



PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO BIOATIVO CURCUMINA POR SISTEMA MICROFLUÍDICO DE ADVECÇÃO CAÓTICA

Palavras-Chave: nanopartículas, lipossomas, microfluídica

Autores(as):

GIOVANNA FERREIRA LOPES, FEQ – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). LUCIMARA GAZIOLA DE LA TORRE, FEQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

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 tem ganho destaque ao utilizar as propriedades e características físicas de nanomateriais, 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).

Dentre estes, destacam-se os lipossomas que são nanoagregados lipídicos 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, 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 anfífilicos podem ficar ancorados na nanoestrutura. (FAN; ZHANG, 2013)

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.

Com o passar do tempo, se tornou evidente que lipossomas "clássicos" (1ª geração) possuíam alguns problemas associados ao uso *in vivo*, isso porque esses lipossomas 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. Nesse processo, há modulação da permeabilidade, induzindo um denso empacotamento de fosfolipídios, o que reduz vazamentos do conteúdo encapsulado nos lipossomas. Além disso, a mudança para bicamada de fase fluida para uma bicamada de fase sólida também contribuiu para essa redução (ALLEN; CULLIS, 2013) (BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

Outro bioativo que se demonstrou relevante é a curcumina. Ela é um polifenol hidrofóbico atóxico com importantes propriedades biológicas e farmacológicas, como anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e antibacterianas.

No que diz respeito a produção de lipossomas, a consideração sobre as diferentes técnicas de montagem faz-se necessária para produção satisfatória a fim de garantir um melhor aproveitamento, tendo em vista o potencial de uso da vesícula para entrega de fármacos.

Dentre as técnicas de produção de lipossomas destacam a produção em *bulk* e a produção microfluídica. Contudo, neste trabalho, concentram-se estudos sobre a produção de lipossomas por microfluídica levando em consideração que a produção por métodos em *bulk* produz nanopartículas menos uniformes necessitando de uma etapa de pós processamento.

A microfluídica pode ser definida como 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. Nessa situação, as correntes fluem sem vórtices e a mistura ocorre apenas por meio da difusão molecular, um processo lento quando comparado à convecção.

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.

A advecção caótica é uma técnica para aumentar a produtividade da síntese de nanoestruturas lipídicas em comparação a métodos microfluídicos convencionais baseados em difusão, 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). 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).

O micromisturador 3D (HFR-MD) avaliado recentemente em nosso grupo de pesquisa (FIRMINO et al, 2021), é um tipo de dispositivo que faz uso da técnica de advecção caótica e demonstra sua viabilidade.

Dessa maneira, este trabalho fez uso da técnica de advecção caótica para produção de lipossomas por meio do dispositivo microfluídico HFR-MD (Figura 1), no qual faz-se a mistura entre a corrente central contendo os lipídios solubilizados em etanol seco e duas correntes laterais contendo água ultrapurapara para encapsulação do bioativo curcumina.

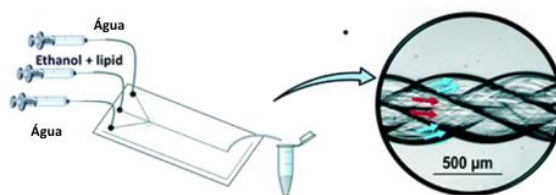


Figura 1: Representação esquemática de dispositivo HFR-MD

METODOLOGIA:

Produção de Dispositivo Microfluídico de alta taxa de fluxo (HFR-MD)

O dispositivo microfluídico de alta taxa de fluxo (HFR-MD) foi fabricado utilizando o método *scaffold*, adaptado de Firmino et al, 2021. Utilizou-se um molde composto por duas partes: base de vidro e laterais plásticas: a base de vidro contém 7 cm x 10 cm e a lateral plástica foi fabricada usando uma impressora 3D (Seth3D AiP) com tecnologia de impressão por extrusão. O polímero utilizado na impressora foi o ácido polilático (PLA) não tóxico com menor contração e menor probabilidade de sofrer deformação. A moldura lateral impressa tinha 7,8 cm x 4,1 cm x 1,6 cm e 0,4 cm de espessura.

A montagem do dispositivo inicia-se com a união da base lateral com a base de vidro fazendo o uso do material do próprio dispositivo e cura por 20 minutos no forno a 45 °C. Em seguida, três fios de nylon foram inseridos nos orifícios da peça do molde, estes foram unidos e esticados na extremidade oposta que contém um único furo, sendo que em cada um dos furos havia uma agulha auxiliar. Posteriormente, o molde deve ser preenchido com uma mistura de monômeros e agente de cura na proporção de 10: 1 p/p.



Figura 2: Dispositivo HFR-MD produzido



Figura 3: Etapa de produção do microdispositivo

Por fim, o PDMS foi curado em um forno de laboratório a 90° por 40 min. Espera-se um dia para remoção dos fios de nylon e com um alicate e para soltar o dispositivo do molde

Produção dos lipossomas em sistemas microfluídicos

Para a síntese de lipossomas em sistemas microfluídicos de fluxo contínuo, será utilizado o microdispositivo de focalização hidrodinâmica descrito no item 2.1. Na corrente central são inseridos lipídios dispersos em etanol e nas correntes laterais água ultrapura. A formação de nanopartículas será monitorada em microscópio invertido Nikon, modelo ECLIPSE Ti-U, com o emprego de bombas seringas, modelo PHD2000 (Infuse/Withdraw), da Harvard Apparatus. Após o preparo das nanopartículas, estas serão armazenadas e refrigeradas a 8°C. As caracterizações físico-químicas deverão ser realizadas dentro de 24 horas após sua formação.

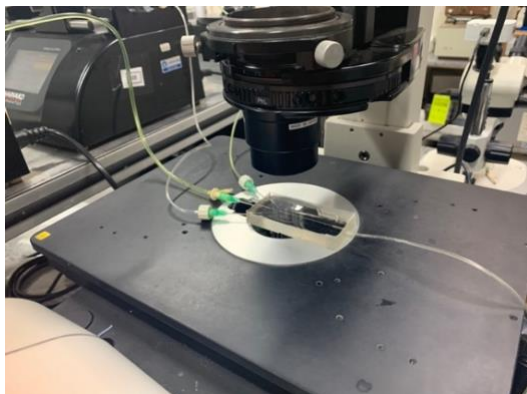


Figura 4: Produção de lipossomas

$$FRR = \frac{2(Q_w)}{Q_a}$$

A análise I foi feita produzindo lipossomas considerando concentração de lipídeo de 5 mM, vazão total de 5 mL/min e quatro FRRs (razão de vazão) diferentes a serem analisadas: FRR 1, FRR 5, FRR 10 e FRR 15, sendo a razão de vazão calculada pelo quociente entre duas vezes a razão aquosa pela razão alcoólica.

A análise II fez o uso da melhor FRR produzida na Análise I e fez adição do bioativo curcumina para produção do lip-Cur (lipossomas com curcumina). A metodologia foi adaptada do protocolo estabelecido no artigo de Gomez Mascaraque 2017. A curcumina foi adicionada ao EPC em solução alcoólica nas concentrações em proporções mássicas: 0,5, 1, 1,5, 2 e 4%.



Figura 5: Soluções de diferentes concentrações de curcumina

Caracterização Físico-Química dos lipossomas

Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Índice de Polidispersidade

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas serão medidos utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, Reino Unido) através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* – DLS). As medidas serão realizadas utilizando laser He-Ne a 633 nm e fonte de energia de 4,0 mW, com detecção em ângulo de espalhamento de 173° (*backscattering*). Cada medida será realizada em triplicata e os valores obtidos serão utilizados para obter o tamanho médio das partículas em termos de intensidade e número. Já em relação ao índice de polidispersidade, este varia entre 0 e 1 e quanto mais próximo o valor se encontra de 1, maior é a polidispersidade dos nanoagregados. Assim como o tamanho, a dispersidade é fornecida pelo equipamento durante a realização das medidas.

Eficiência de encapsulação dentro dos lipossomas

A eficiência de encapsulação foi quantificada pela quantidade de curcumina retida nos lipossomas em comparação a quantidade de curcumina inicialmente colocada na dispersão. As dispersões produzidas foram centrifugadas a 100g e 4°C para 5 min usando uma centrífuga Heal Force Neofuge 23R (Thanes Science, Tailândia). Essas condições foram otimizadas em testes preliminares precipitar os cristais não encapsulados de curcumina e não os lipossomas. O sobrenadante foi diluído 4 vezes com etanol dissolvendo os lipossomas e a curcumina. A concentração de curcumina então foi calculada por espectroscopia UV-vis a 425 nm usando um termoespectrofotômetro modelo Genesys 6 (Nova York, EUA), por meio de uma curva de calibração ($R^2 = 0,9887$) ($y = 129,34x - 0,0947$). Dessa forma, foi possível determinar a eficiência de encapsulação (EE) e a capacidade de carregamento (LC) conforme as Eqs. (2) e (3), respectivamente.

$$EE(\%) = \frac{\text{massa de curcumina encapsulada (experimental)}}{\text{massa total de curcumina adicionada (teórica)}}$$

$$LC(\%) = \frac{\text{massa de curcumina encapsulada (experimental)}}{\text{massa total de lipídeos adicionados (teórica)}}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Estão dispostos na Tabela 1,2 os melhores resultados obtidos ao longo de todos os ensaios realizados no microdispositivo HRF-MD. Os resultados para diâmetro hidrodinâmico e PDI foram obtidos por meio de triplicatas independentes. Foram utilizados fluxos totais de 5 mL/min e concentração de lipídios na dispersão alcoólica foi de 5 mM.

Tabela 1: Análise I – Teste de produção de lipossomas para estudo de melhor FRR para lipídeo EPC

Características Físico-Químicas Lipossomas		
FRR	Média de Diâmetro hidrodinâmico (nm)	PDI
1	138,3 ± 3,13	0,101 ± 0,005
5	41,42 ± 4,06	0,228 ± 0,093
10	36,99 ± 1,15	0,284 ± 0,009
15	68,21 ± 11,96	0,185 ± 0,112

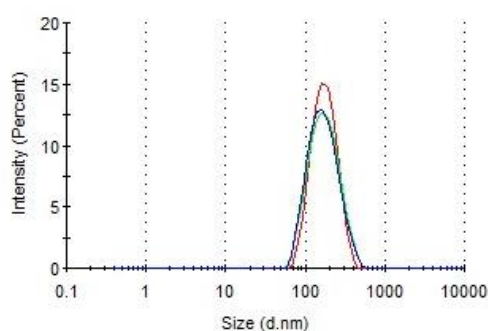


Figura 6: Distribuição por intensidade da FRR 1 reprodução do software Zetasizer Nano ZS

Tabela 2: Análise II – Teste de produção de lipossomas contendo curcumina para FRR 1 para estudo de melhor concentração de curcumina para lipídeo EPC

Curcumina(%m/m)	EE (%)	LC (%)
0,5%	71,8 ± 13,55	0,41 ± 0,07
1%	70,3 ± 3,40	0,74 ± 0,03
1,5%	81,8 ± 7,91	1,30 ± 0,14
2%	65,1 ± 16,17	1,41 ± 0,35
4%	61,4 ± 15,07	2,93 ± 0,66

Tabela 3: Análise II – Estudo de Características Físico-Químicas Lip-Cur em concentração mássica de 1% de curcumina

FRR	Média de Diâmetro hidrodinâmico (nm)	PDI
1	345 ± 10,8	0,163 ± 0,107

Por meio desses experimentos foi possível notar que há uma tendência de redução do tamanho dos lipossomas de acordo com a diminuição da corrente alcoólica (maiores FRRs). Para o lipídeo EPC a FRR 1 se demonstrou a mais adequada para produção de lipossomas. O valor obtido está condizente com o obtido por Firmino *et al* 2021 no qual a Média de Diâmetro hidrodinâmico (nm) para as mesmas condições experimentais foi de 175,55 ± 2,65 e PDI 0,106 ± 0,011.

Para a Análise II a produção de 1% em massa apresentou os menores desvios e um valor condizente aos estudos de Firmino *et al* 2021 no qual a eficiência de encapsulação foi de 63,8 ± 5,84 e capacidade de carregamento de 1,58 ± 0,15. No que diz respeito a questões estruturais o lipídeo EPC é insaturado, isso permite que existam espaços gerados pelas dobras das cadeias de acil que favorecem a acomodação da curcumina próximo ao núcleo da membrana. Esperava-se que com a adição na curcumina aos lipossomas houvesse aumento das vesículas devido a desestabilização da bicamada como indicado pela literatura. Esse fenômeno foi observado como indicado nas Tabelas 1 e 3.

CONCLUSÕES:

O desenvolvimento desse projeto pode reunir um conjunto de informações importantes para realização de projetos posteriores para estudos e mais entendimento sobre o processo de produção de lipossomas com diferentes formulações microfluídicas, em especial o microdispositivo que favorece a advecção caótica.

A realização desse projeto não acarretou maiores dificuldades em minha situação acadêmica, com a participação no laboratório e reuniões, percebo um grande desenvolvimento como estudante a profissional.

No que diz respeito às características dos lipossomas formados é possível dizer que de forma geral as vesículas formadas atingiram as tendências de dimensões esperadas de forma consideravelmente satisfatória para FRR 1 e para o Lip-Cur com concentração de 1%. De forma que, para as outras configurações são necessárias mais investigações.

Uma possível possibilidade de andamento desse trabalho é a ampliação da investigação experimental de novas concentrações de curcumina.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36–48, 2013.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2015.
- 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.
- EŞ, Ismail; MONTEBUGNOLI, Leonardo Jose; FILIPPI, Maria Fernanda P.; 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
- KIM, B. Y. S., RUTKA, J. T. & CHAN, W. C. W. Current concepts: Nanomedicine. **Journalism**, v. 11, n. 3, p. 369–373, 2010.
- 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.
- NGUYEN, Tuan Anh et al. Micro and nano liposome vesicles containing curcumin for a drug delivery system. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 035003, 2016.
- 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.
- SHEPHERD, S. J.; ISSADORE, D.; MITCHELL, M. J. Microfluidic formulation of nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 274, n. March, p. 120826, 2021.
- WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006.
- GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G. et al. Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. v. 233, p. 343–350, 15 out. 2017.