



Síntese de Lipossomas Via Rota microfluídica

Aluno: Ricardo Pereira Buffo

Orientador: Dra. Lucimara Gaziola de la Torre

Coautor: Priscilla Cibelle Oliveira de Souza Firmino

Resumo do Projeto

O campo da nanotecnologia visa a elaboração e o aperfeiçoamento de estruturas em escala nanométrica. Nesse campo pode-se aplicar a microfluídica que é a ciência que atua no desenvolvimento e estudo de escoamento de fluidos em canais em escalas micrométricas.

Na microfluídica, utilizam-se pequenas quantidades de reagentes, sendo isso uma das suas principais vantagens, assim como o baixo custo energético, alto rendimento, alta resolução e ainda curto tempo de análise de amostras obtidas. Tendo isso em vista, a microfluídica é muito utilizada para a produção de nanoagregados, como os lipossomas, (vesículas que mimetizam a membrana celular). Os lipossomas são obtidos pela autoagregação de determinados lipídios em água, sendo utilizados em aplicações alimentícias, veiculação de fármacos e na área nanobiotecnológica.

Contudo, é importante ressaltar a necessidade de se investigar parâmetros de processo para explorar condições que permitam o controle de tamanho e dispersidade dos lipossomas, fator limitante em algumas aplicações. Além disso, devido ao pequeno volume transportado, o regime de escoamento é normalmente laminar, limitando a mistura entre as fluidos, ocorrendo a mesma principalmente pela difusão das moléculas.

Especificamente para a síntese dos lipossomas em sistemas microfluídicos de focalização hidrodinâmica, é necessário o escoamento de correntes de etanol e água. Os lipídeos são dispersos em etanol e à medida que ocorre a autodifusão das moléculas de solventes, ocorre a autoagregação dos lipídeos em lipossomas.

Explorou-se a advecção caótica como alternativa que possibilita uma melhora no processo de mistura. Este fenômeno permite a sobreposição das correntes de fluxo, de forma não aleatória e favorecem o processo de mistura. Dessa forma, este trabalho se propôs a estudar a síntese de lipossomas em um microdispositivo que, explorasse a advecção caótica e consequentemente aumentasse os efeitos de mistura no processo de síntese, buscando encontrar as condições ótimas de processo para obter lipossomas de tamanho e dispersidade controlados.

Investigou-se neste trabalho o processo microfluídico com tipos distintos de fosfolipídios de origens diversas assim como utilizou-se da adição de colesterol. Dessa forma, ao investigar as variáveis do processo como a taxa de fluxo, vazão volumétrica e concentração de lipídios na solução alcoólica, buscou-se padronizar tais condições para o maior controle possível de características dos lipossomas.

Objetivos

Este projeto focou a investigação da síntese de lipossomas utilizados lipídios de diversas origens e purezas, tais como lecitina de soja com 45% de pureza (S45), lecitina de ovo com 80% de pureza (E80) para observação de como as variáveis do processo afetavam o tamanho e dispersidade das partículas. Explorou-se também lecitina de girassol com 90% de pureza (H90).

O dispositivo de advecção caótica (foco deste projeto) ilustrado na Figura 1 foi também comparado ao microdispositivo de formato T-longo (Figura 1).

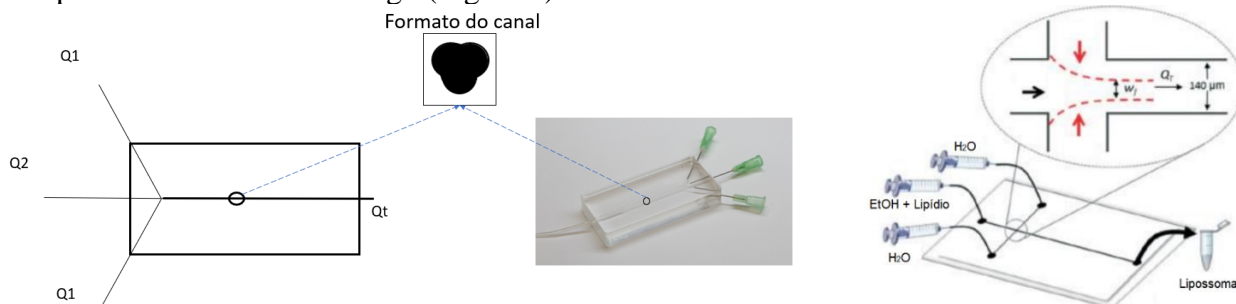


Figura 1: Esquerda: Esquema do microdispositivo de focalização hidrodinâmica que favorece advecção caótica, Q_1 são as correntes aquosas e Q_2 a corrente lipídica, Q_t é a corrente total de saída. Direita: Esquema de dispositivo microfluídico de focalização hidrodinâmica no formato T longo para síntese de nanopartículas. Adaptado de PESSOA, (2017).



Materiais e Métodos

Para a construção dos dispositivos microfluídicos em PDMS, utilizou-se o Sylgard 184 Elastomer Kit (Dow Corning, EUA), utilizou-se uma nova técnica denominada *Scaffold*, a qual é realizada a construção dos dispositivos a partir de um molde pré-fabricado por impressão 3D (Figura 3). Para a síntese dos lipossomas foi utilizado como lipídio a lecitina de algumas origens e purezas sendo esses produtos de nome S45 (lecitina da soja com 45% de pureza), E80 (lecitina do ovo com 80% de pureza) e H90 (lecitina de girassol com 90% de pureza) todos esses lipídios da marca Lipoid. No processo de síntese também foi utilizado Etanol (marca LabSynth/Sinergia Científica, Brasil) anidro obtido com o auxílio de peneiras moleculares (Molecular Sieves, 3Å, marca Sigma-Aldrich, EUA). Em alguns testes também foi utilizado o colesterol (5-cholesten-3β-ol, marca Sigma-Aldrich, EUA).

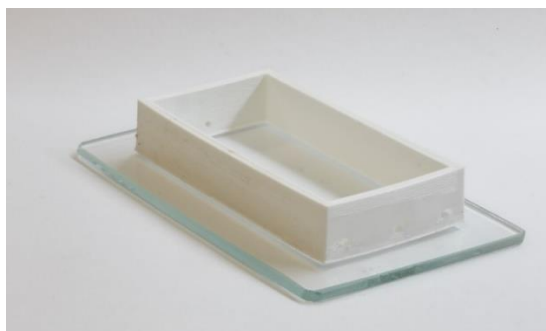


Figura 3: Molde utilizado para a produção dos microdispositivos, fabricado utilizando impressão 3D.

Para a produção das dispersões alcólicas de lipídios foram realizados os seguintes cálculos:

$$m' = C * MM * V$$

$$m = \frac{m'}{P/100}$$

Onde,

m' = Massa sem correção da pureza

C = Concentração desejada da solução mãe

MM = massa molar da fosfatidilcolina (756 g/mol)

V = Volume total de solução mãe

m = Massa utilizada para realização da solução

P = Pureza do lipídio

Já para a síntese de lipossomas foi realizado o controle da taxa de fluxo de cada corrente de entrada no microdispositivo em diferentes FRR (relação entre as duas correntes de água com a corrente alcóolica de lipídio), o cálculo de FRR está explicitado a seguir:

$$FRR = \frac{2Q_1}{Q_2}$$

$$Q_t = 2Q_1 + Q_2$$

Q_1 = Vazão das correntes aquosas

Q_2 = Vazão da corrente de lipídio

Q_t = Vazão total (sempre utilizado 5 mL/min)

Para a análise dos lipossomas formados foram realizados testes de diâmetro Hidrodinâmico Médio, Índice de Polidispersidade, Potencial Zeta e morfologia utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão em processo crioscópico.

Resultados

Os valores obtidos para os testes de S45 e E80 estão indicados pela Tabela 1 e Figura 4. Por se tratar de uma análise feita em triplicata, também estão presentes os respectivos desvios. Os resultados desses experimentos estão de acordo com resultados de estudos anteriores (Es *et al.*, 2019), indicando que os lipídios utilizados são uma ótima opção para a síntese de lipossomas.



Tabela 1 –Diâmetro médio (em intensidade) e PDI dos testes iniciais com o lipídio S45 em diferentes FRR. Concentração de lipídio na fase alcoólica de 10 mM com vazão total constante de 5 ml/min.

FRR	Diâmetro médio (\pm nm)*	PDI*
10	88,10 \pm 4,09	0,24 \pm 0,01
1	180,32 \pm 1,55	0,11 \pm 0,01

(*) Valores médios seguidos de desvio padrão referente a triplicatas independentes

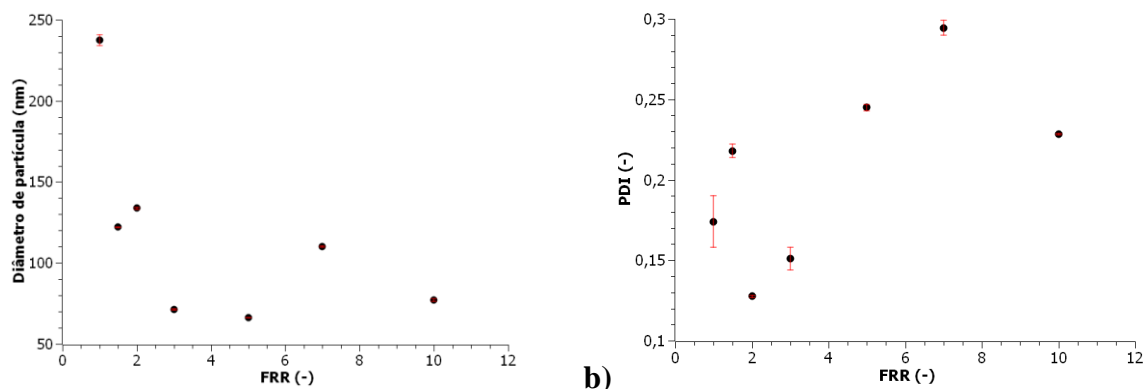


Figura 4: Diâmetro médio (em intensidade) (a) e PDI (b) dos testes iniciais com o lipídio E80 em diferentes FRR (Barras de erro representam desvio padrão de triplicatas independentes). Concentração de lipídio na fase alcoólica de 10 mM com vazão total constante de 5 ml/min no dispositivo de advecção caótica.

Já os resultados de potencial Zeta indicaram para o S45 e para o E80 caráter aniônico indicando uma maior estabilidade para esses nanoagregados.

Para o efeito de comparação entre o dispositivo de advecção caótica e o outro dispositivo de focalização hidrodinâmica do tipo T longo foram sintetizados lipossomas nesse dispositivo e os dados estão na Tabela 2.

Tabela 2 – Diâmetro médio (em intensidade) dos testes para comparação com outros microdispositivos. Utilizado lipídio S45 com vazão total constante de 120,12 μ L/min e FRR 1.

Diâmetro médio (\pm nm)*	PDI*
221,63 \pm 17,23	0,33 \pm 0,06

(*) Valores médios seguidos de desvio padrão referente a triplicatas independentes

Essa análise foi realizada com S45 e FRR 1, observa-se que o microdispositivo de alta produtividade utilizado no projeto, obteve lipossomas de tamanho médio de aproximadamente 180,0 \pm 1,5 nm e um PDI de 0,11 \pm 0,01. Sendo assim, o dispositivo estudado consegue sintetizar lipossomas de tamanho relativamente próximo em uma vazão muito maior que o dispositivo convencional e mantendo um baixo índice de polidispersidade.

Para o estudo com o lipossoma H90 utilizou-se o colesterol como forma de estabilização das bicamadas lipídicas e foi realizado o estudo de como a concentração desse material afeta a formação dos lipossomas. Alguns dos valores obtidos estão na Figura 5, nessa figura é possível notar o efeito da concentração inicial de lipídios na dispersão alcóolica na síntese dos lipossomas e também como esse processo é afetado pela porcentagem de colesterol presente no meio.

Observando a Figura 5 é possível notar que uma maior concentração de lipídios na dispersão alcóolica favoreceu o processo de síntese sem que houvesse um aumento no índice de polidispersidade e também se observa que uma porcentagem maior de colesterol no meio favorece a síntese desses nanoagregados. Sendo assim, avaliou-se que é necessário um maior estudo da influência do colesterol ou outros componentes graxos no processo de síntese de lipossomas para que se obtenha o melhor proveito desse conhecimento sendo isso abordado em um próximo projeto.

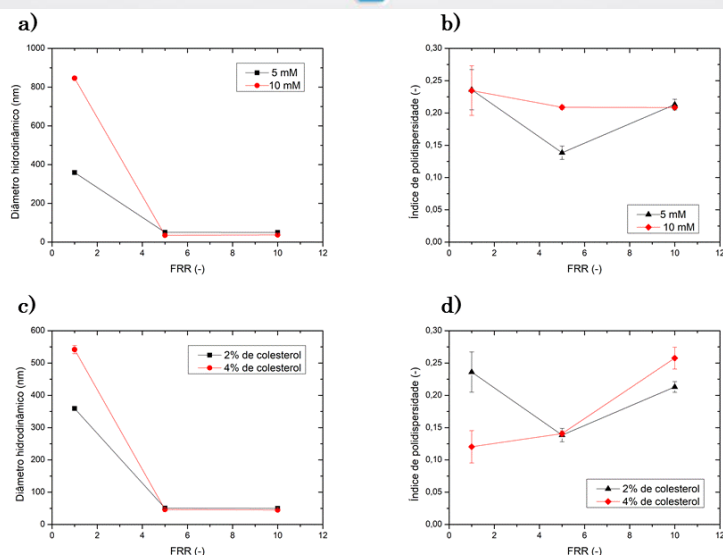


Figura 5: Comparação entre diâmetro médio (a) e PDI (b) dos lipossomas produzidos a partir de de H90 5 ou 10 mM (solução alcoólica) + 2% (m/m) de colesterol. Comparação entre diâmetro médio (c) e PDI (d) de lipossomas formados a partir de H90 (dispersão alcoólica 5 mM) + 2 e 4% (m/m) de colesterol. Barras de erro correspondem a desvio padrão de triplicatas independente.

Por fim, a Figura 6 ilustra os resultados obtidos pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão em processo crioscópico.

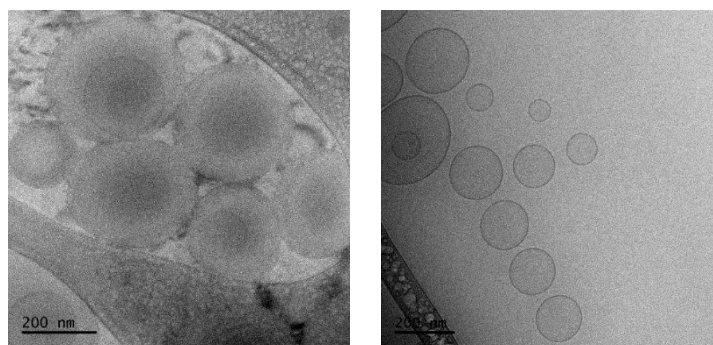


Figura 6: Imagens de lipossomas de E80 (esquerda) e lipossomas de H90 (direita) obtidos por Microscopia Eletrônica de Transmissão em processo crioscópico.

As imagens possibilitam observar as bicamadas lipídicas e como os lipossomas de E80 possuem multilamelas enquanto os lipossomas de H90 possuem apenas uma bicamada, isso pode ser efeito da característica dos materiais ou do uso do colesterol nos lipossomas de H90. Essas hipóteses também serão abordadas em um próximo projeto.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que o uso do microdispositivo elaborado para o projeto favoreceu uma produção muito maior que os dispositivos microfluídicos utilizados comumente, como o T longo, sem perda na qualidade das características físico-químicas dos nanoagregados. Os lipossomas sintetizados tiveram bons resultados como tamanho considerável, o que pode favorecer uma maior encapsulação de agentes, e índice de polidispersidade baixo, fortalecendo que o microdispositivo fornece uma boa qualidade de síntese desses materiais. Os valores obtidos nos testes de potencial Zeta indicaram certa estabilidade dos lipossomas devido ao seu caráter aniônico e as imagens obtidas por crioscopia comprovaram essa estabilidade e a formação dos lipossomas, seus resultados também estão de acordo com os resultados obtidos por DLS. O H90 se mostrou uma alternativa viável para a síntese de lipossomas e seu uso possibilitou compreender a importância da presença de outros materiais além do lipídio para a formação desses nanoagregados.

Para concluir, o seguimento do projeto abriu novas oportunidades de estudo que serão abordadas no próximo projeto, como o uso de colesterol para a estabilização da bicamada lipídica.



Referências Bibliográficas

- AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S. W.; ZARGHAMI, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; NEJATI-KOSHK, K. "Liposome: classification, preparation, and applications". *Nanoscale Research Letters*. v. 8:102, p.1-9, 2013.
- AREF, Hassan. The development of chaotic advection. *Physics of Fluids*, v. 14, n. 4, p. 1315-1325, 2002.
- ARYA, S.; KHAN, S.; VAID, A.; KOUR, H.; LEHANA, P. "Microfluidic Mechanics and Applications: a Review". *Journal of Nano- And Electronic Physics*. v. 5, p. 2077-772, 2013.
- BALBINO, T. A.; AOKI, N. T.; GASPERINI, A. A. M.; OLIVEIRA, C. L. P.; AZZONI, A. R.; CAVALCANTI, L. P.; DE LA TORRE, L. G. "Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications". *Chemical Engineering Journal*. v. 226, p. 423-433, 2013.
- CAMARGO, C. L.; SHIROMA, L. S.; GIORDANO, G. F.; GOBBI, A. L.; VIEIRA, L. C. S.; LIMA, R. S. "Turbulence in microfluidics: Cleanroom-free, fast, solventless, and bondless fabrication and application in high throughput liquid-liquid extraction". *Analytica Chimica Acta*. v. 940, p. 73-83, 2016.
- CARUGO, D.; BOTTARO, E.; OWEN, J.; STRIDE, E.; NASTRUZZI, C. "Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors". *Scientific Reports*. v. 6, doi: 10.1038, 2016.
- COLLINS, Mary; THRASHER, Adrian. Gene therapy: progress and predictions. *Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences*, [s.l.], v. 282, n. 1821, p.1-8, 22 dez. 2015. The Royal Society.
- BALAZS, Daniel A.; GODBEY, W. T. Liposomes for use in gene delivery. *Journal of drug delivery*, v. 2011, 2011.
- DE PAULA RIGOLETTO, Thais et al. Effects of extrusion, lipid concentration and purity on physico-chemical and biological properties of cationic liposomes for gene vaccine applications. *Journal of microencapsulation*, v. 29, n. 8, p. 759-769, 2012.
- DEMETZOS, Costas. Differential scanning calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *Journal of liposome research*, v. 18, n. 3, p. 159-173, 2008.
- ES, I.; MONTEBUGNOLI, L. J.; FILIPPI, M. F. P.; GASPERINI, A. A. M.; RADAIC, A.; JESUS, M. B.; LA TORRE, L. G. "High-Throughput conventional and stealth cationic liposome synthesis using a chaotic-advection based microfluidic device combined with a centrifugal vacuum concentrator". *Chemical Engineering Journal*, S11385-8947(19) 32231-4.
- FRÖHLICH, Eleonore. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, v. 7, p. 5577, 2012.
- G.-M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics *Nature*, 442 (27) (2006), pp. 368-373.
- GOMEZ-MASCARAQUE, L.G., Casagrande Sipoli, C., de La Torre, L.G., Lopez-Rubio, A., 2017. Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. *Food Chem.* 233, 343-350.
- HOOD, R. R.; DEVOE, D. L. "High-Throughput Continuous Flow Production of Nanoscale Liposomes by Microfluidic Vertical Flow Focusing". *Small Journal*. v. 11, p. 5790-579, 2015.
- JAHN, A.; REINER, J. E.; VREELAND, W. N.; DEVOE, D. L.; LOCASCIO, L. E.; GAITAN, M. "Preparation of nanoparticles by continuous-flow microfluidics". *Journal of Nanoparticle Research*. v.10, p. 925-934, 2010.
- KONDIAH, Pierre PD, et al. Nanocomposites for therapeutic application in multiple sclerosis. In: *Applications of nanocomposite materials in drug delivery*. Woodhead Publishing, 2018. p. 391-408.
- LAPINSKI, Monique M. et al. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir*, v. 23, n. 23, p. 11677-11683, 2007.
- MARK, D. et al. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 3, p. 1153, 2010.
- MAULUCCI, Giuseppe et al. Particle size distribution in DMPC vesicles solutions undergoing different sonication times. *Biophysical journal*, v. 88, n. 5, p. 3545-3550, 2005.
- MEURE, Louise A.; FOSTER, Neil R.; DEGHANI, Fariba. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *Aaps Pharmscitech*, v. 9, n. 3, p. 798, 2008.
- MOZAFARI, M. Reza. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v. 10, n. 4, p. 711, 2005.
- OTTINO, Julio M. Mixing, chaotic advection, and turbulence. *Annual Review of Fluid Mechanics*, v. 22, n. 1, p. 207-254, 1990.
- PIHL, J.; KARLSSON, M.; CHIU, D. T. Microfluidic technologies in drug discovery microfluidic systems and technologies in the process of drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 20, p. 1377-1383, 2005.
- PUPO, Elder et al. Preparation of plasmid DNA-containing liposomes using a high-pressure homogenization-extrusion technique. *Journal of controlled release*, v. 104, n. 2, p. 379-396, 2005.
- REAY, D.; RAMSHAW, C.; HARVEY, A.; Process Intensification: 2.ed.: editora Butterworth-Heinemann, 2013.
- REN, K.; CHEN, Y.; WU, H. "New materials for microfluidics in biology". *Current Opinion in Biotechnology*. v. 25, p.78-85, 2014.
- SAATDJIAN, E.; RODRIGO, A. J. S.; MOTA, J. P. B. A study of mixing by chaotic advection in two three-dimensional open flows. *Chemical engineering science*, v. 81, p. 179-190, 2012.
- SUN, B.; JIANG, J.; SHI, N.; XU, W. "Application of Microfluidics Technology in Chemical Engineering for Enhanced Safety". *Wiley Online Library*. v. 35, p. 365-373, 2015.
- THORSEN, T.; MAERKL, S. J.; QUAKE, S. R. "Microfluidic Large-Scale Integration". *Science*. v. 298, p. 580-584, 2002.