

Análise exploratória de métodos para encapsulação da curcumina e lipossomas sintetizados por microfluídica de alta vazão

Palavras-Chave: Lipossomas, microfluídica, nanotecnologia

Autores/as:

Aluno: Ricardo Pereira Buffo

Orientador: Dra. Lucimara Gaziola de La Torre

Coautor: Priscilla Cibelle Oliveira de Souza Firmino

INTRODUÇÃO

A microfluídica compreende a ciência e a tecnologia aplicadas para o desenvolvimento de dispositivos em escala micrométrica que possibilitam o escoamento de fluidos em pequenas quantidades (10^{-9} a 10^{-18} litros) (Arya *et.al*, 2013). Comparado com processos convencionais na Engenharia Química a microfluídica conta com muitas vantagens como por exemplo o baixo consumo de reagentes, pequeno custo energético, maiores rendimentos e tempos de análise menores, isso proporciona cada vez mais a fixação dessa ferramenta versátil para diversas áreas, como a produção de nanopartículas dentre essas, os lipossomas. (Balazs *et.al*, 2011; Balbino *et.al*, 2013; Mozafari, 2005; Ren *et.al*, 2014). Essas vesículas que mimetizam a membrana celular podem ser obtidas por diferentes métodos, mas nem sempre de maneira controlada em termos de tamanho, polidispersidade e lamelaridade, o que limita suas aplicações.

Ainda, os pequenos volumes que escoam pelos microcanais são caracterizados por baixos números de Reynolds, o que indica ausência de turbulência (na ausência de forças externas) e por consequência baixos índices de mistura. Esse fato traduz que a formação das vesículas ocorre apenas pela difusão causada pelo gradiente de concentração entre as correntes que fluem paralelamente nos microcanais (Sun *et.al*, 2015; Thorsen *et.al*, 2002). Misturas ineficientes impactam, inclusive, sobre a produtividade na síntese de nanopartículas (Camargo *et.al*, 2016; Mark *et.al*, 2010). Mediante este cenário, ainda é um desafio melhorar a mistura entre as espécies nos microcanais através de técnicas que permitam aumentar a produtividade e repetibilidade das vesículas geradas. Por isso, uma alternativa que representa uma possibilidade efetiva de melhorar a mistura em escoamento laminar trata-se da advecção caótica. Este fenômeno é gerado quando em um escoamento laminar as linhas de fluxo se

misturam de forma intensa, mas não atingem velocidades tão altas ao ponto de classificar o regime como turbulento (Aref, 2002). Em microfluídica, a advecção caótica pode ser gerada mediante a modificação da geometria dos microcanais (Ottino, 1990; Saadjan *et.al*, 2012), permitindo a sobreposição de linhas de corrente em movimento fluídico que ocorre de forma repetida.

Dessa forma, este trabalho se propôs a estudar a síntese de lipossomas em um microdispositivo que explora a advecção caótica (Figura 1) favorecendo a mistura, para dessa forma obter lipossomas de tamanho e polidispersidade reprodutíveis com alta produtividade e características desejadas.

Além disso foi realizado o estudo de encapsulação de um nutracêutico por meio desses lipossomas.

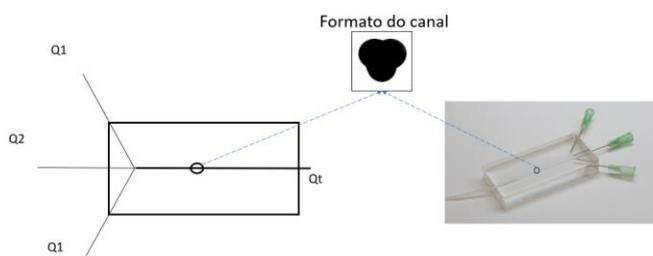


Figura 1: Esquema do microdispositivo que favorece advecção caótica, Q_1 são as correntes aquosas e Q_2 a corrente lipídica, Q_t é a corrente de saída.

METODOLOGIA

Os lipossomas, devido a sua estrutura particular, sendo vesículas de membranas fechadas de fosfolipídios, são uma ótima opção para a encapsulação de substâncias diversas. Essa versatilidade permite a encapsulação de substâncias hidrofílicas (encapsuladas no núcleo) e substâncias hidrofóbicas (encapsuladas nas bicamadas), as quais podem ser utilizadas como ativos

encapsulados pelos lipossomas (Rigolletto *et.al*, 2012; Pihl *et.al*, 2005).

No presente trabalho, foi utilizada a curcumina (C1386-50G, marca Sigma) como substância a ser encapsulada. A curcumina é um polifenol natural amarelo, é obtida a partir da *Curcuma longa L* e também é chamada de cúrcuma. A curcumina é conhecida por apresentar propriedades anticarcinogênica, antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas e de cicatrização de feridas (Collins *et.al*, 2013; Kondiah *et.al*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2016) o que a torna uma ótima substância de estudo para aplicações medicinais e alimentícias.

Para a encapsulação do bioativo, foi adicionada a curcumina na fase alcoólica (contendo etanol + lipídio), essa técnica para a formação de lipossomas para a encapsulação de um ativo é uma adaptação da feita por MICHELON *et al.*, 2016 e Mascaraque *et al.*, 2017.

A análise da efetividade da encapsulação foi feita por meio de análises de espectroscopia UV-Vis no comprimento de onda de 415 nm. Para isso, foi traçada uma curva padrão ($R^2 = 0,9813$) contendo etanol e curcumina em várias concentrações (Figura 2) obtidas a partir dos valores de absorvância para cada situação. após traçada a curva comparou-se os valores de absorvância obtidos com as amostras de encapsulação com os lipossomas. Tendo o valor inicial da concentração de curcumina e tendo o valor final de concentração obtido pela análise de absorvância foi possível obter a porcentagem de encapsulação do ativo. Uma prática parecida foi realizada por Mascaraque *et al.*, 2017.

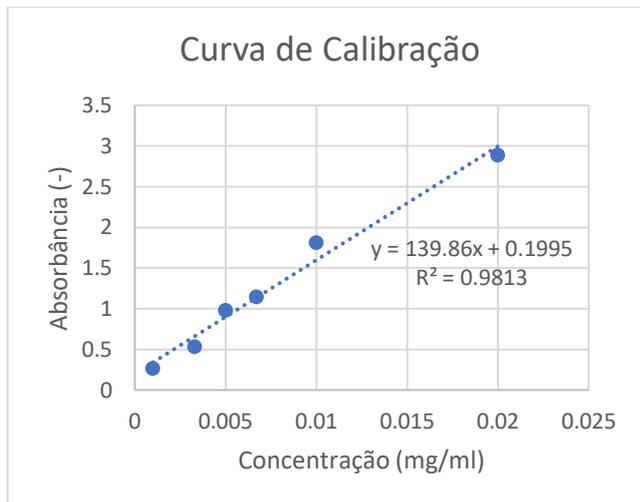


Figura 2: Curva de calibração para a mistura de etanol, lipídio, água e curcumina.

Com base na equação da reta da curva de calibração foi possível obter os valores das concentrações finais de curcumina livre após a síntese dos lipossomas. Para isso foi isolada a concentração (x) na equação da reta e aplicada a absorbância (y) obtida para cada amostra (1%, 4%, 7% e 10%), como pode ser observado na Equação 1.

$$x = \frac{y - 0,1995}{139,86} \quad (1)$$

O resultado obtido por meio da Equação 1 representa a concentração de curcumina que não foi encapsulada ao fim do processo, entretanto, é necessário levar em consideração a dissolução da solução inicial para uma real análise da encapsulação. Para tal, utilizou-se a Equação 2 a qual contempla as diluições realizadas no processo, que no total são duas. A primeira delas ocorre durante o próprio processo de síntese dos lipossomas, onde a solução mãe de contendo a curcumina é adicionada à uma vazão de 2,5 ml/min e água é adicionada em uma mesma vazão, totalizando 5 ml de solução final. A segunda é realizada para a análise de espectroscopia,

onde é feita a diluição de 1 ml de dispersão em 4 mL de etanol.

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f \quad (2)$$

C_i = Concentração da solução antes da diluição

V_i = Volume total da solução inicial

C_f = Concentração da solução após a diluição

V_f = Volume total da solução final

Com o valor de massa encapsulada obtido utiliza-se as Equações 3 e 4 para o cálculo da efetividade de encapsulação (EE) e também a capacidade de carregamento (CC), respectivamente.

$$EE(\%) = \frac{\text{Massa de curcumina encapsulada (experimental)}}{\text{Massa total de curcumina adicionada (Teórica)}} \cdot 100 \quad (3)$$

$$CC(\%) = \frac{\text{Massa de curcumina encapsulada (experimental)}}{\text{Massa total adicionada (Teórica)}} \cdot 100 \quad (4)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios, realizados em triplicata, conforme apresentado na Tabela 1, demonstram que a eficiência de encapsulação dos lipossomas decresce com o aumento da porcentagem de curcumina, isso se dá devido à curcumina ser um agente hidrofóbico que irá se localizar na bicamada. Os resultados experimentais nos levam a crer que a concentração de 1% já é capaz de ocupar os espaços vazios entre as caudas hidrofóbicas de uma maneira efetiva, o aumento dessa concentração se torna inviável pois não há espaço no lipossoma para encapsulação. Dessa forma, toda a curcumina adicional permanece em solução, resultando em uma grande diminuição da eficiência do processo. Nota-se também que a capacidade de carga, que está diretamente ligada à quantidade de lipídio no meio, não é muito elevada, já que a

curcumina é inserida na bicamada lipídica e o espaço disponível é limitado.

Todos os ensaios foram realizados nas condições de FRR 1 (razão entre as correntes de entrada com valor 1, ou seja, a soma das vazões de ambas as correntes de água tem valor igual à corrente de lipídio) e com a concentração de 5 mM de lipídio na solução inicial lipídio + curcumina. Por fim, todas as sínteses foram realizadas com uma vazão total de 5 mL/min.

Tabela 1: Resultados experimentais de eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de carga (CC) dos lipossomas sintetizados.

Quantidade de Curcumina Inicial	EE (%)	CC (%)
1%	67.84	1.00
4%	24.44	2.08
7%	18.42	2.72
10%	17.42	2.87

Também foi realizada uma análise exploratória quanto ao tema, a tabela abaixo ilustra os principais resultados de encapsulação para cada um dos métodos abordados no estudo. Também estão ilustrados o tamanho médio dos agregados formados, assim como o seu índice de polidispersidade.

Tabela 2: Comparação dos resultados de encapsulação dos métodos analisados.

Método	Lipídio / Surfactante	Tamanho médio (nm)	PDI	EE (%)
Bulk	90G	508	0.75	79
Microfluídica herringbone	T85	231	0.34	9.57
Microfluídica advecção caótica	E80	163.2	0.19	67.84

Ao observar os resultados nota-se que o método em Bulk é o que proporciona uma síntese de lipossomas com maior diâmetro

hidrodinâmico e maior eficiência de encapsulação, em contrapartida esse método conta com dificuldades em realizar a síntese de forma controlada, o que resulta em um valor alto no PDI e também em uma produtividade baixa. O método abordado por Obeid *et al.*, 2019 consegue contornar o problema de altos valores de PDI e proporciona a síntese de nanoagregados de menor tamanho médio, mas que ainda contam com certa capacidade de encapsulação, entretanto, a eficiência obtida é a menor entre as três analisadas.

O método tratado nesse trabalho, que aborda a advecção caótica juntamente com a focalização hidrodinâmica em microdispositivos, foi capaz de obter uma eficiência de encapsulação próxima a em bulk sem perder o controle na síntese dos lipossomas, obtendo um baixo valor no índice de polidispersidade e mantendo a formação de nanoagregados com um bom diâmetro hidrodinâmico.

Por fim, tais análises não visam realizar uma comparação entre os estudos, já que é variado o método, composição e vazão mássica em cada um dos casos abordados, o que tornaria inconclusiva a comparação. Apenas foi realizado o estudo exploratório para compreender como são variadas as opções de encapsulação de nutraceuticos como a curcumina.

CONCLUSÕES

O presente projeto demonstrou a viabilidade de realizar um processo de encapsulação de curcumina durante a síntese de lipossomas no microdispositivo de advecção caótica. De acordo com os percentuais analisados, foi verificado que a concentração

ótima do nutracêutico foi de 1% (mol/mol) e que o aumento da concentração além desse percentual não é uma estratégia vantajosa em termos de rendimento do agente encapsulado.

Com isso, se conclui que os lipossomas sintetizados foram capazes de encapsular a curcumina em alta produtividade e repetibilidade.

Para o estudo exploratório sobre o tema, foram abordadas outras duas formas de se alcançar o mesmo objetivo de encapsulação da curcumina. Observou-se que há grande variedade de estudos que abordam diferentes técnicas indicando um grande crescimento na pesquisa científica nesse tema.

BIBLIOGRAFIA

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.

BALAZS, Daniel A.; GODBEY, W. T. Liposomes for use in gene delivery. *Journal of drug delivery*, v. 2011, 2011.

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 liquidliquid extraction". *Analytica Chimica Acta*. v. 940, p. 73-83, 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.

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.

GOMEZ-MASCARAQUE, L.G., Casagrande Sipoli, C., de La Torre, L.G., LopezRubio, 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.

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.

MARK, D. et al. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 3, p. 1153, 2010.

MICHELON, Mariano et al. High-throughput continuous production of liposomes using hydrodynamic flow-focusing microfluidic devices. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, v. 156, p. 349-357, 2017.

MOZAFARI, M. Reza. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, v. 10, n. 4, p. 711, 2005.

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.

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.

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.