



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANDRÉ LEANDRO SILVA**

***Produção e avaliação de nanoemulsão catiônica como possível vetor não-viral  
para pIRES2-EGFP***

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ERYVALDO SÓCRATES TABOSA DO EGITO  
COORIENTADORA: Prof. Dra. LOURENA MAFRA VERÍSSIMO**

**NATAL  
2013**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
LABORATÓRIO DE SISTEMAS DISPERSOS - LASID**

***Produção e avaliação de nanoemulsão catiônica como possível vetor não-viral  
para pIRES2-EGFP***

**ANDRÉ LEANDRO SILVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração:

Bioanálises e Medicamentos

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ERYVALDO SÓCRATES TABOSA DO EGITO  
COORIENTADORA: Prof. Dra. LOURENA MAFRA VERÍSSIMO**

**NATAL  
2013**

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

S586p

Silva, André Leandro.

Produção e avaliação de nanoemulsão catiônica como possível vetor não-viral para pIRES2-EGFP / André Leandro Silva. – Natal, 2013.

93f.

Orientador: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lourena Mafra Veríssimo.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Terapia gênica – Dissertação. 2. Nanoemulsão catiônica – Dissertação. 3. Carreador não-viral – Dissertação. 4. Terapia gênica – Dissertação. I. Egito, Eryvaldo Sócrates Tabosa do. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 575.113(043.3)

**ANDRÉ LEANDRO SILVA**

***Produção e avaliação de nanoemulsão catiônica como possível vetor não-viral  
para pIRES2-EGFP***

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito  
Presidente da Banca**

---

**Prof. Dra. Nereide Stela dos Santos Magalhães  
Examinador Externo**

---

**Dra. Tírzah Braz Petta Lajus  
Avaliador Interno**

**NATAL – RN  
2013**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo Dom da vida, por conceder-me saúde para trabalhar e desejar o saber, com mais intensidade a cada dia.

Ao meu orientador, Prof. Sócrates Egito, pela confiança, amizade e exemplo de profissionalismo e caráter.

À minha coorientadora, Prof. Lourena Mafra, por me ter acolhido ainda na iniciação científica, ter me ensinado os primeiros passos e me acompanhado na caminhada.

À Prof. Katty Gyselle, por me apresentar à ciência e mostrar que o 'céu é o limite', pela confiança em mim depositada e pela amizade sempre sincera e constante, muito obrigado!

À Prof. Lucymara Fassarela, por abrir as portas de seu laboratório em colaboração a este projeto de pesquisa.

Ao NUPEG, por gentilmente nos permitir o uso do equipamento ZetaPlus.

À UFRN e ao PPgCF pelos ensinamentos e à Capes pelo auxílio financeiro.

Aos meus colegas do Laboratório de Sistemas Dispersos: Alexandrino, Cybelle, Alélia, Bartô, Christian Assunção e Christian Melo, Tereza, Lucas, Ítalo, Kátia, Itamar, Thales, Rafael, Érica, Scheyla, Miguel, Laura, Izabel, Walteçá, Rosilene, Luíza, Andrezza, Éverton, Júnior e Nednaldo, por todos os momentos compartilhados nos últimos anos. Em especial, agradeço aos meus colegas do PPgCF, Juliana Fernandes, Henrique Marcelino e Monique Salgado, com os quais tive o prazer de estar mais próximo nestes últimos dois anos.

Aos meus colegas do LBMG: Angélica, Thayse, Acarízia, Ana Rafaela, Fábio Duarte, Leonam, Ana Helena, Jana Dara, Amanda Medeiros, Tirzah, Abí e Gysele pela atenção e ajuda nos assuntos de biomol.

Aos meus amigos Angélica, Iury, Cláudia, Tamyres, Karol, Simone e George, pela alegria de viver.

À minha família, nas pessoas de Teresinha Lins (mãe), Adriana e Adriele Lins (irmãs) por serem minha base, refúgio e apoio. Não teria o menor sentido, senão por vocês.

Muito Obrigado!

## RESUMO

A terapia gênica consiste na transferência de material genético exógeno para células ou tecidos no intuito de corrigir, suplementar ou silenciar um determinado gene. Para que este objetivo seja alcançado, eficientes veículos carreadores devem ser desenvolvidos: virais ou não-virais. O objetivo deste trabalho foi produzir e avaliar um sistema nanoemulsionado como possível veículo não-viral para terapia gênica, capaz de veicular um modelo plasmidial (pIRES2-EGFP). A nanoemulsão foi produzida pelo método de sonicação, após ser escolhida em um digrama de fases pseudo-ternário. A formulação é constituída de 5 % de Captex 355<sup>®</sup>, 1,2 % de Tween 80<sup>®</sup>, 0,8 % de Span 80<sup>®</sup>, 0,16 % de estearilamina e água (qsp 100 %). O sistema foi caracterizado quanto ao tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PI), potencial zeta, pH e condutividade. Os resultados mostraram gotículas menores que 200 nm (PI < 0,2) e potencial zeta > 30 mV em uma formulação de pH próximo a 7,0 e condutividade compatível a formulações de óleo em água (70 – 90  $\mu$ S/s). A possibilidade de escalonamento, a estabilidade do sistema e a melhor forma de esterilização também foram avaliadas onde observou-se que o sistema pode ser escalonado adequando o volume produzido ao tempo de sonicação e a forma mais eficiente de esterilização foi a filtração em membrana. O sistema apresentou estabilidade maior que 180 dias quando armazenado a 4 °C. Uma vez desenvolvido, o sistema foi testado quanto à capacidade de compactar o modelo plasmidial (pDNA). Eletroforese em gel de agarose foi a metodologia empregada para este fim, onde verificou-se que o poder de compactação aumenta (de 46 para 115 ng/ $\mu$ L) quando a estearilamina é incorporada na fase aquosa, respeitando um período de contato (nanoemulsão/pDNA) de pelo menos 2 horas, em banho de gelo. A nanoemulsão mostrou-se pouco tóxica nas concentrações usuais para ensaios de transfecção em células do tipo MRC-5, apresentando 81,49 % de viabilidade celular. Portanto, o processo de produção de um sistema que complexa eficientemente o modelo plasmidial foi obtido. Contudo, estudos de eficiência de transfecção devem ser conduzidos para confirmar o sistema como um carreador não-viral de material genético.

**Palavras-Chave:** Terapia gênica; nanoemulsão catiônica; carreador não-viral.

## ABSTRACT

Gene therapy is based on the transfer of exogenous genetic material into cells or tissues in order to correct, supplement or silencing a particular gene. To achieve this goal, efficient vehicles, viral or non-viral, should be developed. The aim of this work was to produce and evaluate a nanoemulsion system as a possible carrier for no-viral gene therapy able to load a plasmid model (pIRES2-EGFP). The nanoemulsion was produced by the sonication method, after been choose in a pseudo-ternary phase diagram build with 5 % of Captex 355<sup>®</sup>, 1.2 % of Tween 80<sup>®</sup>, 0.8 % of Span 80<sup>®</sup>, 0.16% of stearylamine and water (to 100 %). Measurements of droplet size, polydispersity index (PI), zeta potential, pH and conductivity, were performed to characterize the system. Results showed droplets smaller than 200 nm (PI < 0.2) and zeta potential > 30 mV. The formulation pH was near to 7.0 and conductivity was that expected to oil in water systems (70 to 90  $\mu$ S/s) A scale up study, the stability of the system and the best sterilization method were also evaluated. We found that the system may be scaled up considering the time of sonication according to the volume produced, filtration was the best sterilization process and nanoemulsions were stable by 180 days at 4 °C. Once developed, the complexation efficiency of the plasmid (pDNA) by the system was tested by agarose gel electrophoresis retardation assay.. The complexation efficiency increases when stearylamine was incorporated into aqueous phase (from 46 to 115 ng/ $\mu$ L); regarding a contact period (nanoemulsion / pDNA) of at least 2 hours in an ice bath, for complete lipoplex formation. The nanoemulsion showed low toxicity in MRC-5 cells at the usual transfection concentration, 81.49 % of survival was found. So, it can be concluded that a nanoemulsion in which a plasmid model was loaded was achieved. However, further studies concerning transfection efficiency should be performed to confirm the system as non-viral gene carrier.

**Keywords:** Gene Therapy; Cationic Nanoemulsion; No-Viral Carriers

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema de produção de vetores virais: linearização do DNA viral e aplicação da tecnologia do DNA recombinante. ....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b>	Esquema simplificado de um vetor plasmidial. ....	<b>17</b>
<b>Figura 3</b>	Bandas eletroforéticas em gel de agarose de diferentes isoformas de um mesmo pDNA, com imagens de microscopia eletrônica referentes às bandas indicadas no gel; OC - Circular aberta (Open circle); L - Linear e SC - Superenovelado (Supercoiling). ....	<b>18</b>
<b>Figura 4</b>	Esquema da formação de lipoplexos entre DNA e uma emulsão catiônica e interação com a membrana celular, para o processo de transfecção. ....	<b>19</b>
<b>Figura 5</b>	Ilustração da formação termodinâmica das nanoemulsões. ....	<b>20</b>
<b>Figura 6</b>	Estrutura de um triglicerídeo de cadeia média, derivado do ácido cáprico. ....	<b>21</b>
<b>Figura 7</b>	Estrutura química dos principais lipídeos catiônicos relacionados à terapia gênica. ....	<b>22</b>
<b>Figura 8</b>	Estrutura química do Tween 80 <sup>®</sup> . ....	<b>23</b>
<b>Figura 9</b>	Estrutura química do Span 80 <sup>®</sup> . ....	<b>23</b>
<b>Figura 10</b>	Esquema representativo da formação do lipoplexo e tráfego intracelular. ....	<b>24</b>
<b>Figura 11</b>	Diagrama de fases pseudo-ternário composto de Captex 355 <sup>®</sup> , Span 80 <sup>®</sup> , Tween 80 <sup>®</sup> e água-ultra pura indicando as regiões EM, EMV, ME e SF. O ponto indicado pela seta no diagrama indica o ponto escolhido para formulação das	<b>32</b>

	nanoemulsões. ....	
<b>Figura 12</b>	Análise granulométrica dos sistemas armazenados a 4 °C, 25 °C e 40 °C no período de 180 dias. ....	<b>37</b>
<b>Figura 13</b>	Análise do potencial zeta de amostras armazenadas a 4 °C, 25 °C e 40 °C, num Período de 180 dias. ....	<b>38</b>
<b>Figura 14</b>	Curva de viabilidade celular para nanoemulsões frente à linhagem celular MRC5: porcentagem de células vivas em função da concentração molar de estearilamina no meio de cultura. ....	<b>40</b>
<b>Figura 15</b>	Perfil de compactação de pIRES2- EGFP por volumes crescentes de nanoemulsão FA – Cada poço contém 460 ng de pDNA. ....	<b>42</b>
<b>Figura 16</b>	Perfil de compactação de pIRES2- EGFP por volumes crescente de nanoemulsão FO – Cada poço contém 460 ng de pDNA. ....	<b>42</b>
<b>Figura 17</b>	Granulometria das formulações FA e FO e seus respectivos lipoplexos – Concentração de pDNA: FA 115ng/μL; FO 46ng/μL. ....	<b>43</b>
<b>Figura 18</b>	Potencial zeta das nanoemulsões FA e FO e respectivos lipoplexos. ....	<b>44</b>
<b>Figura 19</b>	Perfil da influência do tempo na complexação de pIRES2-EGFP por nanoemulsão catiônica contendo estearilamina. ....	<b>44</b>
<b>Figura 20</b>	Perfil eletroforético da influência da temperatura do meio de complexação na formação do lipoplexo de pIRES2 EGFP e nanoemulsão catiônica contendo estearilamina. ....	<b>45</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Diferentes tipos virais e suas capacidades para a terapia gênica ...	<b>16</b>
<b>Tabela 2</b>	Influência da diluição (nanoemulsão:água) no tamanho e Índice de Polidispersão (PI) das nanoemulsões. ....	<b>33</b>
<b>Tabela 3</b>	Caracterização das formulações escalonadas. ....	<b>34</b>
<b>Tabela 4</b>	Caracterização das formulações após teste de escalonamento com adequação do tempo de sonicação. ....	<b>35</b>
<b>Tabela 5</b>	Relação entre a viabilidade celular, dose letal, concentração de lipídio catiônico e o volume de nanoemulsão correspondentes .....	<b>40</b>
<b>Tabela 6</b>	Índice de Polidispersão para nanoemulsões com estearilamina incorporada à fase aquosa (FA) e à fase oleosa (FO) e respectivos lipoplexos. ....	<b>43</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

DL <sub>50</sub>	Dose Letal para 50%
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento Dinâmico de Luz)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
DFPT	Diagrama de Fases Pseudo-Ternário
EGFP	<i>Enhanced Green Florescent Protein</i>
EM	Emulsão
EMV	Emulsão Viscosa
FA	Nanoemulsão com Estearilamina incorporada à Fase Aquosa
FO	Nanoemulsão com Estearilamina incorporada à Fase Oleosa
ME	Microemulsão
MRC-5	<i>Normal Human Fetal Lung Fibroblast</i> (Fibroblasto de Pulmão Fetal)
O/A	Sistema emulsionado do tipo Óleo em Água
pDNA	<i>plasmid DNA</i> (DNA plasmidial)
TCM	Triglicerídeo de Cadeia Média
OD	<i>Optical Density</i> (Densidade óptica)
PEG	Poli etilenoglicol
SDS	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SFB	Soro Fetal Bovino
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i> (RNA de interferência)
TA	Temperatura ambiente

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>13</b>
	2.1 TERAPIA GÊNICA	13
	2.2 VETORES E VEÍCULOS EM TERAPIA GÊNICA	14
	2.2.1 Vetores Virais	15
	2.2.2 Vetores Sintéticos	16
	2.2.3 Sistemas Emulsionados como Carreadores Não-virais	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
	4.1 PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO	27
	4.2 DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNARIO	27
	4.3 PREPARAÇÃO DAS NANOEMULSÕES	28
	4.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE	28
	4.5 TESTE DE ESCALONAMENTO	28
	4.6 ESTERILIZAÇÃO DO SISTEMA	29
	4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE <i>in vitro</i>	29
	4.8 PREPARAÇÃO DO LIPOPLEXO	30
	4.9 AVALIAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	30
	4.10 ESTATÍSTICA	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>32</b>
	5.1 DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNÁRIO	32
	5.2 ESCALONAMENTO	34
	5.3 ESTERILIZAÇÃO	36
	5.4 ESTABILIDADE	37
	5.5 TOXICIDADE	39
	5.6 PREPARAÇÃO DO LIPOPLEXO	41
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>46</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	APÊNDICES	56
	ANEXO	92

## 1 INTRODUÇÃO

A terapia gênica baseia-se no tratamento de doenças pela inserção de uma sequência nucleotídica exógena dentro de uma célula (1-4). Entre as modalidades de terapia gênica, pode-se citar a modificação direta do gene causador da doença (caso das doenças hereditárias monogênicas), tratamento indireto da patologia através da modulação gênica (caso de doenças complexas/adquiridas/multifatoriais) ou ainda a utilização de vacinas de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) (proposta para cânceres e doenças infecciosas) (4-5). Contudo, para que isso seja possível, é necessário direcionar o material genético à célula, tecido ou órgão alvo por meio de carreadores especialmente desenvolvidos que facilitem a entrada do DNA em células vivas, a estes carreadores dá-se o nome de veículos (para vetores sintéticos) ou simplesmente vetores (virais) (4, 6-7).

Os vetores em terapia gênica permitem que fragmentos genéticos sejam inseridos neles, por clonagem, e propagados em uma célula hospedeira. Estes vetores são classificados em duas classes principais: virais e não-virais (3, 8). Os vetores virais são intensamente estudados, contudo, fatores como fortes reações imunológicas, dificuldades no preparo e purificação do sistema viral, além da limitação no tamanho do gene a transferir, têm estimulado o estudo e desenvolvimento de vetores não-virais (6, 9-10). Diversos são os tipos de veículos carreadores de vetores não-virais, dentre eles estão os sistemas nanoemulsionados, compostos geralmente por um núcleo oleoso disperso em água, e estabilizado por tensoativos. Tais sistemas possuem lipídeos catiônicos, que lhes dão carga positiva e permitem complexar o material genético, formando o lipoplexo (9, 11-13).

A formação do lipoplexo permite a condensação do DNA e conseqüente diminuição do volume aparente da molécula pela interação eletrostática da carga positiva do lipídeo catiônico com os grupamentos fosfato do material genético (12, 14-18).

A carga positiva resultante do sistema facilita a captação do lipoplexo por interação com os proteoglicanos da membrana celular (19). O efeito fusogênico dos lipídeos catiônicos nos sistemas de membrana permite o escape do lipoplexo do endossoma; pela complexação do material genético, ocorre diminuição do tamanho

aparente da molécula gênica, facilitando o trânsito citosólico e protegendo-a das enzimas DNAses, de modo a viabilizar a chegada do material genético ao núcleo celular (20-21).

O mecanismo supracitado torna a terapia gênica uma ferramenta inovadora, extremamente relevante e promissora para o tratamento de doenças de base genética: inatas ou adquiridas.

Muitos estudos têm sido feitos na área de terapia gênica com o intuito de aproximar os conceitos à prática. O avanço das pesquisas nessa área requer estudos de pré-formulação, estabilidade e toxicidade para que se possam seguir os estudos *in vitro* e em modelos animais (*in vivo*) dos veículos não-virais. Dessa forma será possível analisar os níveis de expressão gênica e segurança do sistema desenvolvido.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 TERAPIA GÊNICA

A medicina está entrando em uma nova era de tratamento de enfermidades, onde se almeja tratar a causa da doença, além dos seus sintomas (22). Nesse contexto, a terapia gênica tem surgido como uma abordagem promissora para o tratamento ou prevenção de doenças genéticas e adquiridas (14, 20, 23-24), baseado na transferência de material genético exógeno (8). Isto consiste na inserção de uma sequência nucleotídica em células com genes defeituosos, para incluir, substituir, complementar ou silenciar os genes causadores de doença (2-4, 25-27) e por sua vez, corrigi-las em sua origem (23) com propostas experimentais ou terapêuticas, *in vitro* ou *in vivo* (10).

Tipicamente, a transferência genética se utiliza de ácidos nucléicos, como os plasmídeos (28), para melhorar a expressão de uma proteína alvo (29), ou de outros vetores, como nucleotídeos e RNA de interferência (siRNA), para silenciar a expressão de proteínas anômalas, uma vez que os efeitos acumulativos disparados por genes defectivos atípicos em um determinado órgão levam às alterações fenotípicas (3).

A terapia gênica é baseada em três princípios básicos: 1) realocação ou correção de um gene no intuito de gerar produtos apropriados às funções da célula ou órgão; 2) introdução de um gene exógeno na célula, levando à produção de algo que não é inato e 3) inativação de um gene que esteja causando uma disfunção celular (3). As etapas envolvidas em um experimento de terapia gênica são: o isolamento do gene, a construção de um vetor, a transferência para células no tecido-alvo, e a produção da proteína codificada e expressa pelo gene terapêutico nessas células (30). Contudo, quando se trata de siRNA, ocorrerá a inibição da expressão de um determinado gene (31). O objetivo maior da terapia gênica é a melhora do quadro clínico do paciente através da administração de um gene terapêutico apropriado (25) diminuindo, dessa forma, a progressão da enfermidade e propiciando melhora na qualidade de vida do mesmo (3).

A terapia gênica é ainda recente, e suas bases científicas estão sendo estabelecidas com estudos pré-clínicos e clínicos (3). Os estudos pré-clínicos têm demonstrado o potencial deste tipo de terapia em reverter, ainda que de forma transiente, vários fenótipos de doenças. Para algumas indicações como o câncer, estes efeitos a curto-prazo podem ser suficientes (22). Os estudos clínicos somente poderão desenvolver-se com o avanço da tecnologia existente.

As ferramentas da nanobiotecnologia, bem como as novas ferramentas de caracterização e visualização celular, permitirão o desenvolvimento de técnicas mais seguras de transfecção (3); uma vez que a entrega de um gene é um processo complexo que necessita de um carreador eficiente para ultrapassar cada uma das etapas celulares envolvidas (14).

A nanotecnologia tem se destacado no desenvolvimento de sistemas de entrega de DNA (14), sendo a transferência de genes, demonstrada tanto por vetores virais quanto não-virais (3, 8).

## 2.2 VETORES E VEÍCULOS EM TERAPIA GÊNICA

O desenvolvimento de vetores aplicáveis à terapia gênica tem sido objeto de muitos estudos. Os vetores podem ser divididos em duas categorias: vetores sintéticos e vetores virais (27, 32). Os vetores sintéticos incluem DNA plasmidial (pDNA), siRNA e oligonucleotídeos, livres ou associados a algum sistema de liberação.

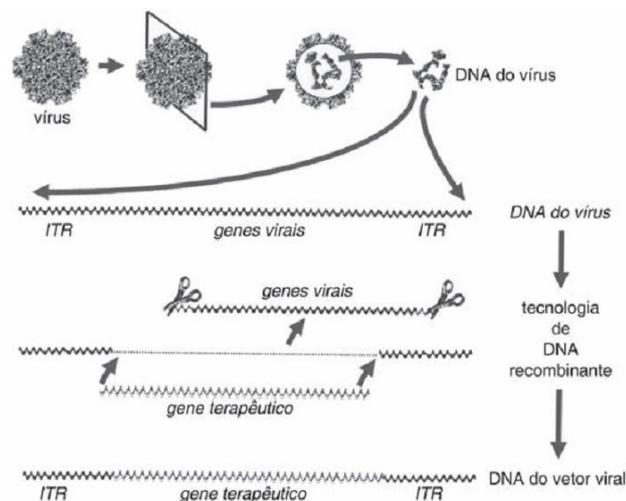
Os vetores virais usam a capacidade de infecção do próprio vírus para introduzir o material genético na célula alvo (3). De forma que os vetores virais são capazes de se “auto-veicular”, ao passo que os vetores sintéticos devem ser carregados para a célula por meio físico (microinjeção ou *gene gun*, por exemplo) ou utilizando sistemas não-virais de veiculação.

### 2.2.1 Vetores virais

Os vírus são micro-organismos especializados em infectar células, eles podem conter RNA ou DNA como material genético, cercado por uma capa protéica e em alguns casos, um envelope adicional de proteína e lipídeos (4).

O ciclo viral pode ser dividido em duas fases distintas: a infecção e a replicação. A infecção resulta na introdução do genoma viral na célula e a replicação, na expressão e multiplicação de novas partículas virais (33).

No caso dos vetores virais em terapia gênica, a partícula viral encapsula um genoma modificado, que carrega um gene terapêutico no lugar do genoma viral (5, 33). O esquema de produção de um vetor viral a partir de um adenovírus pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1** - Esquema de produção de vetores virais: linearização do DNA viral e aplicação da tecnologia do DNA recombinante.

**Fonte:** Linden, 2010.

Os vetores virais diferem entre si no que diz respeito à capacidade infectante, de carregamento de material genético, de poder inflamatório e ainda de integração ao DNA genômico do hospedeiro (Tabela 1) (4, 24).

**Tabela 1** - Diferentes tipos virais e suas capacidades para a terapia gênica.

<b>Vetor</b>	<b>Capacidade de empacotamento</b>	<b>Integração no genoma do receptor</b>	<b>Duração da expressão</b>	<b>Efeitos adversos</b>
<b>Adenovírus</b>	~30 kB	Não	Transitória	Resposta inflamatória
<b>Retrovírus</b>	~9 kB	Sim	Longa	Mutagênese insercional
<b>Adeno Associados</b>	4,6 kB	Raríssimo	Longa, em células pós-mitóticas	Leve resposta inflamatória
<b>Herpesvírus</b>	>30 kB	Sim	Transitória	Resposta inflamatória
<b>Lentivírus</b>	~10 kB	Sim	Longa	Mutagênese insercional

A transferência genética por meio viral é mais eficiente que a mediada por veículos não-virais, mas a segurança no que diz respeito à imunogenicidade, propriedades oncogênicas, risco de recombinação com outros tipos virais e desconhecidos efeitos a longo prazo têm tornado problemático o uso potencial de vetores virais (6, 10, 14, 27).

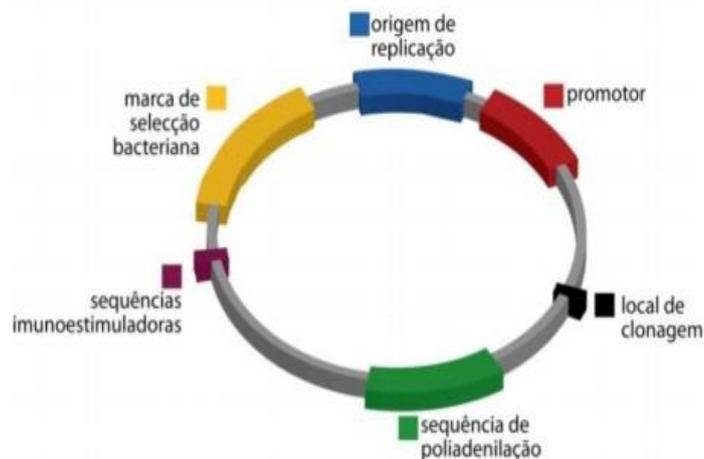
### 2.2.2 Vetores Sintéticos

Os vetores sintéticos são representados pelos siRNAs, oligonucleotídeos e pDNAs. Dentre estes, os plasmídeos são largamente utilizados.

Plasmídeos são moléculas capazes de replicar seu DNA autonomicamente, e que permitem a clonagem de material genético exógeno em sua estrutura, de forma que esta informação passa a ser replicada passivamente, junto com o plasmídeo (34).

Dentre as vantagens de usar pDNA como vetor não-viral, podemos citar: a capacidade de carrear uma grande quantidade de material genético, ausência do risco de infecção ou mutagênese e, fácil produção em larga escala por multiplicação em células bacterianas (3, 19, 35).

Em geral, todos os plasmídeos apresentam regiões comuns como as apresentadas na Figura 2: um promotor eucariótico forte, normalmente de origem viral; um local de clonagem posterior ao promotor, para inserção do gene heterólogo; uma sequência de poliadenilação, que estabiliza os transcritos e aumenta a eficiência do promotor; uma marca de seleção bacteriana, de resistência a um antibiótico; e uma origem de replicação. No caso das vacinas de DNA, os próprios vetores podem servir de adjuvantes se possuírem sequências imunoestimuladoras (ISS), capazes de ativar uma resposta imunológica celular (34, 36).

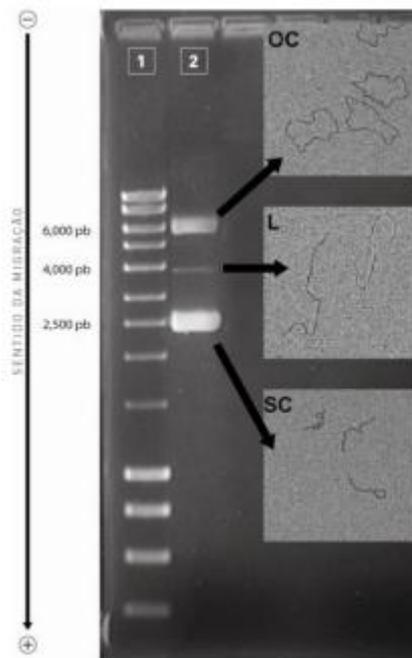


**Figura 2** - Esquema simplificado de um vetor plasmidial.  
**Fonte:** Lima, 2008.

O pIRES2-EGFP, plasmídeo utilizado neste estudo, contém uma sequência interna de entrada ribossomal (IRES – *internal ribosome entry site*) do vírus de encefalomiocardite (ECMV) entre o sítio múltiplo de clonagem (MCS – *Multiple Cloning Site*) e a região que codifica a proteína verde fluorescente melhorada (EGFP – *Enhanced Green Fluorescent Protein*). Isto permite a tradução tanto do gene de interesse (clonado no plasmídeo) quanto da EGFP, a partir de um único mRNA bicistrônico (37-39).

A EGFP é uma variante da GFP que foi otimizada para conferir maiores fluorescência e expressão em células de mamíferos (Máximo de excitação = 488 nm; Máximo de emissão = 507 nm).

Os plasmídeos podem apresentar-se, topologicamente, em diferentes formas (34). A visualização das isoformas pode ser feita por meio de eletroforese em gel de agarose por meio da análise dos padrões característicos de bandejamento, como indicado na Figura 3.



**Figura 3** - Bandas eletroforeticas em gel de agarose de diferentes isoformas de um mesmo pDNA, com imagens de microscopia eletrônica referentes às bandas indicadas no gel; OC Circular aberta (Open circle); L – Linear e SC – Superenovelado (Supercoiling).

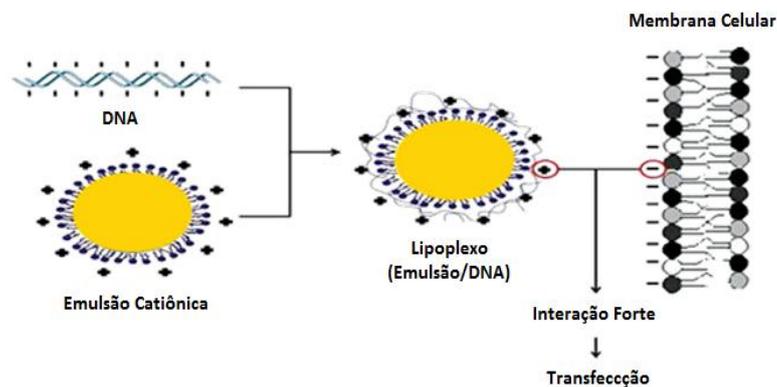
**Fonte:** Lima, 2008.

Plasmídeos na forma superenovelada (SC - *Supercoiling*) são de particular interesse para propostas farmacêuticas, uma vez que nesta forma a transfecção é mais eficiente. Contudo, plasmídeos sozinhos não conseguem transfectar células, uma vez que não ultrapassam as barreiras celulares. Sua aplicação terapêutica é feita através de lipofecção, eletroporação, *gene gun* ou microinjeção (35).

O desenvolvimento de carreadores para uma eficiente entrega deste material até as células tem atraído crescente atenção nos últimos anos (6, 40). Particular interesse tem sido dado ao desenvolvimento de veículos não-virais (41), frente às desvantagens óbvias do uso de vetores virais (14). Os vetores não-virais

representam, em longo prazo, o futuro da terapia gênica e os biomateriais são componentes críticos para o desenvolvimento de sistemas de transferência de genes (29).

Estudos recentes têm demonstrado que sistemas emulsionados com base lipídica apresentam alto potencial como carreador não-viral de genes: são biocompatíveis; capazes de formar complexos em escala nanométrica com o DNA (Figura 4) e com isso, reduzir a degradação enzimática no citosol (16). De-Larduya et al. (2010) indicam que os complexos que são formados entre os vetores não-virais e o DNA ('lipoplexos' ou 'poliplexos') constituem as mais promissoras alternativas ao uso de vetores virais em terapia gênica. Além disso, a resposta imune para estes vetores mostrou-se, inicialmente, não ser um problema significativo (22).



**Figura 4** - Esquema da formação de lipoplexos entre DNA e uma emulsão catiônica e interação com a membrana celular, para o processo de transfecção.

**Fonte:** Adaptado de Veríssimo et al., 2010.

### 2.2.3 Sistemas Emulsionados como Carreadores Não-virais

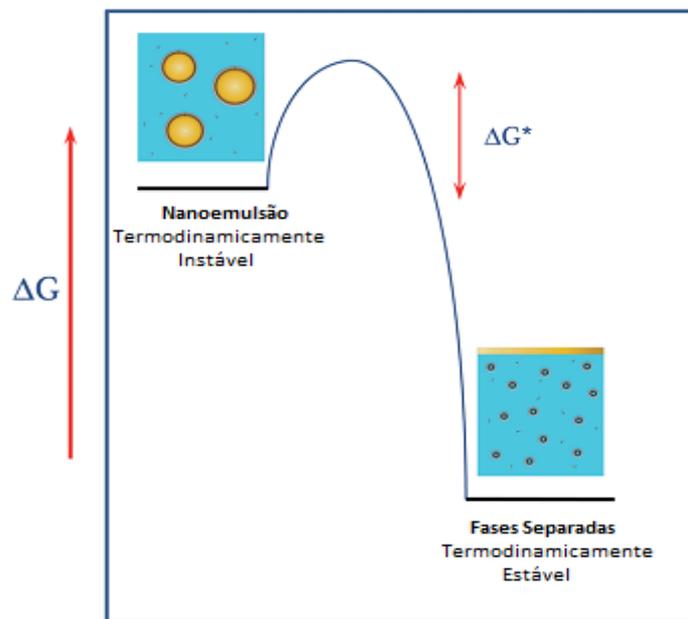
Os veículos lipídicos têm sido usados como carreadores de fármacos há muitos anos, e são conhecidos por serem seguros e de fácil escalonamento (22). Na década de setenta foi descrito pela primeira vez o uso de lipídeos catiônicos sintéticos para transfecção gênica. Depois da publicação deste trabalho mais de uma dezena de lipossomas catiônicos foram desenvolvidos para estes fins(3).

Recentemente demonstrou-se que as emulsões de lipídeos catiônicos têm estabilidade física e atividades biológicas mais favoráveis que os tradicionais

lipossomas catiônicos, como carreador genético, *in vivo* (16), e as emulsões se apresentam mais promissoras inclusive do ponto de vista da produção em larga escala (14).

As emulsões são preparações farmacêutico-cosméticas, geralmente descritas como sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, constituídos por uma fase interna, dispersa ou ainda conhecida como descontínua e por uma fase externa, dispersante ou contínua (42-45) estabilizada por um sistema tensoativo. As emulsões em geral têm tamanho médio de gotícula de 1  $\mu\text{m}$ , porém, com o desenvolvimento da nanotecnologia, novos homogeneizadores são capazes de produzir emulsões nanométricas, as nanoemulsões.

As nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) consistem de pequenas gotículas de óleo dispersas em uma fase contínua aquosa e assim como as emulsões, são termodinamicamente instáveis (Figura 5) (46-48). No entanto, devido ao seu reduzido tamanho, são considerados sistemas cineticamente estáveis (49).



**Figura 5** - Ilustração da formação termodinâmica das nanoemulsões.

**Fonte:** Adaptado de McClements, 2012 (48).

Estes sistemas apresentam algumas vantagens quando comparadas às emulsões tradicionais: sua grande área de superfície e energia livre evitam fenômenos de instabilidade como cremagem, floculação e separação de fases (50). De forma que as pontes de Ostwald respondem pelo principal problema de

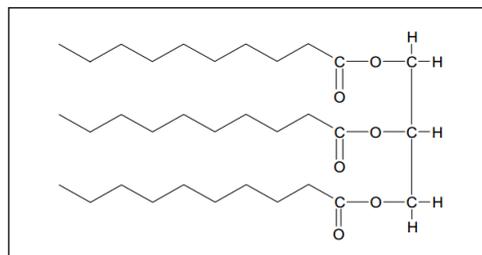
instabilidade das nanoemulsões. Estas pontes resultam da diferença na solubilidade entre gotas pequenas e grandes. Teoricamente, as pontes levam à condensação de todas as gotas em uma única gota (causando separação de fases) (51).

As nanoemulsões podem ser produzidas a partir de técnicas que empregam alta energia, como a sonicação e a microfluidização ou baixa energia, como a emulsificação espontânea (49).

A ultrasonicação é documentada como um método de alta energia capaz de formar rapidamente nanoemulsões estáveis, com pequeno tamanho de gotícula associado a um baixo índice de polidispersão (52). Neste método, as gotículas são formadas devido ao colapso de bolhas causadas pela cavitação e a liberação local de uma quantidade substancial de energia decorrente deste processo (53). A aplicação de ultrasonicação para formulação de sistemas nanoemulsionados vem sendo relatada em diversos trabalhos (9, 54-56).

A escolha dos componentes das nanoemulsões é um importante passo, que normalmente leva em consideração a estabilidade da formulação e as características físico-químicas que se deseja obter.

Há evidências de que o tamanho de gotícula é fortemente influenciado pelo tipo de óleo que se emprega (57). Para nanoemulsões em terapia gênica é relatado tanto o uso de óleos naturais quanto de óleos semi-sintéticos (58). Entre os óleos vegetais pode-se citar, por exemplo, o óleo de soja e de linhaça (16, 18). Entre os óleos semi-sintéticos, os Triglicerídeos de Cadeia Média (TCM) (Figura 6) têm sido constantemente utilizados (11-13).



**Figura 6.** Estrutura de um triglicerídeo de cadeia média, derivado do ácido cáprico.

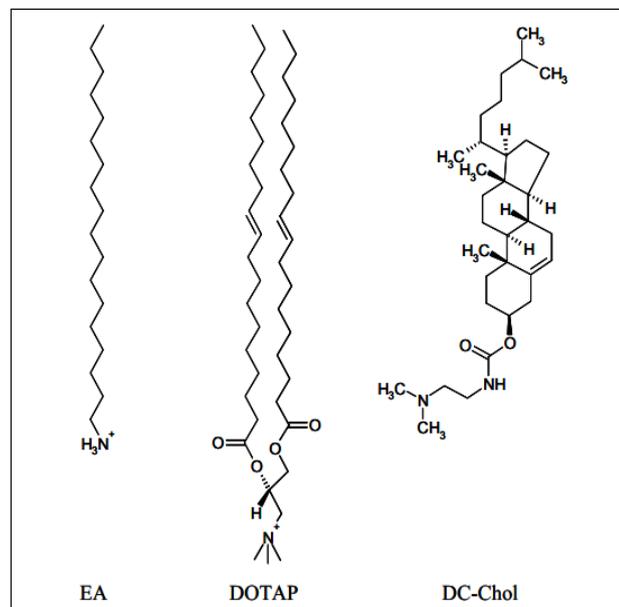
Os óleos que apresentam baixa densidade formam suspensões bem dispersas no meio de cultura (16), o que é desejável para uma aplicação uniforme do sistema (*in vitro*). Contudo, aqueles óleos que apresentam alta densidade têm-se

mostrado mais eficientes em complexar o material genético e demonstrado maior atividade de transfecção em células aderentes (59).

Bruxel et al. (2012) listaram os óleos mais comuns na preparação de nanoemulsões. O tipo TCM aparece como um dos mais empregados devido principalmente à sua miscibilidade em água, quando comparada aos triglicerídeos de cadeia longa.

Como é sabido, para formação de um sistema emulsionado, é necessário um sistema tensoativo adequado, que diminua a tensão interfacial entre a água e o óleo.

Os lipídeos catiônicos têm sido empregados na preparação de lipossomas para terapia gênica há algumas décadas e a maioria destes lipídeos está disponível para a preparação das nanoemulsões (16). Martini (2005) indica que os lipídeos catiônicos mais utilizados em estudos relacionados à terapia gênica são a estearilamina (EA), o N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate (DOTAP) e o 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol (DC-Chol). A estrutura química destes lipídeos catiônicos variam quanto ao seu tamanho e número de cadeia(s) hidrofóbica(s), no espaçador e no grupamento polar (Figura 7).



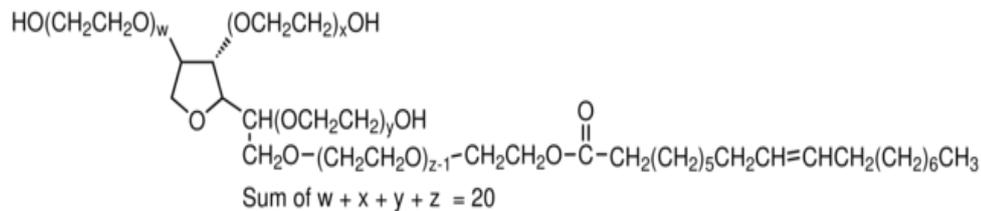
**Figura 7.** Estrutura química dos principais lipídeos catiônicos relacionados à terapia gênica.

**Fonte:** Martini, 2005.

Por causa da toxicidade inerente aos lipídeos catiônicos, outros tensoativos devem ser empregados para estabilizar as nanoemulsões.

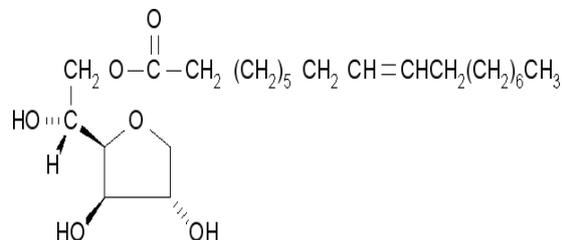
Os tensoativos não-iônicos utilizados nas formulações de sistema desenvolvidos para terapia gênica normalmente são aprovados para o consumo humano (50) e as quantidades utilizadas são imensamente menores que às necessárias à formação de microemulsões, por exemplo (49).

Os tensoativos não-iônicos atuam aumentando a estabilidade das nanoemulsões (60). Kim et al. (2002) avaliaram o papel de diversos tensoativos não-iônicos em sistemas contendo lipídeos catiônicos para terapia gênica e observaram que o Tween 80<sup>®</sup> (Figura 8) aumentou tanto a transfecção (atuando como uma espécie de 'lipídeo *helper*') quanto a estabilidade física (evitando a agregação das gotículas (61)). Contudo, o tensoativo diminuiu a eficiência de compactação do sistema (62).



**Figura 8** - Estrutura química do Tween 80<sup>®</sup>.

O Tween 80<sup>®</sup> e o Span 80<sup>®</sup> (Figuras 8 e 9, respectivamente) quando misturados, agem sinergicamente (54), modificando a tensão interfacial das misturas de óleo em água e melhorando a estabilidade física do sistema emulsionado(60). Por causa disto, estes foram os tensoativos escolhidos para a construção do Diagrama de Fases Pseudo Ternário (DFPT), no HLB crítico do Captex 355<sup>®</sup> (10,5).



**Figura 9** - Estrutura química do Span 80<sup>®</sup>.

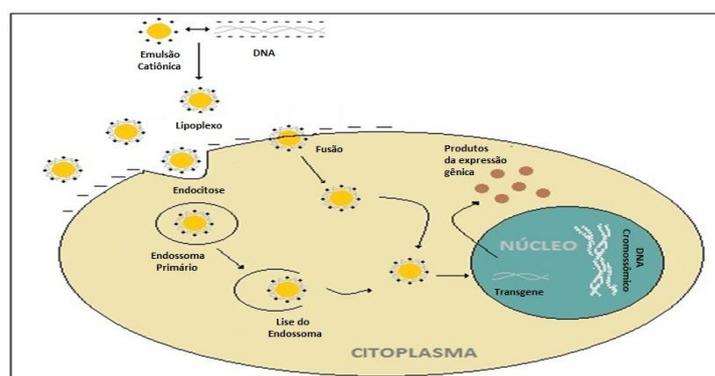
Pelo baixo teor de surfactante desses sistemas (2 a 5%), quando comparado a outros sistemas emulsionados como as microemulsões, as nanoemulsões têm sido escolhidas como potenciais carreadores lipídicos para terapia gênica (14). Além disso, Nam et al. (2009) dizem que as nanoemulsões catiônicas oferecem

biocompatibilidade, estabilidade física, baixa toxicidade e a possibilidade de produção em larga escala, necessária para aplicações clínicas, *in vivo*. Isto corrobora com o pensamento de Veríssimo et al. (2010), que indica a otimização de todos os componentes das nanoemulsões no sentido de permitir seu uso como vetor na terapia de transtornos ou enfermidades genéticas.

Lipídeos catiônicos interagindo com o DNA podem apresentar estabilidade coloidal em três zonas: Zona A é uma região de estabilidade coloidal para os complexos com razão de carga negativa. Nesta zona, o DNA está descondensado em volta do lipoplexo; a zona B é uma região de instabilidade coloidal onde os complexos são essencialmente descarregados; e a zona C é uma zona de estabilidade coloidal onde as gotículas são positivamente carregadas e o DNA está altamente condensado (20).

Castilho et al. (2008) indicam que a principal propriedade dos lipoplexos é facilitar a passagem do DNA através da membrana plasmática por dois mecanismos: neutralização das cargas de DNA e condensação do plasmídeo, reduzindo seu tamanho. Tros-de-Ilarduya et al. (2010) acrescentam que é amplamente aceito que os lipoplexos preparados com um ligeiro excesso de carga positiva confere maior eficiência de transfecção.

A compactação do DNA é um dos mais importantes requisitos para uma eficaz transfecção genética (21). O sucesso da entrega do material genético depende de vários fatores. Isso inclui a estrutura química do reagente catiônico, a estrutura supramolecular do lipoplexo, suas interações com as membranas celulares, sua internalização e localização intracelular, além da liberação do DNA dos carreadores catiônicos (20-21). Esses eventos constituem o mecanismo que garante a internalização dos veículos não virais (Figura 10).



**Figura 10** - Esquema representativo da formação do lipoplexo e tráfego intracelular.

Desta forma, as nanoemulsões apresentam-se como uma interessante alternativa aos vetores virais em terapia gênica, dados a facilidade de produção do sistema emulsionado, simplicidade no processo de formação do lipoplexo, capacidade de carrear materiais genéticos desde pequenas sequências nucleotídicas até grandes plasmídeos e somando-se ainda a segurança conferida ao uso de sistemas não-virais, que não são imunogênicos, não apresentam riscos de mutagênese insercional e apresentam baixo poder inflamatório.

Em suma, os lipoplexos são reais possibilidades de aproximação da teoria à terapia e por este motivo, objeto de estudo deste trabalho de mestrado.

### 3 OBJETIVOS

- Geral

Produzir e avaliar um sistema nanoemulsionado como potencial veículo não-viral para terapia gênica.

- Específicos

- Escolher, por meio de Diagrama de Fases Pseudo-Ternário, o melhor ponto para produção de nanoemulsões;
- Avaliar a estabilidade das nanoemulsões;
- Verificar a possibilidade de escalonamento das nanoemulsões;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do sistema nanoemulsionado;
- Produzir lipoplexos formados a partir da nanoemulsão catiônica e o pDNA;
- Avaliar os fatores que influenciam a compactação do material genético pelas nanoemulsões;
- Reproduzir lipoplexos estáveis, aptos à utilização em terapia gênica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PREPARAÇÃO DO PLASMÍDEO

O vetor plasmidal (pIRES2-EFGP - 5,3 Kb) contém um sítio interno de entrada ribossomal (IRES) entre o sítio múltiplo de clonagem e a região codante para a proteína verde fluorescente (EGFP, do inglês *Enhanced Green Fluorescent Protein*). O plasmídeo possui promotor de Citomegalovírus (CMV) além de conferir resistência ao antibiótico canamicina (Kan). O plasmídeo foi gentilmente cedido pelo prof. Dr. Calos Meck – USP.

A multiplicação do material genético foi feita por transformação em bactérias *E. coli* competentes (DH10B), pelo método de eletroporação. A extração do pDNA foi feita pelo protocolo de lise alcalina com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), pelo protocolo de MidiPrep (63). O extrato foi diluído em água ultra-pura autoclavada. O material genético foi quantificado em aparelho específico (Nanovue – GE) e a densidade óptica (OD) calculada como a razão das leituras em 260/280 nm.

### 4.2 DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNÁRIO (DFPT)

O diagrama de fases corresponde a uma área em forma de triângulo equilátero, delimitando em que proporção os componentes formam os variados tipos de sistemas emulsionados e/ou separação de fases. Este diagrama apresenta em cada um de seus vértices a proporção de 100% em massa de fase oleosa (Captex 355<sup>®</sup>), aquosa e da mistura de tensoativos (Tween 80<sup>®</sup> e Span 80<sup>®</sup>).

Nove pontos de formulação (com proporção óleo:tensoativo variando de 1:9 a 9:1) foram sequencialmente diluídos em água. A energia foi fornecida ao sistema por meio de sonda ultrassônica por 2 minutos, seguidos de 2 minutos em banho de ultrassom. Depois de formulados, os sistemas foram classificados visualmente em emulsão fluida (EM), emulsão viscosa (EMV), microemulsão (ME) ou separação de fases (SF). A partir destas informações, as regiões foram delimitadas no diagrama.

### 4.3 PREPARAÇÃO DAS NANOEMULSÕES

As nanoemulsões consistem de um sistema O/A, escolhido a partir de análises do DFPT e preparadas pelo método de sonicação: a fase aquosa foi sonicada por 3 minutos e colocada em banho de ultrassom por 2 minutos. Em seguida a fase aquosa foi adicionada à oleosa e submeteu-se a sonicação por 4 minutos, em banho de gelo.

Foram produzidas emulsões com incorporação de estearilamina na fase aquosa (FA) e na fase oleosa (FO), a fim de avaliar se tal modificação influenciava no poder de complexação do sistema. As amostras produzidas foram armazenadas a 4 °C.

### 4.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

As nanoemulsões tiveram a estabilidade avaliada por seis meses (nos dias (D)0, D7, D15, D30, D60, D120 e D180) sob três temperaturas de armazenamento: 4 °C, 25 °C e 40 °C ( $\pm 2$  °C). As amostras foram diluídas 300 vezes em água ultra pura para análise.

Os parâmetros escolhidos para a avaliação da estabilidade foram diâmetro de gotícula e potencial- $\zeta$ , aferidos pelo equipamento Zetaplus (Brookhaven Instruments Corporation) por meio de espectroscopia de correlação de fótons.

### 4.5 TESTE DE ESCALONAMENTO

Para realização desse teste, volumes crescentes (10 mL, 20 mL, 50 mL e 100 mL) de nanoemulsão foram produzidos no intuito de verificar a possibilidade de escalonamento do produto. A caracterização foi feita por análise macroscópica, pH, condutividade, granulometria e potencial zeta.

As quantidades dos componentes foram escalonadas e as condições de produção, mantidas. Também foram produzidas formulações nos volumes de 10 mL, 20 mL e 50 mL adequando proporcionalmente o tempo de sonicação ao volume produzido. Sendo os tempos de sonicação: 4 min, 8 min e 20 min respectivamente.

#### 4.6 ESTERILIZAÇÃO DO SISTEMA

Como o sistema foi desenvolvido para fins biológicos, é de fundamental importância encontrar um método eficaz de esterilização do sistema emulsionado. Para isso testamos esterilização por autoclavação a 121 °C, 1 atm, por 15 minutos e filtração por meio de membrana de poro 0,22 µm. Após esterilização as amostras foram analisadas quanto à manutenção de suas características.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vitro*

Para avaliar a toxicidade *in vitro* do sistema foi utilizada a linhagem celular MRC-5 cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas em uma concentração de  $3 \times 10^5$  células por poço, em placas de seis poços, 24h antes do ensaio. Diferentes volumes de nanoemulsão (variando de 0 a 30 µL) foram aplicados em poços diferentes e a viabilidade celular foi verificada 72h após o tratamento.

As células foram coradas com Azul de Trypan (0,4%) e contadas em câmara de Neubauer.

Os cálculos de viabilidade celular foram feitos dividindo o número de células viáveis do tratamento pelo número de células viáveis do controle (não tratado com nanoemulsão). Um gráfico foi plotado relacionando a viabilidade celular com a concentração de concentração molar de estearilamina no meio de cultura. A equação da reta foi calculada de forma a inferir a dose letal para 50% das células.

#### 4.8 PREPARAÇÃO DO LIPOPLEXO

O material genético foi colocado em contato direto com a nanoemulsão em diferentes relações (p/v) de pDNA/Nanoemulsão no intuito de formar o lipoplexo, por formação de um par iônico.

Os fatores que influenciam a complexação foram avaliados no intuito de otimizar o processo:

Fase de incorporação da estearilamina: 460 ng de pDNA foi complexado com volumes crescentes de nanoemulsão com estearilamina incorporada à FA e FO;

Temperatura do ambiente de complexação: foram testadas três temperaturas para complexação das nanoemulsões FA: 25 °C, 37 °C e 4 °C ( $\pm 2$  °C);

O tempo de contato entre o material genético e a nanoemulsão (0min, 15min, 30 min, 60 min e 120 min), também foi avaliado.

Após cada ensaio, avaliou-se a complexação do material genético conforme descrito em 4.9.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA COMPLEXAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

A avaliação qualitativa da complexação do pDNA à nanoemulsão foi feita pelo ensaio de retardo em gel de agarose 0,7%. O sistema 100% compactado tem a migração impedida no gel de agarose por dois motivos: 1) as cargas estão neutralizadas (grupo fosfato do DNA e carga catiônica do sistema) e 2) a condensação do material genético ao sistema impede a intercalação do corante entre os pares de base (62, 64).

#### 4.10 ESTATÍSTICA

Para comparação dos resultados, foi realizada análise estatística por meio do teste t de student, considerando diferenças estatisticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ .

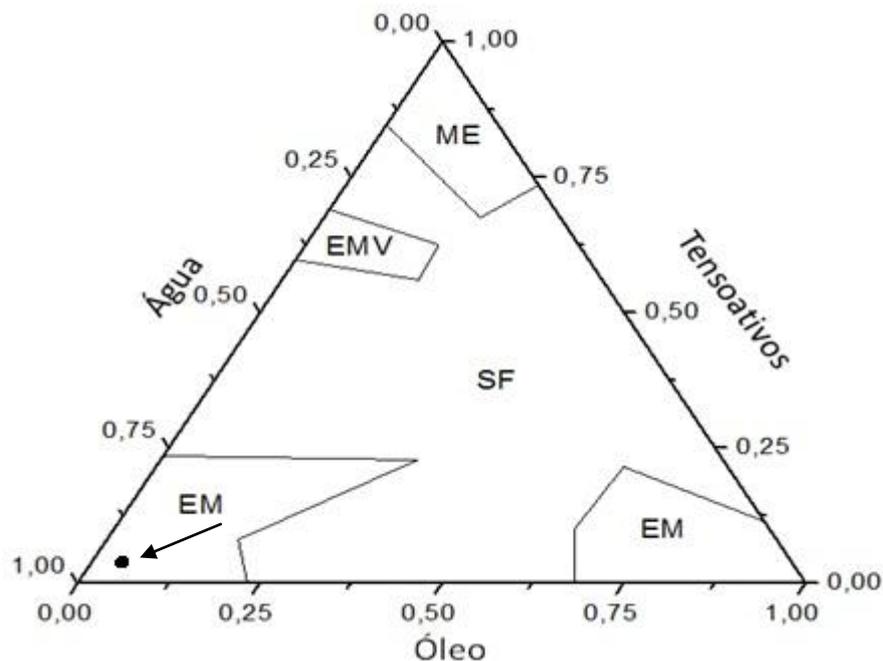
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DIAGRAMA DE FASES PSEUDO-TERNÁRIO

O diagrama foi construído com os componentes mencionados na metodologia, escolhidos em função das vantagens apresentadas por cada um deles: a boa miscibilidade do óleo no meio de cultura celular (devido a sua densidade – 0,93), as características de estabilização, impedimento estérico e de auxílio à transfecção relacionados ao Tween 80<sup>®</sup> e o efeito complementar do Span 80<sup>®</sup>.

Os resultados obtidos revelam que vários tipos de sistemas emulsionados podem ser produzidos com a variação das proporções de água, óleo e tensoativos (figura 11). Nam et al. (2009) também concordam que as características físico-químicas das nanoemulsões são controladas pela variação em seus constituintes.

Por meio de análise macroscópica, as amostras foram classificadas como emulsão fluida (EM), emulsão viscosa (EMV), microemulsão (ME) e região de separação de fases (SF). Tal resultado pode ser observado na figura 11.



**Figura 11** - Diagrama de fases pseudo-ternário composto de Captex 355<sup>®</sup>, Span 80<sup>®</sup>, Tween 80<sup>®</sup> e água ultra-pura indicando as regiões EM, EMV, ME e SF. O ponto indicado pela seta no diagrama indica o ponto escolhido para formulação das nanoemulsões.

No diagrama, verificou-se a formação de duas regiões de emulsão fluida: uma rica em óleo ( $\geq 65\%$  de TCM) e outra rica em água ( $\geq 75\%$  de água), para as regiões ricas em tensoativo ( $\geq 60\%$ ) observou-se a formação de emulsão viscosa e microemulsão (figura 11).

Uma vez que nanoemulsões são formulações ricas em fase aquosa (49), o ponto escolhido para o sistema foi o que representa 5% de Captex 355<sup>®</sup>, 2% de tensoativos (1,2% de Tween 80<sup>®</sup> e 0,8% de Span 80<sup>®</sup>) e 93% de água ultra-pura. Estearilamina (0,16%) foi adicionada, no intuito de conferir caráter catiônico ao sistema (11-12, 61).

O ponto escolhido para produção do sistema está localizado dentro de uma região de emulsão (Figura 11). Evitou-se a escolha de regiões de borda pelos efeitos de instabilidade que podem ocorrer a estas formulações. Em seguida, procedeu-se diluições subsequentes do sistema com água, no intuito de confirmar o ponto escolhido como nanoemulsão e observar a influência da diluição no tamanho da gotícula.

Foram testadas seis diferentes diluições nanoemulsão:água (1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300 e 1:500) que foram analisadas quanto a sua granulometria e índice de polidispersão (Tabela 2). Os dados permitiram escolher a melhor diluição e confirmar que a formulação se trata de uma nanoemulsão (49). Pode-se observar que quando a amostra é analisada sem diluição, o equipamento é incapaz de fornecer valores reais de tamanho para o sistema: 4,36 nm. Com o aumento das diluições, o tamanho de gotícula diminui, de modo que a partir da diluição de 1:200, há uma estabilização no tamanho da gotícula, não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tamanhos encontrados nas diluições de 1:200, 1:300 e 1:500. Além disso, o índice de polidispersão diminuiu para valores menores que 0,2, nesta faixa de diluição.

**Tabela 2** - Influência da diluição (nanoemulsão:água) no tamanho e Índice de Polidispersão (PI) das nanoemulsões.

Diluição	Tamanho (nm)	PI
1:0	4,36	0,217
1:20	201,74	0,201
1:50	190,19	0,201
1:100	185,08	0,188
1:200	181,63	0,174
1:300	178,94	0,182

<b>1:500</b>	178,61	0,192
--------------	--------	-------

Esses resultados confirmam que a formulação foi eficiente na formação de nanoemulsão, pois em todas as diluições testadas obtivemos tamanhos nanométricos. Além disso, por meio desses resultados foi possível selecionar uma diluição confiável para análises em DLS (Espalhamento Dinâmico de Luz, do inglês *Dynamic Light Scattering*) para a qual se convencionou 1:300.

## 5.2 ESCALONAMENTO

Os resultados obtidos nos permite observar que o volume de produção interfere no tamanho da gotícula obtida. Verificou-se para formulações de 10 mL, gotículas de 188,4 nm. Já as formulações de 100 mL apresentaram um aumento de aproximadamente 78 nm em relação ao tamanho das gotículas da formulação de menor volume (Tabela 3). Contudo, o potencial zeta não sofreu diferença significativa para qualquer dos volumes produzidos.

Quando o volume de produção aumenta, aumenta também o tamanho da gotícula formada ( $p < 0,05$ ). Isso ocorre, provavelmente, por que o tempo de sonicação foi mantido, independente do volume final produzido. Contudo, como esperado, o potencial zeta não sofreu mudanças significativas, uma vez que a quantidade de lipídeo catiônico foi ajustada ao volume final.

**Tabela 3** - Caracterização das formulações escalonadas.

Formulação	pH	Condutividade ( $\mu\text{S}$ )	Tamanho (nm)	Potencial- $\zeta$ (mV)
<b>10 mL</b>	7,41 $\pm$ 0,35	91,80 $\pm$ 1,42	188,4 $\pm$ 5,4	29,69 $\pm$ 1,33
<b>20 mL</b>	8,77 $\pm$ 0,38	82,28 $\pm$ 1,35	204,1 $\pm$ 0,3	30,59 $\pm$ 0,11
<b>50 mL</b>	8,35 $\pm$ 0,50	73,78 $\pm$ 3,11	227,55 $\pm$ 4,3	32,22 $\pm$ 2,94
<b>100 mL</b>	8,41 $\pm$ 0,09	71,52 $\pm$ 0,96	265,55 $\pm$ 5,5	29,97 $\pm$ 1,55

Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 3 nos permitiram observar que formulações com volumes diferentes nos fornece gotículas com diferentes tamanhos. Para verificar se o tempo de sonicação influencia o tamanho das gotículas, este foi proporcionalmente adequado ao volume produzido. Quando fornecemos ao volume de 10 mL de formulação 4 minutos de energia pelo processo de sonicação obtivemos uma gotícula de  $176,67 \pm 3,9$  nm. Com o dobro do volume e o quántuplo do volume observamos que ao fornecer energia proporcional obtivemos gotículas de  $166,8 \pm 4,2$  nm e  $166,4 \pm 1,9$  nm, respectivamente (Tabela 4). O que nos permite sugerir que ao formularmos volumes maiores devemos adequar o tempo de sonicação de forma proporcional obtendo, dessa forma, gotículas com tamanhos semelhantes.

Os estudos de Koroleova e Yurtov (2012), Ghosh et al. (2013) e Liu e Yu (2010) relacionam o tempo de sonicação com a diminuição no tamanho de gotícula e a redução do índice de polidispersão. Além disso, comentam que a quantidade de energia fornecida tem influência direta no tamanho da gotícula.

**Tabela 4.** Caracterização das formulações após teste de escalonamento com adequação do tempo de sonicação

Formulação	pH	Condutividade ( $\mu$ S)	Tamanho (nm)
<b>10 mL</b>	$7,3 \pm 0,14$	$88,9 \pm 1,6$	$176,67 \pm 3,9$
<b>20 mL</b>	$7,6 \pm 0,08$	$79,62 \pm 0,66$	$166,8 \pm 4,2$
<b>50 mL</b>	$7,75 \pm 0,04$	$72,83 \pm 0,29$	$166,4 \pm 1,9$

Nota: Volume de formulação – Tempo de sonicação: 10 mL – 4'; 20 mL – 8' e 50 mL – 20')

O tamanho de gotícula diminuiu significativamente com o aumento do tempo de sonicação. Tal fato também foi observado por Jafari et al. (2006) (65). Desta forma, alterações no protocolo de fabricação que propiciem maior oferta de energia quando se tem aumento do volume preparado, mostram-se adequadas.

Outro dado obtido e analisado no decorrer dos experimentos é que à exceção do volume de 100 mL, as demais formulações apresentaram PI menor que 0,180. Para a formulação de maior volume, o PI foi de 0,225. Esse resultado é muito

importante, uma vez que o PI é um indicador da homogeneidade do tamanho de gotícula, onde índices menores que 0,2 representam, geralmente, estreita distribuição granulométrica (66). Indicando populações monomodais.

Os valores de pH e condutividade permitem o acompanhamento da estabilidade de sistemas emulsionados (67-70). Geralmente, os processos de instabilidade são acompanhados de diminuição de pH (devido a oxidação da fase oleosa ou hidrólise dos triglicerídeos)(69) e elevação da condutividade (67). Masmoudi et al (2005) sugere que as emulsões que apresentam diminuição de pH e aumento de condutividade sejam menos estáveis. Contudo, ressalva que deve-se observar os pormenores de cada formulação.

Nossos resultados demonstram que adequando o tempo de sonicação ao volume produzido, há uma aproximação dos valores de pH e condutividade, o que sugere um possível aumento na estabilidade destas formulações.

### 5.3 ESTERILIZAÇÃO

Quando as amostras foram submetidas à esterilização por autoclave, observamos separação de fases. Esse resultado era esperado uma vez que o processo consiste na aplicação de altas temperaturas e o sistema nanoemulsionado apresenta instabilidade nessa condição. Resultados semelhantes foram observados por Chung et al. (2001) e Bruxel et al. (2012) que verificaram com diversos óleos (57), e com o Tween 80<sup>®</sup> (13) que quando seus sistemas eram submetidos a altas temperaturas, eles sofriam separação de fases e/ou ocorreu ao menos um aumento no tamanho de gotícula de pelo menos duas vezes, em dez minutos de exposição.

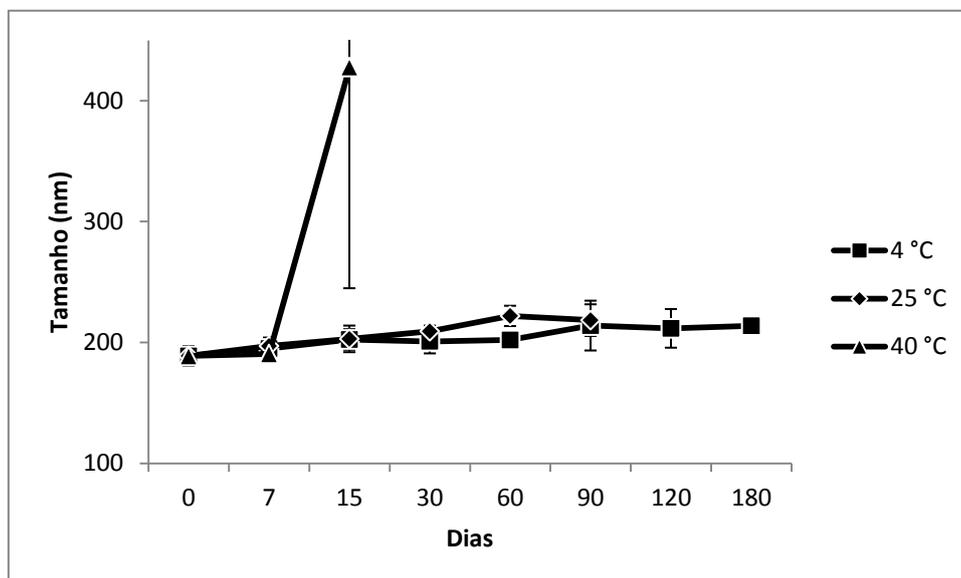
O processo de esterilização com uso de membranas mostrou-se mais adequado, quando comparado à metodologia anterior. Após a passagem em membranas filtrantes, o sistema manteve suas características de tamanho e potencial zeta, bem como aparência macroscópica. Verificou-se ainda uma leve diminuição no PI, provavelmente decorrente da harmonização do tamanho quando passada por poros calibrados.

## 5.4 ESTABILIDADE

Um dos pré-requisitos mais importantes ao formular um sistema emulsionado é a manutenção de sua estabilidade física no decorrer do tempo. A estabilidade do tamanho de uma nanoemulsão é definida como a capacidade de manutenção da distribuição do tamanho de gotícula inicial, ao longo do tempo, sem que haja separação de fases (57).

As amostras foram produzidas em volume de 10 mL, em triplicata, e armazenadas em três temperaturas: 4 °C, 25 °C e 40 °C ( $\pm 2$  °C).

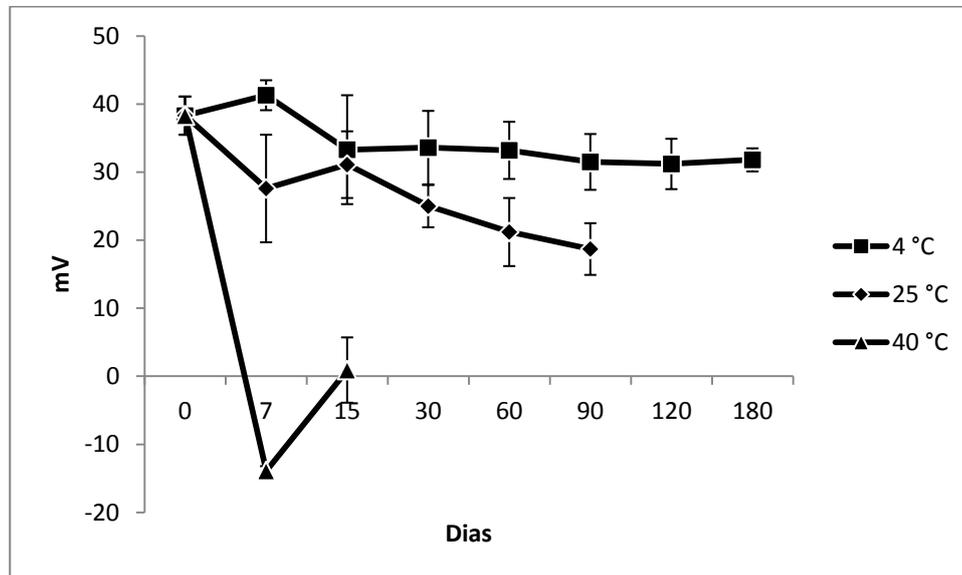
Os resultados obtidos pela análise da estabilidade nos permitiram observar que no primeiro dia de estudo todas as formulações apresentaram a coloração branca e uma característica leitosa, típica de nanoemulsão (resultado não apresentado). No dia denominado D0 todas as gotículas apresentaram um tamanho de 189 nm ( $\pm 9$ ) (Figura 12), PI menor que 0,200 e potencial zeta de 38 mV ( $\pm 3$ ) (Figura 13).



**Figura 12** - Análise granulométrica dos sistemas armazenados a 4 °C, 25 °C e 40 °C no período de 180 dias.

No decorrer dos sete primeiros dias não houve alteração no tamanho das gotículas em qualquer das condições de armazenamento testadas. Contudo, foi possível observar uma leve diminuição do potencial zeta nas temperaturas de 25 °C

(aproximadamente 15 mV) e uma acentuada diminuição naquelas nanoemulsões armazenadas à 40 °C (Figura 13).



**Figura 13** - Análise do potencial zeta de amostras armazenadas a 4 °C, 25 °C e 40 °C, num período de 180 dias.

O resultado do acompanhamento do potencial zeta para as amostras estocadas a 40 °C mostram que após uma semana de armazenamento, atingiu-se um valor de -14 mV ( $\pm 5$  mV) e tal modificação foi acompanhada por mudança de coloração, para amarelo claro. Estas amostras apresentaram separação de fases logo após o D15, quando o tamanho de gotícula mais que dobrou e o potencial zeta aproximou-se de zero. Resultado semelhante foi observado por Yang et al. (2013), os quais relatam o comportamento de um sistema emulsionado contendo Tween 80<sup>®</sup>, que quando estocado em temperaturas acima da temperatura ambiente, apresentaram uma fina camada de óleo sobre o sistema, indicando a quebra destes, ao fim do primeiro mês de estocagem.

As formulações estocadas a 25 °C mantiveram seu tamanho característico durante o período de análise, sendo observadas alterações no potencial zeta no decorrer do experimento. Foi observado que o potencial zeta diminuiu de 38 mV (D0) para 19 mV (D90). Essa alteração pode ter contribuído para a desestabilização do sistema, uma vez que a separação de fase para estas nanoemulsões ocorreram anteriormente às análises do D120.

Os resultados obtidos para as amostras estocadas a 4 °C permitem prever que essa é a melhor temperatura de armazenamento. Na análise macroscópica, no

decorrer do estudo, não foram observados quaisquer indícios de separação de fases, embora as características de granulometria tenham aumentado de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) o potencial zeta manteve-se estável ( $p = 0,1$ ). Nossos resultados são semelhantes aos achados de Chung et al. (2001) e Xavier et al. (2012), que observaram que as amostras armazenadas a 4 °C apresentaram-se mais estáveis que àquelas armazenadas em temperaturas mais elevadas, uma vez que sob temperaturas mais baixas, diminui-se a energia de colisão entre gotículas.

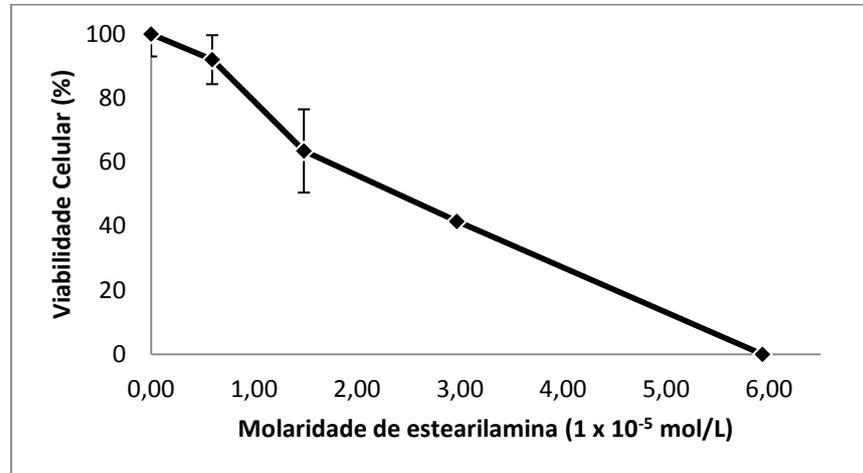
Devido ao tamanho diminuto de gotícula, as nanoemulsões possuem estabilidade contra sedimentação ou cremagem (estabilidade cinética), e as pontes de Ostwald respondem pela grande parte dos fenômenos de instabilidade (50). Contudo, o aumento na temperatura acelera os processos de instabilidade (46, 66, 70), uma vez que os componentes podem ser hidrolisados e, no caso dos tensoativos, podem perder sua capacidade surfactante (71).

Baspinar et al (2012) verificou um leve decréscimo no potencial zeta das formulações ao longo de um ano de análise. Contudo, as amostras analisadas a 25 e 40 °C apresentaram-se estáveis durante o período. Provavelmente por utilizar um sistema tensoativo mais resistente ao aumento na temperatura.

## 5.5 TOXICIDADE

No intuito de verificar se o sistema desenvolvido é atóxico, tornando-o hábil à utilização para fins de terapia gênica, realizamos ensaio de viabilidade celular em cultura de células humanas. A toxicidade das nanoemulsões catiônicas estão relacionadas principalmente ao lipídeo catiônico utilizado na formulação (16). A toxicidade *in vitro* das formulações contendo estearilamina foi determinada em células da linhagem MRC-5 (*Lung Fetus Human Cell Fibroblasts*). Os resultados indicam que a diminuição da viabilidade celular está associada diretamente ao volume de sistema utilizado e conseqüentemente à concentração de estearilamina no meio de cultura. Quando as células foram tratadas com 2 µL de nanoemulsão, ocorreu uma diminuição de 8% na viabilidade. Para o volume de 10 µL, a redução na

viabilidade alcançou mais de 50%, e para volumes acima de 20  $\mu\text{L}$  não houveram células viáveis correspondentes (Figura 14).



**Figura 14** - Curva de viabilidade celular para nanoemulsões frente a linhagem celular MRC5: porcentagem de células vivas em função da concentração molar de estearilamina no meio de cultura.

Os resultados do ensaio com células permitiram construir o gráfico que representa uma curva de viabilidade celular e daí obter a equação da reta  $y = -16,916x + 96,55$  ( $R^2 = 0,978$ ), a partir da qual é possível identificar as doses letais para a linhagem celular em questão.

**Tabela 5.** Relação entre a viabilidade celular, dose letal, concentração de lipídio catiônico e o volume de nanoemulsão correspondentes

Viabilidade (%)	Dose Letal (DL)	Concentração de EA ( $1 \times 10^{-5}$ mol/L)	Volume de Nanoemulsão ( $\mu\text{L}$ )
90	10	0,3874	1,30
70	30	1,5697	5,28
50	50	2,7520	9,27

Estes resultados são interessantes quando se deseja compara-los aos volumes necessários aos ensaios de transfecção, de forma a prever a viabilidade deste último ensaio. Para o volume necessário aos ensaios de transfecção, que normalmente adota o uso de 1  $\mu\text{g}$  de plasmídeo, e considerando as mesmas condições adotadas no ensaio de viabilidade celular (placas de seis poços), nosso sistema apresentaria 81,49% de células vivas. A relação de nitrogênio:fosfato (N:P)

que permite relacionar o quantitativo ( $\mu\text{g}$ ) de pDNA e o volume de nanoemulsão ( $\mu\text{L}$ ) e, por conseguinte, calcular a viabilidade para o volume, é mostrado no tópico 5.6 (Preparação do Lipoplexo).

Esses dados nos permitem constatar que a toxicidade aumenta com o aumento da quantidade de lipídeo catiônico (72-73) o que é corroborado pela razão de cargas entre nitrogênio e fosfato: quanto maior a razão, maior a toxicidade (72, 74)

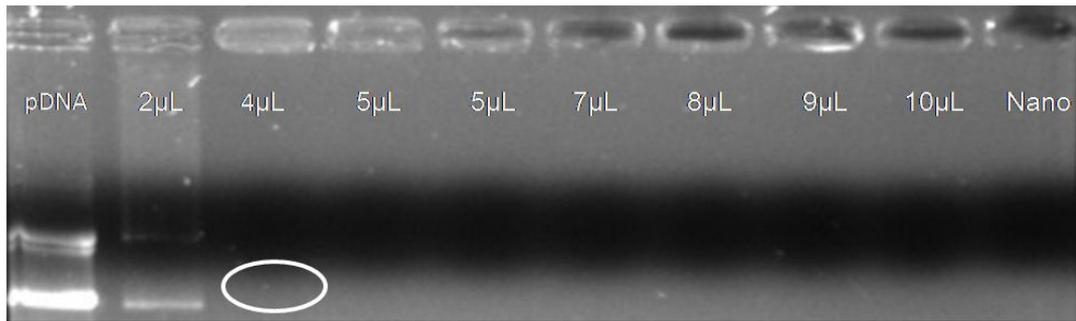
O aumento na toxicidade do nosso sistema pode estar relacionado também aos tensoativos, pois estes têm alto poder de desestabilização de membranas. Aumentando o volume de nanoemulsão nos poços, aumenta-se a quantidade real de tensoativo adicionado, com isto, dependendo do volume, a mortalidade pode chegar a 100% das células (27).

## 5.6 PREPARAÇÃO DO LIPOPLEXO

A preparação do lipoplexo consiste basicamente em colocar em contato o material genético e o sistema catiônico desenvolvido. Neste contato, ocorre uma interação eletrostática entre o radical fosfato do material genético (carregado negativamente) e o grupamento amina presente na cabeça polar do tensoativo catiônico (7, 14, 16-18).

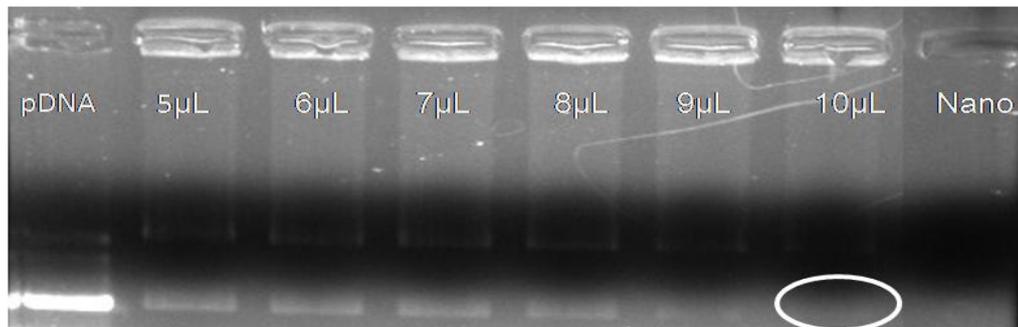
O tensoativo catiônico (estearilamina) foi incorporado ora na fase aquosa (FA), ora na fase oleosa (FO). A caracterização de ambos os sistemas não mostrou diferenças significativas (Figuras 17 e 18) (Tabela 5). Contudo, os sistemas apresentaram diferenciado poder de compactação do material genético. Embora em diferentes proporções de pDNA/nanoemulsão conseguiu-se 100% de compactação do material genético por ambos os sistemas, FA e FO (Figuras 15 e 16).

Quando a estearilamina foi incorporada na fase aquosa,  $4\mu\text{L}$  de nanoemulsão foi necessário para complexar completamente o material genético ( $115\text{ ng}/\mu\text{L}$ ). A Figura 15 indica que aumentando as razões de complexação acima de  $115\text{ ng}/\mu\text{L}$ , não é mais possível verificar a formação de bandas no gel, indicando completa complexação do pDNA (61).



**Figura 15** - Perfil de compactação de pIRES2-EGFP por volumes crescentes de nanoemulsão FA – Cada poço contém 460 ng de pDNA.

O sistema que teve o tensoativo catiônico incorporado à FO necessitou de maiores quantidades de nanoemulsão para complexar a mesma quantidade de pDNA (460 ng) utilizada no ensaio de complexação realizado para FA (Figura 16). Neste caso a complexação ocorreu quando adicionou-se 10 µL de nanoemulsão (46 ng/µL).



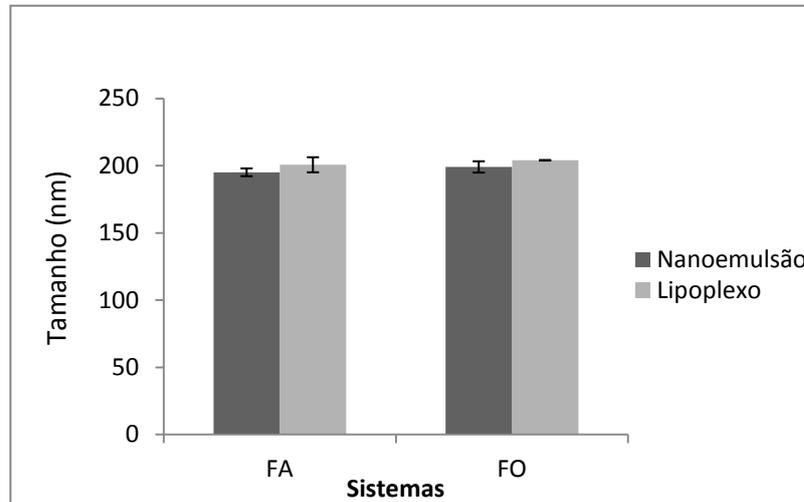
**Figura 16.** Perfil de compactação de pIRES2-EGFP por volumes crescente de nanoemulsão FO – Cada poço contém 460 ng de pDNA.

Os resultados obtidos nos ensaios de complexação com FA e FO podem estar relacionados ao uso de Tween 80<sup>®</sup> na formulação desses sistemas (61). O efeito estérico relacionado a este componente pode tornar difícil a complexação do sistema com a molécula de pDNA (60). Isto está de acordo com o trabalho de Matulis et al. (2002) (75) que descreveram o modelo de ligação onde a cabeça polar está próxima ao grupamento fosfato do DNA enquanto a calda apolar está perpendicular à superfície do DNA.

Considerando que para a formulação do lipoplexo é necessário adicionar material genético ao sistema, realizou-se a caracterização físico-química de ambas as formulações (FA e FO) e de seus respectivos lipoplexos.

Pode-se observar que tanto as nanoemulsões (FA e FO) quanto os seus respectivos lipoplexos (115 ng/µL e 46 ng/µL) apresentam tamanho médio de 200

nm, havendo um leve e desprezível aumento no tamanho dos lipoplexos em relação às nanoemulsões (Figura 17).



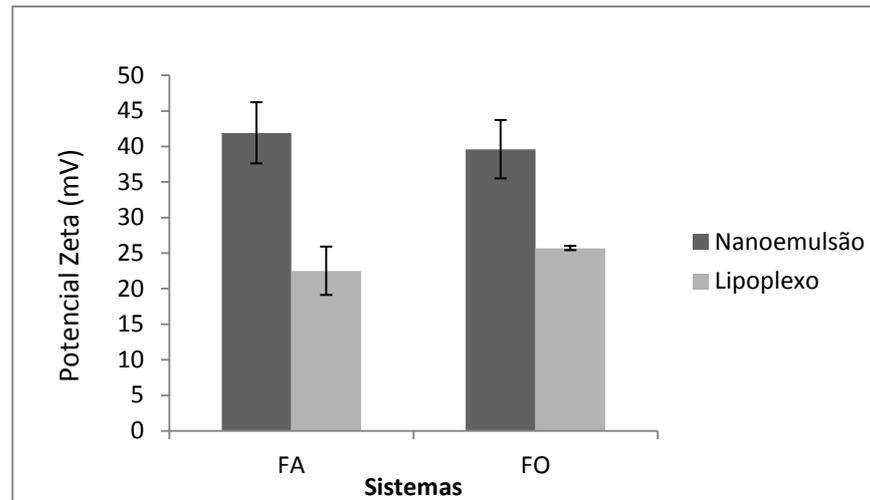
**Figura 17** - Granulometria das formulações FA e FO e de seus respectivos lipoplexos - concentração de pDNA: FA 115 ng/μL; FO 46 ng/μL.

Outro dado importante é que os valores de polidispersão das formulações mantiveram-se dentro da faixa adequada, mesmo com a adição material genético. Indicando que o sistema continuou homogêneo (Tabela 5).

**Tabela 6** - Índice de Polidispersão para nanoemulsões FA e FO e respectivos lipoplexos.

Formulação	PI (± DP)
<b>FA</b>	0,185 ± 0,015
<b>Lipoplexo - FA</b>	0,177 ± 0,027
<b>FO</b>	0,185 ± 0,004
<b>Lipoplexo - FO</b>	0,213 ± 0,010

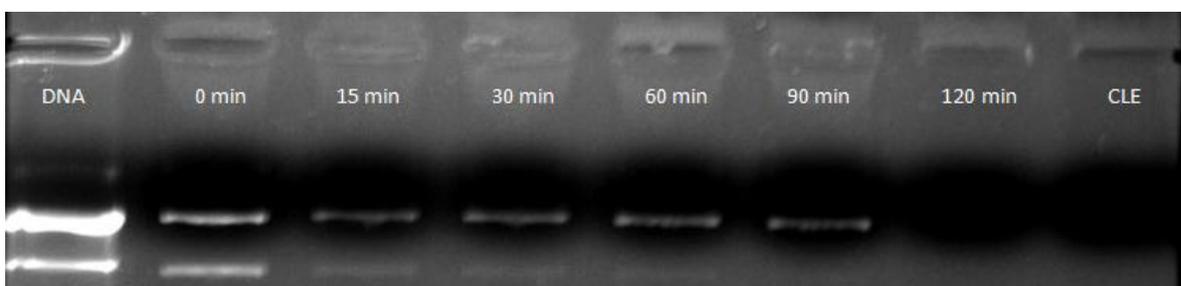
Considerando que o potencial zeta é uma ferramenta capaz de prever a estabilidade do sistema, esse parâmetro foi verificado para as nanoemulsões e seus lipoplexos. As formulações FA e FO apresentaram potencial zeta de aproximadamente 40 mV enquanto para os lipoplexos, observamos diminuição desse valor para 22,5 e 25,7 mV para os lipoplexos de FA e FO, respectivamente. Tal resultado pode ser explicado pela adição de carga negativa proveniente do pDNA, tornando o potencial zeta menos positivo (Figura 18).



**Figura 18** - Potencial zeta das nanoemulsões FA e FO e seus respectivos lipoplexos.

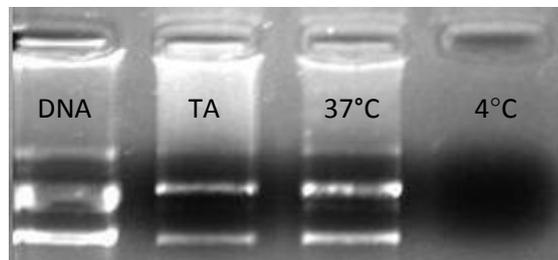
A estearilamina é capaz de tornar a superfície da gotícula positiva (11-12). Essa característica permite que a carga resultante do lipoplexo também seja positiva, fator importante para a interação com a carga negativa da superfície celular, que facilita o processo de transfecção (19).

Em se tratando de sistemas não virais em terapia gênica, os cientistas trabalham com variados tempos de complexação do material genético. O que parece ser dependente não só da formulação como também do tipo de material genético que se deseja carrear (1, 7-8, 11, 15, 62, 76). O que nos leva a crer que o melhor tempo de compactação é determinado de modo experimental. Nossos estudos revelam que o melhor tempo de complexação para o pIRES2-EGFP em nanoemulsão catiônica com estearilamina incorporada à fase aquosa é de 120 minutos, uma vez que nos tempos inferiores testados ainda é possível visualizar a formação de bandas eletroforéticas (Figura 19.)



**Figura 19** - Perfil da influência do tempo na complexação de pIRES2-EGFP por nanoemulsão catiônica contendo estearilamina.

Normalmente, os ensaios de complexação se dão à temperatura ambiente (TA) (7, 11-13, 15, 62, 76). No entanto, sabe-se que de acordo com a temperatura do meio, os plasmídeos podem apresentar estruturas conformacionais diferenciadas (34, 77). Analisamos a complexação do plasmídeo pela nanoemulsão FA em três temperaturas: 4 °C, 25 °C e 37 °C. Os resultados obtidos neste ensaio indicam que a diminuição da temperatura favoreceu a formação do lipoplexo, o que pode ser evidenciado pela ausência de bandas na temperatura de 4 °C e pela diminuição na intensidade da banda na temperatura de 25 °C, comparada à banda da temperatura de 37 °C (Figura 20).



**Figura 20** – Perfil eletroforético da temperatura do meio de complexação na formação do lipoplexo de pIRES2-EGFP e nanoemulsão catiônica contendo estearilamina.

Em baixas temperaturas o pDNA tende a apresentar-se superenovelado (SC) (78), o que lhe confere menor volume e pode facilitar o processo de compactação. Por outro lado, elevando a temperatura, a macromolécula tende a se apresentar mais relaxada, com ganho de volume (78) e por consequência, maior dificuldade de complexação do material genético pelo sistema catiônico. Além disso, estudos demonstram que em altas temperaturas, as interações entre os lipídeos catiônicos e o DNA são enfraquecidas (75).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de sistemas não virais para a terapia gênica pode solucionar a maioria dos problemas relacionados aos vetores virais, marcadamente efeitos relacionados à segurança destes vetores como o desenvolvimento de resposta imune e inflamatória, além de problemas de mutagênese insercional. Contudo, aplicações clínicas desta abordagem terapêutica requerem o desenvolvimento de eficientes veículos de entrega.

Considerando o supracitado, neste trabalho:

- Construímos um diagrama de fases pseudo-ternário que apresentou regiões de emulsão, emulsão viscosa, microemulsão e nanoemulsão;
- Formulamos uma nanoemulsão com baixo teor de tensoativos;
- Confirmamos a formação do sistema por diluições consecutivas sem alteração no tamanho de gotícula;
- Testamos e confirmamos a possibilidade de escalonamento de produção, enfatizando a importância do tempo de sonicação neste processo;
- Acompanhamos a estabilidade do sistema em três diferentes temperaturas, e confirmamos que para maior longevidade do sistema, este deve ser condicionado a frio;
- Esterilizamos o sistema por meio de filtração;
- Testamos a toxicidade *in vitro* da nanoemulsão, e confirmamos sua biocompatibilidade para células MRC5;
- Formamos de maneira eficiente um complexo de pDNA e nanoemulsão (lipoplexo);
- Identificamos os fatores físicos que influenciam a formação do lipoplexo, a citar: tempo de complexação, temperatura do meio de complexação e fase de incorporação do lipídeo catiônico;

Desenvolver sistemas não virais para terapia gênica não é uma tarefa simples e um grande número de variantes podem influenciar a formação dos sistemas nanotecnológicos. Embora os modelos de interação entre os lipídeos catiônicos e o material genético tenham sido desenvolvidos, este processo é ainda pouco entendido.

Contudo, pode-se concluir que as nanoemulsões contendo estearilamina obtidas neste estudo são possíveis veículos não virais para terapia gênica e podem ser utilizadas para posteriores estudos de transfecção *in vitro* e *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yue Y, Jin F, Deng R, Cai J, Dai Z, Lin MCM, et al. Revisit complexation between DNA and polyethylenimine — Effect of length of free polycationic chains on gene transfection. *Journal of Controlled Release*. [doi: 10.1016/j.jconrel.2011.03.020]. 2011;152(1):143-51.
2. Dani SU. The challenge of vector development in gene therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999;32.
3. Castilho LR, Moraes ÂM, Augusto EFP, Butler M. *Animal Cell Technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy*. New York: Taylor & Francis; 2008.
4. Linden R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estudos Avançados*. 2010;24:31-69.
5. Giacca M, Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of Controlled Release*. 2012 Jul 20;161(2):377-88.
6. Jacobsen F, Mertens-Rill J, Beller J, Hirsch T, Daigeler A, Langer S, et al. Nucleofection: A new method for cutaneous gene transfer? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2006.
7. Dai Z, Gjetting T, Matthebjerg MA, Wu C, Andresen TL. Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through a mechanistic study of linear and branched PEI. *Biomaterials*. [doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.044]. 2011;32(33):8626-34.
8. Yue YA, Jin F, Deng R, Cai JG, Chen YC, Lin MCM, et al. Revisit complexation between DNA and polyethylenimine - Effect of uncomplexed chains free in the solution mixture on gene transfection. *J Control Release*. 2011 Oct 10;155(1):67-76.
9. Verissimo LM, Agnez Lima LF, Monte Egito LC, de Oliveira AG, Tabosa do Egito ES. Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. *Journal of Drug Targeting*. 2010 Jun;18(5):333-42.

10. Abdallah B, Sachs L, Demeneix BA. Non-viral gene transfer: Applications in developmental biology and gene therapy. *Biology of the Cell*. [doi: DOI: 10.1016/0248-4900(96)89122-2]. 1995;85(1):1-7.
11. Teixeira H, Rosilio V, Laigle A, Lepault J, Erk I, Scherman D, et al. Characterization of oligonucleotide/lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids. *Biophys Chem*. 2001;92(3):169-81.
12. Martini E, Fattal E, de Oliveira MC, Teixeira H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008 Mar 20;352(1-2):280-6.
13. Bruxel F, Cojean S, Bochot A, Teixeira H, Bories C, Loiseau PM, et al. Cationic nanoemulsion as a delivery system for oligonucleotides targeting malarial topoisomerase II. *International Journal of Pharmaceutics*. [Article]. 2011 Sep;416(2):402-9.
14. Verissimo LM, Lima LFA, Egito LCM, de Oliveira AG, do Egito EST. Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. *Journal of Drug Targeting*. 2010;18(5):333-42.
15. Tang R, Ji W, Wang C. Synthesis and characterization of new poly(ortho ester amidine) copolymers for non-viral gene delivery. *Polymer*. 2011 Feb 17;52(4):921-32.
16. Nam HY, Park JH, Kim K, Kwon IC, Jeong SY. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. *Archives of Pharmacal Research*. 2009;32(5):639-46.
17. Marty R, N'Soukpoe-Kossi CN, Charbonneau D, Weinert CM, Kreplak L, Tajmir-Riahi H-A. Structural analysis of DNA complexation with cationic lipids. *Nucleic Acids Research*. 2009 Feb;37(3):849-57.
18. Kwon SM, Nam HY, Nam T, Park K, Lee S, Kim K, et al. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier (vol 128, pg 89, 2008). *Journal of Controlled Release*. 2009 Nov 16;140(1):74-.

19. Williams PD, Kingston PA. Plasmid-mediated gene therapy for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2011 Sep 1;91(4):565-76.
20. Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgünes N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. [doi: DOI: 10.1016/j.ejps.2010.03.019]. 2010;40(3):159-70.
21. Badea I, Wettig S, Verrall R, Foldvari M. Topical non-invasive gene delivery using gemini nanoparticles in interferon-gamma-deficient mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007 Mar;65(3):414-22.
22. Rolland A, Sullivan SM. *Pharmaceutical Gene Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker; 2003.
23. Liu F, Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *Journal of Controlled Release*. [doi: DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00494-1]. 2002;78(1-3):259-66.
24. Lundstrom K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology*. 2003 Mar;21(3):117-22.
25. Bulamarque-Neto AC. *Terapia gênica: contribuição para uma abordagem farmacológica [Mestrado]*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
26. Cecchi CR. *Secreção de hormônio de crescimento de camundongo por queratinócitos humanos primários: perspectivas para um modelo animal de terapia gênica cutânea [Mestrado]*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
27. Brgles M ŠM, Halassy B, Forcic D, Tomašić J. Influence of charge ratio of liposome/DNA complexes on their size after extrusion and transfection efficiency. *International Journal of Nanomedicine*. 2012 25 January 2012;7(1):393-401.
28. Hsu CY, Uludag H. Effects of size and topology of DNA molecules on intracellular delivery with non-viral gene carriers. *BMC Biotechnol*. 2008;8:23.
29. De Laporte L, Cruz Rea J, Shea LD. Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials*. 2006;27(7):947-54.

30. Nardi NB, Teixeira LAK, Silva EFÁd. Terapia gênica. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2002;7:109-16.
31. Hobel S, Aigner A. Nonviral delivery platform for therapeutic RNAi: pegylated siRNA/cationic liposome complexes for targeting of the proto-oncogene bcl-2. *Future Oncol*. 2009 Feb;5(1):13-7.
32. Yue YA, Jin F, Deng R, Cai JG, Dai ZJ, Lin MCM, et al. Revisit complexation between DNA and polyethylenimine - Effect of length of free polycationic chains on gene transfection. *J Control Release*. 2011 May 30;152(1):143-51.
33. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine*. 2001 Jan;7(1):33-40.
34. Schleef M. *Plasmids for Therapy and Vaccination*. New York: Wiley-VCH; 2001.
35. Voß C, Schmidt T, Schleef M, Friehs K, Flaschel E. Production of supercoiled multimeric plasmid DNA for biopharmaceutical application. *Journal of Biotechnology*. 2003;105(3):205-13.
36. Lima JBM. *Efeito do grau de superenrolamento de plasmídeos na sua estabilidade estrutural e função biológica*. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2008.
37. Martínez-Salas E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999;10(5):458-64.
38. Semler BL, Waterman ML. IRES-mediated pathways to polysomes: nuclear versus cytoplasmic routes. *Trends in Microbiology*. 2008;16(1):1-5.
39. Ul-Hussain M, Dermietzel R, Zoidl G. Connexins and Cap-independent translation: Role of internal ribosome entry sites. *Brain Research*. 2012;1487(0):99-106.
40. Dai ZJ, Gjetting T, Matthebjerg MA, Wu C, Andresen TL. Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through

a mechanistic study of linear and branched PEI. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(33):8626-34.

41. Taira K, Kataoka K, Niidome T. *Non-Viral Gene Therapy: gene design and delivery*. Tokio: Springer; 2005.
42. Ansel HC, Popovich NG, Allen Jr LV. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. *Farmacotécnica*. 6 ed. São Paulo: Premier; 2000. p. 299-311.
43. Azzini RG. *Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos [Mestrado]*. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.
44. Prista LN, Alves AC, Morgado R. *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1981. p. 179-210 e 1125-81.
45. Ribeiro HM. *Teorias de estabilidade de emulsões cosméticas*. *Cosmetic & Toiletries*. 2002;14(4):88-92.
46. Qian C, Decker EA, Xiao H, McClements DJ. Physical and chemical stability of beta-carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chemistry*. 2012 Jun 1;132(3):1221-9.
47. Troncoso E, Aguilera JM, McClements DJ. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*. [doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.10.014]. 2012;27(2):355-63.
48. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*. [Article]. 2012;8(6):1719-29.
49. Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharm Res*. [Review]. 2011 May;28(5):978-85.
50. Lovelyn C, Attama AA. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2011;2:626-39.

51. Tadros T, Izquierdo R, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004 May 20;108:303-18.
52. Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20(1):338-44.
53. Koroleva MY, Yurtov EV. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*. 2012 2012;81(1):21-43.
54. Leong TSH, Wooster TJ, Kentish SE, Ashokkumar M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2009;16(6):721-7.
55. Liu C-H, Yu S-Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;79(2):509-15.
56. Silva AL, Alexandrino F, Verissimo LM, Agnez-Lima LF, Egito LCM, de Oliveira AG, et al. Physical Factors Affecting Plasmid DNA Compaction in Stearylamine-Containing Nanoemulsions Intended for Gene Delivery. *Pharmaceuticals*. 2012;5(6):643-54.
57. Chung H, Kim TW, Kwon M, Kwon IC, Jeong SY. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *Journal of Controlled Release*. 2001;71(3):339-50.
58. Martini É. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.
59. Yoo HS, Kwon SM, Kim YJ, Chung H, Kwon IC, Kim J, et al. Cationic lipid emulsions containing heavy oils for the transfection of adherent cells. *Journal of Controlled Release*. 2004;98(1):179-88.
60. Kim TW, Chung H, Kwon IC, Sung HC, Jeong SY. Optimization of lipid composition in cationic emulsion as in vitro and in vivo transfection agents. *Pharm Res*. 2001 Jan;18(1):54-60.

61. Liu C-H, Yu S-Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2010 Sep 1;79(2):509-15.
62. Kim TW, Kim YJ, Chung H, Kwon IC, Sung HC, Jeong SY. The role of non-ionic surfactants on cationic lipid mediated gene transfer. *Journal of Controlled Release*. 2002 Aug;82(2-3):455-65.
63. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
64. Ott G, Singh M, Kazzaz J, Briones M, Soenawan E, Ugozzoli M, et al. A cationic sub-micron emulsion (MF59/DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines. *Journal of Controlled Release*. 2002;79(1-3):1-5.
65. Jafari SM, He YH, Bhandari B. Nano-emulsion production by sonication and microfluidization - A comparison. *Int J Food Prop*. [Article]. 2006;9(3):475-85.
66. Baspinar Y, Borchert H-H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions-Is there a benefit of the positive charge? *International Journal of Pharmaceutics*. 2012 Jul 1;430(1-2):247-52.
67. Masmoudi H, Dréau YL, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;289(1-2):117-31.
68. van Ruth SM, Roozen JP, Posthumus MA, Jansen F. Volatile composition of sunflower oil-in-water emulsions during initial lipid oxidation: Influence of pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999 Oct;47(10):4365-9.
69. Hathout RM, Woodman TJ, Mansour S, Mortada ND, Geneidi AS, Guy RH. Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;40(3):188-96.
70. Xavier FH, Silva KGH, Farias IEG, Morais ARV, Alencar EN, Araujo IB, et al. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. *J Drug Deliv Sci Technol*. [Article]. 2012 Jul-Aug;22(4):367-72.

71. Yang Y, Leser ME, Sher AA, McClements DJ. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids*. 2013;30(2):589-96.
72. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release*. 2006;114(1):100-9.
73. Masotti A, Mossa G, Cametti C, Ortaggi G, Bianco A, Grosso ND, et al. Comparison of different commercially available cationic liposome–DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009;68(2):136-44.
74. Caracciolo G, Amenitsch H. Cationic liposome/DNA complexes: from structure to interactions with cellular membranes. *Eur Biophys J Biophys Lett*. [Review]. 2012 Oct;41(10):815-29.
75. Matulis D, Rouzina I, Bloomfield VA. Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: Roles of electrostatics and hydrophobicity. *Journal of the American Chemical Society*. 2002 Jun 26;124(25):7331-42.
76. Munier S, Messai I, Delair T, Verrier B, Ataman-Onal Y. Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: Comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties. *Colloids and Surfaces B- Biointerfaces*. 2005 Jul 10;43(3-4):163-73.
77. TseDinh YC, Qi HY, Menzel R. DNA supercoiling and bacterial adaptation: Thermotolerance and thermoresistance. *Trends in Microbiology*. 1997 Aug;5(8):323-6.
78. Witz G, Stasiak A. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Research*. 2010 Apr;38(7):2119-33.

**APÊNDICES:**

- A** Physical Factors Affecting Plasmid DNA Compaction in Stearylamine-Containing Nanoemulsions Intended for Gene Delivery. **57**  
(**Pharmaceuticals** 5, 643-654) – Qualis B2.
- B** Development of a Cationic Nanoemulsion Intended to Gene Delivery **69**  
(Manuscrito)
- C** Trabalhos em Congressos – Derivados da Dissertação **82**

*Article*

## Physical Factors Affecting Plasmid DNA Compaction in Stearylamine-Containing Nanoemulsions Intended for Gene Delivery

André Leandro Silva <sup>1</sup>, Francisco Alexandrino Júnior <sup>1</sup>, Lourena Mafra Verissimo <sup>1</sup>, Lucymara Fassarella Agnez-Lima <sup>2</sup>, Lucila Carmem Monte Egito <sup>3</sup>, Anselmo Gomes de Oliveira <sup>4</sup> and Eryvaldo Socrates Tabosa do Egito <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Sistemas Dispersos (LASID), Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brazil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Petróleo, Laboratório de Análises Extratográficas, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal/RN, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista-Unesp, Rodovia Araraquara-Jaú Km 01, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mails: [socrates@ufrnet.br](mailto:socrates@ufrnet.br) or [socratesegito@gmail.com](mailto:socratesegito@gmail.com); Tel.: +55-84-9431-8816; Fax: +55-84-3342-9808.

*Received: 17 May 2012; in revised form: 9 June 2012 / Accepted: 13 June 2012 /*

*Published: 18 June 2012*

---

**Abstract:** Cationic lipids have been used in the development of non-viral gene delivery systems as lipoplexes. Stearylamine, a cationic lipid that presents a primary amine group when in solution, is able to compact genetic material by electrostatic interactions. In dispersed systems such as nanoemulsions this lipid anchors on the oil/water interface conferring a positive charge to them. The aim of this work was to evaluate factors that influence DNA compaction in cationic nanoemulsions containing stearylamine. The influence of the stearylamine incorporation phase (water or oil), time of complexation, and different incubation temperatures were studied. The complexation rate was assessed by electrophoresis migration on agarose gel 0.7%, and nanoemulsion and lipoplex characterization was done by Dynamic Light Scattering (DLS). The results demonstrate that the best DNA compaction process occurs after 120 min of complexation, at low temperature

( $4 \pm 1$  °C), and after incorporation of the cationic lipid into the aqueous phase. Although the zeta potential of lipoplexes was lower than the results found for basic nanoemulsions, the granulometry did not change. Moreover, it was demonstrated that lipoplexes are suitable vehicles for gene delivery.

**Keywords:** gene therapy; stearylamine; cationic lipid nanoemulsions

---

## 1. Introduction

Medicine is entering a new era of treatments in which doctors will be able to treat not only symptoms, but also the cause of genetic diseases [1]. Genes influence various human diseases in general by coding abnormal proteins that are responsible for the disease or determining susceptibility to environmental agents that induce them. The development of safe and effective carriers for gene delivery has attracted enormous attention in the last decades [2–5].

Recent advances in human genomics and gene delivery systems have made it possible to cure genetic or acquired diseases using gene therapy through the direct modulation of gene expression [4,6–10]. In this way, gene delivery works where defective genes need to be replaced or pathogenic gene expression needs to be inhibited [9,11]. Moreover, entirely new functions can be added to cells by gene transfer [12], thereby repairing the origin of the disease [6].

Recently, the importance of nanotechnology applied to gene delivery systems [8], in which gene transfer can be achieved by viral or non-viral vehicles has been strongly emphasized [3,9,13–15]. Cationic nanoemulsions have been investigated as non-viral gene carriers in therapeutic gene delivery [8,10,11,16–18] due to the disadvantages related to the use of viral vectors (scale-up control, immunogenicity, oncogenicity, and the limited size of nucleic acid that can be packed) [8,10,19–21]. These systems consist of two immiscible liquids containing an oil core (natural or semi-synthetic) stabilized by co-surfactants and cationic surfactants, which are responsible for the positive charge in the droplet surface. The presence of cationic surfactants allows the complexation with the negatively charged DNA via electrostatic interactions [2,8,20–24], resulting in DNA compaction and consequently nanocomplex formation of emulsion/DNA [10]. Besides, cooperative hydrophobic interactions between aliphatic tails might be important in this process [24,25]. Stearylamine, a cationic lipid, is reported to be a suitable cationic surfactant for gene delivery [10,16,17].

The goal of this work was to evaluate the influence of physical factors in the formation of lipoplexes between a cationic nanoemulsion and a plasmidial DNA (pIRES2-EGFP) as a model. Several pieces of evidence lead to the supposition that different temperatures [25,32–34], time of complexation [11,15–17,20], and place of the incorporation phase of the cationic lipid into the systems [10,25,27] might have some influence on the lipoplex formation.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Chemicals

Stearylamine, sorbitan monooleate (Span<sup>®</sup> 80), and poly(oxyethylene sorbitan monooleate) (Tween<sup>®</sup> 80) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Medium-chain triglycerides (Captex<sup>®</sup> 355) were donated by Abitech (Columbus, OH, USA). The water used in this study was freshly purified by a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Molsheim, France). All reagents were used without further purification.

### 2.2. Plasmid PIRES2-EGFP DNA (pDNA)

The plasmid pIRES2-EGFP was amplified in *Escherichia coli* (strain DH10B) and extracted by MidiPrep [26]. The purity of the plasmidial DNA (pDNA) was measured by OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> (1.85–1.90; OD, optical density) and electrophoresis in a 0.7% agarose gel. pDNA was resuspended in pure water (Milli-Q) and frozen in aliquots.

### 2.3. Preparation of Cationic Lipid Nanoemulsions (CLNs)

The nanoemulsions were produced by the sonication method. Briefly, the aqueous phase components were weighed and mixed with pure water (Milli-Q). The mixture was sonicated for 3 minutes using a probe sonicator at 30 W (VCX600, Sonics and Materials, Danbury, CT, USA). This mixture was added into the oily phase, which was 50 ng of Captex<sup>®</sup> 355 per mg of nanoemulsion, and sonicated for 4 min in an ice-water bath and, then, stored at 4 °C. In order to evaluate possible changes in the physicochemical properties of the nanoemulsions containing stearylamine (CLN) and consequently variations in the complexation efficiency, two different CLNs were formulated, in which the cationic lipid stearylamine was dispersed into the water phase (CLN<sub>1</sub>) or into the oily phase (CLN<sub>2</sub>), as described in Table 1.

**Table 1.** Composition of the CLNs: CLN with stearylamine dispersed into aqueous phase (CLN<sub>1</sub>) or CLN with stearylamine dispersed into oily phase (CLN<sub>2</sub>).

Component	CLN <sub>1</sub> % <sub>(w/w)</sub>	CLN <sub>2</sub> % <sub>(w/w)</sub>
<b>Oily phase</b>		
Captex <sup>®</sup> 355 (TCM)	5	5
Span <sup>®</sup> 80	0.8	0.8
Stearylamine	-	0.16
<b>Aqueous phase</b>		
Tween <sup>®</sup> 80	1.20	1.20
Stearylamine	0.16	-
Water qsp.	100	100

#### 2.4. Particle Size and Zeta Potential Analysis

The mean particle size and zeta potential of the CLN and lipoplexes (at the best pDNA/CLN ratio, which was 2.3 (2.3 ng of pDNA per 1 ng of CLN<sub>1</sub>) and 0.92 (0.92 ng of pDNA per 1 ng of CLN<sub>2</sub>, found by the compaction process assay)) were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) and phase analysis light scattering, respectively (Brookhaven ZetaPALS, Holtsville, NY, USA). The formulations were diluted with distilled water by 300-fold before the measurement.

#### 2.5. Preparation of PDNA/CLN Complexes

##### 2.5.1. Influence of the Stearylamine Loading Process at the Water or Oil Phase on the PDNA Compaction Process

To analyze the efficiency in the compaction process of the formulations, both CLN<sub>1</sub> and CLN<sub>2</sub> were left in contact with pDNA (460 ng/well or 4.60 ng of pDNA per ng of oil phase of CLN<sub>1</sub> in the case of pDNA/CLN ratio 4.60) for 30 min at room temperature (RT – 25 ± 2°C) at increasing amounts of CLN ranging from 5 µL to 50 µL. After the preliminary results from such CLN volume variation, a screening was done at a narrow interval from 2 µL to 10 µL (Table 2). Although the volume inside the well varied, the pDNA concentration remained constant at 460 ng/well. In fact, because the full lipoplex volume will be used for the gel running and the volume variation did not affect the pDNA state by itself, the gel running would present the same bend intensity if no lipoplex were formed. It is important to note that CLN has 5% (w/w) of oil. This corresponds at 50 ng of Captex<sup>®</sup> 355 per 1 mg (or 1 µL) of nanoemulsion. Because the oil content has a direct relationship with the number of droplets into the CLN system, and by consequence the state in which the pDNA was found into the media, this value was used to establish the pDNA/CLN ratio.

**Table 2.** Study concentration of CLN and its corresponding pDNA/CLN ratio.

CLN (µL)	pDNA(ng)/CLN(ng oil phase) ratio
2	4.60
4	2.30
5	1.84
6	1.53
7	1.31
8	1.15
9	1.02
10	0.92

##### 2.5.2. Influence of the Time of Complexation

Because CLN<sub>1</sub> presented a better compaction process compared to CLN<sub>2</sub>, different times of contact between pDNA and CLN<sub>1</sub> (at the best pDNA/CLN<sub>1</sub> ratio, found by the compaction process assay) were assessed at 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min. This experiment was conducted at RT.

### 2.5.3. Influence of the Temperature on the Lipoplex Formation

To analyze the influence of temperature in the compaction process assay, three different temperatures were evaluated: RT,  $37 \pm 2$  °C and  $4 \pm 1$  °C (ice-bath). Again, CLN<sub>1</sub> formulation was used as the reference due to the results obtained in the compaction process assay. pDNA (4.60 ng of per ng of internal phase of CNL<sub>1</sub>) was mixed and left in contact for 30 min.

### 2.6. Efficiency of Complexation by Electrophoresis Assay

The complexes were loaded onto 0.7% agarose gel containing ethidium bromide (0.5 mg/mL) using 40 mM Tris acetate and 1mM EDTA as buffer. Gel was run at 80 mV for 60 min and the trapping efficiency of pDNA by CLNs was determined as the DNA was no longer accessible to ethidium bromide intercalation by the assay of gel electrophoresis [20].

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Particle Size and Zeta-Potential Characteristics

DLS analysis of CLNs and lipoplexes ensured that the produced systems were at nanoscale dimensions (Table 3). It is important to note that the pDNA in stock solution-presented a mean particle size of  $52.2 \pm 0.6$ nm. It should be emphasized that this size is given as a purpose of comparison with the CLN size. In fact, hydrodynamic volume (which is measured by the DLS) changes according the kind of coiled in which the plasmid has been presented.

**Table 3.** Characterization (Size, Polydispersity Index (PI) and Zeta Potential) of CLNs and lipoplexes (CLN<sub>1</sub> – 1.60 pDNA/CLN<sub>1</sub> ratio; CLN<sub>2</sub> – 0.64 pDNA/CLN<sub>2</sub> ratio).

Formulation	Size (nm) $\pm$ SD	PI ( $\pm$ SD)	Zeta Potential (mV) $\pm$ SD
CLN <sub>1</sub>	195.1 $\pm$ 2.9	0.185 $\pm$ 0.015	41.9 $\pm$ 4.3
CLN <sub>1</sub> -lipoplex	200.7 $\pm$ 4.2	0.177 $\pm$ 0.027	22.5 $\pm$ 3.4
CLN <sub>2</sub>	199.1 $\pm$ 4.2	0.185 $\pm$ 0.004	39.6 $\pm$ 4.1
CLN <sub>2</sub> -lipoplex	204.0 $\pm$ 0.2	0.213 $\pm$ 0.010	25.7 $\pm$ 0.3

CLNs presented particle sizes smaller than 200 nm, for both CLN<sub>1</sub> and CLN<sub>2</sub>. After lipoplex formation, no significant increase in droplet size was found for either CLN<sub>1</sub> or CLN<sub>2</sub>, probably because the pDNA was not only adsorbed, but also condensed on the droplet surface, and its negligible concentration (460 ng) does not induce enough surface volume charge to improve the nanoemulsion droplet size.

The Polydispersity Index (PI) was around 0.2 for all formulations (Table 3). Moreover, the droplet size distribution of the systems was quite homogeneous and not influenced by the lipoplex formation generated between pDNA and CLN.

As can be observed by the positive values of zeta potential, stearylamine gives a positive charge to the droplet surface. Zeta potential results were around +40 mV for both CLN<sub>1</sub> and CLN<sub>2</sub>, which not only provides enough positive charges for lipoplex formation, but also provides CLN stability by

electrostatic repulsion. When lipoplexes were formed, zeta potential decreased (Table 3). This could be explained by the negative charge from the pDNA being added to the system, thereby turning the zeta potential less positive.

This result is quite interesting because although the complexation study revealed that CLN<sub>1</sub>, which has stearylamine at the outermost oil/water interface, possesses different behavior concerning lipoplex formation compared to CLN<sub>2</sub>, which has stearylamine at the innermost oil/water interface, both products presented the same zeta potential. This is probably due to the migration of the stearylamine from the innermost to the outermost interface induced by the dilution process of 300 fold, mandatory for this assay.

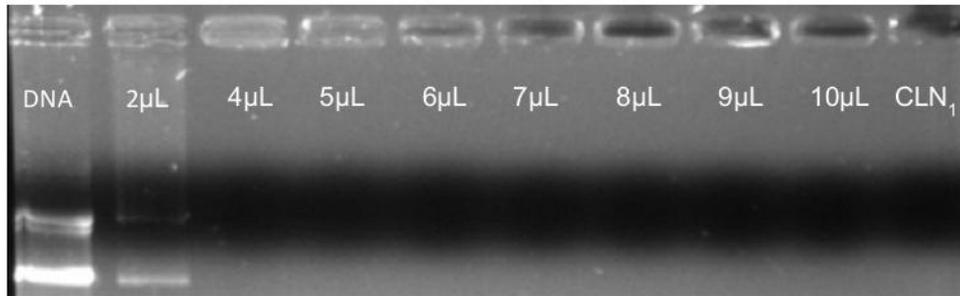
### 3.2. Effects of Stearylamine Loading Phase on the pDNA/CLN Complexation

Although at different pDNA/CLN ratios, 100% of DNA compaction was achieved by diluting the pDNA solution with both CLN<sub>1</sub> and CLN<sub>2</sub>. The presence of the CLN droplets at pDNA/CLN ratio above 2.30 for CLN<sub>1</sub> and above 0.92 for CLN<sub>2</sub> (Table 2), in which a high amount of droplets exists, induces totally complex formation and no free pDNA could be seen in the gel bend. Complexation is possible due to electrostatic interactions between the positively charged stearylamine head group (which is located on the oil/water interface) and the negatively charged phosphate anchor from the pDNA [5,6,8,16].

Matulis *et al.* have demonstrated by thermodynamic assays that condensation is dependent on DNA concentration [25]. In this way, from the data set revealed by CLN<sub>1</sub>, 4  $\mu$ L of CLN<sub>1</sub> was enough to completely condense the genetic material. Figure 1 shows that by increasing the DNA/CLN ratio higher than 2.30 pDNA/CLN<sub>1</sub> ratio, no free pDNA can be seen, which means that the 460 ng of pDNA was completely condensed with 4  $\mu$ L of CLN<sub>1</sub>.

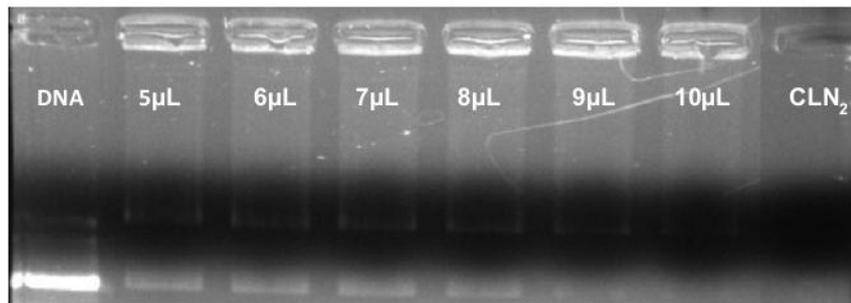
It is known that polyethylene glycol (PEG) domains present in Tween<sup>®</sup> 80 avoid oil droplet aggregation in emulsions [10]. This is also related to a steric effect (because of those mentioned PEG domains) for Tween<sup>®</sup> 80, which could make the entrapment of the pDNA molecule [27] difficult. When stearylamine is placed into the aqueous phase, Tween 80<sup>®</sup> might be placed on the oil/water surface and the stearylamine could be located more externally at the outermost surface of the drop, minimizing the steric effect from PEG. On the other hand, when stearylamine is loaded into the oil phase, the charge is there, but located in the innermost regions of the drop, which allows the steric effect from PEG to participate, and makes the complete complexation of pDNA difficult. It is important to note that, in this case, a probable partition of stearylamine into the two phases was negligible because the steric effect, which is dependent on the phase where stearylamine was placed, was demonstrated. This is in agreement with the works of Matulis *et al.*, who described a binding model where cationic head groups are near DNA phosphates while the aliphatic tails stand perpendicular to the DNA surface [25].

**Figure 1.** Influence of the CLN<sub>1</sub> amount on the compaction of pDNA.



Concerning CLN<sub>2</sub>, it was found that a larger amount of CLN was necessary to compact the same quantity of pDNA compared to CLN<sub>1</sub> (Figure 2). In this case, around 10 µL of CLN<sub>2</sub> (0.92 pDNA/CLN<sub>2</sub> ratio) was necessary to completely compact the 460 ng of the genetic material, which represents more than twice the volume of CLN<sub>1</sub>.

**Figure 2.** Influence of the CLN<sub>2</sub> amount on the compaction of pDNA.



Most of the time, complexation is done by adsorption of the genetic material to the cationic system by electrostatic interaction [16,17,19–21]. However, other methods could be used to ensure that the genetic material is loaded on the carrier. Nanoencapsulation of genetic material is another related approach [28]. This was demonstrated by Badea *et al.* [29], who produced nanoparticles where the genetic material was put into the formulation during the manufacturing process. Also, Kwon *et al.* [23] previously prepared nanoemulsions, added pDNA, and sonicated the mixtures in order to form lipoplexes. All these approaches are in agreement with our results. Moreover, a combination of two mechanisms, named electrostatic interaction and nanoencapsulation assembly, can play an important role in the pDNA complexation in CLN systems.

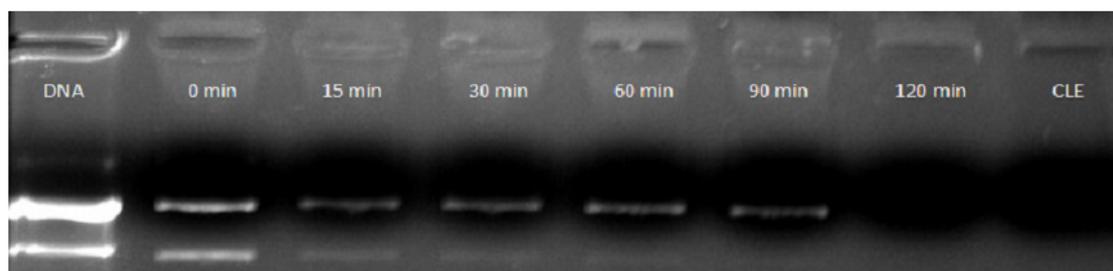
### 3.3. Time Effect on pDNA/CLN Complexation

Concerning non-viral gene delivery systems, the literature reports different times of complexation. It seems that there are no rules governing this variation and many different times are related to the complete complexation of genetic material. Time of complexation changes not only concerning the kind of genetic material, but also the different pharmaceutical systems. Tang *et al.* [20] worked with

two complexation times. They started complexing for 30 min and then reduced the time for 10 min of incubation at RT. Kim *et al.* [14] did nanoparticle complexing of pDNA for 1 hour at RT but Munier *et al.* [19] used 10 min as the time of complexation for their nanoparticles. Other authors working with nanoparticles have described achieving complete complexation in just 5 min [2,3,21]. Teixeira *et al.* [16] associated oligonucleotides with cationic nanoemulsions for 12 h. Martini *et al.* [17] used a similar system and associated the genetic material for 30 min and Bruxel *et al.* [11] for just 15 min. Concerning liposomes, there is also no pattern of complexation time [5,30,31]. Zhang *et al.* [15] evaluated complexation of both pDNA and siRNA for 20 min using a unique system and found different ratios of complexation according to the kind of genetic material. Therefore, it could be seen that each researcher chooses the best time of association experimentally, according to the kind of both formulation and genetic material [11,15–17,20].

This study reveals that for CLN 120 min is the best time of complexation (Figure 3). It was observed that after just adding the pDNA in contact with the CLN, lipoplexes were immediately generated in spite of the important amount of DNA that remained uncomplexed. With the time increasing, the intensity of the band diminished and, after 120 min, free pDNA was no longer observed, meaning that 100% of the pDNA was complexed and condensed.

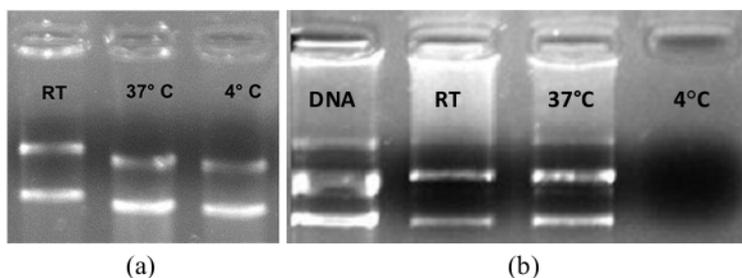
**Figure 3.** Time complexation of pDNA by CLN<sub>1</sub> (2.30 pDNA/CLN<sub>1</sub> ratio).



#### 3.4. Effects of the Environmental Temperature on the pDNA/CLN Complexation

Usually, complexation is done at RT [14,16,17,19,20]. In this study a comparison of three different temperatures [RT, “cold” temperature (4 °C), and “hot” temperature (37 °C)] was performed to observe whether there is any influence of temperature on the complexation efficiency (Figure 4). It was observed that the same amount of pDNA in the same time of complexation had differences in the complexation range. Naked pDNA was also analyzed at the three different temperatures, as a control, to ensure that there would be no difference in the gel visualization when the pDNA was maintained at different temperatures.

**Figure 4.** Influence of the environmental temperature on (a) naked pDNA (1  $\mu$ g per well, with a total mass of pDNA of 1,000 ng) and (b) pDNA/CLN<sub>1</sub> complex formation (158.75 ng of pDNA per  $\mu$ L of CNL<sub>1</sub>, with a total mass of pDNA of 1,270 ng).



As shown in Figure 4, at RT some compaction is achieved. However, it seems that by increasing the temperature to 37 °C less pDNA is packed. On the other hand, at 4 °C all the genetic material was packed by the CLN<sub>1</sub>. A crucial point is that at this temperature, naked DNA, although at lower mass concentration (1,000 ng), presented a bend on the running gel (Figure 4a). The reason is that, according to the temperature, plasmids should assume, more or less, the supercoiled form [32,33]. In fact, at high temperature, the pDNA assumes more relaxed forms and gains more volume. Inversely, at cold temperature it assumes less volume and becomes supercoiled [34] and more pDNA can be packed by the CLN. Furthermore, Matulis *et al.* demonstrated that at a higher temperature, the interaction between the cationic lipids with DNA is slightly weaker, due to the less favorable electrostatic and hydrophobic entropies and electrostatic enthalpy [25]. For a clinical approach, it is important to note that the transfection efficiency is highly dependent on the quality and conformation of the used DNA [35].

#### 4. Conclusions

The use of non-viral gene delivery systems for gene therapy can solve most of the drawbacks related to viral vectors such as any serious side effects related to its safety and the host immune and inflammatory responses. However, clinical application of this approach requires the development of safe and efficient delivery vehicles.

Developing non-viral gene delivery systems is not an easy task and a large number of variations can influence the final pharmaceutical and nanotechnological systems. Despite the fact that models of the interactions between cationic lipids and genetic materials have been developed, this process is still poorly understood. In this work it has been shown that temperature, cationic lipid phase incorporation, and time of complexation all play important roles in the formation of lipoplexes. In fact, these parameters could block the genetic carrier from complexing with the pDNA in order to form lipoplexes, which is mandatory for gene delivery. Moreover, the results presented here allow us to speculate that the stearylamine containing cationic nanoemulsions would be a suitable non-viral vehicle for gene therapy. However, further studies such as cytotoxicity, *in vitro*, and *in vivo* transfection assays are necessary to confirm this hypothesis.

### Acknowledgments

We would like to thank Capes for the Financial Support and Prof. Elias Fattal from the University of Paris XI for the funding support. The authors were also grateful to Glenn Hawes, from the University of Georgia, American Language Program, for editing this manuscript.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Rolland, A.; Sullivan, S.M. *Pharmaceutical Gene Delivery System*; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 2003.
2. Dai, Z.; Gjetting, T.; Matthebjerg, M.A.; Wu, C.; Andresen, T.L. Elucidating the Interplay between DNA-condensing and Free Polycations in Gene Transfection through a Mechanistic Study of Linear and Branched Pei. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8626–8634.
3. Yue, Y.; Jin, F.; Deng, R.; Cai, J.; Dai, Z.; Lin, M.C.M.; Kung, H.F.; Matthebjerg, M.A.; Andresen, T.L.; Wu, C. Revisit Complexation between DNA and Polyethylenimine — Effect of Length of Free Polycationic Chains on Gene Transfection. *J. Control. Release* **2011**, *152*, 143–151.
4. Geusens, B.; Strobbe, T.; Bracke, S.; Dynoodt, P.; Sanders, N.; Van Gele, M.; Lambert, J. Lipid-mediated Gene Delivery to the Skin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *43*, 199–211.
5. Ramezani, M.; Khoshhamdam, M.; Dehshahri, A.; Malaekheh-Nikouei, B. The Influence of Size, Lipid Composition and Bilayer Fluidity of Cationic Liposomes on the Transfection Efficiency of Nanolipoplexes. *Colloid Surface B* **2009**, *72*, 1–5.
6. Liu, F.; Huang, L. Development of Non-viral Vectors for Systemic Gene Delivery. *J. Control. Release* **2002**, *78*, 259–266.
7. De Ilarduya, C.T.; Sun, Y.; Duezguenes, N. Gene Delivery by Lipoplexes and Polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 159–170.
8. Verissimo, L.M.; Agnez Lima, L.F.; Monte Egito, L.C.; de Oliveira, A.G.; Tabosa do Egito, E.S. Pharmaceutical Emulsions: A new Approach for Gene Therapy. *J. Drug Targeting* **2010**, *18*, 333–342.
9. Kapoor, M.; Burgess, D.J.; Patil, S.D. Physicochemical Characterization Techniques for Lipid Based Delivery Systems for Sirna. *Int. J. Pharm.* **2012**, *427*, 35–57.
10. Liu, C.-H.; Yu, S.-Y. Cationic Nanoemulsions as Non-viral Vectors for Plasmid DNA Delivery. *Colloid. Surface. B.* **2010**, *79*, 509–515.
11. Bruxel, F.; Cojean, S.; Bochot, A.; Teixeira, H.; Bories, C.; Loiseau, P.M.; Fattal, E. Cationic Nanoemulsion as a Delivery System for Oligonucleotides Targeting Malarial Topoisomerase ii. *Int. J. Pharm.* **2011**, *416*, 402–409.
12. Cecchi, C.R.; Dagnaes-Hansen, F.; Gissel, H.; Gothelf, A.; Jakobsen, M.; Hansen, B.H.; Frystyk, J.; Oliveira, N.A.J.; Higtuti, E.; Bartolini, P.; Peroni, C.N.; Jensen, T.G. Non-viral Gene Transfer to Skin, Muscle and Liver for Expression of Growth Hormone. *Hum. Gene Ther.* **2011**, *22*, A86–A86.

13. Castilho, L.R.; Moraes, Â.M.; Augusto, E.F.P.; Butler, M. *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*; Taylor & Francis: New York, NY, USA, 2008.
14. Kim, I.S.; Lee, S.K.; Park, Y.M.; Lee, Y.B.; Shin, S.C.; Lee, K.C.; Oh, I.J. Physicochemical Characterization of Poly(l-lactic acid) and Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Nanoparticles with Polyethylenimine as Gene Delivery Carrier. *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 255–262.
15. Zhang, Y.; Li, H.; Sun, J.; Gao, J.; Liu, W.; Li, B.; Guo, Y.; Chen, J. Dc-chol/Dope Cationic Liposomes: A Comparative Study of the Influence Factors on Plasmid Pdna and Sirna Gene Delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *390*, 198–207.
16. Teixeira, H.; Rosilio, V.; Laigle, A.; Lepault, J.; Erk, I.; Scherman, D.; Benita, S.; Couvreur, P.; Dubernet, C. Characterization of Oligonucleotide/Lipid Interactions in Submicron Cationic Emulsions: Influence of the Cationic Lipid Structure and the Presence of Peg-lipids. *Biophys. Chem.* **2001**, *92*, 169–181.
17. Martini, E.; Fattal, E.; de Oliveira, M.C.; Teixeira, H. Effect of Cationic Lipid Composition on Properties of Oligonucleotide/Emulsion Complexes: Physico-chemical and Release Studies. *Int. J. Pharm.* **2008**, *352*, 280–286.
18. Wu, H.L.; Ramachandran, C.; Bielinska, A.U.; Kingzett, K.; Sun, R.; Weiner, N.D.; Roessler, B.J. Topical Transfection using Plasmid DNA in a Water-in-oil Nanoemulsion. *Int. J. Pharm.* **2001**, *221*, 23–34.
19. Munier, S.; Messai, I.; Delair, T.; Verrier, B.; Ataman-Onal, Y. Cationic pla nanoparticles for DNA Delivery: Comparison of Three Surface Polycations for DNA Binding, Protection and Transfection Properties. *Colloid. Surface. B.* **2005**, *43*, 163–173.
20. Tang, R.; Ji, W.; Wang, C. Synthesis and Characterization of New Poly(ortho ester amidine) Copolymers for Non-viral Gene Delivery. *Polymer* **2011**, *52*, 921–932.
21. Yue, Y.A.; Jin, F.; Deng, R.; Cai, J.G.; Chen, Y.C.; Lin, M.C.M.; Kung, H.F.; Wu, C. Revisit Complexation between DNA and Polyethylenimine - effect of Uncomplexed Chains Free in the Solution Mixture on Gene Transfection. *J. Control. Release* **2011**, *155*, 67–76.
22. Nam, H.Y.; Park, J.H.; Kim, K.; Kwon, I.C.; Jeong, S.Y. Lipid-based Emulsion System as Non-Viral Gene Carriers. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 639–646.
23. Kwon, S.M.; Nam, H.Y.; Nam, T.; Park, K.; Lee, S.; Kim, K.; Kwon, I.C.; Kim, J.; Kang, D.; Park, J.H.; Jeong, S.Y. In Vivo Time-dependent Gene Expression of Cationic Lipid-based Emulsion as a Stable and Biocompatible Non-viral Gene Carrier (vol 128, pg 89, 2008). *J. Control. Release* **2009**, *140*, 74–74.
24. Marty, R.; N'Soukpoe-Kossi, C.N.; Charbonneau, D.; Weinert, C.M.; Kreplak, L.; Tajmir-Riahi, H.-A. Structural Analysis of DNA Complexation with Cationic Lipids. *Nucl. Acid. Res.* **2009**, *37*, 849–857.
25. Matulis, D.; Rouzina, I.; Bloomfield, V.A. Thermodynamics of Cationic Lipid Binding to DNA and DNA Condensation: Roles of Electrostatics and Hydrophobicity. *J Am Chem Soc.* **2002**, *124*, 7331–7342.
26. Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001; Volume 1.

27. Kim, T.W.; Chung, H.; Kwon, I.C.; Sung, H.C.; Jeong, S.Y. Optimization of Lipid Composition in Cationic Emulsion as in Vitro and in Vivo Transfection Agents. *Pharmaceut. Res.* **2001**, *18*, 54–60.
28. Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Desigaux, L.; Allard, E.; Saulnier, P.; Lambert, O.; Benoit, J.-P.; Pitard, B. The Encapsulation of DNA Molecules within Biomimetic Lipid Nanocapsules. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3197–3204.
29. Badea, I.; Wettig, S.; Verrall, R.; Foldvari, M. Topical Non-invasive Gene Delivery Using Gemini Nanoparticles in Interferon-gamma-deficient Mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65*, 414–422.
30. Hirsch-Lerner, D.; Zhang, M.; Eliyahu, H.; Ferrari, M.E.; Wheeler, C.J.; Barenholz, Y. Effect of “Helper Lipid” on Lipoplex Electrostatics. *BBA-Biomembranes* **2005**, *1714*, 71–84.
31. Zuidam, N.J.; Barenholz, Y. Electrostatic and Structural Properties of Complexes Involving Plasmid DNA and Cationic Lipids Commonly Used for Gene Delivery. *BBA-Biomembranes* **1998**, *1368*, 115–128.
32. TseDinh, Y.C.; Qi, H.Y.; Menzel, R. DNA Supercoiling and Bacterial Adaptation: Thermotolerance and Thermoresistance. *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 323–326.
33. Schleef, M. *Plasmids for Therapy and Vaccination*. Wiley-VCH: New York, NY, USA, 2001.
34. Witz, G.; Stasiak, A. DNA Supercoiling and Its Role in DNA Decatenation and Unknotting. *Nucl. Acid. Res.* *38*, 2119–2133.
35. Walther, W.; Stein, U.; Voss, C.; Schmidt, T.; Schleef, M.; Schlag, P.M. Stability Analysis for Long-term Storage of Naked DNA: Impact on Nonviral *In Vivo* Gene Transfer. *Anal. Biochem.* **2003**, *318*, 230–235.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

**Stearylamine containing cationic nanoemulsion as a promise vehicle for gene therapy**

André L. Silva <sup>a,b</sup>; Lourena M. Veríssimo <sup>a,b</sup>; Lucymara F. Agnez-Lima <sup>c</sup>; Eryvaldo S. T. do Egito <sup>\*a,b</sup>.

<sup>a</sup> Laboratório de Sistemas Dispersos (LaSiD), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Farmácia. Natal – RN (Brazil);

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPgCF), Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal – RN (Brazil);

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências. Natal – RN (Brazil).

*\* Corresponding author:*

*Prof. E. Sócrates Tabosa do Egito*

*Rua Praia de Areia Branca, 8948, Natal-RN – 59094-450, Brazil.*

*Fone: +55 84 9431 8816*

*Fax: +55 84 3215 4346*

*E-mail: [socratesegito@gmail.com](mailto:socratesegito@gmail.com) or [socrates@ufrnet.br](mailto:socrates@ufrnet.br)*

## Abstract

Gene therapy is a promise to treat many health disorders in its origin by delivering exogenous genetic material into cells. Viral and no viral vehicles have been applied for its purpose and the drawbacks related to viral vehicles have stimulated the formulation of no viral ones, as cationic nanoemulsions. The aim of this work was to develop, scale-up, sterilize, analyze stability, toxicity and DNA-complexation efficiency of a nanoemulsion containing stearylamine. A Pseudo-Ternary Phase Diagram was constructed and one formulation point was chosen. Nanoemulsions smaller than 200nm and zeta potential greater than +30mV were produced. Sterilization by filtration method was the best sterilization option. Scaling the formulation up demonstrated an increase in its size but zeta potential did not change. Concerning stability studies, long-term stability study showed that the size increases and the zeta potential diminishes with the time. Besides, samples stored at 4 °C were stable by more than six months and those stored at 25 °C and 40 °C presented instability during this time. The toxicity in MRC-5 cells was dose-dependent and the system efficiently complexed the genetic material model. To conclude, the nanoemulsion developed is an available no viral vehicle to be tested for gene delivery purpose.

## Graphical abstract

## Keywords

Nanoemulsions; stearylamine; long-term stability; gene delivery; no viral vehicle; pDNA

### 1. Introduction

Gene therapy has appeared as a promising approach to prevention and treatment of acquired and genetic diseases (9, 55, 79-80). The suggested therapy is based on the transfer of an exogenous genetic material into the cell (81) mainly by replacing defective genes (82) and inhibiting pathogenic gene expression (83). However, to a successful approach, the genetic material must be efficiently delivered, targeting the nucleus (16).

With the targeting purpose two vehicle types are employed: viral and no viral. Viral vectors were firstly developed for gene delivery (84) due their natural ability to infect cells. However, there are many disadvantages related to its use, mainly concern safety (85). No viral vectors as liposomes (81), nanoparticles (86), nanoemulsions (9, 56, 87), dendrimers (88), etc. have been extensively investigated in the latest decades.

Concerning no viral vehicles, cationic nanoemulsions appear as a promising approach to gene delivery . It consists of two immiscible liquids containing an oil core stabilized by surfactants (including a cationic one, which is responsible for the positive charge in the droplet surface)(9, 16, 56, 87). They are capable to complex the genetic material (negatively charged) via electrostatic interactions (56, 74, 86-87, 89), forming lipoplexes, what in useful in gene targeting purpose (56, 90).

Being aware that the clinical success of gene therapy is critically dependent on the development of efficient and safe gene delivery systems (80, 85), the aim of this work was to develop and characterize a cationic nanoemulsion, as a possible vehicle to gene delivery. Besides, because nanoemulsions are related as a thermodynamic instable system, evaluate its long-term stability and its toxicity, *in vitro*.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Chemicals

Stearylamine, sorbitan monooleate (Span® 80), and poly(oxyethylene sorbitan monooleate) (Tween® 80) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Medium Chain Triglycerides (MCT) (Captex® 355) were donated by Abitech (Columbus, OH, USA). The water used in this study was freshly purified by a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Molsheim, France). All reagents were used without further purification.

### 2.2. Plasmid DNA (pIRES2-EGFP)

The plasmid pIRES2-EGFP was kindly donated by professor Carlos Menck (São Paulo University), amplified in *Escherichia coli* (strain DH10B) and extracted by MidiPrep (63).

## 3. Nanoemulsion formulation

### 3.1.1. Pseudo-Ternary Phase Diagram (PTPD)

To determine the range of components concentration for the nanoemulsion formulation, a PTPD was constructed, using the water titration method (50, 70). Tween® 80 (HLB value = 15) and Span® 80 (HLB value = 4.3) at 3:2 <sub>(w/w)</sub> ratio were used as surfactants. Nine formulation points (with ratio oil:surfactants ranging from 1:9 to 9:1) were sequentially diluted in water. Energy was supplied to the system by means of an ultrasonic probe for 2 minutes, followed by 2 minutes of ultrasound bath. Once formulated, the systems were visually rated in fluid emulsion (EM), viscous emulsion (VEM), microemulsion (ME), or phase separation (PS). Its respective regions were plotted in an equilateral triangle with one axis representing the aqueous phase, the second one representing oil and the third one representing a mixture of surfactants, at a fixed weight ratio.

### 3.1.2. Cationic nanoemulsion preparation

Cationic nanoemulsions were prepared adding the cationic surfactant stearylamine as described elsewhere (56) by sonication method. Briefly, the aqueous phase components were weighed and mixed with pure water (Milli-Q). The mixture was sonicated for 3 minutes using a probe sonicator (VCX600, Sonics and Materials, Danbury, CT, USA). This mixture was added into the oily phase and sonicated for 4 min in an ice-water bath. Samples were stored at 4 °C for further experiments.

### 3.2. Scale up study

In order to check if scaling up the production changes the characteristic of the final product, different volumes of nanoemulsion were produced: 10 mL, 20 mL, 50 mL and 100 mL. Characterization was done by macroscopic analysis, pH, conductivity, size and zeta potential measurements.

### 3.3. Characterization

#### 3.3.1. Particle size and Zeta potential analysis

The mean particle size and zeta potential of the nanoemulsions were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) and phase analysis light scattering, respectively (Brookhaven ZetaPALS, Holtsville, NY, USA). The formulations were diluted with distilled water 300-fold before the measurement (56).

#### 3.3.2. pH and Conductivity analysis

Electrodes of both, pHmeter (pH METER TEC-2, TECNAL) and conductivimeter (DM-32, DIGIMED), were straight inserted into the nanoemulsion samples after preparation. Changes in pH and conductivity indicate instability to emulsion systems.

### 3.4. Sterilization process

Two sterilization processes well established for liquids were applied: filtration through 0,22  $\mu\text{m}$  filter and autoclaving process (15 min at 1 atm and 121 °C). Then, characterization was done by macroscopic analysis, size and zeta potential measurements to evaluate if the system maintained its characteristics.

### 3.5. Stability evaluation

Long-term stability study was carried out by 6 months. Samples were stored at three different temperatures (4 °C, 25 °C and 40 °C). Zeta potential, hydrodynamic size and polydispersity index (PI) were measured in the formulation in the following days: 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup>, 90<sup>th</sup>, 120<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup>.

### 3.6. In vitro toxicity

Lung fetus human cells (MRC-5) were cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 10% FBS at 37° C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The cells were seeded at  $3 \times 10^5$  cells per well on 6-well plates, 24h before the assay. Subsequently, the cells were exposed to different nanoemulsion amounts (from 0 to 30  $\mu\text{L}$ ). Survivor cells were counted after 72h by taking the cell suspension and staining them with 10  $\mu\text{L}$  of 0.4% Trypan blue (1:1 molar ratio). The free-nanoemulsion well was used as a negative control and represented 100% of cell survival. The cell viability was evaluated by visual inspection under an optical microscope (73).

### 3.7. Plasmid preparation

The plasmid pIRES2-EGFP was amplified in *Escherichia coli* (DH10B strain) and extracted by MidiPrep (63). The purity of the plasmidial DNA (pDNA) was measured by  $OD_{260}/OD_{280}$  (OD – optical density) and electrophoresis in a 0.7% agarose gel. pDNA was resuspended in pure water (Milli-Q) and frozen in aliquots.

### 3.8. Lipoplex formation

The complexation of pIRES2-EGFP by cationic nanoemulsion was optimized previously (56). The lipoplex was formed adding 1 $\mu$ g of pDNA to 3 $\mu$ L of nanoemulsion (5.9 Nitrogen:Phosphate ratio) at 4 $^{\circ}$  C, for 2h. The complexes were loaded onto 0.7% agarose gel using 40 mM Tris acetate and 1mM EDTA as buffer. Gel was run at 80 mV for 60 min and the trapping efficiency of pDNA by nanoemulsion was determined as the DNA was no longer accessible to the stain (SyBr Green) intercalation by the assay of gel electrophoresis.

## 4. Results and Discussion

### 4.1. Nanoemulsion

Nanoemulsions present some advantages when compared to ordinary emulsions. Although thermodynamically unstable, they have greater surface and free energy, avoiding instability phenomenon as creaming, flocculation and phase separation (9, 50). To develop them, high and low energy methods could be employed (49). Ultrasonication is documented as a high energy method for fast formulate stable nanoemulsions with small droplet diameter and low polydispersity (52). In this method, droplets are formed due to cavitation bubble collapse and local release of substantial amount of energy (53). The application of ultrasound to produce nanoemulsions has been considered in several works (48, 52, 54, 56-57, 59) including this one. Nanoemulsion systems are composed by an oil core, stabilized by surfactants in aqueous medium. The components choice is usually done considering formulation stability and desired physical-chemical properties.

#### *Oil Choice*

There are indications that the size stability of emulsions changes greatly by changing oils (57). Both, natural and semi-synthetic oils can be employed in nanoemulsion preparation. Among vegetable ones, the soybean and flaxseed oils have been studied for gene therapy purpose (16, 87). Semi-synthetic oils, as MCT, also have been employed in nanoemulsions to gene delivery (11-12).

When choosing the oil core, it is important to remember that the oils presenting lower density than water forms well dispersed suspensions in cell culture medium (16). However, high density oils form more stable complex with DNA and show superior transfection activity on adherent cells (59).

Bruxel et al. (91) listed oils commonly used in nanoemulsion preparation. The MCT type appeared as one of the most employed due its solubility in water, when compared to Large Chain Triglycerides. This kind of oil (Captex 355®) was considered in this study.

#### *Surfactant Choice*

Cationic lipids have been employed to prepare liposomes intended to gene therapy and most of those lipids are available to nanoemulsion preparation (16). The chemical structure of cationic lipids varies in hydrophobic chain, linker and polar head group. Because of the inherit lipid toxicity, other surfactants must be employed in order of stabilizing the system.

To prepare nanoemulsions, surfactants, in general, are approved for human consumption (50) and the quantities used are significantly less than that required for microemulsions formation (49).

Non-ionic surfactants enhance the stability of nanoemulsions (16). Kim et al. (92) evaluated the role of non-ionic surfactants on cationic lipids mediating gene transfer and they found that Tween 80® increased both, gene transfection (it appears work as a helper lipid) and physical stability (avoiding formation of oil aggregates (55)). However, Tween 80® diminishes the compaction efficiency of the system (56, 92). Tween 80® and Span 80® when mixed, acts in a synergic way, changing the interfacial tension of oil-water mixtures (54) and improving the formulation physical stability (60). For this reason, they were chosen for the PTPD construction, at the Captex 355® critical HLB (10.5).

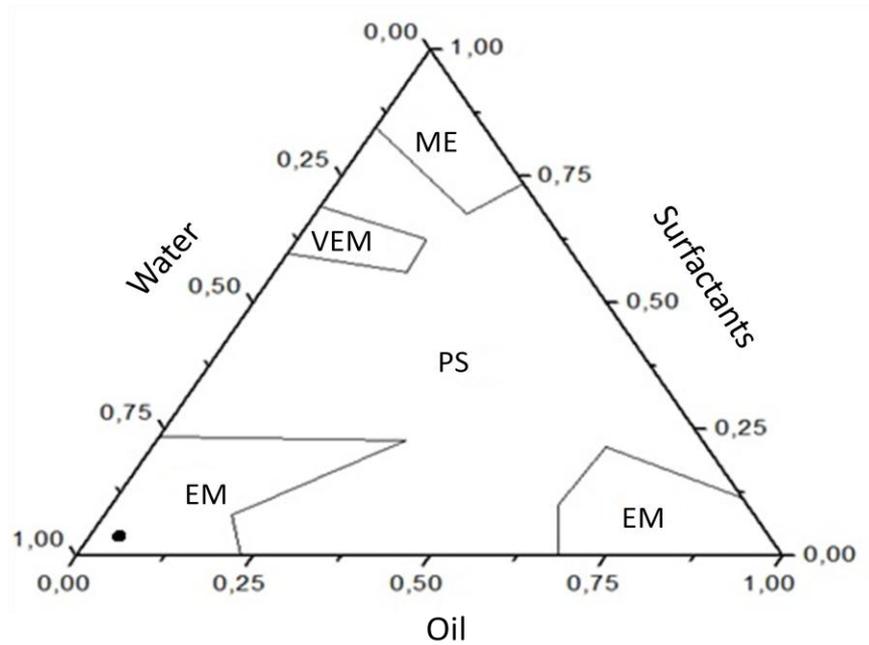
The addition of cationic lipids as stearylamine, oleilamine, 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (DOTMA), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), and others, presenting amine groups in its structures, give a positive charge to the system, which is mandatory to gene delivery (55, 91).

Steraylamine presents a primary amine group in the polar head and have been employed in nanoemulsions with gene therapy purpose (11-12, 56), including this one.

#### *Pseudo-Ternary Phase Diagram*

The PTPD was constructed with the components mentioned above and their concentrations determine the composition of polar, non-polar and surfactant phases that will yield the system (70).

The obtained results revealed that several types of emulsion systems (Fig. 1) were produced within the different water/oil/surfactants ratio. This corroborates with Nam et al. (16) that assures physical-chemical characteristics of nanoemulsions being controlled by varying their constituents.



**Fig. 1.** PTPD showing regions of Microemulsion (ME); Viscous Emulsion (VEM); Fluid Emulsion (EM); Phase Separation (PS) and the nanoemulsion chosen point.

Two regions of fluid emulsions, were found, one rich in water and other rich in oil. Microemulsion and a viscous emulsion were also found in the diagram. Once nanoemulsions are namely rich in water (49) and low oil concentration, a formulation point composed by 5% of Captex 355®, 1.2% of Tween 80®, 0.8% of Span 80® and 93% of pure water was chosen. An amount of 0.16% of stearylamine was added to the water phase, in order to give a cationic character to the system.

#### *Scale up*

To assess the scale up possibility, volumes of 10, 20, 50 and 100 mL were prepared. Augmenting the volume production results in increment in size ( $p < 0.05$ ). It occurred, probably, because the sonication time was maintained, not mind the final volume. However no change in zeta potential was observed as expected, because the amount of cationic lipid was adjusted to the volume produced.

Studies from Koroleva and Yurtov (53), Ghosh et al. (52) and Liu and Yu (55) relates the sonication time with the reduction in droplet size. The longer the sonication time is, the smaller the droplet size and polydispersity index are. Besides the time, the energy input influences the droplet size (52).

On the other hand, sonication method is related to preparation of small volumes, at laboratorial scale. To emulsificate large volumes, mechanical stirring may be required, as a supplement (53).

#### *Sterilization*

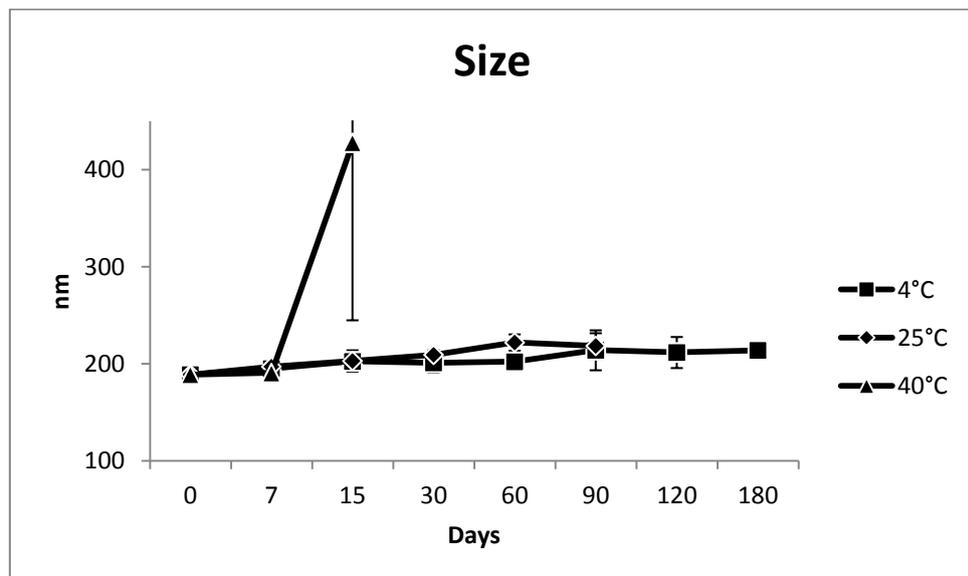
Due the system's biological end, a sterilization method that maintain its characteristics must be available. Two methods were tested: filtration and autoclaving.

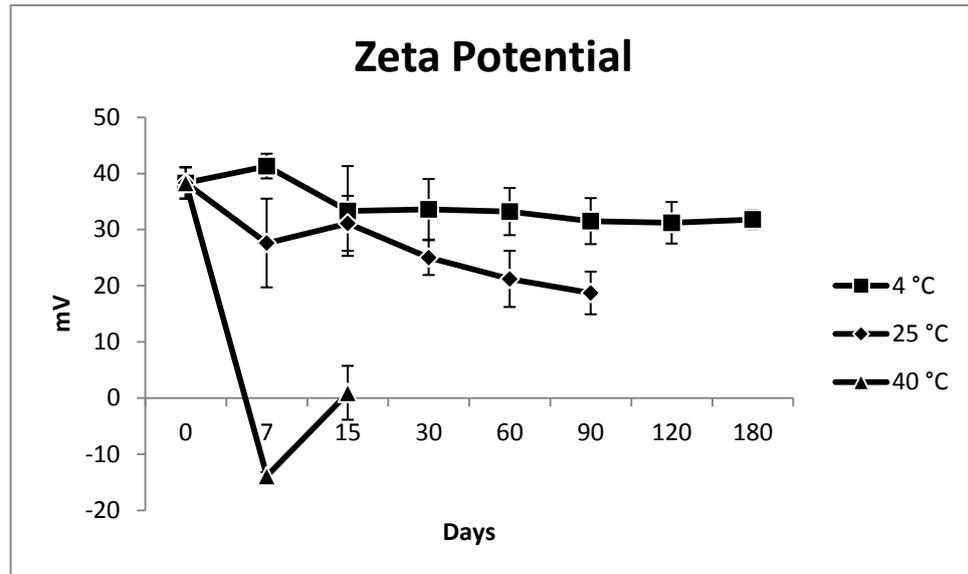
Phase separation occurred when samples were autoclaved, as expected. Bruxel et al. (91) analyzed nanoemulsions containing Tween 80®, sterilized by autoclaving, and they noted increase in droplet size. Besides, Chung et al. (57) stored emulsion systems from various oil types, at high temperature (100 and 120 °C) and phase separation or at least, doubled size as an instability phenomena, occurred in 10 minutes.

However, after filtration, the system maintained its characteristics of size and zeta potential. Additionally, PI decreases slightly, probably due to homogenization that occurs when the system is passed through a calibrated pore.

#### 4.2. Stability

One of the most important pre-requisites in formulating an emulsion is to maintain its physical stability. Emulsion size stability is defined as the capacity of maintaining initial particle size distribution without undergoing phase separation (57). Besides, the zeta potential characterizes the charge which takes place on the droplet surface and it is an indicator of the long-term stability when the absolute value is  $\geq 30$  mV (55). Wiacek et al. (93) also well correlated the zeta potential and stability in their work. Samples stored at three different temperatures were analyzed by six months and results are shown in the figure below (Fig. 2).





b)

**Fig. 2.** Results of long-term stability study (180 days) for cationic nanoemulsions stored at 4 °C, 25 °C and 40 °C. Monitoring of a) Size and b) Zeta Potential are showed.

In the first day, all the formulations presented a white color and milky characteristic, 189 nm ( $\pm 9$ ) of size, zeta potential of 38 mV ( $\pm 3$ ) and PI lower than 0.200. As showed in Fig. 2a, the size was maintained by the 7<sup>th</sup> day for all the formulations, but zeta potential decreased increasing temperature (Fig. 2b). Concerning the samples stored at 40 °C, zeta potential reached a negative value (-14 mV  $\pm 0.5$ ) and it was noted a difference on the color, becoming light yellow. Phase separation occurred in these emulsions after the 15<sup>th</sup> day, the size increased twice and zeta potential was near to zero at that analysis day. Formulations stored at 25 °C maintained their size during storage but their zeta potential diminished (from 38 to 19 mV) in the 90<sup>th</sup> day and phase separation occurred before day 120<sup>th</sup>. Formulations stored at 4 °C presented the same visual aspect until day 180<sup>th</sup> and its physical-chemical characteristics changed slightly.

Due their small droplet size, nanoemulsions possess stability against sedimentation or creaming, being the Ostwald ripening the main mechanism of nanoemulsion instability (50). However, increase in temperature accelerates the onset of instability (70).

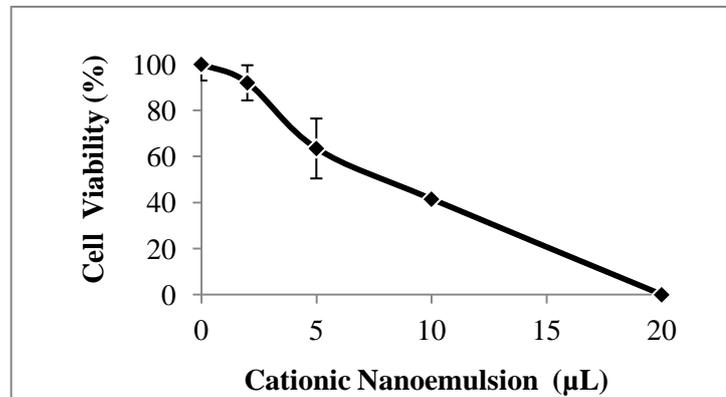
Xavier et al. (70) analyzed their systems in three temperatures. The emulsions stored at room temperature suffered with creaming phenomena faster than those stored at cold temperature. In agreement, Chung et al. (57) found that the size variation of their emulsions were less at 4 °C than at room temperature and Yang et al. (71) observed the behavior of emulsions containing Tween 80® at 55 °C by one month: a thin oil layer above the system was found.

Storing emulsified systems at cold temperature, promotes low collision energy among the droplets (70). Besides, components might be hydrolyzed when stored at elevated temperatures for prolonged periods, mainly surfactants that lose their surface activity (71)

#### 4.3. Toxicity

The cytotoxicity of cationic nanoemulsions are related mainly to the cationic lipid employed, which is determined by the structure of its hydrophilic part (16).

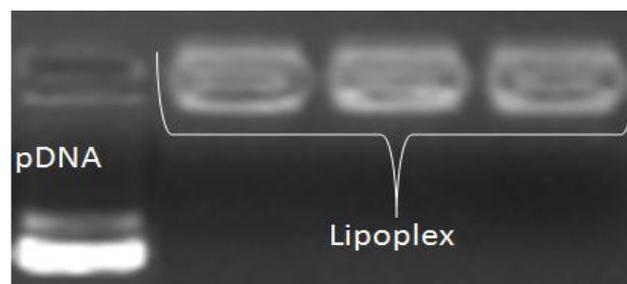
Increasing the nanoemulsion amount induced a dose dependent cytotoxicity on MRC5 cells. According to Fig. 3, when the final volume on the well reaches 20  $\mu\text{L}$ , no viable cells were found.



**Fig. 3.** In vitro toxicity related to nanoemulsions containing stearylamine in MRC-5 cells. A dose dependent behavior is showed.

$DL_{50}$  was calculated by the interpolation of the survival curve ( $r^2 = 0.978$ ) and a value of 9.27  $\mu\text{L}$  was found.

Once observed a dose-dependent behavior in the toxicity assay, the pDNA-complexation efficiency was confirmed by agarosis gel retardation (Fig. 4) in order of making possible a correlation between the volume of nanoemulsion (and its correspondent toxicity) and the quantity of pDNA ( $\mu\text{g}$ ) necessary to transfect cells at the same culture conditions.



**Fig. 4.** Agarosis gel image showing in the lane 1: 1  $\mu\text{g}$  of the pIRES2-EGFP (mainly in the supercoiled form) and in the lanes 2, 3 and 4 the lipoplex formed using 3  $\mu\text{L}$  of nanoemulsion (5.9 N:P ratio).

The agarosis gel assay (Fig. 4) confirmed (triplicate) that the system was able to completely complex the genetic material (pIRES2-EGFP) when 1  $\mu\text{g}$  of pDNA was added to 3  $\mu\text{L}$  of nanoemulsion what corresponds of Nitrogen:Phosphate ratio (N:P) of 5.9.

The volume necessary to transfect cells corresponds to a cell survival rate of 81,49%. Although Liu and Yu (55) have modified their systems with aminoacids, they verified a cell viability near to 80% after treatment with cationic nanoemulsions. The behavior of their systems were dose-dependent, as we also have found.

The toxic effect is mainly determined by the cationic nature of the vehicle, which attains different level to different structure (72). In consequence, toxicity increases with the cationic lipid amount (73, 81). Besides, the N:P ratio influences in the cell survival (55, 72, 74).

## 5. Conclusions

The use of no viral vehicles may avoid most of the problems related to viral vectors, mainly those concerning safety and immunogenicity.

This work presents a system constructed from safe components, able to complex genetic material and presenting low toxicity *in vitro*. Besides, the system may be sterilized by filtration, maintaining its characteristics. Stability, a drawback for unstable systems, it is not a problem when working with nanoemulsions well formulated as in the case. The system was stable, at 4 °C, by six months at least. The results presented lead us to suppose that the cationic nanoemulsion produced is a suitable no viral gene carrier. However, further studies of transfection efficiency and DNA protection must be done in order to support this hypothesis.

## 6. References

- Anton, N., Vandamme, T.F., 2011. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharm Res* 28, 978-985.
- Blaese, R.M., 1990. THE ADA HUMAN GENE-THERAPY CLINICAL PROTOCOL. *Human Gene Therapy* 1, 327-329.
- Brgles, M., Santak, M., Halassy, B., Forcic, D., Tomasic, J., 2012. Influence of a charge ratio of liposome/DNA complexes on their size after extrusion and transfection efficiency. *International Journal of Nanomedicine* 7, 393-401.
- Bruxel, F., Laux, M., Wild, L.B., Fraga, M., Koester, L.S., Teixeira, H.F., 2012. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova* 35, 1827-1840.
- Bulst, S., Holinski-Feder, E., Payne, B., Abicht, A., Krause, S., Lochmuller, H., Chinnery, P.F., Walter, M.C., Horvath, R., 2012. In vitro supplementation with deoxynucleoside monophosphates rescues mitochondrial DNA depletion. *Mol. Genet. Metab.* 107, 95-103.
- Caracciolo, G., Amenitsch, H., 2012. Cationic liposome/DNA complexes: from structure to interactions with cellular membranes. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* 41, 815-829.
- Chung, H., Kim, T.W., Kwon, M., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., 2001. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *Journal of Controlled Release* 71, 339-350.
- Cun, D., Foged, C., Yang, M., Frøkjær, S., Nielsen, H.M., 2010. Preparation and characterization of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles for siRNA delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 390, 70-75.
- Elouahabi, A., Ruysschaert, J.-M., 2005. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Mol Ther* 11, 336-347.
- Ghosh, V., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2013. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry* 20, 338-344.

- Gray, W.D., Wu, R.J., Yin, X., Zhou, J.H., Davis, M.E., Luo, Y., 2013. Dendrimeric Bowties Featuring Hemispheric-Selective Decoration of Ligands for microRNA-Based Therapy. *Biomacromolecules* 14, 101-109.
- Guo, X., Huang, L., 2011. Recent Advances in Nonviral Vectors for Gene Delivery. *Accounts of Chemical Research* 45, 971-979.
- Jafari, M., Soltani, M., Naahidi, S., Karunaratne, D.N., Chen, P., 2012. Nonviral Approach for Targeted Nucleic Acid Delivery. *Current Medicinal Chemistry* 19, 197-208.
- Jagani, H., Rao, J.V., Palanimuthu, V.R., Hariharapura, R.C., Gang, S., 2013. A nanoformulation of siRNA and its role in cancer therapy: In vitro and in vivo evaluation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 18, 120-136.
- Karmali, P.P., Chaudhuri, A., 2007. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: Resolved issues, open questions, and future promises. *Medicinal Research Reviews* 27, 696-722.
- Kim, T.W., Chung, H., Kwon, I.C., Sung, H.C., Jeong, S.Y., 2001. Optimization of lipid composition in cationic emulsion as in vitro and in vivo transfection agents. *Pharmaceutical Research* 18, 54-60.
- Kim, T.W., Kim, Y.J., Chung, H., Kwon, I.C., Sung, H.C., Jeong, S.Y., 2002. The role of non-ionic surfactants on cationic lipid mediated gene transfer. *Journal of Controlled Release* 82, 455-465.
- Koroleva, M.Y., Yurtov, E.V., 2012. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews* 81, 21-43.
- Kwon, S.M., Nam, H.Y., Nam, T., Park, K., Lee, S., Kim, K., Kwon, I.C., Kim, J., Kang, D., Park, J.H., Jeong, S.Y., 2008. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. *Journal of Controlled Release* 128, 89-97.
- Leong, T.S.H., Wooster, T.J., Kentish, S.E., Ashokkumar, M., 2009. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry* 16, 721-727.
- Liu, C.-H., Yu, S.-Y., 2010. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79, 509-515.
- Lovelyn, C., Attama, A.A., 2011. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2, 626-639.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., Yan, J., 2006. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release* 114, 100-109.
- Martini, E., Fattal, E., de Oliveira, M.C., Teixeira, H., 2008. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. *International Journal of Pharmaceutics* 352, 280-286.
- Masotti, A., Mossa, G., Cametti, C., Ortaggi, G., Bianco, A., Grosso, N.D., Malizia, D., Esposito, C., 2009. Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68, 136-144.
- McClements, D.J., 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8, 1719-1729.
- Nam, H.Y., Park, J.H., Kim, K., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., 2009. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. *Arch. Pharm. Res.* 32, 639-646.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Silva, A.L., Alexandrino, F., Verissimo, L.M., Agnez-Lima, L.F., Egito, L.C.M., de Oliveira, A.G., do Egito, E.S.T., 2012. Physical Factors Affecting Plasmid DNA Compaction in Stearylamine-Containing Nanoemulsions Intended for Gene Delivery. *Pharmaceutics* 5, 643-654.
- Teixeira, H., Rosilio, V., Laigle, A., Lepault, J., Erk, I., Scherman, D., Benita, S., Couvreur, P., Dubernet, C., 2001. Characterization of oligonucleotide/lipid interactions in submicron cationic emulsions: influence of the cationic lipid structure and the presence of PEG-lipids. *Biophysical Chemistry* 92, 169-181.

- Verissimo, L.M., Agnez Lima, L.F., Monte Egito, L.C., de Oliveira, A.G., Tabosa do Egito, E.S., 2010. Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. *Journal of Drug Targeting* 18, 333-342.
- Wiacek, A.E., Chibowski, E., Wilk, K., 2002. Studies of oil-in-water emulsion stability in the presence of new dicephalic saccharide-derived surfactants. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 25, 243-256.
- Xavier, F.H., Silva, K.G.H., Farias, I.E.G., Morais, A.R.V., Alencar, E.N., Araujo, I.B., Oliveira, A.G., Egito, E.S.T., 2012. Prospective study for the development of emulsion systems containing natural oil products. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 22, 367-372.
- Yang, Y., Leser, M.E., Sher, A.A., McClements, D.J., 2013. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids* 30, 589-596.
- Yoo, H.S., Kwon, S.M., Kim, Y.J., Chung, H., Kwon, I.C., Kim, J., Jeong, S.Y., 2004. Cationic lipid emulsions containing heavy oils for the transfection of adherent cells. *Journal of Controlled Release* 98, 179-188.
- Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D., Li, Z., 2004. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *Journal of Controlled Release* 100, 165-180.

## APÊNDICE C

**Trabalhos em Congressos – Derivados da dissertação**

- Scale Up Evaluation of a Cationic Nanoemulsion System for Gene Delivery.** In: I Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2012, Ipojuca. I Congresso da ABCF, 2012. 83
- Influência da adição de glicose como crioprotetor em uma nanoemulsão catiônica para terapia gênica.** In: XIV Congresso Científico e XIII Mostra de Extensão da UnP, 2012, Natal. Ciência e Sustentabilidade: desafios e oportunidades, 2012. 84
- Terapia gênica: tráfego intracelular e mecanismos necessários à sua eficácia.** In: XIV Congresso Científico e XIII Mostra de Extensão da UnP, 2012, Natal. Ciência e Sustentabilidade: desafios e oportunidades. Natal: EdUnP, 2012. 85
- A perspectiva do uso da sequência IRES na terapia gênica.** In: XIV Congresso Científico e XIII Mostra de Extensão da UnP, 2012, Natal. Ciência e Sustentabilidade: desafios e oportunidades. Natal: EdUnP, 2012. 86
- In vitro toxicity evaluation of a cationic nanoemulsion for gene therapy.** In: AAPS Annual Meeting and Exposition, 2012, Chicago. Published Meeting Abstracts, 2012. 87
- Long-term stability evaluation of cationic nanoemulsion intended to gene therapy.** In: GTRV - Annual Meeting, 2012, Paris. Abstracts of GTRV Annual Meeting, 2012. 88
- Gene Delivery Carriers - Nanoemulsion and Lipoplexes: Development and Characterization.** In: 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2012, Istanbul. Istanbul, 2012. 89
- Characterization of a cationic nanoemulsion intended to gene therapy after sterilization processes.** In: II International Symposium of Pharmaceutical Sciences, 2011, Natal. Annals of International Symposium of Pharmaceutical Sciences:, 2011. p. 5-5. 91

## SCALE UP EVALUATION OF A CATIONIC NANOEMULSION SYSTEM FOR GENE DELIVERY

A.L. Silva<sup>1</sup>, L.R.S. Miranda<sup>1</sup>, J.G.S. Medeiros<sup>1</sup>, L.M. Veríssimo<sup>1</sup>, E.S.T. do Egito<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> *Laboratório de Sistemas Dispersos (LaSiD), Departamento de Farmácia (UFRN).  
59010-180, Natal, Brazil*

\* *socratesegito@gmail.com*

**Introduction:** In the latest years, cationic nanoemulsion has been studied as a non-viral gene delivery carrier. The presence of a cationic lipid on the formulation results in a positive final charge, which is mandatory to complex the genetic material, negatively charged. After the formulation development, it is important to know the formulation behavior during the scale up process. **Objective:** The aim of this work was to assess the characteristics of a cationic nanoemulsion during its scale up from 10 mL to 100 mL. **Methodology:** Different volumes (10, 20, 50 and 100 mL) of nanoemulsions were prepared by the sonication method. The system was made using (w/w) Captex 355® (5%), Tween 80® (1.2%), Span 80® (0.8%), stearylamine (0.16%) and distilled-water (up to 100%). Measurements of zeta potential, hydrodynamic size and polydispersity index (PI) were performed by Dynamic Light Scattering and phase analysis light scattering. Samples were diluted 300-fold before those analyses. Additionally, pH and conductivity were analyzed. **Results:** The pH varied from 7.41 (10 mL) to 8.41 (100 mL); conductivity also varied, being reduced from 91.80 $\mu$ S (10 mL) to 71.52 $\mu$ S (100 mL). Concerning the zeta potential, which was 30.61 mV ( $\pm$  1.13) for all formulations, variation was not observed, The hydrodynamic size increased with the volume from 188 nm (10 mL) to 266 nm (100 mL). Concerning the PI, formulations with 10, 20 and 50 mL presented smaller value (0.18) than 100 mL ones (0.225). **Conclusions:** During the scale up studies on cationic emulsion, some changes on the physicochemical properties of the formulations could be observed. The most evident one was the hydrodynamic size. However, this drawback could be handled by increasing the sonication time during the production process.. The results show that the scaling up process of the formulation, probably, will not affect the efficiency of DNA complexation.

**Supported by:** Capes

## **INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE GLICOSE COMO CRIOPROTETOR EM UMA NANOEMULSÃO CATIÔNICA PARA TERAPIA GÊNICA**

André Leandro Silva<sup>1</sup>; Lorena Raquel de Sena Miranda<sup>1</sup>; Jéssica Gilvania dos Santos Medeiros<sup>1</sup>;

Nednaldo Dantas dos Santos<sup>1</sup>; Lourena Mafra Veríssimo<sup>1</sup>; Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito<sup>1</sup>.

As nanoemulsões catiônicas (NC) têm sido amplamente estudadas como carreadores não-virais para terapia gênica nos últimos anos. Estes sistemas possuem tensoativos catiônicos em sua interface, tornando as gotículas positivamente carregadas o que permite sua interação com o DNA, negativamente carregado, através de interações eletrostáticas. O resultado desta interação é a formação de um complexo (lipoplexo) que é internalizado pelas células, caracterizando o processo de transfecção. Uma vez que as NC são sistemas que tendem à instabilidade, liofilizar o sistema pode ser uma alternativa no que se refere ao aumento de sua estabilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da glicose como crioprotetor em uma nanoemulsão catiônica previamente desenvolvida, observando modificações nas características da formulação e o poder em complexar um modelo de DNA plasmidial (pDNA). As nanoemulsões foram preparadas pelo método de sonicção onde a fase aquosa (93% de Água, 1,2% de Tween 80 e 0,16% de estearilamina) foi sonicada por 2 minutos e então adicionada à fase oleosa (5% de Captex 355 e 0,8% de Span 80). A mistura foi sonicada em banho de gelo, por 3 minutos e então estocadas a 4°C. Diferentes concentrações de glicose (5%, 10%, 15% e 20%) foram adicionadas ao sistema e então caracterizadas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), o que forneceu informações sobre o tamanho hidrodinâmico das gotículas. Para verificar se a adição do crioprotetor influencia no poder de complexação, foi realizado ensaio de retardo em gel de agarose 0,7%. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados, estatisticamente testados ( $\alpha = 0,05$ ). O crioprotetor se dissolveu na nanoemulsão em todas as concentrações utilizadas, não alterando o aspecto macroscópico do sistema. Os resultados de DLS mostraram que as NC sem crioprotetor mediram em média 201,3 nm ( $\pm 4,9$ ) e que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) para qualquer adição de glicose: 5% (195,8 nm  $\pm 2,5$ ); 10% (195 nm  $\pm 4,5$ ); 15% (194,5 nm  $\pm 7,5$ ) ou 20% (195,2 nm  $\pm 7,7$ ). As amostras adicionadas de 15% de crioprotetor foram submetidas ao ensaio de retardo em gel de agarose e observou-se que embora haja formação do lipoplexo, foi possível visualizar bandas de pDNA não complexado. Pode-se concluir que embora o crioprotetor não altere o tamanho das gotículas da nanoemulsão, há diminuição do poder de complexação do sistema, o que pode ser devido a um impedimento estérico causado pelo crioprotetor, na interface da gotícula. Os resultados nos levam a crer que a liofilização prejudica a complexação do material genético e que, após a liofilização do sistema, um sensível aumento na razão Nitrogênio:Fosfato (NC:pDNA) de complexação poderá ser necessário na tentativa de manter o sistema efetivo.

## TERAPIA GÊNICA: TRÁFEGO INTRACELULAR E MECANISMOS NECESSÁRIOS A SUA EFICÁCIA

Francisco Alexandrino Junior<sup>1,2</sup>; André Leandro Silva<sup>1,2</sup>; Alélia Moraes da Rosa<sup>1</sup>; Lourena Mafra Veríssimo<sup>1,2</sup>; Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Sistemas Dispersos (LaSiD), Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Natal/BR.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPgCF), UFRN. Natal/BR.

A terapia gênica visa à inserção de material genético (DNA ou RNA), no interior de células-alvo, com o intuito de se obter uma resposta terapêutica desejada. Podendo esta objetivar a expressão de uma proteína pouco, ou não expressa, na célula-alvo (ex. xeroderma pigmentoso), inibir a síntese proteica (ex. Doença de Alzheimer) ou ainda ,inserir características completamente novas (ex. diferenciação de células-tronco). Porém, a captura celular destas macromoléculas é limitada devido ao seu tamanho, hidrofobicidade, carga negativa e elevada susceptibilidade à degradação por endonucleases. Assim, tem sido proposto o uso de sistemas carreadores para facilitar o transporte e proteção deste material, sendo estes divididos em sistemas virais e não-virais. Os primeiros apresentam elaborada maquinaria de transfeção e em sua maioria apresentam tropismo, podendo infectar apenas certos tipos de células (as de interesse), o que os tornam um carreador muito útil. Contudo, estes sistemas apresentam dificuldades no processo de produção, problemas relacionados à segurança como mutação e carcinogênese, imunogenicidade, além de apresentar uma limitação em termos de limitação no tamanho do material genético a ser inserido. Como consequência destes empecilhos os carreadores gênicos não-virais têm sido desenvolvidos e são considerados atualmente como uma alternativa valiosa e grande promessa para futuras aplicações terapêuticas. O presente trabalho consiste de uma revisão bibliográfica sobre as principais barreiras intracelulares a serem transpostas por carreadores gênicos não-virais: (1) entrada na célula, (2) escape do endossoma, (3) transporte citoplasmático e (4) ingresso no núcleo, quando for o caso – para garantir eficiência na transfeção. Para tanto, foi realizada uma busca nos seguintes periódicos indexados: web of Knowledge, Science Direct, Scirus, Scielo e PudMed, no período de setembro a outubro de 2012 e como metodologia utilizou-se o cruzamento dos seguintes descritores/palavras-chave: “gene therapy” + “endocytosis”, “gene therapy” + “Intracellular trafficking” e “gene therapy” + “transfection”, como critério de inclusão adotou-se: os artigos publicados nos anos 2011 e 2012, que apresentaram em seu título um ou mais descritores supracitados. Acredita-se que esta avaliação promoverá uma maior e melhor compreensão dos processos já ditos e será de grande utilidade para um público diversificado que estão interessados tanto em terapia gênica com carreadores não-virais, quanto em entender os mecanismos envolvidos na endocitose de “nanomedicamentos”.

## A PERSPECTIVA DO USO DA SEQUÊNCIA IRES EM TERAPIA GÊNICA

Alélia Morais da Rosa<sup>1</sup>; André Leandro Silva<sup>1,2</sup>; Francisco Alexandrino Junior<sup>1,2</sup>; Nednaldo Dantas dos Santos<sup>1</sup>; Lourena Mafra Veríssimo<sup>1,2</sup>; Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito<sup>1,2</sup>.

Um dos objetivos da terapia gênica é a produção de uma proteína alvo, que por algum motivo, deixou de ser expressa pela célula, sendo necessário inserir um gene terapêutico exógeno, apropriado ao tratamento. Entretanto isso ainda representa um grande desafio. O objetivo deste trabalho de revisão é demonstrar as vantagens de usar um sítio interno de entrada ribossomal (IRES) em um plasmídeo recombinante para utilização em terapia gênica. A pesquisa realizada teve como etapas a busca do tema da revisão literária a partir da definição de palavras chaves e a extração do conhecimento foi feita em livros e periódicos internacionais indexados (PubMed, SCIELO e Web of Science) no período de setembro a outubro de 2012. As palavras chaves utilizadas foram “IRES plasmid” e “translation initiation”. Normalmente, em eucariotos, a tradução é iniciada apenas pela extremidade 5', conhecida como 5' cap da molécula de RNAm, uma vez que ela promove o reconhecimento necessário para a montagem do complexo de iniciação com o ribossomo. O IRES é uma sequência de nucleotídeos que admite a tradução e recruta a subunidade ribossomal 40S de forma totalmente independente do sentido 5' - 3' do RNAm. Por isso, pode ser de grande interesse no caso de patologias onde a terapia conjugada é útil ou mesmo necessária, ou ainda, quando um gene repórter está acoplado à expressão de algum gene que se pretende estudar, permitindo identificar a célula que expressa esse transgene através da co-expressão do gene repórter. A teoria mais aceita para o funcionamento do IRES aponta para uma estrutura tridimensional secundária do RNAm, que seria reconhecida pelos ribossomos e prenderia o RNAm apesar da existência de um códon de terminação na fase de leitura, permitindo com isso a leitura da segunda ORF (Open Read Frame). Esta abordagem permite a expressão de proteínas mesmo sob condições desfavoráveis à tradução 5' cap dependente. Os artigos mostraram que o RNAm transcrito a partir dos plasmídeos de expressão contendo o IRES promoveram níveis de expressão ótimos quando comparados com o RNAm gerado sem o elemento IRES. A estabilidade e eficiência da tradução também foram observadas, sendo mais relevantes no primeiro caso. Dessa forma, conclui-se que o uso de uma sequência IRES em plasmídeos recombinantes é uma estratégia interessante para a terapia gênica pois, possivelmente, acarretará maior eficiência de expressão do gene funcional nas células onde estes apresentam-se defeituosos e por conseguinte, causarão alterações fenotípicas benéficas, alcançando um dos objetivos da terapia gênica que é a melhora do quadro clínico do paciente.

**In vitro toxicity evaluation of a cationic nanoemulsions for gene therapy.**

A. L. Silva, F. Alexandrino-Jr., T. B. Lajus, L. M. Verissimo, L. F. Agnez-Lima, E. T. Egitto

Federal University of Rio Grande do Norte

**Purpose**

To evaluate the “in vitro” toxicity of a cationic nanoemulsion (CN) system composed of Captex 355®, Span 80®, Tween 80®, Stearylamine and distilled water.

**Methods**

The CN system was produced by the sonication method. Characterization was carried out by Dynamic Light Scattering, which gave information about size, polydispersity index and zeta potential. Besides, electrophoresis in agarose gel 0.7% was run to ensure that the system was able to compact the pIRES2-EGFP plasmid model. Lung fetus human cells (MRC5) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The cells were seeded at 3 x10<sup>5</sup> cells per well on 6-well plates, 24h before the assay. Subsequently, the cells were exposed to different CN amounts from 0 to 30µL (pH 8.6; 5.9 mM of Stearylamine/mL of CN). Survivor cells were counted after 72h by taking the cell suspension and staining them with 10 µL 0.4% Trypan blue at 1:1 molar ratio. A linear death curve ( $r^2= 0.978$ ) was achieved as result. The free NC well was used as negative control and represented 100% of cell survival.

**Results**

Increasing the CN amount induces a dose dependent cytotoxicity on MRC5 cells. When the final CN volume on the well reaches 20 µL, no viable cells were found. DL50, which was found to be 9.27 µL of CN, was calculated by the interpolation of the death curve. This volume reveals to be three times higher than the one necessary to complex 1µg of pDNA, which is 3 µL of CN. On the other hand, this volume of CN (3 µL) corresponds to a cell survival rate of 81.49%.

**Conclusion**

The CN system here produced was able to compact the pIRES2-EGFP plasmid model not inducing high cytotoxicity against MRC5 cells. Therefore, it can be seen as a promise vehicle for gene therapy.

## LONG-TERM STABILITY EVALUATION OF A CATIONIC NANOEMULSION INTENDED TO GENE THERAPY

Silva, André Leandro<sup>1</sup>, Miranda, Lorena Raquel de Sena<sup>1</sup>, Medeiros, Jéssica Gilvania S<sup>1</sup>, Alexandrino-Junior, Francisco<sup>1</sup>, Agnez-Lima, Lucymara Fassarela<sup>2</sup>, Veríssimo, Lourena Mafra<sup>1</sup>, Egito, Eryvaldo Sócrates Tabosa<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Sistemas Dispersos (UFRN). 59010-180, Natal – Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (UFRN). 59072-970, Natal – Brazil.

\* [socratesegito@gmail.com](mailto:socratesegito@gmail.com)

**Introduction:** Gene therapy is based on the transfer of an exogenous genetic material into the cell. Usually, it is done in order to supplement/improve the expression of a determined protein, but not only for this purpose. There are two different main ways to transfect cells: using viral and no-viral vehicles. Because of its safety, no-viral vectors have been extensively studied to promote gene delivery. Cationic nanoemulsions are no-viral systems able to complex the anionic genetic material via electrostatic interaction, forming lipoplexes that could be used to transfect cells. However, as a dispersed system, its thermodynamic instability can be a limitation in its use. **Objective:** The aim of this work was to assess the long-term stability study of a cationic nanoemulsion system. **Methodology:** The stability study was carried out by 6 months, in three different temperatures (4°C, 25°C and 40°C). Nanoemulsions were prepared by sonication method. The system was composed by (w/w) Captex 355<sup>®</sup> (5%), Tween 80<sup>®</sup> (1.2%), Span 80<sup>®</sup> (0.8%), stearylamine (0.16%) and distilled-water (to 100%). Electrophoresis assay was performed to assure that the nanoemulsion was able to complex the pIRES2-EGFP (plasmid model). Measurements of zeta potential, hydrodynamic size and polydispersity index (PI) were done by Dynamic Light Scattering (DLS) and phase analysis light scattering as scheduled: formulation day, 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup>, 90<sup>th</sup>, 120<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup> days. Samples were diluted 300-fold before analysis. All the experiments were carried out in triplicate. **Results:** Electrophoresis assay showed that 3µL of nanoemulsion are necessary to compact 1µg of pDNA, which means a charge ratio of 5.9 (N/P). In the first day, all the formulations presented a white color and milky characteristic, size of 189 nm (± 9), zeta potential of 38 mV (± 3) and PI lower than 0.200. The size was maintained by the 7<sup>th</sup> day for all the formulations, but zeta potential decreased increasing temperature. Concerning the samples stored at 40°C, the zeta potential reached a negative value (-14 mV ± 0.5) and it was noted a difference on the coloration, becoming light yellow. Phase separation occurred in these emulsions on the 15<sup>th</sup> day, the size increased twice and zeta potential was near to zero. Formulations stored at 25°C maintained their size during storage but their zeta potential diminished (from 38 to 19 mV) in the 90<sup>th</sup> day, and phase separation occurred before day 120<sup>th</sup>. Formulations stored at 4°C presented the same visual aspect until day 180<sup>th</sup> and its physical-chemical characteristics changed slightly (213.5 nm (± 6) mean size, PI of 0.162 and 31.8 mV (± 1.8) of zeta potential). **Conclusions:** The studied nanoemulsion was able to compact the genetic material and temperature influenced its stability. Samples stored at 40°C broke in two weeks and those stored at room temperature (25°C) were stable for 3 months. When stored at 4°C, the system had an increase in size and a decrease in the zeta potential, however its characteristics remained compatible to the purpose that it was produced.

## GENE DELIVERY CARRIERS – NANOEMULSION AND LIPOPLEXES: DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION

A.L. Silva <sup>1 2</sup>; F. Alexandrino-Junior <sup>1 2</sup>; L. M. Veríssimo <sup>1</sup>; A. E. Silva<sup>1</sup>; L. F. Agnez-Lima <sup>2</sup>; E. S. T. do Egito <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Departamento de Farmácia, Laboratório de Sistemas Dispersos – LASID, Rua Gustavo Cordeiro de Farias, Sn, Petrópolis, Natal, Brazil, Tel: 55 84 9431 8816, Fax: 55 84 3342 9808, e-mail: socrates@digi.com.br

<sup>2</sup> UFRN, Centro de Biociências, Laboratório de Biologia Molecular e Genômica – LBMG, Natal, Brazil

### INTRODUCTION

Cationic lipid-based emulsions (CLEs), also called nanoemulsions, have been investigated as an alternative non-viral gene carrier in therapeutic gene delivery (Wagner et al., 2008). The CLEs are systems consisting of two immiscible liquids containing an oil core stabilized by cosurfactants and cationic surfactants, which are responsible for the positive charge in the droplet surface. Cationic surfactants allow the complexation with the negatively charged DNA via electrostatic interactions, resulting in DNA compaction and formation of lipoplexes (Nam et al., 2009). The aim of this work was to choose the best CLE formulation from a Pseudo Ternary Phase Diagram, to assess the point of 100% compaction of the plasmid DNA (pDNA); and to characterize both, the CLE and the lipoplex (CLE+pDNA) by Dynamic Light Scattering (DLS).

### EXPERIMENTAL METHODS

#### Materials

1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium propane (DOTAP) was purchased from Avanti Polar Lipids, EUA and Captex® 355 was donated by Abitech, EUA. pIRES2-EGFP plasmid (Biosciences Clontech) was a gift from Prof. Menck – USP and Tween 80® and Span 80® were purchased from Sigma, EUA.

#### Pseudo Ternary Phase Diagram (PTPD)

Nine different ratio of surfactants/oil were weighed and then titrated with water (11 titrations to each ratio). Formulations

obtained by sonication were macroscopically characterized.

#### Preparation of CLE

CLE were prepared by the sonication method. Briefly, aqueous phase components were weighed and mixed with distilled water. The mixture was sonicated for 3 min using a probe sonicator at 10W (Sonicator Ultra Processor XL 2020 from Heat System Inc., EUA). This phase was added to the oil phase and sonicated for 4 min in an ice-water bath and then, stored at 4°C. Table 1 shows the final composition of the formulation.

**Table 1.** CLE composition.

Component	% (w/w)
<b>Oil Phase</b>	
Captex 355® (MCT)	5
Span 80®	0.8
<b>Aqueous Phase</b>	
Tween 80®	1.2
DOTAP	0.08
Distilled water qsp.	Qsp. 100

#### Preparation of lipoplexes

Interactions between pDNA and lipid emulsions were investigated by agarose gel electrophoresis (Kwon et al., 2008). Several volumes of CLE (0.5 to 15 µL) and 8.5 µg of DNA were incubated for 30 min. The complexes were then loaded onto 0.7% agarose gels containing ethidium bromide (0.5 mg/ml). The trapping efficiency of the plasmid to the nanoemulsion was determined as the DNA being no longer

accessible to ethidium bromide intercalation.

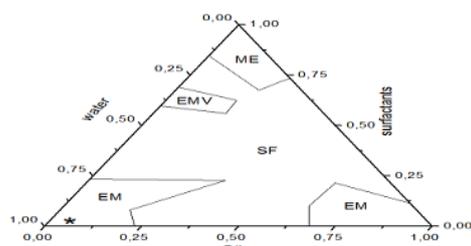
### Particle size and zeta potential analysis

The mean particle size and zeta potential of both the CLE and the lipoplex were performed by DLS (Brookhaven ZetaPALS, USA). The nanoemulsion was diluted in NaCl 1 mM solution by 300-fold before analysis.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Formulation Development

The PTPD revealed several types of emulsion systems (Fig. 1) within the different water/oil/surfactants ratio.

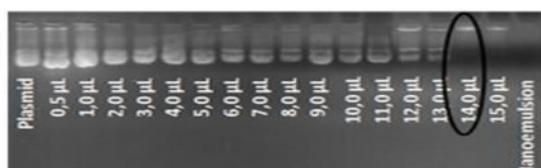


**Fig 1.** PTPD showing regions of Microemulsion (ME); Fluid Emulsion (EM); Viscous Emulsion (VEM); Phase Separation (PS) and the CLE chosen point (\*).

The optimal nanoemulsion formulation point (Table 1) showed nanometric size after various dilution processes (Table 2), which is characteristic from this kind of formulation (Anton and Vandamme, 2011).

### Lipoplexes formation

Lipoplexes were formed by electrostatic interactions and the point in which no DNA was visualized under UV-light in the agarose gel (1.9 nmol/ $\mu$ g) (Fig 2) was chosen as the best ratio to reproduce lipoplexes for the DLS analysis.



**Fig 2.** Agarose gel showing the best ratio of CLE/pDNA to lipoplex formation.

### DLS analysis

pDNA should adsorb on the positive-charged droplet surface forming lipoplexes. Therefore, it is expected that the CLE hydrodynamic diameter increases. Because of the electrostatic interactions between the positive charged DOTAP and negative charged DNA, zeta potential decreases from CLE to lipoplexes (Table 2).

**Table 2.** Results of DLS for CLE and Lipoplexes.

Formulation	Size (nm)	$\zeta$ -Potential (mV)
CLE	175 $\pm$ 12	24 $\pm$ 1
Lipoplex	212 $\pm$ 8	16 $\pm$ 2

Although lipoplexes are larger than CLE, Sahay et al (2010) proves that particles of this range of size is able to be endocytosed by the cells and might reach the nucleus.

## CONCLUSIONS

These results demonstrate that adding DOTAP to a basic nanoemulsion developed from the PTPD process makes the system able to efficiently compact the genetic material, forming lipoplexes, which, in spite of increasing size and decreasing zeta potential, becomes a promising vehicle for gene delivery.

## REFERENCES

- [1] Wagner E. Converging paths of viral and non-viral vector engineering. *Mol Ther*, 16: 1–2 (2008).
- [2] Nam HY, Park JH, Kim K, Kwon IC, Jeong SY. Lipid-based emulsion system as non-viral gene carriers. *Arch Pharm Res*, 32: 639–646 (2009).
- [3] Kwon SM, Nam HY, Nam T, Park K, Lee S, Kim K, et al. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. *J Control Release*. 22;128(1):89-97 (2008).
- [4] Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarification of the Critical Differences. *Pharm Res*. 28:978-985 (2010).
- [5] Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of Nanomedicines. *J. Control Release*. 145:182-195 (2010).

## CHARACTERIZATION OF A CATIONIC NANOEMULSION INTENDED TO GENE THERAPY AFTER STERILIZATION PROCESSES

Silva, A. L.<sup>1,2</sup>; Alexandrino-Junior, F.<sup>1,2</sup>; Silva, K. S.<sup>1</sup>; Veríssimo, L. M.<sup>1,2</sup>; Lima, L. F. A.<sup>2</sup>; Egito, E. S. T\*.<sup>1</sup>

\*socrates@ufrnet.br

<sup>1</sup> Laboratório de Sistemas Dispersos (LaSiD), Departamento de Farmácia (UFRN);

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Genética (LBMG), Centro de Biociências (UFRN);

Gene therapy is based on the transfer of genetic material into the target defective tissue or cell. For its success, it is necessary to develop carriers able to bypass both, membrane and cytosol barriers, reaching the nucleus. Most of the researchers deals with viral approaches. However, concerns about safety have increased studies on non viral gene delivery systems like nanoemulsions. The aim of this work was to evaluate autoclaving and filtration as methods to guarantee a cationic nanoemulsion system sterility, which makes *in vitro* assays possible. The nanoemulsion, prepared by sonication method, was made of Captex 355®, Span 80®, Tween 80®, water and stearylamine. Sterilization processes was done as follow: filtration by 0.22 µm filter and autoclaving for 15 min at 1 atm and 121°C. Then, characterization by macroscopic analyses, zeta potential and size measurements were performed. The results showed that, as expected, phase separation happens when autoclaving was used to sterilize the nanoemulsion (a thermodynamically unstable system). Concerning the filtration method, the characteristics of the system were maintained. The unsterilized nanoemulsion presented size of 240 nm and zeta potential value of +26.6 mV. After filtration, the system presented 233 nm of size and +23.9 mV of Zeta Potential. Poldispersivity Index decreased from 0.201 to 0.176 after filtration, meaning that size distribution was more homogenous after the filtration process. These results demonstrate that sterile filtration is a suitable process to sterilize cationic nanoemulsion for gene therapy making possible the future use of cationic nanoemulsions for gene delivery.



1987 is methylated in the DNA provided by BD Biosciences Clontech. If you wish to digest the vector with this enzyme, you will need to transform the vector into a *dam*<sup>-</sup> host and make fresh DNA.

**Use:**

Genes inserted into the MCS should include the initiating ATG codon. pIRES2-EGFP and its derivatives can be introduced into mammalian cells using any standard transfection method. If required, stable transformants can be selected using G418 (9).

**Location of features:**

- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1–589  
Enhancer region: 59–465; TATA box: 554–560; Transcription start point: 583  
C→G mutation to remove *Sac* I site: 569
- MCS: 591–665
- IRES sequence: 666–1250
- Enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene  
Kozak consensus translation initiation site: 1247–1257  
Start codon (ATG): 1254–1256; Stop codon: 1971–1973  
Insertion of Val at position 2: 1257–1259  
GFPmut1 chromophore mutations (Phe-64 to Leu; Ser-65 to Thr): 1446–1451  
His-231 to Leu mutation (A→T): 1948
- SV40 early mRNA polyadenylation signal  
Polyadenylation signals: 2127–2132 & 2156–2161; mRNA 3' ends: 2165 & 2177
- f1 single-strand DNA origin: 2224–2679 (Packages the noncoding strand of EGFP.)
- Bacterial promoter for expression of Kan<sup>r</sup> gene:  
–35 region: 2741–2746; –10 region: 2764–2769  
Transcription start point: 2776
- SV40 origin of replication: 3020–3155
- SV40 early promoter/enhancer  
72-bp tandem repeats: 2853–2996; 21-bp repeats (3): 3000–3063  
Early promoter element: 3076–3082
- Kanamycin/neomycin resistance gene: 3204–3998  
G→A mutation to remove *Pst* I site: 3386; C→A (Arg to Ser) mutation to remove *Bss*H II site: 3732
- Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signals: 4234–4252
- pUC plasmid replication origin: 4583–5226

**Propagation in *E. coli***

- Suitable host strains: DH5 $\alpha$ , HB101, and other general purpose strains. Single-stranded DNA production requires a host containing an F plasmid such as JM101 or XL1-Blue.
- Selectable marker: plasmid confers resistance to kanamycin (30  $\mu$ g/ml) to *E. coli* hosts.
- *E. coli* replication origin: pUC
- Copy number: ~500
- Plasmid incompatibility group: pMB1/ColE1

**References:**

1. Jackson, R. J., *et al.* (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**:477–483.
2. Jang, S. K., *et al.* (1990) *J. Virol.* **62**:2636–2643.
3. Cormack, B., *et al.* (1996) *Gene* **173**:33–38.
4. Yang, T. T., *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**:4592–4593.
5. Haas, J., *et al.* (1996) *Curr. Biol.* **6**:315–324.
6. Jackson, R. J., *et al.* (1990) *Trends Biochem.* **15**:477–483.
7. Jang, S. K., *et al.* (1988) *J. Virol.* **62**:2636–2643.
8. Huang, M. T. F. & Gorman, C. M. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**(4):937–947.
9. Gorman, C. (1985). In *DNA cloning: A practical approach*, vol. II. Ed. D.M. Glover. (IRL Press, Oxford, U.K.) pp. 143–190.

**Note:** The attached sequence file has been compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by BD Biosciences Clontech. This vector has not been completely sequenced.