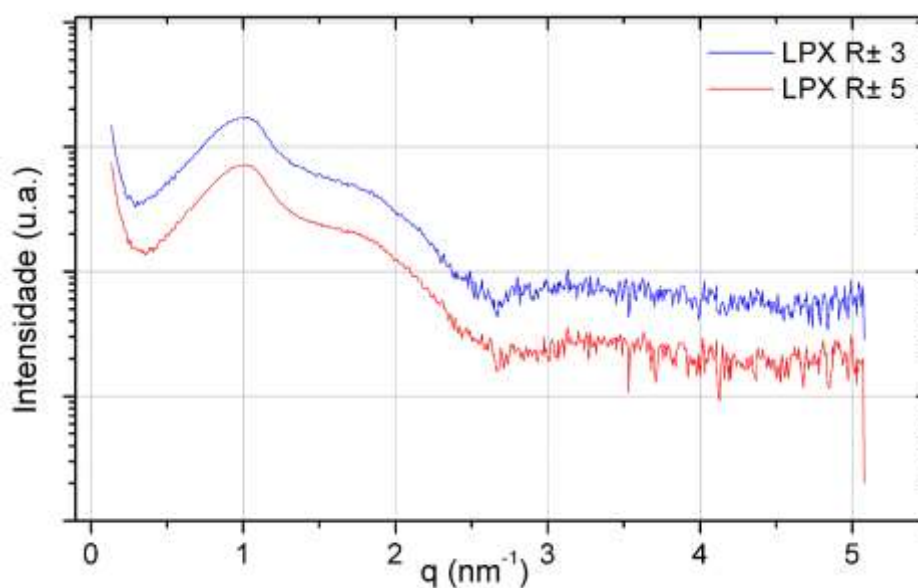


Figura 4.S3. Intensidade de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) de lipoplexos (LPX) formados por SCL (contendo 1% de DSPE-PEG) preparados em PBS 50 mM em R \pm de 3 e 5.

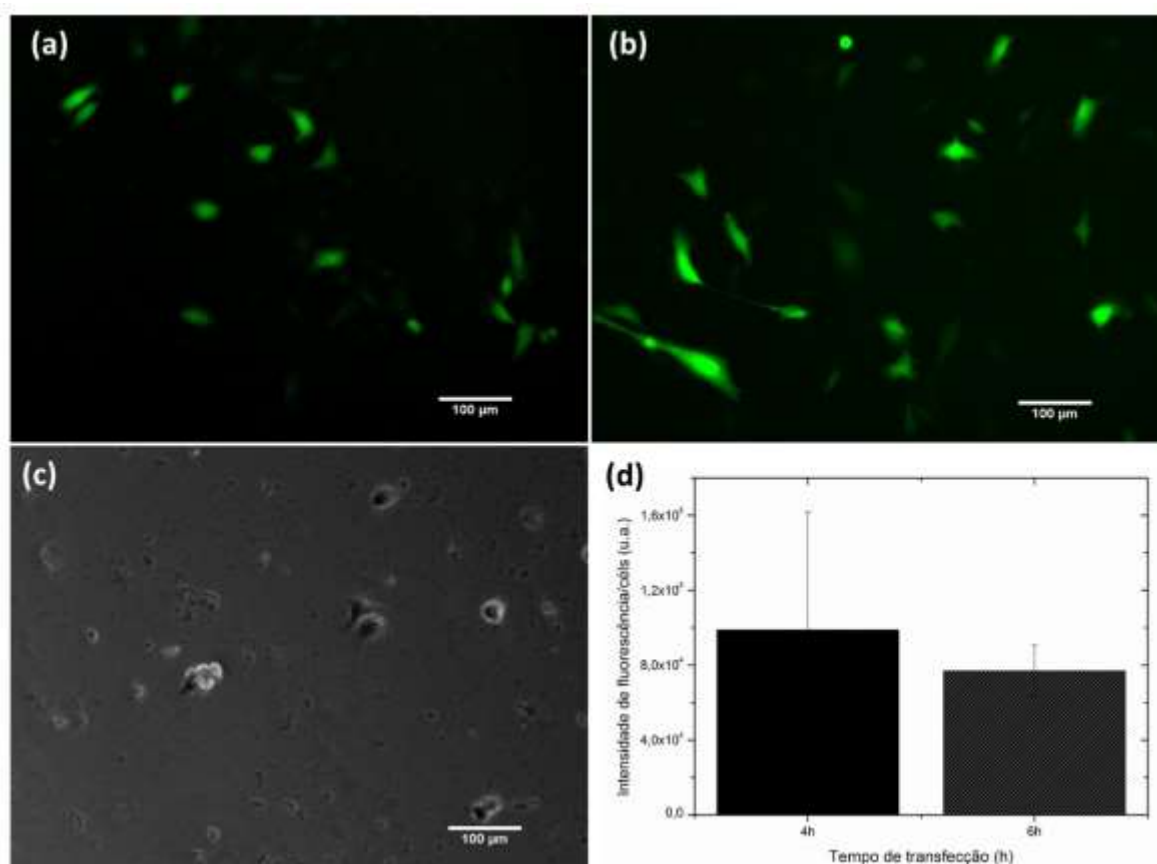


Figura 4.S4. Imagens de microscopia de fluorescência de células PC3 transfectadas com pDNA codificante para GFP (filtro para FITC), em diferentes tempos de transfecção: (a) 4h, (b) 6h e (c) 8h, em campo claro. Lipoplexos foram formados utilizando CL preparados em água complexados com DNA em R \pm de 3. As barras de escala indicam 100 μ m. (d) Gráfico de intensidade de fluorescência normalizado pelo número de células PC3, para os tempos de transfecção de 4h e 6h.

5. Lipid-Coated Microbubbles Produced via Microfluidics aiming at Ultrasonic Imaging and Gene Delivery Applications

Amanda C. S. N. Pessoa¹, Ugur Soysal², Lucimara G. de la Torre¹, Patrick Tabeling².

¹ School of Chemical Engineering, University of Campinas, UNICAMP, Brazil.

² Laboratoire de Microfluidique, MEMS et Nanostructures, ESPCI Paris, France.

Abstract

Microbubbles are highly compressible systems that oscillate when driven by an ultrasonic pulse, and this acoustic property makes them useful as ultrasound contrast agents for diagnostics imaging. The use of thin lipid shells to stabilize the microbubbles gas-liquid interface make these applications possible. In this way, microbubbles offer different possibilities of tailoring their surface by using targeting ligands for specific tissue attachment and enhanced therapeutic delivery. In this context, microfluidic devices provide further opportunity for tuning the interfacial coverage of individual bubbles, also enabling the synthesis of microbubbles with controlled properties. The main goal of this work is to evaluate microfluidics as a technological platform for synthesis of monodisperse lipid-coated microbubbles. We investigate different microfluidic geometries, such as step-emulsification and hydrodynamic focusing, and process parameters for the synthesis of microbubbles. Hydrodynamic focusing devices coupled with the adjustment of the ionic strength of the system, as a simple alternative for replacing commonly used viscosity enhancers, enabled the synthesis of monodisperse microbubbles. Finally, we envisioned to obtain a simple and reproducible process aiming at industrial applications for production of monodisperse microbubbles to be applied in several medical applications.

5.1. Introduction

Microbubbles oscillate when driven by an ultrasonic pulse, emitting ultrasound echo signals that increase the image contrast, which can improve the visual distinction between blood and the surrounding tissues (GNYAWALI et al., 2017). This acoustic property makes them useful as ultrasound contrast agents for diagnostics imaging, specially to enhance the reflectivity of perfused tissues, i.e. in myocardial perfusion (TIAN et al., 2020).

Alternatively, microbubbles can be disrupted by applying a focused ultrasound beam, also providing the possibility of local release of drugs or genes. The microbubbles destruction during ultrasonic excitation leads to an increase in cell membrane permeability, enabling the use of microbubbles as therapeutic agents for drug and gene delivery applications (TIAN et al., 2020). Additionally, DNA released from microbubbles has been shown to remain intact and stable after destruction by ultrasound (UNGER et al., 2001).

Nevertheless, room air-filled microbubbles usually disappear in a few seconds after intravenous administration. Therefore, strategies to stabilize the gas-liquid interface with a thin shell, simultaneously to the use of low diffusivity gases like perfluorocarbons (PFC) or sulfur hexafluorides (SF₆), can increase the microbubbles circulation time (FRINKING et al., 2020). It is important to highlight that it has been demonstrated the microbubbles' low short-time toxicity for *in vitro* and *in vivo* studies (CHEN et al., 2013; FU et al., 2019), however, other safety concerns still need to be addressed regarding the systemic administration of microbubbles (DUAN et al., 2020).

A surfactant layer can increase the microbubble stability by reducing the surface tension, also leading to microbubbles with higher resistance against rupture in the ultrasound pressure field (CHU et al., 2019). Although being less stable than polymeric shells, lipids yield more echogenic microbubbles and they have the ability to spontaneously adsorb to the gas-liquid interface and self-assemble into a monolayer coating (HETTIARACHCHI et al., 2007).

However, a relevant limitation of using ultrasound contrast agents is that the bubbles resonance behavior under ultrasound frequencies is closely dependent on the bubbles size (DOLLET; MARMOTTANT; GARBIN, 2019). In this context, microfluidics emerges as an important tool for enabling the synthesis of microbubbles

with controlled properties, as size and polydispersity, in order to ensure a narrower range of resonance and a higher sensitivity for ultrasound imaging (CHU et al., 2019; LIN; CHEN; CHEN, 2016).

Thus, in this chapter, we studied different microfluidic approaches for the synthesis of monodisperse lipid-coated microbubbles. We assessed poly(dimethylsiloxane) (PDMS)/glass devices based on step-emulsification and hydrodynamic focusing designs, and we evaluated the influence of process parameters such as ionic strength, for the developing a simple and reproducible microfluidic platform for the synthesis of monodisperse microbubbles for medical applications, especially aiming towards ultrasonic imaging and gene delivery.

5.2. Material and Methods

5.2.1. Material

We used L- α -phosphatidylcholine hydrogenated soy, (hydrogenated soy PC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt) (DSPE-PEG₂₀₀₀) from Avanti Polar Lipids (USA). Glycerol, propylene glycol and 10-12-pentacosadiynoic acid (PCDA) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). Perfluorohexane (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to produce microbubbles with volatile C₆F₁₄ (g). We applied Sylgard 184 Silicon Elastomer Kit from Dow Corning (USA) for the microfluidic chips fabrication.

5.2.2. Methods

5.2.2.1. Design and fabrication of microfluidic chips

The polydimethylsiloxane (PDMS)/glass chips were fabricated by applying standard soft lithography techniques (DUFFY et al., 1998). The hydrodynamic focusing chips, of various designs were designed using CleWin software.

SU-8 photoresist was spin-coated onto a silicon wafer and UV-exposed using a photomask of the microfluidic design and a mask aligner MJB4 (SUSS Microtec, Germany). For designs with low resolution, we used standard plastic photomasks. On

the other hand, for high resolution geometries such as the ones containing geometric filters at the inlets or nozzles lower than $20\ \mu\text{m}$ wide, we printed and applied chrome photomasks to ensure the precision of the mold. We used Dektak Surface Profilometer (Veeco, USA) to measure the vertical profile of the produced devices. Next, the mold was replicated using PDMS (Sylgard 184 elastomer kit, Dow Corning, Germany), which was mixed in 1:10 cross-linker/polymer ratio, gently poured into the mold, and placed under vacuum. After degassing, the mold was cured inside an oven at $65\ ^\circ\text{C}$ for 4 h, cut into the desired shape, and punched to make inlet and outlet holes. Oxygen plasma treatment was used to irreversibly bond the PDMS layer with a microscope glass slide.

The step-emulsification chips were fabricated with a double layer technique. The molding silicon wafer was prepared with SU-8 photoresist by a two-step UV-exposure procedure to obtain channels with a rectangular cross-section with heights of $1\ \mu\text{m}$ (Figure 5.1a, blue) and $20\ \mu\text{m}$ (Figure 5.1a, grey). Briefly, the SU-8 photoresist was spin-coated onto a silicon wafer and UV-exposed using a mask containing $5\text{-}\mu\text{m}$ -wide microchannel arrays (Figure 5.1a, blue, and Figure 5.1b). This process was repeated under careful alignment of the second mask (Figure 5.1a, gray). The mold was replicated using PDMS (Sylgard 184 elastomer kit, Dow Corning, Germany), which was mixed in 1:10 cross-linker/polymer ratio, gently poured into the mold, and placed under vacuum. After degassing, the mold was cured inside an oven at $65\ ^\circ\text{C}$ for 4 h, cut into the desired shape, and punched to make inlet and outlet holes. Oxygen plasma treatment was used to irreversibly bond the PDMS layer with a microscope glass slide.

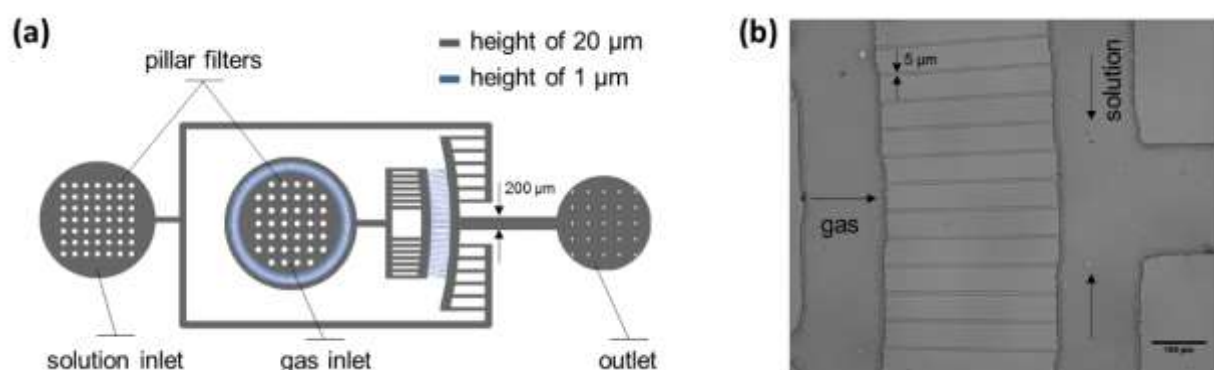


Figure 5.1. (a) Schematic drawing of the microfluidic step-emulsification geometry used to produce microbubbles. The chip has channels with heights of $1\ \mu\text{m}$ (blue) and $20\ \mu\text{m}$ (grey). (b) Optical Image of the microchannel array at the end of the microfluidic chip, containing $5\ \mu\text{m}$ wide channels for bubble production (scale bar: $100\ \mu\text{m}$). Adapted from (GORMLEY et al., 2019).

5.2.2.2. Production of lipid-coated microbubbles

The lipid-coated microbubbles production was achieved in two phases:

(1st) optimization of production of polymerized shell microbubbles, developed in collaboration with Boston University (USA);

(2nd) evaluation of microfluidic process parameters synthesis of monodisperse microbubbles for industrial purposes.

Polymerized shell microbubble production

The microbubbles were composed by L- α -phosphatidylcholine hydrogenated soy, (hydrogenated soy PC), 1,2-distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (m-PEG2000-DSPE) and 10-12-pentacosadiynoic acid (PCDA), an UV cross-linkable fatty acid to enhance bubble stability. We prepared phospholipid solutions with total lipid concentration of 0.5% (w/w). First, the lipids were dissolved in chloroform, mixed and dried overnight under vacuum. The lipid film was stored in -20°C freezer and rehydrated prior to use using a tip sonicator (Soniprep 150 plus, MSE, UK), at 23 kHz frequency, power output of 100W with 10% amplitude for 10 min. The lipids were dissolved in an aqueous solution composed of 10:10:80% (v/v) of glycerol: propylene glycol; and deionized water, respectively.

We used a Microfluidic Flow Controller Systems (MFCS-100, Fluigent, France) to adjust the pressure of the air inlet. The liquid inlet was controlled by an infusion syringe pump (neMESYS Low Pressure Module 290N, cetoni GmbH, Germany). We used an inverted optical microscope (Axio Observer Z1, Zeiss, Germany) for real-time monitoring of the microbubble microfluidic synthesis. The microbubble solution was collected and polymerized with a UV-Crosslinker (Labomoderne, France) at 254 nm and 5000 x 100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, in order to form polymerized shell microbubbles (PSM). Regarding the microfluidic chips, we started to investigate step-emulsification (Figure 5.1) devices, and later we optimized the production conditions by using microchips based on hydrodynamic focusing.

Evaluation of process parameters for production of monodisperse microbubbles

For this step, we used the phospholipids DSPC and DSPE-PEG₂₀₀₀ at a molar ratio of 9:1, respectively, with a total lipid concentration of 0.5% (w/w). The lipid film was rehydrated in an aqueous solution containing sucrose (10% m/v) in deionized water. We investigated two aqueous solutions for lipid dispersion: 10% (w/v) sucrose solution in deionized water and phosphate-buffered saline (PBS) at 10 mM concentration with 10% (w/v) sucrose. Also, we assessed the microbubbles synthesis with two different entrapped gases: air or perfluorohexane (air containing around 50% saturation of C₆F₁₄), purchased from Thermo Fisher Scientific (USA).

To ensure hydrophilic conditions, the chips were sealed with O₂ plasma surface treatment (CUTE, Femtoscience, Korea) and were used within 10 minutes after bonding. The plasma treatment modifies the PDMS surface with silanol groups (SiOH), which render the PDMS temporarily hydrophilic. We investigated microfluidic chips based on hydrodynamic focusing with nozzle widths of 5, 10 and 20 μm (Figure 5.2a) and, finally, we developed co-flow channels of 20 μm to stabilize the production (Figure 5.2b). We used a Microfluidic Flow Controller Systems (MFCS-100, Fluigent, France) to adjust the pressure of the gas inlet between 200-250 mbar. The liquid inlet was maintained between 25 and 30 uL/min. The hydrodynamic focusing devices were produced with 20 μm of height and they were designed with an expanding region of around 300 μm, as shown in Figure 5.2.

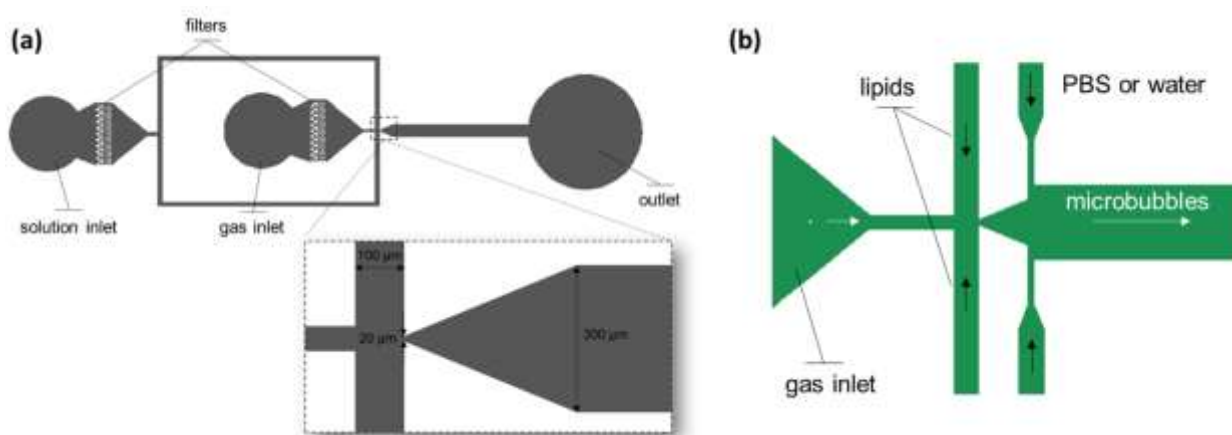


Figure 5.2. Microfluidic chip based on hydrodynamic focusing developed for microbubble synthesis. (a) The nozzle width varied between 5, 10 and 20 μm, and the outlet channel had an expansion chamber of 300 μm of width. (b) Zoom at the co-flow geometry developed to increase the stability of the production. In both conditions, lipids are dispersed in the continuous aqueous phase.

5.2.2.3. Characterization

Image data analysis

The lipid-shelled microbubbles were characterized using an inverted optical microscope (Axio Observer Z1, Zeiss, Germany). Briefly, around 20 μL of sample was deposited on top of a glass slide and covered with a thin glass cover slip for immobilization. The size and polydispersity of the samples were determined by ImageJ or MATLAB softwares. Coefficient of variation (CV) is defined as the ratio between the standard deviation and the mean diameter of a population of microbubbles. Standard image treatment techniques such as background subtraction and image binarization by thresholding were used to enhance the contrast before performing various data analyses.

Morphology and Fluorescence assays

We used Scanning Electron Microscopy (SEM) to analyze the morphology of the powdered microbubbles, using a FEI Magellan 400 XHR SEM (FEI Company, USA) without exposure to air using a vacuum chamber. The samples were prepared as follows: a squared silicon support was covered with a drop (~ 5 μL) of sample and it was left overnight to dry at room temperature. Prior to the analysis, the excess liquid was removed using blotting paper.

We also applied confocal microscopy (LEICA DMi 8) equipped with a 40X optical lens to evaluate the morphology of microbubbles. We used a lipid conjugated with a fluorophore (DSPE-PEG-FITC, PEG MW 2000, Interchim, France) to evaluate the coating of microbubbles by the lipids.

Surface tension measurements

The surface tension was measured using a Drop Shape Analyzer DSA30 (KRUSS GmbH, Germany). Briefly, we filled a 1 mL plastic syringe coupled with a needle adaptor of 0.91 mm of outer diameter (20 ga x $\frac{1}{2}$ " Luer stubs, PHYMEP, France) with the solution or solvent of interest. We applied the pendant drop analysis. The results are presented as triplicates with standard deviation.

5.3. Results and Discussion

This chapter aimed to investigate the synthesis of monodisperse lipid-shelled microbubbles to be applied as carriers for drug and gene delivery or contrast agents for ultrasonic imaging. First, we describe the optimization of a microfluidic set-up for the synthesis of polymerized shell microbubbles, targeted to detect and treat post-surgical adhesions.

5.3.1. Optimization of polymerized shell microbubbles production

In collaboration with Boston University (USA), we worked on the synthesis of fibrin targeting polymerized shell microbubbles for ultrasonic imaging applications using microfluidic devices. In this work, we produced targeted lipid shell microbubbles as ultrasound contrast reagents that can be used to detect and treat adhesion-like fibrin formations using clinical diagnostic ultrasound scanners. Adhesions are post-surgical bands of fibrous scar tissue ligating apposing tissues/organs, which can cause different clinical complications, significant morbidity and mortality (SCHNÜRIGER et al., 2011). We studied the microfluidic synthesis of gas-core polymerized shell microbubbles (PSMs) that display the fibrin binding peptide CREKA (ZHOU et al., 2013) and include an UV cross-linkable fatty acid (pentacosadiynoic acid, PCDA) to enhance bubble stability (PARK et al., 2012). Also, the aqueous phase was composed of a mixture of glycerol: propylene glycol: deionized water (10:10:80 %, volume), which is commonly applied for the formation of microbubbles in microfluidic platforms (HETTIARACHCHI et al., 2007; SEGERS et al., 2016a).

5.3.1.1. Step-emulsification devices

The chips employed for microbubbles synthesis were based on step-emulsification (Figure 5.1). By applying this design, the bubbles are formed when the dispersed phase flows through an abrupt transition in the form of a step between the inlet channel and the reservoir (LI et al., 2015). We used pressure control systems (Fluigent, France) to control the gas and liquid inlet.

As shown in Figure 5.3a, confocal laser scanning microscopy enabled the three-dimensional visualization of the step-emulsification device's structure: a step from 1 μm to 20 μm between the channel heights of the inlet and reservoir/outlet channels, respectively. The lipid-coated gas-filled microbubbles were produced inside the microfluidic device (Figure 5.3b), and further UV cross-linked immediately after production, to yield PSMs (Figure 5.3c).

This technique yielded PSMs with reduced size, when compared to the microbubbles observed inside the microfluidic channels. Indeed, the PSMs presented mean diameter of $8.2 \pm 4.9 \mu\text{m}$ and coefficient of variation (CV) of 0.61, based on the size distribution of the PSM after UV-polymerization (Figure 5.3d). These results highlighted the need for optimization regarding the microbubbles polydispersity, in order to ensure a narrower range of resonance and a higher sensitivity for ultrasound imaging (LIN; CHEN; CHEN, 2016).

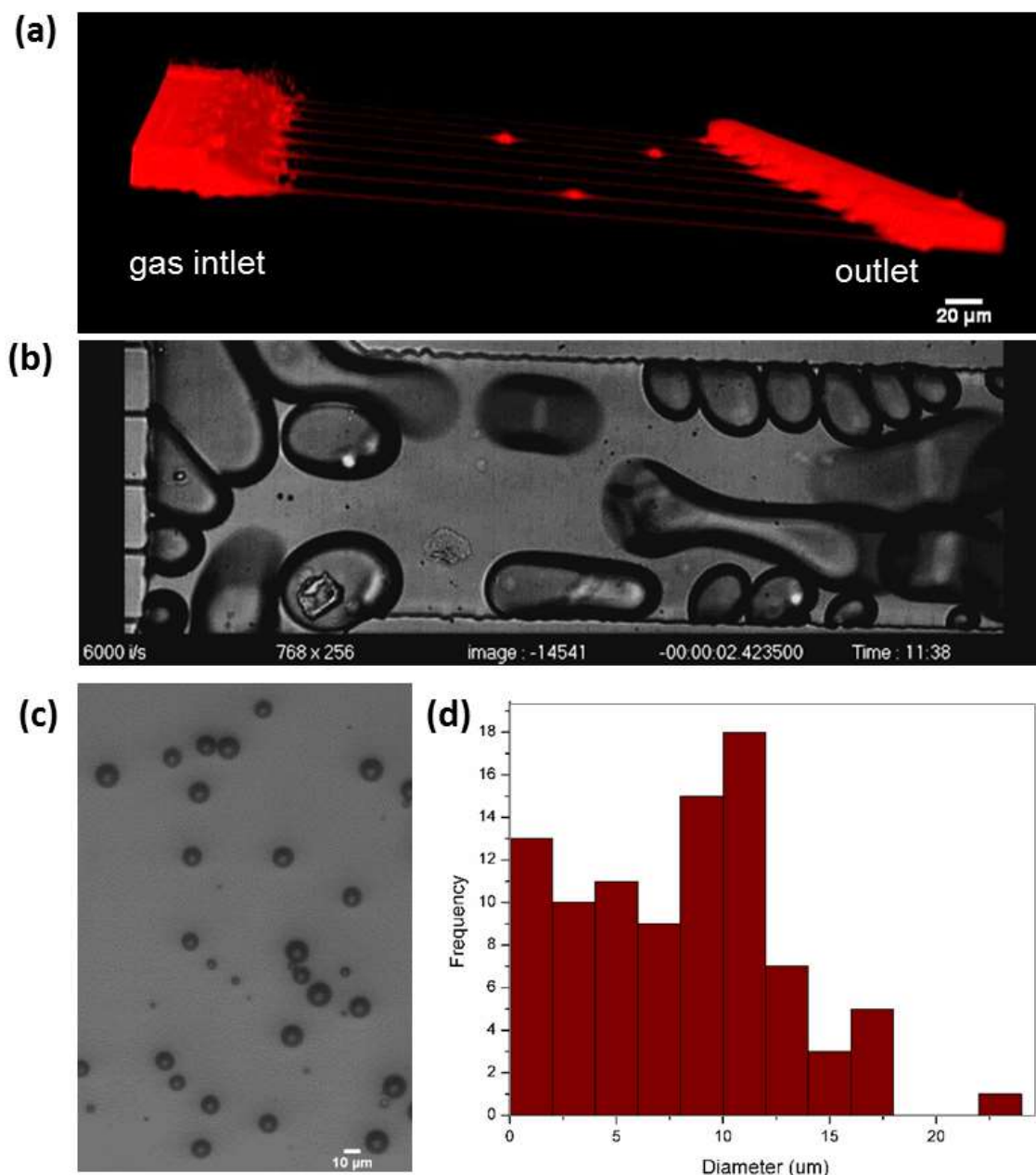


Figure 5.3. Microfluidic system for polymerized shell microbubble (PSM) synthesis using step-emulsification chip. (a) Confocal micrograph of the microfluidic channels using rhodamine B dye to demonstrate the step from 1 μm to 20 μm between the gas inlet and reservoir outlet channels. (b) Optical image of the microfluidic array channel during the microbubbles production. (c) Optical image of the collected microbubbles after UV-polymerization. (d) Size distribution histogram of PSM produced through this set-up.

To optimize the step-emulsification generation of microbubbles, we applied oxygen plasma as a surface treatment to create a hydrophilic microfluidic channel network. This means that we used the microfluidic chips within 10 min after bonding of the PDMS layer to the glass substrate, in order to ensure its hydrophilic character. This optimization allowed for the continuous formation of gas-filled microbubbles

without observing coalescence or adhesion to the channel walls (Figure 5.4a, zoomed view).

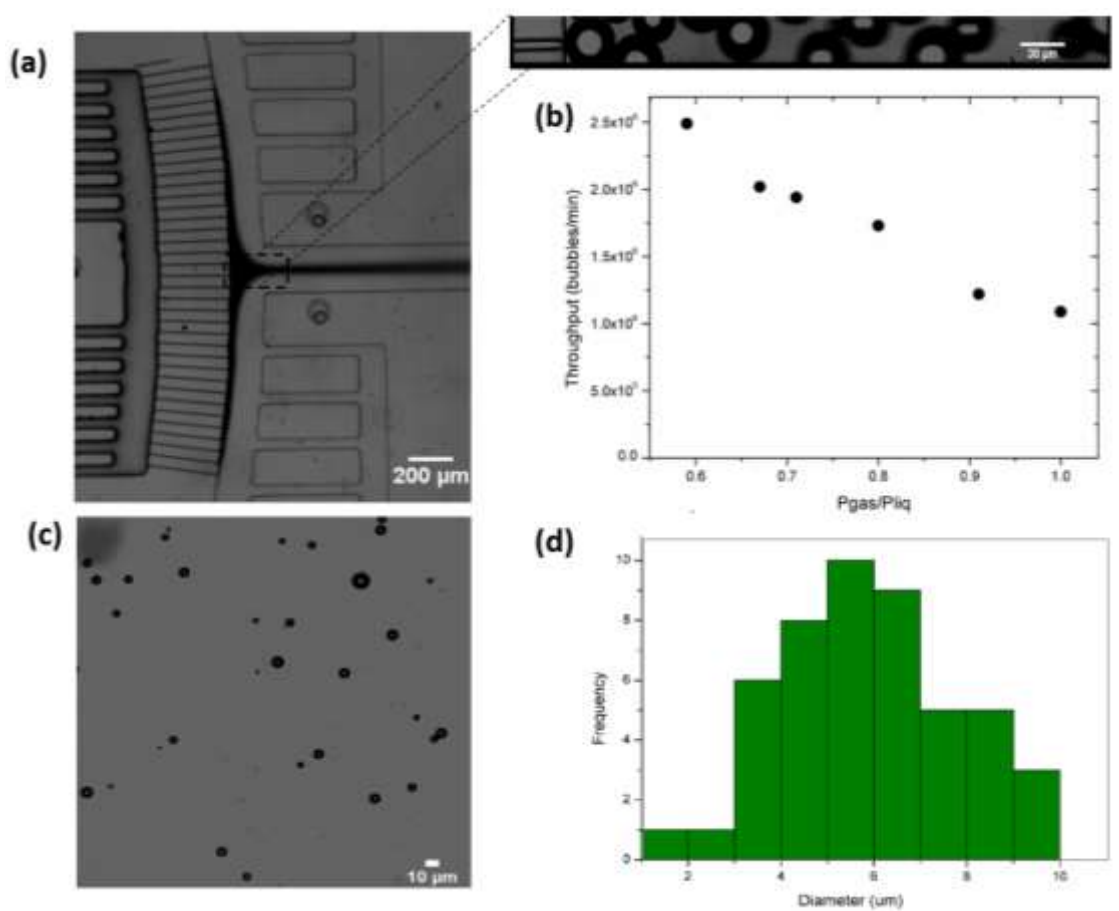


Figure 5.4. Optimized microfluidic synthesis of polymerized shell microbubble (PSM) using step-emulsification devices and oxygen plasma surface treatment. (a) Optical image of the microfluidic array channel during the microbubbles production. Zoomed image was taken with a high-speed camera. (b) Productivity of microbubbles within the microfluidic chip. The gas inlet pressure (P_{gas}) was kept at 2 bar while liquid inlet pressure (P_{liq}) varied. (c) Optical image of the collected microbubbles after UV-polymerization (PSM) and (d) corresponding size distribution histogram for process condition of $P_{\text{gas}}/P_{\text{liq}}$ of 0.6.

Moreover, we evaluated the productivity of microbubbles within the microfluidic chip with a high-speed camera (Figure 5.4a, zoomed view) and using ImageJ software for data treatment. We achieved the throughput of 2.5×10^6 microbubbles/min, as presented in Figure 5.4b ($P_{\text{gas}}/P_{\text{liq}}$ of 0.6), depending on the pressure of the liquid inlet (P_{liq}). With a single device, this rapid rate of PSM production enables sufficient microbubbles for use in pre-clinical studies, which typically use $\sim 10^8$ microbubbles/mL. After these improvements, the optimized PSMs presented $5.87 \pm 1.9 \mu\text{m}$ as mean diameter and CV of 0.33 (Figure 5.4c). Indeed, this optimized microfluidic set-up based on step-emulsification generated microbubbles with tighter, more controlled, size distributions (Figure 5.4d). Microbubbles with

improved characteristics such as polydispersity have been shown to improve US contrast intensity *in vivo* (DOLLET; MARMOTTANT; GARBIN, 2019; STREETER et al., 2010).

This microfluidic synthesis of PSMs was recently reported by our collaborators from Boston University (GORMLEY et al., 2019). In this study, these bubbles showed the potential to identify adhesion-like fibrin formations, and may hold promise in blocking or breaking up fibrin formations *in vivo*. This strategy represents a noninvasive technique to breakup early stage adhesions coupled with a reliable detection method aiming to provide an ideal solution to address adhesion-related complications.

5.3.1.2. Hydrodynamic focusing devices

Finally, aiming to produce microbubbles with further improved features, we investigated the use of hydrodynamic focusing chips. We kept the same conditions applied above for the lipid-coated gas-filled microbubbles synthesis (Figure 5.4), such as hydrophilic surface treatment with oxygen plasma and lipid composition of liquid inlet. We developed microfluidic devices with nozzle of 20 μm and with an expanded reservoir, in order to reduce the hydraulic resistance for the gas inlet and allow a continuous production of microbubbles (Figure 5.2a).

To establish an optimized and reproducible condition for the production of microbubbles using hydrodynamic focusing devices, we had to use simultaneously two flow control equipment: a Microfluidic Flow Controller Systems (MFCS-100, Fluigent, France) to adjust the pressure of the air inlet. The liquid inlet was controlled by an infusion syringe pump (neMESYS Low Pressure Module 290N, cetoni GmbH, Germany). As shown in Figure 5.5a, the bubbles produced using microfluidic chips based on hydrodynamic focusing were monodisperse with high reproducibility. After UV-polymerization, the PSMs were stable for at least 24h (Figure 5.5b) and presented mean diameter of $5.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ and CV of 0.05 (Figure 5.5c), demonstrating the formation of monodisperse stable microbubbles.

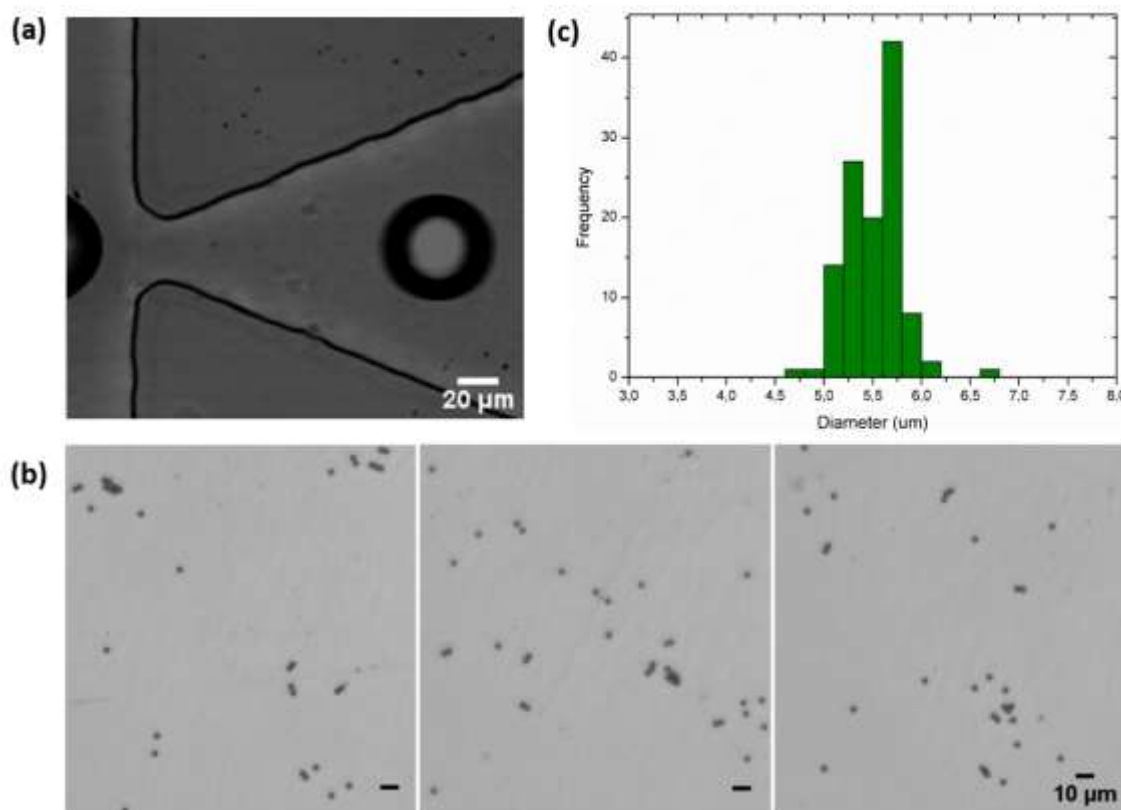


Figure 5.5. (a) Hydrodynamic focusing microfluidic chip used for lipid-coated microbubbles, with size distribution of the microbubbles produced. (b) Optical micrograph of the polymerized shell microbubbles (PSMs) 24h after UV-polymerization. (c) Size distribution histogram of PSMs after 24h.

In fact, comparing the size of the microbubbles after production within the microchannel (Figure 5.5a) and the stable PSMs after UV-polymerization (Figure 5.5b), we observe a reduction size factor of approximately 7 times after 24h, while keeping a monodisperse size distribution (CV of 0.05). The reduction of lipid-shelled microbubbles was already reported in the scientific literature (SEGERS et al., 2016a). The authors explain that the final bubble size depends on the phenomenon of Ostwald ripening and on the lipid formulation, more precisely, on the number of lipid molecules on the bubble surface. Due to the presence of a stabilizing shell composed of phospholipids, the bubbles do not fully dissolve, but reach a finite stable size (SEGERS et al., 2016a). Hence, these phenomena may explain the results we obtained for the shrinkage of our microbubbles. It is important to highlight that the monodispersity of the lipid-coated microbubbles was maintained from production even after UV-polymerization.

In this way, herein we described the optimization of the microfluidic synthesis of polymerized lipid-shelled microbubbles, which were further described for treatment of post-surgical adhesions (GORMLEY et al., 2019). Further, we assessed the effects

of each microfluidic process parameter on the synthesis of monodisperse lipid-coated microbubbles.

5.3.2. Evaluation of process parameters on microfluidic synthesis of lipid-coated microbubbles

Despite the efforts for developing a microfluidic set-up for microbubbles synthesis, it is still challenging to make this a suitable process aiming at industrial applications. Taking into account that a continuous production of monodisperse microbubbles with significantly improved acoustic responses is highly desirable for commercial products, we aimed to investigate the effects of different process parameters aiming to achieve a simpler and robust production process for industrial applications.

5.3.2.1. Continuous phase components

At first, we assessed the modification of the liquid phase components. We aimed to find alternatives for the aqueous phase composed of glycerol: propylene glycol: deionized water (GPW – 10:10:80 % (v/v)), to develop a simpler and cheaper system for industrial processes.

We investigated the use of a lipid composition of DSPC:DSPE-PEG₂₀₀₀ (9:1 molar), since it is already reported on the literature to form stable lipid-coated microbubbles (GNYAWALI et al., 2017; TALU et al., 2007). This composition is reported to be similar to the FDA-approved commercial products DEFINITY® (Lantheus Medical Imaging, USA) (GNYAWALI et al., 2017) and SonoVue® (Bracco Diagnostics, USA) (KOOIMAN et al., 2014). Thus, it would allow us to evaluate the other microfluidic parameters involved in the formation of monodisperse microbubbles.

We measured the surface tension (γ) at the liquid-air interface of the phospholipid compositions (all prepared at 0.5 wt% of total lipid concentration) dispersed in deionized water with 10% sucrose (Suc), or GPW solution (Figure 5.6). In fact, surfactants in the encapsulating shell contribute to stabilize the bubbles against coalescence, diminish the surface tension and hinder the gas dissolution from the core into the surrounding medium (FERRARA; POLLARD; BORDEN, 2007).

Hence, we expect to compare both lipid compositions for the ability to stabilize the microbubbles.

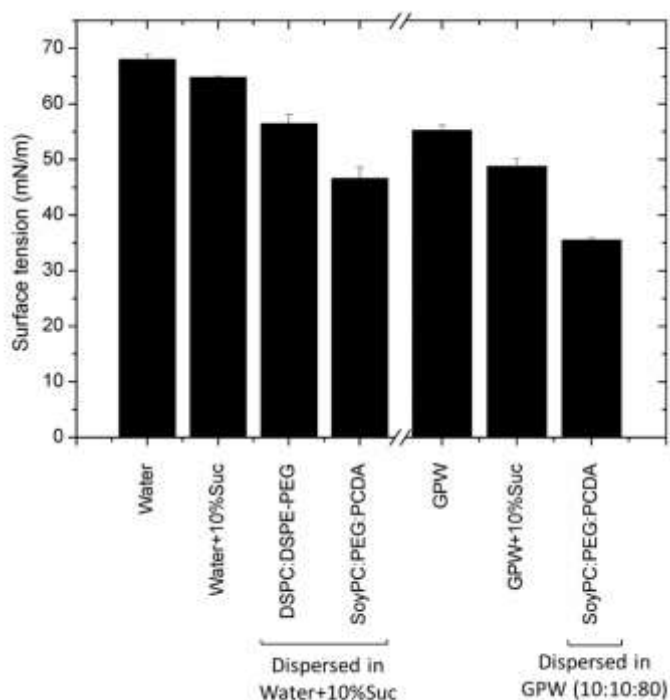


Figure 5.6. Surface tension measurements of various phospholipid compositions (0,5% of total lipid concentrations) in different aqueous phases: deionized water with 10% (m/m) sucrose (Suc) and glycerol:propylene glycol:water (GPW) solution (10:10:80 %). The error bars indicate standard deviation of independent triplicates.

Figure 5.6 shows that the use of 10 % glycerol in the aqueous phase, as a viscosity enhancer, decreased the γ in about 10 mN/m for all the analyzed samples. As reported in the literature, this component is widely applied to improve stability of the microbubbles (HETTIARACHCHI et al., 2007; SEGERS et al., 2016a). Nevertheless, recent reports showed that it is possible to produce monodisperse microbubbles without addition of co-solvents or viscosity enhancers (SEGERS et al., 2017, 2019). In this way, we replaced GPW solution with aqueous phase composed of 10 wt% sucrose in deionized water, a cheaper biocompatible alternative for the subsequent experiments.

Between the lipid dispersions in water with 10% sucrose, the phospholipid composition of SoyPC:DSPE-PEG:PCDA presented the lowest surface tension (37.1 ± 0.6 mN/m) when compared to DSPC:DSPE-PEG (56.5 ± 1.5 mN/m) (Figure 5.6). The inclusion of the unsaturated fatty acid PCDA probably have contributed to the depletion in γ ; however, it also requires an UV-polymerization post-treatment to polymerize the lipid shell around the microbubbles. In this way, it would not be the

most feasible strategy aiming for the development of industrial products. Hence, we decided to evaluate the synthesis of microbubbles using the lipid composition of DSPC:DSPE-PEG₂₀₀₀ at 0.5 wt% of total lipid concentration with the use of sucrose (10 wt%), aiming to understand and compare the characteristics of the microbubbles synthesized via microfluidics.

5.3.2.2. Microfluidic process parameters

Effects of ionic strength

We used the hydrodynamic focusing microfluidic devices developed previously in section 3.1.2 (Figure 5.5a). Figure 5.7 summarizes the experiments performed for the optimization of microfluidic production of microbubbles. When applied side streams composed of lipids dispersed in aqueous phase of water with 10% sucrose, we observed adhesion of microbubbles on top of the glass wall, leading to increased coalescence and polydispersity of the produced microbubbles (Figure 5.7a). It is important to observe that this phenomenon was not detected for the PSMs due to the use of GPW solution as aqueous phase (Figure 5.5a), which is known to increase the bulk liquid viscosity and allow for a controlled synthesis of lipid-coated microbubbles (DHANALIWALA et al., 2013; SEGERS et al., 2016a).

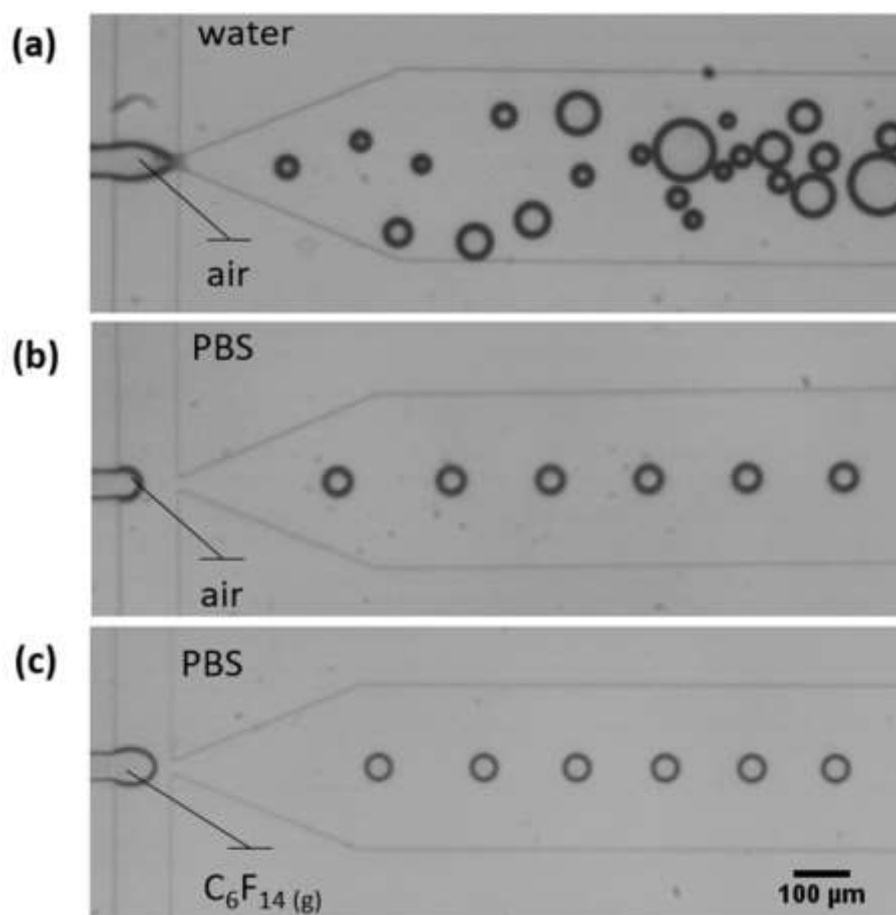


Figure 5.7. Optimization for microfluidic synthesis of DSPC:DSPE-PEG₂₀₀₀-coated (0.5wt%) microbubbles. Air-filled microbubbles produced using side streams composed of (a) lipids dispersed in 10wt% sucrose aqueous solution and (b) lipids dispersed in PBS 10 mM containing 10wt% of sucrose. (c) Investigation of gas inlet containing air and perfluorohexane (C₆F₁₄(g)) and lipids dispersed in PBS 10 mM with 10% sucrose. All microfluidic conditions applied gas inlet pressure of 220 mbar and liquid inlet flow rate of 30 μ L/min.

Taking into account our experience with lipid-surface interactions when working with stealth cationic liposome microfluidic synthesis (*chapter 3*) (PERLI et al., 2019), an alternative to overcome the hydration forces between the silica surface and the molecules is the exploitation of saline solutions. Hydrated cations bind to the negatively charged surfaces and give rise to a repulsive hydration force (WANG et al., 2013). In this case, we employed phosphate-buffered saline (PBS) at 10 mM concentration as the aqueous phase with the dispersed phospholipids.

As hypothesized, this condition allowed for the synthesis of monodisperse lipid-coated air-filled microbubbles (Figure 5.7b). The buffer played an important role on reducing the lipid interaction with the microchannel walls, modulating the lipid self-assembly and probably improving the surfactant effect of the phospholipids for stabilizing the gas/liquid interface. Indeed, ionic strength has been studied as a

coalescence inhibitor parameter driven by cation/anion pair affinities for the interface gas/liquid, which might decrease bubble coalescence, depending on the chemical nature of the salts and surfactants involved (SOVECHLES; WATERS, 2015).

Effects of gas core component

To improve bubble stability we assessed the modification of the gas component for the synthesis of microbubbles. Some parameters that affect bubble dissolution include surface tension, the partial gas pressure in the medium and the shell resistance against gas efflux from the core of the microbubble (PARK et al., 2012). In view of this, we investigated the use of perfluorohexane ($C_6F_{14(g)}$ – MW of 338 Da) as a heavy gas core (Figure 5.7c), in order to reduce its diffusivity through the lipid monolayer, avoid microbubble dissolution and improve its stability. Also, due to its immiscibility with water, this PFC gas represents an interesting alternative to resist Laplace and outer fluid pressures accounting for bubble dissolution (HETTIARACHCHI et al., 2007). This configuration allowed for a continuous and reproducible production of highly monodisperse (CV of 0.012) lipid-coated microbubbles with $52.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ in average diameter.

The commercially available microbubbles typically present highly polydisperse populations. The FDA-approved SonoVue® microbubbles are available as a dried powder based on sulfur hexafluoride ($SF_6(g)$ – MW of 146 Da) gas-filled DSPC-coated microbubbles of 2-3 μm as average diameter (LINDNER, 2004), with a concentration of 300 million bubbles per mL (SEGERS et al., 2019).

Comparatively, our microfluidic system configurations (Figure 5.7b,c) allow for the production of microbubbles with an average frequency of 236 Hz and a throughput of 1.4×10^4 bubbles/min. This is a relatively low throughput, also when compared to step-emulsification devices (Figure 5.4b). However, the monodispersity is remarkably higher and the production exhibits great reproducibility. Finally, when compared to the air-filled microbubbles, the use of $C_6F_{14(g)}$ (PFC) (Figure 5.7c) showed to be an important parameter to improve microbubbles stability after collection.

Enhancing microfluidic production stability

Even though the microfluidic set-up shown in Figure 5.7 was already effective to produce monodisperse microbubbles, we aimed to develop a microfluidic design with a co-flow channel to control the spacing between the microbubbles, reduce coalescence probability and improve the flow stabilization (Figure 5.2b and Figure 5.8a).

The fluorescence assays using a FITC-tagged phospholipid demonstrated the adsorption of phospholipids at the air/liquid interface (Figure 5.8b, arrow) and the co-flow of buffer solution (PBS 10 mM) for flow stabilization, leading to the formation of monodisperse lipid-coated microbubbles (Figure 5.8a and Figure 5.8c).

However, it is important to mention that, differently from short chain surfactants such as Tween, phospholipids are only able to sufficiently stabilize microbubbles against coalescence at high concentrations of specific lipid compositions. As reported by Segers et al. (2016a), even though at high lipid concentrations the collision frequency between liposomes and microbubbles increases accounting for an enhanced stability against coalescence, only 0.1% of the lipids in the fluid is adsorbed to the bubble interface. This suggests that there is a phenomenological balance between the emulsion formation and the presence of free liposomes, which may also contribute to prevent bubble coalescence through increasing the effective viscosity in the thin film between colliding microbubbles (SEGERS et al., 2017).

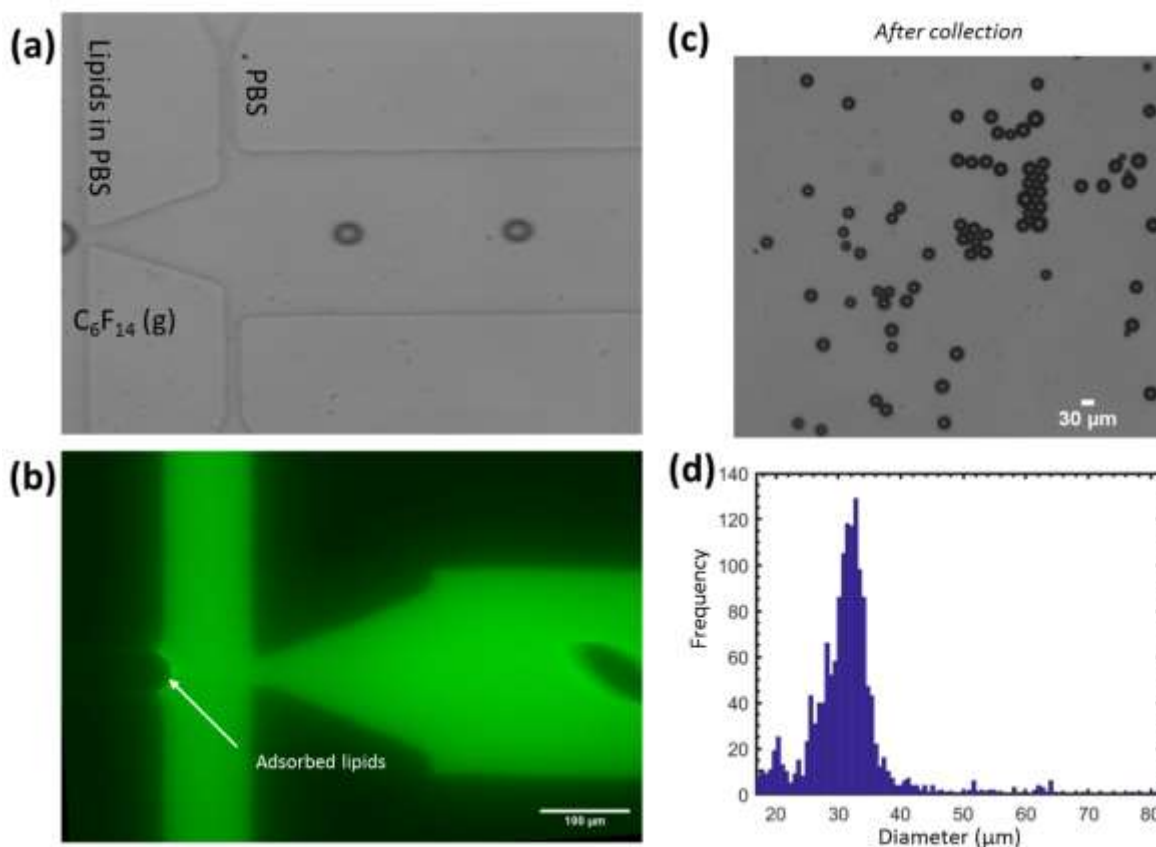


Figure 5.8. (a) Co-flow microfluidic geometry for synthesis of lipid-coated microbubbles (DSPC:DSPE-PEG₂₀₀₀ in deionized water with 10% sucrose), using PBS 10 mM as stabilizing flows (scale bar: 100 μm). (b) Fluorescence analysis showing FITC-tagged lipids adsorbed at the surface of the microbubbles (scale bar: 100 μm). (c) Microbubbles characterized after collection in a tube, with (d) corresponding size distribution histogram (scale bar: 30 μm).

From the size distribution histograms presented after collection (Figure 5.8d), it is possible to observe that the bubbles presented $31.6 \pm 7.3 \mu\text{m}$ and CV of 0.2 (Figure 5.8c). Additionally, the slight increase in polydispersity from the inside of the microchannels (Figure 5.8a, CV of 0.05) to the collection tube (Figure 5.8c, CV of 0.2) may indicate microbubbles instability after collection. In view of this, we assessed the stability of the microbubbles through a simple approach: we collected the microbubbles directly on top of a microscope glass slide and we took images of the suspension. This analysis was performed in order to elucidate the differences in polydispersity between the steps of production inside the microchannels and collection. Figure 5.9 shows the microscopic images (Figure 5.9a) and size distribution histograms (Figure 5.9b) at different time periods.

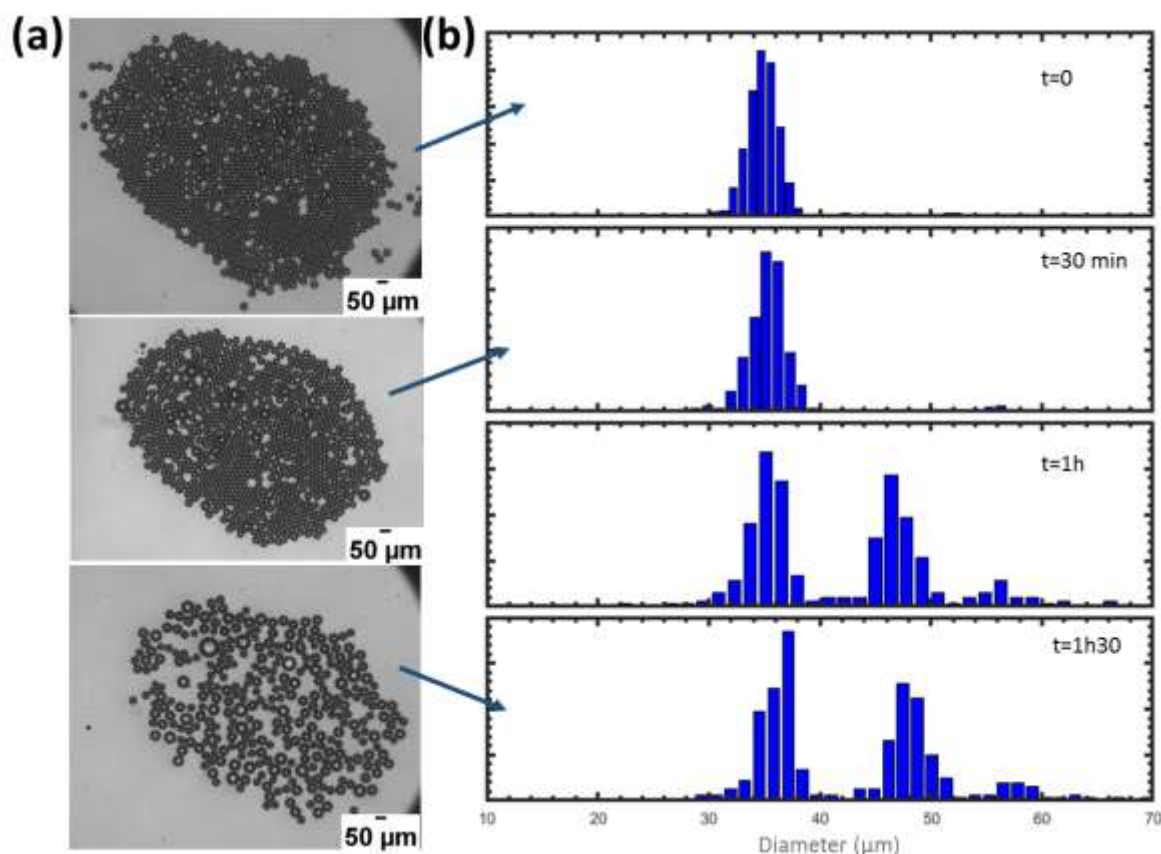


Figure 5.9. (a) Optical micrographs of the microbubbles collected on top of a glass slide directly from the co-flow microfluidic production set-up. (b) Size distribution histograms evaluating the stability of the final characteristics of the microbubbles during collection.

It is worth noticing the dissolution of the microbubbles within the first 1h30min after production. It is possible to observe that the microbubbles were initially monodisperse, but after 1h they became polydisperse probably due to Ostwald ripening and coalescence, and gas-liquid emulsion instability. The Ostwald ripening phenomenon involves the dissolution of the smallest bubbles whose lost gas diffuse into larger neighboring bubbles with the lowest Laplace pressures. This phenomenon was observed by Segers et al. (2016), for lipid-coated microbubbles prepared in GPW solutions. The authors explain that in the presence of a stabilizing shell, the shrinkage inherently occurs until the bubbles reach a final stable size by reducing the surface tension through mechanical compression of the lipid shell. Additionally, the authors elucidate that the lipid adsorption in the gas/liquid interface reaches equilibrium before it leaves the nozzle, and the amount of phospholipids remain unchanged during its dissolution until it reaches a stable size (SEGERS et al., 2016a).

This outcome indicates that further improvements might be considered to ensure the monodisperse bubble distribution. After having established the optimal conditions to produce monodisperse microbubbles using microfluidic devices (Figure 5.8 and Figure 5.9), the team from ESPCI continued this research line and they are currently evaluating the effects of different coating materials and gas substitutes on the monodispersity of the microbubbles, as well as their acoustic properties.

5.4. Final Remarks

This work concerns the activities developed during the Research Internship Abroad Program (BEPE) at *École Supérieure de Physique et Chimie Industrielles* (ESPCI Paris).

We were able to produce monodisperse lipid-coated microbubbles within microfluidic devices. We observed that different variables account for the stable synthesis of microbubbles inside microchannels, such as proper wettability conditions (oxygen plasma and continuous phase components), optimized geometry of the microfluidic chips (co-flow hydrodynamic focusing chips) and adequate phospholipid formulation. In this way, we were able to develop a microfluidic set-up with high reproducibility for the production of tightly monodisperse lipid-coated microbubbles.

As our collaboration with ESPCI is ongoing, the microbubbles are currently being characterized regarding their acoustic response and biological evaluation.

Finally, microbubble-based microfluidics emerged as a valuable tool for high precision and high sensitivity developments, such as size-controlled microcarriers. This strategy can contribute for future developments for varied healthcare applications.

6. Discussão Geral

O maior desafio encontrado neste estudo envolveu a síntese de lipossomas catiônicos funcionalizados com polietilenoglicol (PEG) (*Stealth Cationic Liposomes – SCL*) em sistemas microfluídicos. Observamos que o processo microfluídico convencional utilizando água nas correntes laterais levava à formação de micelas oblatas, a partir da inserção do DSPE-PEG. Isso se deu pela natureza altamente hidrofílica da porção de PEG, que permitia a formação concomitante de lipossomas e micelas oblatas (*Capítulo 3*). A presença de duas nanoestruturas pode limitar futuras aplicações biológicas, pois pode proporcionar a entrega heterogênea da carga terapêutica.

Para superar esta limitação, realizamos um estudo fenomenológico da síntese de lipossomas *stealth* em dispositivos microfluídicos explorando o aumento da força iônica do sistema (PERLI et al., 2019). Íons nas correntes laterais mostraram-se imprescindíveis para blindar as cargas superficiais dos fosfolídeos, evitar a formação de micelas e governar a auto-agregação lipídica para formação de fragmentos de bicamadas e, conseqüentemente, de SCL uniformes. Para aprofundar as descobertas quanto à modificação da auto-agregação lipídica, esses lipossomas foram caracterizados morfológicamente (criomicroscopia eletrônica de transmissão – cryo-TEM) e estruturalmente (espalhamento de Raios-X a baixo ângulo – SAXS) (*Capítulo 4*). Ambas as técnicas evidenciaram que o aumento da força iônica do sistema levou a um concomitante aumento da fração de SCL multilamelares.

A partir desses resultados, verificamos que o aumento da força iônica é uma variável de processo microfluídico capaz de modular a auto-agregação lipídica para formação de SCL monodispersos em processos reprodutíveis. A presença dos íons nas correntes laterais possibilitou a redução da repulsão das cabeças polares positivamente carregadas dos fosfolídeos e favoreceu as interações hidrofóbicas entre as caudas apolares. Aliado ao regime laminar de escoamento e à mistura gradual baseada em difusão molecular desenvolvida no sistema microfluídico, o aumento da força iônica acentuou a formação de bicamadas justapostas, resultando na síntese de uma maior fração de lipossomas multilamelares.

A característica multilamelar desses SCL pode influenciar na entrega de material genético quando utilizados como carreadores de liberação gênica. A formação de lipoplexos foi analisada através das técnicas de cryo-TEM e SAXS, as quais corroboraram dados da literatura ao evidenciar a inserção do pDNA entre bicamadas consecutivas, formando bicamadas duplas e apresentando uma eficiente incorporação de pDNA. No entanto, devido à presença de contaminação das linhagens celulares aqui estudadas, a avaliação biológica destes SCL como carreadores de material genético ainda será finalizada, a partir da repetição dos ensaios de transfecção celular.

Um desafio adicional deste trabalho foi a síntese de microbolhas revestidas por monocamada lipídica utilizando recobrimento com PEG (*Capítulo 5*). Corroborando os resultados obtidos para a síntese de SCL (*Capítulo 3*), o emprego de correntes laterais tamponadas (PBS) possibilitou a formação contínua de microbolhas monodispersas em processos reprodutíveis. Ao atuar na auto-agregação lipídica, a força iônica se mostrou uma alternativa simples e robusta ao uso de reagentes, como glicerol e propilenoglicol, comumente empregados para a síntese de microbolhas em microcanais. Porém, é importante ressaltar que o recobrimento lipídico estudado ainda permite otimizações, a fim de aprimorar a estabilidade das microbolhas.

Exploramos diferentes dispositivos microfluídicos para controle das propriedades físico-químicas finais das microbolhas. O dispositivo microfluídico de emulsificação em “*step*”, possibilitou ampliar significativamente a produtividade de microbolhas. Porém, uma produção monodispersa foi obtida somente a partir do emprego de dispositivos de focalização hidrodinâmica. A microfluídica permite infinitas possibilidades de modificação de geometria dos microcanais para as mais diversas aplicações. A investigação de dispositivos que permitam a síntese de microbolhas monodispersas com elevada produtividade é de extrema relevância para o desenvolvimento de novas tecnologias no âmbito de carreadores.

Este estudo ressaltou que a microfluídica é uma ferramenta multidisciplinar valiosa e versátil para a síntese de carreadores. Aliando os conhecimentos das propriedades hidrodinâmicas do escoamento em microescala aos mecanismos de auto-agregação lipídica, foi possível explorar a força iônica do sistema para desenvolver plataformas microfluídicas robustas para a síntese de carreadores.

Deve-se destacar que este processo baseado na força iônica do sistema permite modular as propriedades físico-químicas finais de carreadores lipídicos de acordo com a finalidade. O aumento da força iônica do sistema acarreta a síntese de carreadores monodispersos e de maiores diâmetros. Para aplicações nas quais a monodispersidade dos carreadores não seja prioritária, a utilização de condições de baixa força iônica se mostra suficiente para balancear as interações hidrofóbicas e proporcionar a síntese de carreadores funcionalizados superficialmente com PEG.

Os conhecimentos adquiridos neste trabalho quanto à síntese de SCL e microbolhas lipídicas com o aumento da força iônica em processos microfluídicos abre novas perspectivas para a produção dos mais diversos micro e nanocarreadores. Vislumbra-se explorar, principalmente, outras funcionalizações superficiais, a partir da inclusão de lipídeos derivatizados com ligantes específicos. O aumento da força iônica do sistema microfluídico permite aprimorar a cinética de auto-agregação lipídica, assegurando a incorporação dos diferentes lipídeos na estrutura lipídica para formação de carreadores funcionalizados. Torna-se possível, por exemplo, a produção de carreadores para entrega gênica direcionada (*targeted delivery*), tema bastante abordado na literatura científica. Dessa forma, este estudo contribuiu para a fundamentação fenomenológica e para o desenvolvimento de processos microfluídicos inovadores para a síntese de carreadores lipídicos.

7. Conclusões

Este estudo visou explorar sistemas microfluídicos baseados em focalização hidrodinâmica para a síntese de carreadores lipídicos para aplicação em nanomedicina. Dentre esses vetores, foram explorados lipossomas catiônicos *stealth* (SCL) funcionalizados com polietilenoglicol (PEG), e microbolhas revestidas por lipídeos. A partir dos resultados apresentados, foi possível concluir:

- A síntese microfluídica de lipossomas catiônicos (CL) empregando correntes laterais de água é um processo robusto e reprodutível; porém, correntes laterais com maior força iônica mostraram-se parâmetros indispensáveis para a formação de lipossomas catiônicos *stealth* (SCL, contendo DSPE-PEG) monodispersos, de forma reprodutível.
- O aumento da força iônica para formação microfluídica de SCL mostrou atuar em três âmbitos principais: (i) a blindagem das cargas da superfície vítrea, de forma a evitar interações entre os lipídeos e superfície do dispositivo microfluídico; (ii) balancear as forças de hidratação dos lipídeos para com as correntes laterais, atuando assim na redução da força motriz de transferência de massa e evitando a deposição de lipídeos em forma de micelas e microagregados; (iii) reduzir a repulsão das cabeças polares positivamente carregadas dos fosfolipídeos e, assim, favorecer as interações hidrofóbicas entre as caudas apolares para formação de bicamadas e, conseqüentemente, de lipossomas.
- Análises de cryo-TEM e SAXS demonstraram que o aumento da força iônica leva à formação de lipossomas multilamelares. Estas técnicas evidenciaram que lipoplexos de SCL e pDNA se organizam estruturalmente inserindo o material genético entre bicamadas consecutivas, formando bicamadas duplas.
- Avaliação de eletroforese em gel de agarose mostrou que lipoplexos exibem elevada eficiência de incorporação de pDNA. A avaliação biológica sugere que não houve diferenças significativas entre as transfecções utilizando lipoplexos de SCL sintetizados em diferentes forças iônicas (PBS nas concentrações de 10 e 50 mM). Porém, devido à presença de contaminação das linhagens celulares por micoplasmas, os ensaios biológicos ainda serão repetidos e confirmados.

- A produção microfluídica de microbolhas revestidas por fosfolipídeos se mostrou viável. A utilização de dispositivos de focalização hidrodinâmica, empregando fase contínua tamponada (PBS) e gases de alto peso molecular, possibilitou a formação de microbolhas monodispersas com elevada reprodutibilidade.

8. Perspectivas de Trabalhos Futuros

A partir da pesquisa desenvolvida nesta tese envolvendo a síntese microfluídica de carreadores lipídicos, vislumbra-se as seguintes sugestões de trabalhos futuros:

- Conduzir e otimizar os ensaios biológicos de transfecção celular para avaliar os efeitos da funcionalização superficial com PEG e da resultante multilamelaridade dos nanocarreadores lipídicos na entrega do material genético a células de câncer.
- A partir do método microfluídico otimizado neste trabalho utilizando elevada força iônica, prospecta-se o estudo da formação de lipossomas funcionalizados com ligantes específicos direcionadores. Por exemplo, o peptídeo cíclico baseado na sequência dos aminoácidos arginina, glicina e aspartato (cRGD), que é bastante estudado para funcionalização de nanocarreadores especializados para terapia de câncer. Assim, vislumbra-se a formação de lipossomas de terceira geração de forma monodispersa e reprodutível. A avaliação biológica de lipossomas funcionalizados com cRGD pode ser realizada por ensaios de transfecção e viabilidade celular, estudando células que expressam receptores seletivos ao peptídeo RGD, como as células do tipo de câncer de próstata PC3 (*prostate cancer cells*) ou HeLa (*human epitheloid carcinoma*), em comparação com células de câncer de mama MCF-7 (*human breast cancer*), por exemplo, que não expressam tais receptores.
- Investigar tampões orgânicos, como HEPES e MOPS, para modular a força iônica do processo de síntese de SCL. Quando comparados ao tampão mineral PBS, esses apresentam reduzida permeabilidade na membrana celular, se mostrando mais adequados para ensaios biológicos.
- Avaliar o método microfluídico empregando elevada força iônica na síntese de carreadores utilizando outras geometrias microfluídicas, incluindo por exemplo micromisturadores, para comparar os efeitos da força iônica acoplado a outros mecanismos de mistura, além da difusão, na formação de carreadores monodispersos. Ainda, estudar o emprego de dispositivos microfluídicos tridimensionais (3D), os quais minimizam os efeitos de parede, pode ser uma alternativa interessante para a síntese microfluídica de SCL monodispersos.
- Empregar ferramentas de simulação numérica como Dinâmica dos Fluidos Computacional (CFD – do inglês *Computational Fluid Dynamics*) para compreender

ainda melhor o fenômeno de auto-agregação lipídica e de síntese dos SCL no processo microfluídico.

- Quanto às microbolhas revestidas por lipídeos, estudar diferentes geometrias microfluídicas para alcançar a formação contínua e estável de microbolhas monodispersas apresentando diâmetros menores e adequados para as mais diversas aplicações médicas.

- Verificar outras composições para o revestimento das microbolhas, empregando misturas lipídicas com polímeros ou surfactantes, de forma a aprimorar a estabilidade das microbolhas revestidas por lipídeos.

- Além disso, assim como para os lipossomas, torna-se possível investigar a funcionalização superficial das microbolhas com ligantes direcionadores, de forma a produzir carreadores específicos para tecidos-alvo. Estas microbolhas podem ser empregadas nas mais diversas aplicações médicas, dentre elas para diagnóstico e/ou terapêutica em imagem ultrassônica ou ainda entrega direcionada de fármacos e genes.

- Avaliar as propriedades acústicas e estruturais das microbolhas, e realizar ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* para verificar a estabilidade, toxicidade e a especificidade dos carreadores formados em microfluídica.

9. Referências

- AGHAEI, H.; SOLAIMANY NAZAR, A. R. Continuous Production of the Nanoscale Liposome in a Double Flow-Focusing Microfluidic Device. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 51, p. 23032–23045, 2019.
- ALEXANDROVA, L. Thin wetting films from aqueous solutions of surfactants and phospholipid dispersions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 132, n. 1, p. 33–44, 2007.
- ALEXANDROVA, L. et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects The influence of mixed cationic – anionic surfactants on the three-phase contact parameters in silica – solution systems. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 373, n. 1–3, p. 145–151, 2011.
- ALLEN, T. M. et al. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. **BBA - Biomembranes**, v. 1066, n. 1, p. 29–36, 1991.
- ALLEN, T. M.; CHONN, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. **FEBS Letters**, v. 223, n. 1, p. 42–46, 1987.
- ALLEN, T. M.; HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes : effect of dose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1068, p. 133–141, 1991.
- ANDAR, A. U. et al. Microfluidic preparation of liposomes to determine particle size influence on cellular uptake mechanisms. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 2, p. 401–413, 2014.
- ANNA, S. L. Droplets and Bubbles in Microfluidic Devices. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 48, n. 1, p. 285–309, 2016.
- ATENCIA, J.; BEEBE, D. J. Controlled microfluidic interfaces. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 648–655, 2005.
- BABU, A. et al. Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 15, n. 3, p. 709–21, jun. 2014.
- BALAGADDÉ, F. K. et al. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 137–40,

jul. 2005.

- BALBINO, T. A. et al. Correlation of the physicochemical and structural properties of pDNA/cationic liposome complexes with their in vitro transfection. **Langmuir**, v. 28, n. 31, p. 11535–11545, 2012.
- BALBINO, T. A. et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 226, p. 423–433, jun. 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.
- BALBINO, T. A. et al. Integrated microfluidic devices for the synthesis of nanoscale liposomes and lipoplexes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, n. 2017, p. 406–413, 2017.
- BALBINO, T. A.; AZZONI, A. R.; DE LA TORRE, L. G. Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 203–10, 1 nov. 2013.
- BANGHAM, A. D. Liposomes: the Babraham connection. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, p. 275–285, 1993.
- BEEBE, D. J.; MENSING, G. A; WALKER, G. M. Physics and applications of microfluidics in biology. **Annual review of biomedical engineering**, v. 4, p. 261–86, jan. 2002.
- BJÖRNMALM, M.; YAN, Y.; CARUSO, F. Engineering and evaluating drug delivery particles in microfluidic devices. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 139–49, 28 set. 2014.
- BORDET, T.; BEHAR-COHEN, F. Ocular gene therapies in clinical practice: viral vectors and nonviral alternatives. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 8, p. 1685–1693, 2019.
- BREISCH, S. et al. Selective chemical surface modification of fluidic microsystems and characterization studies. v. 14, p. 497–505, 2004.
- BUCK, J. et al. Lipid-Based DNA Therapeutics: Hallmarks of Non-Viral Gene Delivery. **ACS Nano**, v. 13, p. 3754–3782, 2019.
- ÇAĞDAŞ, M.; SEZER, A. D.; BUCAK, S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In: SEZER, A. D. (Ed.). . **Application of**

- Nanotechnology in Drug Delivery**. 1. ed. [s.l.] InTech, 2014. p. 1–50.
- CAPRETTO, L. et al. Micromixing Within Microfluidic Devices. **Topics in Current Chemistry**, n. April, p. 27–68, 2011.
- CARRILLO, C. et al. Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: Determination of loading efficiency. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 68, n. 6, p. 775–83, jul. 2014.
- CARRIÓN, F.J, A. DE LA MAZA, J. . P. Carrion The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes. **Journal of colloid and interface science**, v. 164, n. 12, p. 78–87, 1993.
- CARRIÓN, F. J.; DE LA MAZA, A.; PARRA, J. L. The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes. **Journal of colloid and interface science**, v. 164, n. 1, p. 78–87, 1994.
- CARUGO, D. et al. Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016.
- CHEN, Z.-Y. et al. Gene therapy for cardiovascular disease mediated by ultrasound and microbubbles. **Cardiovascular ultrasound**, v. 11, p. 11, 2013.
- CHEN, Z. et al. Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system: Enhanced cellular uptake in vitro and improved pharmacokinetics in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3803–3811, 2012.
- CHEN, Z. et al. High Throughput Nanoliposome Formation Using 3D Printed Microfluidic Flow Focusing Chips. **Advanced Materials Technologies**, v. 4, n. 6, p. 1–9, 2019.
- CHEUNG, C. C. L.; AL-JAMAL, W. T. Sterically stabilized liposomes production using staggered herringbone micromixer: Effect of lipid composition and PEG-lipid content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, n. June, p. 687–696, 2019.
- CHU, P. et al. A review of bubble break-up. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 270, p. 108–122, 2019.
- CHYNOWETH, D. P. **General structure of a phospholipid**. Disponível em: <http://faculty.abe.ufl.edu/~chyn/age2062/lect/lect_06/4_18.GIF>. Acesso em: 7 mar. 2020.
- CLAESSENS, M. M. A. E. et al. Charged lipid vesicles: Effects of salts on bending rigidity, stability, and size. **Biophysical Journal**, v. 87, n. 6, p. 3882–3893, 2004.

- CONVERY, N.; GADEGAARD, N. 30 years of microfluidics. **Micro and Nano Engineering**, v. 2, n. January, p. 76–91, 2019.
- CORSI, K. et al. Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1255–1264, 2003.
- COUTURE, O. et al. Review of ultrasound mediated drug delivery for cancer treatment: Updates from pre-clinical studies. **Translational Cancer Research**, v. 3, n. 5, p. 494–511, 2014.
- CROMMELIN, D. J. Influence of lipid composition and ionic strength on the physical stability of liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 11, p. 1559–1563, 1984.
- DE JESUS, M. B. et al. Inclusion of the Helper Lipid Dioleoyl-Phosphatidylethanolamine in Solid Lipid Nanoparticles Inhibits Their Transfection Efficiency. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 2, p. 355–365, 2014.
- DE JESUS, M. B.; ZUHORN, I. S. Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: Properties and molecular mechanisms. **Journal of Controlled Release**, v. 201, p. 1–13, 2015.
- DE LA TORRE, L. G. et al. The synergy between structural stability and DNA-binding controls the antibody production in EPC/DOTAP/DOPE liposomes and DOTAP/DOPE lipoplexes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 175–84, 15 out. 2009.
- DE LA TORRE, L. G. et al. Trends on Microfluidic Liposome Production through Hydrodynamic Flow-focusing and Microdroplet Techniques for Gene Delivery Applications. In: **Advances in Liposomes Research**. New York: Nova Science Publishers, 2014. p. 63–96.
- DE LA TORRE, L. G.; BALBINO, T. A.; SIPOLI, C. C. Nanomedicina e os desafios da Engenharia Química. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 32, n. 3, p. 16–23, 2017.
- DERJAGUIN, B.; LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Progress in Surface Science**, v. 43, n. 1–4, p. 30–59, 1993.
- DHANALIWALA, A. H. et al. Liquid flooded flow-focusing microfluidic device for in situ generation of monodisperse microbubbles. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 14, n. 3–4, p. 457–467, 2013.

- DOLLET, B.; MARMOTTANT, P.; GARBIN, V. Bubble Dynamics in Soft and Biological Matter. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 51, n. 1, p. 331–355, 2019.
- DRUMMOND, D. C. et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacological reviews**, v. 51, n. 4, p. 691–743, 1999.
- DUAN, L. et al. Micro/nano-bubble-assisted ultrasound to enhance the EPR effect and potential theranostic applications. **Theranostics**, v. 10, n. 2, p. 462–483, 2020.
- DUFFY, D. C. et al. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 4974–4984, 1998.
- EDWARDS, K. et al. Preparations of Small Unilamellar Liposomes. v. 73, n. July, p. 258–266, 1997.
- EGELHAAF, S. U. et al. Determination of the size distribution of lecithin liposomes : a comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering. **Journal of Microscopy**, v. 184, n. 3, p. 214–228, 1996.
- ENDO, S.; PFENNIGSDORFF, A.; GOSS, K. U. Salting-out effect in aqueous NaCl solutions: Trends with size and polarity of solute molecules. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 1496–1503, 2012.
- EŞ, İ. et al. High-throughput conventional and stealth cationic liposome synthesis using a chaotic advection-based microfluidic device combined with a centrifugal vacuum concentrator. **Chemical Engineering Journal**, v. 382, n. September 2019, p. 122821, 2019.
- EVERS, M. J. W. et al. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. **Small Methods**, v. 2, n. 9, p. 1700375, 2018.
- FELGNER, J. H. et al. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 4, p. 2550–61, 1994.
- FELGNER, P. L. et al. Lipofection: A highly efficient , lipid-mediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, p. 7413–7417, 1987.
- FERRARA, K.; POLLARD, R.; BORDEN, M. Ultrasound Microbubble Contrast

- Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 415–447, 2007.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3rd. ed. [s.l: s.n.].
- FORBES, N. et al. Rapid and scale-independent microfluidic manufacture of liposomes entrapping protein incorporating in-line purification and at-line size monitoring. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 556, n. September 2018, p. 68–81, 2019.
- FRINKING, P. et al. Three Decades of Ultrasound Contrast Agents: A Review of the Past, Present and Future Improvements. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 46, n. 4, p. 892–908, 2020.
- FU, J. W. et al. Multifunctionalized Microscale Ultrasound Contrast Agents for Precise Theranostics of Malignant Tumors. **Contrast Media and Molecular Imaging**, v. 2019, 2019.
- GALE, B. K. et al. A Review of Current Methods in Microfluidic Device Fabrication and Future Commercialization Prospects. **Inventions**, v. 3, n. 60, p. 1–25, 2018.
- GASPERINI, A. A. M. et al. Association between cationic liposomes and low molecular weight hyaluronic acid. **Langmuir**, v. 31, n. 11, p. 3308–3317, 2015.
- GNYAWALI, V. et al. Honey, I shrunk the bubbles: microfluidic vacuum shrinkage of lipid-stabilized microbubbles. **Soft Matter**, v. 13, n. 22, p. 4011–4016, 2017.
- GORMLEY, C. A. et al. Fibrin-Targeted Polymerized Shell Microbubbles as Potential Theranostic Agents for Surgical Adhesions. **Langmuir**, 2019.
- GUO, Z. et al. Targeting efficiency of RGD-modified nanocarriers with different ligand intervals in response to integrin $\alpha v \beta 3$ clustering. **Biomaterials**, v. 35, n. 23, p. 6106–6117, 2014.
- HAS, C.; SUNTHAR, P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. **Journal of Liposome Research**, p. 1–30, 2019.
- HETTIARACHCHI, K. et al. On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging. **Lab Chip**, v. 7, n. 4, p. 463–468, 2007.
- HOOD, R. R. et al. Microfluidic formation of nanoscale liposomes for passive transdermal drug delivery. **MAMNA 2013 Spring Symposium - Microsystems Technology: Fulfilling the Promise**, p. 12–15, 2013a.

- HOOD, R. R. et al. Microfluidic synthesis of PEG- and folate-conjugated liposomes for one-step formation of targeted stealth nanocarriers. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 6, p. 1597–1607, 2013b.
- HOOD, R. R. et al. A facile route to the synthesis of monodisperse nanoscale liposomes using 3D microfluidic hydrodynamic focusing in a concentric capillary array. **Lab on a chip**, v. 14, n. 14, p. 2403–9, 2014.
- HOOD, R. R.; DEVOE, D. L. High-Throughput Continuous Flow Production of Nanoscale Liposomes by Microfluidic Vertical Flow Focusing. **Small**, v. 11, n. 43, p. 5790–5799, 2015.
- HUANG, Y. et al. Systemic Administration of siRNA via cRGD-containing Peptide. **Scientific reports**, v. 5, n. 12458, p. 1–5, 2015.
- HUH, D. et al. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. **Science**, v. 328, n. June, p. 1662–1668, 2010.
- HUNTER, R. Zeta potential in colloid science: principles and applications. In: **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. [s.l.: s.n.]. p. 93–117.
- IDEN, D. L.; ALLEN, T. M. In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1513, n. 2, p. 207–216, 2001.
- IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297–315, 2006.
- ISHIDA, T.; IDEN, D. L.; ALLEN, T. M. A combinatorial approach to producing sterically stabilized (Stealth) immunoliposomal drugs. **FEBS Letters**, v. 460, n. 1, p. 129–133, 1999.
- JAHN, A. et al. Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. **ACS Nano**, v. 4, n. 4, p. 2077–2087, 2010.
- JEN, C.-P. et al. Design and simulation of the micromixer with chaotic advection in twisted microchannels. **Lab Chip**, v. 3, n. 2, p. 77–81, 2003.
- JO, S. D. et al. Targeted nanotheranostics for future personalized medicine: Recent progress in cancer therapy. **Theranostics**, v. 6, n. 9, p. 1362–1377, 2016.
- JOHANSSON, M.; EDWARDS, K. Liposomes, Disks, and Spherical Micelles: Aggregate Structure in Mixtures of Gel Phase Phosphatidylcholines and

- Poly(Ethylene Glycol)-Phospholipids. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 6, p. 3839–3847, 2003.
- JÚNIOR, Á. D. C. et al. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. **Life Sciences**, v. 80, n. 7, p. 659–664, 2007.
- KALRA, A. et al. Salting-in and salting-out of hydrophobic solutes in aqueous salt solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 27, p. 6380–6386, 2001.
- KANG, M.; KIM, H.; LEAL, C. Self-organization of nucleic acids in lipid constructs. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 26, p. 58–65, 2016.
- KESHARWANI, P.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N. K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p. 7138–7150, 2012.
- KIBRIA, G. et al. Dual-ligand modification of PEGylated liposomes shows better cell selectivity and efficient gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 141–148, 2011.
- KLIBANOV, A. L. et al. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. **FEBS Letters**, v. 268, n. 1, p. 235–237, 1990.
- KOOIMAN, K. et al. DSPC or DPPC as main shell component influences ligand distribution and binding area of lipid-coated targeted microbubbles. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 9, p. 1217–1227, 2014.
- LAPINSKI, M. M. et al. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: Rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. **Langmuir**, v. 23, p. 11677–11683, 2007.
- LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 307–321, 1998.
- LASIČ, D. D. A general model of vesicle formation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 124, n. 1, p. 35–41, 1987.
- LEE, C.-Y. et al. Microfluidic mixing: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3263–87, jan. 2011.
- LI, Z. et al. Step-emulsification in a microfluidic device. **Lab Chip**, v. 15, n. 4, p. 1023–1031, 2015.
- LIECHTY, W. B. et al. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, p. 149–73, 2010.

- LIN, H.; CHEN, J.; CHEN, C. A novel technology: microfluidic devices for microbubble ultrasound contrast agent generation. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 54, n. 9, p. 1317–1330, 2016.
- LIN, W. Z. S.; MALMSTADT, N. Liposome production and concurrent loading of drug simulants by microfluidic hydrodynamic focusing. **European Biophysics Journal**, v. 48, n. 6, p. 549–558, 2019.
- LINDNER, J. R. Microbubbles in medical imaging: current applications and future directions. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 527–533, 2004.
- LIU, D. et al. Core/Shell Nanocomposites Produced by Superfast Sequential Microfluidic Nanoprecipitation. **Nano letters**, v. 17, p. 606–614, 2017.
- LU, M. et al. Microfluidic hydrodynamic focusing for synthesis of nanomaterials. **Nano Today**, v. 11, n. 6, p. 778–792, 2016.
- MA, J. et al. Controllable synthesis of functional nanoparticles by microfluidic platforms for biomedical applications-a review. **Lab on a Chip**, v. 17, n. 2, p. 209–226, 2017.
- MAEKI, M. et al. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 128, p. 84–100, 2018.
- MANSOURI, S. et al. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 1–8, jan. 2004.
- MARELLI, U. K. et al. Tumor targeting via integrin ligands. **Frontiers in Oncology**, v. 3 AUG, n. August, p. 1–12, 2013.
- MARRE, S.; JENSEN, K. F. Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 3, p. 1183, 2010.
- MAULUCCI, G. et al. Particle Size Distribution in DMPC Vesicles Solutions Undergoing Different Sonication Times. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 5, p. 3545–3550, 2005.
- MEURE, L. A.; FOSTER, N. R.; DEGHANI, F. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 3, p. 798–809, 2008.
- MICKLER, F. M. et al. Effect of integrin targeting and PEG shielding on polyplex micelle internalization studied by live-cell imaging. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 3, p. 364–373, 2011.

- MIN, Y. et al. Clinical Translation of Nanomedicine. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 11147–11190, 2015.
- MISRA, S. K. et al. Co-liposomes comprising a lipidated multivalent RGD-peptide and a cationic gemini cholesterol induce selective gene transfection in $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ integrin receptor-rich cancer cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 35, p. 5758, 2014.
- MIURA, Y. et al. Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. **ACS Nano**, v. 7, n. 10, p. 8583–8592, 2013.
- MONCK, M. A. et al. Stabilized plasmid-lipid particles: Pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection. **Journal of Drug Targeting**, v. 7, n. 6, p. 439–52, 2000.
- MOREIRA, N. H. et al. Fabrication of a multichannel PDMS/glass analytical microsystem with integrated electrodes for amperometric detection. **Lab Chip**, v. 9, n. 1, p. 115–21, 2009.
- MURA, S.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. **Nature Materials**, v. 12, n. 11, p. 991–1003, 2013.
- MYERS, D. Surfaces, Interfaces and Colloids — Principles and Applications. In: **Surfaces, Interfaces and Colloids - Principles and Applications**. [s.l: s.n.]. p. 179–214.
- N. NISHI, K. KOGA, C. OHSHIMA, K. YAMAMOTO, U. N. AND K. N. Molecular Association in Ethanol-Water Mixtures Studied by Mass Spectrometric Analysis of Clusters Generated through Adiabatic Expansion of Liquid Jets. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 5246–5255, 1988.
- NABIKA, H.; FUKASAWA, A.; MURAKOSHI, K. Control of the structure of self-spreading lipid membrane by changing electrolyte concentration. **Langmuir**, v. 22, n. 26, p. 10927–10931, 2006.
- NIEBERLER, M. et al. Exploring the role of RGD-recognizing integrins in cancer. **Cancers**, v. 9, n. 9, p. 1–33, 2017.
- OLIVEIRA, A. F. et al. Microfluidic tools toward industrial biotechnology. **Biotechnology Progress**, n. Figure 1, 2016.
- OLIVER, J. Colloidal Dispersions, Electrokinetic Effects, and the concept of zeta potential. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 8, 1965.
- PARK, Y. et al. Tunable diacetylene polymerized shell microbubbles as ultrasound

- contrast agents. **Langmuir**, v. 28, n. 8, p. 3766–3772, 2012.
- PENG, Y. et al. Organic Nanocarriers for Delivery and Targeting of Therapeutic Agents for Cancer Treatment. **Advanced Therapeutics**, v. 1900136, p. 1900136, 2020.
- PERLI, G. et al. Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, n. November 2018, p. 233–241, 2019.
- PERRIE, Y.; FREDERIK, P. M.; GREGORIADIS, G. Liposome-mediated DNA vaccination : the effect of vesicle composition. **Vaccine**, v. 19, p. 3301–3310, 2001.
- QIAN, J. et al. A comprehensive review on liquid – liquid two - phase flow in microchannel: flow pattern and mass transfer. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 23, n. 10, p. 1–30, 2019.
- 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, p. 1–8, 2014.
- RAFIQUE, A. et al. Targeted lipid nanoparticle delivery of calcitriol to human monocyte-derived macrophages in vitro and in vivo : investigation of the anti-inflammatory effects of calcitriol. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 2829–2846, 2019.
- RAFTERY, R.; O'BRIEN, F. J.; CRYAN, S.-A. Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5611–47, jan. 2013.
- RAN, R.; MIDDELBERG, A. P. J.; ZHAO, C. Microfluidic synthesis of multifunctional liposomes for tumour targeting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 148, p. 402–410, 2016.
- ROSADA, R. et al. Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. **BMC Immunology**, v. 9, n. 1, p. 38, 2008.
- ROSADA, R. S. et al. Effectiveness , against tuberculosis , of pseudo-ternary complexes : Peptide-DNA-cationic liposome. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 373, p. 102–109, 2012.
- SACKMANN, E. K.; FULTON, A. L.; BEEBE, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 181–189, 13

mar. 2014.

- SAKURAI, Y. et al. RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system. **Journal of Controlled Release**, v. 173, n. 1, p. 110–118, 2014.
- SCHNÜRIGER, B. et al. Prevention of postoperative peritoneal adhesions: A review of the literature. **American Journal of Surgery**, v. 201, n. 1, p. 111–121, 2011.
- SEDIGHI, M. et al. Rapid optimization of liposome characteristics using a combined microfluidics and design-of-experiment approach. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, p. 404–413, 2019.
- SEGRS, T. et al. Stability of Monodisperse Phospholipid-Coated Microbubbles Formed by Flow-Focusing at High Production Rates. **Langmuir**, v. 32, n. 16, p. 3937–3944, 2016a.
- SEGRS, T. et al. Uniform scattering and attenuation of acoustically sorted ultrasound contrast agents : Modeling and experiments. v. 2506, 2016b.
- SEGRS, T. et al. Universal Equations for the Coalescence Probability and Long-Term Size Stability of Phospholipid-Coated Monodisperse Microbubbles Formed by Flow Focusing. **Langmuir**, v. 33, n. 39, p. 10329–10339, 2017.
- SEGRS, T. et al. High-precision acoustic measurements of the non-linear dilatational elasticity of phospholipid coated monodisperse microbubbles. n. October, 2018a.
- SEGRS, T. et al. Monodisperse Versus Polydisperse Ultrasound Contrast Agents: Non-Linear Response, Sensitivity, and Deep Tissue Imaging Potential. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 44, n. 7, p. 1482–1492, 2018b.
- SEGRS, T. et al. Improved coalescence stability of monodisperse phospholipid-coated microbubbles formed by flow-focusing at elevated temperatures. **Lab Chip**, v. 19, p. 158–167, 2019.
- SHIRLEY, J. L. et al. Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. **Molecular Therapy**, v. 28, n. 3, p. 1–14, 2020.
- SOVECHLES, J. M.; WATERS, K. E. Effect of Ionic Strength on Bubble Coalescence in Inorganic Salt and Seawater Solutions. **AIChE Journal**, v. 61, n. 8, p. 2489–2496, 2015.
- SPAIN, S. G. et al. **Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery**. [s.l.] Elsevier, 2011. v. 4
- SQUIRES, T. M.; QUAKE, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale.

- Reviews of Modern Physics**, v. 77, n. 3, p. 977–1026, 2005.
- STREETER, J. E. et al. Improving sensitivity in ultrasound molecular imaging by tailoring contrast agent size distribution: In vivo studies. **Molecular Imaging**, v. 9, n. 2, p. 87–95, 2010.
- STROOCK, A. D. et al. Chaotic mixer for microchannels. **Science**, v. 295, n. 5555, p. 647–51, 2002.
- SUK, J. S. et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 28–51, 2016.
- TABELING, P. A brief introduction to slippage, droplets and mixing in microfluidic systems. **Lab on a Chip**, v. 9, n. 17, p. 2428, 2009.
- TALU, E. et al. Tailoring the size distribution of ultrasound contrast agents: Possible method for improving sensitivity in molecular imaging. **Molecular Imaging**, v. 6, n. 6, p. 384–392, 2007.
- TEMPLETON, N. S. et al. Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 8, 1997.
- TIAN, Y. et al. New aspects of ultrasound-mediated targeted delivery and therapy for cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 401–418, 2020.
- UNGER, E. C. et al. Local drug and gene delivery through microbubbles. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 44, n. 1, p. 45–54, 2001.
- VERWEY, E. J. W.; OVERBEEK, J. T. G. Theory of the stability of lyophobic colloids. **Journal of Colloid Science**, v. 51, n. 3, p. 631–636, 1955.
- WANG, Y. et al. Atomic force microscopy study of forces between a silica sphere and an oxidized silicon wafer in aqueous solutions of NaCl, KCl, and CsCl at concentrations up to saturation. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 5, p. 2113–2120, 2013.
- WEIBEL, D. B.; WHITESIDES, G. M. Applications of microfluidics in chemical biology. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, p. 584–591, 2006.
- WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–373, 27 jul. 2006.
- WIACEK, A. E. Effect of ionic strength on electrokinetic properties of oil/water emulsions with dipalmitoylphosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 302, n. 1–3, p. 141–149, 2007.

- XIANG, Y. et al. Chloride channel-mediated brain glioma targeting of chlorotoxin-modified doxorubicine-loaded liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 152, n. 3, p. 402–410, 2011.
- YANG, F. et al. The ionic strength dependent zeta potential at the surface of hexadecane droplets in water and the corresponding interfacial adsorption of surfactants. **Soft Matter**, v. 13, n. 3, p. 638–646, 2017.
- ZHANG, D.; ZHANG, J. Surface engineering of nanomaterials with phospholipid-polyethylene glycol-derived functional conjugates for molecular imaging and targeted therapy. **Biomaterials**, v. 230, n. November 2019, p. 119646, 2020.
- ZHANG, H.; ZHU, Y.; SHEN, Y. Microfluidics for Cancer Nanomedicine: From Fabrication to Evaluation. **Small**, v. 14, p. 1–25, 2018.
- ZHAO, Z. et al. Dual-active targeting liposomes drug delivery system for bone metastatic breast cancer: Synthesis and biological evaluation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 223, n. April, p. 104785, 2019.
- ZHOU, L. Q. et al. Ultrasound nanotheranostics in fighting cancer: Advances and prospects. **Cancer Letters**, v. 470, n. 1095, p. 204–219, 2020.
- ZHOU, Z. et al. Peptide targeted tripod macrocyclic Gd(III) chelates for cancer molecular MRI. **Biomaterials**, v. 34, n. 31, p. 7683–7693, 2013.
- ZIZZARI, A. et al. Continuous-flow production of injectable liposomes via a microfluidic approach. **Materials**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2017.

APÊNDICE I – Estudos exploratórios para síntese do lipídeo DSPE-PEG-cRGDfk para formação de lipossomas para liberação gênica direcionada

1. Introdução

Nanocarreadores funcionalizados são estratégias amplamente exploradas na área da nanotecnologia visando aplicações em diagnóstico e terapia com precisão (ZHANG; ZHANG, 2020). Modificações de superfície, como emprego de polietilenoglicol (PEG), são estratégias interessantes para estabilizar e blindar nanocarreadores frente a células do sistema mononuclear fagocitário, proporcionando o acúmulo nas células e órgãos-alvo e favorecendo a internalização e processamento do material carregado pelas células (SUK et al., 2016). Mais especificamente, a inclusão de funcionalidades adicionais à superfície destes carreadores, como o direcionamento sítio-específico, possibilita que fármacos e genes sejam eficientemente entregues para células-alvo (JO et al., 2016).

Nanocarreadores compostos por fosfolipídeos PEGuilados ou apresentando um revestimento destes, possibilitam diferentes funcionalizações superficiais para as mais diversas aplicações. Como apresentado na Figura I.1, diferentes protocolos derivatização são reportados na literatura para funcionalização com peptídeos, anticorpos, proteínas e pequenas moléculas (ZHANG; ZHANG, 2020)

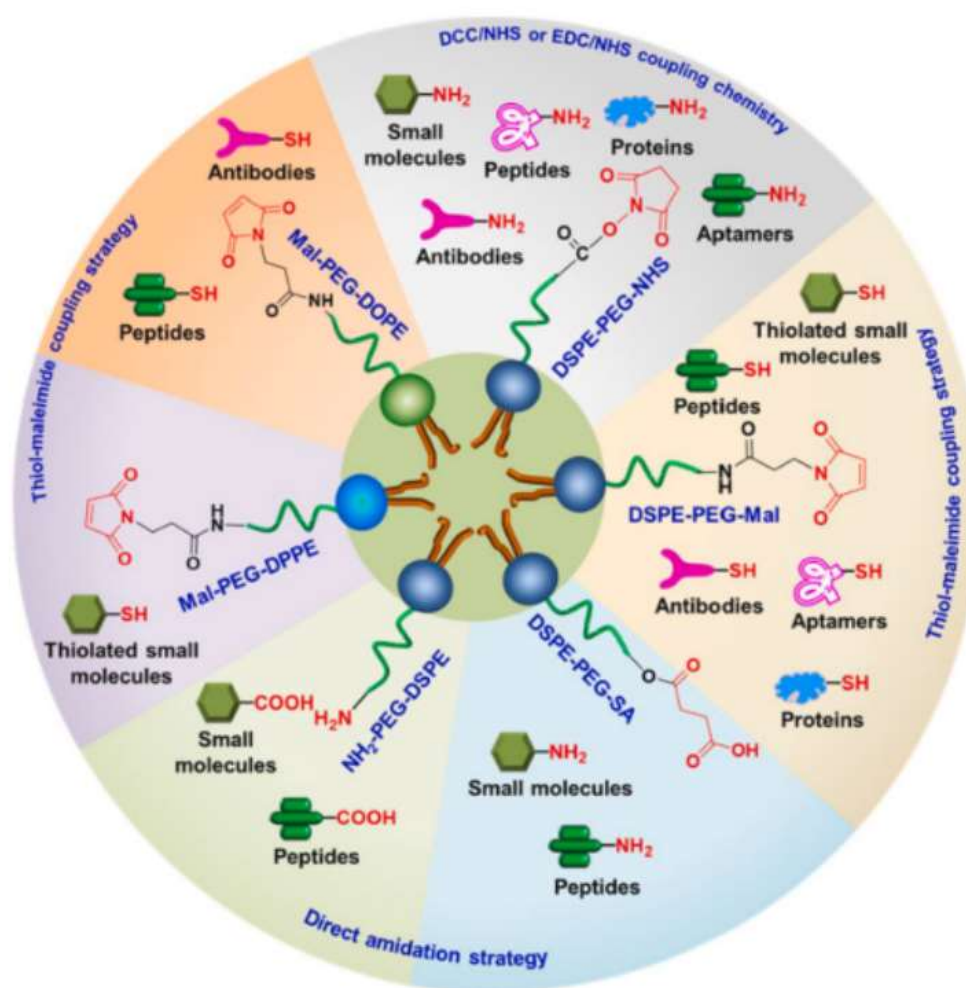


Figura I.1. Possíveis rotas para síntese de fosfolípidos funcionalizados.
Fonte: Zhang (2020)

Dentre as diversas interações moleculares que podem mediar a adesão celular, muitos estudos empregam peptídeos que ativam o conjunto de receptores de superfície celular de integrinas, especialmente os baseados na sequência dos três aminoácidos: arginina, glicina e aspartato (RGD) (MARELLI et al., 2013; NIEBERLER et al., 2017). As integrinas $\alpha_v\beta_3$ são seletivamente expressas em diversas células tumorais e endoteliais, que constituem vasos sanguíneos tumorais, e são os receptores predominantes dos peptídeos RGD (HUANG et al., 2015). Como os receptores de integrinas reconhecem o RGD como sequência primária (Figura I.2) (embora outras conformações possam modular esta afinidade, como peptídeos cíclicos e lineares, por exemplo), torna-se possível a entrega gênica sítio-específica (*targeted delivery*), resultando em transfecções *in vitro* e *in vivo* mais eficientes (GUO et al., 2014). De fato, carreadores de siRNA ancorados com o peptídeo RGD

se mostraram eficientes no silenciamento de genes em ensaios de transfecção *in vitro* e *in vivo* para tratamento de células endoteliais tumorais (HUANG et al., 2015).

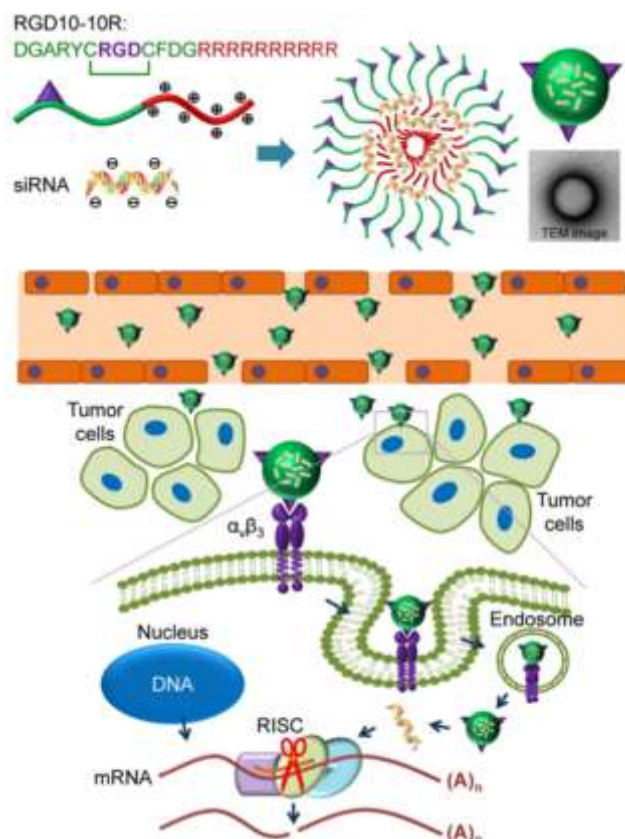


Figura 1.2. Esquema representando complexos funcionalizados para a entrega de siRNA. A sequência peptídica RGD favorece interações específicas com os receptores celulares da família das integrinas, sendo os receptores $\alpha_v\beta_3$ geralmente recorrentes em células tumorais. Assim, os complexos são internalizados pelas células por endocitose mediada pelos receptores $\alpha_v\beta_3$, proporcionando a liberação do siRNA do endossoma/lisossoma e uma eficiente modulação da expressão gênica. Fonte: Huang et al. (2015)

Na literatura, estão descritos alguns protocolos para a derivatização química de lipídeos com o peptídeo cRGD, sendo a utilização de lipídeos PEGuilados com terminais reativos de succinimidil-éster (NHS) um dos protocolos mais reportados (IDEN; ALLEN, 2001). Essa modificação de superfície reportou a maximização das interações lipossoma-célula através de receptores celulares integrinas $\alpha_v\beta_3$, assim como a internalização desses nanocarreadores pelas células, e, a partir de ensaios *in vivo*, o peptídeo cRGD se mostrou eficiente no direcionamento terapêutico às células tumorais melanoma B16 (GUO et al., 2014).

Tendo isso em vista, este trabalho visou continuar o estudo da formação de lipossomas catiônicos *stealth* (SCL) em dispositivos microfluídicos, para desenvolvimento de sistemas não-virais de liberação gênica, agora visando a

formação de nanocarreadores com entrega direcionada (*targeted delivery*). Neste, foi explorada a derivatização química do lipídeo PEGuilado com o peptídeo cRGDfK (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys), mais especificamente, para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos para funcionalização superficial de SCL com peptídeo cíclico cRGD.

2. Material e métodos

2.1. Material

Lipossomas catiônicos (CL) foram produzidos utilizando 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DOPE), fosfatidilcolina natural de ovo (EPC) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP), adquiridos da Lipoid (Alemanha). O fosfolipídeo 1,2-diestearil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE) derivatizado com polietilenoglicol (PEG) (MW 2000) com o reagente N-hidroxissuccinimida (NHS) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (EUA). Empregou-se o peptídeo de RGD (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) cíclico da Peptides International (EUA). Tampão fosfato salino (PBS) foi adquirido da Laborclin. Peneira molecular de 3-Å 8-12 mesh, Etanol, Ácido esteárico e Pluronic F68 foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

2.2. Métodos

2.2.1. Derivatização do lipídeo DSPE-PEG-NHS com peptídeo cRGDfK

Para realizar a derivatização química de conjugação do peptídeo, testaram-se duas metodologias. Primeiramente, seguindo metodologia reportada na literatura (KIBRIA et al., 2011; SAKURAI et al., 2014), o lipídeo DSPE-PEG₂₀₀₀ foi incubado com o lipídeo reativo DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS (proporção 3:1), dissolvidos em clorofórmio, em dessecador a vácuo por 12h, para formação de um filme seco. Em seguida, o filme seco foi hidratado em tampão fosfato salino (PBS), o peptídeo cRGDfK foi incubado e a reação foi submetida à agitação por 12h. A solução foi então submetida à centrifugação a 12000 rpm (16260 ×G) por 30 min em membrana com massa molar de corte de 3000 Da (Merck Millipore) para reter o produto derivatizado e separar os peptídeos e lipídeos não conjugados. A caracterização foi

realizada pela técnica de espectrometria de massas de ionização por eletrospray (ESI) com detecção por analisador do tipo tempo de voo (TOF) (ESI(+)-TOF-MS).

Como método alternativo, reportado por Guo et al. (2014), o peptídeo cRGDfK foi dissolvido em dimetilformamida (DMF) e o lipídeo DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS foi adicionado na proporção de (2:1). O pH da solução foi ajustado para 8 usando trietilamina e a reação foi deixada por 120 h (5 dias) a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a amostra foi dialisada em água deionizada utilizando sacos de diálise com membranas de MWCO de 3500 Da (Spectrum Labs, EUA), à temperatura ambiente durante 48 h. Por fim, a solução foi liofilizada e armazenada em freezer a -20 °C. A caracterização foi realizada pela técnica de espectrometria de massas com ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI) e detecção por analisador do tipo tempo de voo (TOF) (ESI(+)-TOF-MS).

3. Resultados

3.1 Derivatização química de lipídeo DSPE-PEG com peptídeo cíclico cRGD

A partir dos conhecimentos adquiridos para a síntese de SCL em processos microfluídicos com aumento da força iônica, visou-se explorar a produção de lipossomas para entrega gênica direcionada para células tumorais metastáticas considerando a funcionalização do SCL com peptídeos cRGDfK (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys), os quais são ativam receptores de superfície celular de integrinas expressos em células tumorais (HUANG et al., 2015).

Para isso, previamente, foram realizados ensaios de derivatização química do lipídeo DSPE-PEG₂₀₀₀ com o peptídeo cRGDfK, baseando-se no emprego de um lipídeo conjugado a um terminal reativo de succinimidil (NHS) (Figura I.3).

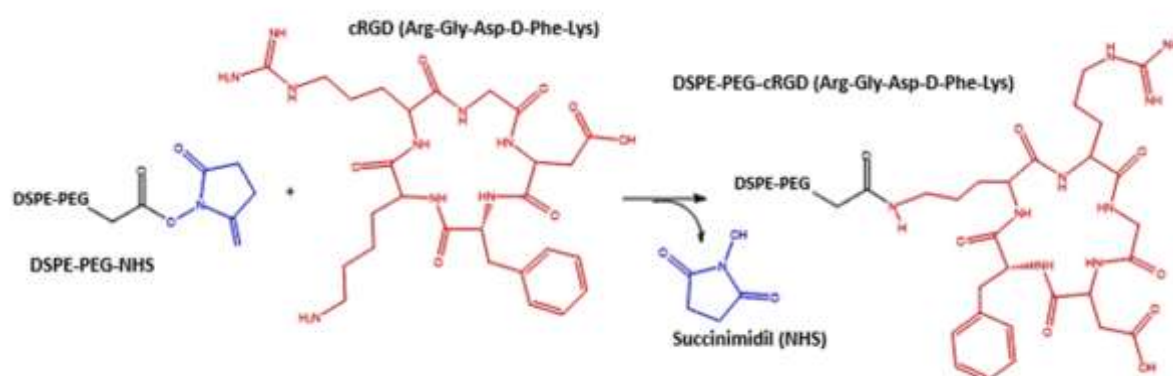


Figura 1.3. Esquema da reação de derivatização do lipídeo (DSPE) funcionalizado com polietilenoglicol (PEG) e succinimidil (NHS), sendo derivatizado com o peptídeo RGD cíclico (cRGD).

Segundo a metodologia já estabelecida na literatura (KIBRIA et al., 2011; SAKURAI et al., 2014), empregou-se o terminal reativo NHS para favorecer sua substituição mediada por uma adição nucleofílica de uma amina (cadeia lateral da lisina). O terminal NHS é comumente utilizado como reagente ativador de ácidos carboxílicos. A partir disso, seria formado um lipídeo DSPE-PEG-cRGD de massa molar em torno de 3000 Da, partindo de um composto (DSPE-PEG-NHS) de 2600 Da. Após separação da amostra por centrifugação, utilizando uma membrana com corte de 3500 Da, o retentado foi analisado por espectrometria de massas com ionização por electrospray e analisador por tempo de voo (*time-of-flight*) (ESI-TOF-MS) (Figura 1.4).

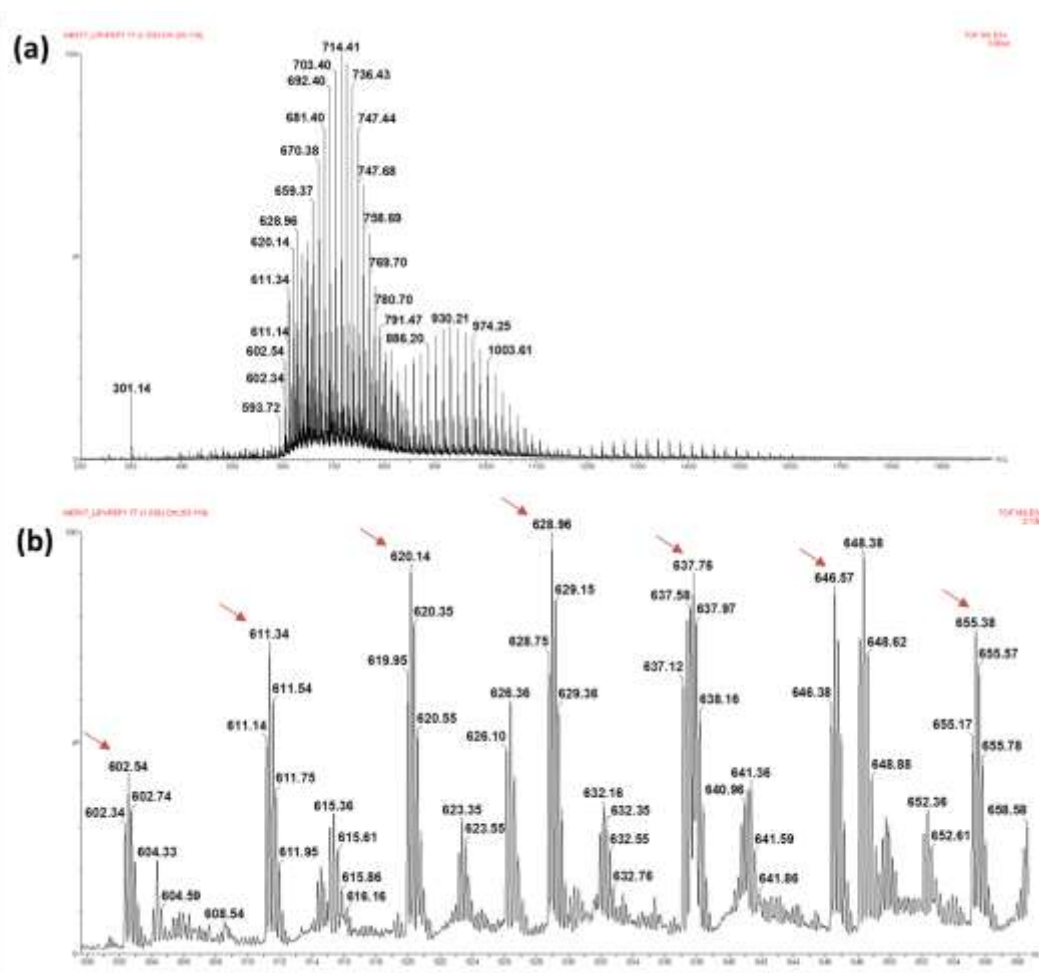


Figura 1.4. Espectros de massas (ESI-TOF-MS) do lipídeo DSPE-PEG derivatizado com cRGD. (a) Espectro total. (b) Distribuição ampliada, na qual as setas vermelhas indicam lipídeo derivatizado DSPE-PEG-cRGD, com intervalos de m/z igual a 5.

Como é possível observar pelo espectro total da amostra de lipídeo derivatizado (Figura 1.4a), a amostra apresentou uma distribuição típica para amostras contendo cadeias poliméricas, como o PEG. As massas molares predominantes representam em sua maioria o lipídeo reativo (DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS) inicial (Figura 1.4a), enquanto as massas molares correspondentes ao lipídeo derivatizado (DSPE-PEG-cRGD) apareceram em menores proporções (Figura 1.4b). Esses resultados mostram que a reação foi bem sucedida em proporcionar a derivatização do lipídeo DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figura 1.4b). Porém, além do processo de separação por membrana não ter sido suficiente para proporcionar a separação do lipídeo reativo, a análise de ESI-TOF-MS demonstrou que não foi possível obter um elevado rendimento a partir do método utilizado para reação.

Baseando-se em estudos anteriores, a reação de derivatização foi realizada novamente, ampliando o tempo de reação de 24 h para 120 h (XIANG et al., 2011),

para proporcionar um maior tempo de contato entre as moléculas e favorecer um maior rendimento de reação. Além disso, a separação entre os lipídeos reativo e derivatizado foi realizada através de diálise em membrana com MWCO de 3,5 kDa. Por fim, a amostra foi liofilizada e armazenada em freezer.

A caracterização da amostra foi, então, realizada por espectrometria de massas com ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e analisador de tempo de voo (TOF). A Figura 1.5a apresenta o espectro de massas com as massas monoisotópicas obtidas para a amostra caracterizada. No entanto, não foi possível observar a presença de massa de aproximadamente 3400 Da correspondente ao lipídeo derivatizado. A reação foi realizada novamente, porém, o processo não se mostrou reprodutível e não foi bem-sucedida para formação do lipídeo DSPE-PEG-cRGD.

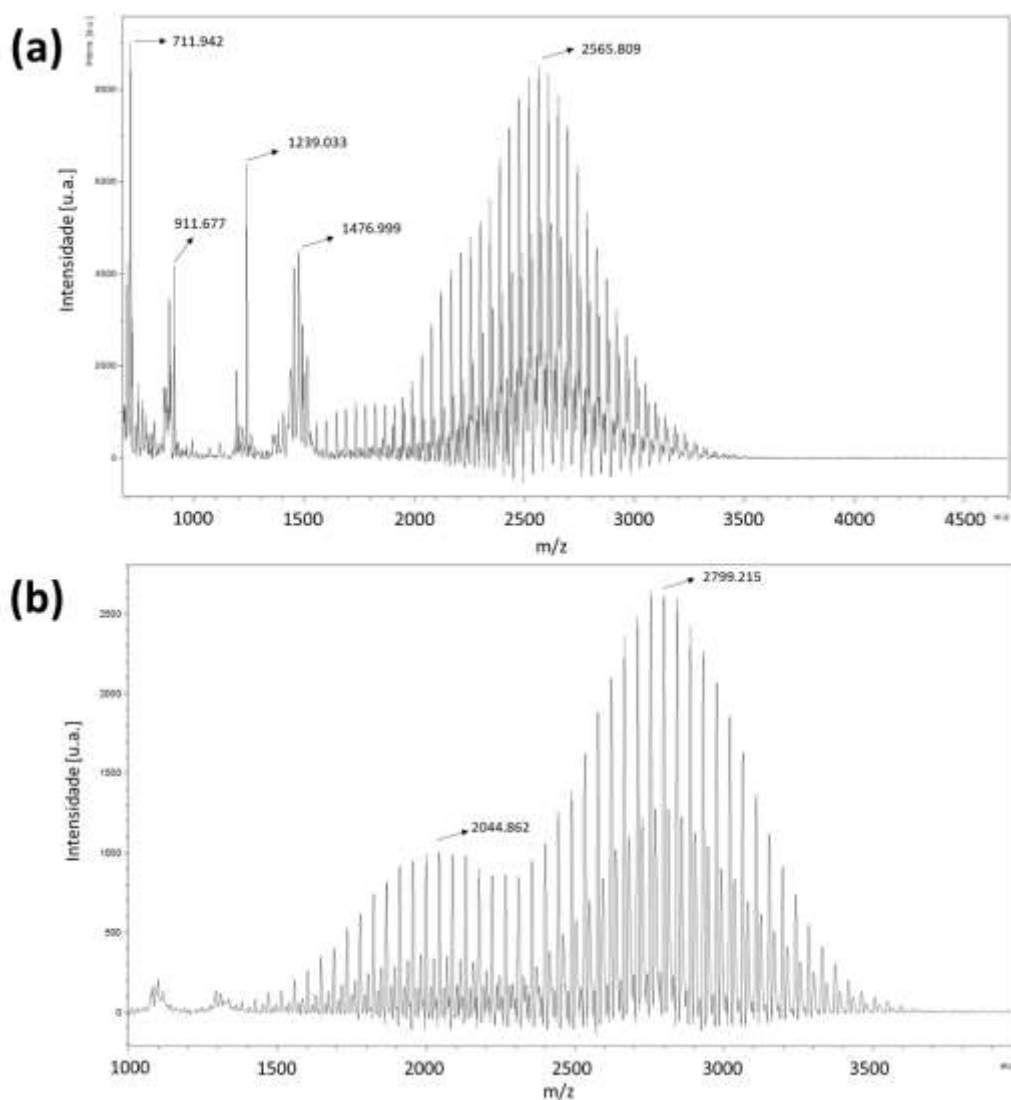


Figura 1.5. Espectro de Massas (MALDI-TOF-MS) do lipídeo DSPE-PEG após derivatização com o peptídeo cRGDfK (a) utilizando o primeiro método em PBS e (b) o segundo método, em solvente dimetilformamida.

Como alternativa, um novo protocolo de derivatização utilizando o lipídeo DSPE-PEG₂₀₀₀-NHS foi avaliado (GUO et al., 2014). A reação com o peptídeo cRGDfK foi mantida por 120 h em solvente dimetilformamida (DMF), liofilizada e analisada por MALDI-TOF-MS. A Figura 1.5b apresenta o espectro de massas com as massas monoisotópicas obtidas para a amostra caracterizada. Do mesmo modo, é possível observar a distribuição típica para a cadeia polimérica do PEG e a presença de picos de massa molar correspondente aos lipídeos PEGuilados (DSPE-PEG-NHS). Porém, não há indícios da derivatização química do lipídeo DSPE-PEG-cRGD de massa molar próxima de 3400 Da.

Vale ressaltar que para ambos as análises de MS (Figura 1.5a-b) não foi possível identificar o pico referente ao lipídeo DSPE-PEG funcionalizado com o

terminal reativo NHS, que apresenta massa molar de 2858 Da. Provavelmente, a integridade dos reagentes poderia estar comprometida, previamente à reação química, impossibilitando o acoplamento do peptídeo cRGDfK.

Dessa forma, os protocolos de derivatização investigados neste trabalho não se mostraram eficazes para a obtenção do lipídeo DSPE-PEG funcionalizado com peptídeo cRGDfK. Novas alternativas ainda podem ser exploradas, tendo em vista a importância do desenvolvimento de plataformas para liberação sítio-específica de fármacos e genes para tratamento ou diagnóstico das mais diversas doenças no campo da nanomedicina.

4. Conclusões Parciais

Os protocolos de derivatização investigados neste trabalho para a síntese de lipossomas de terceira geração, apresentando peptídeos cRGD ancorados na superfície de SCL para entrega gênica direcionada (targeted delivery), não se mostraram eficazes. Provavelmente, a integridade dos reagentes poderia estar comprometida, visto que nas últimas análises de MS não foi possível verificar a massa referente ao lipídeo DSPE-PEG funcionalizado com o terminal reativo NHS. Dessa forma, novas alternativas podem ainda ser exploradas no âmbito deste trabalho para formação dos lipossomas de terceira geração.

Após a otimização do processo de produção de lipossomas funcionalizados com PEG (SCL) em microcanais, como apresentado no capítulo 3 desta tese, torna-se possível explorar a síntese microfluídica de lipossomas incorporando o lipídeo DSPE-PEG-cRGD para fins terapêuticos como nanocarreadores especializados para terapia de câncer. Assim, podem ser definidas as condições de obtenção de nanocarreador e complexação que se mostrar mais apropriado para aplicações em terapia e vacinação gênica.

ANEXO I – Depósito de Patente Nacional (2017)



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 025862 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 46068425000133

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz

Cidade: Campinas

Estado: SP

CEP: 13084-971

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: patentes@inova.unicamp.br

ANEXO II – Artigo Publicado na Revista Científica *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2019)

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 179 (2019) 233–241



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb



Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices



Gabriel Perli^{a,1}, Amanda C.S.N. Pessoa^{b,1}, Tiago A. Balbino^c, Lucimara G. de la Torre^{b,*}

^a University of Campinas, UNICAMP, Institute of Chemistry, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^b University of Campinas, UNICAMP, School of Chemical Engineering, PO BOX 6066, 13086-090, Campinas, SP, Brazil

^c Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ/COPPE, Nanotechnology Engineering Program, 21.941-972, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Stealth liposomes
Microfluidics
Hydrodynamic flow-focusing
Ionic strength
Lipid self-assembly
Micelles
PEG
Diffusion-based mass transfer

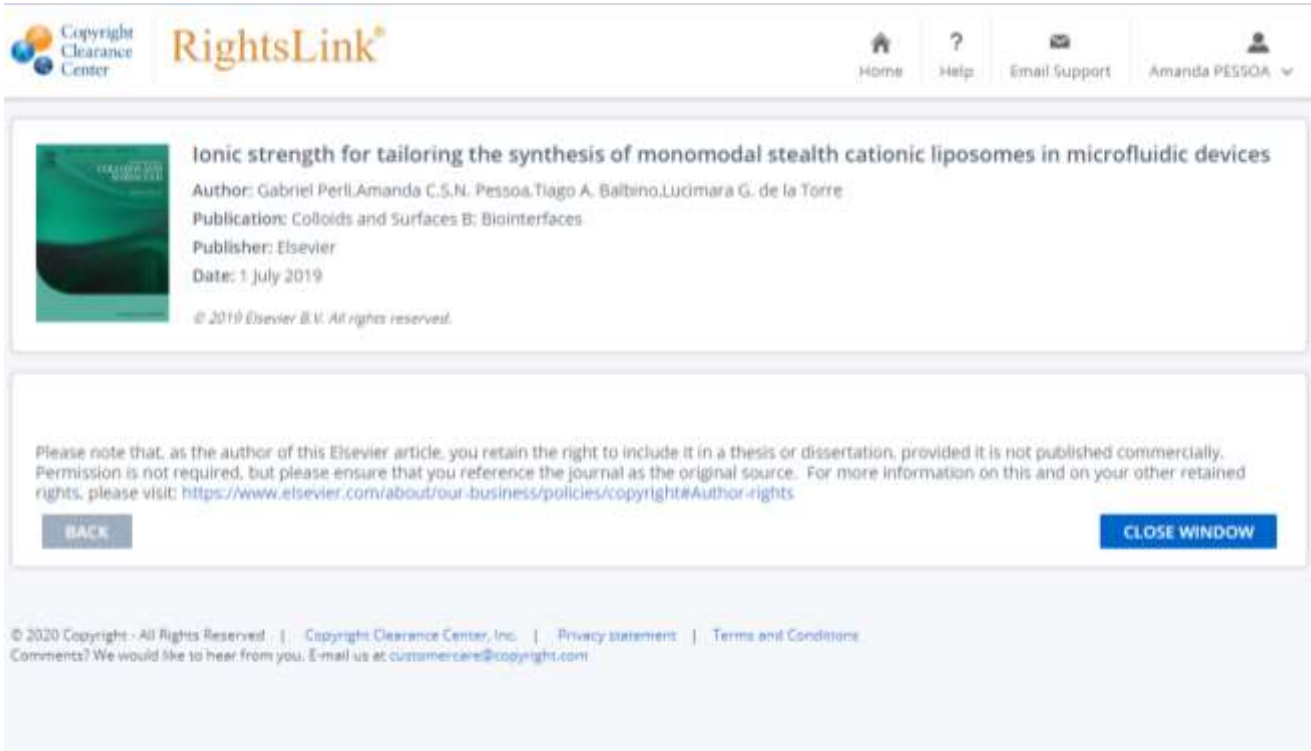
ABSTRACT

In this work, we describe a hydrodynamic flow-focusing microfluidic process to produce stealth cationic liposomes (SCL), stabilized with poly(ethylene glycol) (PEG), with uniform and reproducible features. Through cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) characterization and real-time monitoring, we verified the formation of multi-sized lipid self-aggregates, which can be attributed to micelles formation. These structures tend to undergo deposition within the PDMS/glass microchannels through intermolecular interactions with the glass walls, hindering not only the process reproducibility but also the final biological application of the SCL products. In view of this, we propose the modulation of ionic strength of the side streams aiming to ionically shield the glass surface, decrease the intermolecular interactions of the lipid polar heads, and, essentially, to promote the bilayer-driven self-assembly of SCL with 1% of DSPE-PEG₂₀₀₀ lipid. Herein, we applied phosphate-buffered saline (PBS) from 10 to 50 mM concentration as side streams, and evaluated its effects on SCL final physicochemical properties in terms of size distribution, mean diameter, zeta potential and polydispersity index (PDI). We present evidences indicating that the ionic strength can be used as a microfluidic process parameter to modulate the lipids self-assembly kinetics whilst preventing micelles formation. Finally, the proposed diffusion-based microfluidic system with high ionic strength enables the formation of monodisperse (PDI < 0.2) SCL of around 140 nm with monomodal size distributions and enhanced properties when compared to usual bulk mixing.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.056>

ANEXO III – Licença de publicação de artigo na tese

O editor Elsevier, referente ao artigo publicado na revista *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 179 (2019) 233-241, reforça que não há necessidade de solicitar uma autorização para o autor publicar o artigo completo na tese de doutorado.



The screenshot displays the RightsLink interface. At the top left, there are logos for the Copyright Clearance Center and RightsLink. The top right navigation bar includes links for Home, Help, Email Support, and a user profile for Amanda PESSOA. The main content area features a green article cover on the left and the following text on the right:

Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices
 Author: Gabriel Peril, Amanda C.S.N. Pessoa, Tiago A. Balbino, Lucimara G. de la Torre
 Publication: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces
 Publisher: Elsevier
 Date: 1 July 2019
 © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Below this, a notice states: "Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>".

At the bottom of the notice area, there are two buttons: "BACK" and "CLOSE WINDOW".

The footer contains the following text: "© 2020 Copyright - All Rights Reserved. | Copyright Clearance Center, Inc. | Privacy statement | Terms and Conditions. Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customerscare@copyright.com".

ANEXO IV – Capítulo aceito para publicação no livro “DNA Vaccines: Methods and Protocols” (previsto para 2020)

Consent to Publish

Title of Book/Volume/Conference: DNA Vaccines: Methods and Protocols (hereinafter the “Work”)

Editor(s) name(s): Ângela Sousa, PhD (hereinafter the “Editor”)

Title of Contribution: Bulk and microfluidic synthesis of stealth and cationic-liposomes for gene delivery applications (hereinafter the “Contribution”)

Author(s) full name(s): Lucimara Gaziola de la Torre, Amanda da Costa e Silva de Noronha Pessoa, Bruna Gregatti de Carvalho, Thiago Bezerra Taketa, Ismail Es, Gabriel Perli (hereinafter the “Author”)

Corresponding Author’s name, address, affiliation and e-mail: Itorre@unicamp.br

When Author is more than one person the expression “Author” as used in this agreement will apply collectively unless otherwise indicated.

The Publisher intends to publish the Work under the imprint **Springer**. The Work may be published in the book series [**Methods in Molecular Biology**].

§ 1 Rights Granted

Author hereby grants and assigns to **Springer Science+Business Media, LLC** (hereinafter the “Publisher”) the exclusive, sole, permanent, world-wide, transferable, sub-licensable and unlimited right to reproduce, publish, distribute, transmit, make available or otherwise communicate to the public, translate, publicly perform, archive, store, lease or lend and sell the Contribution or parts thereof individually or together with other works in any language, in all revisions and versions (including soft cover, book club and collected editions, anthologies, advance printing, reprints or print to order, microfilm editions, audiograms and videograms), in all forms and media of expression including in electronic form (including