



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

BRUNO TELLI CECCATO

**MICROFLUÍDICA 3D PARA A SÍNTESE DE ALTA PRODUTIVIDADE DE
LIPOSSOMAS *STEALTH* E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS VISANDO A
TERAPIA E VACINAÇÃO GÊNICAS**

***STEALTH LIPOSOMES AND LIPID NANOPARTICLES SYNTHESIS VIA HIGH
PRODUCTIVITY 3D MICROFLUIDICS AIMING GENE THERAPY AND
VACCINATION***

CAMPINAS

2022

BRUNO TELLI CECCATO

**MICROFLUÍDICA 3D PARA A SÍNTESE DE ALTA PRODUTIVIDADE DE
LIPOSSOMAS *STEALTH* E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS VISANDO A
TERAPIA E VACINAÇÃO GÊNICAS**

***STEALTH LIPOSOMES AND LIPID NANOPARTICLES SYNTHESIS VIA HIGH
PRODUCTIVITY 3D MICROFLUIDICS AIMING GENE THERAPY AND
VACCINATION***

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

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Lucimara Gaziola de La Torre.

Coorientador: Prof. Dr. Sávio Souza Venâncio Vianna.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO BRUNO TELLI CECCATO, E ORIENTADO PELA PROF^a.
DR^a. LUCIMARA GAZIOLA DE LA TORRE.

CAMPINAS

2022

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

C322m Ceccato, Bruno Telli, 1997-
Microfluídica 3D para a síntese de alta produtividade de lipossomas stealth e nanopartículas lipídicas visando a terapia e vacinação gênicas / Bruno Telli Ceccato. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Lucimara Gaziola de la Torre.

Coorientador: Sávio Souza Venâncio Vianna.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microfluídica. 2. Nanopartículas lipídicas. 3. Simulação computacional. 4. Terapia gênica. I. Torre, Lucimara Gaziola de la, 1971-. II. Vianna, Sávio Souza Venâncio, 1975-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Stealth liposomes and lipid nanoparticles synthesis via high productivity 3D microfluidics aiming gene therapy and vaccination

Palavras-chave em inglês:

Microfluidics

Lipid nanoparticles

Computational simulation

Gene therapy

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Lucimara Gaziola de La Torre

Harrison Silva Santana

Adriano Rodrigues Azzoni

Data de defesa: 24-02-2022

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

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

- ORCID do autor: 0000-0002-1414-8511

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1889369414162671>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Folha de Aprovação da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **BRUNO TELLI CECCATO**, aprovada em 24 de fevereiro de 2022 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre - Presidente e Orientadora
FEQ/ UNICAMP
Videoconferência

Dr. Harrson Silva Santana
FEQ/ UNICAMP
Videoconferência

Prof. Dr. Adriano Rodrigues Azzoni
Escola Politécnica/ USP
Videoconferência

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

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bolsa processo nº 130575/2020-8. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a todos os colegas e amigos do laboratório que me ajudaram a contornar muitas dificuldades ao longo desta jornada, especialmente os colegas Marcel Franco Mougnot, Gabriela Gomes da Silva, Priscilla Cibelle Oliveira Souza Firmino, Bruna Gregatti de Carvalho, Daniel Pereira Sacomani, Franciele Flores Vit e Ricardo Buffo Pereira.

Também agradeço ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, especialmente à Dra. Marianna Favaro pelos ensaios de transfecção, ao Instituto de Biologia da Unicamp, especialmente Francisco Breno Teófilo, e também ao Gilson Barbosa Maia Júnior, ambos por ceder equipamentos importantes para o desenvolvimento do projeto. Por fim, agradeço ao Antonio Carlos Borges e o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pelas análises de cryo-TEM.

E por fim, não poderia deixar de agradecer os meus familiares e parentes próximos que me deram muito suporte ao longo de todo o projeto. Sem eles essa realização não seria possível. Agradeço muito aos meus amigos por todo o apoio, em especial ao Fabio Henrique Bastiani, que esteve ao lado acompanhando e me ajudando em momentos de dificuldade. Não poderia finalizar sem agradecer muito à minha orientadora Dr^a. Lucimara Gaziola de La Torre, que além de toda orientação fundamental ao desenvolvimento do projeto e do processo de aprendizagem, também foi muito compreensível e me deu todo apoio e suporte para que eu pudesse realizar o projeto da melhor maneira possível, mesmo em pandemia. E claro, agradeço também ao meu coorientador Dr. Sávio Souza Venâncio Vianna por todo apoio e suporte na simulação computacional, que foi parte integrante e fundamental para consolidar os conceitos práticos e teóricos, parte esta muito satisfatória de poder ter trabalhado.

RESUMO

A demanda por vacinas e medicamentos para o combate de doenças impulsiona a busca por novas tecnologias na área de nanobiotecnologia, como é o caso recente da corrida para a vacina da COVID-19. Nesse sentido, a terapia e vacinação gênicas emergem como potenciais ferramentas de combate. No entanto, um dos maiores obstáculos para o sucesso desta técnica consiste em entregar eficientemente o material genético (DNA/RNA) nas células-alvo. Para contornar esse problema, nanocarreadores não virais podem ser explorados. Dentre eles, lipossomas catiônicos e nanopartículas lipídicas se destacam como potenciais veículos de sistema de entrega de fármacos. A produção dessas nanoestruturas em sistemas microfluídicos operando em regime laminar permite se obter um melhor controle da mistura e das variáveis do processo, em comparação com os métodos convencionais *bulk* de produção. Porém, sistemas microfluídicos à base de difusão possuem baixa produtividade. Com o intuito de explorar o aumento de produtividade, a advecção caótica pode ser empregada, mas ainda requer compreensão do processo de formação destas nanoestruturas. Para auxiliar na compreensão da fluidodinâmica e do processo de mistura nos canais microfluídicos, simulações computacionais podem ser desenvolvidas, como o estudo de fluidodinâmica computacional (CFD). Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa realizou o estudo de CFD e investigou a síntese de lipossomas em dispositivo microfluídico 3D de alta vazão (HFR-MD). No entanto, não foi analisada a potencial aplicação deste dispositivo na síntese de lipoplexos e nanopartículas lipídicas (LNPs). Baseado nisso, este projeto visa a incorporação de material genético (pDNA) em sistemas lipídicos (lipoplexos e LNPs) através do estudo de CFD e aplicação de técnica microfluídica de advecção caótica no dispositivo HFR-MD, visando contribuições na área da medicina. Para tal, investigou-se a melhor configuração de malha que pudesse fornecer a simulação computacional mais precisa. Dessa maneira, a análise de CFD permitiu antever o padrão de mistura e as condições de advecção caótica nas diferentes vazões testadas, que posteriormente serviu de apoio para a otimização das melhores condições de processo para a síntese das nanoestruturas. Foi observado que para a síntese de lipossomas catiônicos e *stealth*, apesar da advecção caótica melhorar as propriedades de diâmetro hidrodinâmico médio (tamanho) e polidispersão (PDI) das nanoestruturas, ela não se mostrou fundamental, pois a incorporação do lipídio PEGlado foi possível mesmo sem advecção caótica. Além disso, investigação entre o uso de água pura e tampão PBS na fase aquosa mostrou que a água pura foi mais eficaz na síntese adequada de lipossomas. Já para lipoplexos e LNPs, a advecção caótica em alta vazão se mostrou fundamental para evitar a formação de microagregados no

canal e fornecer propriedades físico-químicas ótimas para aplicações. Além disso, a presença de uma barreira difusiva mostrou ser benéfica na formação de complexos pDNA/lipídios. Estudos de morfologia apontaram estruturas majoritariamente unilamelares para os lipossomas e lipoplexos *stealth*, estruturas mistas para lipoplexos catiônicos e possível núcleo denso de elétrons para LNPs. Por fim, teste *in vitro* realizado em colaboração com o Instituto de Ciências Biomédicas da USP apontou maior eficiência de transfecção para as LNPs, o que condiz com a literatura, porém sem relatar diferenças estatísticas com os lipoplexos. Como contribuição deste trabalho, a validação do dispositivo HFR-MD na síntese de nanoestruturas complexas em condições de alta produtividade infere seu potencial uso para futuras investigações de LNPs com lipídios ionizáveis de última geração, bem como aplicações *in vivo* visando a produção de vacinas gênicas e aumento de escala.

Palavras chave: microfluídica, nanopartículas lipídicas, simulação computacional, terapia gênica.

ABSTRACT

The demand for vaccines and medicines to fight diseases drives the search for new technologies in nanobiotechnology, as it is the recent case of the race for the immunization of COVID-19. In this sense, gene therapy and vaccination emerge as potential combat tools. However, one of the greatest obstacles to this technique's success lies in efficiently delivering the genetic material (DNA/RNA) to the target cells. To overcome this problem, non-viral nanocarrier vehicles can be explored. Cationic liposomes and lipid nanoparticles stand out as potential vehicles for drug delivery systems. The production of these nanostructures in microfluidic systems operating in a laminar flow enables better control over the mixture and over the process variables compared to the conventional bulk production methods. However, diffusion-based microfluidic systems have low productivity. To explore the increase in productivity, the chaotic advection can be employed, but it still requires a comprehension of the formation process of these nanostructures. To help the fluid dynamics and the mixing process comprehension in microfluidic channels, computational simulations can be developed, such as the study of computational fluid dynamics (CFD). In this context, our research group carried out the CFD study and investigated the synthesis of liposomes in a high flow rate 3D microfluidic device (HFR-MD). However, the potential application of this device in the synthesis of lipoplexes and lipid nanoparticles (LNPs) was not analyzed. Based on that, this project aims to incorporate genetic material (pDNA) into lipid systems (lipoplexes and LNPs) by CFD study and application of chaotic advection microfluidic technique in HFR-MD, aiming contributions in the field of medicine. For this, the best mesh configuration that could provide the most accurate computational simulation was investigated. In this way, the CFD analysis allowed the prediction of the mixing pattern and the chaotic advection conditions in the different flow rates tested, which later served as support for optimization of the best process conditions to synthesize nanostructures. It was observed that for the synthesis of cationic and stealth liposomes, despite the chaotic advection improvements in the hydrodynamic mean diameter (size) and polydispersity (PDI) properties of the nanostructures, it was not fundamental, since the incorporation of the PEGlated lipid was possible even without chaotic advection. Furthermore, investigation between the use of pure water and PBS buffer in the aqueous phase showed that pure water was more effective in the proper synthesis of liposomes. For lipoplexes and LNPs, high flow chaotic advection proved to be fundamental to avoid the formation of microaggregates in the channel and provide optimal physicochemical properties for applications. Furthermore, the presence of a diffusive barrier was shown to be beneficial in the

formation of pDNA/lipid complexes. Morphology studies showed mostly unilamellar structures for liposomes and stealth lipoplexes, mixed structures for cationic lipoplexes and possible electron dense core for LNPs. Finally, in vitro test carried out in collaboration with Instituto de Ciências Biomédicas of USP showed greater transfection efficiency for LNPs, which is consistent with literature, however, without reporting statistical differences with lipoplexes. As a contribution of this work, the validation of HFR-MD for the synthesis of complex nanostructures under high throughput conditions infers its potential use for future investigations of LNPs with ionizable lipids, as well as in vivo applications aiming the production of gene vaccines and scale-up.

Keywords: microfluidics, lipid nanoparticles, computational simulation, gene therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama esquemático básico da formação do lipossoma	26
Figura 2 - Ilustração de complexação entre lipídios catiônicos e material genético	27
Figura 3 - Representação do PEG na superfície do lipossoma.....	27
Figura 4 - Estrutura geral de uma SLN (A) e um NLC (B).....	28
Figura 5 - Representações esquemáticas de um lipoplexo multilamelar (A) e uma LNP (B)..	29
Figura 6 - Representação esquemática do procedimento de injeção de etanol	34
Figura 7 - Representação esquemática da formação de lipossomas em dispositivos microfluídicos.....	41
Figura 8 - Dispositivos microfluídicos com foco hidrodinâmico.....	42
Figura 9 - Fluxo secundário em canais curvos para geração de advecção caótica.....	43
Figura 10 - Ilustração esquemática de um dispositivo SHM.....	44
Figura 11 - Esquema do dispositivo microfluídico para montagem contínua de lipoplexo com pDNA	45
Figura 12 - Estratégia de formulação de LNPs com pDNA.....	47
Figura 13 - Esquema de produção de LNPs	48
Figura 14 - Funcionamento da vacina Pfizer/BioNTech.....	49
Figura 15 - Síntese de LNPs de mRNA via rota microfluídica.....	50
Figura 16 - Modelo de entrega de siRNA mediada por nanopartículas lipídicas para hepatócitos <i>in vivo</i>	51
Figura 17 - Plataforma microfluídica escalonável para formulações de LNPs de RNA.....	52
Figura 18 - Representação esquemática da técnica de paralelização de dispositivos microfluídicos.....	53
Figura 19 - Geometria dos canais microfluídicos do dispositivo HFR-MD preenchidos com corantes.....	54
Figura 20 - Dispositivo HFR-MD. (A) Molde produzido por impressão 3D aderido à base de vidro para fabricação do dispositivo. As setas verdes indicam as três entradas e a saída do microdispositivo. (B) Microdispositivo com agulhas nas entradas e mangueira ligada à saída. Q_W representa a corrente aquosa e Q_A a corrente alcoólica. As posições I e II representam o início da junção dos três canais de entrada e 2,5 cm a jusante, respectivamente.	57
Figura 21 - Configurações do dispositivo HFR-MD estudadas e imagens da geometria do canal microfluídico. Configuração padrão (A) e com barreira difusiva (B).	58
Figura 22 - Estrutura e dimensões do dispositivo HFR-MD computacional	59

Figura 23 - Linha de seção transversal traçada no canal para intensidade de cinza. Corte aproximado para os comprimentos de (A) 0,1 cm em TFR 0,2 e (B) 2 cm em TFR 0,2.	64
Figura 24 - Dispositivo HFR-MD produzido em laboratório e utilizado para as investigações de processo. O canal para a mistura possui 3,5 cm de comprimento trançado a partir de fios de <i>nylon</i> de 0,2 mm de diâmetro, com as entradas laterais apresentando cerca de 45° em relação ao canal central.	70
Figura 25 - Perfis de concentração de fluxos caóticos encontrados na literatura. (A) Imagem de seção transversal do perfil de fração de etanol em FRR 3 e TFR 5 a uma distância de 0,015 cm da junção das correntes; (B) Imagens de seção transversal do perfil de fração do fluido de estudo em uma distância mais próxima (esquerda) e outra mais longe (direita) das entradas do micromisturador.	76
Figura 26 - Perfis de velocidade superficial de etanol ao longo da seção transversal do microcanal para as diversas TFRs em FRR 1. Imagens mostram o perfil de velocidade para as TFRs de maneira agrupada (I) e separada (II, III e IV), para o comprimento de canal de 2 cm e altura central (meio).	79
Figura 27 - Padrão de mistura difusiva.	80
Figura 28 - Perfis de mistura para as vazões de (A) 0,2; (B) 5 e (C) 20 mL/min analisadas em FRR 1 ao longo da largura do microcanal de mistura comparando a simulação e os testes experimentais com fluorescência nos comprimentos de canal de 0,1 e 2 cm a partir da junção	86
Figura 29 - Comparação entre perfil de mistura completa e experimental ao longo da largura do microcanal para as diferentes vazões analisadas em FRR 1 nos comprimentos de canal de 0,1 e 2 cm a partir da junção	87
Figura 30 - Seções transversais dos comprimentos de canal 0,1 e 2 cm do dispositivo HFR-MD obtidas pela simulação computacional	88
Figura 31 - Índices de mistura ao longo do dispositivo HFR-MD para as TFRs analisadas em FRR 1 com base nos dados fornecidos a partir das simulações em CFD.	88
Figura 32 – Comparação físico-química de diâmetro médio, PDI (A) e potencial zeta (B) entre CLs produzidos em água e em tampão PBS para a TFR 5 nas diferentes FRRs, com concentração final lipídica de 12,5 mM para a FRR 1 e 2,27 mM para a FRR 10	94
Figura 33 - Efeito da vazão nas propriedades de diâmetro hidrodinâmico médio e PDI dos lipossomas catiônicos produzidos em FRR 1. * Indica diferença estatística significativa de diâmetro quando comparado com as TFRs de 10; 15 e 20 mL/min. # Indica diferença estatística significativa de PDI quando comparado com as TFRs de 5; 10; 15 e 20 mL/min.	96

Figura 34 - Imagens de cryo-TEM dos CLs e S-CLs produzidos em TFR 5 e FRR 1. A) Imagens de CLs e B) S-CLs. As setas indicam os lipossomas de tamanhos correspondentes aos encontrados por DLS, quantificados com o software ImageJ® (National Institute of Health, EUA).....	100
Figura 35 - Representações esquemáticas das definições de processo para a síntese das diferentes nanoestruturas no dispositivo HFR-MD. <i>Set up</i> de processo para a síntese de (A) lipossomas, (B) lipoplexos e (C) LNPs.	102
Figura 36 – Formação de agregados no canal apontados em vermelho para a síntese de lipoplexos nas TFRs 0,2 (A); 5 (B) e 20 (C). D) Imagem do canal limpo usado como comparativo.	103
Figura 37 - Perfil de escoamento no dispositivo HFR-MD simulando o efeito da inserção da barreira difusiva na mistura. Setas verdes simulam a trajetória de escoamento da corrente lateral orgânica em uma primeira situação sem encontro com a outra corrente lateral aquosa (setas em azul); e uma segunda situação de encontro entre essas correntes, no qual a função da barreira difusiva (setas em vermelho) não se faz efetiva.	105
Figura 38 - Perfis de velocidade do etanol com a inserção da barreira difusiva nas TFRs (A) 0,2; (B) 5 e (C) 20 mL/min em FRR _B 1.....	106
Figura 39 - Perfis de concentração de etanol com a inserção da barreira difusiva nas TFRs (A) 0,2; (B) 5 e (C) 20 mL/min em FRR _B 1.....	106
Figura 40 - Perfil de concentração de etanol na presença de barreira difusiva para as diversas TFRs em FRR _B 1. Imagens de cortes da seção transversal no plano XY (altura x largura) para comprimentos de canal de 0,05 cm (A) e 0,1 cm (B).	107
Figura 41 - Comparação de índices de mistura com e sem barreira difusiva ao longo do dispositivo HFR-MD para as TFRs analisadas em FRR 1 obtidos pela simulação computacional com o software ANSYS-CFX® 2020	108
Figura 42 - Imagens do canal microfluídico com a inserção da barreira difusiva durante síntese de lipoplexos em TFR 0,2 (A) e TFR 20 (B) mL/min em FRR _B 1	109
Figura 43 - Diâmetro médio hidrodinâmico (colunas) e PDI (símbolos) dos lipoplexos sintetizados com e sem barreira difusiva nas TFRs 0,2 e 20 mL/min em FRR 1 e dois níveis de concentração lipídica	111
Figura 44 - Canais microfluídicos sem barreira difusiva durante síntese de LNPs em TFRs de 0,2 (A) e 20 (B) mL/min em FRR 1	115
Figura 45 - Canais microfluídicos com barreira difusiva durante síntese de LNPs em TFRs de 0,2 (A) e 20 (B) mL/min em FRR 1	117

Figura 46 – Esquema ilustrando a mistura e as interações DNA/lipídio dentro do microcanal. Perfil de escoamento e formação de complexos DNA/lipídios no HFR-MD para mistura baseada em (A) difusão e (B) advecção caótica. Setas vermelhas e azuis indicam as linhas de corrente de etanol e água, respectivamente. As escalas de tamanho dos lipídios e do DNA são meramente exemplificativas e não representam o tamanho real.	119
Figura 47 - Imagens de cryo-TEM de lipoplexos e LNPs. (A) lipoplexos, (B) lipoplexos <i>stealth</i> e (C) LNPs sem lipídio PEGlado sintetizados na TFR 20 mL/min e FRR 1. Setas brancas indicam nanoestruturas adequadas e de acordo com as análises físico-químicas. Setas azuis indicam possível fusão de partículas. Setas vermelhas indicam presença de multilamelas. ..	122
Figura 48 - Eficiências de transfecção em células VERO de lipoplexos e LNPs. LNPs foram sintetizadas em TFR 20 mL/min, FRR 1, com uso de barreira difusiva e com concentração lipídica final de 3,6 mM. Lipoplexos foram sintetizados via método convencional <i>bulk</i> a partir de lipossomas em 12,5 mM obtidos por microfluídica. * Indica diferença estatística significativa quando comparado com os demais grupos de controle.	125
Figura 49 - Determinação do raio e ângulo de curvatura do canal.....	131
Figura 50 - Determinação do ângulo de curvatura do canal experimental.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - NPs clinicamente aprovadas.....	33
Tabela 2 - Nomenclatura e parâmetros de estudo utilizados ao longo do trabalho	72
Tabela 3 - Efeito de malha no perfil de mistura. Dados de malha retirados do meshing do ANSYS-CFX® 2020. Os perfis de mistura foram retirados em um comprimento de canal de 0,05 cm e vazão de 5 mL/min. A variação na fração de etanol é definida pelo intervalo de cores, sendo a cor vermelha a maior fração (100%) e azul escuro a menor (0%).	73
Tabela 4 – Comparação de perfil de velocidade e de concentração de etanol em TFR de 5 mL/min para diferentes FRRs.....	74
Tabela 5 - Perfil de concentração de etanol em vários comprimentos de canal para estudo do efeito da FRR em TFR 5. Imagens de cortes da seção transversal no plano XY (altura x largura).	75
Tabela 6 - Comparação entre TFR de 0,2 e 20 mL/min para o perfil de velocidade e concentração de etanol em FRR 1	77
Tabela 7 - Perfil de concentração de etanol em vários comprimentos de canal para estudo do efeito da TFR em FRR 1. Imagens de cortes da seção transversal no plano XY (altura x largura).	80
Tabela 8 - Números de Dean nas condições analisadas para quantificação da advecção caótica em dois comprimentos de canal.....	81
Tabela 9 - Índices de mistura para as condições simuladas em diversos comprimentos de canal	83
Tabela 10 - Comprimento de canal para mistura completa nas TFRs analisadas em FRR 1 ...	83
Tabela 11 - Imagens de fluorescência obtidas com rodamina B simulando o processo de mistura no canal microfluídico para as vazões analisadas em FRR 1. Corrente central etanólica com Rodamina B em concentrações de saída de 0,0025; 0,005 e 0,0005 mM para as TFRs de 0,2; 5 e 20 mL/min, respectivamente. Correntes laterais de água pura foram utilizadas.	84
Tabela 12 – Caracterização físico-química dos CLs produzidos no dispositivo HFR-MD em água e TFR 5 com relação ao diâmetro médio, PDI e potencial zeta com seus respectivos desvios padrões (DP) para as diferentes FRRs	92
Tabela 13 - Números de Reynolds e Peclet para a análise de FRRs em TFR 5	92
Tabela 14 - Tempo de residência para as vazões de 0,2, 5 e 20 mL/min considerando apenas o canal trançado para ocorrer a mistura.....	95

Tabela 15 - Propriedades físico-químicas de diâmetro médio, PDI e potencial zeta com os respectivos desvios padrões (DP) dos lipossomas <i>stealth</i> sintetizados em FRR 1 para as TFRs 0,2 e 5 mL/min em água pura como correntes laterais aquosas	97
Tabela 16 - Comparativo de comprimento de canal necessário para mistura completa com e sem barreira difusiva para as diversas TFRs em FRR 1	109
Tabela 17 - Comparativo de situações com e sem geração de precipitados nas TFRs 0,2 e 20 mL/min e concentrações lipídicas altas (6,25 mM) e baixas (2 mM) de entrada, além do uso ou não da barreira difusiva na síntese de lipoplexos	112
Tabela 18 - Propriedades de diâmetro médio, PDI e potencial zeta com seus respectivos desvios padrões (DP) de lipoplexos sintetizados em alta vazão (TFR 20) e alta concentração lipídica (10,5 mM), com e sem a barreira difusiva em FRR 1	113
Tabela 19 - Resumo das condições operacionais utilizadas na síntese de LNPs em FRR 1 com e sem barreira difusiva.....	114
Tabela 20 - Caracterização físico-química das LNPs sintetizadas na presença da barreira difusiva com relação ao diâmetro médio e PDI com seus desvios padrões (DP), para as TFRs 0,2 e 20 mL/min	117
Tabela 21 - Comparação de produtividade lipídica do HFR-MD na síntese de LNPs com diversas tecnologias microfluídicas e nanoestruturas. A produtividade calculada levou em conta as condições otimizadas para as LNPs, presença da barreira difusiva, concentração final lipídica de 3,6 mM e massa molar média lipídica aproximada de 740,5 g/mol.	120
Tabela 22 - Condições requeridas para a produção contínua no HFR-MD em FRR 1 das nanoestruturas analisadas e com boas propriedades físico-químicas	121
Tabela 23 - Números de Reynolds calculados.....	131
Tabela 24 - Raio de seção transversal e ângulo de curvatura do canal	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ζ	Potencial Zeta (mV)
<i>Bulk</i> :	Método convencional de produção de nanopartículas
CFD:	<i>Computational fluid dynamics</i> - Fluidodinâmica computacional
CL:	Lipossoma Catiônico
Cryo-TEM:	Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão
DLS:	<i>Dynamic Light Scattering</i> – Espalhamento de luz dinâmico
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DOPE:	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOTAP:	1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano
DSPE-PEG 2000:	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000]
EPC:	L- α -fosfatidilcolina de ovo
FRR:	<i>Flow Rate Ratio</i> – Razão entre taxas de fluxo
GFP:	<i>Green fluorescent protein</i> - proteína fluorescente verde
HFF:	<i>Hydrodynamic Flow-Focusing</i> - Foco de fluxo hidrodinâmico
HFR-MD:	<i>High flow rate microfluidic device</i> - Dispositivo microfluídico de alta vazão
iLNP:	<i>Ionizable lipid nanoparticle</i> - Nanopartícula lipídica ionizável
LNP:	<i>Lipid nanoparticle</i> – Nanopartícula lipídica
MHF:	<i>Microfluidic hydrodynamic focusing</i> - Método de focalização hidrodinâmica
mRNA:	<i>Messenger RNA</i> - RNA mensageiro
NP:	Nanopartícula
PBS:	<i>Phosphate buffered saline</i> - Tampão fosfato-salino
PDI:	Índice de polidispersidade
pDNA:	Ácido desoxirribonucleico plasmidial
PDMS:	Polidimetilsiloxano
PEG:	Polietilenoglicol
R $\pm$:	Razão molar de cargas, relacionando moles de cargas positivas dos lipídeos catiônicos e cargas negativas do material genético
Re:	Número de Reynolds
RNA:	Ácido ribonucleico

S-CL:	Lipossoma catiônico <i>stealth</i>
SHM:	<i>Staggered herringbone mixer</i> – Dispositivo <i>herringbone</i>
siRNA:	<i>short interfering</i> RNA - RNA de interferência curto
SLN:	<i>Solid lipid nanoparticle</i> - Nanopartícula sólida
TEM:	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TFR:	<i>Total Flow Rate</i> – Taxa de fluxo total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivos gerais	22
1.1.2 Objetivos específicos	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 TERAPIA GÊNICA	24
2.2 LIPOSSOMAS, LIPOPLEXOS E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS	25
2.3 BUSCA DE PROCESSOS PARA A SÍNTESE DE NANO AGREGADOS LIPÍDICOS	33
2.3.1 Microfluídica	35
2.3.1.1 Simulação de processos microfluídicos.....	38
2.3.2 Rota microfluídica para a síntese de lipossomas	40
2.3.3 Produção de complexos contendo material genético – lipoplexos com técnicas microfluídicas	44
2.3.4 Produção de complexos contendo material genético – <i>lipid nanoparticles</i> com técnicas microfluídicas	45
2.3.5 Estratégias para aumento de produção e amplificação de escala em processos microfluídicos.....	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1 MATERIAL	56
3.2 MÉTODOS	56
3.2.1 Dispositivo microfluídico HFR-MD (<i>High Flow Rate Microfluidic Device</i>)	56
3.2.2 Simulação computacional e parâmetros adimensionais	58
3.2.3 Caracterização experimental da condição de mistura - Traçador fluorescente para avaliação do perfil de mistura.....	63
3.2.4 Síntese de lipossomas catiônicos (CLs) e <i>stealth</i> (S-CL).....	64
3.2.5 Síntese de lipoplexos e LNPs	65
3.2.6 Caracterização físico-química e análises estatísticas do complexo de lipossomas catiônicos e LNPs com material genético.....	66
3.2.7 Avaliação <i>in vitro</i>	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 AVALIAÇÃO DA MISTURA E SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO DISPOSITIVO	70

4.1.1 Simulação computacional.....	70
4.1.1.1 Efeito de malha.....	72
4.1.1.2 Efeito da razão entre taxas de fluxo - FRR no processo de mistura.....	73
4.1.1.3 Efeito da taxa de fluxo total - TFR no processo de mistura	76
4.1.1.4 Índice de mistura e avaliação da advecção caótica.....	81
4.1.2 Avaliação experimental da mistura	84
4.2 SÍNTESE DE LIPOSSOMAS	89
4.2.1 Produção de lipossomas catiônicos - CLs em água.....	90
4.2.2 Comparação físico-química entre lipossomas catiônicos - CLs produzidos em água e em tampão fosfato-salino - PBS	92
4.2.3 Efeito da taxa de fluxo total - TFR nas características dos lipossomas.....	95
4.2.4 Produção de lipossomas <i>stealth</i>	97
4.2.5 Análise de morfologia dos lipossomas	99
4.3 Síntese de lipoplexos	101
4.3.1 Efeito da inserção da barreira difusiva	105
4.3.2 Efeito sinérgico entre concentração lipídica e barreira difusiva nas propriedades dos lipoplexos	110
4.4 Síntese de <i>lipid nanoparticles</i>	114
4.5 Análises de morfologia e ensaios de transfecção para lipoplexos e LNPs.....	121
5 CONCLUSÕES.....	128
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	130
ANEXO I – Metodologia e cálculo do número de Dean.....	131
APÊNDICE I.....	133
REFERÊNCIAS	142

1 INTRODUÇÃO

A necessidade mundial de desenvolvimento de vacinas e tratamentos eficientes para combater doenças existentes e novas doenças que vão surgindo, como a mais recente e pandêmica COVID-19, implica no surgimento de potenciais ferramentas de combate, como a terapia gênica (CULLIS; HOPE, 2017; MCKAY et al., 2020; SHIN et al., 2020). A terapia gênica se baseia na transmissão de material genético para células-alvo (transfecção celular), com o intuito de expressar um gene terapêutico de interesse, visando prevenir e tratar doenças (DUNBAR et al., 2018; GUANG LIU; DE YAO, 2002). Este campo vem ganhando destaque, com diversas empresas e instituições de pesquisa buscando novas tecnologias na área (MA et al., 2020; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Um dos principais obstáculos é encontrar um sistema eficaz de transfecção celular, pois os ácidos nucleicos, quando administrados de forma livre, são rapidamente degradados em meios biológicos e eliminados da circulação (EVERS et al., 2018; GUANG LIU; DE YAO, 2002; SIPOLI et al., 2015).

De maneira a conferir proteção ao material genético e conseguir maiores eficiências de transfecção, o uso de vetores não-virais surgem como alternativas (JEONG; KIM; PARK, 2007; SIPOLI et al., 2015; SPAIN et al., 2011). Este tipo de sistema vem sendo amplamente explorado, devido a possibilidade de se obter alta estabilidade, baixo custo e toxicidade reduzida (E. MCNEIL et al., 2010; EŞ et al., 2018; SPAIN et al., 2011). Nesse sentido, surgem as nanopartículas como estratégia de carreamento do material genético, em especial as nanopartículas lipídicas (*lipid nanoparticles* – LNP), que vem sendo muito investigadas (CULLIS; HOPE, 2017; DEL POZO-RODRÍGUEZ; SOLINÍS; RODRÍGUEZ-GASCÓN, 2016; SPAIN et al., 2011).

As LNPs, como o próprio nome diz, são sintetizadas a partir de lipídios. Os principais lipídios utilizados na síntese de LNPs são caracterizados por possuírem cadeias insaturadas de hidrocarbonetos e uma cabeça polar com grupo amino. Usualmente, como lipídio majoritário em sua composição, tem-se os lipídios catiônicos ou mais recentemente os amino ionizáveis. Os lipídios ionizáveis vêm sendo cada vez mais explorados, que, por possuírem insaturações nas suas cadeias de hidrocarbonetos e pKa que varia entre 6 e 7, resultam em melhores eficiências de transfecção e menores toxicidades quando comparados com os lipídios catiônicos. Outra classe importante na composição são os lipídios PEGlados, que modulam o tamanho da LNP e previnem a sua degradação e agregação (CULLIS; HOPE, 2017; PATEL et al., 2019). Um exemplo de aplicação de LNPs é a atual vacina da Pfizer, que se utiliza de LNPs de tamanho em torno de 100 nm de diâmetro, com lipídio ionizável para entrega de RNA

mensageiro (*messenger* RNA - mRNA) (ANSEDE; GALOCHA; OLIVEIRA, 2020; REGALADO, 2020).

A microfluídica tem demonstrado enorme potencial na síntese de nanopartículas reprodutíveis com características aprimoradas quando comparada às técnicas *bulk*, especialmente quanto ao tamanho, distribuição de tamanho e eficiência de complexação. Essas características tem levado a ampla aplicação e pesquisa de nanopartículas sintetizadas via técnicas microfluídicas na área biomédica e química (CONVERY; GADEGAARD, 2019; SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021). Uma classe de nanoestruturas amplamente estudadas são os lipossomas, vesículas aproximadamente esféricas compostas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, e comumente são produzidos via técnica *bulk* ou microfluídica de foco hidrodinâmico, o qual consiste na mistura de uma corrente de lipídios dispersos em etanol comprimida por duas correntes laterais de água (AUDOUY et al., 2002; CARUGO et al., 2016). As características dos lipossomas, como similaridade com a estrutura das membranas celulares e versatilidade para distribuição de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, tem levado também a muitas aplicações na área farmacêutica (FAN; ZHANG, 2013; GV, 2020). Quando associado a entrega de material genético, os lipossomas são chamados de lipoplexos, os quais também podem ser sintetizados por microfluídica e aplicados à terapia gênica (AUDOUY et al., 2002; BALBINO et al., 2017).

Já a produção adequada de LNPs, as quais passaram a ser investigadas com microfluídica depois do surgimento dos lipoplexos, é melhor atingida com um processo de mistura rápida e com bom controle sobre o processo de mistura. Com isso, o método de produção comumente utilizado para LNPs é a técnica microfluídica com advecção caótica (MAEKI et al., 2018). Esta técnica se caracteriza por usar microdispositivos com geometrias diferenciadas, onde o fenômeno da advecção caótica surge pelo cisalhamento das partículas contra a parede ou barreiras inseridas no microcanal. Dessa forma são gerados campos com diferentes velocidades que causam a recirculação do fluido e a geração de fluxos secundários que melhoram a mistura, levando assim, a maiores eficiências de encapsulação quando comparado com dispositivos microfluídicos baseados em difusão com foco hidrodinâmico (AHN et al., 2018; ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; EŞ et al., 2020). As aplicações de nanoestruturas para entrega de material genético foram intensificadas após a descoberta do efeito *stealth* causada pela inserção de lipídios PEGlados. Esse efeito age como uma barreira estérica e aumenta a estabilidade da nanoestrutura na circulação sanguínea, evitando sua opsonização e rápida eliminação pelo sistema retículo-endotelial (HATAKEYAMA; AKITA; HARASHIMA, 2013; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE,

2020). Além disso, o uso de dispositivos que se utilizam da técnica de advecção caótica facilita a ampliação da produção por técnicas de paralelização de dispositivos microfluídicos (EVERS et al., 2018).

Uma maneira de simular e prever os processos microfluídicos é através da fluidodinâmica computacional (CFD). Desse modo, é possível entender como funciona o processo de mistura e o comportamento dos fluidos nos canais microfluídicos, de maneira a dar suporte e otimizar os testes experimentais, minimizando assim, custos com reagentes e tempo operacional para o *set up* das condições de estudo (CARVALHO et al., 2021b; VATANKHAH; SHAMLOO, 2018).

Apesar das vantagens da microfluídica na síntese de nanomateriais, o desafio atual consiste em atingir escalas de produção próximas das requeridas em nível industrial (JEONG; ISSADORE; LEE, 2016; WEBB et al., 2020). A compreensão sobre os efeitos de mistura no processamento de nanoestruturas permite estimar as melhores definições de processamento na síntese destes nanomateriais em uma condição de alta produtividade que se aproxime das demandas industriais, o que pode ser feito através de estudos de CFD e microdispositivos baseados em advecção caótica. Deste modo, este projeto visa realizar estudos de CFD e utilizar um dispositivo de alto fluxo (HFR-MD) com advecção caótica para a produção de nanocarreadores lipídicos (lipossomas, lipoplexos e LNPs) visando a terapia e vacinação gênicas, na área da nanobiotecnologia.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

Esta dissertação de mestrado tem como objetivo contribuir na área da microfluídica e nanobiotecnologia pela incorporação de material genético em lipoplexos e *lipid nanoparticles* de escala nanométrica, através dos métodos convencional *bulk* (modelo equivalente a um sistema batelada) e técnica microfluídica de alta produtividade com advecção caótica (sistema contínuo de produção) utilizando o dispositivo baseado nos trabalhos de De Camargo e colaboradores (2016) e Firmino e colaboradores (2021). O desenvolvimento de processos para a produção destes complexos visa potenciais aplicações em terapia gênica na área da medicina.

1.1.2 Objetivos específicos

A estratégia de pesquisa foi estabelecida nas seguintes metas:

- **Elucidar o processo de mistura e a fluidodinâmica dentro do canal microfluídico em advecção caótica:** Avaliar o comportamento de mistura e a fluidodinâmica para o microdispositivo em três velocidades de escoamento, a fim de identificar o efeito da advecção caótica no processo de mistura etanol-água. Para isso foram realizadas simulações computacionais da mistura no microdispositivo HFR-MD através de CFD, utilizando-se o software ANSYS CFX® 2020.
- **Investigar o microdispositivo HFR-MD para a síntese de lipossomas catiônicos (CLs) e do tipo *stealth* (S-CL):** A partir dos estudos de simulação computacional, avaliar vazões limítrofes e parâmetros de processo para garantir a formação de lipossomas catiônicos e *stealth* com propriedades físico-químicas apropriadas, buscando-se obter a vazão mínima para garantir o efeito de advecção caótica necessário ou não para a incorporação do lipídio PEGlado na nanoestrutura, tomando-se como base as simulações realizadas. A capacidade das nanoestruturas em veicular material genético é avaliada em *bulk* e em microfluídica em duas etapas para a formação de lipoplexos, contendo ácido desoxirribonucleico plasmidial (pDNA), bem como avaliação *in vitro*.
- **Síntese de *lipid nanoparticles* (LNP) para entrega de pDNA:** A partir das condições de processo estabelecidas anteriormente para os lipoplexos, é avaliada a viabilidade da síntese de LNPs em uma única etapa no mesmo dispositivo, incorporando pDNA. Para tal é utilizada a mesma composição definida para os lipoplexos. Por fim, testes *in vitro* são realizados para o estudo em aplicações biológicas.

Nas duas etapas finais, os CLs, S-CLs, lipoplexos e as LNPs são caracterizados em termos de suas propriedades físico-químicas através de técnicas de potencial zeta, diâmetro médio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos (zetasizer), morfologia (criomicroscopia eletrônica de transmissão), e avaliação *in vitro* (com colaboração do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB da USP)).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TERAPIA GÊNICA

O tratamento de doenças através da medicina molecular vem aumentando significativamente nos últimos anos (DUNBAR et al., 2018). A terapia gênica consiste na entrega (*delivery*) intracelular de material genético para corrigir ou combater genes defeituosos, responsáveis por causarem doenças através da modulação de funções e respostas celulares (JEONG; KIM; PARK, 2007; VERMA et al., 2000). Outra aplicação é na vacinação, onde o material genético que codifica uma proteína com potencial para estimular o sistema imunológico e gerar resposta permanente pode ser utilizado (HERWEIJER; WOLFF, 2007; JOSEFSBERG; BUCKLAND, 2012; ULMER; MANSOURA; GEALL, 2015). No entanto, um dos maiores obstáculos desta técnica consiste em entregar eficientemente o material genético (DNA ou RNA) no interior das células-alvo (CULLIS; HOPE, 2017; EŞ et al., 2018; YIN et al., 2014), para que uma proteína com potencial profilático ou terapêutico seja produzida pela própria célula (JEONG; KIM; PARK, 2007; TORCHILIN et al., 2003). Quando o material genético é administrado de forma livre (*naked*) e sem proteção, este é rapidamente eliminado da circulação e digerido por nucleases, pois existem inúmeras barreiras intra e extracelulares que o material genético deve superar para alcançar a produção adequada da proteína codificada (CULLIS; HOPE, 2017; LIU et al., 2007; SCHUSTER et al., 2015).

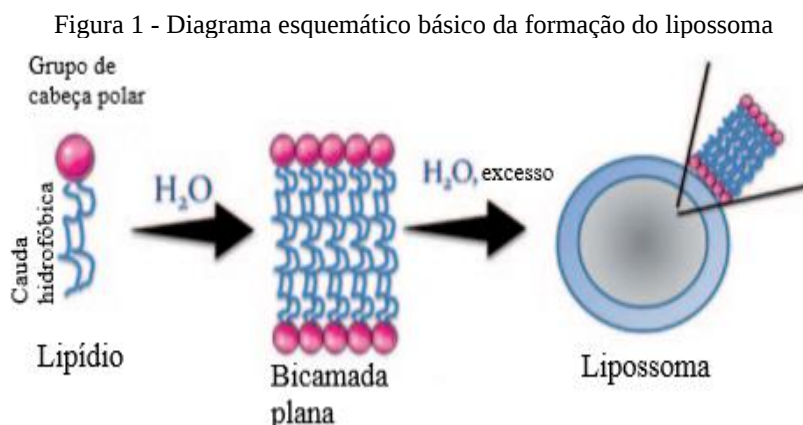
A fim de superar a limitação da entrega do material genético na sua forma *naked*, diferentes técnicas de veiculação deste material podem ser exploradas. Estas técnicas exploram aspectos relacionados com nanobiotecnologia. De maneira geral, existem duas categorias de técnicas para terapia gênica que visam contornar este problema: uso de vetores virais e não virais. Os vetores virais são obtidos a partir da modificação de vírus e exploram a capacidade nata dos vírus em entrar no interior das células (FRIEDMANN, 1997; SPAIN et al., 2011). Esse tipo de carreador, apesar de efetivo, possui muitas limitações, dentre elas, incluem-se a imunogenicidade, toxicidade, alto custo de produção, baixa segurança, incapacidade de entregar grandes transgenes e até mesmo riscos de carcinogênese (DEL POZO-RODRÍGUEZ et al., 2010; JEONG; KIM; PARK, 2007; YIN et al., 2014). O uso de vetores não-virais vem emergindo como uma alternativa promissora na área de nanobiotecnologia para superar as limitações impostas pelos vetores virais, principalmente no que diz respeito à segurança (EŞ et al., 2018; JEONG; KIM; PARK, 2007). Esse tipo de sistema carreador consiste de modo geral na encapsulação do material genético em nanoestruturas utilizando polímeros ou lipídeos.

Como a natureza do material genético é aniônica, uma estratégia comum é o emprego de materiais catiônicos. Assim, nanopartículas e nano agregados podem ser formados e na ausência de uma especificidade para o interior de células, explora-se a diferença de cargas entre a superfície das células (normalmente aniônica) e a dos complexos catiônicos. Os vetores não virais possuem diversas vantagens, como a capacidade de fornecer um alto grau de empacotamento de material genético, respostas imunológicas reduzidas, bem como uma facilidade de fabricação quando comparado aos sistemas virais (CULLIS; HOPE, 2017; E. MCNEIL et al., 2010; JEONG; KIM; PARK, 2007).

Dentre os sistemas não virais destaca-se a aplicação de polímeros catiônicos, lipossomas catiônicos, nanopartículas sólidas (*solid lipid nanoparticles* - SLNs) e LNPs (DEL POZO-RODRÍGUEZ et al., 2010; JEONG; KIM; PARK, 2007; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). As LNPs, em especial, têm sido amplamente investigadas (CULLIS; HOPE, 2017; DEL POZO-RODRÍGUEZ; SOLINÍS; RODRÍGUEZ-GASCÓN, 2016).

2.2 LIPOSSOMAS, LIPOPLEXOS E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS

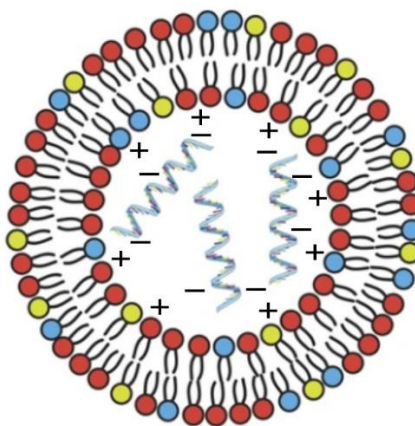
Quando se trata de terapia gênica baseada em genes (DNA ou RNA), as nanopartículas lipídicas se destacam como os principais veículos de sistema de entrega de fármacos (*drug delivery system* - DDS). A nanoestrutura projetada como LNPs advém dos conhecimentos prévios dos lipossomas e de sua associação com o material genético, formando os chamados lipoplexos. Os lipossomas são sistemas coloidais auto agregados na forma de bicamada e que em excesso de água formam vesículas uni ou multilamelares, com um núcleo aquoso (CULLIS; HOPE, 2017; EŞ et al., 2020; RODRÍGUEZ-GASCÓN; DEL POZO-RODRÍGUEZ; SOLINÍS, 2014). Os lipídios formadores de bicamadas têm natureza anfifílica, com uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. Os fosfolipídios são o tipo de lipídios mais comuns para aplicação em lipossomas (CAI et al., 2011; CARUGO et al., 2016; RODRÍGUEZ-GASCÓN; DEL POZO-RODRÍGUEZ; SOLINÍS, 2014). A conformação e a morfologia do lipossoma, entre outros fatores, é determinada pelo parâmetro de empacotamento (P.E) dos lipídios em bicamada $P.E = V/a.L$, onde “V” é o volume das cadeias de hidrocarboneto, “a” é área ótima de seção transversal da cabeça hidrofílica e “L” o comprimento das caudas hidrofóbicas. Quando $0,5 < P.E \leq 1$, organização lamelar (bicamada) é favorecida, se $P.E > 1$, estruturas invertidas são formadas, e $P.E < 0,5$ a formação de micelas são favorecidas (MA et al., 2007; NAGARAJAN, 2002; VHORA et al., 2018). A Figura 1 apresenta um diagrama esquemático de uma estrutura do lipossoma.



Fonte: Traduzido de De La Torre e De Pinho (2015).

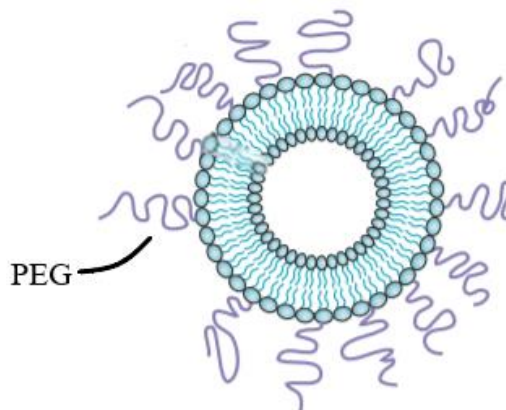
Os sistemas lipossomais podem ser usados para a nano encapsulação de fármacos e moléculas bioativas para diversas aplicações na área biomédica (CARUGO et al., 2016; TORCHILIN, 2005). Muitos ingredientes farmacêuticos ativos e compostos biológicos como materiais genéticos, peptídeos, vacinas, proteínas, agentes anticâncer, dentre outros, tem sido encapsulados em partículas de lipossomas e administrados por meio dessas estruturas vesiculares (FAN; ZHANG, 2013; GV, 2020). Os lipossomas, por mimetizar a membrana celular, possuem como vantagem baixa toxicidade e ainda podem ser produzidos em tamanho adequado para aplicações, variando nas escalas nano e micrométricas (AGHAEI; NAZAR, 2019; RODRÍGUEZ-GASCÓN; DEL POZO-RODRÍGUEZ; SOLINÍS, 2014; TORCHILIN, 2005). Quando lipídios catiônicos são usados na sua formulação, os lipossomas catiônicos são formados e a interação eletrostática com material genético é favorecida, como representado pela Figura 2 (EŞ et al., 2018; SAFINYA et al., 2014). Por fim, também é possível prolongar o tempo de circulação dos lipossomas e diminuir a captação por células fagocitárias no organismo através da característica *stealth*. Essa é uma modificação na superfície das nanoestruturas que pode ser feita com a inserção de lipídeos derivatizados como o diestearoilfosfatidiletanolamina de polietilenoglicol (PEG (1900)-DSPE) (ALLEN; HANSEN, 1991; SAFINYA et al., 2014). O lipídeo PEGlado fica localizado na superfície dos lipossomas, conferindo uma camada de proteção ao redor das vesículas através do impedimento estérico, que evita a ligação de proteínas plasmáticas (opsoninas), gerando o efeito *stealth*, como apresentado na Figura 3 (EŞ et al., 2020; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020; TORCHILIN, 2005). Com isso, sua inserção confere melhor biodistribuição e estabilidade (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021; ZALIPSKY, 1995).

Figura 2 - Ilustração de complexação entre lipídios catiônicos e material genético



Fonte: Adaptado de Blakney e colaboradores (2019).

Figura 3 - Representação do PEG na superfície do lipossoma



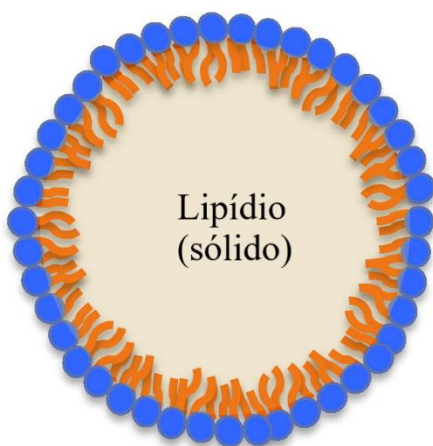
Fonte: Adaptado de Torchilin (2005).

Como alternativa aos lipossomas, as SLNs são desenvolvidas para aumentar a estabilidade do composto, diminuir sua degradação e aumentar o tempo de liberação do fármaco. Este tipo de nanoestrutura é caracterizado por possuir um núcleo (*core*) hidrofóbico de lipídios sólido e rígido, com uma camada de fosfolipídios (hidrofílica), como na Figura 4 (A), sendo majoritariamente utilizado para encapsular compostos hidrofóbicos. Essas características propiciam a redução da toxicidade e melhoram a especificidade e direcionamento do alvo (*target*) dos compostos para os tecidos de interesse. Contudo, aspectos como baixa eficiência de encapsulação, bem como risco de expulsão precoce dos fármacos da matriz lipídica durante armazenamento, são alguns dos fatores limitantes destas estruturas (MARTINS et al., 2007; MISHRA et al., 2018; WANG et al., 2014). Para superar as dificuldades impostas pelas SLNs, *nanostructured lipid carrier* (NLC) foram desenvolvidas para oferecer maior capacidade de encapsulação e prevenir a expulsão precoce do fármaco, através de um núcleo contendo uma mistura de lipídios sólidos e líquidos, conforme observado pela Figura 4 (B). Dessa maneira, a

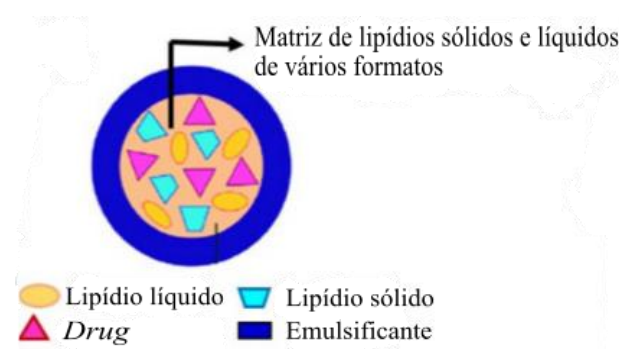
nanoestrutura adquire uma matriz semi-cristalina, evitando a cristalização dos lipídios, e também é conhecida como uma formulação híbrida entre SLNs e emulsão óleo em água. Dentre as aplicações, destaca-se seu uso para vacinação (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; ERASMUS et al., 2018; MISHRA et al., 2018).

Figura 4 - Estrutura geral de uma SLN (A) e um NLC (B)

A)



B)

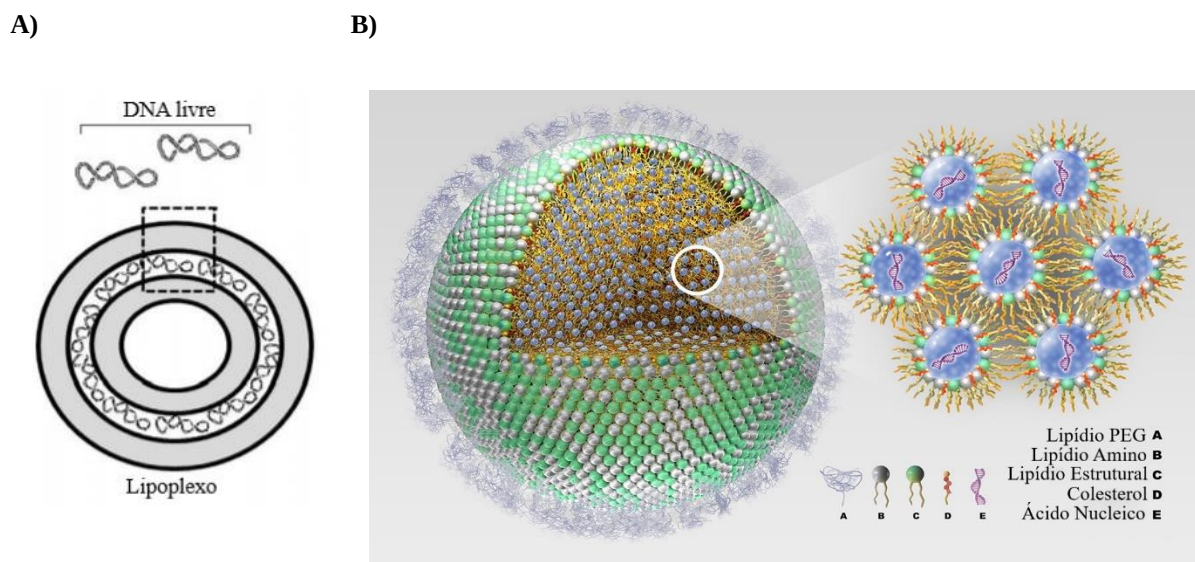


Fonte: Traduzido e adaptado de Wang et al. (2014) e Aldosari, Alfagih e Almurshedi (2021).

Os lipoplexos são os complexos gerados a partir da interação eletrostática entre o material genético (RNA ou DNA) e os lipossomas catiônicos (LI et al., 2018; PACK et al., 2005). Estes podem ter estrutura diversas, a depender da composição, como estrutura multilamelar (HENRIQUES et al., 2009), hexagonal invertida (CONGIU et al., 2004) e características polimórficas (BALBINO et al., 2012), e a vantagem destes complexos é fornecer proteção ao DNA ou outro material genético contra a degradação mediada por nucleases (CHENG et al., 2009; GREGORIADIS et al., 2002). Além disso, possuem carga resultante catiônica e favorecem interações eletrostáticas com as células, permitindo a incorporação intracelular do material genético e sua liberação no citoplasma (BALBINO et al., 2012; NIKCEVIC; KOVACEVIC-GRUJICIC; STEVANOVIC, 2003). A morfologia e suas propriedades podem variar dependendo de quais lipídios catiônicos e polímeros são utilizados (E. MCNEIL et al., 2010; EŞ et al., 2018). Por conta das vantagens apresentadas, os lipoplexos vêm sendo estudados por nosso grupo de pesquisa (BALBINO et al., 2016; EŞ et al., 2018), e um exemplo de uma estrutura de um lipoplexo multilamelar pode ser visualizado pela Figura 5 (A). Um exemplo de composição de lipossomas catiônicos envolve 50% de lipídeos estruturais (para favorecer a auto agregação em bicamadas), 25% de lipídeos catiônicos e 25% de lipídeos

helper (que auxiliam na liberação do material genético no interior das células) (BALBINO et al., 2012, 2015).

Figura 5 - Representações esquemáticas de um lipoplexo multilamelar (A) e uma LNP (B)



Fonte: Traduzido de Henriques e colaboradores (2009) e Samaridou, Heyes e Lutwyche (2020).

Como alternativas aos lipoplexos, as LNPs foram projetadas para não apresentarem estruturas multilamelares, seguindo a teoria da não bicamada. Nesta teoria, a formação de nanoestruturas lipídicas contendo o material genético e que não forma bicamada facilita a liberação do material genético no interior das células e aumenta a resposta biológica (CULLIS; HOPE, 2017). A principal diferença entre os lipoplexos e as LNPs é o processo de síntese. Enquanto que os lipoplexos são formados a partir de uma prévia síntese de lipossomas e sua mistura posterior com o material genético (duas etapas) em *bulk* ou microfluídica, as LNPs são sintetizadas misturando-se diretamente os lipídios com o material genético (uma etapa) através da microfluídica (EVERS et al., 2018; HIROTA et al., 1999; QUAGLIARINI et al., 2021). Usualmente, a composição lipídica varia em relação aos lipoplexos. Tipicamente, a maior porcentagem é de um lipídio ionizável ou catiônico (cerca de 50%), colesterol (cerca de 38,5%), lipídio PEGlado (“PEGylated lipid”) (cerca de 1,5%) e um lipídio estrutural ou *helper* (cerca de 10%) (HASSETT et al., 2019; PATEL et al., 2019). A Figura 5 (B) mostra um exemplo de estrutura típica de uma LNP. No entanto, a proporção lipídica pode variar, bem como sua estrutura, e não necessariamente inclui todos os tipos de lipídios citados (KIMURA et al., 2018; KULKARNI et al., 2018). Dentre os lipídios, o de ação *helper* mais comum é o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), com a função de promover a desestabilização da

membrana plasmática e facilitar a liberação intracelular de DNA para aplicação em lipoplexos (CONGIU et al., 2004; FARHOOD; SERBINA; HUANG, 1995). Essa classe de lipídios usualmente possui carga neutra (zwitteriônico), e no caso do DOPE, seu uso pode elevar o parâmetro de empacotamento médio, e dependendo da proporção utilizada, pode levar a formação de estruturas hexagonais (MA et al., 2007; MAQBOOL et al., 2019; VHORA et al., 2018). Já para as LNPs, o DOPE tem como objetivo aumentar a eficácia de entrega *in vitro*, promovendo a fusão da membrana, e o 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) estabiliza a nanopartícula (EVERS et al., 2018; HAFEZ; MAURER; CULLIS, 2001; LOU et al., 2020). Dos lipídios estruturais (formadores de bicamada) mais utilizados têm-se a L- α -fosfatidilcolina de ovo (EPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) e o DSPC, que pode funcionar tanto como *helper* quanto estrutural (BALBINO et al., 2017; EVERS et al., 2018; VERBEKE et al., 2019). Os lipídios ionizáveis mais empregados são 1,2-dioleoil-3-dimetilamônio propano (DODAP), 1,2-dilinoil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide (DLin-DMA) e dilinoil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide (DLin-MC3-DMA), e o lipídio catiônico mais comum é o 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) (CULLIS; HOPE, 2017; EVERS et al., 2018; LOU et al., 2020). O DLin-MC3-DMA é atualmente considerado o “padrão ouro” para silenciar alvos do fígado, sendo um dos lipídios mais potentes e ativos, e é um dos componentes lipídicos do produto Onpattro® (CULLIS; HOPE, 2017; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020).

Os lipídeos de última geração e capazes de veicular material genético nas estruturas das LNPs são os ionizáveis. Estes são uma evolução dos lipossomas catiônicos, sintetizados quimicamente para incorporar o material genético (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; CULLIS; HOPE, 2017). Estes lipídeos ionizáveis possuem pKa variando de 5,8 a 6,8 (SEMPLE et al., 2001, 2010). Desta forma, quando o processamento das LNPs ocorre em pH ácido, a nanoestrutura formada possui caráter catiônico, permitindo a associação eletrostática com o material genético. Após a formação da nanoestrutura e incorporação do material genético no seu interior, o pH do meio é alterado para o fisiológico e acima do pKa do lipídeo ionizável, e assim a nanoestrutura perde seu caráter catiônico. Essa alteração leva a uma diminuição da toxicidade das nanoestruturas. Quando a LNP é incorporada pela célula e no interior dos endossomas, a diminuição natural do pH em seu interior permite a protonação dos lipídeos ionizáveis, e que, devido ao seu excesso na formulação, levam a desestruturação da membrana endossomal e consequentemente a liberação do material genético no citosol. Esse processo leva à modulação do caráter catiônico (CULLIS; HOPE, 2017; PATEL et al., 2019; SEMPLE et al.,

2010). No entanto, o lipídeo ionizável é ainda de difícil comercialização (custo elevado) e também existe a possibilidade de se pesquisar novas estruturas.

Dos lipídios PEGlados mais utilizados, destacam-se o 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000] (DMG-PEG2000) e o poli(etilenoglicol)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PEG-DSPE) (EVERS et al., 2018; LOU et al., 2020). Normalmente o teor de lipídeo-PEG é variado para se ajustar o tamanho da LNP, modulando seu tamanho, geralmente permanecendo em baixas quantidades, em torno de 1,5% (CHEN et al., 2016; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Além disso, os lipídios PEGlados previnem a agregação das nanopartículas durante a produção e armazenamento. No entanto, a quantidade de lipídio PEGlado deve ser muito bem ajustada, pois no caso em que se visa a entrega nos hepatócitos, é importante que essa camada PEGlada não diminua potencialmente a adsorção da apolipoproteína E (ApoE) nas LNPs, pois é um passo essencial para se alcançar a transfecção apropriada das LNPs nesse tipo de células. Portanto, é necessário encontrar um equilíbrio na proporção de lipídio PEGlado, bem como nos diferentes tamanhos de suas cadeias hidrofóbicas, a fim de se atingir com eficiência seu propósito de aplicação (EVERS et al., 2018; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020).

Além de diferente modo de síntese, outra comum diferença das LNPs para os lipoplexos é a estrutura das nanopartículas. No caso dos lipossomas e lipoplexos, considera-se normalmente uma bicamada vesicular unilamelar ou multilamelar, com núcleo aquoso, e demais estruturas considera-se LNPs, que contém o material genético em seu interior e boa parte dos lipídios catiônicos/ionizáveis ocupam o núcleo pela hipótese da não-bicamada (*non-bilayer hypothesis*), formando um núcleo denso de elétrons, no qual a estrutura mais comum é de uma micela invertida (Figura 5 (B)) (CULLIS; HOPE, 2017; EVERS et al., 2018; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Porém, também se há registros de estruturas amorfas e até mesmo multilamelares em alguns casos (KULKARNI et al., 2018; QUAGLIARINI et al., 2021). Boas premissas para se utilizar as LNPs residem no fato de se conseguir altas eficiências de encapsulação, propriedades físico-químicas que contribuem para superar as barreiras biológicas para os ácidos nucleicos, além de poder exibir baixa carga de superfície (*low surface charge*), conforme necessário para a administração *in vivo* (CULLIS; HOPE, 2017; EVERS et al., 2018). Além disso, esse tipo de nanoestrutura com um núcleo denso de elétrons devido ao complexo ácido nucleico/lipídio, potencializam aplicações na área biomédica devido à sua versatilidade, biocompatibilidade e potente entrega intracelular de ácidos nucleicos (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021).

Devido às diversas vantagens apresentadas, após longos anos de estudo sobre lipossomas, lipoplexos e LNPs, em 1995 houve a aprovação do Doxil® para o tratamento de câncer de ovário e sarcoma de Kaposi pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), o qual é uma formulação lipossomal de doxorubicina (ICKENSTEIN; GARIDEL, 2019; NORTHFELT et al., 1996). Em 2018 houve a aprovação do Onpattro® para o tratamento de Amiloidose nos Estados Unidos e na União Européia. Esse é um medicamento para a veiculação de *small interfering* RNA (siRNA) em LNPs (ICKENSTEIN; GARIDEL, 2019; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Além disso, a possibilidade de se inserir ligantes para direcionamentos específicos evidencia potenciais nichos de aplicação dessas nanopartículas, como é o caso dos imunolipossomas com fragmentos de anticorpo monoclonal anti-HER2, para direcionar a entrega de fármaco para células com superexpressão de HER2, visando atingir alvo tumoral (PARK et al., 2001). Outras modificações de superfície possíveis em lipossomas para se obter diferentes direcionamentos são mostradas por Torchilin (2005). No caso das LNPs também há trabalhos que evidenciam a possibilidade de modificação das nanopartículas visando diferentes direcionamentos, como é o caso de Kedmi e colaboradores (2018) e Veiga e colaboradores (2018), que propuseram recentemente uma plataforma de direcionamento modular para a entrega seletiva de LNPs recobertas com anticorpos monoclonais (mAbs) incorporando siRNA e mmRNA (*modified messenger* RNA), respectivamente, para diversos leucócitos *in vivo* (VERBEKE et al., 2019). Não coincidentemente, dentre as nanopartículas aprovadas clinicamente, os lipossomas e as LNPs representam mais da metade das NPs aprovadas pela FDA que estão atualmente em uso clínico, conforme é possível observar pela Tabela 1 (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021). No entanto, no caso das LNPs, apesar das vantagens de se adicionar materiais ligantes para direcionamento, questões como custo, maior complexidade, dificuldades regulatórias com relação ao processo de fabricação do sistema de LNP e relação custo de fabricação/benefícios clínicos devem ser levadas em conta (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; CHENG et al., 2012).

A eficiência de LNPs foi recentemente demonstrada por Mucker e colaboradores (2020), comprovando o potencial de aplicação para vacinas de DNA. Os autores demonstraram a formação de anticorpos neutralizantes para Andes virus (ANDV) e doença de Zika virus (ZIKV). Lou e colaboradores (2020) identificaram a formação de altas porcentagens de expressão do antígeno utilizando LNPs catiônicos baseados em dimetildioctadecilamônio (DDA) e DOTAP para *delivery* de vacina de *Self-amplifying* RNA (SAM).

Tabela 1 - NPs clinicamente aprovadas

Product (generic name)	Approval year	Approved designation(s)	Description
Abelcet (amphotericin B)	FDA 1995	Fungal infections	Amphotericin B lipid complex
Abraxane (paclitaxel)	FDA 2005	Advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC) Metastatic breast cancer Metastatic pancreatic cancer	Albumin-particle bound paclitaxel
AmBisome (amphotericin B)	EMA 2008	Fungal/protozoal infections	Liposomal amphotericin B
Apealea/Paclical	FDA 1997	Ovarian cancer	Micellar formulation of paclitaxel
Curosurf (poractant alpha)	EMA 2018	Pulmonary surfactant for respiratory distress syndrome	Liposome-proteins SP-B and SP-C
InFed/CosmoFer/Ferrisat	FDA 1999	Iron deficient anemia	Iron dextran colloid (low molecular weight)
	FDA 1992 Europe 2001		
DaunoXome (daunorubicin)	FDA 1996	HIV-associated Kaposi's sarcoma	Non-PEGylated liposomal daunorubicin
DepoCyt (cytarabine)	FDA 1999	Neoplastic meningitis	Liposomal cytarabine
DepoDur (morphine)	FDA 2004	Analgesia	Liposomal morphine sulfate
Diafer	Europe 2013	Iron deficiency for patients with chronic kidney disease	5% iron isomaltoside colloid
Diprivan (propofol)	FDA 1989	Anesthesia	Liposomal propofol
Doxil/Caelyx (doxorubicin)	FDA 1995	Ovarian cancer HIV-associated Kaposi's sarcoma Multiple myeloma	PEGylated liposomal doxorubicin
	EMA 1996		
Feraheme/Rienso (feruxmoxetol)	FDA 2009	Iron replacement therapy for chronic kidney disease	Iron polyglucose sorbitol carboxymethylether colloid
	EMA 2012		
Ferlecit (ferric gluconate)	FDA 1999	Iron replacement therapy for chronic kidney disease	Iron gluconate colloid
Hensify (NBTXR3)	CE Mark 2019	Locally advanced soft cell carcinoma	Hafnium oxide NPs stimulated by radiation to induce tumor cell death
Injectafer/Ferinject (ferric carboxymaltose)	FDA 2013	Iron deficient anemia	Iron carboxymaltose colloid
Marqibo (vincristine)	FDA 2012	Acute lymphoid leukemia	Non-PEGylated liposomal vincristine
Mepact (mifamurtide)	EMA 2009	Non-metastatic osteosarcoma	Non-PEGylated liposomal mifamurtide
Monoferic/Monofer (ferric derisomaltose)	FDA 2020 Europe 2009	Iron deficiency anemia	10% iron isomaltoside colloid
Myocet (doxorubicin)	EMA 2000	Metastatic breast cancer	Non-PEGylated liposomal doxorubicin
NanoTherm	Europe 2010	Thermal ablation glioblastoma	Iron oxide NP
Onivyde (MM-398 irinotecan)	FDA 2015	Metastatic pancreatic cancer	PEGylated liposomal irinotecan
Onpatro (patisiran)	FDA 2018 Europe 2018	Transthyretin induced amyloidosis (hATTR)	siRNA lipid nanoparticle
Venofer (iron sucrose)	FDA 2000	Iron replacement therapy for chronic kidney disease	Iron sucrose colloid
Visudyne (verteporfin)	FDA 2000	Macular degeneration	Liposomal verteporfin (light activated)
	EMA 2000		
Vyxos (daunorubicin cytarabine)	FDA 2017	Acute lymphocytic leukemia	Liposomal daunorubicin and cytarabine

Fonte: Shepherd, Issadore e Mitchell (2021).

Embora recentemente um progresso notável nessa área tenha sido feito, como evidenciado pelo trabalho de Aldosari, Alfagih e Almurshedi (2021), que apresenta diversas LNPs em estudos pré-clínicos contra doenças, algumas questões ainda necessitam de maiores investigações. Por exemplo, melhorias na entrega funcional ocasionadas por mudanças nas estruturas de lipídios amino ionizáveis, bem como a ocorrência de reações imunes e eventos adversos durante aplicações *in vivo*, ainda não são muito bem compreendidas (EVERS et al., 2018; HASSETT et al., 2019; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Além disso, efeitos de biotransformações em nanomateriais, como adsorção de *protein corona* e fenômenos de agregação em meios biológicos precisam de mais investigações, uma vez que afetam os testes toxicológicos e a qualidade dos nanomateriais para suas aplicações *in vitro* e *in vivo* (MARTINEZ; ALVES, 2013; MILOSEVIC; ROMEO; WICK, 2020; QIU; CLEMENT; HAYNES, 2018). Portanto, o progresso recente somado às questões ainda não muito bem esclarecidas, demonstram o potencial de aplicação e desenvolvimento dessa área.

2.3 BUSCA DE PROCESSOS PARA A SÍNTESE DE NANO AGREGADOS LIPÍDICOS

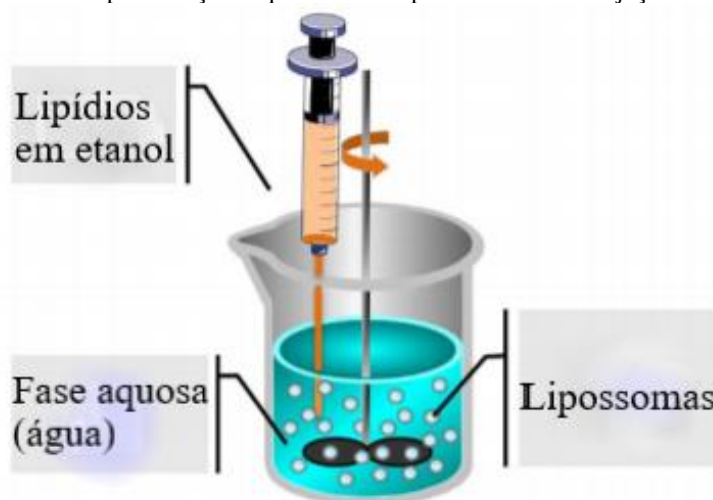
O desenvolvimento de produtos farmacêuticos depende de fases de aprovação, indo da fase pré-clínica até a fase clínica 4 (produto já sendo comercializado) (INSTITUTO

NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2018; QUENTAL; FILHO, 2006). Um dos requisitos é que o desenvolvimento do processo produtivo esteja associado ao produto. Assim, ao se iniciarem estudos clínicos, o processo de produção já deve estar estabelecido (HOMMA et al., 2003; QUENTAL; FILHO, 2006). Desta forma, o desenvolvimento de processos torna-se fator importante no desenvolvimento de vacinas gênicas.

Dentre os métodos mais conhecidos de produção de lipossomas e lipoplexos, destacam-se os métodos convencionais (*bulk*) e a microfluídica. Os métodos *bulk* são caracterizados pela mistura entre fase aquosa, que contém o material genético no caso dos lipoplexos, e o nanocarreador (como lipídios catiônicos), através de agitação por vórtice ou pipetagem manual, e são considerados métodos *top-down*, onde etapas para redução de tamanho e polidispersidade normalmente se fazem necessárias, como técnicas de sonicação e extrusão (BALBINO et al., 2016; CARUGO et al., 2016; HSIEH et al., 2009). Dentre as vantagens que apresentam, pode-se citar a facilidade de implementação e execução em escala laboratorial, bem como equipamentos necessários relativamente baratos, o que torna estes métodos amplamente acessíveis (GRIMALDI et al., 2016; PATIL; JADHAV, 2014).

Um dos métodos *bulk* mais utilizados quando se deseja comparar lipossomas produzidos também por métodos microfluídicos, é o método de injeção de etanol. Este método se caracteriza por dissolver lipídios na fase orgânica (etanol), e em seguida, com auxílio de uma seringa, esta solução de lipídios é injetada em um volume apropriado de água sob agitação contínua. A formação espontânea de lipossomas ocorre assim que a solução etanólica entra em contato com a fase aquosa (CARUGO et al., 2016). A Figura 6 exemplifica este processo de síntese.

Figura 6 - Representação esquemática do procedimento de injeção de etanol



Fonte: Traduzido de Carugo e colaboradores (2016).

O etanol é um dos solventes orgânicos mais utilizados tanto nos métodos *bulk*, quanto na microfluídica. Isso deve-se ao fato de que esse solvente é o menos tóxico para aplicações na medicina, podendo ser facilmente retirado por diálise, e concentrações de até 0,5% (v/v) são aceitas pelas diretrizes atuais na Europa e América (CARUGO et al., 2016; EVERS et al., 2018).

Os métodos microfluídicos são do tipo *bottom-up* e caracterizam-se por produzir os agregados no tamanho apropriado, sem a necessidade de etapa adicional para o controle e ajuste de tamanho (EVERS et al., 2018; ZIZZARI et al., 2017).

Os métodos *bulk*, como o método de injeção de etanol, apresentam baixo controle sobre as condições de mistura e reprodutibilidade da mistura (GUIMARÃES SÁ CORREIA et al., 2017; JAHN et al., 2004). Além disso, Aghaei e Nazar (2019) obtiveram tamanhos de partículas maiores com os métodos *bulk* em comparação com a microfluídica, e ainda uma menor uniformidade da distribuição de partículas. O mesmo foi observado por Carugo et al. (2016). Com isso, a microfluídica surge como uma potencial alternativa para contornar estes problemas (MAEKI et al., 2018; ZIZZARI et al., 2017).

2.3.1 Microfluídica

Estima-se que o conceito “microfluídica” foi definido em 1990 com a visão de integrar todos os processos de análise química em um chip micro fabricado, surgindo os μ TAS (*micro-total analysis systems*). Devido ao seu pequeno tamanho e dimensões de canal da ordem de dezenas de micrômetros, as plataformas μ TAS apresentam custo reduzido de processo e curto tempo de análise (ARAYA-FARIAS; DZIOMBA; TRAN, 2020; KOVARIK et al., 2013). Posteriormente, os trabalhos pioneiros de George Whitesides, Steven Quake e outros, inspiraram um forte crescimento de aplicações microfluídicas, com a introdução de dispositivos de PDMS, multicamadas e baseados em gotículas (KONG; SHUM; WEITZ, 2020; SQUIRES; QUAKE, 2005; WHITESIDES, 2006). Polidimetilsiloxano (PDMS) é um elastômero macio opticamente transparente e de fácil prototipagem, facilitando o projeto e construção de dispositivos microfluídicos de forma prática e rápida (WHITESIDES, 2006).

A microfluídica é a tecnologia e ciência multidisciplinar com grande potencial de aplicações, que consiste na manipulação de pequenas quantidades de fluidos na escala micrométrica (BALBINO et al., 2013; WHITESIDES, 2006). Essa característica permite o fluxo nos canais desses sistemas em regime laminar, o qual pode ser inferido matematicamente pelo número de Reynolds (Equação (1)). Na macroescala, o fluxo é considerado laminar quando

este apresenta valores menores que cerca de 2300 (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; SHARP et al., 2002; VATANKHAH; SHAMLOO, 2018). No entanto, na microescala não há um consenso definido na literatura que permita estimar uma faixa de valor fixa para a transição entre regimes, pois os parâmetros geométricos do canal influenciam nessa determinação. Desse modo, segue-se a premissa de que majoritariamente as pequenas dimensões e quantidades de fluido manipulados em microfluídica resultam em regimes laminares, sendo que para obter tal confirmação, estudo sobre dinâmica de fluxo deve ser realizado (FIRMINO et al., 2021; LI; OLSEN, 2006; WANG; YANG; ZHAO, 2014). Com este regime, é possível se obter melhor controle sobre a concentração das moléculas no espaço e no tempo. Como se trata de sistema operando em regime laminar, os processos de mistura são governados pelo fenômeno da difusão molecular (BALBINO et al., 2013; CARUGO et al., 2016; WHITESIDES, 2006), o que pode favorecer a investigação de processos de sistemas autoagregados, como os lipossomas.

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

Quando ρ e μ são a densidade e viscosidade do fluido, respectivamente, v_o é a velocidade característica de escoamento do fluido, e D_h é o diâmetro hidráulico, o qual depende da geometria da seção transversal do microcanal. Vale destacar que o Re permite indicar o tipo de escoamento, laminar ou turbulento, através da razão entre as forças inerciais e as forças viscosas. Dessa maneira, na microescala, diferente da macroescala, quase sempre o escoamento é considerado laminar, com poucos trabalhos reportando indícios de regime turbulento em micromisturadores (GUAN et al., 2020; YOU et al., 2015), o que acarreta em uma cinética mais previsível, sendo resultado de um balanço entre forças interfaciais, inerciais, viscosas e capilares (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; CONVERY; GADEGAARD, 2019; WHITESIDES, 2006).

Na microfluídica, também é comum relacionar o fenômeno de transferência de massa através do número de Peclet (Pe). O Pe (Equação (2)) relaciona a razão entre o efeito convectivo e difusivo de moléculas em um fluido (CONVERY; GADEGAARD, 2019; OLIVEIRA et al., 2016).

$$Pe = \frac{vL}{D} \quad (2)$$

Quando D é o coeficiente de difusão, v é a velocidade média de escoamento e L é a largura da seção transversal do microcanal. Em se tratando da microescala, uma redução nas dimensões do sistema leva a uma redução no Pe , sendo encontrado valores baixos de Pe quando a difusão domina o processo de transferência de massa (CONVERY; GADEGAARD, 2019; JEN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2016).

Por fim, o número capilar (Ca) representa a razão entre força viscosa e força interfacial, sendo utilizado para fluidos viscosos, como emulsões e geração de gotas por microfluídica (CHAVES et al., 2020; JAHN et al., 2008; USHIKUBO et al., 2015). Sua importância também é visualizada em escoamentos de sistemas microfluídicos em que não há o uso de bombas, ou contra as forças da gravidade, sendo muito explorado no desenvolvimento de microdispositivos analíticos de papel (μ PADs), uma vez que a força gravitacional é reduzida na escala micro, possibilitando assim a criação deste tipo de dispositivo (CONVERY; GADEGAARD, 2019; JAFRY et al., 2017; MARTINEZ et al., 2007).

Para a representação do fluxo caótico na microfluídica, um método muito utilizado é o cálculo da exponencial de Lyapunov, conhecido como *finite time Lyapunov exponent* (FTLE). O FTLE quantifica a taxa de separação (divergência) exponencial entre uma trajetória e seus vizinhos próximos ao longo de um intervalo de tempo, sendo capaz de caracterizar a existência e a intensidade caótica no fluxo. Porém, este método necessita de uma análise em regime transiente, onde a evolução temporal é analisada (JAY BRETT et al., 2019; KIM, 2004; SHILTON; YEO; FRIEND, 2011). Outro método para caracterização de fluxo caótico é pelo cálculo do número adimensional de Dean (De). O número de Dean é utilizado na análise de fluxos de caminho secundário (*secondary path flow*) gerados em canais curvados e tortuosos, que dão origem a advecção caótica. A vantagem deste método é a possibilidade de caracterização em regime estacionário, bem como a geometria e a curvatura do canal são levados em conta. O De é amplamente investigado em dispositivos microfluídicos com canais curvados. O fluxo secundário surge no fluxo de fluido através de um canal curvado por causa de uma incompatibilidade de velocidade na direção a jusante entre o fluido nas regiões centrais (mais rápida) e perto da parede do canal (mais lenta). Isso cria dois vórtices em contra-rotação perpendiculares à direção do fluxo primário, gerando a advecção caótica, resultando em melhor mistura dos fluidos no canal (DI CARLO, 2009; HABCHI et al., 2009; VERMA et al., 2008).

O número de Dean para canal helicoidal ou torcido é mostrado na Equação (3).

$$De = \left(\frac{D_{eq}}{\rho} \right)^{0,5} Re \sin(\theta) \quad (3)$$

Sendo D_{eq} o diâmetro equivalente ou hidráulico, ρ o raio da seção transversal sob análise, Re o número de Reynolds e θ o ângulo de curvatura (VERMA et al., 2008).

Comparado com os métodos convencionais, a microfluídica exhibe vantagens econômicas e técnicas, como *design* de baixo custo, alto controle e minimização do efeito da transferência de massa e calor, além das vantagens já mencionadas anteriormente (EŞ et al., 2018; HALLDORSSON et al., 2015). Por isso, na última década, as aplicações da microfluídica se estenderam a aplicações bioquímicas e médicas, diagnóstico de ponto de atendimento e síntese de novos biomateriais, e provavelmente continuará a ser integrada em diferentes tópicos de pesquisa e aplicações (KONG; SHUM; WEITZ, 2020). Com a exploração cada vez maior da microfluídica, ferramentas computacionais têm se tornado um importante aliado no entendimento da fluidodinâmica e dos processos de mistura em dispositivos microfluídicos (CHAVES et al., 2020; OLESEN; BRUUS, 2003).

2.3.1.1 Simulação de processos microfluídicos

A necessidade pela busca e estudo de simulações computacionais que representem os processos microfluídicos advém, principalmente, da resolução das equações que regem os fenômenos de transporte dos fluidos, uma vez que há dificuldade de se obter soluções analíticas para a maioria dos casos (JÚNIOR, 2019; OLESEN; BRUUS, 2003). CFD é uma técnica numérica usada na análise de sistemas de fluxo e outros fenômenos associados, sendo resultado de uma combinação das ciências matemáticas, físicas e computacionais, com o objetivo principal de compreender sistemas de fluxo de fluidos. Com o auxílio desta técnica, importantes aspectos de engenharia podem ser solucionados, visando principalmente a otimização e *design* de processos e equipamentos, redução de custos de projeto e o aprofundamento na compreensão dos fenômenos envolvidos, que via de regra são difíceis de serem analisados por via experimental e física (JÚNIOR, 2019; SANTANA et al., 2020). Além disso, a análise via CFD permite superar as limitações experimentais e acelerar a busca pelo *set up* inicial de processo mais assertivo, diminuindo o gasto com procedimentos experimentais e otimizando o tempo produtivo (CARVALHO et al., 2021b; CHAVES et al., 2020).

Como já mencionado, as principais forças governantes na microfluídica que influenciam no comportamento e mistura dos fluidos são a difusão, convecção, força interfacial, viscosa e

inercial (OLIVEIRA et al., 2016). Além disso, as típicas baixas vazões e dimensões de dispositivos microfluídicos resultam em baixos números de Re, regime laminar e mistura governada pela difusão, o que torna a mistura lenta e inviável para diversas aplicações. Dessa forma, o comportamento é diferente quando comparado a macroescala (AFZAL; KIM, 2014; STREMLER; HASELTON; AREF, 2004; XIA et al., 2005). No entanto, sabe-se que realizando mudanças na geometria dos canais e nas vazões aplicadas é possível melhorar significativamente a mistura, como pela geração de advecção caótica, o que pode ser melhor compreendido com a simulação computacional (JEN et al., 2003; VATANKHAH; SHAMLOO, 2018). Porém, antes desta etapa é preciso entender as equações que regem o transporte dos fluídos, a fim de se determinar o perfil de velocidade e concentração, para que tal análise seja confiável e represente com precisão o fenômeno ocorrido na prática (TRIPATHI; PATOWARI; PATI, 2021; VATANKHAH; SHAMLOO, 2018).

As equações generalizadas que governam os fenômenos de transporte para um sistema operando com temperatura constante e estado estacionário são a da continuidade (Equação (4)) e Navier-Stokes (Equação (5)), para a conservação da massa e momento, respectivamente, bem como a equação de transporte de espécies, para o cálculo da fração mássica (Equação (6)) (ANSARI; KIM, 2007; BORGOHAIN et al., 2018; TRIPATHI; PATOWARI; PATI, 2021).

Equação da continuidade:

$$\frac{\partial u_j}{\partial x_j} = 0 \quad (4)$$

Equação de Navier-Stokes:

$$\frac{\partial(\rho u_i u_j)}{\partial x_j} = -\frac{\partial P}{\partial x_i} + \frac{\partial \tau_{ij}}{\partial x_i} \quad (5)$$

Sendo $\tau_{ij} = \mu \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right)$

Equação da fração mássica:

$$\frac{\partial(\rho u_j C)}{\partial x_j} = \frac{\partial(\rho D \frac{\partial C}{\partial x_j})}{\partial x_j} \quad (6)$$

Quando u_i , P , τ_{ij} , D e C são o vetor velocidade, pressão, tensor tensão, coeficiente de difusão binário e fração mássica da espécie em estudo. ρ é a densidade (kg/m³) de mistura

calculada usando a lei de mistura ponderada pelo volume e μ a viscosidade dinâmica da mistura ($\text{kg.m}^{-1}\text{s}^{-1}$).

A partir destas equações é possível buscar a solução numérica, podendo ser realizada através de uma discretização. Um método comumente usado é o *upwind scheme*, que leva em consideração os termos convectivos das equações governantes (VATANKHAH; SHAMLOO, 2018), sendo usualmente aplicado quando $Pe > 2$ (MOUKALLED; MANGANI; DARWISH, 2016). Com a definição do conjunto de equações e a forma de solução, é possível implementar os processos microfluídicos em softwares como ANSYS CFX®, ANSYS FLUENT® e CFD-ACE™ (AFZAL; KIM, 2014; JEN et al., 2003; TRIPATHI; PATOWARI; PATI, 2021), cujos resultados podem contribuir na validação de experimentos. Como visto por Firmino e colaboradores (2021), a simulação computacional pode atuar como ferramenta colaborativa na validação de hipóteses de processo. Com o auxílio de CFD, os autores puderam comprovar que a mistura completa dentro do microcanal não era fator fundamental para a síntese de lipossomas, para o caso específico analisado. Li e colaboradores (2018) utilizaram o software COMSOL Multiphysics® para simular numericamente a mistura caótica de gotículas que passaram pelo microcanal e a tensão de cisalhamento na junção de geração de gotículas. Assim, os autores utilizaram um modelo multifásico para rastrear com precisão a interface entre as fases aquosa e oleosa, servindo como ferramenta auxiliadora na predição das gotas que seriam usadas como microrreatores para gerar lipoplexos monodispersos. Dessa forma, o estudo de simulação numérica pode ser útil na validação de processos de síntese de nanoestruturas via microfluídica.

2.3.2 Rota microfluídica para a síntese de lipossomas

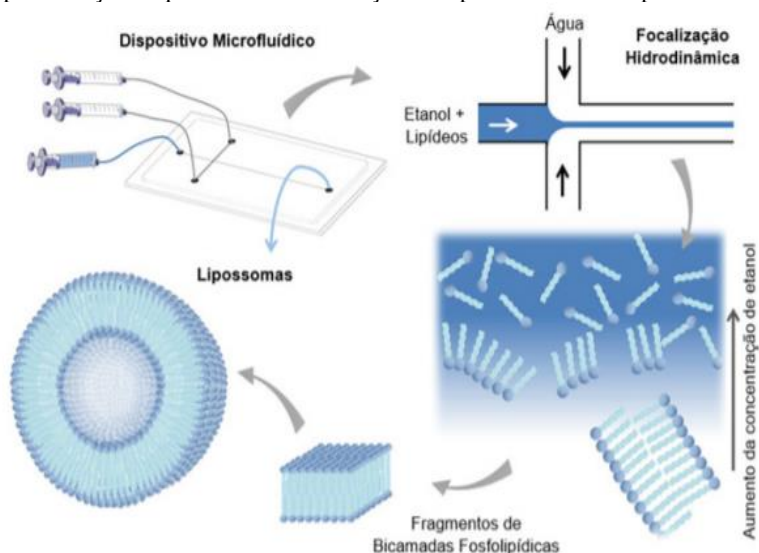
A microfluídica pode ser empregada para a produção de lipossomas, lipoplexos e LNPs. Normalmente, para lipossomas e lipoplexos, são empregados sistemas de fluxo contínuo baseado no método de focalização hidrodinâmica (MHF). Basicamente a focalização hidrodinâmica consiste no uso de um dispositivo microfluídico de fluxo contínuo com uma geometria de fluxo cruzado ou, mais raramente, com uma geometria coaxial anular 3D (CARUGO et al., 2016; JAHN et al., 2004).

Os lipossomas podem ser produzidos nestes sistemas microfluídicos através da adaptação do método clássico da injeção de etanol, aplicando o escoamento contínuo dos lipídeos dispersos/solubilizados em etanol e de outra corrente aquosa nos microcanais. Assim, há a mistura entre uma corrente orgânica, que consiste em lipídios dispersados em solução de

solvente orgânico (comumente alcoólica), e uma corrente aquosa, normalmente água. Essa mistura ocorre internamente nos canais, com a solução contendo os lipídios sendo hidrodinamicamente comprimida por duas correntes aquosas laterais. A formação dos lipossomas ocorre com a formação de um gradiente de concentração devido à difusão mútua de ambas as fases (AGHAEI; NAZAR, 2019; CARUGO et al., 2016; JAHN et al., 2007).

À medida que ocorre a difusão entre as correntes, os lipídios se tornam menos solúveis no meio aquoso, e se auto agregam formando as bicamadas lipídicas no formato de vesículas, encapsulando parte do meio, como apresentado na Figura 7 (BALBINO et al., 2013).

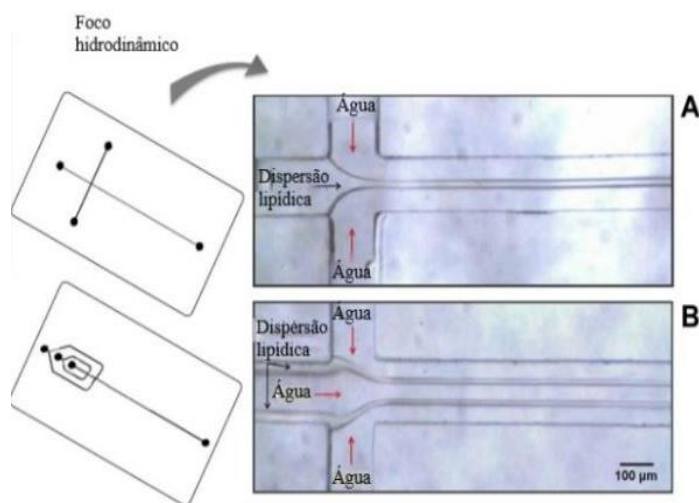
Figura 7 - Representação esquemática da formação de lipossomas em dispositivos microfluídicos



Fonte: Balbino e colaboradores (2013) e De La Torre, Balbino e Sipoli (2017).

Frequentemente são utilizados dispositivos *single*-MHFF (*hydrodynamic flow-focusing microfluidic*) e *double*-MHFF. A Figura 8 mostra um exemplo de dispositivo microfluídico *single*-MHFF (*hydrodynamic flow-focusing microfluidic*) (A), com apenas uma corrente de entrada de lipídios (*single*), e *double*-MHFF (B), com duas correntes de entrada de lipídios (*double*) (AGHAEI; NAZAR, 2019; BALBINO et al., 2013).

Figura 8 - Dispositivos microfluídicos com foco hidrodinâmico



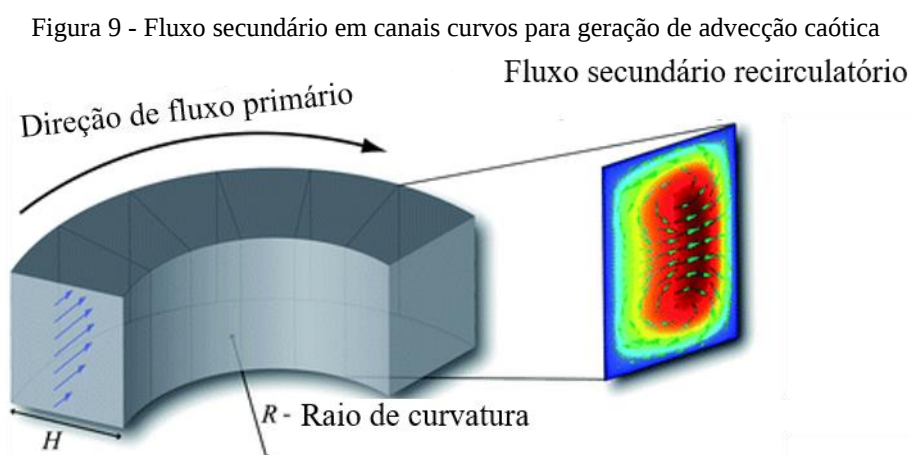
Fonte: Traduzido de Balbino e colaboradores (2013).

Esta técnica MHF começou a ser explorada por Jahn e colaboradores (JAHN et al., 2004, 2007, 2010), e o amplo controle sobre o tamanho das partículas e PDI (índice de polidispersidade) elucidaram as vantagens deste método, e a partir de então, vários trabalhos vêm sendo conduzidos (BALBINO et al., 2013; DE LA TORRE; BALBINO; SIPOLI, 2017; EVERS et al., 2018). Nosso grupo de pesquisa avaliou a produção de lipossomas, e obteve-se características adequadas para entrega de genes e terapia gênica, utilizando dispositivos de foco hidrodinâmico MHF (BALBINO et al., 2013). No entanto, uma das limitações desta técnica é a baixa vazão volumétrica de operação e concentração lipídica (EVERS et al., 2018; HOOD; DEVOE, 2015; MAEKI et al., 2018), com vazões residindo na faixa de $\mu\text{L}/\text{min}$ (BALBINO et al., 2013, 2017; MICHELON et al., 2017). Como o cálculo da produtividade lipídica em microfluídica leva em conta a concentração final e a vazão total de fluxo, como é mostrado na Equação (7), esses parâmetros acabam resultando em produtividades mássicas (g/h) reduzidas em dispositivos MHF ou baseados em difusão, menores que 0,3 gramas de lipídio por hora, conforme os trabalhos encontrados na literatura (FIRMINO et al., 2021). O mesmo cálculo pode ser estendido a outros produtos em microfluídica. Vale ressaltar que em bioprocessos e reatores costuma-se usar o conceito de produtividade como sendo concentração mássica por tempo espacial ($\text{g}/\text{L.d}$) (DE FARIAS SILVA; SFORZA, 2016; HAJBA; GUTTMAN, 2017). No entanto, na microfluídica (processo contínuo), o tempo de processo depende da quantidade de material disponível (massa e concentração) e a vazão utilizada (TFR), podendo ser usado o mesmo conceito de reatores (EŞ et al., 2020) ou em termos mássicos (FIRMINO et al., 2021), uma vez que o cálculo é proporcional a concentração.

$$Produtividade = C_{final} * M_{média} * TFR \quad (7)$$

Quando C_{final} é a concentração molar lipídica final na saída do dispositivo (mol/L), $M_{média}$ é a massa molar média dos lipídios (g/mol) e TFR é a taxa de fluxo total (L/h).

Assim, outra estratégia que pode ser explorada para elevar a vazão de processamento e aumentar a produtividade nos microcanais é a de advecção caótica. A advecção caótica consiste em uma dinâmica de escoamento diferenciada, onde uma partícula é advecada em um campo de velocidade que possui uma trajetória caótica (AREF, 2002; TÓTH et al., 2015). De forma prática, promove-se o entrelaçamento das linhas de corrente, permitindo que os processos de mistura sejam facilitados. A dinâmica das partículas advecadas nos canais acaba sendo caracterizada por alongamentos e dobramentos repetidos (*stretching and folding*), causado pela interação de cisalhamento do fluido no canal com as paredes do mesmo (FROMMELT et al., 2008; SONG et al., 2003). Essa dinâmica causa a recirculação do fluido próximo a parede dentro do microcanal, gerando um fluxo secundário, que pode ser visualizado pela Figura 9, no qual o efeito é mostrado para canais curvos (DI CARLO, 2009). Este fenômeno permite melhorar o controle sobre o processo de mistura e diminuir o tempo de mistura, resultando em maiores produtividades. A advecção caótica normalmente tem sido implementada em sistemas microfluídicos em valores baixos e intermediários de número de Reynolds (BELLIVEAU et al., 2012; SONG et al., 2003).

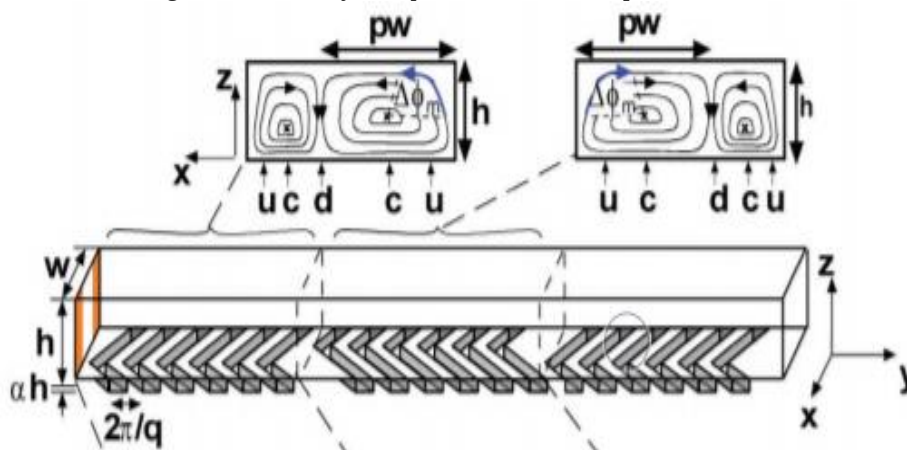


Fonte: Traduzido de Di Carlo (2009).

Um exemplo consolidado na literatura científica de microdispositivo operando com advecção caótica é o *staggered herringbone mixer* (SHM), como apresentado pela Figura 10,

caracterizado por apresentar canais com ranhuras estilo espinha de peixe em sua estrutura (STROOCK et al., 2002).

Figura 10 - Ilustração esquemática de um dispositivo SHM



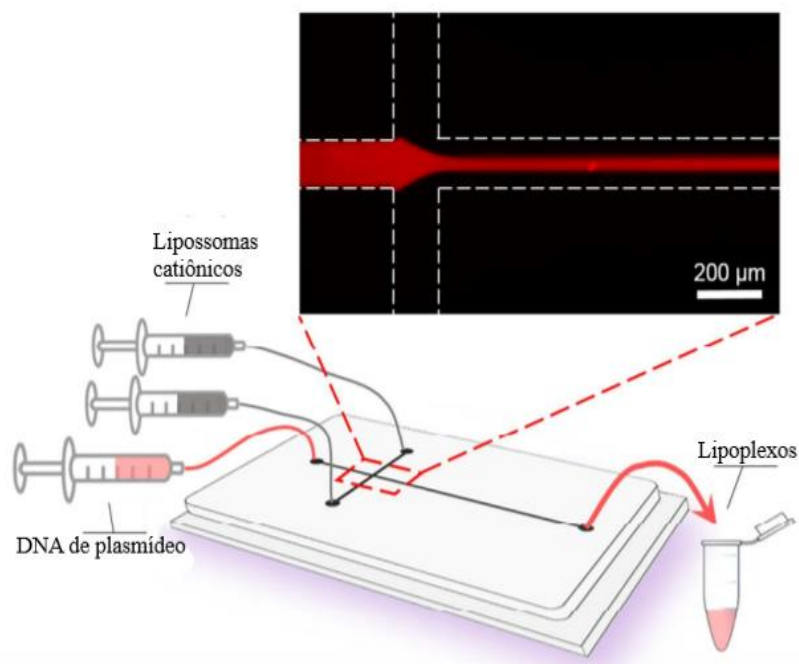
Fonte: Adaptado de Stroock et al. (2002).

Nosso grupo de pesquisa avaliou a produção de lipossomas catiônicos convencionais e do tipo *stealth* utilizando-se da advecção caótica em um dispositivo SHM, combinado com concentradores de vácuo centrífugos (CVC) para remoção do solvente, obtendo-se alta produtividade para ambas as estruturas. Além disso, verificou-se que a advecção caótica é mais eficiente na formação adequada de lipossomas *stealth* quando comparado com dispositivo microfluídico baseado em difusão (D-MD), pois evita a formação de micelas oblatas, devido ao melhor processo de mistura no microcanal que este método propicia (EŞ et al., 2020). Neste trabalho, vazões de 1,5 mL/min puderam ser empregadas para a síntese de lipossomas.

2.3.3 Produção de complexos contendo material genético – lipoplexos com técnicas microfluídicas

A microfluídica tem sido uma potencial ferramenta para produção de complexos lipídios/material genético. Além dos lipossomas, nossa equipe também foca o estudo na formação de lipoplexos. Lipoplexos são formados através da síntese em duas etapas: primeiro há a síntese de lipossomas, e depois a complexação destas nanoestruturas com o material genético. Um esquema de produção de lipoplexo incorporando pDNA nos canais microfluídicos através do foco hidrodinâmico pode ser visualizado na Figura 11.

Figura 11 - Esquema do dispositivo microfluídico para montagem contínua de lipoplexo com pDNA



Fonte: Traduzido de Balbino e colaboradores (2016).

Balbino e colaboradores (2017) sintetizaram lipoplexos pEGFP-N1 (pDNA carregando proteína fluorescente verde intensificada) utilizando múltiplas regiões de foco de fluxo hidrodinâmico (HFF). O sistema microfluídico foi projetado para primeiramente sintetizar os lipossomas, e posteriormente condensá-los com pDNA, no mesmo dispositivo. Os autores conseguiram atingir eficiências de transfecção próximas as obtidas via método *bulk*, cerca de 40%, comprovando a viabilidade do processo para a produção de nanolipossomas e lipoplexos via microfluídica.

Em termos da formação de complexos lipossoma catiônico/RNA, Eş e colaboradores (2018) avaliaram a incorporação de *small interfering* RNA (siRNA) em lipossomas compostos de fosfolipídios EPC, DOTAP e DOPE, na razão molar de 2:1:1 respectivamente. A complexação ocorreu em modo *bulk*, mas os lipossomas foram produzidos através de um dispositivo de foco hidrodinâmico, e observaram praticamente nenhuma citotoxicidade dos lipoplexos e um silenciamento (*knockdown*) significativo de luciferase.

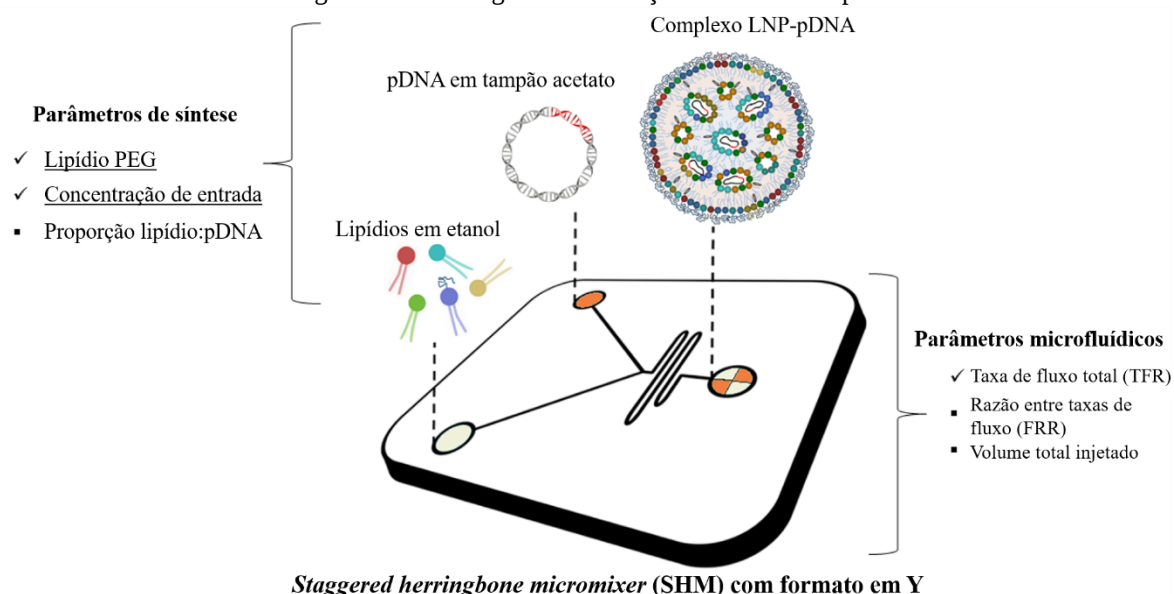
2.3.4 Produção de complexos contendo material genético – *lipid nanoparticles* com técnicas microfluídicas

LNPs podem ser formadas através da mistura em uma única etapa entre fase orgânica contendo lipídios e fase aquosa contendo o ácido nucleico (CULLIS; HOPE, 2017; EVERS et

al., 2018). LNPs possuem um amplo potencial de fabricação por microfluídica, ganhando cada vez mais atenção na área de *gene delivery*, e sua aplicação é principalmente focada na entrega de RNA. A principal razão para isto reside no fato que o DNA precisa atingir o núcleo para conferir sua propriedade terapêutica. Já a maioria dos RNAs aplicados à terapia gênica, como mRNA, siRNA, microRNA (miRNA) e SAM, apenas precisam atingir o citoplasma para promover a expressão da proteína ou inibição (CARVALHO et al., 2020; LI; SZOKA, 2007; YIN et al., 2014). No entanto, atualmente investigações para entrega de DNA também vêm sendo conduzidas.

Kulkarni e colaboradores (2017) estudaram diversas composições de LNPs para o *delivery* de pDNA carreando EGFP ou *firefly* luciferase (FLuc) para explorar como a composição lipídica pode afetar a eficiência de transfecção em linhagens de células de mamíferos e células primárias. Sintetizadas a partir de um micromisturador de junção em T, as LNPs contendo lipídios amino ionizáveis se provaram sistemas de entrega mais eficientes e não tóxicos para pDNA, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com expressão acima de 85% de GFP. Mucker e colaboradores (2020) utilizaram um dispositivo *Nanoassemblr*® *microfluidic device* para produção de LNPs com lipídios DSPC (7%), lipídio amino ionizável ATX® (58%), colesterol (33.5%) e DMG-PEG (1,2-Dimiristoilsn-glicerol, metoxipolietilenoglicol, massa molecular da cadeia PEG: 2000) (1.5%), incorporando pDNA pWRG/c7d11, e concluíram que é possível usar LNPs para produzir vacina de DNA mais potente para Andes virus (ANDV) e Zika virus (ZIKV), capaz de produzir anticorpos neutralizantes elevados em coelhos e primatas. Já Quagliarini e colaboradores (2021) utilizaram um dispositivo SHM com formato em Y com duas entradas para sintetizar pDNA (GL3)-LNPs, conforme Figura 12. Os autores viram que a PEGlação e concentração de amostra foram importantes para se obter LNPs de tamanho pequeno e homogêneas com alta eficiência de transfecção e menor citotoxicidade em células HEK-293. Além disso, a taxa de fluxo total impactou as propriedades físico-químicas e níveis de transfecção adquiridas. Com isso, importantes aspectos podem e vêm sendo explorados para diminuir a lacuna deixada em aplicações de LNPs envolvendo DNA.

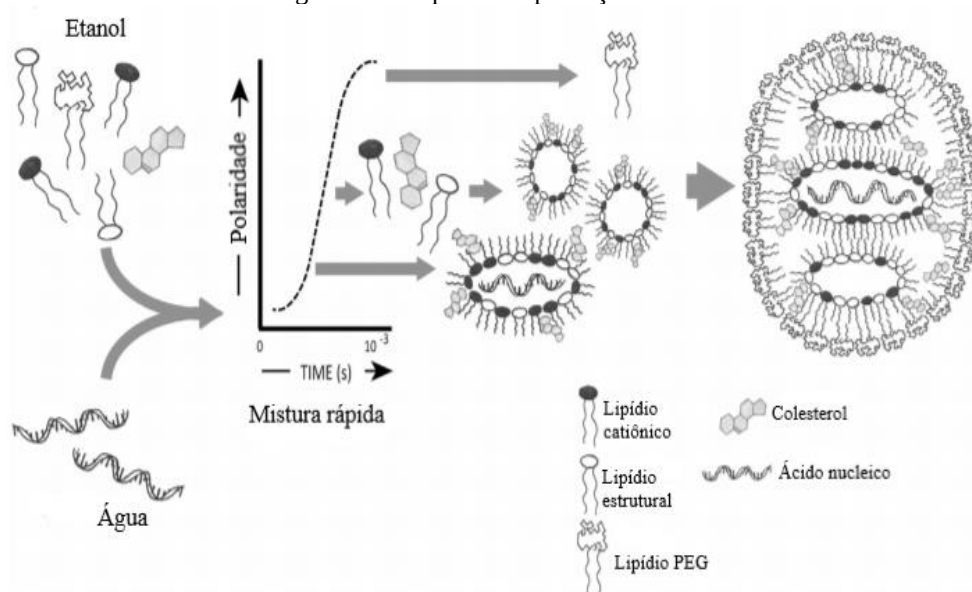
Figura 12 - Estratégia de formulação de LNPs com pDNA



Fonte: Traduzido de Quagliarini e colaboradores (2021).

A Figura 13 apresenta um esquema de produção de LNPs que pode ocorrer nos canais microfluídicos, onde normalmente utiliza-se processos envolvendo advecção caótica. Observa-se que o aumento súbito da polaridade do ambiente das moléculas de lipídios leva à supersaturação, e acredita-se que resulte na formação de LNPs (EVERS et al., 2018). A estrutura final típica costuma ser um núcleo denso de elétrons constituído pelos ácidos nucleicos circundados por lipídios predominantemente catiônicos, no formato de micelas invertidas, e externamente a isso uma monocamada de lipídios estruturais circundada por lipídios PEGlados ancorados na nanopartícula. Neste caso, a microfluídica é uma ferramenta essencial para a síntese de LNPs, pois esta requer o controle rigoroso dos processos de mistura, pois é esse controle no aumento da polaridade e a rápida mistura que permite a apropriada interação entre material genético e os lipídios catiônicos, que formam o *core* sem que haja tempo para que as micelas invertidas formadas se agreguem, e em vez disso, há a posterior precipitação dos lipídios PEGlados que circundam a nanopartícula (CULLIS; HOPE, 2017; EVERS et al., 2018; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020).

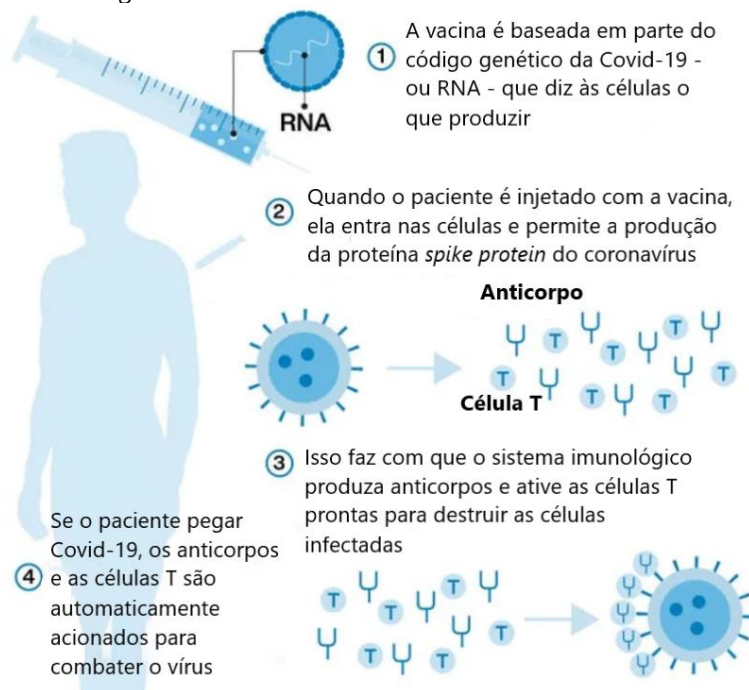
Figura 13 - Esquema de produção de LNPs



Fonte: Traduzido de Cullis e Hope (2017).

Com relação a RNA-LNPs, recentemente pôde-se perceber um avanço significativo no desenvolvimento de LNPs para vacinação, impulsionado, em boa parte, pela necessidade de combate à crise sanitária da COVID-19, como é o caso das vacinas da Pfizer (BioNTech) e da Moderna, ambas relacionadas à entrega de RNA através de LNPs, e seu funcionamento pode ser visualizado pela Figura 14 (DAMMES; PEER, 2020; ROCES et al., 2020). Em comparação com outros tipos de vacinas, as vacinas baseadas em mRNA podem ser rapidamente produzidas a baixo custo, uma vez que se tenha as informações sobre a sequência do gene do patógeno infeccioso (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021). Com isso, apesar da maior parte dos ensaios clínicos atuais abrangerem o uso de siRNA e mRNA, dezenas de outros candidatos terapêuticos de RNA também entraram em fases de testes clínicos (DAMMES; PEER, 2020). Nesse sentido, a microfluídica tem sido muito utilizada.

Figura 14 - Funcionamento da vacina Pfizer/BioNTech

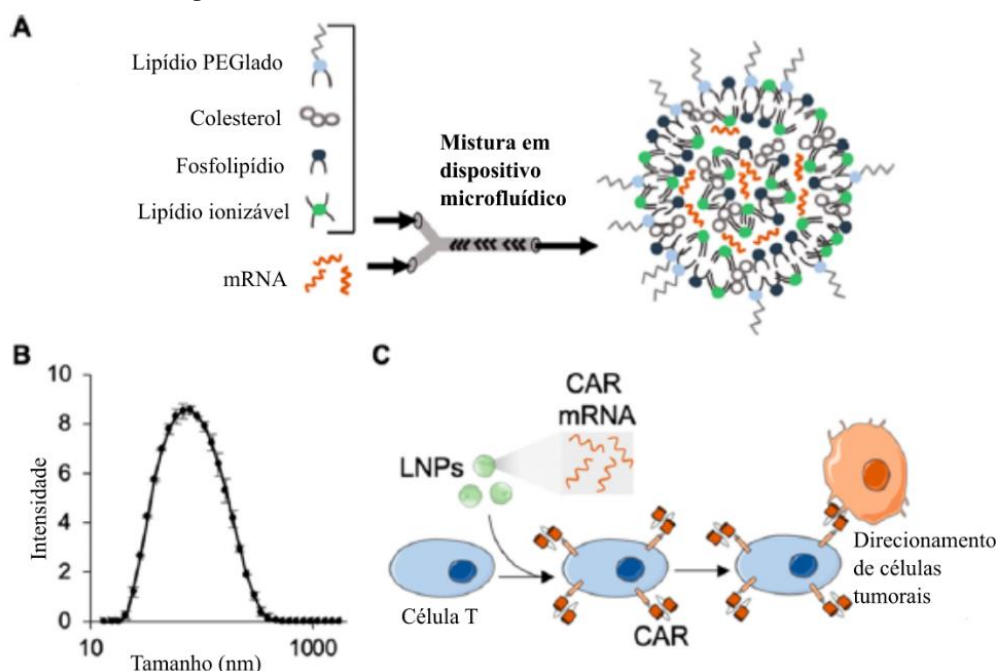


Fonte: Traduzido de Itv (2020).

Patel e colaboradores (2019) utilizaram a microfluídica (dispositivo e método de mistura não especificado) e diversos lipídios conhecidos na seguinte proporção: lipídio ionizável (Dlin-MC3-DMA (MC3), Dlin-KC2-DMA (KC2) e 1,2-dioleiloxi-3-dimetilaminopropano (DODMA)) ou catiônico (DOTAP, N-(4-carboxibenzil)-N,N-dimetil-2,3-bis (oleoiloxi) propan-1-amínio (DOBAQ) e 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamônio propano (DOTMA)) (50%), DSPC (10%), DMG-PEG2k (1,5%) e colesterol (38,5%), para produzir diversas LNPs e compará-las para a entrega de mRNA para terapia gênica aplicada para os olhos. Os autores observaram que as LNPs que continham lipídios ionizáveis com baixo pKa (MC3 e KC2) e cadeias de hidrocarbonetos insaturados mostraram a maior quantidade de transfecção do gene repórter na retina após uma injeção sub-retiniana. Billingsley e colaboradores (2020) sintetizaram iLNPs contendo mRNA para entrega em células T (Figura 15 (C)) através de dispositivo microfluídico (Figura 15 (A)), produzindo diâmetro de partículas em torno de 70 nm (Figura 15 (B)). Os autores demonstraram a capacidade das LNPs de entregar mRNA às células T humanas primárias para induzir a expressão de proteínas funcionais, indicando o potencial das LNPs em melhorar os métodos de engenharia de células T CAR (*chimeric antigen receptor* - receptor de antígeno quimérico) baseados em mRNA. Riley e colaboradores (2021) também produziram iLNPs contendo mRNA, através de dispositivo *herringbone* para induzir

advecção caótica no canal microfluídico, visando aplicação no útero, conseguindo prover uma plataforma para entrega de mRNA para substituição de proteínas e edição de genes.

Figura 15 - Síntese de LNPs de mRNA via rota microfluídica



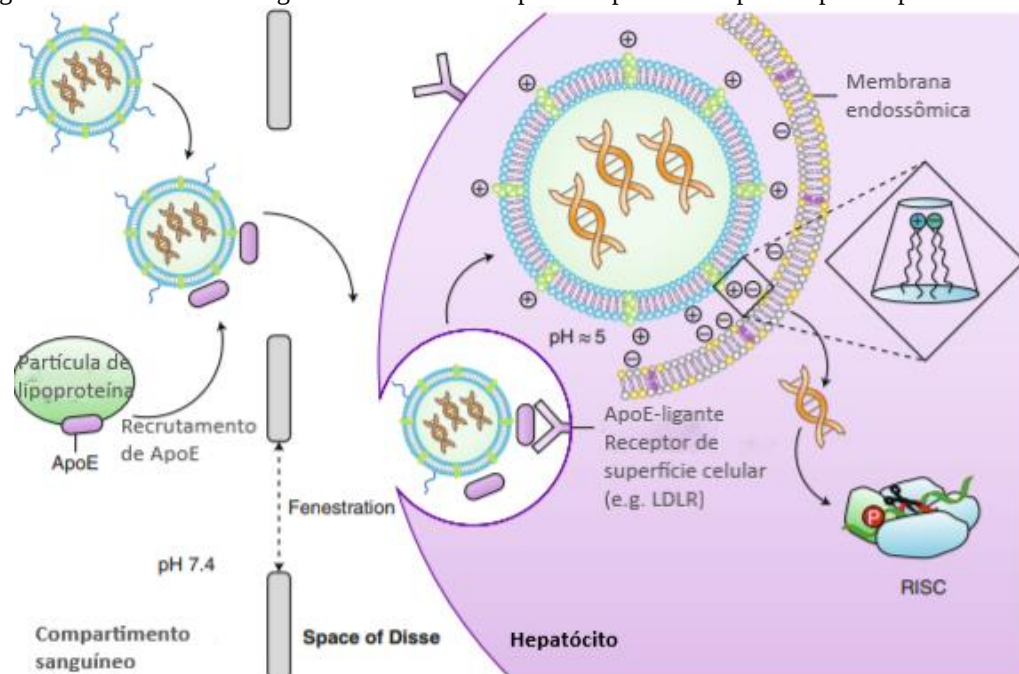
Fonte: Traduzido de Billingsley e colaboradores (2020).

Modificações químicas também podem ser realizadas para melhorar o *delivery* de RNA, aumentar a expressão da proteína e a sua atividade (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; SAHIN; KARIKÓ; TÜRECI, 2014). Nesse sentido, o SAM pode induzir expressão proteica local e atividade prolongada com doses menores do que o mRNA convencional (BLOOM; VAN DEN BERG; ARBUTHNOT, 2021; GEALL et al., 2012). Uma vez no citoplasma, o SAM funciona como um molde de tradução para produzir a RNA polimerase e, em seguida, fazer várias cópias idênticas da fita de RNA original (HOU et al., 2021; PUSHKO et al., 1997). Lou e colaboradores (2020) utilizaram um dispositivo *Micromixer* espinha de peixe escalonado em forma de Y (*Y-shaped staggered herringbone*) para *delivery* de uma vacina de RNA de auto-amplificação (*self-amplifying RNA (SAM)*) com LNPs catiônicos em duas composições diferentes: 1) DOPE, um lipídio catiônico e DMG-PEG2000 na razão molar de 49:49:2 e 2) DSPC, colesterol, um lipídio catiônico e DMG-PEG2000 na razão molar de 10:48:40:2 respectivamente, e obtiveram altas expressões de antígeno, bem como as formulações interagiram com as células *in vitro*.

As primeiras aplicações das LNPs, e que continuam muito em alta, são referentes à entrega de siRNA. Inicialmente, através do desenvolvimento e aprovação do Onpatro®

(patisiran) em 2018 pela FDA, as LNPs se consolidaram como os transportadores mais avançados e adequados para a entrega de siRNA *in vivo* (AKINC et al., 2019; ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; DAMMES; PEER, 2020). A razão pela qual as LNPs foram tão bem-sucedidas no silenciamento do gene hepático foi devido à capacidade das LNPs ionizáveis de adsorver a apolipoproteína E (ApoE) na circulação, através de administração intravenosa, dando origem a um ligante de direcionamento natural que se liga com alta afinidade ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL), que é amplamente expresso em hepatócitos, desencadeando assim a absorção por endocitose, conforme Figura 16 (AKINC et al., 2019; DAMMES; PEER, 2020; JAYARAMAN et al., 2012). Após atingir o citoplasma, siRNA interage com o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), e então, o RISC é guiado para o mRNA alvo, que é reconhecido e clivado ou bloqueado para tradução (DYKXHOORN; LIEBERMAN, 2006; EVERS et al., 2018). No final de 2019, um segundo medicamento de siRNA, o Givosiran, foi aprovado (DAMMES; PEER, 2020). Desta maneira, fica evidenciado a eficiência das LNPs no silenciamento hepático (KULKARNI et al., 2019; SHEPHERD et al., 2021).

Figura 16 - Modelo de entrega de siRNA mediada por nanopartículas lipídicas para hepatócitos *in vivo*

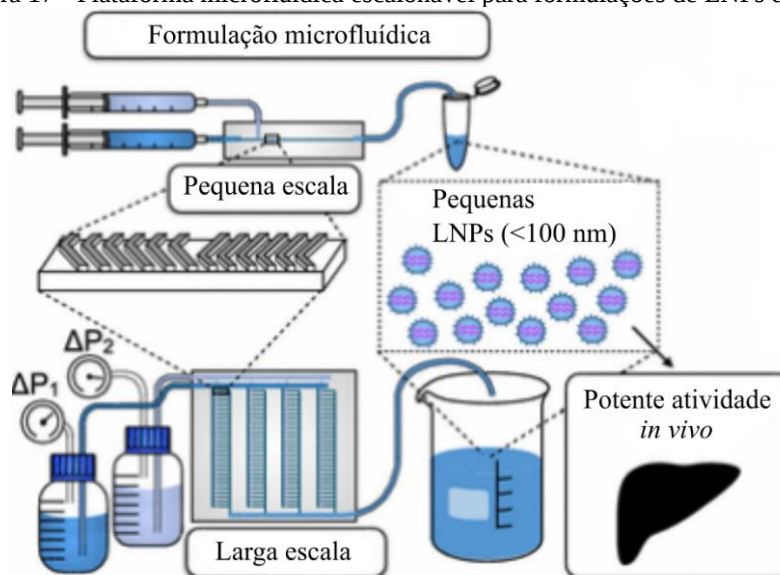


Fonte: Traduzido de Akinc e colaboradores (2019).

A microfluídica pode ser utilizada também para a entrega de siRNA, como demonstraram Shepherd e colaboradores (2021), os quais utilizaram um dispositivo SHM baseado em PDMS para mistura rápida, conforme Figura 17. Os autores também avaliaram o

aumento de escala através da técnica de paralelização dos dispositivos, conseguindo gerar formulações de LNPs escalonáveis e reproduzíveis, necessárias para aplicações clínicas emergentes, incluindo RNA terapêutico e vacinas.

Figura 17 - Plataforma microfluídica escalonável para formulações de LNPs de RNA



Fonte: Traduzido de Shepherd e colaboradores (2021).

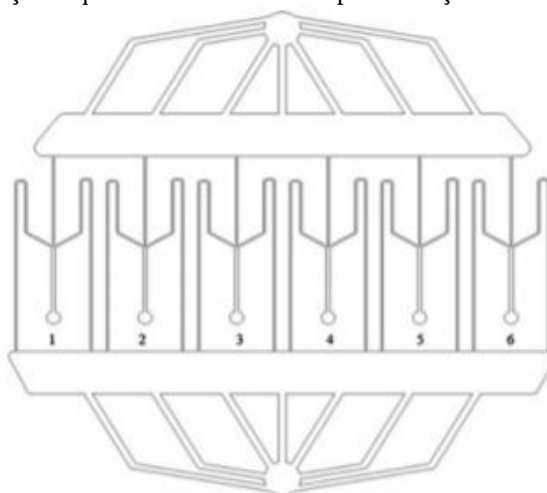
Como é possível observar pelos trabalhos citados, as LNPs são comumente produzidas utilizando-se o fenômeno da advecção caótica, não sendo encontrada evidências do uso de foco hidrodinâmico para a produção de *lipid nanoparticles*.

2.3.5 Estratégias para aumento de produção e amplificação de escala em processos microfluídicos

Apesar dos dispositivos microfluídicos conseguirem sintetizar nanopartículas com menores tamanhos e com maior uniformidade comparado aos métodos *bulk*, a produtividade ainda é muito baixa, na ordem de $\mu\text{L}/\text{min}$ para dispositivos MHF baseados em difusão (BALBINO et al., 2013; EŞ et al., 2020), devido as características de fluxo laminar e baixas quantidades de fluido manipulado com o tempo (HOOD; DEVOE, 2015). Com a crescente busca e validação das nanopartículas como potentes veículos para *drug* e *gene delivery system*, há a necessidade de viabilizar a produção a nível industrial, ao mesmo tempo que mantendo as vantagens oferecidas pela microfluídica (LU et al., 2016). Portanto, uma alternativa atrativa é o *numbering-up* (ampliação de escala) pela técnica de paralelização dos dispositivos microfluídicos.

Esta técnica de paralelização permite o aumento de produtividade pela integração de diversas cópias de um mesmo dispositivo em um único chip, usando-se um conjunto de unidades bombecedores de fluído (seringas) (ROMANOWSKY et al., 2012). Um dos desafios impostos por esta técnica é conciliar a taxa de produção desejada minimizando a quantidade de bombeamento necessário (MULLIGAN; ROTHSTEIN, 2012). Uma representação esquemática da paralelização de dispositivos pode ser visualizada na Figura 18.

Figura 18 - Representação esquemática da técnica de paralelização de dispositivos microfluídicos



Fonte: Mulligan e Rothstein (2012).

Jeong, Issadore e Lee (2016) e Tetradis-Meris e colaboradores (2009) discutiram sobre técnicas de paralelização para formação de emulsões. Porém, na área de produção de *lipid nanoparticles*, a técnica ainda é pouca difundida, e a produtividade necessária para atender a operação em escala comercial permanece como um gargalo a ser superado (SHEPHERD et al., 2021).

Outra técnica que vem sendo analisada é a modularização de sistemas em microescala. Nesta técnica, microcanais ou microreatores são paralelizados e essas estruturas são empilhadas de tal forma que um módulo é criado (BILLO et al., 2015). Além disso, vários módulos podem ser integralizados de maneira a elevar a taxa de produção em três níveis. No entanto, para sua aplicação em microfluídica, primeiro faz-se necessário encontrar um meio de paralelizar o sistema microfluídico (HAN et al., 2017; SHEPHERD et al., 2021).

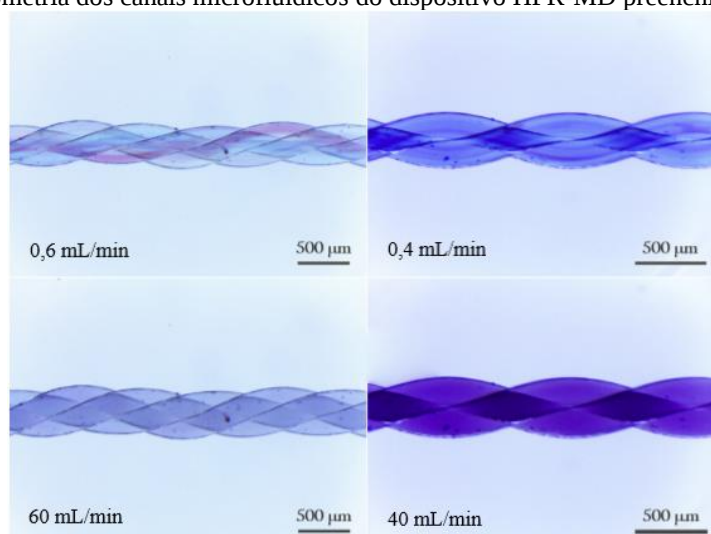
Por fim, também há a estratégia de aumentar as dimensões dos canais, mas mantendo as mesmas características de mistura rápida e transferências de calor e massa encontrados nas dimensões características da microescala. Com isso, é possível elevar a produtividade sem que haja o comprometimento nas características de transporte e fluxo dentro dos canais de mistura.

Além disso, esta técnica reduz a propensão ao entupimento dos canais (SANTANA; SILVA; TARANTO, 2019; WARKIANI et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

Independentemente do método de escalonamento a ser utilizado, antes de iniciar seu estudo de implementação faz-se importante encontrar o processo que garanta a formação adequada das nanopartículas na máxima vazão volumétrica e concentração lipídica. Assim, é interessante ampliar alternativas do uso da advecção caótica e aumento da vazão nos canais.

Dispositivos do tipo *herringbone*, apesar de amplamente utilizados, apresentam complexidade de microfabricação, e assim, novos dispositivos que permitam simplificar a construção sem necessidade de sala limpa (*cleanroom*), e aumentar a capacidade de produção podem ser pesquisados. Como exemplo de alternativas mais simples para o emprego da advecção caótica, pode-se citar o trabalho de De Camargo e colaboradores (2016) que utilizou vazões entre 0,6 e 60 (mL/min) em um dispositivo microfluídico HFR-MD (*high flow rate microfluidic device*) elaborado pelo método PSR (*polymerization and scaffold removal*) para extrações líquido-líquido, e obtiveram alta produtividade de emulsões, corroborando para com as vantagens desta técnica previamente citadas. A geometria utilizada pelos autores pode ser visualizada pela Figura 19. Este mesmo dispositivo foi adaptado por Firmino e colaboradores (2021) para a produção de lipossomas de alta produtividade, com polidispersidade baixa e tamanho adequado para aplicação ($\sim 176,4$ nm de diâmetro). Vale ressaltar que esta geometria ainda não foi utilizada para a produção de lipossomas catiônicos, lipoplexos e LNPs.

Figura 19 - Geometria dos canais microfluídicos do dispositivo HFR-MD preenchidos com corantes



Fonte: Adaptado de De Camargo e colaboradores (2016).

Outra alternativa à paralelização é demonstrada por Webb e colaboradores (2020), que utilizaram um dispositivo que permite a produção de nanopartículas em vazões que variam de

1 mL até 20 (L/h). Este dispositivo é chamado de *toroidal mixer*, e se baseia na criação de advecção caótica usando estruturas circulares dentro do caminho de fluxo. Além disso, também há micromisturadores em espirais (TRIPATHI; PATOWARI; PATI, 2021) e osciladores (XIA et al., 2015).

Assim, a busca de processos eficientes que garantam elevada produtividade e que sejam factíveis de serem implementados em indústrias para a sínteses de lipossomas catiônicos, do tipo *stealth* e *lipid nanoparticles*, pode contribuir para o desenvolvimento tecnológico e eliminar gargalos de produção, como o caso da pandemia que vivemos atualmente e que requer elevados índices de produção de vacinas gênicas. Ou seja, compreender os fenômenos existentes na síntese dessas nanoestruturas contribuí para o desenvolvimento racional de operações unitárias que possam suprir as necessidades mundiais de produção e a busca por processos eficientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Os lipídios L- α -fosfatidilcolina de ovo (EPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) foram adquiridos da Lipoid (Ludwigshafen, Alemanha). 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenoglicol)-2000] (DSPE-PEG 2000) foi obtido pela Sigma-Aldrich Brasil. Foi usado tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 da Laborclin. Etanol absoluto (99,5%) foi adquirido da Labsynth (Diadema, SP, Brasil), e foi utilizado após processo de desidratação, seco em uma peneira molecular de 3 Å adquirida da Sigma-Aldrich. Para a fabricação do microdispositivo HFR-MD de PDMS, usou-se o Sylgard 184 Silicon Elastomer Kit da Dow Corning (Midland, MI, USA). pDNA de luciferase (pDNA-Luc) foi fornecido pelo grupo do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo.

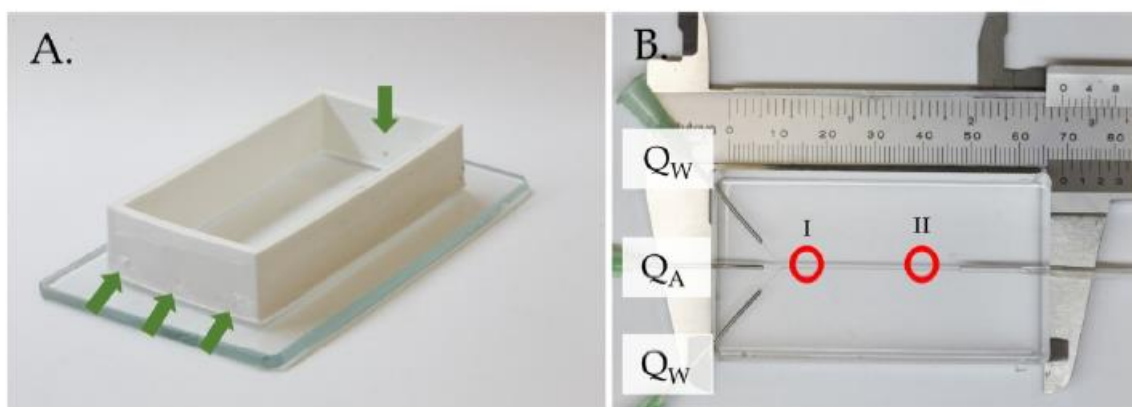
3.2 MÉTODOS

3.2.1 Dispositivo microfluídico HFR-MD (*High Flow Rate Microfluidic Device*)

Foi utilizado um dispositivo de PDMS baseado no método PSR do trabalho de De Camargo e colaboradores (2016) e Firmino e colaboradores (2021) para os testes com advecção caótica, para síntese dos lipossomas, lipoplexos e LNPs. A geometria em espiral dos canais pode ser visualizada pela Figura 19. Inicialmente é fabricado o molde plástico composto pelas bases laterais e de vidro. A forma lateral é confeccionada em impressora 3D com tecnologia de impressão por extrusão. O polímero usado na impressora é o ácido polilático (PLA) atóxico. A moldura lateral impressa tem dimensões 7,8 cm x 4,1 cm x 1,6 cm e 0,4 cm de espessura, conforme Figura 20 (A). A base de vidro tem 7 cm x 10 cm. A forma lateral é aderida à base de vidro após adicionar uma pequena quantidade do próprio material de fabricação do microdispositivo (PDMS) e curar por cerca de 30 minutos na estufa a 60°C. Posteriormente, esse método consiste em utilizar três fios de *nylon* com 200,0 μ m de diâmetro, os quais são inseridos nos orifícios da peça de molde (*scaffold*). Estes são unidos e esticados na extremidade oposta contendo um único orifício no centro, ao qual os fios também são fixados. Os fios são então torcidos e passam a ocupar o que posteriormente gera o microcanal (entradas). É possível controlar o número de torções médias (65 ± 5 torções) para garantir a reprodutibilidade da

fabricação. O molde é então preenchido com uma mistura de monômeros de PDMS e agente de cura na proporção 10:1 razão mássica. Posteriormente, o PDMS é curado em uma estufa de laboratório (90°C por 40 minutos). Os fios de *nylon* são então retirados com o auxílio de uma pinça, os quais formam o microcanal torcido, com cerca de 3,5 cm de canal trançado. Após essa etapa, com o auxílio de um bisturi, o microdispositivo é destacado da base lateral e liberado do molde. Por fim, um pequeno tubo (mangueira) é inserido no canal de saída e agulhas nos canais de entrada (Figura 20 (B)). Após essa etapa, o microdispositivo se encontra pronto para uso.

Figura 20 - Dispositivo HFR-MD. (A) Molde produzido por impressão 3D aderido à base de vidro para fabricação do dispositivo. As setas verdes indicam as três entradas e a saída do microdispositivo. (B) Microdispositivo com agulhas nas entradas e mangueira ligada à saída. Q_W representa a corrente aquosa e Q_A a corrente alcoólica. As posições I e II representam o início da junção dos três canais de entrada e 2,5 cm a jusante, respectivamente.



Fonte: Firmino e colaboradores (2021).

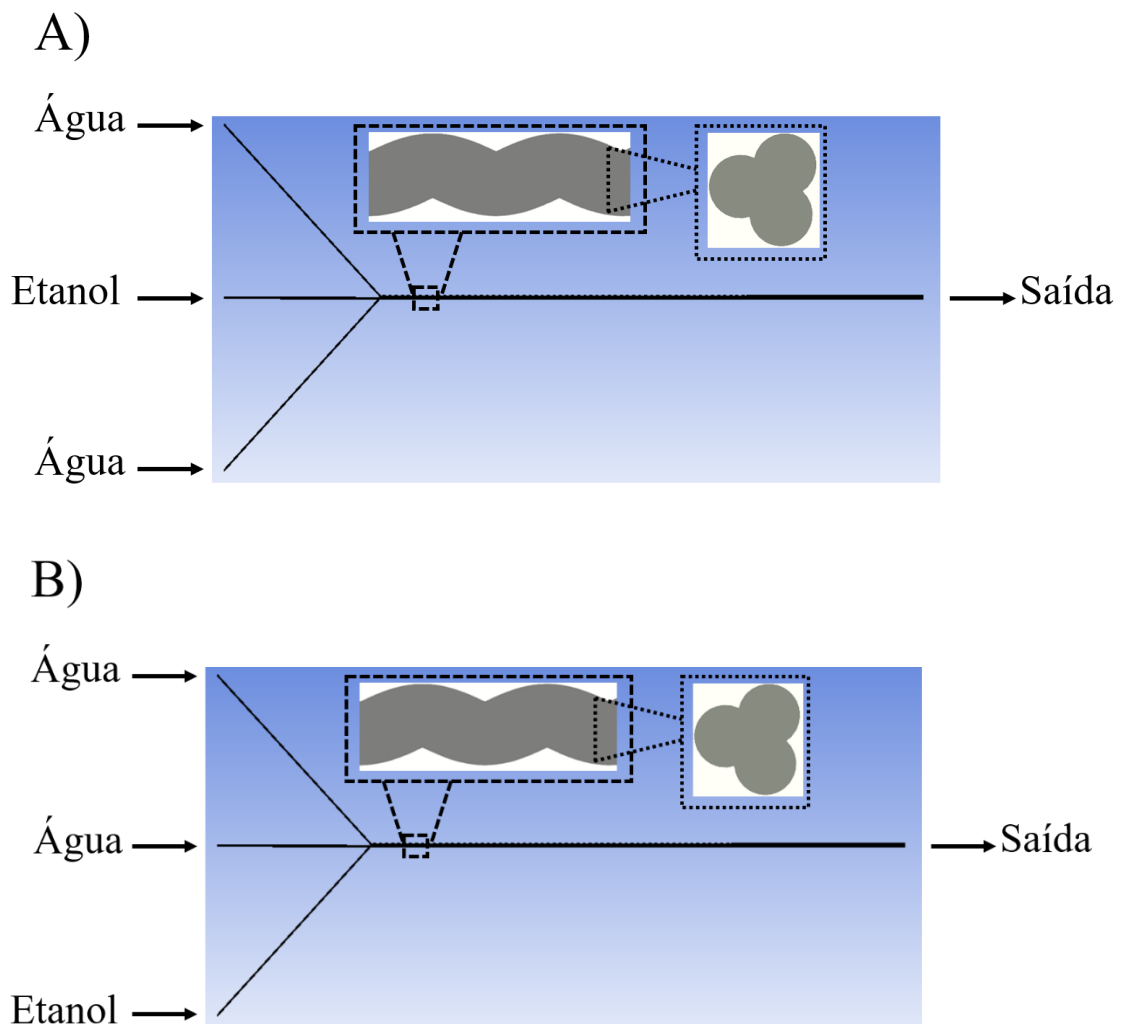
As configurações do dispositivo utilizadas ao longo do trabalho podem ser verificadas na Figura 21, sendo a configuração padrão (A) consistindo em corrente orgânica central e correntes laterais aquosas, e com barreira difusiva (B) consistindo em corrente central aquosa e uma corrente lateral orgânica, no qual a corrente de etanol (orgânica) simula a corrente com lipídios ou lipossomas, seja no centro ou na lateral, dependendo do tipo de estrutura a ser sintetizada. Já as correntes laterais de água simulam a corrente que contém material genético (pDNA) ou apenas água pura no caso dos lipossomas, e quando seu uso se faz na corrente central, esta atua como barreira difusiva de água pura. Além disso, também foram estudadas razões entre taxas de fluxo (FRR) 1 e 10. A FRR representa a razão entre a vazão volumétrica (Q) das correntes laterais e a vazão volumétrica da corrente central, considerando Q_W a vazão volumétrica da corrente aquosa de água e Q_L a vazão volumétrica da corrente orgânica alcoólica, conforme Equação (8), sendo FRR_P o cálculo para a configuração padrão e FRR_B para a presença de barreira difusiva. Taxas de fluxo total (TFR) entre 0,2 e 20 mL/min foram

avaliadas. A TFR é a soma total dos fluxos das correntes aquosas e orgânica, conforme Equação (9).

$$FRR_P = \frac{2Q_w}{Q_L} \quad FRR_B = \frac{Q_w + Q_L}{Q_w} \quad (8)$$

$$TFR = Q_w + Q_w + Q_L \quad (9)$$

Figura 21 - Configurações do dispositivo HFR-MD estudadas e imagens da geometria do canal microfluídico. Configuração padrão (A) e com barreira difusiva (B).



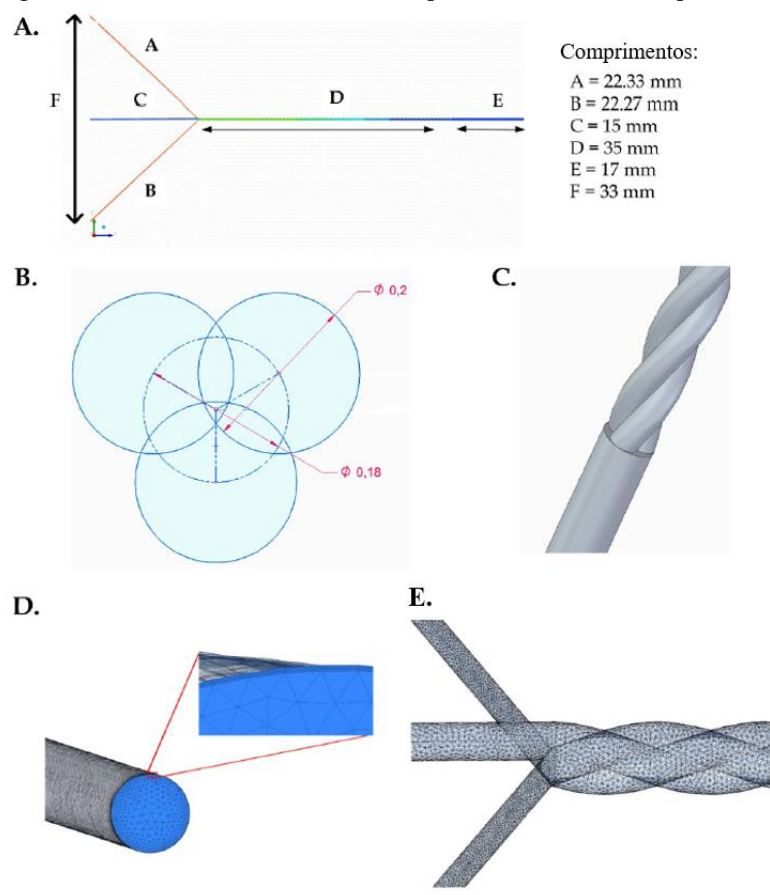
3.2.2 Simulação computacional e parâmetros adimensionais

A fluidodinâmica no HFR-MD foi avaliada computacionalmente e experimentalmente. Inicialmente foram realizadas simulações com CFD para descobrir os limites de processamento:

vazão mínima que garanta a advecção caótica e vazão máxima que garanta a formação das *lipid nanoparticles* no HFR-MD, avaliando o perfil gerado pela mistura das correntes de etanol e água, sem considerar a influência dos lipídios e material genético na transferência de massa, e considerou-se a formação dos lipossomas e demais nanoestruturas como sendo consequência da mistura etanol-água. Essa hipótese foi baseada em outros trabalhos da literatura que consideraram a predição de formação de nanoestruturas a partir da mistura entre fases aquosas e orgânicas (FIRMINO et al., 2021; LI et al., 2018).

A geometria utilizada é a mesma proposta por Firmino e colaboradores (2021). A geometria foi criada em um software *computer aided design* (CAD), Solid Edge. A Figura 22 apresenta as dimensões e o perfil da geometria utilizada. Região E abrange a saída do dispositivo, sendo um cilindro medindo 0,38 mm de diâmetro externo. Regiões A, B e C foram criadas como simples circunferências medindo 0,20 mm de diâmetro. A região D compreende as três circunferências medindo 0,20 mm de diâmetro (externo), cujos centros são colocados a 0,18 mm e espaçados por 120 graus (Figura 22 (A) e (B)), indo até a junção com a região E (Figura 22 (C)).

Figura 22 - Estrutura e dimensões do dispositivo HFR-MD computacional



Fonte: Traduzido de Firmino e colaboradores (2021).

A malha foi construída usando o ANSYS Meshing. Elementos tetraédricos foram gerados para capturar os detalhes da geometria (Figura 22 (D)). O refinamento (*inflation*) das bordas foram realizadas de modo a assegurar que os gradientes gerados na mistura fossem bem captados. Para isso, o *inflation* automático foi realizado, no qual a variação do número de camadas (*maximum layers*) foi estudada: 5; 10 e 15 camadas, de modo a obter-se a malha com melhor relação precisão/tempo computacional, sem que houvesse sobrecarga de esforço computacional. Tal implementação e análise são mostradas na seção 4.1.1.1 de resultados. A seleção da geometria do elemento da malha foi baseada na característica complexa do domínio computacional cuja curvatura da topologia do microcanal representou um desafio adicional (Figura 22 (E)).

O tamanho de elemento mínimo escolhido foi de 2×10^{-2} mm e máximo de 1×10^{-1} mm, baseado na malha validada por Firmino e colaboradores (2021). A malha foi gerada automaticamente. De maneira análoga, a taxa de crescimento (*growth rate*) foi estabelecida como 20%.

O conjunto de equações governantes de transporte de fluidos foram resolvidas: equação da continuidade (Equação (4)), Navier-Stokes (Equação (5)) e transporte de espécies (Equação (6)), como apresentado anteriormente na seção 2.3.1.1. Para tal, considerou-se uma mistura etanol e água em regime laminar, fluidos incompressíveis e Newtonianos, pressão atmosférica padrão, estado estacionário, sem efeitos de gravidade e flutuabilidade, condição de não deslizamento nas paredes do sólido e transferência de calor desprezível. Resolveu-se a equação de transporte de espécies químicas apenas para a água, considerando-se a difusividade cinemática de acordo com a razão etanol-água, e a fração de etanol pôde ser obtida através de balanço material.

As velocidades médias de entrada de etanol e água foram calculadas considerando-se suas respectivas vazões de entrada e a área de seção transversal (A_{ST}) das entradas do dispositivo, conforme Equação (10).

$$A_{ST} = \pi \cdot r^2 \quad (10)$$

Sendo r o raio da circunferência de entrada (100 μm) deste dispositivo.

Na saída considerou-se pressão estática zero. Os termos de convecção das equações de transporte foram discretizados usando esquema *upwind*, cujo critério de convergência foi estipulado como 1×10^{-6} , para garantir rigorosidade e confiabilidade sem demandar esforço

computacional excessivo. Ademais, considerando a natureza difusiva-convectiva do problema, a estratégia de discretização foi baseada no método dos volumes finitos (FIRMINO et al., 2021; GLATZEL et al., 2008; TRIPATHI; PATOWARI; PATI, 2021).

A solução foi obtida considerando-se as condições iniciais e dupla precisão (*double precision*), sendo estipulado um máximo de 1000 iterações.

Um tutorial exemplificativo mostrando o passo a passo de uma simulação pode ser visualizada no Apêndice I.

Além disso, com os dados provenientes das simulações foram calculados os índices de mistura (Equações (11) e (12)), perfis de mistura e velocidade ao longo da seção transversal. Foi utilizado o software ANSYS CFX® 2020 para a simulação. Valor residual da média quadrática (RMS) inferior a 10^{-6} foram estipulados para fornecer um alto rigor de convergência da solução (ALAM; AFZAL; KIM, 2014). Efeitos de malha foram analisados na predição dos resultados, bem como diferentes razões entre taxas de fluxo (FRRs), TFRs e configuração das correntes de entrada do dispositivo. Por fim, os dados de fração volumétrica foram retirados para o cálculo do índice de mistura (I.M.) para a fração de volume de etanol, cujos dados planilhados foram fornecidos pelo ANSYS CFX®. A fórmula utilizada para o I.M. está descrita nas Equações (11) e (12).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (c_i - c_m)^2}{N}} \quad (11)$$

$$I.M. = 1 - \sqrt{\frac{\sigma^2}{\sigma_{máx}^2}} \quad (12)$$

Onde σ é a variância do conjunto dados, N é o número de pontos amostrais, c_i é a fração de volume de etanol pontual e c_m é a fração de volume de etanol média. A variância máxima ($\sigma_{máx}$) foi considerada como sendo a maior variância do conjunto de dados, sendo obtida na região mais próxima da junção (AFZAL; KIM, 2014; ALAM; AFZAL; KIM, 2014). Imagens dos índices de mistura ao longo do microcanal foram elaboradas com o software OriginPro® 8.5.

Os perfis de concentração de etanol foram retirados considerando-se um plano nos eixos X (altura) e Y (largura), em diversos comprimentos de canal (eixo Z), bem como foram obtidas imagens no plano Y e Z, passando por $X = 0$ cm (meio do canal), para análise ao longo do

comprimento. Já para o perfil de velocidade do etanol ao longo da largura do canal, os dados foram obtidos considerando-se a largura do canal em um comprimento de 2 cm e altura de 0 cm (meio), considerando que é uma largura onde o perfil de velocidade se encontra totalmente desenvolvido, cujas imagens foram elaboradas no software OriginPro® 8.5.

Para o cálculo do número de Reynolds (Equação (1)), considerou-se a fração de etanol na mistura ($X_e = 0,5$ para configuração original e $X_e = 0,25$ para configuração com barreira difusiva), respectivas densidades e viscosidades da solução (893,5 [kg/m³] e 0,0011 [Pa.s] para configuração original e 945,75 [kg/m³] e 0,0010 [Pa.s] para barreira difusiva), diâmetro equivalente (D_{eq}) de 303,81 μm , conforme Equação (13), e velocidade média (V_{med}) de escoamento (0,028; 0,7 e 2,8 m/s para TFRs 0,2; 5 e 20, respectivamente) com base no D_{eq} calculado. A partir das velocidades médias de escoamento e o comprimento de canal (L_{canal}) trançado para a mistura (3,5 cm) foram obtidos os tempos de residência (τ_{res}), conforme Equação (14). Todos os dados foram extraídos com base em Firmino e colaboradores (2021), presente no material suplementar.

$$D_{eq} = \frac{4A_w}{P_w} \quad (13)$$

$$\tau_{res} = \frac{L_{canal}}{V_{med}} \quad (14)$$

Sendo A_w a área de superfície molhada da seção transversal e P_w o perímetro molhado (FIRMINO et al., 2021; LU et al., 2016; VERMA et al., 2008).

Já para o número de Peclet (Equação (2)), calculou-se o coeficiente de difusão mútuo (D) de etanol-água, considerando a fração volumétrica de etanol (X_e), conforme Equação (15) (HOOD et al., 2014). Também se considerou a velocidade média de escoamento e o D_{eq} previamente calculados para a determinação do número de Reynolds.

$$D[m^2s^{-1}10^{-9}] = 11,22X_e^5 - 24,11X_e^4 + 12,27X_e^3 + 6,45X_e^2 - 5,88X_e + 1,42 \quad (15)$$

Para o cálculo do número de Dean (Equação (3)), foi considerado o D_{eq} usado para o cálculo de Re, o raio da seção transversal no comprimento de canal analisado, o Re calculado e o ângulo de curvatura aproximado da geometria no comprimento de canal sob análise. Os cálculos de De foram realizados com base na metodologia empregada por Verma e

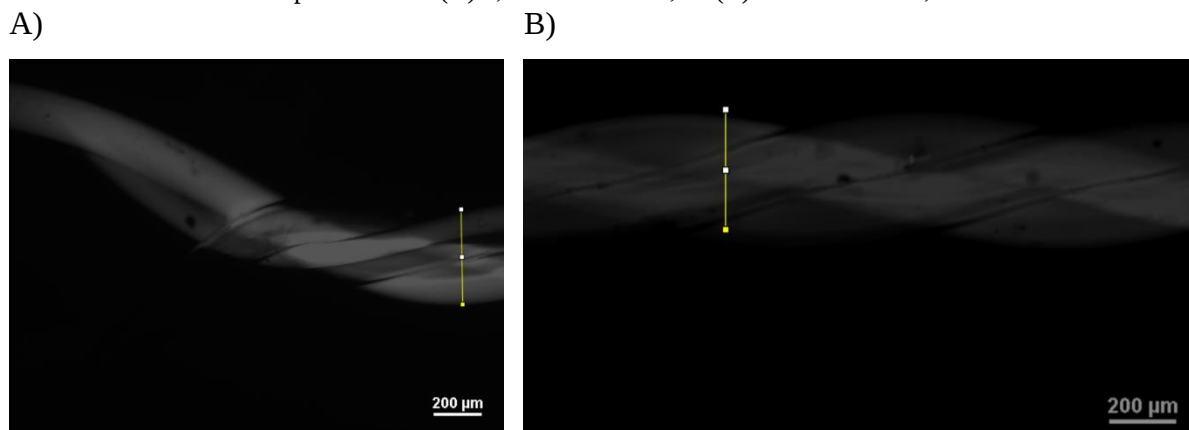
colaboradores (2008), cuja geometria de canal é a mesma da utilizada nesse trabalho. Maiores detalhes da metodologia empregada podem ser vistos no anexo I.

3.2.3 Caracterização experimental da condição de mistura - Traçador fluorescente para avaliação do perfil de mistura

Para obter o perfil de mistura experimental, testes de fluorescência em FRR 1 com rodamina B foram realizados. A concentração de rodamina B na saída foi ajustada para cada vazão, de modo a garantir uma boa visibilidade do gradiente de fluorescência ao longo do canal, sendo de 0,0025; 0,005 e 0,0005 mM para as TFRs de 0,2; 5 e 20, respectivamente. Os testes foram realizados apenas para a configuração original do dispositivo, sendo a corrente central etanólica com Rodamina B, e correntes laterais de água ultrapura. Para todos os testes experimentais foram utilizadas seringas de vidro de volumes variáveis entre 5 e 10 mL (Hamilton, NV, USA) e bombas-seringas (PHD Ultra, Harvard Apparatus). As imagens foram retiradas em comprimentos em torno de 0,1 e 2 cm a partir de junção, a partir de microscópio invertido (Inverted Research Microscope Eclipse Ti-U, Nikon, Tokyo, Japan). O cálculo de intensidade de fluorescência foi realizado no software ImageJ®, onde as imagens foram transpostas para a escala de cinza, feita a conversão de escala de pixels para micrômetros, através da barra de escala conhecida, e em alguns casos ajustou-se o brilho e contraste, para então se obter posteriormente a curva de intensidade de cinza aproximada ao longo das larguras especificadas. É válido ressaltar que as imagens de fluorescência são resultadas dos efeitos de fluorescência acumulada ao longo de toda a altura do microcanal. A imagem de fluorescência reporta o evento em 2D. No entanto, é necessária a análise crítica das imagens, pois o fenômeno está ocorrendo em 3D e a altura do microcanal não pode ser desconsiderada. Nesse sentido, nos locais onde há maior altura espera-se que haja maiores intensidades de fluorescência em condições de mistura completa. A Figura 23 exemplifica o método realizado para ambos os comprimentos analisados: 0,1 cm (Figura 23 (A)) e 2 cm (Figura 23 (B)).

Para termos comparativos, na simulação usou-se os dados exportados das seções transversais em 0,1 e 2 cm obtidos do CFD-Post do Ansys. A soma dos pontos de concentração de etanol para todas as alturas em determinada faixa de largura foi retirada para a geração da curva. Para a análise do perfil de mistura em cada comprimento foram consideradas as larguras reais medidas, de maneira aproximada, visto que é variável em cada comprimento de canal devido ao entrelaçamento, e portanto não considerou-se o diâmetro equivalente/hidráulico nessa análise.

Figura 23 - Linha de seção transversal traçada no canal para intensidade de cinza. Corte aproximado para os comprimentos de (A) 0,1 cm em TFR 0,2 e (B) 2 cm em TFR 0,2.



Imagens retiradas dos testes de fluorescência e processadas no software ImageJ®. Quando necessário, ajustes de brilho e contraste foram realizados.

Já o perfil teórico de mistura completa foi realizada seguindo os mesmos procedimentos de Firmino e colaboradores (2021), no qual retirou-se a imagem da seção transversal do CFX em ambos os comprimentos, e a soma das alturas em intervalos espaçados foram registrados, e nesse caso, obteve-se 19 pontos para cada comprimento de canal analisado. As imagens geradas comparando-se os perfis de mistura foram elaboradas no software OriginPro® 8.5. Nesse caso, considerou-se mistura completa quando a mesma atingiu 100%.

3.2.4 Síntese de lipossomas catiônicos (CLs) e *stealth* (S-CL)

As CLs e S-CLs foram produzidas com uma composição de lipídios dispersos em etanol seco com concentração total lipídica de 25 mM, similar à proporção definida pelos autores Es e colaboradores (2020) e Perli e colaboradores (2019), sendo EPC, DOTAP e DOPE em uma razão molar de 50-25-25 (%) para os lipossomas catiônicos, respectivamente, e EPC, DOTAP, DOPE e DSPE-PEG (2000) em uma razão molar 50-25-24-1 (%), para os lipossomas catiônicos *stealth*, respectivamente. Antes da síntese, a solução lipídica foi sonicada por 15 minutos entre 25 e 35°C (Modelo Ultrasonic Bath 08895-43, Cole-Parmer®). Para a produção dos lipossomas, foi utilizado água ultrapura ou tampão PBS como correntes laterais aquosas, e corrente central etanólica. As soluções foram carregadas em seringas de vidro (Hamilton, NV, USA) e bombas-seringas (PHD Ultra, Harvard Apparatus) foram utilizadas nos processos microfluídicos. Inicialmente os CLs foram sintetizados com o propósito de validar o dispositivo HFR-MD. Para tal, foram utilizadas condições similares às testadas por Firmino e colaboradores (2021) para este dispositivo, estabelecidas as FRRs (*flow rate ratios*) 1 e 10, e TFR (*total flow rate*) de 5

mL/min. Analisou-se também a influência da escolha de tampão PBS (10 mM) como fase aquosa nas características dos lipossomas, como diâmetro médio, PDI e potencial zeta, como explorado por Perli e colaboradores (2019). Posteriormente, vazões totais de escoamento foram variadas a fim de se encontrar a melhor condição de processo, tanto TFRs mais altas (10, 15 e 20 mL/min), quanto mais baixas (0,2; 0,5 e 1 mL/min). Para esse estudo, fixou-se a melhor FRR encontrada para a TFR de 5 mL/min. Para colaborar com os resultados encontrados, foram ainda realizadas simulações em todas as condições supracitadas, em ANSYS CFX®. Por fim, as melhores condições operacionais encontradas para os CLs foram avaliadas para a produção de S-CLs. Para todos os testes utilizou-se as 3 entradas do dispositivo: corrente central com os lipídios dispersos em etanol, e as duas correntes laterais (canais com 45° em relação ao canal central) aquosas (água ultrapura ou tampão PBS).

3.2.5 Síntese de lipoplexos e LNPs

A formação dos lipoplexos deu-se com a utilização de pDNA para validação do processo de formação das nanoestruturas carregadas com material genético. Para este estudo, avaliou-se diferentes configurações do dispositivo: (1) corrente central orgânica com lipossomas e as duas laterais de água com material genético (Figura 21 (A)); (2) corrente central aquosa de água pura, uma corrente lateral de lipossoma e outra corrente aquosa de material genético (Figura 21 (B)); bem como diferentes concentrações lipídicas e TFRs. Utilizou-se também o método convencional *bulk* de produção, baseado no método de Eş e colaboradores (2018), de maneira a comparar com o sistema microfluídico na avaliação da capacidade das nanoestruturas em veicular DNA de luciferase. O protocolo *bulk* é definido pela mistura em banho de gelo entre o material genético e os lipossomas através do uso de agitador vórtex.

A proporção entre lipídios e material genético necessária para se atingir a devida complexação e formulação das nanoestruturas (lipoplexos ou LNPs) pode ser calculada através da proporção molar de cargas (*molar charge ratio* ($R_{\pm}$)), que pode ser traduzida como razão N/P (nitrogênio-fosfato), uma vez que os lipídios catiônicos ou ionizáveis possuem grupo amino (N^+) em sua composição, o que confere carga positiva. Por outro lado, os ácidos nucleicos (RNA ou DNA) são caracterizados por possuírem nucleotídeos em sua composição, que detém grupos fosfato (P^-), o que confere carga negativa (BALBINO et al., 2017; LOU et al., 2020; ROCES et al., 2020). O protocolo é definido com base em Eş e colaboradores (2018). Com isso, essa razão pode ser calculada conforme o equacionamento abaixo (Equações (16) e (17)):

$$R_{\pm} = \frac{\text{mols carga (+)}}{\text{mols carga (-)}} \quad (16)$$

$$R_{\pm} = \frac{C_{lip} * y_{cat} * V_{lip} * [N^{+}]}{[P^{-}] * C_{gen} * V_{gen}} \quad (17)$$

Quando:

- C_{lip} é a concentração molar da solução etanólica contendo os lipídios que serão introduzidos no micromisturador;
- y_{cat} é a fração molar do lipídio catiônico ou ionizável;
- V_{lip} é o volume da solução lipídica orgânica que será introduzido no micromisturador;
- $[N^{+}]$ é a quantidade de grupo(s) amino(s) em um mol do lipídio catiônico ou ionizável;
- $[P^{-}]$ é a quantidade de grupo(s) fosfato(s) em um mol de material genético;
- C_{gen} é a concentração molar do material genético na entrada do micromisturador;
- V_{gen} é o volume da(s) corrente(s) aquosa(s) contendo material genético que será introduzido no micromisturador.

Basicamente, calcula-se a proporção necessária entre cargas positivas e negativas (BALBINO et al., 2017). Com base em Balbino e colaboradores (2016, 2017), foi determinado um $R_{\pm}$ de 3 para os lipoplexos e LNPs com pDNA, por ter se mostrado uma proporção capaz de produzir nanoestruturas com propriedades físico-químicas apropriadas para terapia gênica.

As LNPs foram produzidas misturando-se em uma única etapa os lipídios na corrente etanólica e o DNA na corrente aquosa. Análogo aos lipoplexos, estudou-se as duas configurações de dispositivo, mesmas composições lipídicas e diferentes TFRs.

3.2.6 Caracterização físico-química e análises estatísticas do complexo de lipossomas catiônicos e LNPs com material genético

A avaliação das propriedades físico-químicas de nano materiais foi realizada em termos do diâmetro hidrodinâmico médio, polidispersidade, potencial zeta e morfologia (BALBINO et al., 2015; BHATTACHARJEE, 2016).

Em suas metodologias, o PDI e o diâmetro hidrodinâmico médio podem ser medidos pela técnica de DLS usando-se um equipamento como Malvern Zetasizer®, com um ângulo de

detecção de 173°, para as versões mais modernas (BALBINO et al., 2013, 2015; BHATTACHARJEE, 2016). Esta técnica se baseia no movimento Browniano das nanopartículas em uma suspensão coloidal. Os valores de PDI permitem que se obtenha informações quanto a uniformidade da distribuição das nanopartículas (monodispersa ou polidispersa) (AGHAEI; NAZAR, 2019; BHATTACHARJEE, 2016). Usualmente busca-se valores baixos de PDI, que indicam uma população homogênea (AGHAEI; NAZAR, 2019; BALBINO et al., 2013).

O potencial zeta, que também se utiliza das propriedades da dispersão coloidal, mede a densidade de carga superficial através da mobilidade eletroforética das nanopartículas em suspensão, e provém informações sobre a estabilidade coloidal (AGHAEI; NAZAR, 2019; BHATTACHARJEE, 2016). Via de regra, busca-se valores maiores que 30 mV ou menores que -30 mV, indicando estabilidade coloidal. No entanto, em sistemas que se busca a estabilidade por efeito estérico, como o caso em que há a inserção de lipídio PEGlado na estrutura, o potencial zeta torna-se um fator somativo, e não determinante, uma vez que nesses casos, pode-se atingir valores próximos de zero, e ainda assim resultar em um sistema estável (LOU et al., 2020; MISHRA et al., 2018). O potencial zeta pode ser medido utilizando-se um Zetasizer® (BALBINO; AZZONI; DE LA TORRE, 2013; BHATTACHARJEE, 2016).

Os lipossomas catiônicos, lipoplexos e as LNPs carregando material genético foram caracterizados nos seguintes aspectos: (1) diâmetro médio (por técnica DLS), índice de polidispersidade (por técnica DLS) e potencial zeta (com Laser Doppler Anemometry) utilizando equipamento Zetasizer NanoZS da Malvern, a 25°C; (2) morfologia através de Cryo-TEM, utilizando condições operacionais como disposto no trabalho de Eş e colaboradores (2020). Todos os protocolos de caracterização já foram estabelecidos pelo grupo de pesquisa.

Para as análises de tamanho e PDI por *Dynamic Light Scattering* (DLS) e potencial zeta, as amostras foram diluídas à concentração de 0,2 mM de lipídios, e as medidas foram realizadas três vezes para cada replicata em água ultrapura (BALBINO et al., 2015, 2017), ou em PBS, e neste caso somente para os estudos com o tampão (PERLI et al., 2019). Para Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (cryo-TEM), as amostras de lipossomas produzidas em FRR 1 (concentração lipídica final de 12,5 mM) foram diluídas até a concentração de 10 mM (Eş et al., 2020). Já para lipoplexos e LNPs não foram realizadas diluições, sendo utilizadas as concentrações finais dos processos de síntese, sendo 6,25 e 3,6 mM, respectivamente. Um sistema de vitrificação automatizado (Vitrobot Mark IV, FEI, Holanda) foi usado para a preparação das grades. As grades foram expostas ao tratamento de descarga de plasma (easiGlow, Pelco, EUA) com corrente de 25 mA durante 50 segundos para aumentar a

hidrofilicidade. As amostras foram preparadas em temperatura controlada (22°C) e umidade (100%) para evitar a evaporação dos corpos de prova. 3 µL de amostra foram colocados em uma grade de cobre revestida de carbono de 300 mesh (Ted Pella, EUA, #01895-F) com um *blot time* de 3 s. As imagens foram adquiridas em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEM1400Plus (Jeol, Japan), operando a 120kV; o microscópio é equipado com uma câmera OneView CMOS 4k x 4k (GATAN, EUA) para a aquisição digital de imagens. A aquisição dos dados foi realizada no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). O protocolo adotado é similar a trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa que tiveram suas imagens de cryo-TEM geradas pelo CNPEM (CARVALHO et al., 2022b; EŞ et al., 2020).

Para análises estatísticas, testes t presumindo variâncias equivalentes realizados em Excel foi usado para comparar duas amostras independentes, considerando-se diferenças entre as condições se valor-p < 0,05, e ANOVA fator único com teste de Tukey para comparar duas ou mais amostras, considerando-se diferença estatística significativa entre grupos se o valor absoluto da diferença entre duas médias foi igual ou maior que a diferença mínima significativa (d.m.s.) (CARVALHO et al., 2021a; CONAGIN; BARBIN; DEMÉTRIO, 2008; EŞ et al., 2020).

3.2.7 Avaliação *in vitro*

A avaliação biológica das LNPs e lipoplexos se deu pela transfecção *in vitro* de pDNA-Luc. A avaliação da eficiência de transfecção foi realizado com a colaboração do ICB II da USP, especificamente com a participação da Dra. Marianna Teixeira de Pinho Favaro do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, supervisionada pelo professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

Primeiramente o plasmídeo gentilmente doado pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Adriano Azzoni (Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP) foi transformado em *E. coli* top10 quimiocompetente. Os clones foram selecionados em LB-agar em presença de kanamicina, e os três clones replicados foram crescidos em 5 mL de LB+kan, tendo atingido um DO₆₀₀ final equivalente entre si. Foi selecionado o clone 1 a partir desta etapa. Em seguida, houve a etapa de purificação do plasmídeo. A *E. coli* top10 contendo o pVAX-LUC foi cultivada em pequeno volume (50 mL) *overnight*, e no dia seguinte este pré-inóculo foi utilizado para fazer um cultivo maior de 1 litro de LB + kan. O crescimento se deu por 18 horas a 37°C / 220 rpm e ao término deste período atingiu a DO₆₀₀ = 2,94. O *pellet*

bacteriano foi submetido a lise e purificação conforme instruções do fabricante, utilizando o kit MegaPrep da Qiagen. Ao final, o DNA foi precipitado por isopropanol, lavado em etanol 70% e seco *overnight* para garantir a evaporação completa. Ao final, foi ressuspenso em água miliQ autoclavada estéril, e quantificado.

Células VERO foram cultivadas até atingirem uma confluência de 90%. Antes de iniciar o experimento, o meio foi substituído por DMEM sem soro, ao qual foram adicionadas as formulações. Após 4 horas de incubação, o meio foi substituído por DMEM + 10% SFB. As células então foram incubadas por 24 ou 48 horas. No momento da coleta, as células tiveram o meio aspirado e foram lisadas com o Cell Lysis Reagent (Promega). Para a medida, as células foram misturadas com a Luciferina (Promega), e medidas imediatamente em um luminômetro.

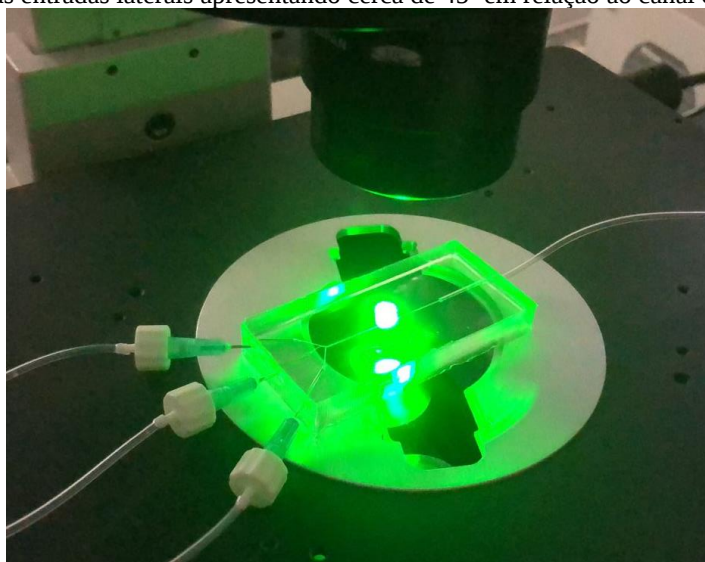
Controles com Lipofectamina, *naked* pDNA e *blank* (só luciferina, equivalente ao branco) foram realizados. As imagens de eficiência de transfecção foram geradas pelo software OriginPro® 8.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA MISTURA E SIMULAÇÃO COMPUTACIONAL DO DISPOSITIVO

O dispositivo HFR-MD é um protótipo de escala laboratorial que necessita de investigações e validações para uma possível ampliação de escala. Uma imagem do dispositivo fabricado em laboratório pode ser visualizada na Figura 24. Apesar de ter sido validado para a produção de emulsões e lipossomas, sua eficácia na formação de lipossomas catiônicos, *stealth*, lipoplexos e LNPs, ainda necessita de comprovação. Desta forma, realizou-se uma simulação computacional da mistura etanol-água representando de maneira indireta a mistura com lipídios e material genético, bem como a caracterização experimental das condições de mistura com traçador fluorescente para permitir a compreensão da fluidodinâmica e do processo de mistura em diferentes vazões. Essas informações podem contribuir indiretamente para a elucidação dos principais fatores que influenciam na formação das nanoestruturas lipídicas e na formação de hipóteses para os mecanismos de formação dos lipossomas.

Figura 24 - Dispositivo HFR-MD produzido em laboratório e utilizado para as investigações de processo. O canal para a mistura possui 3,5 cm de comprimento trançado a partir de fios de *nylon* de 0,2 mm de diâmetro, com as entradas laterais apresentando cerca de 45° em relação ao canal central.



4.1.1 Simulação computacional

No estudo de um processo microfluídico, a simulação computacional pode fornecer importantes informações sobre a dinâmica real de mistura e validação de processos microfluídicos (CARVALHO et al., 2021b; EMERSON et al., 2006). Nesse sentido, a

simulação computacional foi realizada para se analisar o processo de mistura, presença ou não de advecção caótica, e antever condições ótimas de processo. Para que este estudo fosse possível, a geometria do HFR-MD foi construída em CAD com base nas dimensões reais do microdispositivo construído (Seção 3.2.1). As dimensões do dispositivo podem ser visualizadas na Figura 22, que foram previamente estabelecidas por Firmino e colaboradores (2021). A Figura 21 fornece uma visão dessa geometria com as respectivas entradas e saídas. Cabe destacar que a simulação se refere a um sistema etanol/água, pois considerou-se que a formação dos lipossomas é consequência da mistura entre ambas as substâncias, pela mudança de polaridade (Figura 7) e conforme explicado na seção 2.3.2 anteriormente, e a simulação da formação das nanoestruturas dentro do microcanal seria por dinâmica molecular, o que acrescentaria outra abordagem e adicionaria uma complexidade significativa ao estudo (HANSEN; OTTESEN, 2006; RUDYAK; KRASNOLUTSKII; IVANOV, 2011).

Para as primeiras investigações, analisou-se a condição de TFR de 5 mL/min em FRR 1 e 10, a fim de se obter os respectivos padrões de concentração de etanol ao longo do canal, condições estas previamente testadas e validadas por nosso grupo de pesquisa para este dispositivo. Assim, o trabalho de Firmino e colaboradores (2021) serviu como base de comparação para a simulação realizada e determinação de condições iniciais de investigação. Analisou-se posteriormente também as TFRs de 0,2 e 20 mL/min em FRR 1. As TFRs de 0,2 e 20 mL/min foram escolhidas por abrangerem duas grandezas de fluxo diferentes, e hipotetizou-se previamente que poderiam impactar no perfil de mistura e gerar diferentes características de mistura. Além disso, a TFR de 20 mL/min também havia sido a vazão máxima analisada por Firmino e colaboradores (2021), e a TFR de 0,2 mL/min muito próxima da mínima analisada pelos autores (0,5 mL/min). Todas as condições analisadas estão descritas na Tabela 2.

Antes de adentrar nas investigações sobre a fluidodinâmica do sistema, é importante definir uma malha que seja rigorosa e refinada o suficiente para garantir que os resultados obtidos serão confiáveis. Apesar de Firmino e colaboradores (2021) terem gerado uma malha que pôde ser validada pelos resultados experimentais encontrados, os autores não analisaram o possível impacto na simulação do perfil de mistura devido ao uso de diferentes malhas. Desse modo, realizou-se um estudo sobre o efeito da malha no perfil de mistura.

Tabela 2 - Nomenclatura e parâmetros de estudo utilizados ao longo do trabalho

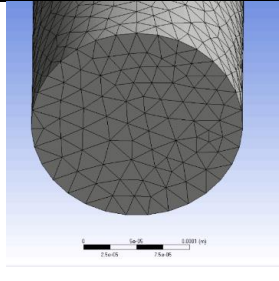
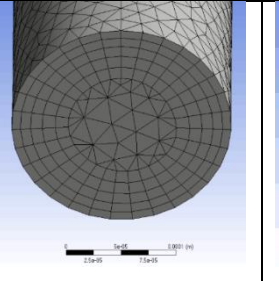
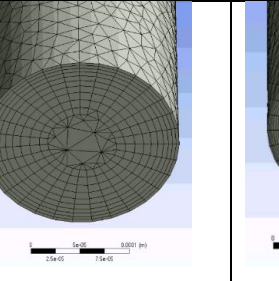
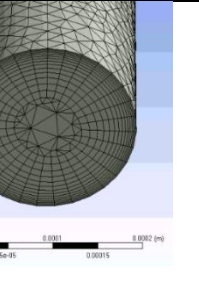
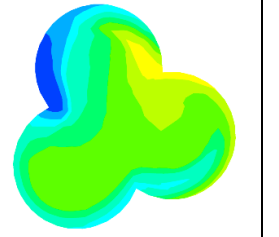
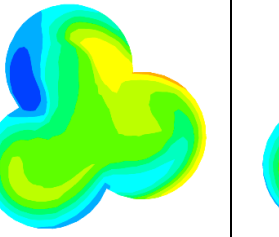
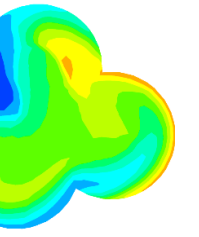
Nomenclatura	TFR (mL/min)	FRR	Fração de etanol volumétrica na saída do processo (% v/v)
TFR ₅ @FRR ₁₀	5	10	9,09
TFR ₅ @FRR ₁	5	1	50
TFR _{0,2} @FRR ₁	0,2	1	50
TFR ₂₀ @FRR ₁	20	1	50

Notas: TFR_x – X representa o valor da taxa de fluxo total em mL/min; FRR_y – Y representa o valor da razão entre taxas de fluxo.

4.1.1.1 Efeito de malha

Apesar de já haver trabalhos que analisaram essa geometria (FIRMINO et al., 2021; VERMA et al., 2008), não foi encontrado na literatura algum estudo sobre efeito de malha. A análise do efeito de malha faz-se importante principalmente quando geometrias complexas são estudadas. De modo geral, quanto mais nós e elementos a malha tiver, menor será o erro obtido pela simulação (WANG; YANG; LYU, 2007). Além disso, como sabe-se que usualmente o regime laminar está presente na microfluídica, é possível realizar o refino (*inflation*) da malha nas regiões mais externas, pois é onde se encontra os maiores gradientes de velocidade. Esse refino aumenta a precisão na captação dos gradientes (LI et al., 2018). Além disso, uma malha com alta resolução e refinada evita efeitos de difusão numérica, efeito que normalmente induz falsos efeitos de mistura no canal em baixas resoluções de malha (TÓTH et al., 2015). Mais especificamente, a difusão numérica ocorre quando a direção do fluxo não está alinhada com os volumes de controle da malha, ou seja, quando as linhas de corrente são oblíquas aos volumes de controle, cuja maximização da difusão numérica ocorre quando as linhas de corrente formam 45° com as linhas de malha (WAREY; HAN; KAUSHIK, 2021). Desse modo, partindo-se da configuração de número de elementos definidos por Firmino e colaboradores (2021), fez-se um estudo de refinamento usando-se o *inflation* nas bordas da geometria. Os resultados do perfil de fração volumétrica de etanol para a condição padrão escolhida ($Z = 0,05$ cm, TFR 5 e FRR 1) nas diversas malhas obtidas podem ser visualizados abaixo.

Tabela 3 - Efeito de malha no perfil de mistura. Dados de malha retirados do *meshing* do ANSYS-CFX® 2020. Os perfis de mistura foram retirados em um comprimento de canal de 0,05 cm e vazão de 5 mL/min. A variação na fração de etanol é definida pelo intervalo de cores, sendo a cor vermelha a maior fração (100%) e azul escuro a menor (0%).

Camadas para <i>inflation</i>				
Condições	0	5	10	15
Resultado da malha				
Resultado do perfil de mistura	 Nós: 841.248 Elementos: 4.200.431	 Nós: 1.753.878 Elementos: 4.312.114	 Nós: 3.006.922 Elementos: 6.645.511	 Nós: 4.285.858 Elementos: 9.150.048

De acordo com a Tabela 3, observa-se que quanto mais refinada a malha se torna, mais nós e elementos são gerados, o que causou relevante diferença no perfil de mistura gerado, principalmente entre uma malha sem *inflation* e com 15 camadas de refinamento. Ou seja, quanto mais refinada a malha, maior precisão na captação dos gradientes é atingida. Mesmo quando utiliza-se de esquema *upwind* de primeira ordem (menor resolução que métodos de ordem maior) é possível minimizar a difusão numérica aplicando o refinamento da malha (WAREY; HAN; KAUSHIK, 2021), como foi observado pelos resultados encontrados. Desse modo, optou-se por definir o *inflation* com 15 camadas como padrão para os demais estudos de simulação, pois mesmo que para 10 camadas não tenha sido observadas grandes diferenças, o tempo de resolução e esforço computacional demandados para 15 camadas não aumentaram significativamente, o que possibilitou essa escolha.

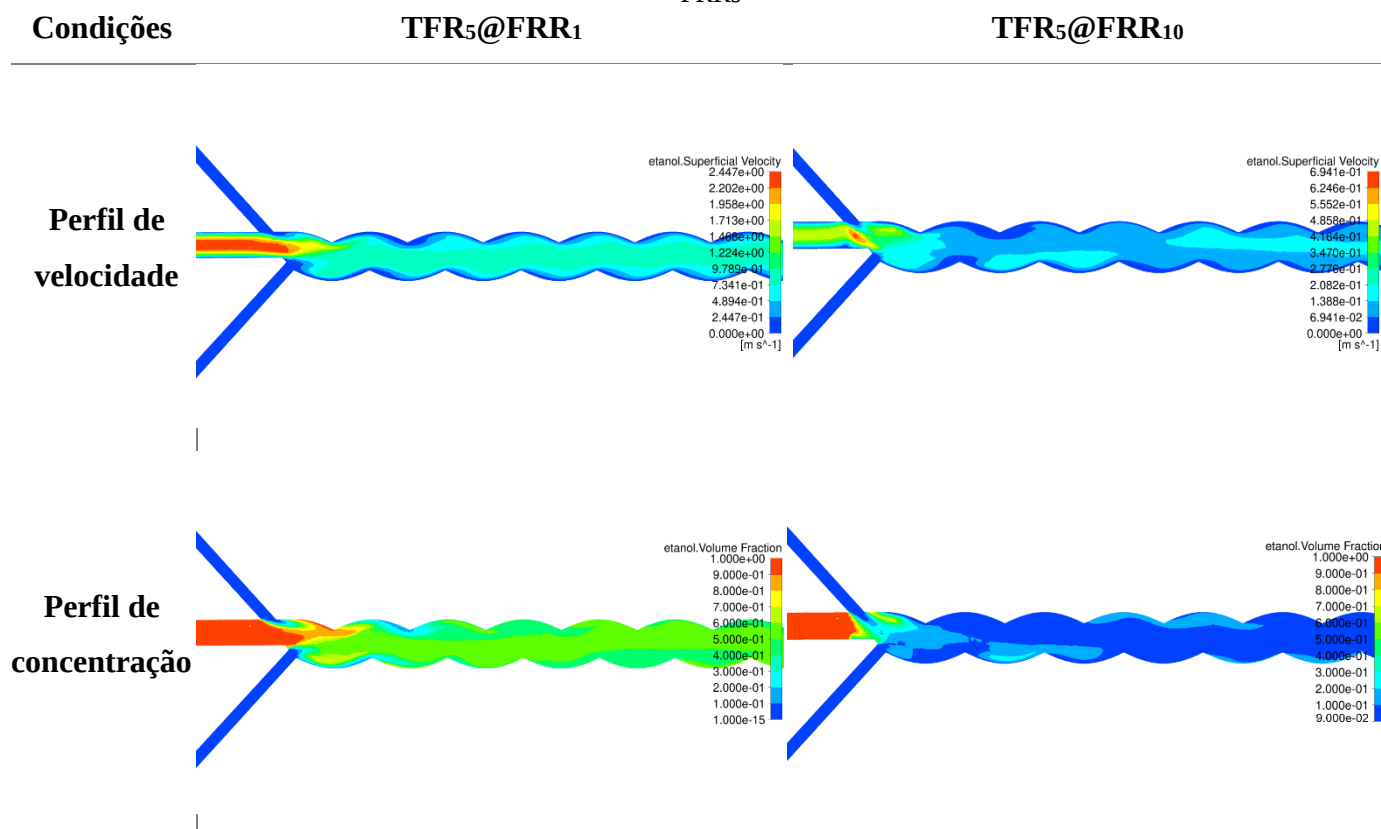
4.1.1.2 Efeito da razão entre taxas de fluxo - FRR no processo de mistura

A partir da definição da vazão total constante de 5 mL/min, optou-se por simular duas proporções diferentes de etanol e água na entrada, refletindo no estudo das FRRs 1 e 10. A hipótese pré-estabelecida foi de que a diferente proporção de etanol/água poderia alterar o perfil

de mistura e impactar posteriormente na síntese das nanoestruturas. Desse modo, com a análise de CFD, seria possível observar os perfis de velocidade e de fração volumétrica de etanol ao longo do microcanal.

Para o estudo da influência da FRR no processo de mistura, avaliou-se duas condições: FRR 1 em TFR 5 ($\text{TFR}_5@FRR_1$) e FRR 10 em TFR 5 ($\text{TFR}_5@FRR_{10}$). A Tabela 4 mostra o comparativo dos perfis de velocidade e concentração para o etanol em ambas as condições. Percebe-se uma clara diferença de grandeza de velocidade nas condições analisadas, o que era esperado, uma vez que na FRR 1 e 10 a velocidade média de entrada do etanol é de 1,33 e de 0,241 m/s, respectivamente, levando em conta a TFR e o diâmetro do canal da entrada circular. Com relação ao perfil de concentração de etanol, observa-se que a concentração tende a 50 e 9% para a FRR 1 e 10, o que condiz com os valores calculados (Tabela 2), tornando a simulação confiável. Além disso, um leve retorno de água na corrente central próximo a junção é observável, causado pela maior pressão inferida pelas correntes laterais aquosas. Além disso, apesar da vazão total ser a mesma (TFR 5 mL/min), os efeitos de velocidade e gradientes de concentração são completamente diferentes, pois a alteração na proporção etanol/água são refletidas pela mudança de FRR e que afeta diretamente o sistema e a transferência de massa.

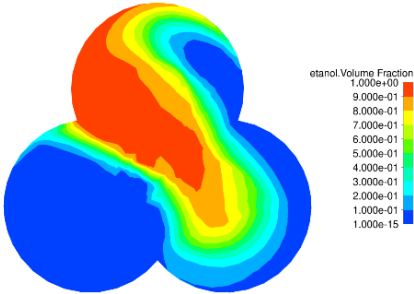
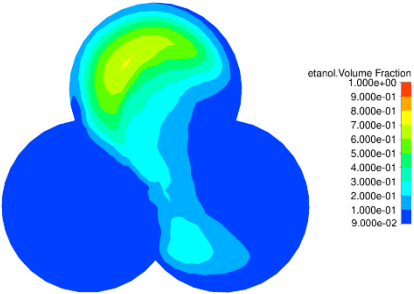
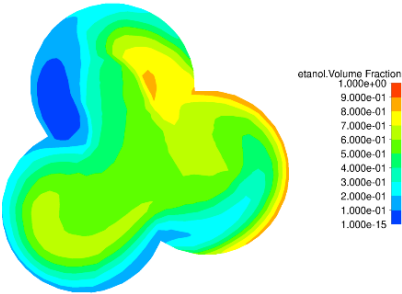
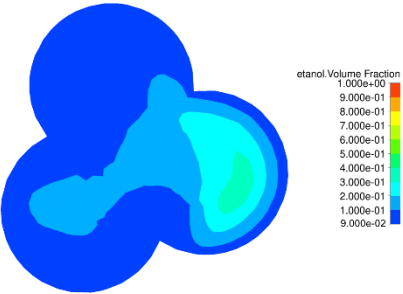
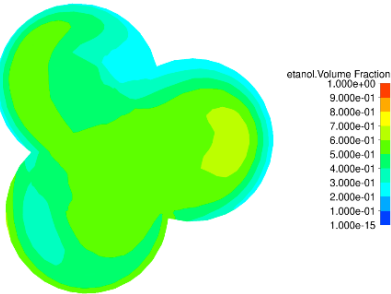
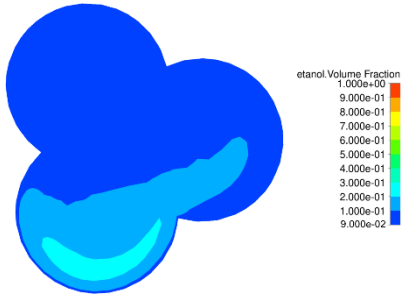
Tabela 4 – Comparação de perfil de velocidade e de concentração de etanol em TFR de 5 mL/min para diferentes FRRs



Imagens obtidas no software ANSYS-CFX® 2020.

A partir da mesma simulação, foi avaliado também o perfil de mistura ao longo de diferentes comprimentos do microcanal nas duas FRRs (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil de concentração de etanol em vários comprimentos de canal para estudo do efeito da FRR em TFR 5. Imagens de cortes da seção transversal no plano XY (altura x largura).

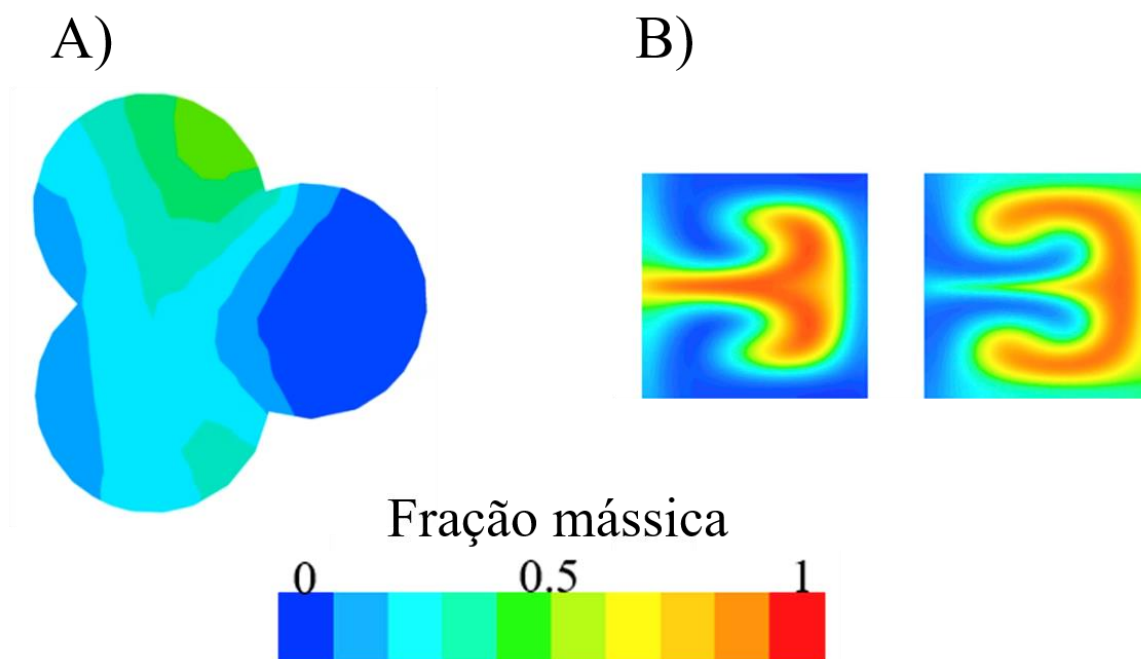
Comprimento de canal	TFR ₅ @FRR ₁	TFR ₅ @FRR ₁₀
Junção		
0,05 cm		
0,1 cm		

Imagens obtidas no software ANSYS-CFX® 2020.

Como abordado anteriormente, a advecção caótica é caracterizada pelo entrelaçamento das linhas de corrente e formação de fluxos secundários. Esse efeito gera distorções no perfil de mistura e causa a recirculação do fluido próximo a parede do canal. A característica do fluxo encontrado na simulação é comparável ao perfil de concentração encontrado por Firmino e colaboradores (2021) e Vatankhah e Shamloo (2018) para o mesmo dispositivo e micromisturador em espiral, respectivamente, como comprovado pela Figura 25, no qual observa-se o efeito do entrelaçamento das linhas de corrente ocasionando distorções nos perfis de fração mássica. Desta forma, pelas simulações realizadas, pode-se inferir que há o

entrelaçamento das linhas de corrente e consequente formação de advecção caótica para ambas as FRRs analisadas, sendo visivelmente mais pronunciado para a FRR 1.

Figura 25 - Perfis de concentração de fluxos caóticos encontrados na literatura. (A) Imagem de seção transversal do perfil de fração de etanol em FRR 3 e TFR 5 a uma distância de 0,015 cm da junção das correntes; (B) Imagens de seção transversal do perfil de fração do fluido de estudo em uma distância mais próxima (esquerda) e outra mais longe (direita) das entradas do micromisturador.



Fonte: Adaptado de (A) Firmino e colaboradores (2021) e (B) Vatankhah e Shamloo (2018).

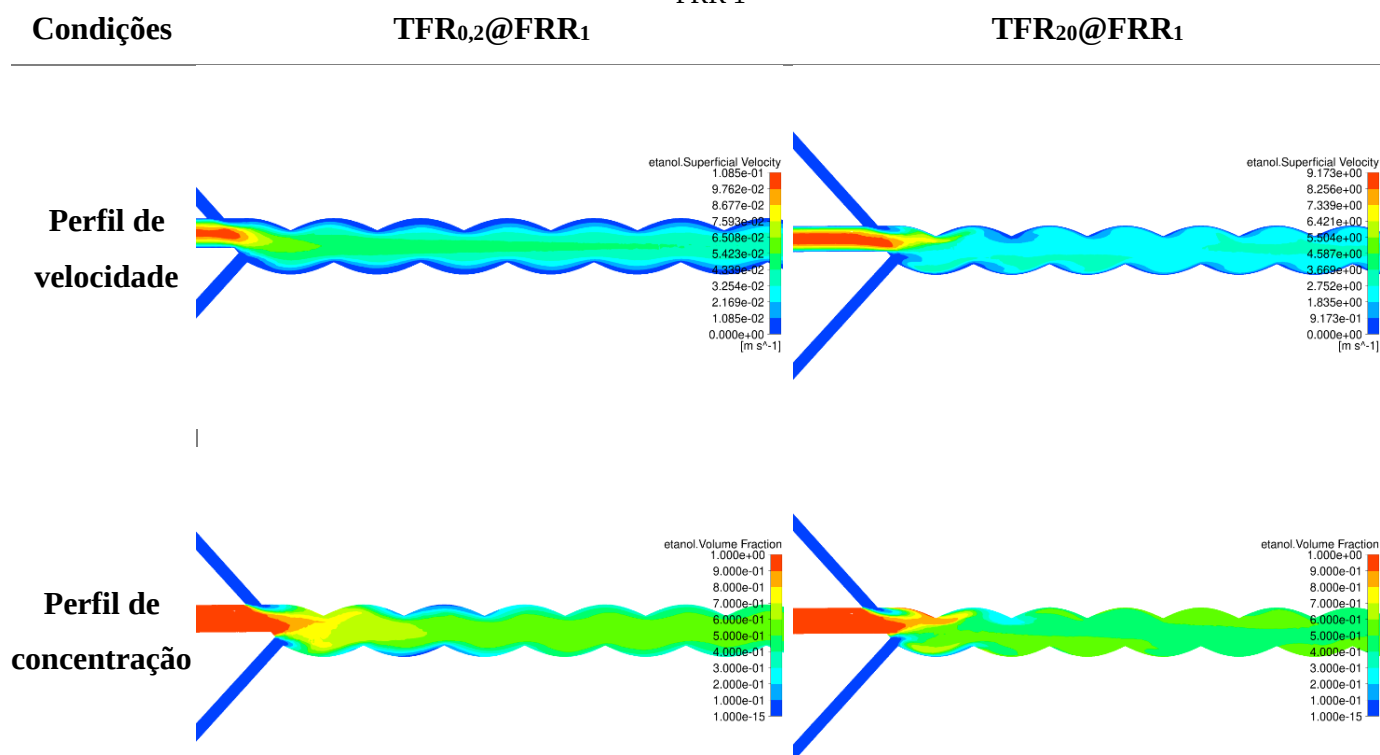
Como foi demonstrado por Firmino e colaboradores (2021) que ambas FRRs produziram lipossomas adequados nesse dispositivo, optou-se por definir a FRR 1 como o padrão para as análises seguintes, já que é a condição em que se tem maior produtividade e é onde se observa com mais facilidade as variações de fração de etanol e intensidade da advecção caótica.

4.1.1.3 Efeito da taxa de fluxo total - TFR no processo de mistura

Um parâmetro que costuma ser muito investigado em processos que se busca aumentar a produtividade é a vazão. De maneira geral, quanto maior a vazão, maior a produtividade ao longo do tempo, resultado do menor tempo de mistura (BELLIVEAU et al., 2012; HOOD; DEVOE, 2015). Nos casos em que se faz uso da advecção caótica em microcanais, há uma taxa de fluxo mínima que induz e torna o fenômeno significativo (HABCHI et al., 2009; VATANKHAH; SHAMLOO, 2018). Para buscarmos essas condições, de maneira a se obter

informações sobre a fluidodinâmica em diferentes níveis de vazões, e o quanto isso poderia impactar na auto agregação dos lipídios para a formação dos lipossomas, investigou-se a simulação em diferentes vazões (TFR de 0,2; 5 e 20 mL/min), limitando-se à faixa operacional experimental do microdispositivo. Com isso, foram obtidos os perfis de velocidade e concentração de etanol em FRR 1 (Tabela 6), sendo que os mesmos perfis para a TFR 5 se encontram na Tabela 4.

Tabela 6 - Comparação entre TFR de 0,2 e 20 mL/min para o perfil de velocidade e concentração de etanol em FRR 1



Imagens obtidas no software ANSYS-CFX® 2020. Nota: os mesmos perfis para a TFR₅@FRR₁ se encontram na Tabela 4.

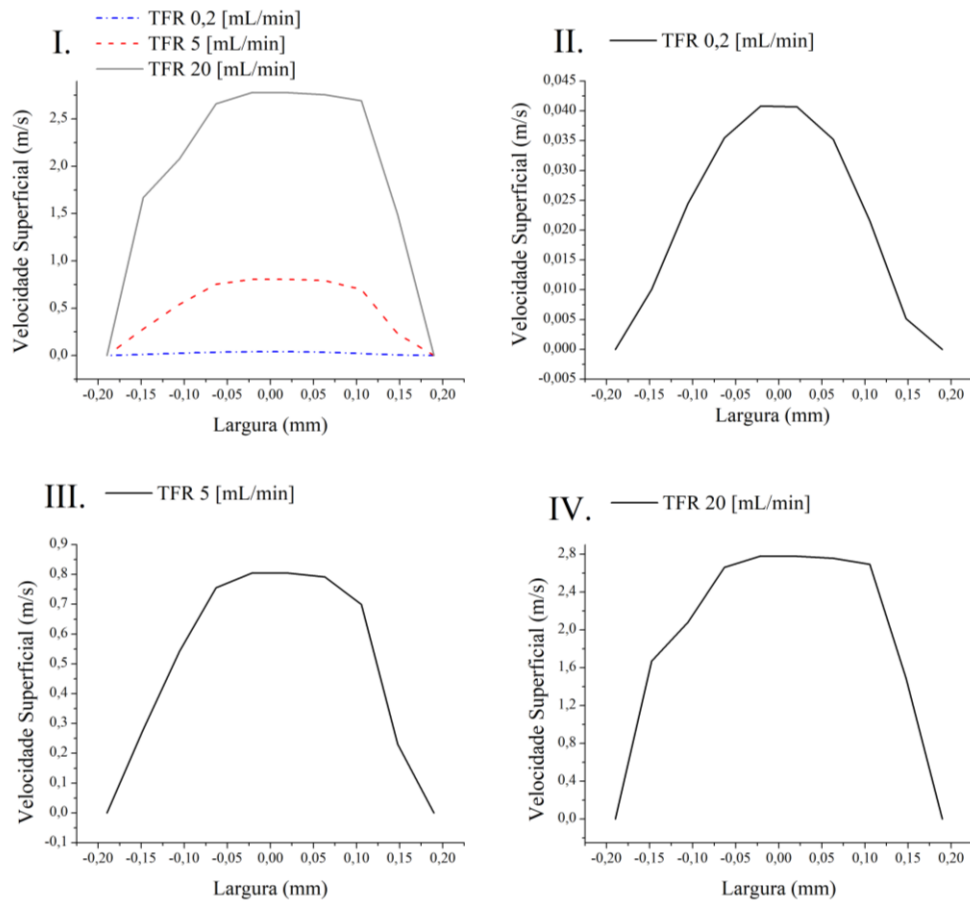
Analisando-se os perfis de velocidade gerados pela Tabela 6, não se observa diferenças significativas entre as TFRs 5 e 20 com relação ao padrão de variação dos gradientes de velocidade gerados ao longo do microcanal. No entanto, fica evidente as diferenças de velocidade do etanol ocasionadas pelas diferentes taxas de fluxo, sendo a velocidade média de entrada de 5,305 m/s para a TFR 20. Além disso, percebe-se que os gradientes de fração volumétrica de etanol são muito similares ao longo do microcanal. Já quando estendemos a análise para a TFR 0,2, observa-se uma diferença significativa para ambos os perfis de velocidade e concentração. Além da diferença de grandeza, cuja velocidade média de entrada de etanol é de apenas 0,0531 m/s para a TFR 0,2, percebe-se uma clara extensão dos gradientes

de velocidade e concentração ao longo do microcanal quando comparados com as demais TFRs, cujos índices de mistura na TFR 0,2 são significativamente menores no início da mistura, cerca de 10% nos comprimentos de canal entre 0,1 e 0,25 cm. Esse comportamento sugere um maior efeito difusivo dentro do microcanal para a TFR 0,2, retardando o processo de mistura. Para dar suporte a esta afirmação, calculou-se o número de Peclet (Pe) levando-se em conta o diâmetro equivalente. Para a TFR 0,2 encontrou-se um Pe de 1.809,93; bem abaixo dos valores encontrados para as TFRs 5 e 20, que foram de 45.248,30 e 180.993,19; respectivamente. Essa afirmação corrobora com a literatura, onde encontrou-se trabalhos que discorreram sobre taxas de fluxo e números mínimos de Reynolds e Peclet que propiciaram um maior efeito convectivo e advecção caótica (GAROFALO et al., 2009; TRIPATHI; PATOWARI; PATI, 2021; VATANKHAH; SHAMLOO, 2018).

Para melhor verificar o perfil de velocidade gerado ao longo da largura do microcanal, construiu-se gráficos de velocidade de etanol ao longo de uma seção transversal em um comprimento de canal (2 cm) onde supostamente haveria um regime de velocidade totalmente desenvolvido. Nota-se pela Figura 26 (I) que os perfis de velocidade são distintos para cada TRF. Para o caso da TFR 0,2, o perfil de velocidade é mais acentuado, e a velocidade máxima é alcançada somente mais próxima do centro do canal (Figura 26 (II)), o que sugere maior resistência ao escoamento laminar causada pela viscosidade dos fluidos, implicado pelo escoamento típico de Poiseuille em dutos circulares (DURST, 2008).

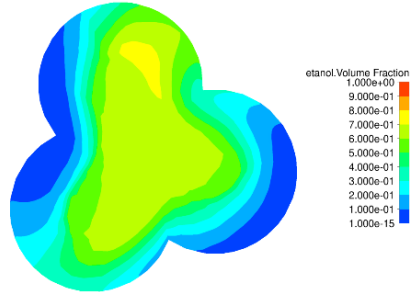
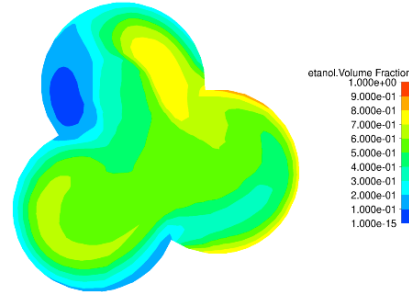
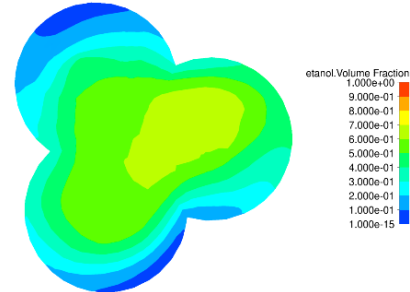
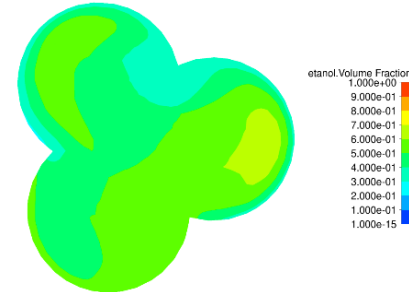
Para entender como estas diferenças apresentadas de velocidade e concentração poderiam impactar no perfil de mistura, a fração de etanol ao longo da seção transversal em três comprimentos de canal (0,05; 0,1 e 0,25 cm) foi avaliada, sendo que as imagens para a TFR 5 nos comprimentos 0,05 e 0,1 cm se encontram na Tabela 5. Pela análise das Tabela 5 e Tabela 7, verifica-se que o perfil encontrado para a concentração de etanol nas TFRs 5 e 20 são similares e sem notórias diferenças. Quando analisamos a TFR 0,2, o perfil de mistura muda consideravelmente e não apresenta o entrelaçamento dos gradientes da corrente etanólica, como nas TFRs 5 e 20. Pelo contrário, se observa uma distribuição das camadas de concentração etanólica sem distorções, nitidamente observável no comprimento de 0,25 cm da Tabela 7. Essas evidências indicam a presença de advecção caótica somente para as TFRs 5 e 20. Um padrão da distribuição de concentração nos casos majoritariamente difusivos e sem advecção caótica pode ser observado pela Figura 27, sendo análogo ao comportamento encontrado para a TFR 0,2.

Figura 26 - Perfis de velocidade superficial de etanol ao longo da seção transversal do microcanal para as diversas TFRs em FRR 1. Imagens mostram o perfil de velocidade para as TFRs de maneira agrupada (I) e separada (II, III e IV), para o comprimento de canal de 2 cm e altura central (meio).



Buscando-se comprovar as teorias impostas pela simulação acerca da presença ou não da advecção caótica, o estudo de sua quantificação e a análise acoplada com os índices de mistura foi realizado e é apresentado a seguir.

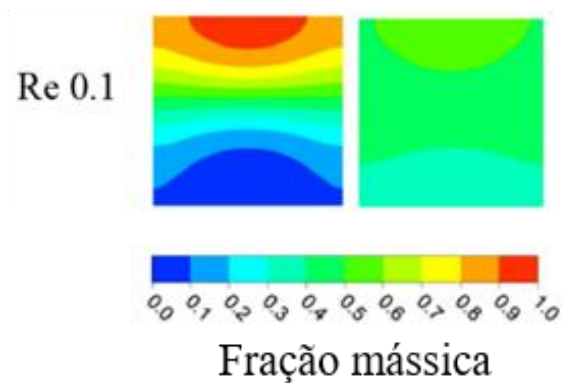
Tabela 7 - Perfil de concentração de etanol em vários comprimentos de canal para estudo do efeito da TFR em FRR 1. Imagens de cortes da seção transversal no plano XY (altura x largura).

Comprimento de canal	TFR _{0,2} @FRR ₁	TFR ₂₀ @FRR ₁	
0,05 cm			
0,1 cm			
0,25 cm	TFR _{0,2} @FRR ₁	TFR ₅ @FRR ₁	TFR ₂₀ @FRR ₁
			

Imagens obtidas no software ANSYS-CFX® 2020.

Figura 27 - Padrão de mistura difusiva

Plano



Fonte: Adaptado e traduzido de Tripathi, Patowari e Pati (2021).

4.1.1.4 Índice de mistura e avaliação da advecção caótica

Quando a análise de advecção caótica é realizada, é interessante que se busque métodos para quantificação do seu efeito, para não se restringir apenas a análise qualitativa e visual. O método mais comumente utilizado é o cálculo da exponencial de Lyapunov. No entanto, este método necessita de uma análise em regime transiente, onde a evolução temporal é levada em conta. Considerando que a análise do processo de mistura ocorreu apenas em regime permanente para o caso do HFR-MD, este método não pôde ser utilizado. Como alternativa, o cálculo do número de Dean pode ser usado para canais curvados. Desta forma, buscou-se comprovar a hipótese de que há advecção caótica nas vazões elevadas. O número de Dean só é válido para se analisar a advecção caótica em geometrias curvadas, e portanto, a comparação do HFR-MD com dispositivos baseados em difusão (D-MD) presentes na literatura que não possuem mudanças de curvatura ou formato dos canais não pôde ser realizada. A Tabela 8 abaixo mostra os valores encontrados para o número de Dean (De) (Equação (3)) nas condições até aqui simuladas, para dois comprimentos de canal: 0,05 e 0,1 cm, pois como visto pela simulação, estes comprimentos de canal são visivelmente mais adequados para se analisar e validar o fenômeno da advecção caótica.

Tabela 8 - Números de Dean nas condições analisadas para quantificação da advecção caótica em dois comprimentos de canal

Z (cm)	TFR_{0,2}@FRR₁	TFR₅@FRR₁	TFR₂₀@FRR₁	TFR₅@FRR₁₀
0,05	2,71	67,74	270,95	81,64
0,1	2,29	57,25	228,98	69,00

Notas: Para o cálculo do De, foi considerado o diâmetro hidráulico (303,81 μm), números de Reynolds (Tabela 23) e dados de raio da seção transversal e ângulo de curvatura local (Tabela 24) estimados conforme mostrado no Anexo I.

Como esperado, quanto maior a vazão, maiores foram os valores de Dean encontrados, pois também aumenta-se os números de Reynolds. A diferença obtida entre o comprimento 0,05 e 0,1 cm pode ser explicada pelo diferente grau de curvatura, sendo um pouco mais elevado para $Z = 0,05$ cm (Anexo I - Tabela 24). De modo geral, quanto maior o valor de De, maior a presença do fluxo secundário transversal e melhor é a mistura (HABCHI et al., 2009; VATANKHAH; SHAMLOO, 2018). Porém, é preciso analisar a influência do De para este sistema, pois a cada diferente estrutura e curvatura dos canais, a análise pode mudar (DI CARLO, 2009; VERMA et al., 2008). Com base nisso, Verma e colaboradores (2008) estudaram a advecção caótica e o fluxo de Dean para este sistema de canais entrelaçados, e

portanto, a comparação torna-se válida. Fluxo de Dean é a denominação para o perfil de fluxo secundário gerado em canais curvados, cuja representação de sua presença e intensidade é através do número de Dean. Os fluxos secundários são gerados a partir da recirculação do fluido próximo a parede, que causam linhas de corrente perpendiculares ao fluxo primário dos fluidos (Figura 9), levando a geração da advecção caótica (DI CARLO, 2009; VERMA et al., 2008). Os autores encontraram que para este sistema, a partir de um $De = 20$, a advecção caótica domina o perfil de fluxo dos fluidos. Nesse sentido, percebemos que de fato, a partir da TFR 5 esta condição é atingida. Além disso, Di Carlo (2009) afirma que os efeitos de advecção caótica e geometria de canal são negligenciáveis quando se trabalha em vazões muito baixas, como é o caso de boa parte dos sistemas microfluídicos. Ou seja, quando a vazão é muito baixa e se encontra valores de De próximo a 1 ou inferiores, a advecção caótica não é atingida e não exerce sua influência, bem como a geometria curvada não propicia melhora significativa da mistura. Com isso, podemos perceber que a TFR 0,2 possui um valor de De muito próximo de 1, e que neste caso, não há a presença de advecção caótica, ou mesmo pode ser negligenciável. Neste caso, o processo de mistura será governado preferencialmente pela difusão mássica.

Apesar das informações e análises que são possíveis de serem retiradas com o número de De para o sistema microfluídico em questão, Verma e colaboradores (2008) afirmam que o De , quando analisado isoladamente, não captura o perfil de fluxo dos fluidos por si só, uma vez que a curvatura é levada em conta, porém os efeitos de torção causados pelo entrelaçamento dos canais não são contemplados nesta análise.

Com o objetivo de compreender e consolidar o efeito caótico na eficiência de mistura nas condições testadas, calculou-se o índice de mistura nas FRRs e TFRs até então analisadas, como é mostrado na Tabela 9 abaixo, bem como o comprimento necessário para se atingir a mistura completa de 100% (Tabela 10). Apesar de haver trabalhos investigando que a partir de 70% de índice de mistura já há indicativo de condições de mistura completa (CETIN; ASIK; TAZE, 2013; PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017), optou-se por manter a definição de 100%, pois hipotetizou-se que condições abaixo de 100% ainda haveria uma condição local dentro do microcanal não favorável para a auto agregação dos lipídeos em lipossomas.

Tabela 9 - Índices de mistura para as condições simuladas em diversos comprimentos de canal

Z (cm)	TFR₅@FRR₁₀	TFR_{0,2}@FRR₁	TFR₅@FRR₁	TFR₂₀@FRR₁
0	74,01%	45,06%	44,81%	42,53%
0,05	88,61%	67,01%	67,43%	70,35%
0,1	91,98%	74,31%	83,36%	87,37%
0,25	97,18%	87,32%	96,19%	96,36%
0,5	99,76%	96,45%	99,68%	99,57%
1	100,00%	99,74%	100,00%	100,00%
2	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Valores calculados com base nos dados fornecidos pelo software ANSYS-CFX® 2020. Os comprimentos de canal (Z) são contabilizados a partir da junção das correntes de entrada.

Tabela 10 - Comprimento de canal para mistura completa nas condições analisadas

	TFR₅@FRR₁₀	TFR_{0,2}@FRR₁	TFR₅@FRR₁	TFR₂₀@FRR₁
Z (cm)	0,53	1,66	0,6	0,745

Os valores encontrados são aproximações com base no que se pôde observar pelos gradientes de etanol nas simulações realizadas.

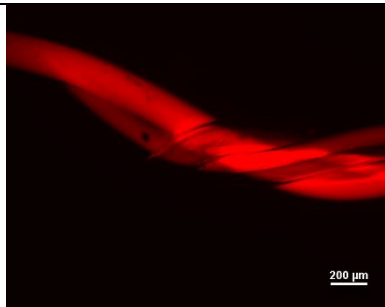
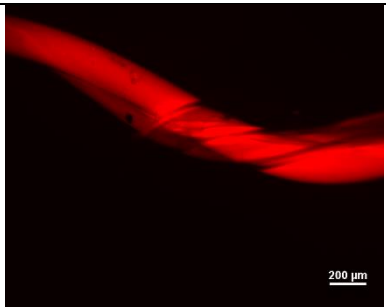
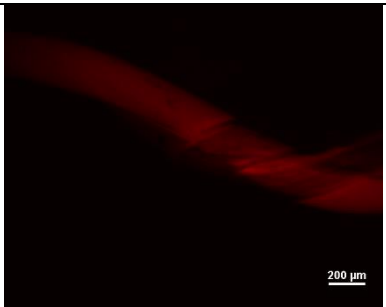
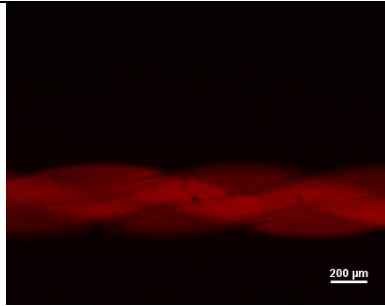
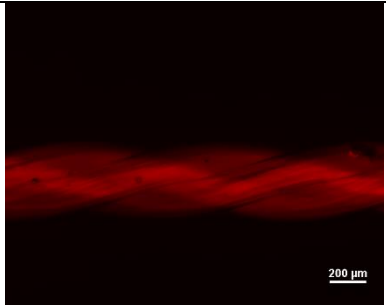
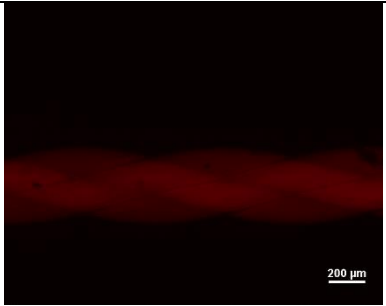
Como é possível observar, a FRR 10 é onde se tem o menor comprimento necessário para atingir a mistura completa (100%), como esperado, uma vez que a proporção de água é muito maior que a de etanol, o qual é diluído rapidamente, atingindo cerca de 9% (Tabela 2) em volume na mistura completa. Além disso, a TFR 0,2 é a vazão com índices de mistura mais baixos dentre elas, condição esta sem a presença da advecção caótica, levando mais que o dobro do comprimento para se atingir a mistura completa em comparação com as demais TFRs. Como visto, a presença da advecção caótica é fundamental para se obter o melhoramento da mistura, o que condiz com os índices de mistura encontrados. Apesar da pequena diferença encontrada entre as TFRs 5 e 20, ambas condições com advecção caótica presente, a mesma pode ser explicada pela possível menor difusão transversal na TFR 20. Como o processo de mistura é ocasionado tanto por contribuições difusivas quanto convectivas, a alta vazão propicia maior efeito convectivo, podendo minimizar a contribuição difusiva e levar a comprimentos maiores para mistura completa (FIRMINO et al., 2021; ISMAGILOV et al., 2000).

Desta maneira, também se optou por realizar a comprovação experimental, através da análise do escoamento com traçador fluorescente, a fim de se obter o perfil de mistura na prática, e compará-los aos resultados de simulação.

4.1.2 Avaliação experimental da mistura

Uma vez estabelecida a análise do perfil de mistura pela simulação computacional, torna-se interessante que a validação experimental seja realizada, de modo a se buscar a correspondência entre simulação e a prática experimental, permitindo a comprovação das hipóteses geradas. Assim, de modo a se obter o perfil de mistura experimental e confrontar com os resultados encontrados pela simulação realizada, ensaios de escoamento com o traçador fluorescente rodamina B foram realizados. Este traçador foi inserido na corrente central alcoólica. Para as correntes laterais utilizou-se água pura. Uma vez que a captação das imagens de fluorescência tinha um certo tempo de exposição adequado entre uma imagem e outra, a concentração de rodamina B precisou ser ajustada, sendo que na saída do canal foi de 0,0025; 0,005 e 0,0005 mM para as TFRs de 0,2; 5 e 20, respectivamente. Foram selecionados comprimentos aproximados de 0,1 (próximo a junção) e 2 cm a partir de junção, ou seja, locais supostamente sem e com mistura completa, como previamente visto pelas simulações realizadas. As imagens de fluorescência obtidas para as TFRs estudadas estão apresentadas na Tabela 11, cuja FRR 1 foi fixada.

Tabela 11 - Imagens de fluorescência obtidas com rodamina B simulando o processo de mistura no canal microfluídico para as vazões analisadas em FRR 1. Corrente central etanólica com Rodamina B em concentrações de saída de 0,0025; 0,005 e 0,0005 mM para as TFRs de 0,2; 5 e 20 mL/min, respectivamente. Correntes laterais de água pura foram utilizadas.

Local	TFR _{0,2} @FRR ₁	TFR ₅ @FRR ₁	TFR ₂₀ @FRR ₁
Próximo a junção			
Próximo a 2 cm			

Imagens retiradas em microscópio invertido.

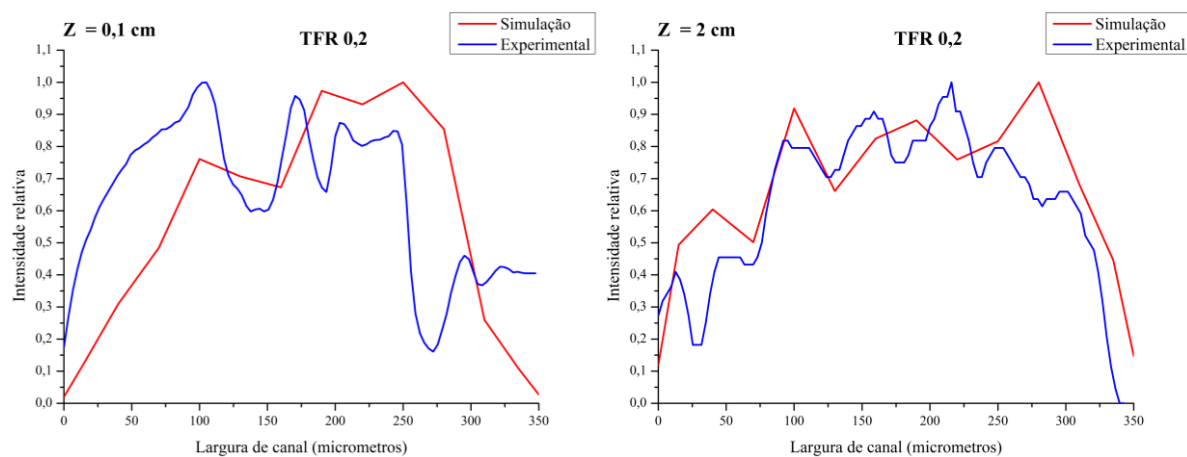
Como houve diferença de tonalidade luminosa para algumas imagens, pela variação de concentração de rodamina B utilizada, ajustes de brilho e contraste foram realizados no ImageJ®, de modo a se obter curvas apropriadas de intensidade de cinza, sem que houvesse extrapolação de intensidade. Como a quantificação do índice de mistura é normalizado para se obter um número adimensional, a comparação do comportamento de mistura torna-se viável para os três casos avaliados.

Pelas imagens obtidas (Tabela 11), percebe-se que no início do canal (próximo a junção das correntes de entrada) boa parte dele não está preenchido com o material fluorescente, nas três vazões, como pode ser visto pelas nuances apresentadas entre as cores vermelha (com traçador) e preta (somente água). Isso era esperado, uma vez que se viu pela simulação computacional que não há mistura completa para os comprimentos de canal próximos a junção (Tabela 9). De maneira análoga, quando voltamos a análise para a região próxima a 2 cm, todo o canal está preenchido com o traçador, para todas as TFRs, que pode ser checado pelas tonalidades na borda do canal que representam a geometria do HFR-MD, indicando que a mistura completa foi atingida. Esta evidência corrobora com a simulação computacional realizada, inferindo que a simulação é fiel ao comportamento experimental. As maiores intensidades visualizadas em certos locais no centro do microcanal não indicam que há maior fração de traçador, mas sim que representam a geometria do dispositivo e a característica de obtenção da imagem em microscópio invertido, que contabiliza a soma das intensidades ao longo da altura, e portanto, nas regiões em que há maior altura, há maior intensidade, para o caso de mistura completa. Visando confirmar a boa correspondência da simulação com os experimentos, os perfis gerados pela simulação e fluorescência puderam ser comparados. A Figura 28 apresenta a comparação nas três vazões de estudo.

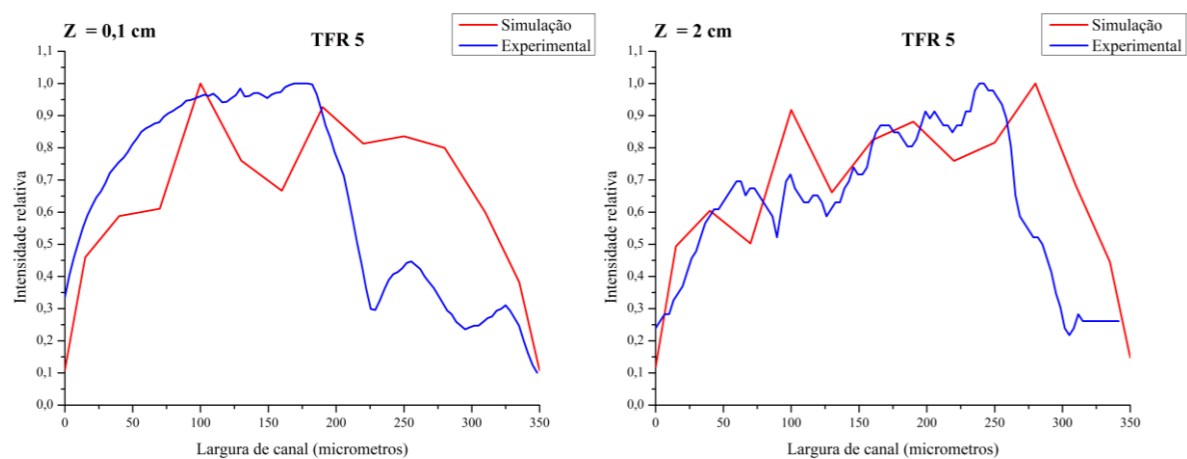
Analisando os perfis apresentados, claramente se observa uma concordância entre a simulação e o resultado experimental, principalmente em $Z = 2$ cm, e apesar de conter notórios desvios em $Z = 0,1$ cm para certas faixas de largura, neste comprimento não há mistura completa, e portanto é uma região mais propícia a desvios. Mesmo assim, percebe-se que para as três vazões o perfil simulado e experimental possui a mesma tendência e comportamento similar em toda a largura. Além disso, deve-se considerar que, apesar do alto critério de precisão e rigorosidade aplicado, ambos podem possuir erros de aproximação durante a extração dos resultados. Apesar disto, ao se realizar uma análise integrada considerando ambos os comprimentos, conclui-se que o perfil de mistura encontrado pela simulação representa a realidade experimental, já que em $Z = 2$ cm percebe-se uma maior concordância em todas as vazões, representada pela maior proximidade das curvas de intensidades relativas.

Figura 28 - Perfis de mistura para as vazões de (A) 0,2; (B) 5 e (C) 20 mL/min analisadas em FRR 1 ao longo da largura do microcanal de mistura comparando a simulação e os testes experimentais com fluorescência nos comprimentos de canal de 0,1 e 2 cm a partir da junção

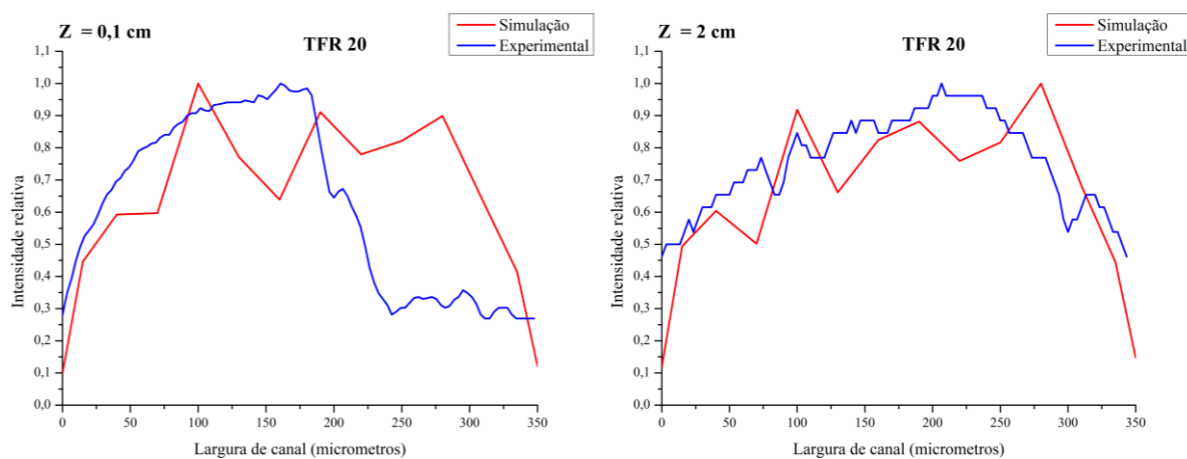
A)



B)

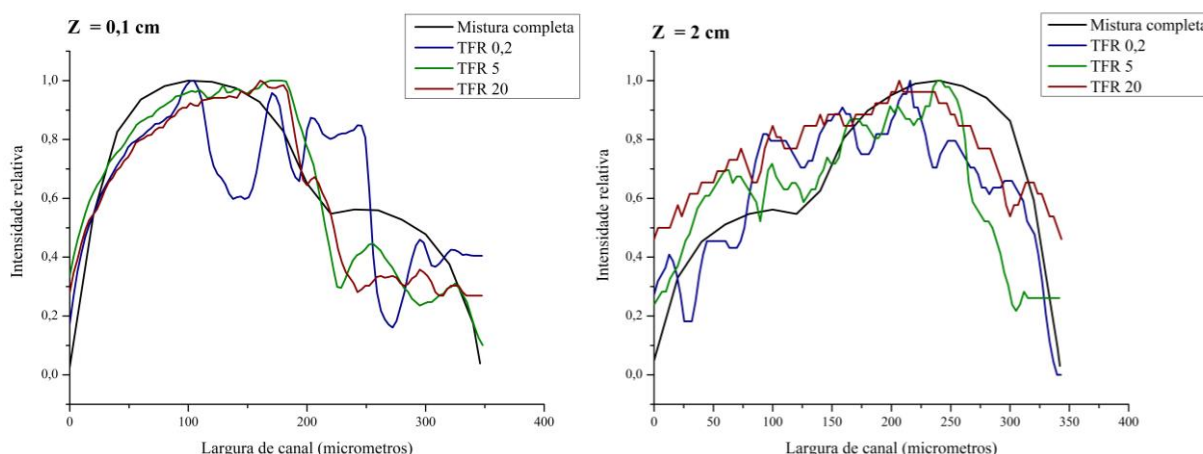


C)



A fim de se confirmar as hipóteses de mistura completa em $Z = 2$ cm, comparou-se os resultados experimentais com a mistura teórica completa, obtida a partir da geometria, somando-se as alturas em cada ponto extraído da largura do canal. Assim, foi possível obter o perfil teórico da mistura completa, análogo a metodologia empregada por Firmino e colaboradores (2021). A mistura completa foi considerada quando foi atingido 100% no índice de mistura para as condições analisadas. Dessa forma, a comparação é mostrada na Figura 29, para as três vazões, nos dois comprimentos de canal (0,1 e 2 cm), sendo que o perfil teórico esperado é dependente do formato da seção transversal do canal no comprimento analisado. Como é possível observar pela curva em preto, o perfil da mistura completa é diverso entre os dois comprimentos, praticamente oposto um do outro. Analisando-se as respectivas seções transversais apresentadas na Figura 30, isso era esperado, pois nitidamente as regiões com maiores áreas se encontram em lados contrários.

Figura 29 - Comparação entre perfil de mistura completa e experimental ao longo da largura do microcanal para as diferentes vazões analisadas em FRR 1 nos comprimentos de canal de 0,1 e 2 cm a partir da junção

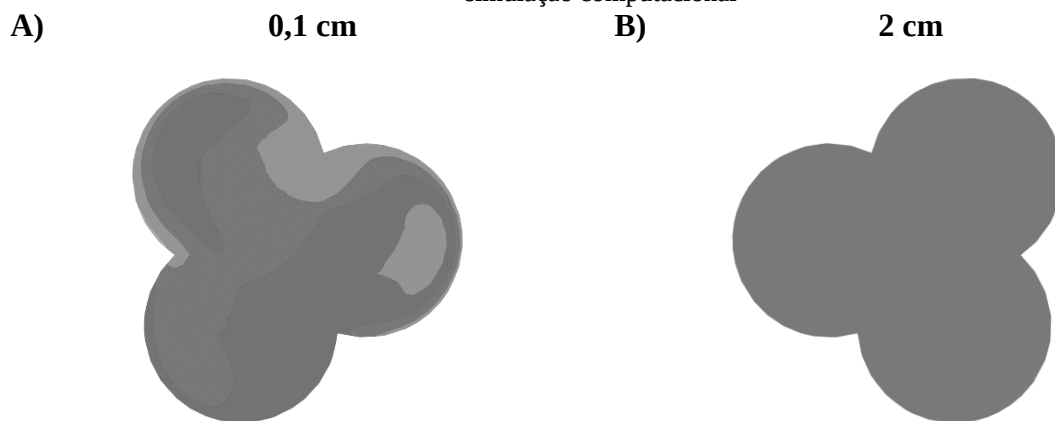


Imagens elaboradas no software OriginPro® 8.5.

A partir dos gráficos apresentados, observa-se que em $Z = 0,1$ cm os perfis experimentais seguem o mesmo padrão da mistura completa, exceto pelas quedas mais bruscas na segunda metade da largura. Isso pode ser justificado pelo fato de não haver mistura completa (100%) para nenhuma TFR, como pode ser verificado pela Figura 31. Além disso, notória atenção pode ser voltada ao fato de que na TFR 0,2, tanto a simulação quanto o perfil experimental tiveram a queda de intensidade relativa mais lenta na segunda intersecção da geometria, representado pela segunda e menor “corcova”, a partir de cerca de 200 micrometros até a parede do canal (perto de 350 micrometros), quando comparado com as TFRs 5 e 20 neste comprimento. Visualmente, de acordo com os perfis de concentração (Tabela 7), percebe-se

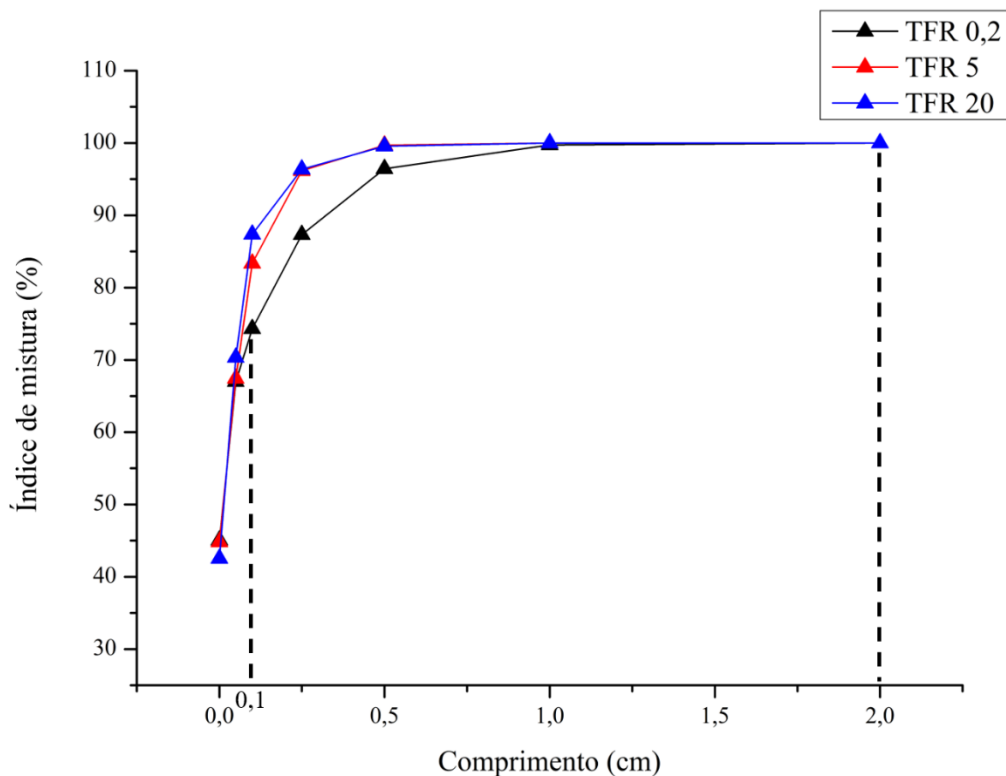
que a segunda “corcova” diz respeito ao fluxo proveniente da corrente etanólica, pois é onde há maior fração volumétrica de etanol, o que indica que nesse local houve menor mistura com as correntes de água, o que corrobora também com o menor índice de mistura observado pela Figura 31 para a TFR 0,2.

Figura 30 - Seções transversais dos comprimentos de canal 0,1 e 2 cm do dispositivo HFR-MD obtidas pela simulação computacional



Imagens retiradas do ANSYS-CFX® 2020 em escala de cinza para a TFR 20 e FRR 1.

Figura 31 - Índices de mistura ao longo do dispositivo HFR-MD para as TFRs analisadas em FRR 1 com base nos dados fornecidos a partir das simulações em CFD



As linhas tracejadas destacam os comprimentos de canal utilizados como comparativo.

No comprimento $Z = 2$ cm, observa-se também o mesmo padrão entre os perfis experimentais e mistura completa, aumentando a intensidade da primeira para a segunda metade do canal, sendo que os desvios nos graus de intensidade apresentados em algumas larguras provavelmente são causados por erros experimentais. Mesmo que a variação na intensidade não seja tão precisa nas curvas experimentais, o local de maior intensidade é atingido na mesma região da mistura completa, bem como percebe-se que as intensidades no início e no final do canal se comportam de maneira similar, o que justifica a mistura completa encontrada pelos índices de mistura para as três vazões neste comprimento. Resultados análogos foram encontrados por Firmino e colaboradores (2021) neste dispositivo para a FRR 1 e TFR 0,5 em um comprimento próximo da junção e outro distante, cujos perfis experimentais tiveram o mesmo comportamento, porém desvios também foram encontrados. Estes resultados encontrados permitem inferir que o processo de autoagregação dos lipídios ocorrerá totalmente dentro do microcanal, pois o canal de mistura do HFR-MD possui 3,5 cm, e em 2 cm já se tem a mistura completa, inclusive para a TFR 0,2.

Os resultados e conclusões obtidas pelas simulações realizadas, bem como os testes experimentais de fluorescência, serviram como apoio para antever e estabelecer condições ótimas de processo para a investigação da síntese de lipossomas e demais nanoestruturas analisadas neste trabalho. Como encontrado pelas simulações, a advecção caótica e fluxo de Dean se faz presente a partir da TFR 5 dentre as condições analisadas. Desta forma, a TFR 0,2 foi descartada como o padrão inicial na investigação dos lipossomas, uma vez que esse fenômeno é caracterizado por melhorar a mistura, e poderia impactar positivamente na formação adequada dos lipossomas. Dentre as TFRs 5 e 20, optou-se por definir a TFR 5 como condição inicial, pois mesmo não sendo a vazão com maior produtividade, em termos de processamento foi a vazão mais segura para se operar, além de já ter sido previamente validada por Firmino e colaboradores (2021) na síntese de lipossomas.

4.2 SÍNTESE DE LIPOSSOMAS

Um dos métodos microfluídicos mais conhecidos e validados na literatura para a formação de lipossomas é o método de focalização hidrodinâmica (MHF) (AGHAEI; NAZAR, 2019; JAHN et al., 2004; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015). No entanto, apesar dos dispositivos baseados em difusão (como os da Figura 8) permitirem a produção de lipossomas com baixa polidispersidade e tamanho, a concentração lipídica e baixas taxas de fluxo se tornam uma limitação desta técnica (AHN et al., 2018; BELLIVEAU et al., 2012; MAEKI et al., 2018).

Nesse sentido, o dispositivo HFR-MD (Figura 20) foi investigado com o intuito de contornar este problema, visando a implementação de advecção caótica, técnica esta, já validada para lipossomas (EŞ et al., 2020; FIRMINO et al., 2021; KASTNER et al., 2015). No entanto, não foi encontrado na literatura algum trabalho que investigou a síntese de complexos material genético/lipídios com o HFR-MD. Dessa forma, buscou-se elucidar seu potencial uso para a síntese de lipossomas catiônicos, do tipo *stealth*, lipoplexos e LNPs.

4.2.1 Produção de lipossomas catiônicos - CLs em água

Buscando-se validar o dispositivo na produção de CLs, inicialmente foram utilizadas condições de fluxo já estabelecidas por Firmino e colaboradores (2021) para a produção de lipossomas nesse dispositivo (TFR 5 mL/min), e com composições lipídicas semelhantes as previamente estabelecidas por nosso grupo de pesquisa (BALBINO et al., 2013; EŞ et al., 2020; PERLI et al., 2019), como prova de conceito.

A Tabela 12 apresenta os resultados de diâmetro médio hidrodinâmico, PDI e potencial zeta encontrados para os lipossomas nas condições analisadas: FRRs de 1 e 10 e TFR de 5 mL/min. Para as análises, as amostras foram diluídas a 0,2 mM em água pura para diminuir a quantidade de etanol, visto que o etanol pode estar presente na bicamada lipídica, e desse modo diminuiria a tensão interfacial ao longo das bicamadas lipídicas e poderia resultar em diâmetros maiores (AGHAEI; NAZAR, 2019; EŞ et al., 2020; FIRMINO et al., 2021). É possível perceber que o aumento da FRR resultou em nanoestruturas maiores e mais polidispersas, bem como um reduzido potencial zeta. Isso pode ser explicado pela mistura muito rápida do etanol, que leva a formação intensa de nanoestruturas em um curto comprimento de canal, como visto pela (Tabela 9). Além disso, também pode ser acoplada a análise da menor largura difusional etanol-água propiciada pela FRR 10, o que ocasiona reduzida taxa de mistura difusional dentro do micromisturador, possivelmente levando à nucleação parcialmente incompleta e uma taxa mais baixa de formação de lipossomas. Ao contrário do que se observa para dispositivos baseados em difusão, o aumento na quantidade de etanol na FRR 1 pode controlar a formação de fragmentos de bicamada por meio de mudanças de polaridade, favorecendo assim a formação de lipossomas com características adequadas na presença de advecção caótica (EŞ et al., 2020; KASTNER et al., 2015). Também pode-se acrescentar a isto o efeito da FRR visto pela simulação, em que a FRR 10 propicia um alto índice de mistura logo no início do canal (Tabela 9), o que pode contribuir para o fenômeno citado, uma vez que baixas variações (gradientes) de etanol foram observadas. Dessa forma, considerando que na FRR 10 o tempo para mistura

completa é menor, a síntese dos lipossomas também ocorre muito rapidamente, visto que a TFR 5 já é elevada, e experimentalmente pode ter ocasionado um descontrole no processo de autoagregação. Eş e colaboradores (2020) obtiveram CLs de mesma composição em dispositivo *herringbone* de duas entradas, sintetizando partículas de 187 nm, PDI de 0,12 e potencial zeta de 59,8 mV, em TFR de 0,5 mL/min e FRR 1. Balbino e colaboradores (2013) sintetizaram os mesmos CLs, porém em dispositivo *single*-MHF baseado em difusão, obtendo nanoestruturas de diâmetro próximo a 124,9 nm, PDI de 0,31 e potencial zeta de 57,4 mV, em FRR 10. Comparativamente, pode-se concluir que o dispositivo HFR-MD é adequado para a síntese de lipossomas, estando também de acordo com valores encontrados por Firmino e colaboradores (2021) para este dispositivo, os quais sintetizaram lipossomas de lecitina de soja na TFR de 5 mL/min, e obtiveram tamanhos de partícula de 176,4 nm e PDI de 0,074, em FRR 1. Por fim, é interessante frisar o efeito da FRR nas propriedades dos lipossomas quando se muda o perfil de mistura e o dispositivo. Zizzari e colaboradores (2017), Aghaei e Nazar (2019) e Jahn e colaboradores (2010) utilizando-se de dispositivo MHF baseado em difusão, perceberam que o aumento na FRR causa a diminuição no tamanho dos lipossomas, ainda que possa haver aumento do PDI (AGHAEI; NAZAR, 2019). Uma vez que esses dispositivos se baseiam estritamente na difusão para propiciar a mistura, a FRR maior resulta em menor largura difusional, necessitando assim, em teoria, menor comprimento de canal para se atingir a completa autoagregação e formação do lipossoma (ZHIGALTSEV et al., 2012). No entanto, quando se utiliza dispositivo de advecção caótica, a influência pode ser diversa. Apesar do etanol continuar sendo hidrodinamicamente comprimido pelas correntes laterais aquosas, a melhora no efeito de mistura causado pelo fluxo secundário favorece a utilização de concentrações mais elevadas de etanol e lipídios, havendo melhor controle sobre a formação do fragmento da bicamada através da mudança de polaridade, contribuindo para a formação de lipossomas com características adequadas (EŞ et al., 2020; FIRMINO et al., 2021). Além disso, o Teste de Tukey e o teste t de *Student* bicaudal confirmaram diferenças estatísticas para PDI e potencial zeta entre as FRRs, bem como menor número de Reynolds para a FRR 1 (Tabela 13), o que condiz com a literatura (FIRMINO et al., 2021).

Elevados números de Peclet (Tabela 13) foram encontrados para ambas as FRRs, o que acarreta maior contribuição de transporte convectivo, corroborando com o efeito de fluxo transversal secundário encontrado anteriormente, sendo pronunciado para a FRR 1. No entanto, essa análise não pode ser feita separadamente, uma vez que outros fatores como composição lipídica, concentração total lipídica e TFR se provam fatores de suma relevância no

compreendimento da formação de lipossomas (AGHAEI; NAZAR, 2019; FIRMINO et al., 2021; ZIZZARI et al., 2017).

Tabela 12 – Caracterização físico-química dos CLs produzidos no dispositivo HFR-MD em água e TFR 5 com relação ao diâmetro médio, PDI e potencial zeta com seus respectivos desvios padrões (DP) para as diferentes FRRs

Condição	^Ω Diâmetro médio (nm ± DP)	^Δ PDI ± DP	^Δ ζ (mV ± DP)
TFR₅@FRR₁	162,8 ± 6,9	0,158 ± 0,017	66,1 ± 1,0
TFR₅@FRR₁₀	184,6 ± 67,5	0,295 ± 0,081	51,4 ± 6,4

Ω valor-p foi maior que 0,05, não indicando diferenças significativas. Δ valor-p foi menor que 0,05, indicando diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 13 - Números de Reynolds e Peclet para a análise de FRRs em TFR 5

Condição	Re	Pe
TFR₅@FRR₁	172,74	45.248,30
TFR₅@FRR₁₀	208,20	22.374,83

Em seguida, estudou-se o efeito da concentração de íons na modulação dos lipossomas, a fim de se obter informações se a alteração da água pura como corrente aquosa por um tampão poderia ser mais adequada ou não na síntese de nanoestruturas no dispositivo HFR-MD, sendo que para tal estudo utilizou-se a TFR de 5 mL/min.

4.2.2 Comparação físico-química entre lipossomas catiônicos - CLs produzidos em água e em tampão fosfato-salino - PBS

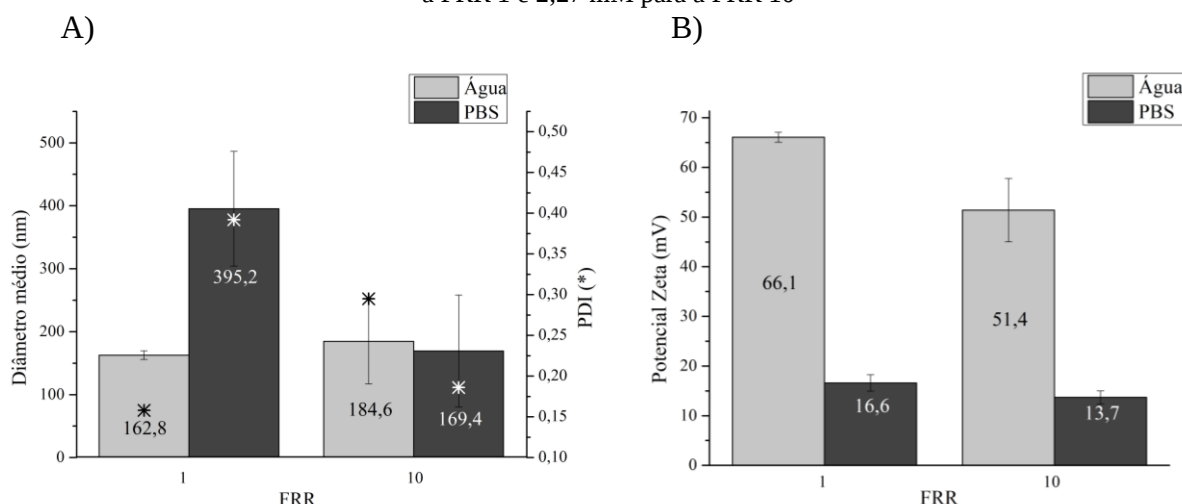
A análise de síntese de lipossomas na presença de tampão PBS foi realizada e comparada com a formação em água. Esse estudo foi realizado por dois motivos: (i) pelo possível melhoramento na modulação de lipossomas, como investigado por Perli e colaboradores (2019); (ii) ser amplamente utilizado no pós-processamento de LNPs (BLAKNEY et al., 2019; PATEL et al., 2019; SEMPLE et al., 2010). Desse modo, buscou-se investigar a influência de íons presentes no meio através do uso de tampão PBS nas características físico-químicas dos lipossomas na sua maior (FRR 10) e menor quantidade (FRR 1), mantendo a mesma composição para os lipossomas catiônicos.

A diferença entre CLs produzidos em água e em PBS utilizando-se a TFR de 5 mL/min pode ser visualizada em termos de diâmetro hidrodinâmico médio e PDI (Figura 32 (A)), e

potencial zeta (Figura 32 (B)). Conforme estudo realizado por Perli e colaboradores (2019), os autores apontaram melhorias significativas quando incorporaram PBS às correntes laterais na formação de S-CLs em dispositivo de focalização hidrodinâmica em FRR 10, quando comparado com correntes laterais de água. Com a utilização de PBS, foi hipotetizado que os íons reduzem as interações hidrofílicas entre as cabeças polares dos fosfolipídios e, conseqüentemente, podem favorecer as interações hidrofóbicas entre as caudas apolares, propiciando o controle da auto agregação dos lipídios em bicamada e promovendo a formação de S-CL monodisperso dentro dos microcanais, reduzindo também, o processo de micro agregação dentro dos canais e evitando formação de micelas. No entanto, apesar de ter sido um importante parâmetro, concluiu-se que o aumento da força iônica por si só não é responsável pela modulação adequada da auto agregação do S-CL. Por fim, viu-se que o aumento na presença de íons causou a redução do potencial zeta. Como esperado, e de acordo com a teoria de Gouy-Chapman, o aumento de íons presentes no meio implica em maiores quantidades de ânions ao redor da membrana lipídica catiônica, levando a formação de uma dupla camada elétrica, que por sua vez, ocasiona o encolhimento da atmosfera iônica pelo aumento da presença de íons e uma proteção eletrostática (PERLI et al., 2019; SHAH et al., 2015; YANG et al., 2017). Conforme resultado encontrado na Figura 32 (B), esta hipótese também se mostra válida para CLs sem lipídio PEGlado. No entanto, a redução do potencial zeta para valores abaixo de ± 30 mV por si só não implica em maior desestabilidade coloidal, como verificado por Perli e colaboradores (2019), sendo também influenciada pelas forças atrativas de Van der Waals (BHATTACHARJEE, 2016; SHAH et al., 2015). Além disso, é possível notar que a mudança de FRR se mostrou parâmetro essencial na auto agregação lipídica em PBS, levando a uma distribuição de partículas mais polidispersa e de tamanho notavelmente maior em FRR 1. Como observado por Perli e colaboradores (2019), em situações com maiores quantidades de íons (FRR 10 ou maiores concentrações), as interações fosfolipídio-fosfolipídio são governadas por forças de van der Waals, uma vez que as interações repulsivas são significativamente diminuídas devido à blindagem iônica pronunciada entre os grupos aminos dos lipídios catiônicos causada pela presença de ânions no meio, levando a formação adequada da bicamada e distribuições de tamanho mais estreitas (menor PDI). Ou seja, na condição de maior concentração lipídica e menor presença de íons, a possibilidade de fusão de lipossomas é maior devido a maior disponibilidade lipídica e maior proximidade das estruturas recém-formadas. Ou seja, esse efeito dos sais facilita a aproximação dos lipídios, que na maior quantidade lipídica (FRR 1), aumenta o número de moléculas fosfolipídicas agregadas, levando a partículas maiores, como pode ser observado na Figura 32. No entanto, cabe destacar que a

o tampão PBS torna-se fator mais relevante quando há a inserção do lipídio PEGlado, pois os íons dispersos no meio podem modular a hidrofiliicidade do lipídio PEGlado minimizando sua afinidade com a corrente aquosa, diminuindo sua força motriz de difusão, importante para evitar a formação de microagregados e micelas (PERLI et al., 2019).

Figura 32 – Comparação físico-química de diâmetro médio, PDI (A) e potencial zeta (B) entre CLs produzidos em água e em tampão PBS para a TFR 5 nas diferentes FRRs, com concentração final lipídica de 12,5 mM para a FRR 1 e 2,27 mM para a FRR 10



Nota: para ambas as condições (com água e tampão PBS) usou-se a mesma concentração lipídica de entrada (25 mM). Imagens elaboradas no software OriginPro® 8.5.

Para confirmar a hipótese de que a auto agregação foi impactada com a escolha do tampão PBS, principalmente quando em maior proporção lipídica (FRR 1), o teste de Tukey foi realizado. Os resultados mostraram que, para a FRR 1, as triplicatas independentes entre água e PBS são estatisticamente diferentes, tanto para diâmetro médio, quanto PDI e potencial zeta. Com relação à FRR 10, pelos motivos já citados, os resultados de tamanho e PDI foram substancialmente melhores, sendo que apenas o potencial zeta se mostrou estatisticamente diferente, o que era de se esperar, uma vez que o tampão PBS altera a dupla camada elétrica, conforme discutido anteriormente. Portanto, este estudo com o tampão PBS mostrou que o mesmo não se mostrou adequado na síntese de lipossomas em FRR 1, comprovado pela caracterização físico-química e precipitações observadas, e mesmo em FRR 10 não houve melhoras significativas para justificar sua escolha. Desse modo, optou-se por prosseguir com a água pura, pois sistemas à base de lipídios catiônicos também são sensíveis à alta quantidade de sais e podem levar a precipitações (ROCES et al., 2020), como pôde ser visualizado nesse trabalho. Além disso, a investigação proposta por Perli e colaboradores (2019) foi realizada em dispositivo de focalização hidrodinâmica, a qual se baseia em mistura difusiva e transferência

de massa gradual, levando a um balanceamento adequado de cargas nesse caso (PERLI et al., 2019). Já para o caso desse trabalho, que se utiliza da advecção caótica e mistura mais rápida no HFR-MD, esses conceitos não são igualmente válidos, pois além dos diferentes gradientes de concentração que são gerados, não foi utilizado o lipídio PEGlado, que causa diferentes efeitos no processo de autoagregação e modulação da nanoestrutura na presença de sais.

Após a análise do efeito da mudança de FRR e do tampão PBS nas propriedades dos lipossomas, foi estudado o efeito da variação de fluxo total (TFR), com o intuito de analisar se o tempo de residência diferente poderia ser um fator importante na auto agregação, além dos efeitos de mistura. Para esse estudo, a FRR 1 foi estabelecida como condição padrão, uma vez que melhores resultados em água pura foram obtidos.

4.2.3 Efeito da taxa de fluxo total - TFR nas características dos lipossomas

Uma vez definido parâmetros importantes como FRR e fase aquosa, o estudo da TFR pôde ser realizado. Tal estudo objetivou analisar se o padrão de mistura e tempo de residência poderiam impactar nas propriedades físico-químicas dos lipossomas.

O efeito de mistura no microcanal foi estudado para as vazões de 0,2; 5 e 20 mL/min, com FRR 1 fixada, a fim de identificar se as condições extremas de menor e maior vazão alterariam as características dos lipossomas. Os tempos de residência (τ_{res}) para as três vazões no canal trançado de mistura estão dispostos na Tabela 14, onde percebe-se a clara diferença de escala de τ_{res} entre a vazão mais baixa e as TFRs de 5 e 20 mL/min.

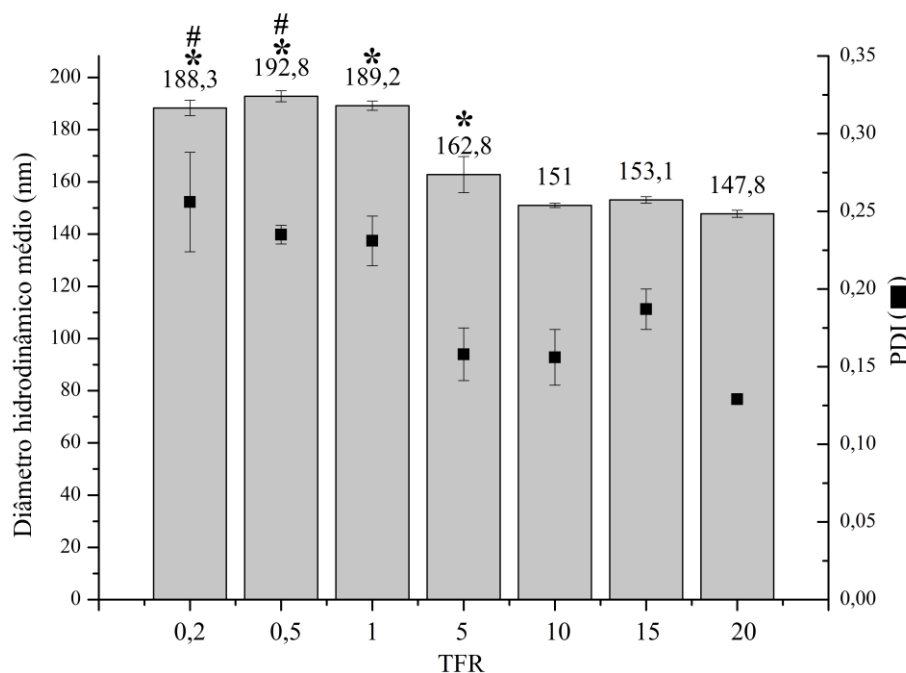
Tabela 14 - Tempo de residência para as vazões de 0,2, 5 e 20 mL/min considerando apenas o canal trançado para ocorrer a mistura

TFR (mL/min)	τ_{res} (ms)
0,2	1250
5	50
20	12,5

Através da simulação realizada em software ANSYS-CFX®, sabe-se previamente que a advecção caótica é presente nas altas vazões (TFR 5 e 20), e que o comprimento para se atingir a mistura completa é menor que para a TFR 0,2. Isso nos forneceu um indicativo de que vazões altas poderiam resultar em nanoestruturas menores e com baixo PDI, uma vez que melhores condições de mistura são atingidas. Com o intuito de visualizar esse possível efeito, foram

testadas também algumas TFRs intermediárias: 0,5; 1; 10 e 15 mL/min. Os resultados experimentais encontram-se na Figura 33.

Figura 33 - Efeito da vazão nas propriedades de diâmetro hidrodinâmico médio e PDI dos lipossomas catiônicos produzidos em FRR 1. * Indica diferença estatística significativa de diâmetro quando comparado com as TFRs de 10; 15 e 20 mL/min. # Indica diferença estatística significativa de PDI quando comparado com as TFRs de 5; 10; 15 e 20 mL/min.



Imagens elaboradas no software OriginPro® 8.5.

De acordo com a Figura 33, é possível perceber uma tendência de melhora nas propriedades dos lipossomas conforme há o aumento da vazão. Isso corrobora para as hipóteses da eficiência de mistura ser importante, como visto pelas simulações realizadas. Graficamente e experimentalmente percebe-se duas regiões distintas: uma região de diâmetros e PDI maiores, que abrange as TFRs de 0,2 a 1 mL/min, e uma segunda região com diâmetros e PDI menores, abrangendo as TFRs de 5 a 20 mL/min. Curiosamente, isso corrobora com a hipótese de advecção caótica que foi encontrada a partir da TFR 5. Ou seja, é possível inferir que a dinâmica de mistura é predominantemente difusiva até a TFR 1 devido aos diâmetros e PDI similares, e que passa a ser caótica após a TFR 5. Além disso, os testes estatísticos revelaram mudanças significativas de tamanho e PDI das partículas nas TFRs muito baixas (0,2 e 0,5 mL/min). Apesar disto, não foi visto nenhuma aglomeração de particulados no canal para nenhuma destas vazões, bem como pode-se considerar diâmetros e PDIs adequados para aplicações, conforme visto na literatura (AGHAEI; NAZAR, 2019; KASTNER et al., 2015; ZIZZARI et al., 2017).

Ou seja, conclui-se que para os lipossomas catiônicos, a presença mais intensa da advecção caótica e maiores TFRs não trazem melhorias muito significativas a ponto de se tornar crucial para uma produção de lipossomas com propriedades físico-químicas adequadas para aplicações, o que corrobora com diversos trabalhos de lipossomas na literatura em que não foram observadas melhorias significativas com aumento da TFR (JAHN et al., 2010; JOSHI et al., 2016), inclusive em alguns casos com uso da advecção caótica (EŞ et al., 2020; FIRMINO et al., 2021; KASTNER et al., 2015).

Como análise subsequente, decidiu-se investigar se a formação de S-CLs ocorreria de maneira similar. Com isso, fixou-se a FRR 1 e avaliou-se a condição padrão (TFR 5) e se a vazão mínima (TFR 0,2) seria capaz de incorporar o lipídio PEGlado adequadamente.

4.2.4 Produção de lipossomas *stealth*

Como discutido anteriormente, a incorporação do lipídio PEGlado confere a propriedade *stealth* que causa o impedimento estérico e potenciais benefícios em estudos de terapia gênica. Desse modo, com o objetivo de incorporar o lipídio PEGlado na estrutura, utilizou-se das condições estudadas para os CLs e conclusões obtidas como ponto de partida para a produção no dispositivo HFR-MD. Inicialmente, fez-se um estudo de vazões amenas, de modo a investigar a vazão mínima necessária para incorporar o lipídio PEG sem que houvesse aglomerados no canal, como visto por Eş e colaboradores (2020) e Perli e colaboradores (2019) em dispositivos D-MD, o que inviabilizaria uma produção contínua. Portanto, iniciou-se os testes em FRR 1, padronizando-se a água pura como correntes laterais e analisando-se as TFRs 0,2 e 5 mL/min. Os resultados estão dispostos na Tabela 15.

Tabela 15 - Propriedades físico-químicas de diâmetro médio, PDI e potencial zeta com os respectivos desvios padrões (DP) dos lipossomas *stealth* sintetizados em FRR 1 para as TFRs 0,2 e 5 mL/min em água pura como correntes laterais aquosas

TFR (mL/min)	^Δ Diâmetro médio (nm ± DP)	PDI ± DP	ζ (mV ± DP)
0,2	174,4 ± 9,9	0,21 ± 0,029	63,2 ± 1,7
5	160,3 ± 9,3	0,19 ± 0,044	64,8 ± 2,2

Δ valor-p menor que 0,05, indicando diferenças significativas entre os grupos.

Como é possível observar, a vazão de 0,2 mL/min já foi suficiente para a incorporação do lipídio PEGlado nos lipossomas com boas propriedades físico-químicas e sem formação de

microagregados no microcanal. Como visto pela simulação computacional, a TFR 0,2 não apresenta uma dinâmica de mistura caótica. Nesse sentido, esperava-se que houvesse a geração de microagregados, da mesma forma que observado em dispositivos D-MD (EŞ et al., 2020; PERLI et al., 2019). Curiosamente, não foi o que ocorreu. Esse fato pode inferir que na TFR 0,2 já existe uma contribuição convectiva não desprezível, mesmo que não seja o necessário para alterar o perfil de mistura. Para comprovar essa hipótese, comparou-se o número de Peclet obtido (1.809,93) com a literatura. Na literatura, foram encontrados vários trabalhos discutindo sobre a predominância da difusão na microfluídica quando $Pe < 2$. Ou seja, para $Pe > 2$, já se pode inferir que a convecção ganha representatividade (GOBBY; ANGELI; GAVRIILIDIS, 2001; JEN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2016).

Como observado por Eş e colaboradores (2020), quando se utiliza dispositivos como SHM ou HFR-MD, que permitem operações em uma escala de vazão 10 vezes maior que dispositivos D-MD, ou até mais, a autoagregação dos lipídeos ocorre favoravelmente com a alteração da geometria, bem como a mudança de polaridade e solubilidade lipídica podem ser modificadas tanto pela TFR quanto pela FRR, de modo a favorecer a formação dos lipossomas. A hipótese gerada pelos autores é de que a mistura mais rápida e eficiente ocasionada pelo uso de advecção caótica evita a transição da fase lamelar para a fase micelar no uso do lipídio PEGlado, uma vez que a formação de micelas (10 a 20 nm (PERLI et al., 2019)) é favorecida em processos difusivos em que a mistura é lenta, pois é mais rapidamente formada (10^{-3} a 10^{-6} s) comparada com a formação de bicamada (10^{-1} a 10^{-3} s), influenciada também pela redução do parâmetro de empacotamento (P.E) médio ocasionado pelo DSPE-PEG 2000 (VHORA et al., 2018). Termodinamicamente, durante a hidratação dos lipídios e a diminuição de sua solubilidade, o processo espontâneo de autoagregação ocorre inicialmente pela formação de membranas lipídicas planares, devido às instabilidades termodinâmicas e energéticas geradas nas bordas dos fragmentos fosfolipídicos que estão com as caudas hidrofóbicas expostas a água. Para minimizar essa energia, a tendência natural é a de conformação em vesícula esférica, condição energeticamente e entropicamente favorável de baixa energia livre que ocorre somente quando a energia de borda excede a energia de resistência à flexão (BALAZS; GODBEY, 2011; BALBINO et al., 2013; HUANG et al., 2017). O formato e o tamanho da nanoestrutura formada estão associados com a minimização da energia de flexão e a energia elástica requerida para flexionar e tornar os discos planares em estruturas vesiculares, e para isso aconteça de maneira apropriada, as técnicas de produção cumprem papel fundamental (CAPRETTO et al., 2013; HUANG et al., 2017; ZOOK; VREELAND, 2010). Dessa forma,

em misturas rápidas e caóticas o lipídio PEGlado pode ser apropriadamente inserido na estrutura de bicamada dos lipossomas.

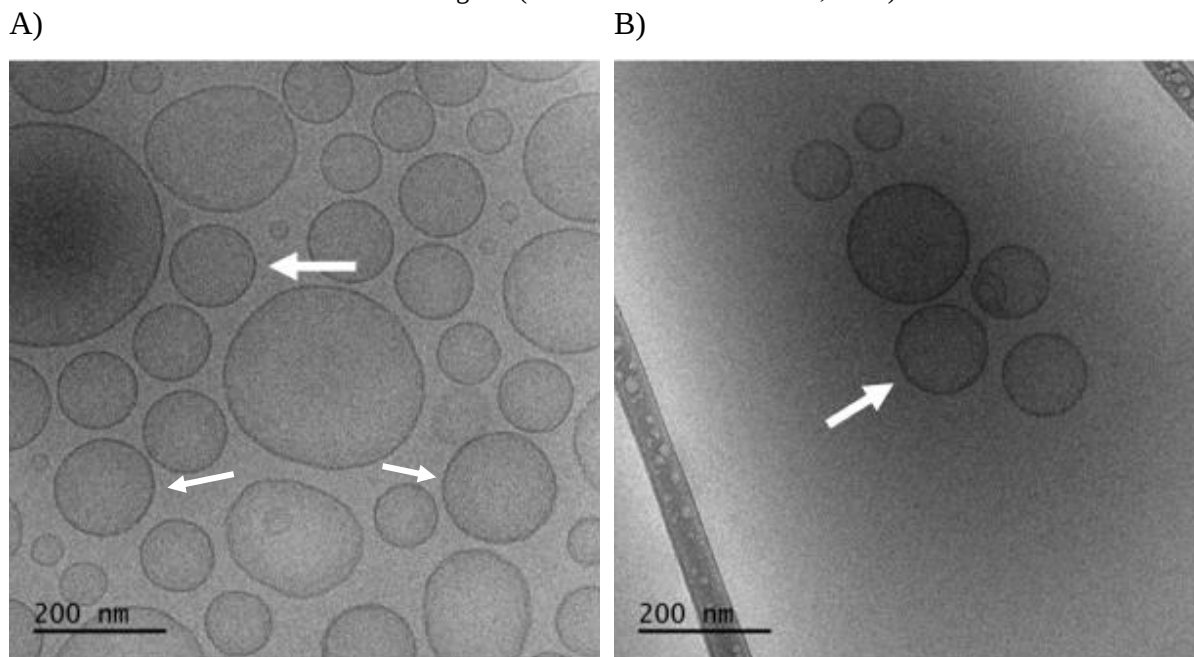
Apesar da TFR 0,2 fornecer lipossomas com características plausíveis para aplicações, mudanças estatísticas para o diâmetro médio hidrodinâmico dos lipossomas foram encontradas, tanto pelo teste t de *Student*, quanto pelo teste de Tukey. Desse modo, considerando o impacto favorável do aumento da vazão tanto para a produção de CLs quanto S-CLs, optou-se por padronizar a TFR 5 como a condição padrão para uso posterior na síntese de lipoplexos, pois também se mostrou a melhor condição para se operar, apresentando vantagens operacionais, uma vez que a TFR 20, por ser uma vazão muito alta para se trabalhar, implica em maiores perdas de coleta inerentes ao processo de síntese.

Por fim, de modo a confirmar a formação adequada dos CLs e S-CLs na condição padronizada, e de que fato não houve a formação de micelas no caso dos CLs *stealth*, fez-se uma análise de morfologia por cryo-TEM das amostras com o apoio do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

4.2.5 Análise de morfologia dos lipossomas

Uma das técnicas mais utilizadas no estudo da morfologia de nanoestruturas é o cryo-TEM. Através desta técnica é possível observar se os lipossomas são majoritariamente unilamelares ou multilamelares, se não há presença de micelas, e se de fato apresentam as faixas de tamanho mostradas pela análise de DLS. Desse modo, visou-se validar se as boas propriedades de tamanho, PDI e potencial zeta corresponderiam a sua estrutura morfológica. Partindo-se disso, realizou-se ensaios de cryo-TEM dos lipossomas com o apoio do CNPEM. Os resultados das análises de cryo-TEM são mostrados na Figura 34 para CLs (A) e S-CLs (B), ambos produzidos em TFR 5 e FRR 1.

Figura 34 - Imagens de cryo-TEM dos CLs e S-CLs produzidos em TFR 5 e FRR 1. A) Imagens de CLs e B) S-CLs. As setas indicam os lipossomas de tamanhos correspondentes aos encontrados por DLS, quantificados com o software ImageJ® (National Institute of Health, EUA).



Fonte: Imagens elaboradas com o apoio do CNPEM (2021). As concentrações lipídicas utilizadas na análise foram de 10 mM para ambos os lipossomas. Os lados mais escuros das imagens representam a camada de carbono das grades.

Pelas estruturas geradas, observa-se que ambos os lipossomas catiônicos e do tipo *stealth* resultaram em unilamelares, onde se é possível observar a bicamada em alguns casos, similar ao que foi encontrado por Eş e colaboradores (2020). A partir de todas as análises realizadas, é possível concluir que o dispositivo, mesmo sendo um protótipo, é adequado para a produção de lipossomas catiônicos e *stealth* em alta produtividade, principalmente na TFR 5, o que nos permitiu avançar na produção dos lipoplexos e também na investigação de LNPs com pDNA. A alta produtividade atingida nessa condição é comparável ao encontrado por Eş e colaboradores (2020) para dispositivo *herringbone*. Os autores encontraram que as condições de síntese de lipossomas utilizadas, TFR de 1,5 mL/min e concentração lipídica final de 12,5 mM (FRR 1), resultaram em produtividade cerca de 70 vezes maior que dispositivo baseado em difusão (D-MD) em condições de TFR 120 μ L/min e concentração lipídica final de 2,27 mM atingidas por nosso grupo de pesquisa (BALBINO et al., 2013). Considerando que a concentração final atingida neste trabalho é a mesma e a TFR é mais elevada, alcança-se produtividade ainda maior com o HFR-MD. Porém, apesar de tais condições de produtividade serem elevadas quando comparado com dispositivos MHF tradicionais (TFR < 10 mL/h) (SHEPHERD et al., 2021), atualmente já existem trabalhos investigando produções de

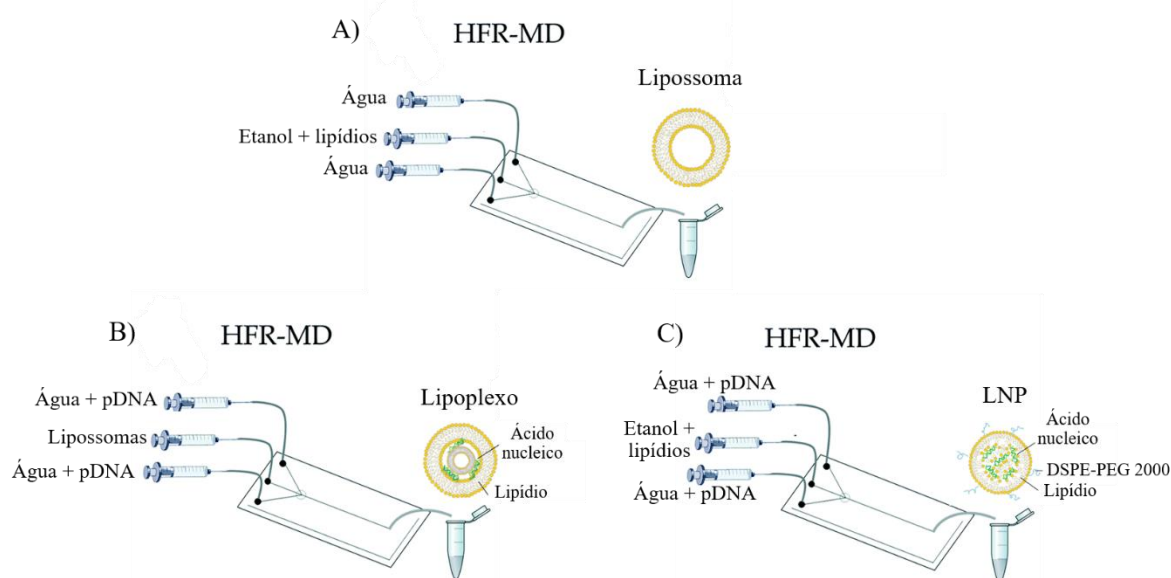
lipossomas com vazão acima de 20 L/h (WEBB et al., 2020) e LNPs acima de 18 L/h (300 mL/min) (SHEPHERD et al., 2021).

A partir das simulações realizadas e dos resultados de DLS e cryo-TEM, percebe-se que para o caso dos lipossomas, tanto CLs quanto S-CLs, o efeito de advecção caótica não é fator determinante, mesmo que benéfico, pois dentro das condições analisadas, baixas TFRs e consequente negligenciável presença do fluxo de Dean resultaram em nanoestruturas adequadas, ainda que tenham mostrado diferenças estatísticas de tamanho e PDI com relação as TFRs elevadas. No entanto, a produtividade é notavelmente mais baixa na TFR 0,2, sendo 25 e 100 vezes menor que as TFRs 5 e 20, respectivamente. Por sua vez, a FRR se provou um parâmetro mais relevante, uma vez que o processo de auto agregação é diretamente impactado pela mudança de polaridade e proporção lipídica, a qual mostrou que o aumento da polaridade em FRR 1 pôde ser bem controlada com o HFR-MD, cuja análise pode ser acoplada com a concentração mássica lipídica, que sendo menor na FRR 10, a menor disponibilidade lipídica impactou negativamente no adequado processo de autoagregação e nas propriedades físico-químicas encontradas. Já para os lipossomas sintetizados na presença de tampão PBS, o efeito se provou contrário, na alta concentração lipídica (FRR 1) e menor quantidade de sais, essa proporção com maior disponibilidade lipídica no meio levou ao desbalanceamento de cargas que resultaram em microagregados e maior polidispersão, pois os sais intensificam as interações hidrofóbicas pela minimização das repulsões entre as cabeças hidrofílicas, podendo levar a agregados maiores (PERLI et al., 2019). Feitas essas conclusões, e visto que a incorporação do lipídio PEGlado não mostrou diferenças físico-químicas e morfológicas perceptíveis, estabeleceu-se a FRR 1, TFR 5 e água pura como fase aquosa para o processamento de lipossomas que vieram a ser utilizados posteriormente na síntese de lipoplexos.

4.3 Síntese de lipoplexos

A partir da padronização dos lipossomas, iniciou-se a investigação de síntese de lipoplexos, a fim de compreender qual seria o efeito da inclusão de material genético nas diferentes condições de escoamento, a qual poderia servir de base para a síntese posterior de LNPs, além de buscar condições ótimas para a produção de nanoestruturas potenciais para aplicações em terapia gênica. Para tal estudo, utilizou-se os lipossomas catiônicos (CL). Os esquemas de síntese e diferenças de *set up* de processo podem ser visualizados na Figura 35.

Figura 35 - Representações esquemáticas das definições de processo para a síntese das diferentes nanoestruturas no dispositivo HFR-MD. Set up de processo para a síntese de (A) lipossomas, (B) lipoplexos e (C) LNPs.



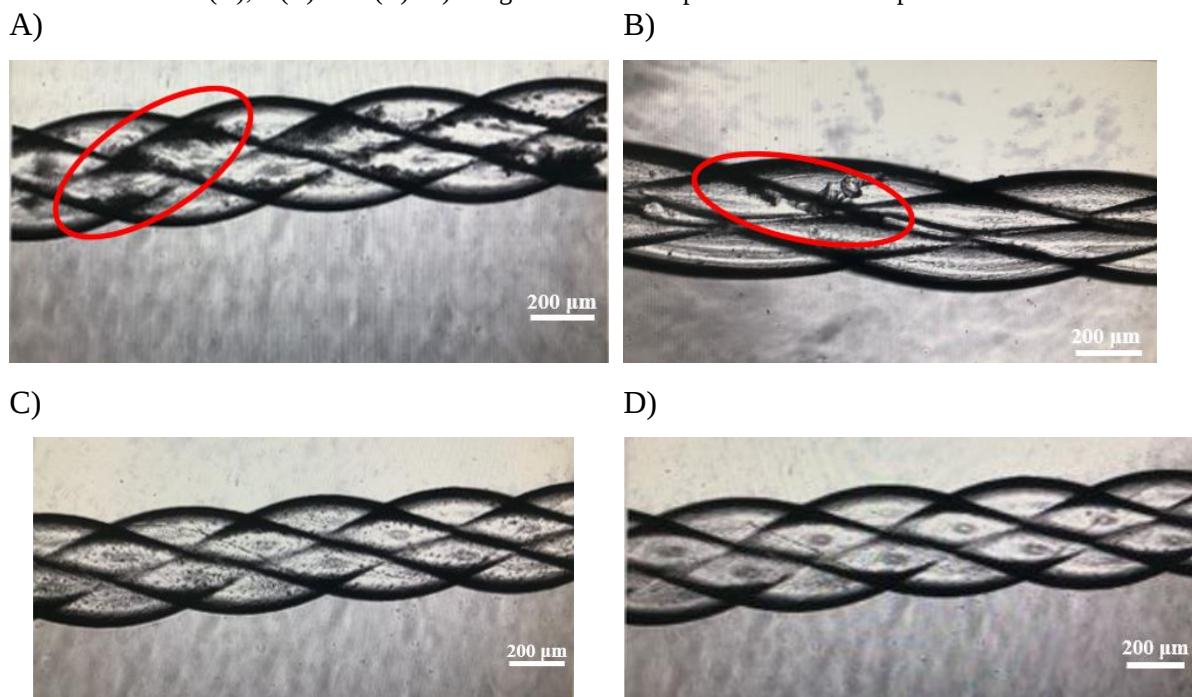
Fonte: Adaptado de Firmino e colaboradores (2021) e Carvalho e colaboradores (2022).

Para a síntese de lipoplexos, optou-se por manter os parâmetros de estudo dos lipossomas (FRR e TFRs) e as análises de fluidodinâmica previamente observadas pelas simulações. Desse modo, seria possível concentrar as análises e observações nos modos de síntese, sem precisar acrescentar diferentes análises devido a mudança de parâmetros como TFR e FRR, o que causaria complexidade nas análises críticas e formulação de hipóteses. Portanto, inicialmente optou-se por usar as mesmas condições investigadas com os lipossomas: TFRs de 0,2, 5 e 20, FRR 1, concentração elevada de 12,5 mM de lipídios na entrada alcoólica central, e nas laterais a fase aquosa contendo o pDNA (Figura 35 (B)) em concentração necessária para se obter um $R_{\pm}$ de 3. Curiosamente, houve precipitação e formação de microagregados na TFR 0,2, como mostrado na Figura 36 (A).

A fim de buscar a minimização do efeito de microagregação ao longo do microcanal, elevou-se a TFR. Assim, quando a TFR foi elevada de 0,2 para 5 mL/min, evidenciou-se que a formação destes precipitados ocorreu em menor proporção (Figura 36 (B)). Já para a TFR 20, inicialmente também houve indícios de possível precipitação, como sugere a Figura 36 (C) em alguns pontos do canal. No entanto, cabe destacar que no caso da TFR 20, a imagem só foi possível de ser obtida logo ao final do processo, pois nesta condição o tempo de processo era muito reduzido (escala de poucos segundos) frente a quantidade de material disponível para síntese, e não havia tempo suficiente para o processamento microfluídico (incluindo o *start* do processo e a coleta da amostra) e obtenção da imagem simultaneamente. Para se ter certeza ou não do ocorrido, posteriormente novos testes em TFR 20 foram realizados, e não se visualizou

a formação de precipitados durante o processo de síntese, permanecendo o canal limpo da mesma forma como mostrado na Figura 36 (D).

Figura 36 – Formação de agregados no canal apontados em vermelho para a síntese de lipoplexos nas TFRs 0,2 (A); 5 (B) e 20 (C). D) Imagem do canal limpo usado como comparativo.



Imagens retiradas em microscópio invertido.

De qualquer maneira, nas condições em que houve precipitação (TFR 0,2 e TFR 5), a produção contínua é inviabilizada, pois os microagregados observados no microcanal podem alterar a condição de regime permanente pelo acúmulo de material no interior do canal. Este fato ocorreu porque muito possivelmente houve um desbalanceamento de cargas implicado pela adição do material genético nas correntes laterais (carga negativa). O fato de não ter havido precipitado na TFR 20 pode estar relacionado com o efeito mais intenso de advecção caótica, como verificado pela simulação e número de Dean, cuja condição ainda em regime laminar (Tabela 23) pode ter sido suficiente para uma complexação eficiente e reproduzível. Isso indica que o processo difusivo para a mistura deva ser lento. Apesar de não ter sido encontrado nenhum trabalho na literatura que tenha investigado o efeito da TFR na síntese de lipoplexos em dispositivos de advecção caótica para confirmar tal hipótese, um estudo realizado para LNPs poderia contribuir para tal análise. Roces e colaboradores (2020) sintetizaram LNPs em dispositivo *herringbone* variando-se a TFR de 5 a 20 mL/min, e de modo geral observaram a diminuição no tamanho das LNPs com o aumento da TFR, bem como viu-se uma produção

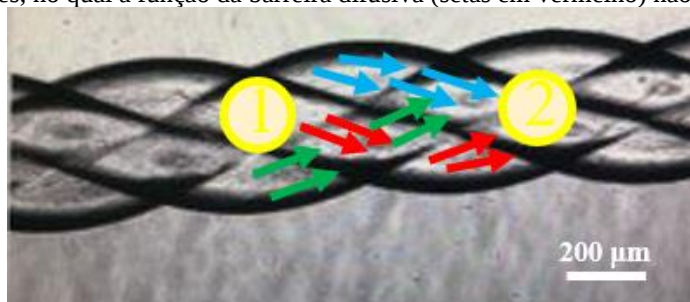
homogênea com baixa polidispersidade. Mesmo que os autores não tenham estudado o efeito da advecção caótica, é de se inferir que houve tal influência nos resultados encontrados.

Para uma complexação adequada de lipossoma/material genético ocorrer, duas etapas são importantes: (i) a fusão da membrana lipídica induzida pelo material genético, devido as interações eletrostáticas (atrações de Coulomb); (ii) colapso cooperativo de DNA induzido por lipossomas. A segunda etapa é considerada evento chave, e leva a aglomerados ligados à estrutura das moléculas de DNA no qual a forma esférica das vesículas ainda pode ser discernida. Uma estrutura em forma de bastão curto é formada na qual o DNA é condensado dentro da bicamada lipídica. Com isso, há um ganho de entropia associando à liberação de contra-íons fortemente ligados do DNA e das bicamadas lipídicas, sendo a principal força motriz da complexação, sendo impactada também pela repulsão entre DNA-DNA.

A mudança de entalpia envolvendo a complexação entre lipossomas e material genético é dita como sendo endotérmica (menos de 1 kcal absorvida por mol de lipídio ou carga de DNA), sendo requerido um certo aumento na entropia para conduzir a formação dos complexos (GASPAR; COELHO; SILVA, 2020; MA et al., 2007). No entanto, mais importante que os efeitos termodinâmicos são os efeitos cinéticos na determinação do tamanho da vesícula formada, causados pelo escoamento e forma de processamento, cujo impacto na conformação estrutural induzido pelos efeitos da mistura orgânica-aquosa é mais relevante (CAPRETTO et al., 2013; KIMURA et al., 2020).

Considerando que mesmo na presença de advecção caótica os efeitos difusivos continuam sendo importantes pela característica de fluxo em regime laminar (FIRMINO et al., 2021), o que impacta no processo de complexação, buscou-se investigar uma alternativa que poderia reduzir e evitar a formação de microagregados no canal. Nesse caso, encontrou-se que a inserção de uma barreira difusiva central poderia influenciar nos efeitos de carga e concentração lipídica, como relatado por Pessoa, Sipoli e De La Torre (2017). Nesse caso, a ideia é que a minimização do contato direto entre as correntes laterais (uma contendo pDNA e outra os lipossomas), simultaneamente com a redução da concentração, levaria a um balanceamento das cargas. No entanto, foi hipotetizado que a geometria dos canais trançados do HFR-MD não permitiria uma barreira difusiva total (quando comparado à geometria retangular), mas sim um efeito parcial, já que em alguns momentos haveria o contato direto entre as correntes laterais, de acordo com a característica do canal, como simulado na Figura 37. Assim, para se ter uma ideia melhor do seu efeito, investigou-se previamente a barreira difusiva por meio da simulação computacional.

Figura 37 - Perfil de escoamento no dispositivo HFR-MD simulando o efeito da inserção da barreira difusiva na mistura. Setas verdes simulam a trajetória de escoamento da corrente lateral orgânica em uma primeira situação sem encontro com a outra corrente lateral aquosa (setas em azul); e uma segunda situação de encontro entre essas correntes, no qual a função da barreira difusiva (setas em vermelho) não se faz efetiva.



4.3.1 Efeito da inserção da barreira difusiva

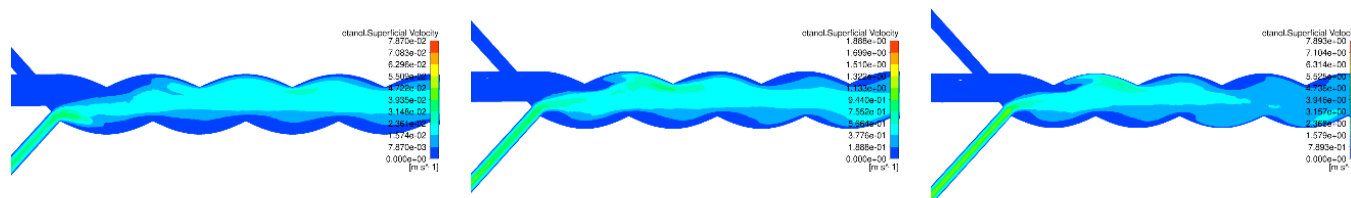
A análise da inserção de uma barreira difusiva já foi previamente analisada pelo nosso grupo de pesquisa, no qual foi observado seu impacto positivo no balanceamento de cargas positivas e negativas e no contato apropriado entre material genético e moléculas lipídicas que evitou a formação de agregados no microcanal (EŞ, 2020), e também no apropriado balanço de cargas e interações eletrostáticas entre quitosana (CHI) e adenosina trifosfato (ATP) na síntese de nanopartículas CHI/ATP (PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017). Porém, em ambos os casos, tal uso da barreira difusiva se deu em dispositivos D-MD, no qual não há alteração da geometria ou mesmo efeitos de advecção caótica. Dessa maneira, com o intuito de se analisar o impacto da barreira difusiva na dinâmica de mistura no dispositivo HFR-MD, e se de fato poderia evitar a formação dos microagregados, simulações foram realizadas nas vazões padrões (TFR 0,2; 5 e 20) e FRR 1. Neste caso, o cálculo da FRR (FRR_B) é diferente da configuração sem barreira difusiva, e pode ser vista pela Equação (8). Para tal, a corrente central passou a ser de água e uma corrente lateral passou a ser etanólica, conforme mostrado na Figura 21 (B). Os resultados de tais simulações são mostrados nas Figura 38 e Figura 39 para a velocidade superficial e fração volumétrica de etanol, respectivamente.

Figura 38 - Perfis de velocidade do etanol com a inserção da barreira difusiva nas TFRs (A) 0,2; (B) 5 e (C) 20 mL/min em FRR_B 1

A) TFR_{0,2}@FRR₁

B) TFR₅@FRR₁

C) TFR₂₀@FRR₁



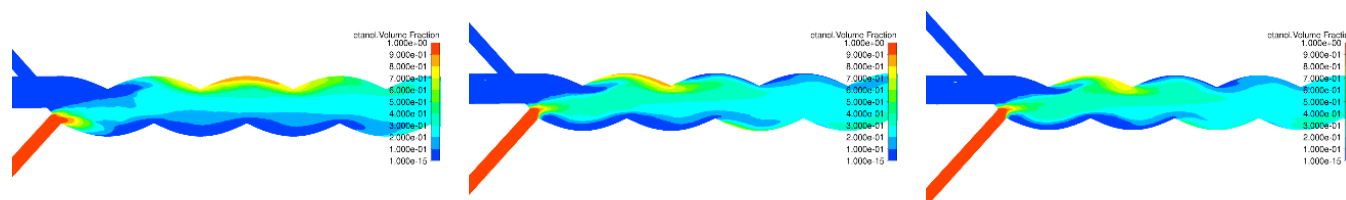
Imagens obtidas no software ANSYS-CFX® 2020.

Figura 39 - Perfis de concentração de etanol com a inserção da barreira difusiva nas TFRs (A) 0,2; (B) 5 e (C) 20 mL/min em FRR_B 1

A) TFR_{0,2}@FRR₁

B) TFR₅@FRR₁

C) TFR₂₀@FRR₁



Imagens obtidas no software ANSYS-CFX® 2020.

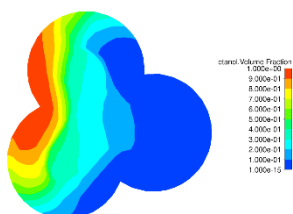
Como é possível observar, a velocidade média de mistura (azul mais escuro) é atingida mais rapidamente nas TFRs mais elevadas, similar ao observado sem a presença da barreira. Quanto aos gradientes de concentração, também se observa pouca diferença entre as TFRs 5 e 20, e maior extensão dos gradientes para a TFR 0,2 ao longo do microcanal.

Para entender como estas diferenças poderiam impactar no perfil de mistura, a fração de etanol ao longo da seção transversal em dois comprimentos de canal, 0,05 e 0,1 cm, foi avaliada, conforme apresentado na Figura 40 (A) e (B), respectivamente. Como esperado, baseado no perfil de advecção caótica, o resultado encontrado para a fração de etanol nas TFRs 5 e 20 é similar e sem notórias diferenças. Quando se analisa a TFR 0,2, o perfil de mistura muda consideravelmente e não apresenta o entrelaçamento das linhas de corrente etanólica como nas TFRs 5 e 20, apresentando perfil difusivo similar ao padrão apresentado (Figura 27). Portanto, encontrou-se condições de mistura similar ao apresentado sem a presença da barreira, onde há indícios de advecção caótica somente para as TFRs 5 e 20.

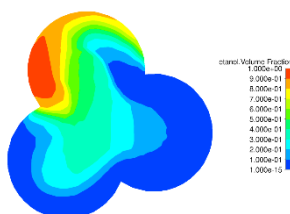
Figura 40 - Perfil de concentração de etanol na presença de barreira difusiva para as diversas TFRs em FRR_{B1}. Imagens de cortes da seção transversal no plano XY (altura x largura) para comprimentos de canal de 0,05 cm (A) e 0,1 cm (B).

A) 0,05 cm

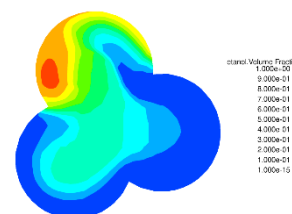
TFR_{0,2}@FRR₁



TFR₅@FRR₁

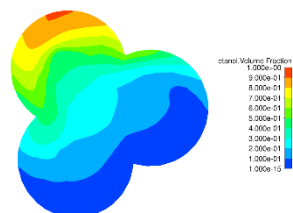


TFR₂₀@FRR₁

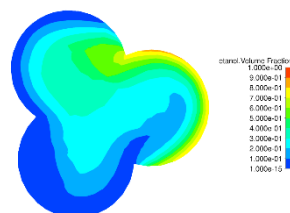


B) 0,1 cm

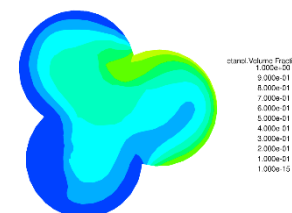
TFR_{0,2}@FRR₁



TFR₅@FRR₁



TFR₂₀@FRR₁



Imagens obtidas no software ANSYS-CFX® 2020.

Outra comparação relevante entre configurações com e sem barreira recaí no gradiente de etanol. Com a inserção da barreira, é possível perceber um maior gradiente de concentração quando comparado com a configuração original do dispositivo, para um mesmo comprimento de canal. Isso era esperado, uma vez que a barreira atua como uma resistência a transferência de massa entre a corrente lateral aquosa e a lateral alcoólica, levando a um maior comprimento (mais tempo) de canal para que haja a mistura entre ambas e atinja a consequente concentração de equilíbrio. Com isso ocorre uma associação eletrostática, conforme descrito anteriormente, mais gradual e dependente da difusão das macromoléculas (EŞ, 2020; PESSOA; SIPOLI; DE LA TORRE, 2017), levando a uma complexação balanceada e uniforme e conforme projetada inicialmente.

De modo a se certificar quantitativamente que a mistura é mais lenta na presença da barreira, comparou-se os índices de mistura em ambas situações, como mostra a Figura 41. Como é possível concluir, de fato a barreira difusiva torna a mistura mais gradual, efeito este pronunciado para a TFR 0,2, onde se tem um escoamento predominantemente difusivo. Esse resultado pode ser comprovado pois também foi necessário maiores comprimentos para a mistura completa (Tabela 16). Uma vez que o perfil de mistura entre TFR 5 e 20 se mostrou similar, o maior comprimento encontrado para a TFR 20 pode estar relacionado com o menor tempo de residência para a mistura. Mesmo que tenha sido visto que os índices de mistura se

iniciam mais elevados para a TFR 20 por conta do maior número de Dean, Peclet e intensidade de advecção caótica, quando se aproxima de 100%, a mistura estende-se mais um pouco até atingir o 100% comparado a TFR 5. Como avaliado por Verma e colaboradores (2008), menores tempos de residência implicam em menores índices de mistura. Além disso, como inferido por Firmino e colaboradores (2021), o efeito difusivo na direção do fluxo cruzado é menor em vazões maiores, o que pode levar a um maior comprimento para mistura completa em situações similares de advecção caótica, como é o caso das TFRs 5 e 20. Quanto aos números de Reynolds, Dean e Peclet, o decaimento na fração de etanol de 50 para 25% na presença da barreira, e consequente alterações na densidade, viscosidade e coeficiente de difusão não impactaram significativamente nos parâmetros adimensionais, sendo próximos dos valores encontrados sem a barreira difusiva.

Como visto, a inserção da barreira difusiva minimiza o contato direto entre as correntes laterais, que na prática são as correntes que contém o pDNA e os lipossomas, prolongando o comprimento necessário para se obter uma mistura completa. Desta forma, formulou-se a hipótese de que a barreira aquosa poderia criar um ambiente mais homogêneo e propiciar o contato gradual entre lipossomas e o pDNA, atuando também com um efeito dilutivo, o que poderia evitar a formação de microagregados, semelhante ao efeito constatado por Pessoa, Sipoli e De La Torre (2017) para quitosana e moléculas de ATP.

Figura 41 - Comparação de índices de mistura com e sem barreira difusiva ao longo do dispositivo HFR-MD para as TFRs analisadas em FRR 1 obtidos pela simulação computacional com o software ANSYS-CFX® 2020

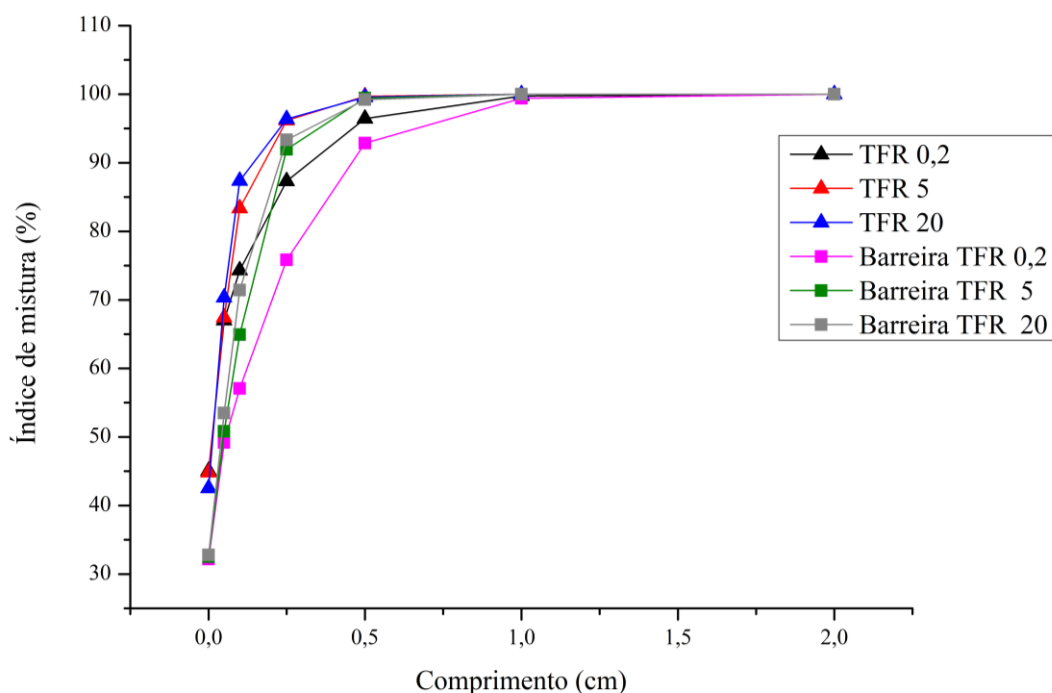


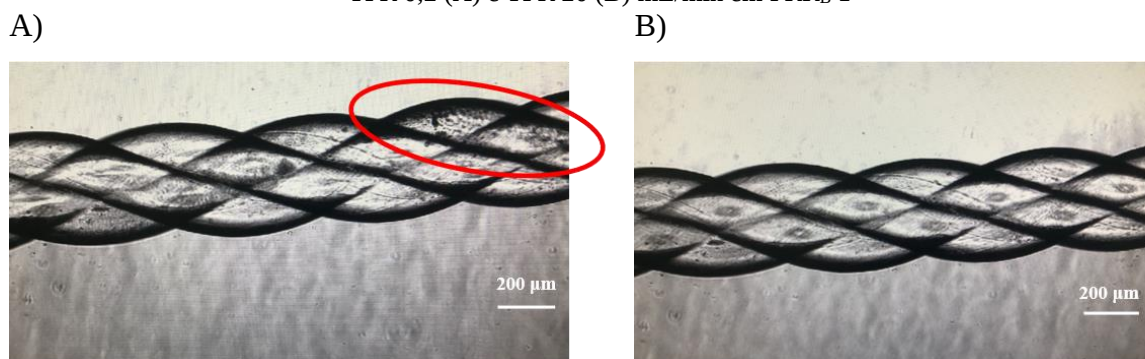
Tabela 16 - Comparativo de comprimento de canal necessário para mistura completa com e sem barreira difusiva para as diversas TFRs em FRR 1

	SEM BARREIRA			COM BARREIRA		
	TFR 0,2	TFR 5	TFR 20	TFR 0,2	TFR 5	TFR 20
Z (cm)	1,66	0,6	0,745	1,85	0,68	0,93

Os valores encontrados são aproximações com base no que se pôde observar pelos gradientes de etanol nas simulações realizadas.

Desse modo, prosseguiu-se com a investigação na síntese dos lipoplexos incluindo a barreira difusiva, mas mantendo a alta concentração de entrada de lipídio (12,5 mM) e material genético igual ao caso sem a barreira. Dessa forma, a análise ficaria restrita ao efeito da barreira difusiva. As imagens dos canais durante o processo de produção podem ser visualizadas na Figura 42, para as TFRs 0,2 (A) e 20 (B).

Figura 42 - Imagens do canal microfluídico com a inserção da barreira difusiva durante síntese de lipoplexos em TFR 0,2 (A) e TFR 20 (B) mL/min em FRR_B 1



Imagens retiradas em microscópio invertido.

Curiosamente, mesmo na presença da barreira ainda se viu a formação lenta e progressiva de precipitados para a TFR 0,2 em alguns pontos do canal. Isso deve-se ao fato de que essa geometria, em alguns momentos, permite o contato direto entre as correntes laterais, devido ao entrelaçamento. Baseado nisto, para esta TFR, mesmo que a corrente central atue como barreira na maior parte do comprimento de mistura, ainda não é o necessário para se evitar a precipitação em alguns pontos localizados. Microagregados também ocorreram para a TFR 5, porém em uma proporção bem reduzida. Já para a TFR 20 não se viu essa formação de agregados, o que nos deu indicativo de que a barreira poderia funcionar experimentalmente quando se trabalha em alta vazão e na presença da advecção caótica, como demonstrado pela simulação, uma vez que o curto tempo de residência somado a presença da barreira e a diminuição do efeito difusivo tornam-se eficazes na manutenção do balanço de cargas. Desse

modo, optou-se por avaliar também o efeito da concentração, tanto com a barreira quanto sem ela, a fim de se obter um panorama geral desses efeitos simultaneamente.

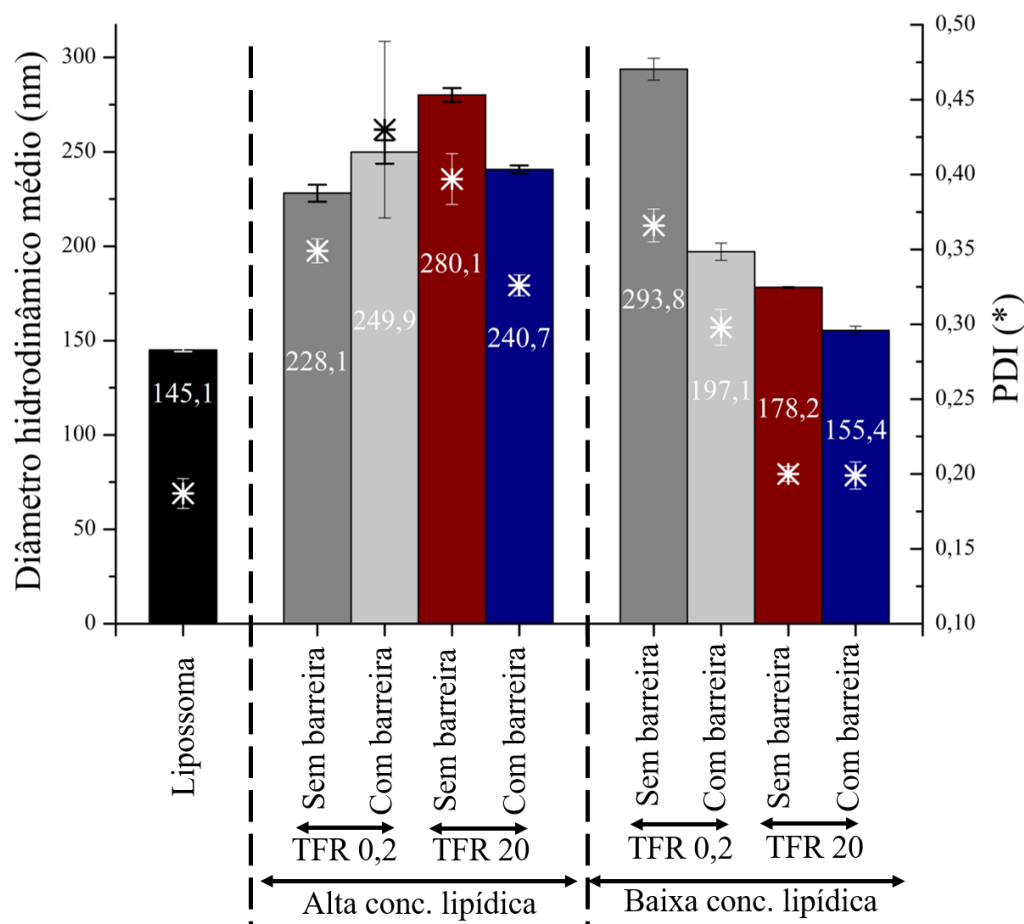
4.3.2 Efeito sinérgico entre concentração lipídica e barreira difusiva nas propriedades dos lipoplexos

Sabe-se que a concentração de material genético e lipídios é parâmetro fundamental na determinação das espessuras das bicamadas e lamelaridade de lipoplexos (EŞ et al., 2018) e nas características das LNPs (QUAGLIARINI et al., 2021). Nesse sentido, a fim de se investigar a influência da concentração, optou-se por explorar concentrações de lipossomas (CLs) e de pDNA mais baixas, com e sem barreira difusiva. A caracterização físico-química das condições analisadas em alta concentração (6,25 mM) e em baixa concentração (2 mM) de lipídios na entrada do microcanal em FRR 1 podem ser visualizadas na Figura 43 (A) e (B), respectivamente. Visualmente, como esperado, houve a formação de microagregados apenas na TFR 0,2. Nesse caso, observou-se duas situações opostas: (i) maior presença de microagregados ocorreu na alta concentração e sem barreira; (ii) menor presença de microagregados ocorreu na menor concentração e na presença da barreira difusiva, porém ainda existente. Ou seja, para a TFR 0,2, a menor concentração e a presença da barreira contribuíram para diminuir a transferência de massa e suavizar as interações DNA/lipossomas, mas esse efeito ainda não foi o suficiente para permitir a produção contínua. Duas causas explicam essas observações: (i) a barreira difusiva, como discutido anteriormente, não atua com 100% de eficiência em todo o comprimento de canal, dada a geometria helicoidal; (ii) possivelmente a concentração baixa de 2 mM ainda não é suficiente para garantir uma mistura adequada de lipídios e material genético. Comparativamente, Balbino e colaboradores (2017) conseguiram sintetizar lipoplexos produzidos em microfluídica em dispositivo HFF utilizando-se de concentrações lipídicas de entrada na mesma faixa deste estudo, entre 1,8 e 2,3 mM advindos dos lipossomas, e praticamente a mesma TFR (TFR 0,15 mL/min). No entanto, além de ser outro dispositivo, causando diferente perfil de mistura, os autores utilizaram outra FRR (FRR 3) e outra proporção lipídio/pDNA, com razão molar de cargas (R_+) 6 na melhor condição encontrada, ou seja, menor proporção de material genético. Isso permite inferir que, por mais que a difusão predomine no HFR-MD na TFR 0,2; os efeitos de geometria e convecção não são completamente desprezíveis, como visto pelo número de Peclet, o qual altera-se com a mudança nas dimensões do dispositivo. Infelizmente os autores não calcularam o número de Peclet para que tal comparação difusão-convecção fosse possível. Além disso, tais diferenças nos

parâmetros de complexação e processamento impactam significativamente na formação dos lipoplexos, o que impossibilita uma comparação confiável entre os trabalhos.

Quando se analisa os efeitos combinados desses resultados (Figura 43), fica nítida a sinergia dos parâmetros barreira difusiva e a concentração. Pode-se observar que as únicas condições experimentais que se aproximam do tamanho e PDI dos lipossomas usados nestas sínteses são na TFR 20 e baixa concentração. Isso foi confirmado também pelo teste de Tukey (Figura 43), em que as únicas condições que geraram equivalência estatística com os lipossomas foram TFR 20 em baixa concentração: com barreira para tamanho, e tanto com ou sem barreira para PDI. Vale destacar também que mesmo na TFR 0,2 em baixa concentração, houve formação mínima e lenta de precipitados no canal, tanto com ou sem a barreira. Já para a TFR 20, não houve a formação concreta de precipitados em nenhuma condição, somente indícios ao final do processo na alta concentração, similar ao visto para a condição anterior. O comparativo das situações que geraram ou não precipitados pode ser visualizado na Tabela 17.

Figura 43 - Diâmetro médio hidrodinâmico (colunas) e PDI (símbolos) dos lipoplexos sintetizados com e sem barreira difusiva nas TFRs 0,2 e 20 mL/min em FRR 1 e dois níveis de concentração lipídica



Imagens elaboradas no software OriginPro® 8.5.

Tabela 17 - Comparativo de situações com e sem geração de precipitados nas TFRs 0,2 e 20 mL/min e concentrações lipídicas altas (6,25 mM) e baixas (2 mM) de entrada, além do uso ou não da barreira difusiva na síntese de lipoplexos

Alta concentração				Baixa concentração			
Sem barreira		Com barreira		Sem barreira		Com barreira	
TFR _{0,2}	TFR ₂₀	TFR _{0,2}	TFR ₂₀	TFR _{0,2}	TFR ₂₀	TFR _{0,2}	TFR ₂₀
FRR _{P1}	FRR _{P1}	FRR _{B1}	FRR _{B1}	FRR _{P1}	FRR _{P1}	FRR _{B1}	FRR _{B1}
Precipitou	Não precipitou	Precipitou	Não precipitou	Precipitou	Não precipitou	Precipitou	Não precipitou

Mesmo que inconclusivo visualmente, percebeu-se que a barreira melhorou as propriedades dos lipoplexos na alta vazão. A leve piora encontrada para a TFR 0,2 em alta concentração pode ser explicada pelo longo comprimento de canal necessário para acontecer a mistura completa (Tabela 16), permitindo a formação de microagregados e partículas maiores.

De maneira geral, foi possível estabelecer a condição de processo experimental que permite a ausência de microagregação de duas maneiras: diminuindo a concentração, por efeito de diluição, ou inserindo a barreira difusiva, impedindo assim o desbalanceamento local de carga, desde que trabalhando ambas com TFR elevada.

Portanto, é notável a importância da advecção caótica na síntese de lipoplexos neste dispositivo, bem como uma mistura mais gradual, que como visto pela simulação, o comprimento de canal para mistura completa aumenta consideravelmente na presença da barreira (Tabela 16). Por fim, buscou-se encontrar a concentração mais alta possível de síntese de lipoplexos sem a formação de microagregados e com boas propriedades, pois baixas concentrações diminuem a produtividade, o que impacta diretamente na quantidade a ser aplicada nos testes *in vitro* ou *in vivo* posteriormente. Além disso, nanoestruturas em torno de 100 nm e até 200 nm se mostram adequadas para aplicações na terapia gênica (GASPAR; COELHO; SILVA, 2020; HARASHIMA et al., 1995; QUAGLIARINI et al., 2021). Nesse sentido, realizou-se testes na TFR 20 em concentrações de 10,5 mM de lipídios na entrada, com e sem barreira, conforme Tabela 18.

Tabela 18 - Propriedades de diâmetro médio, PDI e potencial zeta com seus respectivos desvios padrões (DP) de lipoplexos sintetizados em alta vazão (TFR 20) e alta concentração lipídica (10,5 mM), com e sem a barreira difusiva em FRR 1

Condição Clip = 10,5 mM	^ΔDiâmetro médio (nm ± DP)	PDI ± DP	^Δζ (mV ± DP)
Sem barreira	128,6 ± 2,5	0,23 ± 0,008	50,7 ± 0,3
Com barreira	123,4 ± 1,6	0,24 ± 0,004	61,1 ± 0,8

Clip indica concentração lipídica. Δ valor-p menor que 0,05, indicando diferenças significativas entre as condições.

Pelos resultados encontrados, percebe-se que nessa concentração avaliada (10,5 mM), que é próxima à estudada nas primeiras investigações (12,5 mM), não houve diferença estatística com e sem a barreira difusiva para o PDI das amostras. No entanto, apesar de aparentar resultados próximos para tamanho e potencial zeta, as amostras apresentaram diferenças estatísticas, indicando que a barreira difusiva de fato melhora as propriedades dos lipoplexos. Além disso, observando o canal durante o processamento, não foi encontrado indícios de precipitação em nenhuma das situações. Ou seja, a explicação mais racional para os indícios de precipitação anteriormente vistos para a TFR 20 sem a barreira é de que a imagem captada representou um estado de regime não permanente e de diminuição na taxa de fluxo implicada pelo recém desligamento das bombas-seringas, alterando o perfil de mistura e a complexação na hora da obtenção da imagem. Portanto, neste caso, fica evidenciado que o fenômeno prioritário para uma boa complexação eletrostática é a combinação entre advecção caótica e curto tempo de residência (Tabela 14) que são atingidos na alta vazão de 20 mL/min, pois como visto, o tempo de formação das nanoestruturas reside na faixa de milissegundos (CULLIS; HOPE, 2017; EŞ et al., 2020), o que permite inferir que na TFR 20 não há tempo para a geração de microagregados e partículas com tamanhos maiores, uma vez que o tempo de residência é da mesma ordem de grandeza que a de formação das nanoestruturas, e portanto, rapidamente entram em equilíbrio na mistura completa após serem formadas. Além disso, o uso de altas concentrações não invalidam os lipoplexos sintetizados em alta vazão (TFR 20), com ou sem o uso da barreira, dentro dos limites avaliados neste trabalho. Desta forma, foi possível definir as condições ótimas em TFR 20, e concluí-se que a inserção da barreira difusiva nesse caso é opcional. O diâmetro médio e o PDI encontrados apresentam similaridade com valores reportados na literatura para lipoplexos (BALBINO et al., 2016, 2017).

Na última etapa de síntese deste projeto, decidiu-se por investigar a produção de *lipid nanoparticles* (LNP), ou seja, a produção de complexos lipídicos e pDNA em uma única etapa.

Posteriormente, uma análise de morfologia por cryo-TEM é realizada de modo a investigar lamelaridade e possíveis diferenças de estruturas e tamanho entre lipoplexos e LNPs.

4.4 Síntese de *lipid nanoparticles*

O estudo da síntese de LNPs teve por finalidade avaliar se haveria diferenças no processo de mistura, morfologia das nanoestruturas e eficácia *in vitro* quando comparado aos lipoplexos. Além disso, sabe-se que a síntese em uma única etapa de nanoestruturas lipídicas contendo material genético tem se mostrado nanocarreadores mais potentes para terapia e vacinação gênica, pela teoria da não bicamada, especialmente quando se faz uso de lipídios ionizáveis. Nesse sentido, propôs-se investigar se a síntese em uma única etapa seria viável neste microdispositivo, o que permitiria validá-lo para possíveis investigações futuras com lipídios ionizáveis e na produção de nanopartículas de última geração. Portanto, neste estudo usou-se as mesmas condições de FRR e TFRs às estudadas para os lipoplexos, pois presumiu-se que haveria um comportamento semelhante. A única exceção foi a TFR 5, que pelo fato de sempre ter mostrado condições intermediárias e próximas da TFR 20, foi descartada para o estudo das LNPs.

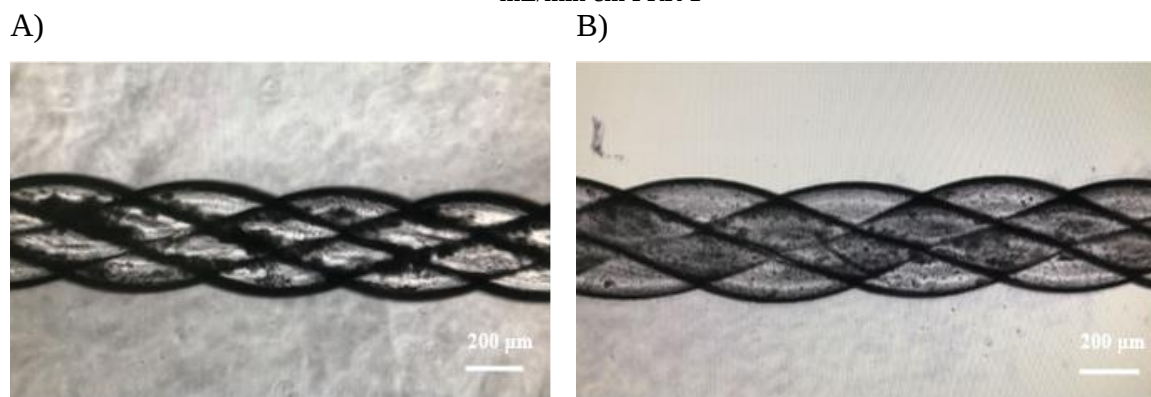
A diferença de processo entre ambas as nanoestruturas (lipoplexos e LNPs) está representada pela Figura 35, onde no caso das LNPs entra-se com os lipídios em etanol ao invés dos lipossomas, na corrente central, sendo que a mesma composição lipídica foi utilizada (EPC/DOTAP/DOPE). Deste modo, iniciou-se a investigação escolhendo concentrações elevadas de 14,4 mM de lipídios na entrada, a fim de se obter concentrações finais de 0,2 mg/mL de pDNA sem barreira, e de 0,1 mg/mL com a barreira difusiva (Tabela 19), o que propiciaria um alto rendimento para posteriores usos em testes biológicos.

Tabela 19 - Resumo das condições operacionais utilizadas na síntese de LNPs em FRR 1 com e sem barreira difusiva

Concentração	TFR _{0,2} @FRR _{P1}	TFR ₂₀ @FRR _{P1}	TFR _{0,2} @FRR _{B1}	TFR ₂₀ @FRR _{B1}
Lipídica inicial (mM)	14,4	14,4	14,4	14,4
Lipídica final (mM)	7,2	7,2	3,6	3,6
pDNA final (mg/mL)	0,2	0,2	0,1	0,1

Primeiramente os testes sem a barreira difusiva foram realizados de maneira a investigar se também haveria precipitação. As imagens dos canais para a TFR 0,2 e TFR 20 durante o processo de síntese podem ser visualizadas pela Figura 44 (A) e (B), respectivamente.

Figura 44 - Canais microfluídicos sem barreira difusiva durante síntese de LNPs em TFRs de 0,2 (A) e 20 (B) mL/min em FRR 1



Imagens retiradas em microscópio invertido.

Similar ao ocorrido para os lipoplexos, houve a formação de agregados no meio do canal para a TFR 0,2, até mais intensamente que no caso dos lipoplexos, muito provavelmente devido às maiores concentrações usadas para as LNPs. Já para a TFR 20 houveram claras precipitações no microcanal, diferente de somente indícios ocasionados para os lipoplexos em um primeiro momento. Nesse caso, as propriedades físico-químicas de diâmetro médio hidrodinâmico, PDI e potencial zeta impossibilitaram a leitura no equipamento pela elevada polidispersidade, com tamanhos e PDIs muito elevados, para ambas as TFRs. Tal diferença para os lipoplexos pode ser assumida como consequência de duas mudanças: maior concentração, que pode promover mais facilmente o desbalanceamento de cargas, sugerindo possível concentração crítica próxima da usada para os lipoplexos (12,5 mM). Porém, infelizmente não foram realizados mais testes com concentrações mais baixas para LNPs para que essa hipótese fosse confirmada. Além disso, sabe-se que o fenômeno de autoagregação é governado pelo aumento de polaridade e consequente diminuição da solubilidade dos lipídios (CHEN et al., 2012; GINDY et al., 2014). Essa variação de solubilidade é maior para as LNPs, pois a fração etanólica varia de 100% (na entrada) até 50% (em condições de elevada mistura no meio), enquanto para os lipoplexos varia de 50% na entrada a 25% na mistura sem barreira, e a mudança de solubilidade pode desencadear a formação de precipitados. Por fim, outro ponto importante a ser discutido é a complexidade estrutural. As LNPs possuem maior complexidade no processo de auto

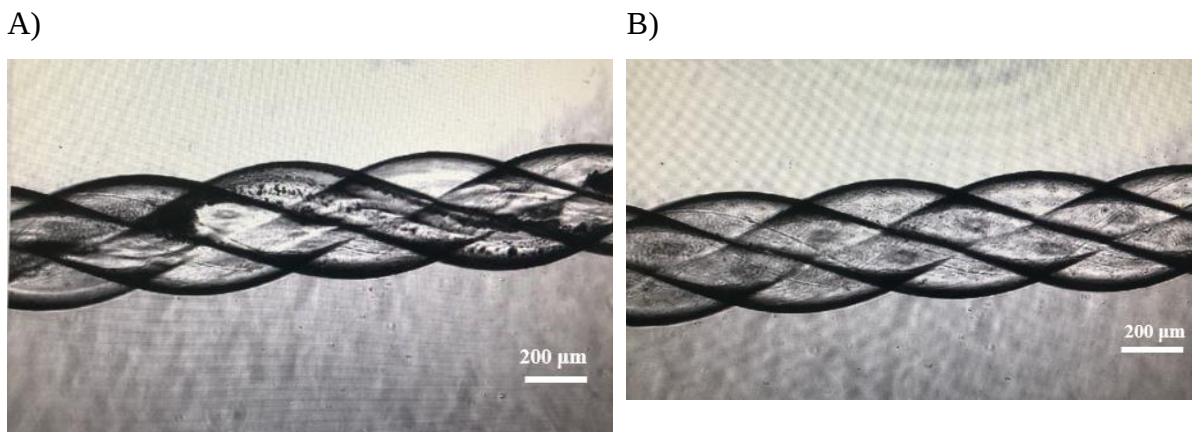
agregação, pois a complexação eletrostática ocorre simultaneamente. Desta forma, essas nanoestruturas são mais sensíveis às condições de mistura, e requerem um controle maior da mistura para não ocorrer formação de agregados e desbalanceamento de cargas com o material genético (SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020; SHEPHERD et al., 2021). A formação das LNPs resulta de um balanço entre cinética e termodinâmica. A mistura rápida (na escala de milissegundos) nos canais microfluídicos permite que as interações eletrostáticas entre material genético e lipídios catiônicos levem à nucleação e crescimento de complexos precursores das LNPs, cuja etapa também ocorre na escala de milissegundos e é dependente da supersaturação do ácido nucleico e lipídios catiônicos em solução. Nessa etapa, essas interações lipídios catiônicos/material genético formam o núcleo da LNP. De maneira geral, a energia livre eletrostática (que é responsável tanto pela atração de Coulomb quanto pela liberação de contraíons) é maximizada se o lipídio catiônico for capaz de condensar totalmente a dupla hélice do ácido nucleico. Após isso, há então o revestimento dessa estrutura por outros lipídios à medida que atingem seus limites de solubilidade no sistema etanol/água (GASPAR; COELHO; SILVA, 2020; GINDY et al., 2014; ZHIGALTSEV et al., 2012). Cabe destacar que a composição lipídica impacta diretamente a estrutura final da LNP, e portanto, diversas estruturas de LNP são possíveis de serem atingidas, a depender da curvatura espontânea dos lipídios gerada pelas diferentes dimensões das caudas hidrofóbicas e a área da cabeça polar (GASPAR; COELHO; SILVA, 2020).

Por fim, estudos sobre o impacto da FRR nas propriedades das LNPs realizados por Rocés e colaboradores (2020) e Maeki e colaboradores (2015) apontaram que a FRR 1 resultou em partículas com tamanhos (MAEKI et al., 2015) e polidispersidades maiores que em FRRs mais elevadas, e que a desestabilização e estabilização das LNPs foram geradas nesta condição (ROCES et al., 2020). Além disso, via de regra, encontra-se na literatura que FRR 1 aumenta a probabilidade de ocorrer fusão de partículas, levando a maiores tamanhos (KIMURA et al., 2020; ROCES et al., 2020). Isso dá suporte ao fato de que na grande maioria dos trabalhos que avaliam a síntese de LNPs não se usa a FRR 1, e sim usualmente a FRR 3, que garante uma proporção lipídica menor, reduzindo a probabilidade de fusões na síntese de LNPs (LOU et al., 2020; PATEL et al., 2019; QUAGLIARINI et al., 2021). Esses fatores podem corroborar para os resultados encontrados nesse trabalho.

Posteriormente então avaliou-se a o efeito da inserção da barreira difusiva, mantendo-se a concentração lipídica de 14,4 mM na entrada e FRR 1 (Tabela 19). Análogo aos lipoplexos, esperava-se que a presença da barreira difusiva poderia impactar positivamente no balanceamento de cargas, bem como levar ao processo adequado de autoagregação lipídica.

Similar ao que foi visto para os lipoplexos, foi verificada a presença de precipitados apenas para TFR 0,2, como mostrado na Figura 45. A partir disso, realizou-se a caracterização de tamanho e PDI das LNPs formadas. O resultado dessa análise está descrito na Tabela 20.

Figura 45 - Canais microfluídicos com barreira difusiva durante síntese de LNPs em TFRs de 0,2 (A) e 20 (B) mL/min em FRR 1



Imagens retiradas em microscópio invertido.

Tabela 20 - Caracterização físico-química das LNPs sintetizadas na presença da barreira difusiva com relação ao diâmetro médio e PDI com seus desvios padrões (DP), para as TFRs 0,2 e 20 mL/min

TFR (Alta concentração com barreira difusiva)	ΔDiâmetro médio (nm $\pm$ DP)	PDI $\pm$ DP
0,2	214,4 $\pm$ 21,5	0,33 $\pm$ 0,06
20	127,6 $\pm$ 3,2	0,27 $\pm$ 0,02

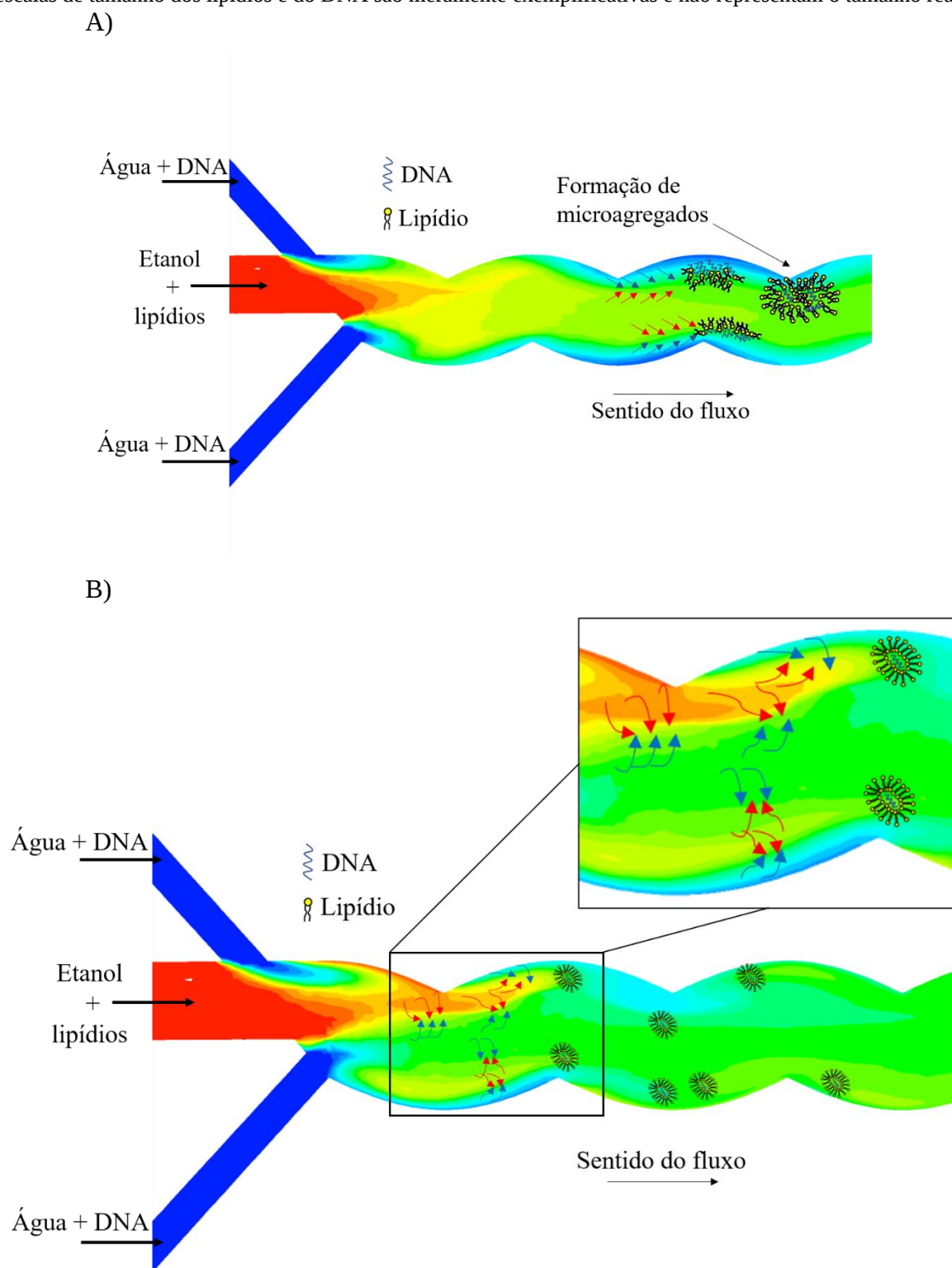
Δ valor-p menor que 0,05, indicando diferenças significativas entre os grupos.

Com os resultados obtidos, percebe-se que a vazão elevada é fator primário para uma adequada síntese de complexos lipídicos/material genético, pelos mesmos motivos previamente discutidos, como é possível observar pelas propriedades apresentadas na Tabela 20, em que a TFR 20 resultou em nanopartículas significativamente menores e menos polidispersas, apresentando tamanho e PDI adequados para aplicações, condizentes com valores encontrados na literatura para LNPs (NOGUEIRA et al., 2020; PATEL et al., 2019). Tal situação é análoga à encontrada para os lipoplexos, com a única diferença que no caso das LNPs a barreira difusiva se mostrou fundamental. Uma ilustração 2D englobando as hipóteses de mistura e a formação dos complexos pDNA/lipídios discutidas até então para o HFR-MD 3D é mostrada na Figura 46, de forma ilustrativa. Na TFR 0,2, processo de mistura governado pela difusão (Figura 46

(A)), locais de contato entre moléculas de etanol e água majoritariamente são criados nas duas fronteiras entre a corrente etanólica central e as correntes laterais aquosas, que seguem a tendência da configuração geométrica do microcanal, semelhante ao proposto por Pessoa, Sipoli e De La Torre (2017) para um dispositivo MHF misturando quitosana e ATP. Nesse caso, a formação de microagregados é favorecida. Nas TFRs elevadas (Figura 46 (B)), melhoramento da mistura é ocasionada e governada pela advecção caótica e fluxo de Dean, onde diversos locais de mistura etanol-água surgem ao longo de toda a área de seção transversal do canal, resultando em melhor distribuição das moléculas no espaço, cujo balanceamento de cargas necessário para uma produção adequada de complexos ácido nucleico/lipídios é atingido. Esse efeito ainda pode ser somado ao menor tempo de residência da TFR 20 (Tabela 14), cujo tempo na mesma escala da formação dos complexos material genético/lipídios, que levam em conta os processos de autoagregação lipídica e interações eletrostáticas, propicia a geração de nanoestruturas de tamanhos adequados e sem microagregados.

Assim como em alguns trabalhos encontrados na literatura (LEUNG et al., 2012; LOU et al., 2020; ROCES et al., 2020), sínteses adequadas de LNPs foram atingidas utilizando-se altas vazões em dispositivos geradores de advecção caótica, como as experimentadas neste trabalho, uma vez que baixas vazões implicam em menor intensidade de advecção caótica e mais lenta diluição do solvente orgânico, promovendo a formação de partículas maiores, onde a predominância da convecção sobre a difusão é reduzida (ROCES et al., 2020). No entanto, para lipoplexos não foi encontrado trabalhos que exploraram sua síntese em dispositivos de advecção caótica, e tal comparação de taxa de fluxo e característica de mistura não pôde ser realizada.

Figura 46 – Esquema ilustrando a mistura e as interações DNA/lipídio dentro do microcanal. Perfil de escoamento e formação de complexos DNA/lipídios no HFR-MD para mistura baseada em (A) difusão e (B) advecção caótica. Setas vermelhas e azuis indicam as linhas de corrente de etanol e água, respectivamente. As escalas de tamanho dos lipídios e do DNA são meramente exemplificativas e não representam o tamanho real.



Imagens obtidas a partir do software ANSYS-CFX® 2020 e adaptadas em PowerPoint.

Portanto, a advecção caótica somada à uma mistura gradual são fatores primordiais para uma síntese de LNPs com propriedades que permitam suas aplicações na área médica e em estudos de transfecção, e que ainda podem ser melhoradas com ajustes de concentração. Em termos de produtividade, alcançou-se uma produção mássica lipídica de 3,2 g/h, apresentando produtividade superior aos trabalhos encontrados na literatura, e similar aos dispositivos SHM para produção de LNPs (Tabela 21), validando o HFR-MD como um dispositivo de alta produtividade.

Tabela 21 - Comparação de produtividade lipídica do HFR-MD na síntese de LNPs com diversas tecnologias microfluídicas e nanoestruturas. A produtividade calculada levou em conta as condições otimizadas para as LNPs, presença da barreira difusiva, concentração final lipídica de 3,6 mM e massa molar média lipídica aproximada de 740,5 g/mol.

Microdispositivo	Nanoestrutura	FRR	TFR (mL/min)	Produtividade mássica lipídica (g/h)	Fonte
HFR-MD	LNPs	1	20	3,20	Este trabalho
HFR-MD	Lipossomas	1	10	2,27	(FIRMINO et al., 2021)
MHF ⁱ	Lipossomas	100	18	0,218	(CARUGO et al., 2016)
Dispositivo de barreira ⁱⁱ	Lipossomas	3	0,1	0,076	(KIMURA et al., 2020)
SHM ⁱⁱⁱ	LNPs	1 a 5	20	2,40	(ROCES et al., 2020)
SHM ^{iv}	Lipossomas	1	1,5	0,87	(EŞ et al., 2020)
SHM ^v	LNPs	3	8	0,24	(QUAGLIARINI et al., 2021)

(i) Cálculo realizado por Firmino e colaboradores (2021); (ii) Calculado com base na concentração lipídica de entrada de 67 mM fornecida; (iii) Calculado com base na concentração final lipídica de 2 mg/mL fornecida; (iv) Cálculo realizado por Firmino e colaboradores (2021); (v) Calculado com base na concentração final lipídica de 0,5 mg/mL fornecida.

Por fim, foram realizados ensaios de cryo-TEM e estudo de transfecção com lipoplexos e LNPs sintetizados na alta vazão.

4.5 Análises de morfologia e ensaios de transfecção para lipoplexos e LNPs

Considerando que a problemática deste trabalho envolve a validação do dispositivo HFR-MD na síntese de lipossomas, lipoplexos e LNPs e o intuito de se obter informações contundentes que permitiriam elucidar que a obtenção dessas nanoestruturas carreando material genético foi atingida com sucesso, investigou-se a análise da morfologia e eficácia de transfecção *in vitro* dos lipoplexos e LNPs. Como visto pelos processos de síntese e caracterizações realizadas, as condições otimizadas foram FRR 1 e TFR 20, com ou sem barreira para lipoplexos, e obrigatoriamente com o uso de barreira difusiva para as LNPs, como é indicado pela Tabela 22. Essas condições ótimas foram utilizadas para a síntese e análise de morfologia.

Tabela 22 - Condições requeridas para a produção contínua no HFR-MD em FRR 1 das nanoestruturas analisadas e com boas propriedades físico-químicas

Tipo de nanoestrutura	Lipossomas	Lipoplexos	LNPs
Condição necessária	Sem restrição de TFR	TFR 20 com ou sem barreira difusiva	TFR 20 com barreira difusiva

Quanto a concentração lipídica, usou-se as mais altas encontradas, pois concentrações maiores permitiram se obter melhor visualização da amostra e obtenção de imagens por cryo-TEM, que foram: concentração de 12,5 mM para lipoplexos e 14,4 mM para LNPs na entrada. Para os lipoplexos, as amostras foram geradas sem barreira difusiva, cuja concentração de saída e análise por cryo-TEM foi de 6,25 mM. Já para as LNPs, como precisou-se da barreira difusiva, a concentração final atingida foi menor, sendo de 3,6 mM, sendo que optou-se por não utilizar o lipídio PEGludo nessa análise. As nanoestruturas formadas foram caracterizadas com as seguintes propriedades: (i) diâmetro hidrodinâmico médio de $181,2 \pm 2,117$; $161 \pm 2,488$ e $104,1 \pm 1,818$ nm para lipoplexos, lipoplexos *stealth* e LNPs, respectivamente; (ii) PDI de $0,326 \pm 0,016$; $0,165 \pm 0,010$ e $0,251 \pm 0,034$ para lipoplexos, lipoplexos *stealth* e LNPs, respectivamente.

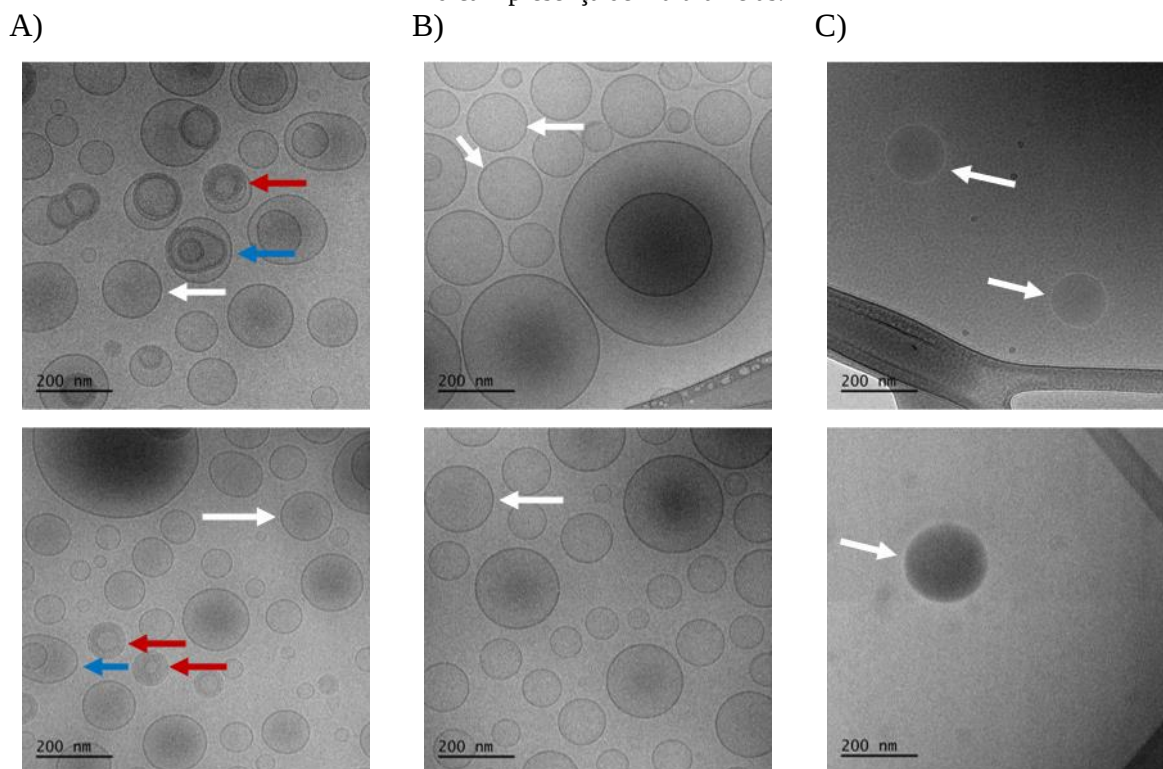
Com base em trabalhos encontrados na literatura, é esperado que lipoplexos sejam uni (SHOKRI; TAVALLAIE; HOSSEINI, 2016; VHORA et al., 2018) ou multilamelares (EŞ et al., 2018; SHOKRI; TAVALLAIE; HOSSEINI, 2016), ou dupla bicamada (BALBINO et al., 2017), em que o material genético se encontra “ensanduichado” entre elas. Além dessas, outras

estruturas como polimórfica (BALBINO et al., 2012) e hexagonal invertida (MA et al., 2007) são possíveis. A estrutura resultante depende de diversos fatores, dentre os quais cabe destacar a concentração e composição lipídica, influência do lipídio *helper* (E. MCNEIL et al., 2010; MA et al., 2007), quantidade de íons presente no meio, proporção molar de cargas ($R_{\pm}$) e característica de mistura (BALBINO et al., 2016, 2017).

Para as LNPs, diferentes tipos de estruturas também podem ser formadas, a depender dos parâmetros discutidos para os lipoplexos, onde os principais são composição e característica de mistura (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; CULLIS; HOPE, 2017; EVERS et al., 2018). No entanto, a estrutura mais aceita é de um núcleo denso de elétrons, tipicamente apresentando micelas invertidas, como pode ser visto em diversos trabalhos na literatura (LEUNG et al., 2012; PATEL et al., 2019; ROCES et al., 2020). Apesar disso, há também alguns trabalhos reportando a presença de lamelas e bicamada em LNPs (KULKARNI et al., 2018; LOU et al., 2020; QUAGLIARINI et al., 2021).

As imagens de cryo-TEM obtidas são mostradas na Figura 47.

Figura 47 - Imagens de cryo-TEM de lipoplexos e LNPs. (A) lipoplexos, (B) lipoplexos *stealth* e (C) LNPs sem lipídio PEGlados sintetizados na TFR 20 mL/min e FRR 1. Setas brancas indicam nanoestruturas adequadas e de acordo com as análises físico-químicas. Setas azuis indicam possível fusão de partículas. Setas vermelhas indicam presença de multilamelas.



Fonte: Imagens elaboradas com o apoio do CNPEM (2021). Os lados mais escuros das imagens representam a camada de carbono das grades.

Como é possível perceber pela Figura 47 (A), os lipoplexos apresentaram partículas uni e multilamelares, além da ocorrência de possíveis fusões entre partículas, similar a dupla bicamada, condizente com estruturas encontradas na literatura (BALBINO et al., 2017; EŞ et al., 2018; VHORA et al., 2018). Sabe-se que o EPC favorece a formação da bicamada e o DOPE pode aumentar o parâmetro de empacotamento médio e levar a coexistência de fases lamelar e hexagonal inversa (BALBINO et al., 2017; MA et al., 2007). Além disso, a quantidade de DNA que interage com o lipossoma e o lipídio catiônico pode causar a formação de diferentes estruturas (BALBINO et al., 2016, 2017; HUEBNER et al., 1999). Já os lipoplexos compostos por lipídio PEGlado apresentaram majoritariamente unilamelas (Figura 47 (B)). Condizente com o encontrado por Vhora e colaboradores (2018), estruturas unilamelares dos lipossomas com lipídio PEGlado podem ser mantidas inalteradas sob certas condições de processo na formação dos lipoplexos. Um dos motivos pode estar relacionado ao aumento de estabilidade das partículas causadas pela inserção do PEG (EŞ et al., 2020). Além disso, as reduções de potencial zeta observadas comparado aos lipossomas, porém ainda mantendo a carga positiva, reforçam que o complexo CL/pDNA ou S-CL/pDNA foi formado apropriadamente (EŞ et al., 2018; SHOKRI; TAVALLAIE; HOSSEINI, 2016).

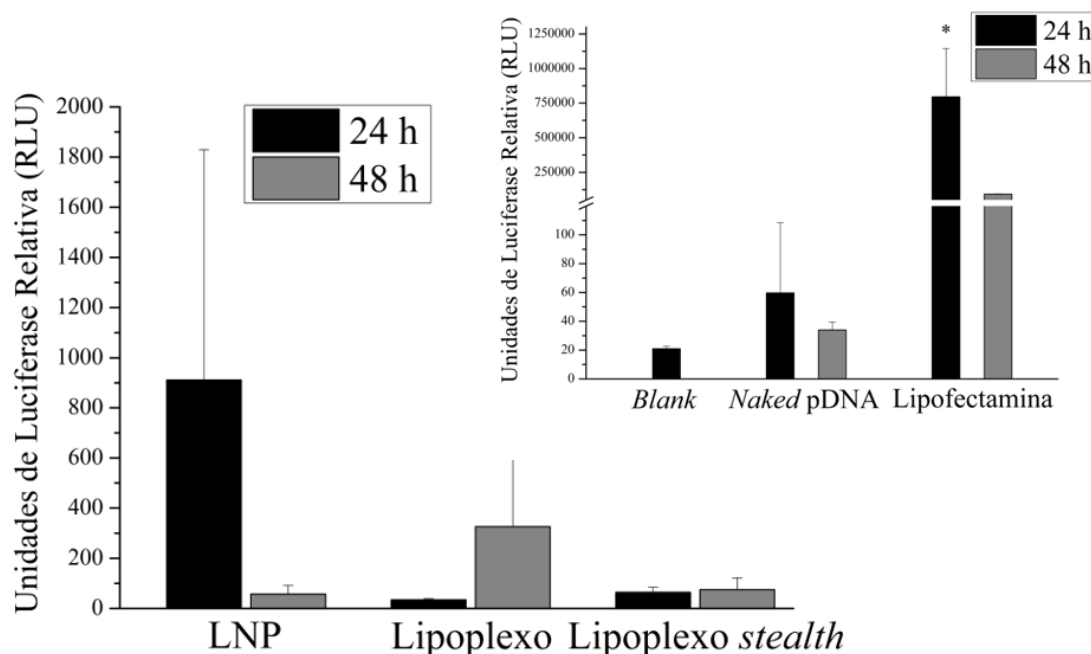
Com relação às LNPs formadas Figura 47 (C), apesar da menor concentração lipídica impactar no número de estruturas possíveis de serem visualizadas, percebe-se uma diferença para com os lipoplexos *stealth*, no qual o núcleo apresenta um aspecto mais denso, indicando que parte dos lipídios podem ter ocupado o núcleo juntamente com o pDNA neste processo em uma etapa, em uma estrutura que não é típica de lipossomas. Particularmente, as estruturas observadas se assemelham com as LNPs encontradas por Kulkarni e colaboradores (2017), produzidas em dispositivo de junção em T, usando-se também pDNA como material genético, sendo que os autores usaram lipídio ionizável (50%), colesterol (39%), lipídio PEGlado (PEG-DMG - 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxi poli (etilenoglicol)-2000) (1%) e as nanopartículas mais parecidas foram com o uso de DSPC e SOPC (1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) como lipídio *helper* (10%), cuja estruturas os autores definiram como um núcleo denso de elétrons. Semelhanças também foram encontradas com as nanoestruturas de Lou e colaboradores (2020), cujas LNPs também foram sintetizadas com DOTAP, porém usando-se *self-amplifying* RNA (SAM) como ácido nucleico, e apresentaram uma bicamada bem compactada, produzidas em um dispositivo *herringbone* da Precision NanoSystems® (NanoAssemblr Platform). A abordagem de núcleo denso de elétrons é reforçada pela estrutura similar apresentada por Cullis e Hope (2017) para LNPs, apesar da composição diferente que utilizou-se neste trabalho.

Além de avaliar as propriedades físico-químicas e estruturais dos nano agregados lipídicos contendo material genético, uma das primeiras análises ocorre de forma *in vitro* para avaliar a eficiência de transfecção. A transfecção ocorre quando as nanopartículas lipídicas são incorporadas nas células e o material genético codificado é expresso. Assim, a avaliação da transfecção *in vitro* caracteriza-se pelo cultivo de células e incubação com o sistema nanocarreador e quantificação da proteína produzida a partir do material genético. Se o sistema lipídico é eficiente em entregar o material genético no interior das células, estas poderão produzir a proteína codificante. Esta quantificação permite avaliar a resposta do processo de entrega. O estudo de transfecção ocorre previamente aos testes *in vivo*, para que se tenha uma análise preliminar sobre diversos fatores, como a eficiência de transfecção e toxicidade (TORCHILIN et al., 2003; VON GROLL, 2003).

Ensaio de transfecção só puderam ser realizados com o apoio do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP). Neste caso, três formulações foram testadas: lipoplexo e lipoplexo *stealth*, ambos sintetizados em *bulk* com lipossomas advindos da condição padronizada em microfluídica, e LNP sem lipídio PEGlado sintetizado com microfluídica em TFR 20, FRR 1 e com barreira difusiva. Os resultados da transfecção podem ser vistos na Figura 48.

Como é possível observar, nenhuma formulação atingiu expressão de luciferase próxima à da lipofectamina, expresso também pelo teste de Tukey, que revelou diferenças estatísticas. No entanto, isso era de se esperar, pois a lipofectamina é o reagente de transfecção controle e considerado o padrão ouro de eficiência de entrega (CARDARELLI et al., 2016; EŞ et al., 2018). Porém, comparativamente ao pDNA *naked*, percebe-se uma melhora significativa das LNPs nas primeiras 24 horas e do lipoplexo em 48 horas, o que nos forneceu um indicativo de que boa parte das nanoestruturas induziram a transfecção. Resultados similares foram obtidos por Balbino e colaboradores (2012), os quais sintetizaram lipoplexos multilamelares e polimórficos em *bulk* com pDNA e mesma composição lipídica, e obtiveram eficácia *in vitro* em células de carcinoma epitelial humano (HeLa) significativamente maior que *naked* pDNA e consideravelmente menor que lipofectamina.

Figura 48 - Eficiências de transfecção em células VERO de lipoplexos e LNPs. LNPs foram sintetizadas em TFR 20 mL/min, FRR 1, com uso de barreira difusiva e com concentração lipídica final de 3,6 mM. Lipoplexos foram sintetizados via método convencional *bulk* a partir de lipossomas em 12,5 mM obtidos por microfluídica. * Indica diferença estatística significativa quando comparado com os demais grupos de controle.



Fonte: Elaboração da imagem de autoria própria com os dados do ensaio realizado pelo ICB-USP (2022).

A baixa resposta fornecida pelos lipoplexos *stealth* em *bulk*, comparável ao encontrado para o pDNA *naked*, provavelmente está relacionado com a baixa eficiência de mistura e a presença do lipídio PEG. Apesar das vantagens de se utilizar o lipídio PEG, como já discutido na seção 2.2, o impedimento estérico causado pelo seu uso pode prejudicar a conformação do lipoplexo em uma estrutura adequada, podendo levar a fases lamelares induzido pelo DSPE-PEG 2000 que dificulta o posterior escape endosomal do material genético, conhecido como PEG *dilemma* (HATAKEYAMA; AKITA; HARASHIMA, 2013; HATTORI et al., 2020; LECHANTEUR et al., 2016). Além disso, sabe-se que a formação do lipoplexo é causada pela interação entre as cargas positivas dos lipídios catiônicos e as cargas negativas do ácido nucleico. Em um processo com baixa qualidade de mistura, como os métodos convencionais, associado com a diminuição da carga positiva do lipossoma causada pela adição do lipídio PEGludo, pode ter levado a uma complexação eletrostática perturbada e ineficiente, acarretando mudança da nanoestrutura, como visto por Eş e colaboradores (2018), cujos lipossomas unilamelares resultaram em lipoplexos multilamelares após a complexação em *bulk* com siRNA, e isso explica a transfecção mais lenta e o aumento após 48 horas encontrado para os lipoplexos, pois estruturas multilamelares dificultam e retardam a liberação do material

genético. Lechanteur e colaboradores (2016) mostram o impacto da carga de superfície de lipoplexos para uma entrega mais eficiente de siRNA. Uma solução para melhorar a transfecção dos lipoplexos seria prover uma mistura mais eficiente, como pelo uso de microfluídica e advecção caótica, para promover uma complexação eletrostática mais eficiente, ou mesmo avaliar a inserção de outra variação de PEG, no caso dos lipoplexos *stealth*, que promova uma estrutura que facilite a liberação do material genético, como analisado também por Lechanteur e colaboradores (2016). Quando comparamos as amostras, percebe-se que as LNPs forneceram uma expressão de luciferase maior que os lipoplexos nas primeiras 24 horas, no entanto testes de Tukey e de t não revelaram diferenças significativas entre as amostras. Apesar disso, o comportamento superior pode inferir que esteja relacionado com a diferente estrutura formada. Como discutido anteriormente, as LNPs usualmente não se caracterizam por apresentar lamelas, o que facilita a liberação do material genético (CULLIS; HOPE, 2017). Além disso, lipoplexos são conhecidos por sofrerem com baixa potência e tolerabilidade devido a carga permanentemente positiva, tendência a agregação e internalização incompleta do ácido nucleico (ALDOSARI; ALFAGIH; ALMURSHEDI, 2021; SAMARIDOU; HEYES; LUTWYCHE, 2020). Via de regra, a síntese em *bulk* de lipoplexos resultam majoritariamente em estruturas multilamelares, como mostrado por Eş e colaboradores (2018) na síntese de lipoplexos de mesma composição lipídica. Isso acontece devido ao contato intenso e rápido entre cargas positivas e negativas em processos *bulk*, que podem levar a agregados maiores e com maior polidispersidade quando comparado à microfluídica, sendo que estruturas maiores com maior número de bicamadas costumam prejudicar a internalização e o processamento do pDNA pelas células (BALBINO et al., 2016). Isso pode ser corroborado pela caracterização físico-química das LNPs que foi realizada previamente ao ensaio *in vitro*, cujo diâmetro hidrodinâmico médio foi de $104,1 \pm 1,818$ nm, PDI de $0,251 \pm 0,034$ e potencial zeta de $37,1 \pm 0,721$ mV, obtendo-se portanto, tamanho e PDI adequado para aplicação, e que a carga positiva foi mantida e abaixo do que se encontra para lipossomas, indicando que houve a internalização do pDNA na nanoestrutura. No entanto, como visto por Shokri, Tavallaie e Hosseini (2016), o tamanho do lipoplexo é mais relevante do que propriamente a estrutura uni ou multilamelar na eficiência de transfecção. De qualquer maneira, como os lipoplexos em *bulk* foram sintetizados pelo ICB-USP logo antes da aplicação *in vitro*, não foi possível realizar caracterizações de tamanho, PDI e morfologia para se comprovar a teoria imposta.

De acordo com os resultados obtidos para as LNPs, relevante comparação pode ser feita com o trabalho de Eş (2020), que sintetizou LNPs de siRNA de mesma composição lipídica em dispositivo D-MD, e comparativamente obteve-se nanopartículas com tamanhos

consideravelmente maiores, entre 263 e 312 nm. Já para PDI, valores baixos entre 0,15 e 0,17 foram encontrados, porém, tal resultado só pôde ser obtido com o uso de barreira difusiva, no qual seu uso foi fundamental para evitar a formação de microagregados, bem como concentração lipídica final em torno de 1 mM, consideravelmente menor do que a utilizada neste trabalho. Tal fato colabora para a hipótese de que dispositivos baseados em advecção caótica permitem a síntese adequada de LNPs com maior produtividade. Por fim, os resultados de transfecção induzem que as LNPs de fato são mais eficientes na entrega de material genético que lipoplexos em *bulk*, expresso pelos maiores níveis de luciferase, apesar de não mostrar diferenças estatísticas significativas.

A queda encontrada para as LNPs após 48 horas parece estar relacionada com a característica estrutural, pois o mesmo perfil foi encontrado por Patel e colaboradores (2019) para a maioria dos lipídios ionizáveis e catiônicos testados na transfecção *in vivo* na retina de camundongos. No entanto, comparações *in vitro* deveriam ser realizadas para confirmar tal hipótese, pois sabe-se que a correlação *in vitro/in vivo* pode ser baixa ou bem diversa (E. MCNEIL et al., 2010). Além disso, para que de fato pudéssemos concluir sua maior eficácia, testes de toxicidade deveriam ser realizados, bem como a repetição em triplicata independente, para garantir a reprodutibilidade dos ensaios. De maneira geral, estes resultados preliminares implicam que de fato o uso de lipídios ionizáveis e uma consequente nanoestrutura típica de LNPs podem levar a eficiências maiores e partículas mais adequadas para vacinação e terapia gênica, como é mostrado por Patel e colaboradores (2019).

5 CONCLUSÕES

A investigação prévia da fluidodinâmica e mistura entre água e etanol dentro do microcanal a partir das simulações computacionais foram fundamentais para prever o comportamento e a característica do fluxo no microcanal, e serviu de base para prever condições ótimas de trabalho na síntese de nanoestruturas posteriormente, além disso, contribuindo positivamente para a assertividade do processo de síntese e redução de gastos com materiais experimentais.

O estudo das propriedades físico-químicas e a morfologia resultante das nanoestruturas sintetizadas revelou que o dispositivo HFR-MD é adequado para a síntese de alta produtividade de lipossomas, lipoplexos e LNPs. Dados obtidos pela simulação e por fluorescência experimental revelaram que a mistura completa é atingida dentro do microcanal, para qualquer vazão testada neste trabalho. Informações da geometria e do fluxo de Dean revelaram que o microcanal torcido cumpre a função de gerar fluxos secundários de Dean e advecção caótica, responsáveis pela melhora da mistura mesmo em condições de regime laminar. Mesmo em vazões baixas onde viu-se a predominância do fenômeno difusivo, similar as características de fluxo de dispositivos baseado em difusão, o comprimento do microcanal foi o suficiente para que lipossomas pudessem ser sintetizados adequadamente. No entanto, o fenômeno da advecção caótica se mostrou fundamental na síntese de lipoplexos e LNPs. Complexos lipídicos/material genético só puderam ser sintetizados na mais alta vazão analisada, a TFR de 20 mL/min. Com isso altas produtividades lipídicas puderam ser atingidas (3,2 g/h), validando o dispositivo como plataforma microfluídica de alta produtividade. Diferente dos lipoplexos onde dispositivos de focalização hidrodinâmica se provam suficientes, para LNPs majoritariamente são utilizados dispositivos com geometrias diferenciadas e taxas de fluxos elevadas, nos quais a complexidade estrutural exige qualidade e controle de mistura elevada.

Com relação a demais parâmetros investigados, a condição de maior proporção lipídica se mostrou adequada (FRR 1) para todas as nanoestruturas, e a presença da barreira difusiva impactou positivamente na suavização do contato entre pDNA e lipídios, contribuindo para evitar a formação de microagregados. A validação do dispositivo para a síntese de lipoplexos e LNPs em elevadas concentrações e produtividade elucida seu potencial uso para aplicações em terapia gênica e vacinação, pois como visto pelo ensaio biológico, LNPs sintetizadas via microfluídica apresentaram um desempenho melhor de transfecção que lipoplexos sintetizados via método convencional, e elucidam sua potencialidade para aplicações em terapia gênica. Por

fim, o uso do HFR-MD na síntese adequada de nanoestruturas infere sua potencial aplicação para escalonamento e paralelização do sistema microfluídico.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este trabalho pode servir de base para análises futuras das seguintes problemáticas:

- Simular a análise de dinâmica molecular dos lipídios e acoplá-la a simulação da fluidodinâmica computacional, para aumentar o grau de precisão na análise do processo microfluídico;
- Investigar o efeito da inclusão de lipídios durante testes de fluorescência, para aproximar mais a análise da mistura real;
- Maior investigação da influência de parâmetros como FRR, TFR e concentração para a síntese de LNPs;
- Confirmar o ensaio de transfecção realizado;
- Sintetizar LNPs com lipídio ionizável de última geração e RNA, e aplicá-las em testes *in vitro* e *in vivo* para estudos de transfecção e toxicidade;
- Propor um sistema escalonável do aparato microfluídico para alcançar demandas industriais, como paralelização.

ANEXO I – Metodologia e cálculo do número de Dean

Para o cálculo do De, conforme Equação (3) deste trabalho, os seguintes dados foram extraídos, seguindo a metodologia explicada a seguir:

- $D_{eq} = 303,81 \mu\text{m}$;

- Re = Número de Reynolds encontrado para cada vazão e condição estudada (Tabela 23), nesse caso em FRR 1.

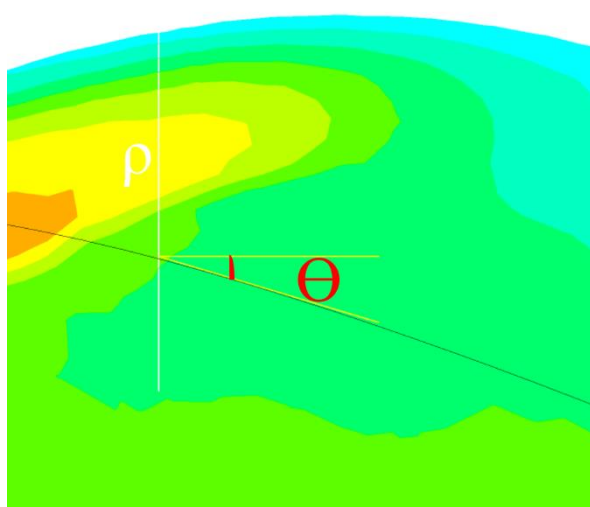
Tabela 23 - Números de Reynolds calculados

TFR 0,2	TFR 5	TFR 20	TFR 0,2 com barreira	TFR 5 com barreira	TFR 20 com barreira
6,91	172,74	690,97	8,05	201,13	804,52

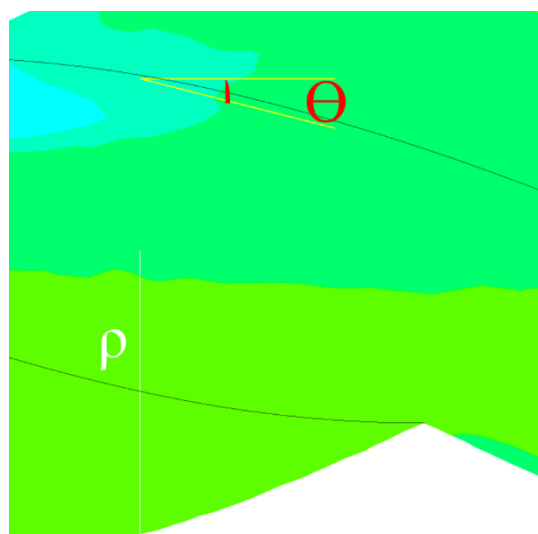
Para a determinação do raio da seção transversal (ρ) e ângulo de curvatura (θ) do microcanal em ambos os comprimentos de canal analisados (0,05 e 0,1 cm), fez-se uma aproximação com base na trajetória da corrente central do canal microfluídico, explicitado pelos contornos em preto, traçando-se retas aproximando a curvatura da trajetória para se obter o raio e a angulação, como demonstrado na Figura 49. Esse método de obtenção é baseado em Verma e colaboradores (2008).

Figura 49 - Determinação do raio e ângulo de curvatura do canal

A)



B)



Imagens do canal simulado em CFX para (A) $Z = 0,05 \text{ cm}$ e (B) $Z = 0,1 \text{ cm}$.

Os valores encontrados para ρ e θ em ambos os comprimentos de canal estão dispostos na Tabela 24.

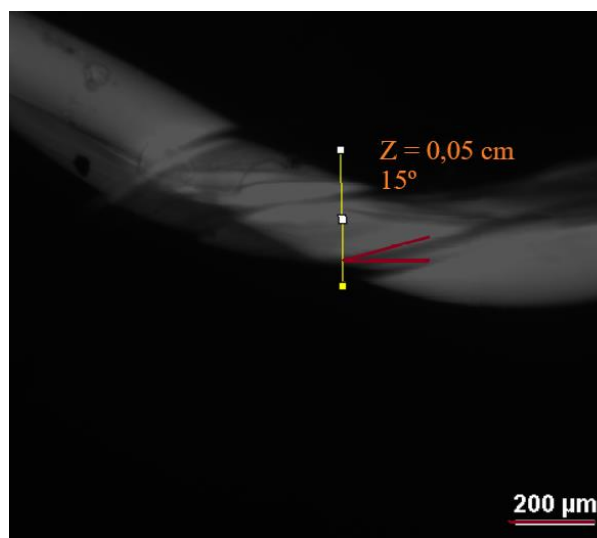
Tabela 24 - Raio de seção transversal e ângulo de curvatura do canal

Parâmetro	0,05 cm	0,1 cm
ρ (μm)	163,15	166,48
θ	16,7°	14,2°

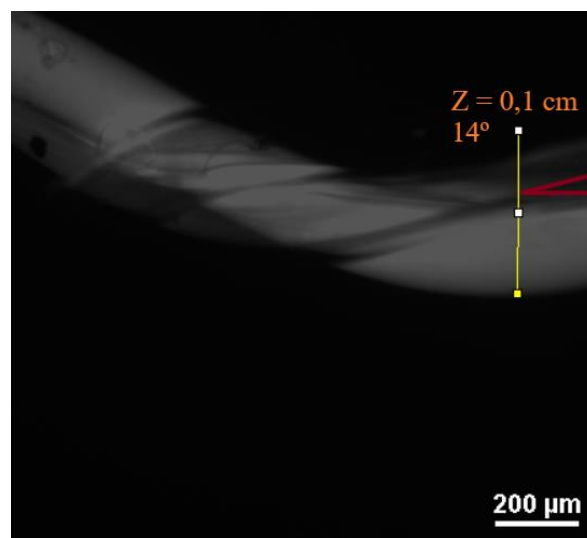
Para avaliar se a curvatura imposta pela simulação era a mesma do dispositivo utilizado para os testes de fluorescência experimental e síntese das nanoestruturas, os parâmetros ρ e θ experimentais foram determinados de maneira aproximada com as imagens do dispositivo obtidas via microscópio invertido, e extraídos via software ImageJ®, conforme Figura 50.

Figura 50 - Determinação do ângulo de curvatura do canal experimental

A)



B)

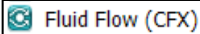


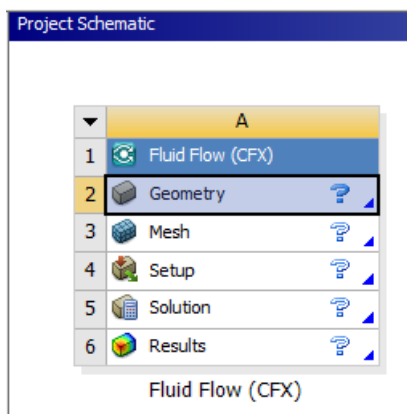
Com isso, as angulações do dispositivo obtidas (15° para $Z = 0,05$ cm e 14° para $Z = 0,1$ cm) confirmaram a similaridade entre geometria experimental e computacional. Os raios obtidos foram em torno de 169,11 e 173,5 μm para comprimentos de 0,05 e 0,1 cm, respectivamente.

APÊNDICE I

Tutorial para estudo básico de fluidodinâmica do *Injection Mixing Pipe*

Criando arquivo CFX

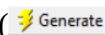
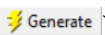
Com o *workbench* aberto, no menu *Analysis Systems* no *toolbox* selecionar  para abrir um arquivo CFX. Após isso, aparecerá o esquema do projeto:

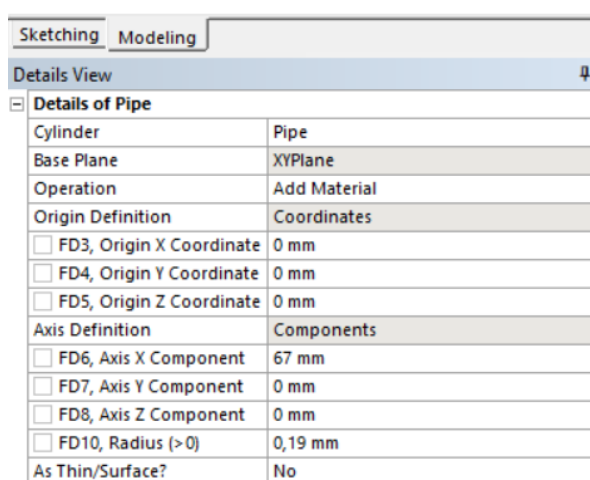


Após isto, seguir para os próximos passos descritos abaixo.

Geometria (Tubo)

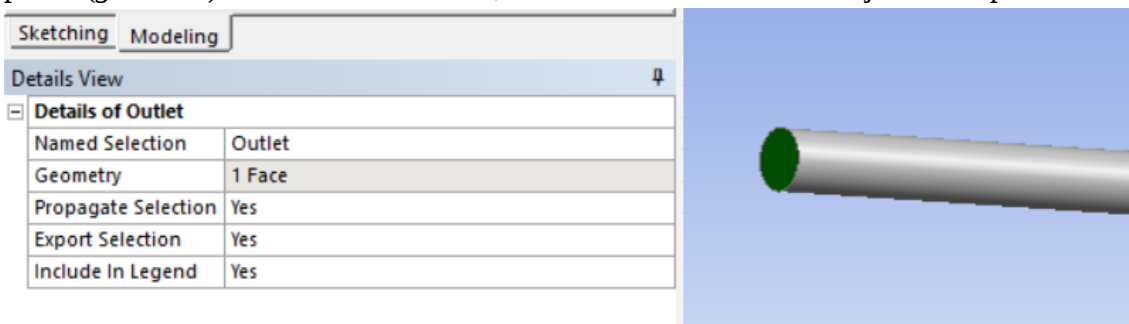
Ao abrir o *geometry* pelo *DesignModeler*, é necessário criar a geometria de interesse.

1) Neste caso, criou-se um cilindro tubular que pode ser usado para simular um escoamento tubular. Para tal, selecionar menu *create* -> *Primitives* -> *Cylinder*. Depois, é necessário gerar () para que seja aplicado. Isso vale para todos os passos seguintes. Em *units*, é possível ajustar a unidade de medida que se adeque melhor ao seu sistema. Nesse caso escolheu-se *Millimeter* (base milimétrica). Então define-se os parâmetros como nome e medidas no menu *Modeling*, logo abaixo de *Tree Outline*, como é mostrado no exemplo abaixo. Por fim, gerar () para que seja aplicado.



Nesse exemplo, foi definido o nome Pipe, com o cilindro medindo 0,19 mm de raio e 67 mm de comprimento (eixo X).

2) Definir entradas e saídas de fluido através do *Named Selection*. Selecionar menu *Tools* -> *Named Selection*. Fazer mesmo procedimento para ambas entrada e saída. Prosseguir com a nomeação e definição da face onde se dará a entrada (*inlet*) ou saída (*outlet*), no menu *Modeling*, e aplicar (*generate*). Ao selecionar a face, a mesma fica destacada. Veja o exemplo abaixo:

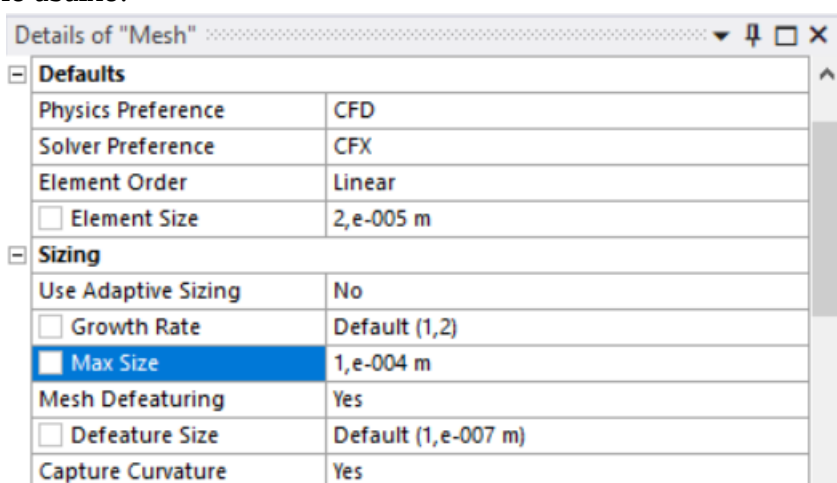


3) Com isso, as definições básicas de geometria estão definidas, e o próximo passo é seguir com a escolha da malha. Por fim, salvar o projeto (*Save Project*) e fechar aba (*Close DesignModeler*).

Geração da malha

Ao clicar em *mesh* no *workbench*, o *meshing* abrirá. O primeiro passo aqui é clicar em *Mesh* ( Mesh), presente no menu *outline*. A partir dele as configurações da malha poderão ser acessadas e definidas.

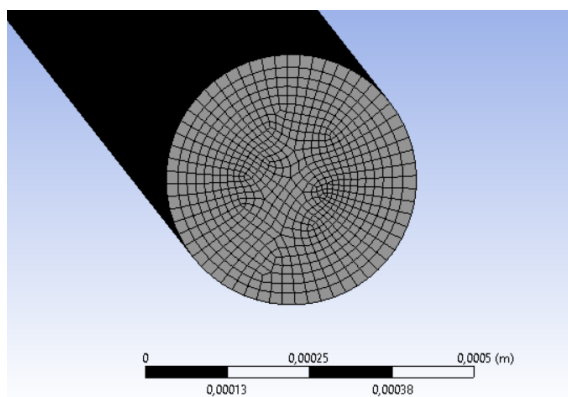
1) Em detalhes da malha (*details of "Mesh"*), definir o tamanho de elemento (*Element Size*) da sua malha, padrão (*default*) ou inserir o valor de sua escolha. Ao clicar em *sizing*, define-se também o tamanho máximo (*Max Size*), *default* ou o valor de sua escolha, que deve ser maior ou igual ao *Element Size*. Outros parâmetros como *Growth Rate* também podem ser alterados. Quando estiver definido todos os parâmetros, clicar em  para gerar a malha. Veja o exemplo abaixo:



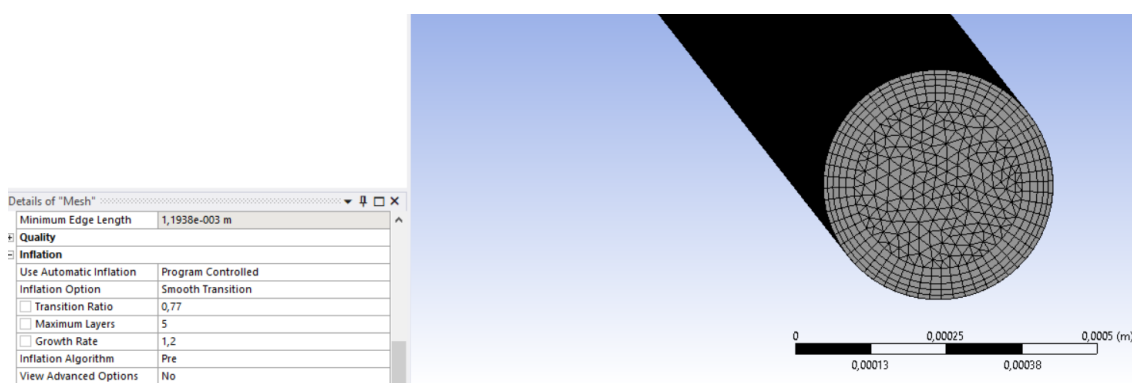
2) Após ter gerado a malha, é possível refinar os locais próximos as bordas, a fim de capturar os elevados gradientes na região de parede, e para tal, utiliza-se a opção *Inflation* para o refino dessa região com a inserção de elementos prismáticos. Em *Details of Mesh* -> *Inflation*, alterar a opção *Use Automatic Inflation* de *None* para *Program Controlled*. Selecionar a opção

Generate Mesh para geração da nova malha. A comparação entre a malha sem e com *Inflation* pode ser visualizada abaixo:

Sem *Inflation*:



Com *Inflation*:



3) O número de nós e elementos gerados pode ser visto ao expandir a aba *Statistics* do menu *Details of "Mesh"*. Com isso, a diferença da malha com e sem *Inflation* pode ser mensurada:

Sem *Inflation*:

Statistics	
Nodes	2311134
Elements	2212776

Com *Inflation*:

Statistics	
Nodes	1622490
Elements	4144101

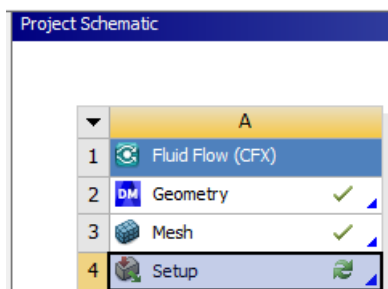
4) Com isso, as configurações de malha estão definidas, e o próximo passo é seguir com o *setup* do processo. Por fim, salvar o projeto (*Save Project*) e fechar aba em *file* → *Close Meshing*.

Setup

Antes de abrir o *setup*, é necessário fazer o *update* da malha. Selecionar com 1 clique o *setup*

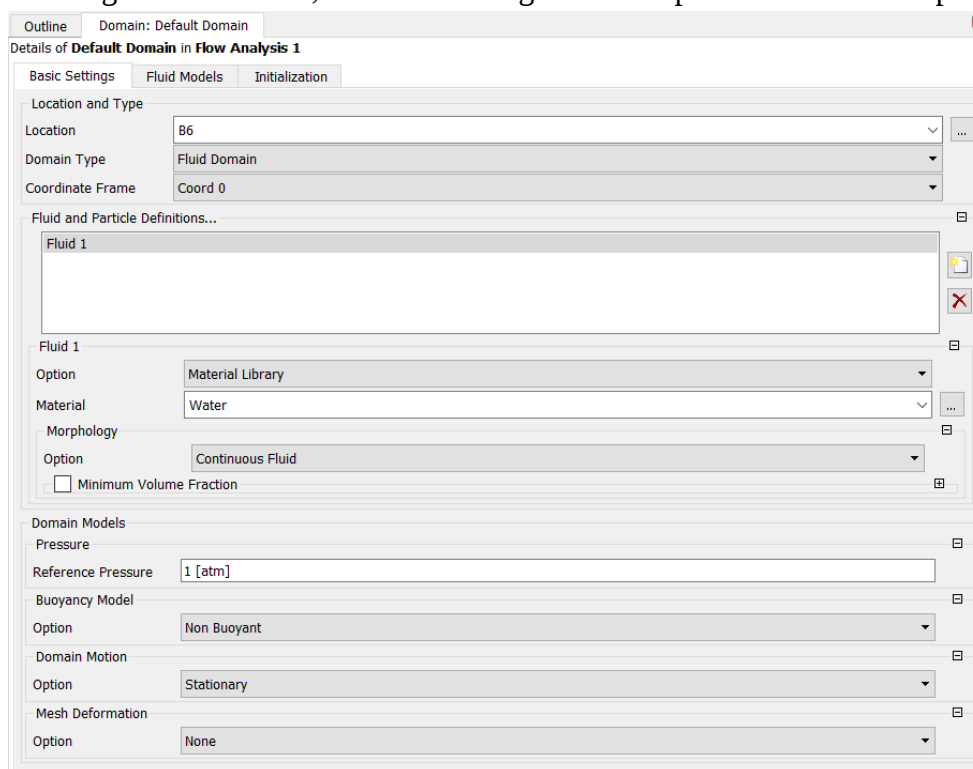


em *Project Schematic*, e com o botão direito do mouse, selecionar *Update Streams Components*. Após isso, a geometria, malha e *setup* devem ficar marcadas da seguinte maneira:

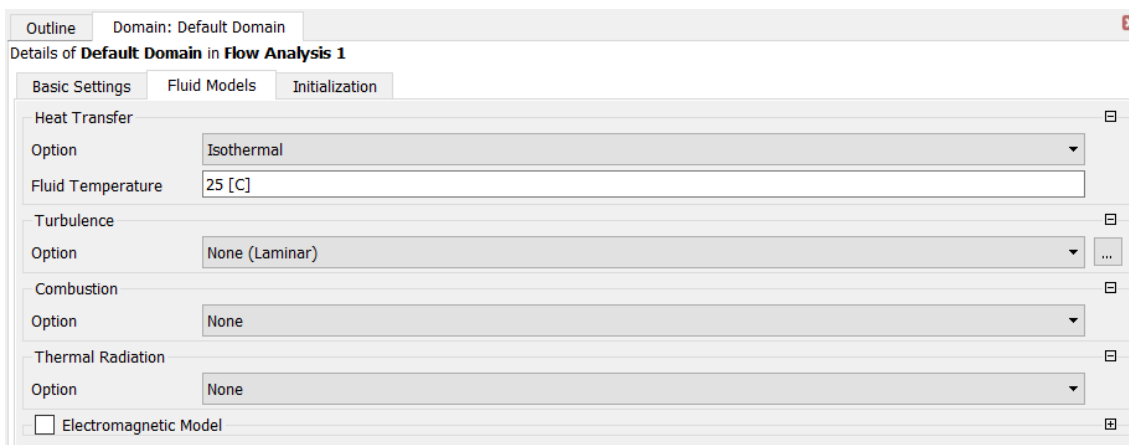


Com o *setup* marcado como na imagem acima, duplo clique para abri-lo, e o CFX-Pre abrirá. Agora é só seguir os próximos passos:

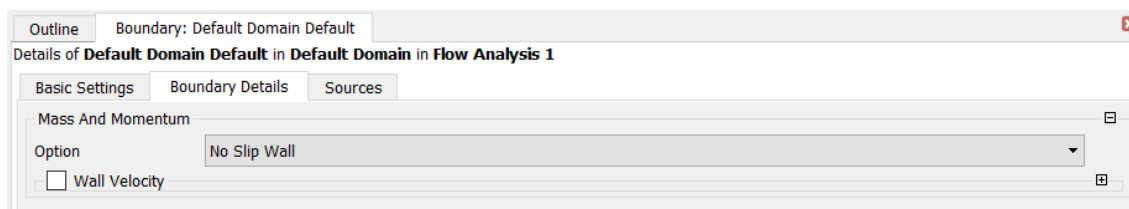
- 1) No menu *Outline*, selecionar *Analysis Type* para escolher entre estado estacionário ou transiente (*Steady State* ou *Transient*), e então aplicar (*Apply*). Lembrar de dar *apply* ao final de todas as etapas seguintes, para que fique registrado as alterações.
- 2) Criar condições de contorno para entrada e saída. Selecionar *Boundary* (), colocar o nome da corrente de entrada (*Inlet*). Na nova aba criada “Boundary: Inlet”, escolher o local (*location*) como *inlet*, em *Basic Settings*. Fazer mesmo procedimento para a saída.
- 3) Escolher características do escoamento: Em *Default Domain* no menu *Outline*, é possível definir o fluido, pressão e outros efeitos, em *Basic Settings*. Veja exemplo abaixo, onde foi escolhida a água como fluido, sem efeitos de gravidade e pressão atmosférica padrão.



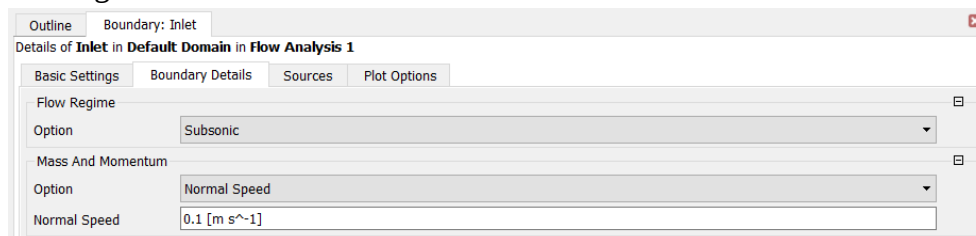
- 4) Na aba do lado, *Fluid Models*, é possível escolher parâmetros de transferência de calor, turbulência e outros. No exemplo, definiu-se como sistema isotérmico e regime laminar:



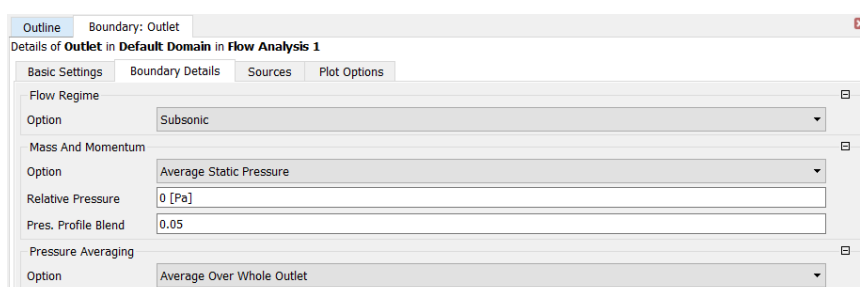
5) Definir contorno de parede: checar se na aba *Basic Settings* do *Default Domain Default*, no menu *Outline*, se está definido contorno como parede (*wall*). Se estiver, em *Boundary Details*, na aba ao lado, é possível definir o tipo de escoamento junto à parede. Nesse exemplo, escolheu-se a característica de não-deslizamento (*No Slip Wall*):



6) Definir características da entrada. Em inlet, no menu outline, abaixo do *Default Domain Default*, em *Boundary Details*, é possível escolher a velocidade de entrada (*Normal Speed*) do fluido, como segue abaixo:

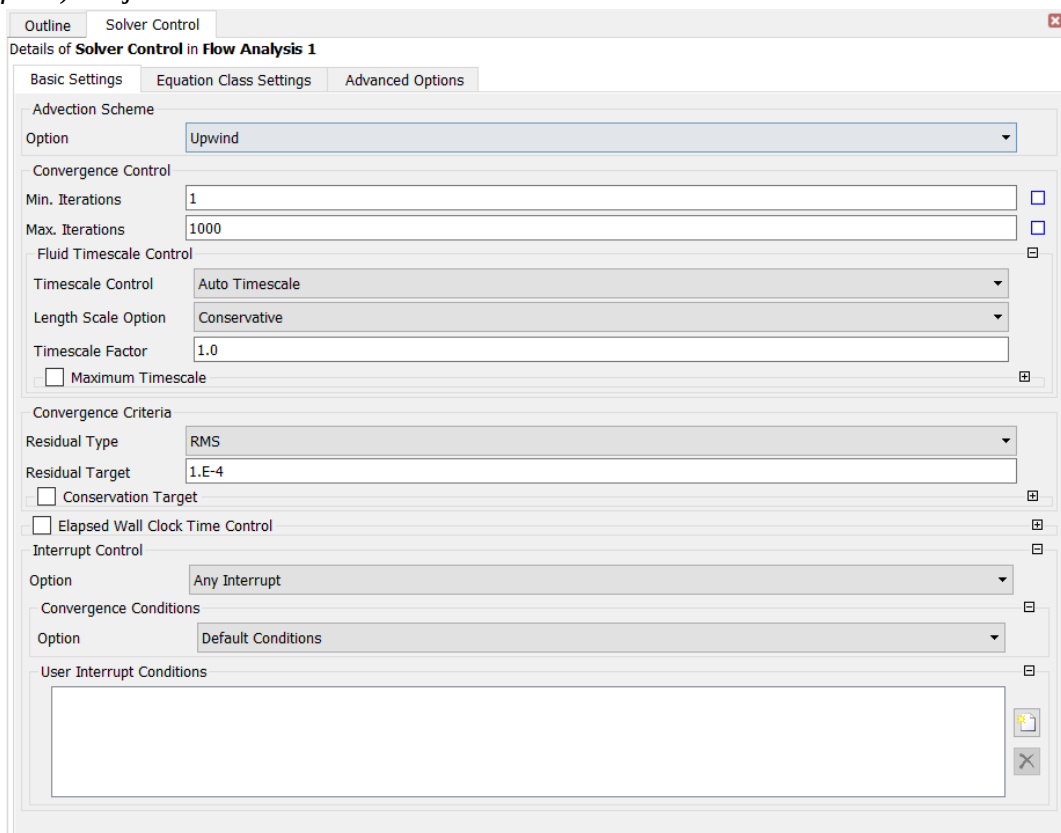


7) Repetir o mesmo procedimento para a saída, com a diferença que aqui optou-se por definir a pressão relativa, sem gradiente:



8) Definir os parâmetros do solver. Em *Solver Control*, no menu *Outline*, define-se, em *Basic Settings*, o método de discretização, quantidade de iterações e erro residual. Neste

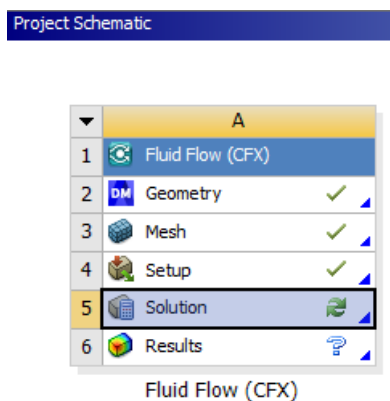
exemplo, escolheu-se o esquema *upwind*, até 1000 iterações, e critério de convergência de $1E-4$ (*default*). Veja abaixo:



9) Com isso, as principais definições de *setup* foram preenchidas. Salvar, *file* → *Close CFX-Pre*, e prosseguir para a solução (*solution*).

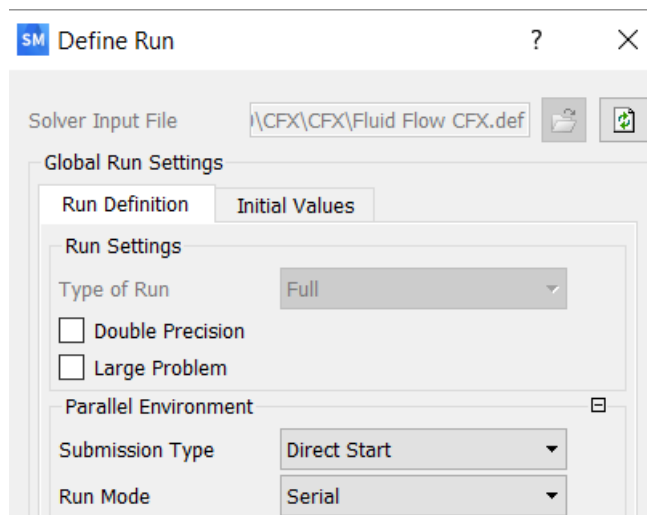
Solution

Antes de prosseguir para a solução, verificar se geometria, malha e setup estão marcadas corretamente, como segue abaixo:

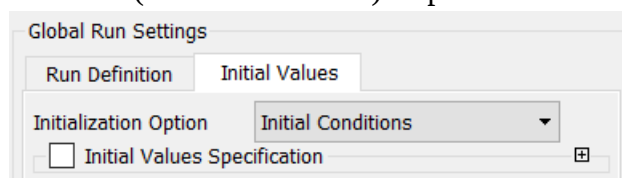


Após isso, duplo clique em *Solution* para abrir as opções de solução.

1) Com o *Solver Manager* aberto, na aba *Run Definition*, pode-se optar pelo modo serial, ou paralelo com várias máquinas. Neste caso optou-se pelo modo em série (*serial*):



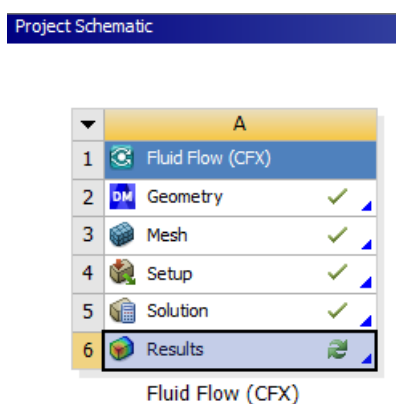
2) Na aba *Initial Values*, escolhe-se o método de inicialização. Neste exemplo optou-se por aplicar as condições iniciais (*Initial Conditions*) dispostas:



3) Com os parâmetros de solução definidos, selecionar *Start Run* para iniciar os cálculos de solução. Após completar a solução, fechar *CFX-Solver Manager* e prosseguir para resultados.

Resultados

Antes de abrir os resultados (*Results*), checar se todas as etapas anteriores foram completadas adequadamente, como segue abaixo:



Após isto, duplo clique em *Results* para abrir CFD-Post.

1) No CFD-Post $\rightarrow$ Location (Location $\rightarrow$ Plane (Plane) é possível criar um plano na tubulação para análise de diversas variáveis. A variável escolhida aqui, à título de exemplo, é a velocidade do fluido. Veja exemplo:

Details of **Plane 1**

Geometry Color Render View

Domains All Domains ...

Definition

Method XY Plane

Z 0.0 [m]

Plane Bounds

Type None

Plane Type

☒ Slice ☐ Sample

Apply Reset Defaults

Neste caso, definiu-se um plano passando na origem em $Z = 0$ [m]. Após definir as dimensões, basta aplicar (*apply*).

2) No CFD-Post $\rightarrow$ Location (Location) $\rightarrow$ Line (Line) é possível traçar uma linha em uma seção transversal, que pode ser usada posteriormente para análise do perfil de velocidade nessa seção, por exemplo:

Details of **Line 1**

Geometry Color Render View

Domains All Domains ...

Definition

Method Two Points

Point 1 0.002 -0.00019 0

Point 2 0.002 0.00019 0

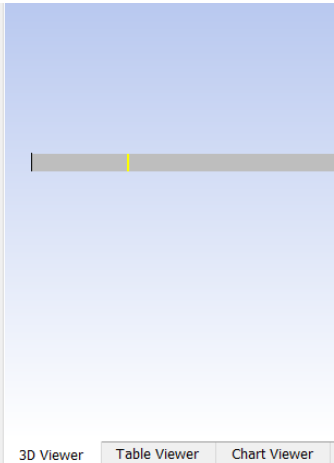
Line Type

☐ Cut ☒ Sample

Samples 10

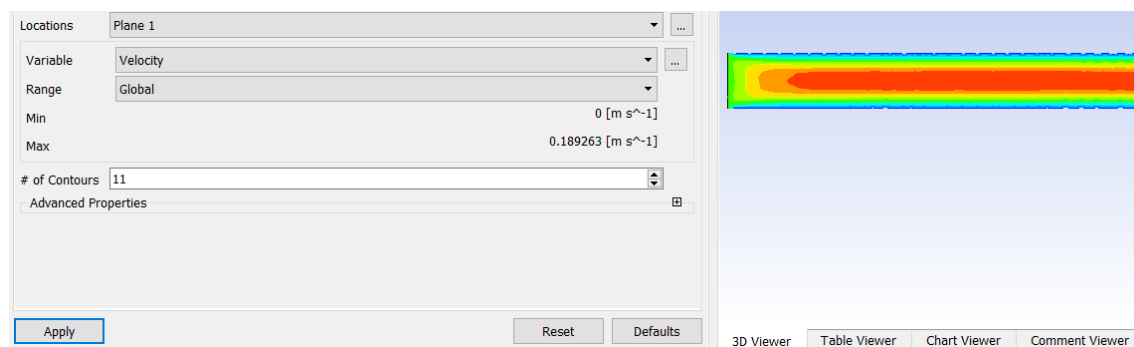
Apply Reset Defaults

3D Viewer Table Viewer Chart Viewer



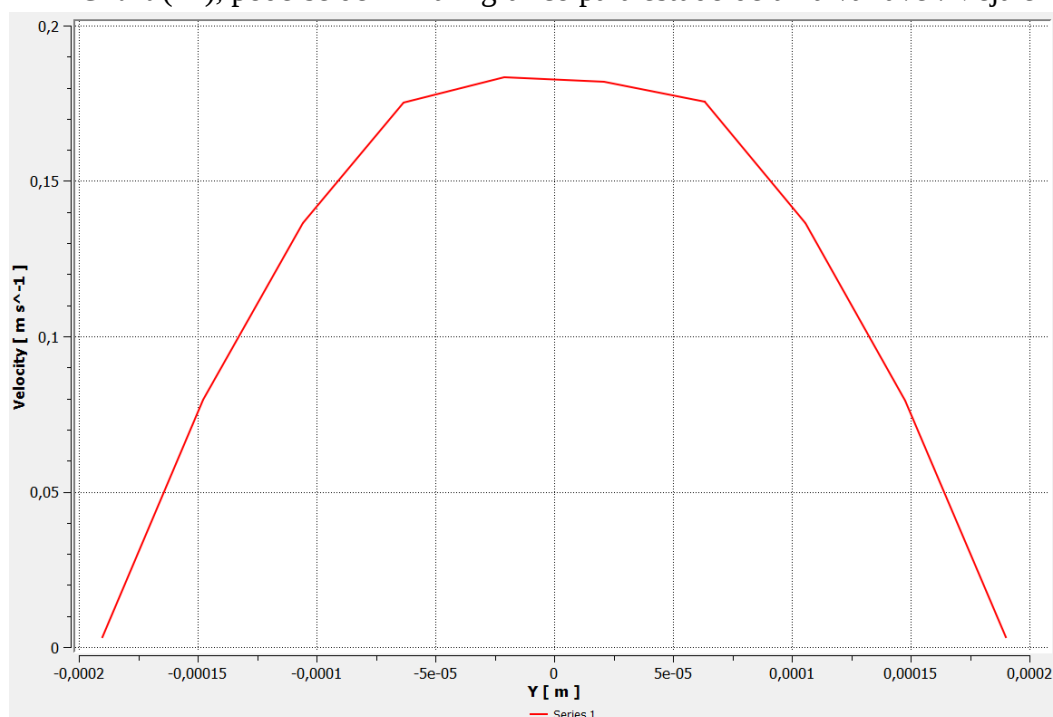
Veja a linha em amarelo, após dar *apply*.

3) No CFD-Post $\rightarrow$ Contour (Contour) é possível fazer um contorno para análise de gradientes. Veja exemplo abaixo:



Neste caso, definiu-se o contorno passando pelo plano, para análise do gradiente de velocidade (à esquerda).

- 4) Em *Chart* () , pode-se definir um gráfico para estudo de uma variável. Veja exemplo:



Neste caso, escolheu-se a análise do perfil de velocidade (definida na aba *Y Axis*, dentro de *Details of Chart*) passando pela largura *Y* do canal (definida na aba *X Axis*, dentro de *Details of Chart*), na seção transversal da linha criada (definida em *Data Series*, dentro de *Details of Chart*, em *Location* → *Line*). Essas são só algumas das possibilidades de se trabalhar com o Ansys-CFX®. Muitas outras funcionalidades podem ser utilizadas.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, Arshad; KIM, Kwang Yong. Three-objective optimization of a staggered herringbone micromixer. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 192, p. 350–360, 2014. DOI: 10.1016/j.snb.2013.10.109.
- AGHAEI, Halimeh; NAZAR, Ali Reza Solaimany. Continuous Production of the Nanoscale Liposome in a Double Flow-Focusing Microfluidic Device. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [S. l.], v. 58, n. 51, p. 23032–23045, 2019. DOI: 10.1021/acs.iecr.9b04079.
- AHN, Jungho; KO, Jihoon; LEE, Somin; YU, James; KIM, Yong Tae; JEON, Noo Li. Microfluidics in nanoparticle drug delivery; From synthesis to pre-clinical screening. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 128, p. 29–53, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.001>.
- AKINC, Akin et al. The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. **Nature Nanotechnology**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1084–1087, 2019. DOI: 10.1038/s41565-019-0591-y. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41565-019-0591-y>.
- ALAM, Afroz; AFZAL, Arshad; KIM, Kwang Yong. Mixing performance of a planar micromixer with circular obstructions in a curved microchannel. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 92, n. 3, p. 423–434, 2014. DOI: 10.1016/j.cherd.2013.09.008.
- ALDOSARI, Basmah N.; ALFAGIH, Iman M.; ALMURSHEDI, Alanood S. Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for RNA-Based Vaccines. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, p. 206, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13020206.
- ALLEN, T. M.; HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. **BBA - Biomembranes**, [S. l.], v. 1068, n. 2, p. 133–141, 1991. DOI: 10.1016/0005-2736(91)90201-I.
- ANSARI, Mubashshir Ahmad; KIM, Kwang-yong. Shape optimization of a micromixer with staggered herringbone groove. [S. l.], v. 62, p. 6687–6695, 2007. DOI: 10.1016/j.ces.2007.07.059.
- ANSEDE, Manuel; GALOCHA, Artur; OLIVEIRA, Regiane. **As diferenças abismais entre as vacinas de Oxford, Pfizer e Moderna, a Coronavac e a Sputnik V**. 2020. Disponível em: <https://brasil.elpais.com/ciencia/2020-11-24/as-diferencas-abismais-entre-as-vacinas-da-oxford-pfizer-moderna-a-coronavac-e-a-sputnik-v.html?ssm=whatsapp>. Acesso em: 12 mar. 2021.
- ARAYA-FARIAS, Monica; DZIOMBA, Szymon; TRAN, N. Thuy. **Microfluidic strategies for extraction and preconcentration of proteins and peptides**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819763-9.00003-9>.
- AREF, Hassan. The development of chaotic advection. **Physics of Fluids**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 1315–1325, 2002. DOI: 10.1063/1.1458932.
- AUDOUY, S. A. L.; DE LEIJ, L. F. M. H.; HOEKSTRA, D.; MOLEMA, G. In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 1599–1605, 2002. DOI: 10.1023/A:1020989709019.
- BALAZS, Daniel A.; GODBEY, WT. Liposomes for Use in Gene Delivery. **Journal of Drug Delivery**, [S. l.], p. 1–12, 2011. DOI: 10.1155/2011/326497. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1702065114>.
- BALBINO, Tiago A.; AOKI, Nayla T.; GASPERINI, Antonio A. M.; OLIVEIRA, Cristiano L. P.; AZZONI, Adriano R.; CAVALCANTI, Leide P.; DE LA TORRE, Lucimara G. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 226, p. 423–433, 2013. DOI: 10.1016/j.cej.2013.04.053.
- BALBINO, Tiago A.; CORREA, Gabriela S. C.; FAVARO, Marianna T. P.; TOLEDO, Marcelo A. S.; AZZONI, Adriano R.; DE LA TORRE, Lucimara G. Physicochemical and in vitro evaluation of cationic liposome, hyaluronic acid and plasmid DNA as pseudo-ternary complexes for gene delivery. **Colloids and Surfaces A**:

Physicochemical and Engineering Aspects, [S. l.], v. 484, p. 262–270, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.08.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.08.005>.

BALBINO, Tiago A.; GASPERINI, Antônio A. M.; OLIVEIRA, Cristiano L. P.; AZZONI, Adriano R.; CAVALCANTI, Leide P.; DE LA TORRE, Lucimara G. Correlation of the physicochemical and structural properties of pDNA/cationic liposome complexes with their in vitro transfection. **Langmuir**, [S. l.], v. 28, n. 31, p. 11535–11545, 2012. DOI: 10.1021/la302608g.

BALBINO, Tiago A.; SERAFIN, Juliana M.; Malfatti-GASPERINI, Antonio A.; DE OLIVEIRA, Cristiano L. P.; CAVALCANTI, Leide P.; DE JESUS, Marcelo B.; DE LA TORRE, Lucimara G. Microfluidic Assembly of pDNA/Cationic Liposome Lipoplexes with High pDNA Loading for Gene Delivery. **Langmuir**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b04177.

BALBINO, Tiago A.; SERAFIN, Juliana M.; RADAIC, Allan; DE JESUS, Marcelo B.; DE LA TORRE, Lucimara G. Integrated microfluidic devices for the synthesis of nanoscale liposomes and lipoplexes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 152, p. 406–413, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.030.

BALBINO, Tiago Albertini; AZZONI, Adriano Rodrigues; DE LA TORRE, Lucimara. Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 111, p. 203–210, 2013. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.003.

BEEBE, David J.; MENSING, Glennys A.; WALKER, Glenn M. Physics and applications of microfluidics in biology. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 4, p. 261–286, 2002. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916.

BELLIVEAU, Nathan M. et al. Microfluidic synthesis of highly potent limit-size lipid nanoparticles for in vivo delivery of siRNA. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [S. l.], v. 1, 2012. DOI: 10.1038/mtna.2012.28.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 235, p. 337–351, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

BILLINGSLEY, Margaret M.; SINGH, Nathan; RAVIKUMAR, Pranali; ZHANG, Rui; JUNE, Carl H.; MITCHELL, Michael J. Ionizable Lipid Nanoparticle-Mediated mRNA Delivery for Human CAR T Cell Engineering. **Nano Letters**, [S. l.], v. 20, p. 1578–1589, 2020. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b04246.

BILLO, Richard E.; OLIVER, C. Ryan; CHAROENWAT, Rachaneewan; DENNIS, Brian H.; WILSON, Paul A.; PRIEST, John W.; BEARDSLEY, Heather. A cellular manufacturing process for a full-scale biodiesel microreactor. **Journal of Manufacturing Systems**, [S. l.], v. 37, p. 409–416, 2015. DOI: 10.1016/j.jmsy.2014.07.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmsy.2014.07.004>.

BLAKNEY, Anna K.; MCKAY, Paul F.; YUS, Bárbara Ibarzo; ALDON, Yoann; SHATTOCK, Robin J. Inside out: optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and in vivo delivery of saRNA. **Gene Therapy**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 363–372, 2019. DOI: 10.1038/s41434-019-0095-2.

BLOOM, Kristie; VAN DEN BERG, Fiona; ARBUTHNOT, Patrick. Self-amplifying RNA vaccines for infectious diseases. **Gene Therapy**, [S. l.], v. 28, p. 117–129, 2021. DOI: 10.1038/s41434-020-00204-y.

BORGOHAIN, Preetirekha; ARUMUGHAN, Jyothis; DALAL, Amaresh; NATARAJAN, Ganesh. Design and performance of a three-dimensional micromixer with curved ribs. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 136, p. 761–775, 2018. DOI: 10.1016/j.cherd.2018.06.027.

CAI, Shuang; YANG, Qihong; BAGBY, Taryn R.; FORREST, M. Laird. Lymphatic drug delivery using engineered liposomes and solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 63, n. 10–11, p. 901–908, 2011. DOI: 10.1016/j.addr.2011.05.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.017>.

CAPRETTO, Lorenzo; CARUGO, Dario; MAZZITELLI, Stefania; NASTRUZZI, Claudio; ZHANG, Xunli. Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 65, p. 1496–1532, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2013.08.002.

CARDARELLI, Francesco et al. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1038/srep25879.

CARUGO, Dario; BOTTARO, Elisabetta; OWEN, Joshua; STRIDE, Eleanor; NASTRUZZI, Claudio. Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, p. 1–15, 2016. DOI: 10.1038/srep25876.

CARVALHO, Bruna G.; CECCATO, Bruno T.; MICHELON, Mariano; HAN, Sang W.; TORRE, Lucimara G. De. Advanced Microfluidic Technologies for Lipid Nano-Microsystems from Synthesis to Biological Application. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 141, p. 1–31, 2022. a. DOI: 10.3390/pharmaceutics14010141.

CARVALHO, Bruna G.; GARCIA, Bianca B. M.; MALFATTI-GASPERINI, Antonio A.; HAN, Sang W.; DE LA TORRE, Lucimara G. Hybrid polymer/lipid vesicle synthesis: Association between cationic liposomes and lipoplexes with chondroitin sulfate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 210, 2022. b. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.112233. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112233>.

CARVALHO, Bruna G.; VIT, Franciele F.; CARVALHO, Hernandes F.; HAN, Sang W.; DE LA TORRE, Lucimara G. Recent advances in co-delivery nanosystems for synergistic action in cancer treatment. **Journal of Materials Chemistry B**, [S. l.], v. 9, p. 1208–1237, 2020. DOI: 10.1039/d0tb02168g.

CARVALHO, Bruna Gregatti; TAKETA, Thiago Bezerra; GARCIA, Bianca Bonetto Moreno; HAN, Sang Won; DE LA TORRE, Lucimara Gaziola. Hybrid microgels produced via droplet microfluidics for sustainable delivery of hydrophobic and hydrophilic model nanocarriers. **Materials Science & Engineering C**, [S. l.], v. 118, n. April 2020, p. 111467, 2021. a. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111467.

CARVALHO, Violeta; RODRIGUES, Raquel O.; LIMA, Rui A.; TEIXEIRA, Senhorinha. Computational Simulations in Advanced Microfluidic Devices: A Review. **Micromachines**, [S. l.], 2021. b.

CETIN, Barbaros; ASIK, Mehmet D.; TAZE, Serdar. Design and fabrication of a microfluidic device for synthesis of chitosan nanoparticles. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, [S. l.], v. 4, 2013. DOI: 10.1115/1.4026287.

CHAVES, I. L.; DUARTE, L. C.; COLTRO, W. K. T.; SANTOS, D. A. Droplet length and generation rate investigation inside microfluidic devices by means of CFD simulations and experiments. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 161, p. 260–270, 2020. DOI: 10.1016/j.cherd.2020.07.015.

CHEN, Delai et al. Rapid discovery of potent siRNA-containing lipid nanoparticles enabled by controlled microfluidic formulation. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 134, n. 16, p. 6948–6951, 2012. DOI: 10.1021/ja301621z.

CHEN, Sam; TAM, Yuen Yi C.; LIN, Paulo J. C.; SUNG, Molly M. H.; TAM, Ying K.; CULLIS, Pieter R. Influence of particle size on the in vivo potency of lipid nanoparticle formulations of siRNA. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 235, p. 236–244, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.059.

CHENG, Jing Yan; HUANG, Hang Ning; TSENG, Wen Chi; LI, Tsung Lin; CHAN, Yi Lin; CHENG, Kai Chun; WU, Chang Jer. Transcutaneous immunization by lipoplex-patch based DNA vaccines is effective vaccination against Japanese encephalitis virus infection. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 135, n. 3, p. 242–249, 2009. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.01.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.014>.

CHENG, Zhiliang; AL ZAKI, Ajlan; HUI, James Z.; MUZYKANTOV, Vladimir R.; TSOURKAS, Andrew. Multifunctional nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities. **Science**, [S. l.], v. 338, p. 903–910, 2012.

CONAGIN, Armando; BARBIN, Décio; DEMÉTRIO, Clarice Garcia Borges. Modifications for the Tukey test procedure and evaluation of the power and efficiency of multiple comparison procedures. **Scientia Agricola**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 428–432, 2008. DOI: 10.1590/S0103-90162008000400016.

CONGIU, Agostina; POZZI, Daniela; ESPOSITO, Claudio; CASTELLANO, Carlo; MOSSA, Giuseppe.

Correlation between structure and transfection efficiency: A study of DC-Chol-DOPE/DNA complexes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 43–48, 2004. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.04.006.

CONVERY, Neil; GADEGAARD, Nikolaj. 30 Years of Microfluidics. **Micro and Nano Engineering**, [S. l.], v. 2, p. 76–91, 2019. DOI: 10.1016/j.mne.2019.01.003.

CULLIS, Pieter R.; HOPE, Michael J. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 1467–1475, 2017. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.013.

DAMMES, Niels; PEER, Dan. Paving the Road for RNA Therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 41, n. 10, p. 755–775, 2020. DOI: 10.1016/j.tips.2020.08.004.

DE CAMARGO, Camila L.; SHIROMA, Letícia S.; GIORDANO, Gabriela F.; GOBBI, Angelo L.; VIEIRA, Luis C. S.; LIMA, Renato S. Turbulence in microfluidics: Cleanroom-free, fast, solventless, and bondless fabrication and application in high throughput liquid-liquid extraction. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 940, p. 73–83, 2016. DOI: 10.1016/j.aca.2016.08.052. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.08.052>.

DE FARIAS SILVA, Carlos Eduardo; SFORZA, Eleonora. Carbohydrate productivity in continuous reactor under nitrogen limitation: Effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*. [S. l.], v. 51, p. 2112–2118, 2016.

DE LA TORRE, Lucimara Gaziola; BALBINO, Tiago Albertini; SIPOLI, Caroline Casagrande. Nanomedicina e os desafios da Engenharia Química. In: Especial Nanotecnologia. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, [S. l.], 2017.

DE LA TORRE, Lucimara Gaziola; DE PINHO, Samantha Cristina. **Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles**. In: **Food Nanoscience and Nanotechnology**. [s.l.] : Springer, 2015. v. 53

DEL POZO-RODRÍGUEZ, Ana; DELGADO, Diego; SOLINÍS, María Ángeles; PEDRAZ, Jose Luis; ECHEVARRÍA, Enrique; RODRÍGUEZ, Juan Manuel; GASCÓN, Alicia R. Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: In vivo protein expression after intravenous administration. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 385, n. 1–2, p. 157–162, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.020.

DEL POZO-RODRÍGUEZ, Ana; SOLINÍS, María Ángeles; RODRÍGUEZ-GASCÓN, Alicia. Applications of lipid nanoparticles in gene therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], 2016. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.10.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.10.016>.

DI CARLO, Dino. Inertial microfluidics. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 9, n. 21, p. 3038–3046, 2009. DOI: 10.1039/b912547g.

DUNBAR, Cynthia E.; HIGH, Katherine A.; JOUNG, J. Keith; KOHN, Donald B.; OZAWA, Keiya; SADELAIN, Michel. Gene therapy comes of age. **Science**, [S. l.], v. 359, n. 6372, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1126/science.aan4672.

DURST, Franz. **Fluid Mechanics: An Introduction to the Theory of Fluid Flows**. [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2008.

DYKXHOORN, Derek M.; LIEBERMAN, Judy. Running interference: Prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 8, p. 377–402, 2006. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095848.

E. MCNEIL, Sarah; VANGALA, Anil; W. BRAMWELL, Vincent; J. HANSON, Peter; PERRIE, Yvonne. Lipoplexes Formulation and Optimisation: In Vitro Transfection Studies Reveal No Correlation with In Vivo Vaccination Studies. **Current Drug Delivery**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 175–187, 2010. DOI: 10.2174/156720110791011774.

EMERSON, David R.; CIEŚLICKI, Krzysztof; GU, Xiaojun; BARBER, Robert W. Biomimetic design of microfluidic manifolds based on a generalised Murray's law. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 447–454, 2006.

DOI: 10.1039/b516975e.

ERASMUS, Jesse H. et al. A Nanostructured Lipid Carrier for Delivery of a Replicating Viral RNA Provides Single, Low-Dose Protection against Zika. **Molecular Therapy**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 2507–2522, 2018. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.07.010.

EŞ, Ismail et al. Evaluation of siRNA and cationic liposomes complexes as a model for in vitro siRNA delivery to cancer cells. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 555, n. March, p. 280–289, 2018. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.06.073. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.06.073>.

EŞ, Ismail. **MICROFLUIDIC SYSTEMS FOR INCORPORATION OF SMALL INTERFERING RNA (SIRNA) IN CATIONIC LIPOSOMES AND ON-CHIP TRANSFECTION OF MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS**. 2020. Universidade Estadual de Campinas. Artigo relacionado se encontra submetido à revista Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, [S. l.], 2020.

EŞ, Ismail; MONTEBUGNOLI, Leonardo Jose; FILIPPI, Maria Fernanda P.; Malfatti-Gasperini, Antonio A.; RADAIC, Allan; DE JESUS, Marcelo Bispo; DE LA TORRE, Lucimara Gaziola. High-throughput conventional and stealth cationic liposome synthesis using a chaotic advection-based microfluidic device combined with a centrifugal vacuum concentrator. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 382, n. 122821, p. 122821, 2020. DOI: 10.1016/j.cej.2019.122821. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122821>.

EVERS, Martijn J. W.; KULKARNI, Jayesh A.; VAN DER MEEL, Roy; CULLIS, Pieter R.; VADER, Pieter; SCHIFFELERS, Raymond M. State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. **Small Methods**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 1700375, 2018. DOI: 10.1002/smtd.201700375.

FAN, Yuchen; ZHANG, Qiang. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 8, p. 81–87, 2013. DOI: 10.1016/j.ajps.2013.07.010.

FARHOOD, Hassan; SERBINA, Natalya; HUANG, Leaf. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. **BBA - Biomembranes**, [S. l.], v. 1235, n. 2, p. 289–295, 1995. DOI: 10.1016/0005-2736(95)80016-9.

FIRMINO, Priscilla C. O. S.; VIANNA, Sávio S. V.; DA COSTA, Ohanna M. M. M.; Malfatti-Gasperini, Antônio A.; GOBBI, Angelo L.; LIMA, Renato S.; DE LA TORRE, Lucimara G. 3D micromixer for nanoliposomes synthesis: a promising advance in high mass productivity. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 21, p. 2971–2985, 2021. DOI: 10.1039/d1lc00232e.

FRIEDMANN, T. Delivering therapeutic genes - matching approach and application. [S. l.], 1997.

FROMMELT, Thomas; KOSTUR, Marcin; WENZEL-SCHÄFER, Melanie; TALKNER, Peter; HÄNGGI, Peter; WIXFORTH, Achim. Microfluidic mixing via acoustically driven chaotic advection. **Physical Review Letters**, [S. l.], v. 100, n. 3, p. 1–4, 2008. DOI: 10.1103/PhysRevLett.100.034502.

GAROFALO, F.; ADROVER, A.; CERBELLI, S.; GIONA, M. Spectral characterization of static mixers. The S-shaped micromixer as a case study. **AIChE Journal**, [S. l.], v. 56, n. 2, 2009. DOI: 10.1002/aic.11994. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.11994>.

GASPAR, Ricardo; COELHO, Filipe; SILVA, Bruno F. B. Lipid-nucleic acid complexes: physicochemical aspects and prospects for cancer treatment. **Molecules**, [S. l.], v. 25, p. 1–39, 2020. DOI: 10.3390/molecules25215006.

GEALL, Andrew J. et al. Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 36, p. 14604–14609, 2012. DOI: 10.1073/pnas.1209367109.

GINDY, Marian E.; DIFELICE, Katherine; KUMAR, Varun; PRUD'HOMME, Robert K.; CELANO, Robert; HAAS, R. Matthew; SMITH, Jeffrey S.; BOARDMAN, David. Mechanism of macromolecular structure

evolution in self-assembled lipid nanoparticles for siRNA delivery. **Langmuir**, [S. l.], v. 30, n. 16, p. 4613–4622, 2014. DOI: 10.1021/la500630h.

GLATZEL, Thomas; LITTERST, Christian; CUPELLI, Claudio; LINDEMANN, Timo; MOOSMANN, Christian; NIEKRAWIETZ, Remigius; STREULE, Wolfgang; ZENGERLE, Roland; KOLTAY, Peter. Computational fluid dynamics (CFD) software tools for microfluidic applications - A case study. **Computers and Fluids**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 218–235, 2008. DOI: 10.1016/j.compfluid.2007.07.014.

GOBBY, D.; ANGELI, P.; GAVRIILIDIS, A. Mixing characteristics of T-type microfluidic mixers. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, [S. l.], v. 11, n. 126, 2001.

GREGORIADIS, Gregory; BACON, Andrew; CAPARROS-WANDERLEY, Wilson; MCCORMACK, Brenda. A role for liposomes in genetic vaccination. **Vaccine**, [S. l.], v. 20, 2002. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00514-5.

GRIMALDI, N.; ANDRADE, F.; SEGOVIA, N.; FERRER-TASIES, L.; SALA, S.; VECIANA, J.; VENTOSA, N. Lipid-based nanovesicles for nanomedicine. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 45, n. 23, p. 6520–6545, 2016. DOI: 10.1039/c6cs00409a.

GUAN, Yanfang; XU, Fengqian; SUN, Baichuan; MENG, Xiangxin; LIU, Yansheng; BAI, Mingyang. A hybrid electrically-and-piezoelectrically driven micromixer built on paper for microfluids mixing. **Biomedical Microdevices**, [S. l.], v. 22, 2020. DOI: 10.1007/s10544-020-00502-7.

GUANG LIU, Wen; DE YAO, Kang. Chitosan and its derivatives - A promising non-viral vector for gene transfection. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

GUIMARÃES SÁ CORREIA, Mariana; BRIUGLIA, Maria L.; NIOSI, Fabio; LAMPROU, Dimitrios A. Microfluidic manufacturing of phospholipid nanoparticles: Stability, encapsulation efficacy, and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 516, p. 91–99, 2017. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.025.

GV. **Continuous production of liposomes and lipid nanoparticles using the 5 Input and Micromixer chip**. 2020.

HABCHI, Charbel; LEMENAND, Thierry; DELLA VALLE, Dominique; PEERHOSSAINI, Hassan. Liquid/liquid dispersion in a chaotic advection flow. **International Journal of Multiphase Flow**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 485–497, 2009. DOI: 10.1016/j.ijmultiphaseflow.2009.02.019.

HAFEZ, IM.; MAURER, N.; CULLIS, PR. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. **Gene Therapy**, [S. l.], v. 8, p. 1188–1196, 2001.

HAJBA, Laszlo; GUTTMAN, Andras. Continuous-Flow-Based Microfluidic Systems for Therapeutic Monoclonal Antibody Production and Organ-on-a-Chip Drug Testing. [S. l.], v. 7, n. October, p. 118–123, 2017. DOI: 10.1556/1846.2017.00014.

HALLDORSSON, Skarphedinn; LUCUMI, Edinson; GÓMEZ-SJÖBERG, Rafael; FLEMING, Ronan M. T. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 63, p. 218–231, 2015. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.029.

HAN, Tengting; ZHANG, Li; XU, Hong; XUAN, Jin. Factory-on-chip: Modularised microfluidic reactors for continuous mass production of functional materials. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 326, p. 765–773, 2017. DOI: 10.1016/j.cej.2017.06.028.

HANSEN, Jesper S.; OTTESEN, Johnny T. Molecular dynamics simulations of oscillatory flows in microfluidic channels. **Microfluidics and Nanofluidics**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 301–307, 2006. DOI: 10.1007/s10404-005-0073-4.

HARASHIMA, H.; HIRAIWA, T.; OCHI, Y.; KIWADA, H. Size dependent liposome degradation in blood: In vivo/in vitro correlation by kinetic modeling. **Journal of Drug Targeting**, [S. l.], v. 3, p. 253–261, 1995. DOI: 10.3109/10611869509015954.

HASSETT, Kimberly J. et al. Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [S. l.], v. 15, n. April, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.01.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.013>.

HATAKEYAMA, Hiroto; AKITA, Hidetaka; HARASHIMA, Hideyoshi. The polyethyleneglycol dilemma: Advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 892–899, 2013. DOI: 10.1248/bpb.b13-00059.

HATTORI, YOSHIYUKI; TAMAKI, KYOKO; SAKASAI, SHO; OZAKI, Kei Ichi; ONISHI, HIRAKU. Effects of PEG anchors in PEGylated siRNA lipoplexes on in vitro gene-silencing effects and siRNA biodistribution in mice. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 4183–4196, 2020. DOI: 10.3892/mmr.2020.11525.

HENRIQUES, A. M.; MADEIRA, C.; FEVEREIRO, M.; PRAZERES, D. M. F.; AIRES-BARROS, M. R.; MONTEIRO, G. A. Effect of cationic liposomes/DNA charge ratio on gene expression and antibody response of a candidate DNA vaccine against Maedi Visna virus. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 377, n. 1–2, p. 92–98, 2009. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.05.005.

HERWEIJER, H.; WOLFF, J. A. Gene therapy progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. **Gene Therapy**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 99–107, 2007. DOI: 10.1038/sj.gt.3302891.

HIROTA, Sadao; DE ILARDUYA, Conchita Tros; BARRON, Lee G.; SZOKA, Francis C. Simple mixing device to reproducibly prepare cationic lipid-DNA complexes (lipoplexes). **BioTechniques**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 286–290, 1999. DOI: 10.2144/99272bm16.

HOMMA, Akira; MARTINS, Reinaldo Menezes; JESSOUROUM, Ellen; OLIVA, Otavio. Desenvolvimento tecnológico: elo deficiente na inovação tecnológica de vacinas no Brasil. [S. l.], v. 10, n. suplemento 2, p. 671–696, 2003.

HOOD, Renee R.; DEVOE, Don L. High-Throughput Continuous Flow Production of Nanoscale Liposomes by Microfluidic Vertical Flow Focusing. **Small**, [S. l.], v. 11, n. 43, p. 5790–5799, 2015. DOI: 10.1002/smll.201501345.

HOOD, Renee R.; DEVOE, Don L.; ATENCIA, Javier; VREELAND, Wyatt N.; OMIATEK, Donna M. A facile route to the synthesis of monodisperse nanoscale liposomes using 3D microfluidic hydrodynamic focusing in a concentric capillary array. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 14, n. 14, p. 2403–2409, 2014. DOI: 10.1039/c4lc00334a.

HOU, Xucheng; ZAKS, Tal; LANGER, Robert; DONG, Yizhou. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. **Nature Reviews Materials**, [S. l.], v. 6, p. 1078–1094, 2021. DOI: 10.1038/s41578-021-00358-0.

HSIEH, Albert Tsung Hsi; HORI, Nicole; MASSOUDI, Rustin; PAN, Patrick Jen Hao; SASAKI, Hirotaka; LIN, Yuh Adam; LEE, Abraham P. Nonviral gene vector formation in monodispersed picolitre incubator for consistent gene delivery. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 9, n. 18, p. 2638–2643, 2009. DOI: 10.1039/b823191e.

HUANG, Changjin; QUINN, David; SADOVSKY, Yoel; SURESH, Subra; HSIA, K. Jimmy. Formation and size distribution of self-assembled vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 114, n. 11, p. 2910–2915, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1702065114. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1702065114>.

HUEBNER, Stefan; BATTERSBY, Bronwyn Jean; GRIMM, Rudo; CEVC, Gregor. Lipid-DNA complex formation: Reorganization and rupture of lipid vesicles in the presence of DNA as observed by cryoelectron microscopy. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 76, n. 6, p. 3158–3166, 1999. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77467-9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77467-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77467-9).

ICKENSTEIN, Ludger M.; GARIDEL, Patrick. Lipid-based nanoparticle formulations for small molecules and RNA drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 16, p. 1205–1226, 2019. DOI: 10.1080/17425247.2019.1669558.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Fases de desenvolvimento de um novo medicamento.**

2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos/fases-desenvolvimento-um-novo-medicamento>.

ISMAGILOV, Rustem F.; STROOCK, Abraham D.; KENIS, Paul J. A.; WHITESIDES, George; STONE, Howard A. Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two- phase laminar flows in microchannels. **Applied Physics Letters**, [S. l.], v. 76, n. 2376, 2000. DOI: 10.1063/1.126351.

ITV. **How does the Pfizer vaccine work?** 2020. Disponível em: <https://www.itv.com/news/2020-12-02/how-does-the-pfizer-vaccine-work>. Acesso em: 9 jul. 2021.

JAFRY, Ali Turab; LIM, Hosub; SUNG, Won Kee; LEE, Jinkee. Flexible time–temperature indicator: a versatile platform for laminated paper-based analytical devices. **Microfluidics and Nanofluidics**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 57, 2017. DOI: 10.1007/s10404-017-1883-x.

JAHN, Andreas; REINER, Joseph E.; VREELAND, Wyatt N.; DEVOE, Don L.; LOCASCIO, Laurie E.; GAITAN, Michael. Preparation of nanoparticles by continuous-flow microfluidics. **Journal of Nanoparticle Research**, [S. l.], v. 10, p. 925–934, 2008. DOI: 10.1007/s11051-007-9340-5.

JAHN, Andreas; STAVIS, Samuel M.; HONG, Jennifer S.; VREELAND, Wyatt N.; DEVOE, Don L.; GAITAN, Michael. Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. **ACS Nano**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 2077–2087, 2010. DOI: 10.1021/nn901676x.

JAHN, Andreas; VREELAND, Wyatt N.; DEVOE, Don L.; LOCASCIO, Laurie E.; GAITAN, Michael. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. **Langmuir**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 6289–6293, 2007. DOI: 10.1021/la070051a.

JAHN, Andreas; VREELAND, Wyatt N.; GAITAN, Michael; LOCASCIO, Laurie E. Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 126, n. 9, p. 2674–2675, 2004. DOI: 10.1021/ja0318030.

JAY BRETT, Genevieve; PRATT, Larry; RYPINA, Irina; WANG, Peng. Competition between chaotic advection and diffusion: Stirring and mixing in a 3-D eddy model. **Nonlinear Processes in Geophysics**, [S. l.], v. 26, p. 37–60, 2019. DOI: 10.5194/npg-26-37-2019.

JAYARAMAN, Muthusamy et al. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo. **Angewandte Chemie - International Edition**, [S. l.], v. 51, n. 34, 2012. DOI: 10.1002/anie.201203263.

JEN, Chun Ping; WU, Chung Yi; LIN, Yu Cheng; WU, Ching Yi. Design and simulation of the micromixer with chaotic advection in twisted microchannels. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 77–81, 2003. DOI: 10.1039/b211091a.

JEONG, Heon Ho; ISSADORE, David; LEE, Daeyeon. Recent developments in scale-up of microfluidic emulsion generation via parallelization. **Korean Journal of Chemical Engineering**, [S. l.], v. 33, n. 6, p. 1757–1766, 2016. DOI: 10.1007/s11814-016-0041-6.

JEONG, Ji Hoon; KIM, Sung Wan; PARK, Tae Gwan. Molecular design of functional polymers for gene therapy. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 1239–1274, 2007. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.019.

JOSEFSBERG, Jessica O.; BUCKLAND, Barry. Vaccine process technology. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 109, n. 6, p. 1443–1460, 2012. DOI: 10.1002/bit.24493.

JOSHI, Sameer; HUSSAIN, Maryam T.; ROCES, Carla B.; ANDERLUZZI, Giulia; KASTNER, Elisabeth; SALMASO, Stefano; KIRBY, Daniel J.; PERRIE, Yvonne. Microfluidics based manufacture of liposomes simultaneously entrapping hydrophilic and lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 514, p. 160–168, 2016. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.09.027.

JÚNIOR, João Lameu da Silva. An Introduction to Computational Fluid Dynamics and Its Application in Microfluidics. [S. l.], p. 50–78, 2019. DOI: 10.4018/978-1-5225-7138-4.ch002.

KASTNER, Elisabeth; VERMA, Varun; LOWRY, Deborah; PERRIE, Yvonne. Microfluidic-controlled manufacture of liposomes for the solubilisation of a poorly water soluble drug. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 485, n. 1–2, p. 122–130, 2015. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.063.

KEDMI, Ranit et al. A modular platform for targeted RNAi therapeutics. **Nature Nanotechnology**, [S. l.], v. 13, p. 214–219, 2018. DOI: 10.1038/s41565-017-0043-5.

KIM, Ho Jun. **Quantification of Chaotic Mixing in Microfluidic Systems**. 2004. Texas A&M University, [S. l.], 2004.

KIMURA, Niko; MAEKI, Masatoshi; SATO, Yusuke; ISHIDA, Akihiko; TANI, Hirofumi; HARASHIMA, Hideyoshi; TOKESHI, Manabu. Development of a Microfluidic-Based Post-Treatment Process for Size-Controlled Lipid Nanoparticles and Application to siRNA Delivery. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S. l.], v. 12, p. 34011–34020, 2020. DOI: 10.1021/acsami.0c05489.

KIMURA, Niko; MAEKI, Masatoshi; SATO, Yusuke; NOTE, Yusuke; ISHIDA, Akihiko; TANI, Hirofumi; HARASHIMA, Hideyoshi; TOKESHI, Manabu. Development of the iLiNP Device: Fine Tuning the Lipid Nanoparticle Size within 10 nm for Drug Delivery. **ACS Omega**, [S. l.], v. 3, p. 5044–5051, 2018. DOI: 10.1021/acsomega.8b00341.

KONG, Tiantian; SHUM, Ho Cheung; WEITZ, David A. The Fourth Decade of Microfluidics. **Small**, [S. l.], v. 16, n. 9, p. 2–3, 2020. DOI: 10.1002/smll.202000070.

KOVARIK, Michelle L.; ORNOFF, Douglas M.; MELVIN, Adam T.; DOBES, Nicholas C.; WANG, Yuli; DICKINSON, Alexandra J.; GACH, Philip C.; SHAH, Pavak K.; ALLBRITTON, Nancy L. Micro total analysis systems: Fundamental advances and applications in the laboratory, clinic, and field. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 451–472, 2013. DOI: 10.1021/ac3031543.

KULKARNI, Jayesh A.; DARJUAN, Maria M.; MERCER, Joanne E.; CHEN, Sam; VAN DER MEEL, Roy; THEWALT, Jenifer L.; TAM, Yuen Yi C.; CULLIS, Pieter R. On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. **ACS Nano**, [S. l.], v. 12, p. 4787–4795, 2018. DOI: 10.1021/acsnano.8b01516.

KULKARNI, Jayesh A.; MYHRE, Johnathan Layne; CHEN, Sam; TAM, Yuen Yi C.; DANESCU, Adrian; RICHMAN, Joy M.; CULLIS, Pieter R. Design of lipid nanoparticles for in vitro and in vivo delivery of plasmid DNA. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [S. l.], v. 13, p. 1377–1387, 2017.

KULKARNI, Jayesh A.; WITZIGMANN, Dominik; CHEN, Sam; CULLIS, Pieter R.; VAN DER MEEL, Roy. Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00368.

LECHANTEUR, Anna; FURST, Tania; EVRARD, Brigitte; DELVENNE, Philippe; HUBERT, Pascale; PIEL, Géraldine. PEGylation of lipoplexes: The right balance between cytotoxicity and siRNA effectiveness. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 93, p. 493–503, 2016. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.08.058. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098716303487>.

LEUNG, Alex K. K. et al. Lipid nanoparticles containing siRNA synthesized by microfluidic mixing exhibit an electron-dense nanostructured core. **Journal of Physical Chemistry C**, [S. l.], v. 116, p. 18440–18450, 2012. DOI: 10.1021/jp303267y.

LI, Hao; OLSEN, Michael G. Aspect ratio effects on turbulent and transitional flow in rectangular microchannel as measured with microPIV. **Journal of Fluids Engineering, Transactions of the ASME**, [S. l.], v. 128, p. 305–315, 2006.

LI, Weijun; SZOKA, Francis C. Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 438–449, 2007. DOI: 10.1007/s11095-006-9180-5.

LI, Xuan; AGHAAMOO, Mohammad; LIU, Shiyue; LEE, Do Hyun; LEE, Abraham P. Lipoplex-Mediated Single-Cell Transfection via Droplet Microfluidics. **Small**, [S. l.], v. 14, n. 40, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1002/smll.201802055.

LIU, Feng; SHOLLENBERGER, Lisa M.; CONWELL, Christine C.; YUAN, Xing; HUANG, Leaf. Mechanism of naked DNA clearance after intravenous injection. **The Journal of Gene Medicine**, [S. l.], v. 9, p. 613–619, 2007.

LOU, Gustavo et al. Delivery of self-amplifying mRNA vaccines by cationic lipid nanoparticles: The impact of cationic lipid selection. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 325, p. 370–379, 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.027>.

LU, Mengqian; OZCELIK, Adem; GRIGSBY, Christopher L.; ZHAO, Yanhui; GUO, Feng; LEONG, Kam W.; HUANG, Tony Jun. Microfluidic hydrodynamic focusing for synthesis of nanomaterials. **Nano Today**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 778–792, 2016. DOI: 10.1016/j.nantod.2016.10.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2016.10.006>.

MA, Baichao; ZHANG, Shubiao; JIANG, Huiming; ZHAO, Budiao; LV, Hongtao. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 123, n. 3, p. 184–194, 2007. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.08.022.

MA, Cui Cui; WANG, Zhen Ling; XU, Ting; HE, Zhi Yao; WEI, Yu Quan. The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 40, 2020.

MAEKI, Masatoshi; KIMURA, Niko; SATO, Yusuke; HARASHIMA, Hideyoshi; TOKESHI, Manabu. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 128, p. 84–100, 2018. DOI: 10.1016/j.addr.2018.03.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.008>.

MAEKI, Masatoshi; SAITO, Tatsuyoshi; SATO, Yusuke; YASUI, Takao; KAJI, De Noritada. A strategy for synthesis of lipid nanoparticles using micro fluidic devices with a mixer structure. **RSC Advances**, [S. l.], v. 5, p. 46181–46185, 2015. DOI: 10.1039/C5RA04690D. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA04690D>.

MAQBOOL, Faheem; MOYLE, Peter M.; THURECHT, Kristofer J.; FALCONER, James R. Dispersibility of phospholipids and their optimization for the efficient production of liposomes using supercritical fluid technology. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 563, n. February, p. 174–183, 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.053. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.053>.

MARTINEZ, Andres W.; PHILLIPS, Scott T.; BUTTE, Manish J.; WHITESIDES, George M. Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low-Volume, Portable Bioassays. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007. DOI: 10.1002/anie.200603817.

MARTINEZ, Diego Stéfani Teodoro; ALVES, Oswaldo Luiz. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Ciência e Cultura**, [S. l.], v. 65, n. 3, p. 32–36, 2013.

MARTINS, Susana; SARMENTO, Bruno; FERREIRA, Domingos C.; SOUTO, Eliana B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery - liposomes versus lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], p. 595–607, 2007.

MCKAY, Paul F. et al. Self-amplifying RNA SARS-CoV-2 lipid nanoparticle vaccine candidate induces high neutralizing antibody titers in mice. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 3–9, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-17409-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17409-9>.

MICHELON, Mariano; OLIVEIRA, Davi Rocha Bernardes; DE FIGUEIREDO FURTADO, Guilherme; GAZIOLA DE LA TORRE, Lucimara; CUNHA, Rosiane Lopes. High-throughput continuous production of liposomes using hydrodynamic flow-focusing microfluidic devices. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 156, p. 349–357, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.033.

MILOSEVIC, Ana; ROMEO, Daina; WICK, Peter. Understanding Nanomaterial Biotransformation: An Unmet Challenge to Achieving Predictive Nanotoxicology. **Small**, [S. l.], v. 16, 2020. DOI: 10.1002/smll.201907650.

MISHRA, Vijay; BANSAL, Kuldeep K.; VERMA, Asit; YADAV, Nishika; THAKUR, Sourav;

SUDHAKAR, Kalvatala; ROSENHOLM, Jessica M. Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 1–21, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10040191.

MOUKALLED, F.; MANGANI, L.; DARWISH, M. **The Finite Volume Method in Computational Fluid Dynamics**. [s.l.] : Springer, 2016. v. 113 Disponível em: <http://www.springer.com/series/5980>.

MUCKER, Eric M. et al. Lipid Nanoparticle Formulation Increases Efficiency of DNA-Vectored Vaccines/Immunoprophylaxis in Animals Including Transchromosomal Bovines. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-65059-0.

MULLIGAN, Molly K.; ROTHSTEIN, Jonathan P. Scale-up and control of droplet production in coupled microfluidic flow-focusing geometries. **Microfluidics and Nanofluidics**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 65–73, 2012. DOI: 10.1007/s10404-012-0941-7.

NAGARAJAN, R. Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. **Langmuir**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 31–38, 2002. DOI: 10.1021/la010831y. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la010831y>.

NIKCEVIC, Gordana; KOVACEVIC-GRUJICIC, Natasa; STEVANOVIC, Milena. Improved transfection efficiency of cultured human cells. **Cell Biology International**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 735–737, 2003. DOI: 10.1016/S1065-6995(03)00143-4.

NOGUEIRA, Sara S. et al. Polysarcosine-Functionalized Lipid Nanoparticles for Therapeutic mRNA Delivery. **ACS Applied Nano Materials**, [S. l.], v. 3, p. 10634–10645, 2020. DOI: 10.1021/acsanm.0c01834.

NORTHFELT, D. W.; MARTIN, F. J.; WORKING, P.; VOLBERDING, P. A.; RUSSELL, J.; NEWMAN, M.; AMANTEA, M. A.; KAPLAN, L. D. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. **J Clin Pharmacol.**, [S. l.], v. 36, p. 55–63, 1996.

OLESEN, Laurits; BRUUS, Henrik. **Computational Fluid Dynamics in microfluidic systems**. [s.l.: s.n.].

OLIVEIRA, Aline F.; PESSOA, Amanda C. S. N.; BASTOS, Reinaldo G.; DE LA TORRE, Lucimara G. Microfluidic tools toward industrial biotechnology. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 32, p. 1372–1389, 2016. DOI: 10.1002/btpr.2350.

PACK, Daniel W.; HOFFMAN, Allan S.; PUN, Suzie; STAYTON, Patrick S. Design and development of polymers for gene delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 4, 2005.

PARK, J. W.; KIRPOTIN, D. B.; HONG, K.; SHALABY, R.; SHAO, Y.; NIELSEN, U. B.; MARKS, J. D.; PAPAHDJOPOULOS, D.; BENZ, C. C. Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 74, p. 95–113, 2001.

PATEL, Siddharth; RYALS, Renee C.; WELLER, Kyle K.; PENNESI, Mark E.; SAHAY, Gaurav. Lipid nanoparticles for delivery of messenger RNA to the back of the eye. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 303, n. April, p. 91–100, 2019. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.04.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.015>.

PATIL, Yogita P.; JADHAV, Sameer. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, [S. l.], v. 177, p. 8–18, 2014. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011.

PATTNI, Bhushan S.; CHUPIN, Vladimir V.; TORCHILIN, Vladimir P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 115, p. 10938–10966, 2015. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00046.

PERLI, Gabriel; PESSOA, Amanda C. S. N.; BALBINO, Tiago A.; DE LA TORRE, Lucimara G. Ionic strength for tailoring the synthesis of monomodal stealth cationic liposomes in microfluidic devices. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 179, n. November 2018, p. 233–241, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.056.

PESSOA, Amanda C. S. N.; SIPOLI, Caroline C.; DE LA TORRE, Lucimara G. Effects of diffusion and

mixing pattern on microfluidic-assisted synthesis of chitosan/ATP nanoparticles. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 17, n. 13, p. 2281–2293, 2017. DOI: 10.1039/c7lc00291b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C7LC00291B>.

PUSHKO, Peter; PARKER, Michael; LUDWIG, George V.; DAVIS, Nancy L.; JOHNSTON, Robert E.; SMITH, Jonathan F. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: Expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. **Virology**, [S. l.], v. 239, p. 389–401, 1997.

QIU, Tian A.; CLEMENT, Peter L.; HAYNES, Christy L. Linking nanomaterial properties to biological outcomes: analytical chemistry challenges in nanotoxicology for the next decade. **Chemical Communications**, [S. l.], v. 54, p. 12787–12803, 2018. DOI: 10.1039/c8cc06473c.

QUAGLIARINI, Erica et al. Microfluidic Formulation of DNA-Loaded Multicomponent Lipid Nanoparticles for Gene Delivery. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, p. 1292, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13081292.

QUENTAL, Cristiane; FILHO, Sérgio Salles. Ensaios clínicos : capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. [S. l.], v. 9, n. 4, p. 408–424, 2006.

REGALADO, Antonio. **What are the ingredients of Pfizer's covid-19 vaccine?** 2020. Disponível em: <https://www.technologyreview.com/2020/12/09/1013538/what-are-the-ingredients-of-pfizers-covid-19-vaccine>. Acesso em: 12 mar. 2021.

RILEY, Rachel S. et al. Ionizable lipid nanoparticles for in utero mRNA delivery. **Science Advances**, [S. l.], v. 7, p. eaba1028, 2021.

ROCES, Carla B.; LOU, Gustavo; JAIN, Nikita; ABRAHAM, Suraj; THOMAS, Anitha; HALBERT, Gavin W.; PERRIE, Yvonne. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, p. 1095, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12111095.

RODRÍGUEZ-GASCÓN, Alicia; DEL POZO-RODRÍGUEZ, Ana; SOLINÍS, María Ángeles. Development of nucleic acid vaccines: Use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1833–1843, 2014. DOI: 10.2147/IJN.S39810.

ROMANOWSKY, Mark B.; ABATE, Adam R.; ROTEM, Assaf; HOLTZE, Christian; WEITZ, David A. High throughput production of single core double emulsions in a parallelized microfluidic device. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 802–807, 2012. DOI: 10.1039/c2lc21033a.

RUDYAK, Valery Ya; KRASNOLUTSKII, Sergey L.; IVANOV, Denis A. Molecular dynamics simulation of nanoparticle diffusion in dense fluids. **Microfluidics and Nanofluidics**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 501–506, 2011. DOI: 10.1007/s10404-011-0815-4.

SAFINYA, Cyrus R.; EWERT, Kai K.; MAJZOUB, Ramsey N.; LEAL, Cecília. Cationic liposome-nucleic acid complexes for gene delivery and gene silencing. **New Journal of Chemistry**, [S. l.], 2014. DOI: 10.1039/c4nj01314j.

SAHIN, Ugur; KARIKÓ, Katalin; TÜRECI, Özlem. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 13, p. 759–780, 2014. DOI: 10.1038/nrd4278.

SAMARIDOU, Eleni; HEYES, James; LUTWYCHE, Peter. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 154, p. 37–63, 2020. DOI: 10.1016/j.addr.2020.06.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.002>.

SANTANA, Harrison S.; DA SILVA, Adriano G. P.; LOPES, Mariana G. M.; RODRIGUES, Alan C.; TARANTO, Osvaldir P.; LAMEU SILVA, João. Computational methodology for the development of microdevices and microreactors with ANSYS CFX. **MethodsX**, [S. l.], v. 7, p. 82–103, 2020. DOI: 10.1016/j.mex.2019.12.006.

SANTANA, Harrison S.; SILVA, João L.; TARANTO, Osvaldir P. Optimization of micromixer with triangular baffles for chemical process in millidevices. **Sensors and Actuators B: Chemical**, [S. l.], v. 281, n.

April 2018, p. 191–203, 2019. DOI: 10.1016/j.snb.2018.10.089. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.089>.

SCHUSTER, Benjamin S.; ENSIGN, Laura M.; ALLAN, Daniel B.; SUK, Jung Soo; HANES, Justin. Particle tracking in drug and gene delivery research: State-of-the-art applications and methods. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 91, p. 70–91, 2015. DOI: 10.1016/j.addr.2015.03.017.

SEMPLE, Sean C. et al. Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: Formation of novel small multilamellar vesicle structures. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [S. l.], v. 1510, n. 1–2, p. 152–166, 2001. DOI: 10.1016/S0005-2736(00)00343-6.

SEMPLE, Sean C. et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 172–176, 2010. DOI: 10.1038/nbt.1602. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1602>.

SHAH, Rohan; ELDRIDGE, Daniel; PALOMBO, Enzo; HARDING, Ian. **Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability**. Melbourne: Springer, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-10711-0.

SHARP, Kendra V.; ADRIAN, Ronald J.; SANTIAGO, Juan G.; MOLHO, Joshua I. Liquid Flows in Microchannels. **Micromachines**, [S. l.], 2002.

SHEPHERD, Sarah J. et al. Scalable mRNA and siRNA Lipid Nanoparticle Production Using a Parallelized Microfluidic Device. **Nano Letters**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1021/acs.nanolett.1c01353.

SHEPHERD, Sarah J.; ISSADORE, David; MITCHELL, Michael J. Microfluidic formulation of nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, [S. l.], v. 274, n. 120826, p. 120826, 2021. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.120826.

SHILTON, Richie J.; YEO, Leslie Y.; FRIEND, James R. Quantification of surface acoustic wave induced chaotic mixing-flows in microfluidic wells. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 1565–1572, 2011. DOI: 10.1016/j.snb.2011.09.007.

SHIN, Matthew D. et al. COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. **Nature Nanotechnology**, [S. l.], v. 15, p. 646–655, 2020.

SHOKRI, Mahshid; TAVALLAIE, Mohmood; HOSSEINI, Seyed Mostafa. a Comparison of Unilamellar and Multilamellar Lipoplexes in Terms of Transfection Efficiency of Human Embryonic Kidney Cells. **Journal of Nanotechnology and Materials Science**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 1–4, 2016. DOI: 10.15436/2377-1372.16.1140.

SIPOLI, Caroline Casagrande; SANTANA, Nathalia; SHIMOJO, Andrea Arruda Martins; AZZONI, Adriano; DE LA TORRE, Lucimara Gaziola. Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 94, p. 65–73, 2015. DOI: 10.1016/j.bej.2014.11.008.

SONG, Helen; BRINGER, Michelle R.; TICE, Joshua D.; GERDTS, Cory J.; ISMAGILOV, Rustem F. Experimental test of scaling of mixing by chaotic advection in droplets moving through microfluidic channels. **Applied Physics Letters**, [S. l.], v. 83, n. 22, p. 4664–4666, 2003. DOI: 10.1063/1.1630378.

SPAIN, S. G.; YAŞAYAN, G.; SOLIMAN, M.; HEATH, F.; SAEED, A. O.; ALEXANDER, C. Nanoparticles for nucleic acid delivery. **Comprehensive Biomaterials**, [S. l.], v. 4, p. 389–410, 2011.

SQUIRES, Todd M.; QUAKE, Stephen R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. [S. l.], v. 77, 2005.

STREMLER, Mark A.; HASELTON, F. R.; AREF, Hassan. Designing for chaos: Applications of chaotic advection at the microscale. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [S. l.], v. 362, n. 1818, p. 1019–1036, 2004. DOI: 10.1098/rsta.2003.1360.

STROOCK, Abraham D.; DERTINGER, Stephan K. W.; AJDARI, Armand; MEZIĆ, Igor; STONE, Howard A.; WHITESIDES, George M. Chaotic mixer for microchannels. **Science**, [S. l.], v. 295, p. 647–651, 2002. DOI: 10.1126/science.1066238.

TETRADIS-MERIS, Georgios; ROSSETTI, Damiano; DE TORRES, Concepción Pulido; CAO, Rong; LIAN, Guoping; JANES, Ruth. Novel parallel integration of microfluidic device network for emulsion formation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [S. l.], v. 48, n. 19, p. 8881–8889, 2009. DOI: 10.1021/ie900165b.

TORCHILIN, Vladimir P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 145–160, 2005. DOI: 10.1038/nrd1632.

TORCHILIN, Vladimir P.; LEVCHENKO, Tatyana S.; RAMMOHAN, Ram; VOLODINA, Natalia; PAPAHAJDOPOULOS-STERNBERG, Brigitte; D'SOUZA, Gerard G. M. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 100, n. 4, p. 1972–1977, 2003. DOI: 10.1073/pnas.0435906100.

TÓTH, Eszter L.; HOLCZER, Eszter G.; IVÁN, Kristóf; FÜRJES, Péter. Optimized simulation and validation of particle advection in asymmetric staggered herringbone type micromixers. **Micromachines**, [S. l.], v. 6, p. 136–150, 2015. DOI: 10.3390/mi6010136.

TRIPATHI, Ekta; PATOWARI, Promod Kumar; PATI, Sukumar. Numerical investigation of mixing performance in spiral micromixers based on Dean flows and chaotic advection. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [S. l.], v. 169, n. July, p. 108609, 2021. DOI: 10.1016/j.cep.2021.108609.

ULMER, Jeffrey B.; MANSOURA, Monique K.; GEALL, Andrew J. Vaccines “on demand”: Science fiction or a future reality. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 101–106, 2015. DOI: 10.1517/17460441.2015.996128.

USHIKUBO, F. Y.; OLIVEIRA, D. R. B.; MICHELON, M.; CUNHA, R. L. Designing Food Structure Using Microfluidics. **Food Engineering Reviews**, [S. l.], v. 7, p. 393–416, 2015. DOI: 10.1007/s12393-014-9100-0.

VATANKHAH, Parham; SHAMLOO, Amir. Parametric study on mixing process in an in-plane spiral micromixer utilizing chaotic advection. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1022, p. 96–105, 2018. DOI: 10.1016/j.aca.2018.03.039.

VEIGA, Nuphar; GOLDSMITH, Meir; GRANOT, Yasmin; ROSENBLUM, Daniel; DAMMES, Niels; KEDMI, Ranit; RAMISHETTI, Srinivas; PEER, Dan. Cell specific delivery of modified mRNA expressing therapeutic proteins to leukocytes. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-06936-1.

VERBEKE, Rein; LENTACKER, Ine; DE SMEDT, Stefaan C.; DEWITTE, Heleen. Three decades of messenger RNA vaccine development. **Nano Today**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1016/j.nantod.2019.100766.

VERMA, Inder M.; NALDINI, L.; KAFRI, T.; MIYOSHI, H.; TAKAHASHI, M.; BLOMER, U.; SOMIA, Nikunj. Gene therapy - Promises, problems and prospects. **Genes and Resistance to Disease**, [S. l.], v. 389, p. 147–157, 2000.

VERMA, Mohan K. S.; GANNEBOYINA, Sambasiva Rao; VINAYAK RAKSHITH, R.; GHATAK, Animangsu. Three-dimensional multihelical microfluidic mixers for rapid mixing of liquids. **Langmuir**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 2248–2251, 2008. DOI: 10.1021/la702895w.

VHORA, Imran; LALANI, Rohan; BHATT, Priyanka; PATIL, Sushilkumar; PATEL, Hinal; PATEL, Vivek; MISRA, Ambikanandan. Colloidally Stable Small Unilamellar Stearyl Amine Lipoplexes for Effective BMP-9 Gene Delivery to Stem Cells for Osteogenic Differentiation. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 3550–3560, 2018. DOI: 10.1208/s12249-018-1161-6.

VON GROLL, Andrea. **Lipídios catiônicos anfífilos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfecção in vitro de células eucarióticas**. 2003. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. l.], 2003.

WANG, G. R.; YANG, Fang; ZHAO, Wei. There can be turbulence in microfluidics at low Reynolds number. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 14, p. 1452–1458, 2014. DOI: 10.1039/c3lc51403j.

WANG, Lilin; YANG, Jing Tang; LYU, Ping Chiang. An overlapping crisscross micromixer. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 711–720, 2007. DOI: 10.1016/j.ces.2006.09.048.

WANG, Shu; SU, Rui; NIE, Shufang; SUN, Ming; ZHANG, Jia; WU, Dayong; MOUSTAID-MOUSSA, Naima. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 25, p. 363–376, 2014. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.10.002.

WAREY, Alok; HAN, Taeyoung; KAUSHIK, Shailendra. Investigation of Numerical Diffusion in Aerodynamic Flow Simulations with Physics Informed Neural Networks. **Cornell University**, [S. l.], p. 1–9, 2021.

WARKIANI, Majid Ebrahimi; WU, Lidan; TAY, Andy Kah Ping; HAN, Jongyoon. Large-Volume Microfluidic Cell Sorting for Biomedical Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–34, 2015. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071114-040818. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-bioeng-071114-040818>.

WEBB, Cameron et al. Using microfluidics for scalable manufacturing of nanomedicines from bench to GMP: A case study using protein-loaded liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 582, n. 119266, p. 119266, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119266.

WHITESIDES, George M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, [S. l.], v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006. DOI: 10.1038/nature05058.

XIA, H. M.; SEAH, Y. P.; LIU, Y. C.; WANG, W.; TOH, Alicia G. G.; WANG, Z. P. Anti-solvent precipitation of solid lipid nanoparticles using a microfluidic oscillator mixer. **Microfluidics and Nanofluidics**, [S. l.], v. 19, p. 283–290, 2015. DOI: 10.1007/s10404-014-1517-5.

XIA, H. M.; WAN, S. Y. M.; SHU, C.; CHEW, Y. T. Chaotic micromixers using two-layer crossing channels to exhibit fast mixing at low Reynolds numbers. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 5, n. 7, p. 748–755, 2005. DOI: 10.1039/b502031j.

YANG, Fangyuan; WU, Wei; CHEN, Shunli; GAN, Wei. The ionic strength dependent zeta potential at the surface of hexadecane droplets in water and the corresponding interfacial adsorption of surfactants. **The Royal Society of Chemistry**, [S. l.], v. 13, p. 638–646, 2017.

YIN, Hao; KANASTY, Rosemary L.; ELTOUKHY, Ahmed A.; VEGAS, Arturo J.; DORKIN, J. Robert; ANDERSON, Daniel G. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 541–555, 2014. DOI: 10.1038/nrg3763.

YOU, Jae Bem; KANG, Kyowon; TRAN, Thanh Tinh; PARK, Hongkeun; HWANG, Wook Ryol; KIM, Ju Min; IM, Sung Gap. PDMS-based turbulent microfluidic mixer. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 15, p. 1727–1735, 2015. DOI: 10.1039/c5lc00070j.

ZALIPSKY, Samuel. Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 16, p. 157–182, 1995. DOI: 10.1016/0169-409X(95)00023-Z.

ZHANG, Jisong; WANG, Kai; TEIXEIRA, Andrew R.; JENSEN, Klavs F.; LUO, Guangsheng. Design and scaling up of microchemical systems: A review. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, [S. l.], v. 8, 2017. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-060816-101443.

ZHIGALTSEV, Igor V.; BELLIVEAU, Nathan; HAFEZ, Ismail; LEUNG, Alex K. K.; HUFT, Jens; HANSEN, Carl; CULLIS, Pieter R. Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing. **Langmuir**, [S. l.], v. 28, p. 3633–3640, 2012. DOI: 10.1021/la204833h.

ZIZZARI, Alessandra; BIANCO, Monica; CARBONE, Luigi; PERRONE, Elisabetta; AMATO, Francesco; MARUCCIO, Giuseppe; RENDINA, Filippo; ARIMA, Valentina. Continuous-flow production of injectable liposomes via a microfluidic approach. **Materials**, [S. l.], v. 10, p. 1–13, 2017. DOI: 10.3390/ma10121411.

ZOOK, Justin M.; VREELAND, Wyatt N. Effects of temperature, acyl chain length, and flow-rate ratio on liposome formation and size in a microfluidic hydrodynamic focusing device. **Soft Matter**, [S. l.], v. 6, p. 1352–1360, 2010. DOI: 10.1039/b923299k.