

AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS MICROFLUÍDICAS EMERGENTES PARA SÍNTESE DE LIPOSSOMAS

Palavras-Chave: Nanotecnologia, Microfluídica, Lipossomas.

Autores/as:

Giovanna Ferreira Lopes (Unicamp)

Profa. Dra. Lucimara Gaziola de La Torre (Unicamp)

1. Introdução

1.1 O que é nanotecnologia?

A nanotecnologia se caracteriza como a ciência dos fenômenos e da manipulação de materiais às escalas atômica, molecular e macromolecular, o que compreende dimensões entre 1 a 100 nanômetros.

Entre as várias áreas de aplicação, a nanotecnologia na área médica e farmacêutica têm ganho destaque ao utilizar as propriedades e características físicas de nanopartículas, tais como: a equivalência em escala com moléculas e sistemas biológicos além de grande proporção de área de superfície para volume, para o tratamento e diagnóstico de doenças a nível molecular (KIM, B. Y. S., RUTKA, J. T. & CHAN, 2010).

Por conta disso, as nanopartículas podem ser utilizadas para auxiliar no transporte de agentes diagnósticos ou terapêuticos por meio de barreiras biológicas; para ter acesso às moléculas; para mediar as interações e para detectar mudanças moleculares de uma maneira sensível e de alto rendimento. (KIM, B. Y. S., RUTKA, J. T. & CHAN, 2010).

1.2 Lipossomas

Dentre as nanopartículas orgânicas destacam-se os lipossomas que são nanopartículas lipídicas que se configuram como vesículas esféricas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas naturais ou sintéticas que envolvem um núcleo aquoso (CARUGO et al., 2016).

Devido a essa conformação (Figura1), os lipossomas são carreadores de fármacos interessantes uma vez que, moléculas hidrofílicas podem ser encapsuladas no núcleo aquoso, ao passo que lipofílicos podem ser encapsulados na bicamada fosfolipídica e anfifílicos podem ficar ancorados na nanoestrutura. (FAN; ZHANG, 2013)



Figura 1: Conformação de Lipossoma: núcleo aquoso revestido por uma bicamada de fosfolípidios (CAPSULARIS 2016)

Além de aspectos de solubilidade entre lipossoma e o meio, os aspectos de carga também influenciam no desempenho da liberação de drogas. Os lipossomas podem conter cargas, as quais lhe atribuem uma carga global neutra, positiva ou negativa.

1.3 Evolução dos lipossomas

Apesar da nanoestrutura lipossomal mimetizar a membrana celular e permitir a incorporação de diferentes moléculas, uma série de melhorias foram incorporadas aos lipossomas. Com o objetivo de aperfeiçoar o potencial de encapsulação e composição das vesículas que foram criadas em 1965 de forma a corroborar para a ampliação de eficácia.

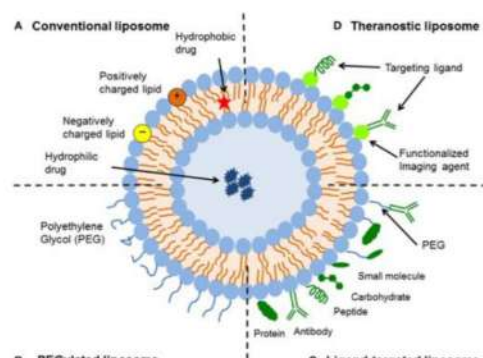


Figura 2- Tipos de lipossomas e

possíveis configurações para aplicações biomédicas

(SERCOMBE et al., 2015)

Com o passar do tempo, se tornou evidente que lipossomas "clássicos" (Figura 2) possuíam alguns problemas associados ao uso *in vivo*, isso porque esses lipossomas (1ª geração) apresentavam dificuldade em reter alguns tipos de moléculas encapsuladas. Esse obstáculo se dava em decorrência da exposição às proteínas séricas que afetavam a liberação de medicamentos. Essa limitação foi solucionada a partir da alteração da composição da bicamada do lipossoma com adição do colesterol (ALLEN; CULLIS, 2013).

A introdução de colesterol à bicamada lipídica dos lipossomas aumenta sua estabilidade *in vivo* e *in vitro*, isso ocorre porque colesterol é uma molécula hidrofóbica que interage com a bicamada, estabilizando-a.

Outra mudança foi desenvolvimento de lipossomas estericamente estabilizados, por meio da adição do polímero hidrofílico que pode ser observado na Figura 2. O polietilenoglicol (PEG) que contribuiu para estabilidade e aumentou o tempo de circulação no sangue. (SERCOMBE et al., 2015)

E por fim, a adição de ligantes de direcionamento foi incorporada com a finalidade de aumentar a especificidade da entrega do medicamento e retê-lo em tecidos e células doentes, com deposição mínima em locais não-alvo. (Figura 2) (SERCOMBE et al., 2015).

Graças as características intrínsecas dos lipossomas e as adaptações feitas em sua composição, como já mencionado, essas vesículas se tornaram um potencial alternativo para entrega de fármaco.

2. Entrega de fármacos

Considerando as características físicas dos lipossomas, a entrega de fármacos por meio destes apresenta-se como uma possibilidade vantajosa em relação à entrega convencional. A qual enfrenta alguns desafios notáveis como : o surgimento de efeitos colaterais severos, eliminação sistêmica rápida e alto potencial para o desenvolvimento de resistência das células a múltiplas drogas (DONG et al., 2019).

Em contrapartida, por meio da nano entrega é possível controlar a liberação da droga, modificar a biodistribuição, direcionar a entrega da droga para o local da doença e aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade. (SHAH et al., 2020).

3. Produção de lipossomas

Tendo em vista o potencial de uso dos lipossomas para entrega de drogas, a consideração sobre as diferentes técnicas de montagem faz-se necessária para produção satisfatória a fim de garantir um melhor aproveitamento.

E uma vez que existem diferentes métodos para a produção de lipossomas a seleção do método mais adequado depende de alguns fatores como: as características físico-químicas do lipossoma e do fármaco; a toxicidade e a concentração da substância carregada; o meio em que os lipossomas estão dispersos; os processos adicionais durante a aplicação / entrega dos lipossomas; o tamanho e a meia-vida desejados para o sucesso da aplicação; e os custos, reprodutibilidade e aplicabilidade em relação à produção em grande escala. (BOZZUTO; MOLINARI, 2015)

Dentre as técnicas de produção de lipossomas destacam a produção em *bulk* e a produção microfluídica que serão tratadas a seguir:

3.1. Técnicas em bulk

Dentre as tecnologias tradicionais (*bulk*) de produção duas se destacam: hidratação do filme lipídico e injeção de etanol.

O método de hidratação do filme lipídico consiste na dissolução do lipídio em um solvente orgânico; seguida da evaporação do solvente; e a dispersão do filme lipídico obtido em meio aquoso. (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Já a injeção de solvente fornece hidratação dos lipídios diretamente de um solvente orgânico e alcançam uma suspensão aquosa de lipossomas. (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Contudo, ambas as técnicas não permitem o controle das condições de produção de forma satisfatória para garantir a uniformidade das partículas formadas, o que resulta na necessidade de uma segunda etapa de pós-processamento como: extrusão, tratamento com ultrassom ou congelamento e descongelamento repetitivos (CARUGO et al., 2016). Em decorrência disso, a tecnologia microfluídica desponta como uma alternativa vantajosa.

3.2. Técnicas microfluídicas

A microfluídica é a ciência e a tecnologia aplicada para o desenvolvimento e controle de pequenas quantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} litros) por meio de pequenos canais (WHITESIDES, 2006) que percorrem microdispositivos (ARYA *et al.*, 2013), os quais podem ser fabricados de polímeros, vidro, silício ou papel (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021).

A microfluídica é capaz de fornecer um controle sensível sobre os processos, o que permite domínio sobre as propriedades de nanopartículas. Além de ser um processo rápido de produção ocasionando na economia de reagentes (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021).

No entanto, nos canais dos dispositivos microfluídicos, os fluidos apresentam baixas vazões, o canal possui baixo diâmetro hidráulico e elevada velocidade de escoamento o que resulta em um número de Reynolds baixo o que caracteriza o escoamento como laminar, apresentando um escoamento em paralelo das correntes.

Em consequência dessa característica de escoamento, garantir a mistura entre as correntes, a fim de assegurar uma eficiência de encapsulação adequada dos compostos é um desafio para a microfluídica, que pode ser amenizado aumentando a área de contato entre as correntes. Dessa forma, a geometria do dispositivo é uma das características determinantes para eficácia do processo.

Uma das geometrias comumente utilizadas é a Focagem de fluxo hidrodinâmico microfluídico (MHF) se desenvolve como uma técnica de difusão de fluidos (principalmente álcool e água, mas também lipídios) com diferentes velocidades inseridos em um chip. Em que o álcool que forma uma corrente central no qual os lipídios são inicialmente solubilizados se difunde na água que forma um tampão em cada um dos lados do dispositivo. Simultaneamente a água se difunde no álcool) até que a concentração de álcool diminua para um nível crítico, abaixo do limite de solubilidade dos lipídios. Como tal, a difusão do álcool desencadeia a formação de lipossomas por um mecanismo descrito como "automontagem" (JAHN et al., 2010)

O escoamento em canais de dimensões micrométricas favorece o escoamento em regime laminar e desta forma, a mistura de moléculas em escoamento contínuo é dominada por efeitos difusivos nos processos de mistura. Neste caso, a transposição do método de injeção de etanol para um processo microfluídico, com o escoamento de uma corrente central contendo etanol e lipídeos, sendo comprimida hidrodinamicamente por duas correntes laterais de fase aquosa, permite a formação de lipossomas com diâmetro e polidispersidade adequados para aplicações biomédicas.

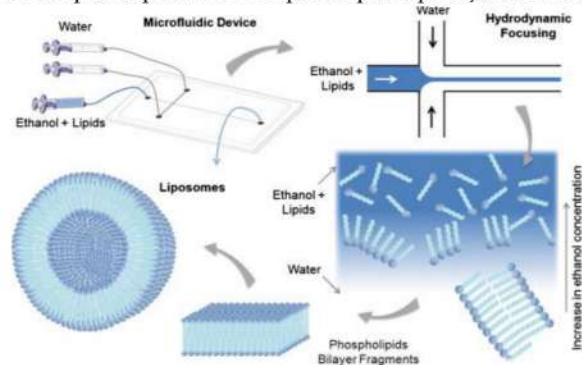


Figura 3: Esquema para formação de lipossomas em um dispositivo de MHF (BALBINO et al., 2013)

Neste caso (Figura 3), o processo microfluídico por focalização hidrodinâmica permite que a difusão controle o processo de mistura, que ocorre de forma reprodutível. No entanto, considerando-se um microcanal, esta técnica permite uma produção volumétrica da ordem de 120 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Como já mencionado, além do destaque para o modelo MHF, a geometria de dispositivos do tipo “Escalonados em espinha de peixe” (SHM) se desenvolve como uma configuração que incorpora uma série de saliências assimétricas chamadas micromisturadores escalonados denominados “espinha de peixe” para mistura de milissegundos

Devido a advecção caótica causada por esse tipo de geometria o comprimento de difusão característico é bastante reduzido entre os fluxos de etanol-lípido e ácido nucleico-tampão, o que permite uma mistura rápida e controlada. (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021)

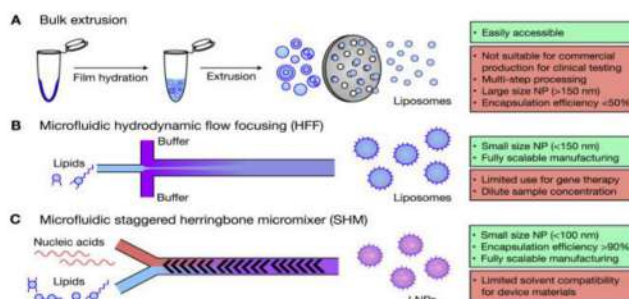


Figura 4: Técnicas de produção de lipossoma (SHEPHERD; ISSADORE; MITCHELL, 2021)

A advecção caótica é uma técnica para aumentar a produtividade da síntese de nanoestruturas lipídicas em comparação a métodos microfluídicos convencionais baseados em difusão (D-MD), os quais tem como principal limitação a baixa produtividade, com vazões residindo na faixa de $\mu\text{L}/\text{min}$ e baixas concentrações finais (EŞ et al., 2020; FIRMINO et al., 2021).

Ela pode ser aplicada em microdispositivos que se utilizam de maiores vazões (na escala de mL/min ou mais) que D-MDs e geometrias diferenciadas. Nesse caso, o escoamento é caracterizado pela geração de fluxos secundários através da recirculação do fluido dentro do canal de mistura. Esse perfil de mistura é gerado através da interação de cisalhamento do fluido com as paredes ou barreiras inseridas no canal.

Dessa maneira, a porção de fluido que entra em contato com as barreiras ou curvas inseridas no microcanal tem sua velocidade bruscamente diminuída, e quando se encontra com a porção de fluido em maior velocidade, o fenômeno é então desencadeado. Essa técnica tem como principal vantagem o aumento da produtividade e melhor controle sobre o processo de mistura, através do uso de elevadas vazões e melhoramento da mistura causada pelo entrelaçamento das linhas de corrente (DI CARLO, 2009; SONG et al., 2003).

4. Referencias bibliográficas

- AL-AMIN, M. D. et al. Dexamethasone loaded liposomes by thin-film hydration and microfluidic procedures: Formulation challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 2020.
- BALBINO, T. A. et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 226, p. 423–433, 2013.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2015.
- CAPRETTO, L. et al. Microfluidic and lab-on-a-chip preparation routes for organic nanoparticles and vesicular systems for nanomedicine applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 11–12, p. 1496–1532, 2013.
- CARUGO, D. et al. Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016.
- DI CARLO, Dino. Inertial microfluidics. **Lab on a Chip**, [S. l.], v. 9, n. 21, p. 3038–3046, 2009.
- DONG, Y. DA et al. Microfluidic preparation of drug-loaded PEGylated liposomes, and the impact of liposome size on tumour retention and penetration. **Journal of Liposome Research**, v. 29, n. 1, p. 1–9, 2019.
- EŞ, Ismail; MONTEBUGNOLI, Leonardo Jose; FILIPPI, Maria Fernanda P.; MALFATTI-GASPERINI, Antonio A.; RADAIC, Allan; BISPO, Marcelo; DE JESUS, Marcelo Bispo; DE LA TORRE, Lucimara 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 [S. l.]**, v. 382, n. 122821, p. 122821, 2020.
- FAN, Y.; ZHANG, Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 81–87, 1 abr. 2013.
- FIRMINO, Priscilla C. O. S.; VIANNA, Sávio S. V.; DA COSTA, Ohanna M. M. M.; MALFATTI-GASPERINI, Antônio A.; GOBBI, Angelo L.; LIMA, Renato S.; DE LA TORRE, Lucimara G. 3D micromixer for nanoliposome synthesis: a promising advance in high mass productivity. **Lab on a Chip**, v. 21, p. 2971–2985, 2021
- JAHN, A. et al. Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. **ACS Nano**, v. 4, n. 4, p. 2077–2087, 2010.
- KIM, B. Y. S., RUTKA, J. T. & CHAN, W. C. W. Current concepts: Nanomedicine. **Journalism**, v. 11, n. 3, p. 369–373, 2010.

RAN, R. et al. Microfluidic self-assembly of a combinatorial library of single- and dual-ligand liposomes for in vitro and in vivo tumor targeting. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 130, n. March, p. 1–10, 2018.

SERCOMBE, L. et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. DEC, p. 1–13, 2015.

SHAH, S. et al. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 154–155, p. 102–122, 2020.

SHEPHERD, S. J.; ISSADORE, D.; MITCHELL, M. J. Microfluidic formulation of nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 274, n. March, p. 120826, 2021.

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

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006.

ZHAO, W.; ZHUANG, S.; QI, X. R. Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 3087–3098, 2011.

ZHAO, X. et al. Microfluidic Generation of Nanomaterials for Biomedical Applications. **Small**, v. 16, n. 9, p. 1–19, 2020.

5. Resumo das atividades

- I. Atividades foram feitas exclusivamente de forma remota devido a pandemia de COVID concentrando-se no levantamento bibliográfico com o uso de ferramentas como *Google Scholar*, *Mendeley* e *Web of Science* e reuniões periódicas.