

PRODUÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS DE BAIXO CUSTO PARA A PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS CONTENDO CURCUMINA

Palavras-Chave: MICROFLUÍDICA, XEROGRAFIA, LIPOSSOMAS, CURCUMINA

Autores/as:

LETÍCIA MAKI CHAN, FEQ, UNICAMP

Dr.^a BRUNA GREGATTI DE CARVALHO, FEQ, UNICAMP

Prof.^a Dr.^a LUCIMARA GRAZIOLA DE LA TORRE (orientador(a)), FEQ, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Nanoestruturas lipídicas como os lipossomas têm sido amplamente explorados em aplicações farmacêuticas pela sua capacidade de carrear e liberar sustentadamente moléculas de interesse. Essas vesículas de bicamada lipídica formam sistemas autoagregados de estrutura anfifílica capazes de encapsular diversos compostos — como materiais genéticos, bioativos e fármacos¹. No caso dos bioativos, muitos apresentam características hidrofóbicas e baixa solubilidade aquosa — como a curcumina, conhecida por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas —, comprometendo sua biodisponibilidade e limitando sua eficácia clínica. Assim, os lipossomas se destacam como uma solução eficaz, que permite a incorporação desses compostos e promove maior dispersão e aproveitamento terapêutico².

Para a produção de lipossomas, a microfluídica — tecnologia dedicada ao desenvolvimento de sistemas capazes de operar com ínfimas porções de fluidos em microcanais — se destaca por permitir maior controle do tamanho e homogeneidade das nanoestruturas em comparação a métodos convencionais, como filme fino e injeção de etanol³.

No entanto, sua ampla adoção é limitada pelos custos elevados e pela infraestrutura complexa necessária para a fabricação dos dispositivos microfluídicos por técnicas comuns, como a litografia macia. Como alternativa simples e reprodutível, a xerografia tem se mostrado como uma solução de baixo custo e alta agilidade para a fabricação desses dispositivos. Com o uso de máquinas de corte tipo

plotter, é possível criar canais micrométricos em minutos, dispensando processos convencionais e possibilitando a aplicação prática em projetos de nanotecnologia voltados à encapsulação de fármacos⁴.

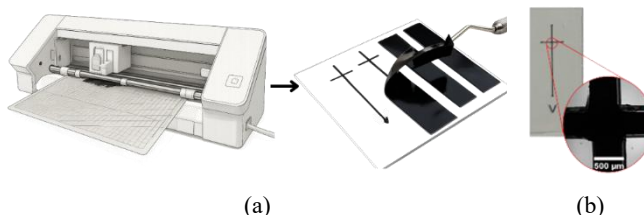
Diante disso, este projeto busca demonstrar pela primeira vez a viabilidade da xerografia para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos e produção de lipossomas encapsulados com curcumina.

METODOLOGIA:

PRODUÇÃO DE DISPOSITIVOS

MICROFLUÍDICOS VIA XEROGRAFIA:

Dispositivos microfluídicos de focalização hidrodinâmica foram desenvolvidos via xerografia com base no protocolo de Speller *et al.*⁴, empregando a Plotter Cameo 4. Os moldes negativos em junção T (500 × 140 µm) em fita vinílica foram cortados em placas de polimetilmetacrilato (PMMA) (Fig. 1). Para fins comparativos, dispositivos produzidos por litografia macia (50 × 50 µm) foram utilizados como base nesse estudo. Os microcanais foram moldados com polidimetilsiloxano (PDMS) e selados em lâminas de vidro utilizando plasma de O₂ (Fig. 2a).



(a)

(b)

Fig. 1 - (a) Diagrama esquemático da produção de moldes via xerografia. (b) Molde produzido via xerografia com fita vinílica em placas de PMMA, 500 x 140 µm (largura x altura do canal), e imagem de microscopia óptica da junção T do molde do canal (Barra de escala: 500 µm).

A qualidade e a viabilidade da xerografia como técnica de fabricação de dispositivos microfluídicos foram avaliadas por meio da análise da exatidão e precisão dos cortes, utilizando imagens de microscopia óptica e o software ImageJ®. As medições da largura, feitas em quatro diferentes regiões dos canais, foram comparadas ao valor nominal de 500 µm, definido pela limitação técnica da máquina de corte, sendo base para a confecção dos moldes. Para avaliar a conformidade dimensional dos canais foram calculados o desvio padrão e o erro absoluto médio.

PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS EM SISTEMAS MICROFLUÍDICOS:

Lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (EPC) e colesterol (Col) (66:34 mol%) foram produzidos a partir de solução lipídica estoque preparada em etanol anidro, utilizando os dispositivos microfluídicos na configuração de focalização hidrodinâmica. Na corrente central foi alimentada a solução lipídica e, nas laterais, solução tampão fosfato-salino (PBS), pH 7, com auxílio de bombas seringas (Fig. 2b). A produção foi acompanhada utilizando microscópio invertido e, após a produção, os lipossomas foram armazenados a 8 °C.

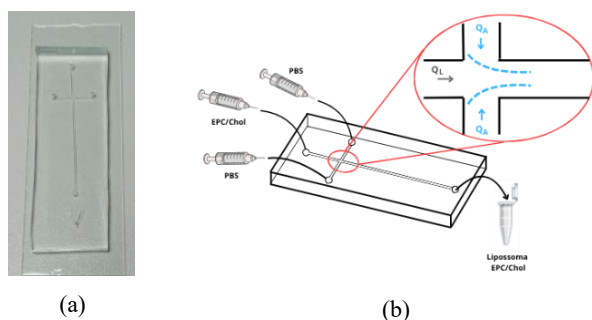


Fig. 2 - (a) Dispositivo microfluídico produzido via xerografia em PDMS/vidro. (b) Diagrama esquemático de dispositivo microfluídico ilustrando a configuração do processo de produção de lipossomas EPC/Col com fluxo central lipídico (Q_L) de EPC/Col sendo focalizado hidrodinamicamente por fluxos laterais (Q_A) de PBS.

A produção dos lipossomas foi otimizada variando separadamente a razão dos fluxos (*Flow Rate Ratio*, FRR) (5, 10 e 15) e a velocidade média de escoamento (v_m) (0,6, 1,2 e 1,8 m·s⁻¹), conforme descrito nas Eqs. (1) e (2).

$$FRR = \frac{2 \times Q_A}{Q_L} \quad (1)$$

$$v_m = \frac{\text{vazão total}}{\text{área (A)}} = \frac{2Q_A + Q_L}{A} \quad (2)$$

Os resultados obtidos via xerografia foram comparados aos da litografia macia, nas mesmas condições de dinâmica de fluxo relacionando a v_m .

Caracterizações dos lipossomas (EPC/Col) foram realizadas utilizando espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS) para determinação dos diâmetros hidrodinâmicos e o índice de polidispersidade (PDI), além da medida da velocidade de mobilidade eletroforética das partículas, obtendo o potencial zeta (PZ).

ENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA EM LIPOSSOMAS:

A encapsulação da curcumina foi realizada em ambos os dispositivos microfluídicos, xerografia e litografia macia, em condições otimizadas de produção de lipossoma — FRR 5 e v_m de 0,6 m·s⁻¹ — visando obter maior produtividade e garantir consistência nas propriedades físicas dos lipossomas produzidos por ambos os microchips.

A curcumina foi adicionada na solução lipídica em diferentes proporções mássicas (curcumina/lipídio) de 1, 2,5, 5 e 10% a fim de avaliar a eficiência de encapsulação (EE) (Eq. 3) e a capacidade de carga (CC) (Eq. 4).

$$EE(\%) = \frac{\text{massa de curcumina encapsulada}}{\text{massa total de curcumina adicionada}} \times 100 \quad (3)$$

$$CC(\%) = \frac{\text{massa de curcumina encapsulada}}{\text{massa total de lipídios no sistema}} \times 100 \quad (4)$$

A curcumina encapsulada foi separada da porção não incorporada por centrifugação a 4 °C (30000 g por 10 min). Em seguida, foi realizada a diluição do sobrenadante contendo os lipossomas com curcumina encapsulada na proporção de 1:10 (v/v) em etanol anidro para induzir a ruptura da bicamada lipídica dos lipossomas e promover a liberação do encapsulado. Assim, a concentração de curcumina encapsulada foi analisada por espectroscopia UV-vis a 425 nm através de uma curva de calibração previamente calculada.

Os resultados de EE e CC foram analisados por meio da análise estatística de variância (ANOVA) bifatorial com nível de significância de 0,05, considerando a metodologia empregada para produção dos microchips e as diferentes concentrações de curcumina adicionadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS VIA

XEROGRAFIA:

Os moldes fabricados por xerografia foram analisados quanto a exatidão e precisão dos canais em quatro regiões distintas. Estes apresentaram dimensões próximas às projetadas de 500 μm (média de 498 μm), com erro absoluto de 0,2% e desvio padrão inferior a 1%. A técnica também se destacou pela agilidade, permitindo a produção de quatro moldes em cerca de 40 minutos — um ganho expressivo frente à litografia. Contudo, foi observado um desvio de cerca de 60 μm entre os canais centrais de entrada e saída, possivelmente relacionado à precisão do corte.

Os canais em PDMS dos microchips, apesar de leves irregularidades nas paredes causadas pela resolução da xerografia, apresentaram dimensões e definição compatíveis com os moldes originais, demonstrando exatidão e precisão satisfatórias, mesmo com pequenas imperfeições nas paredes internas. O uso de adesivo vinílico, cuja superfície é lisa e uniforme, contribuiu positivamente para a formação de canais transparentes e com boa reprodutibilidade.

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE

LIPOSSOMAS NA MICROFLUÍDICA:

Nesse estudo, foram investigadas as melhores condições de produção de lipossomas (EPC/Col) em microchips de xerografia. Para isso, foram testadas diferentes condições de fluxo, avaliando os efeitos da FRR e da v_m . A análise foi feita visando o aumento da produtividade mássica e a otimização dos parâmetros do processo a fim de obter valores satisfatórios para o tamanho médio (na faixa de 100 nm) e PDI (menores que 0,3) dos lipossomas para aplicações em indústrias farmacêutica e alimentícia, além de comparar com a litografia macia.

Na primeira etapa, os microdispositivos foram avaliados a uma mesma v_m de 1,2 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ para diferentes FRRs — 5, 10 e 15, com concentrações finais de lipossomas de 1,9, 2,7 e 5 mM, respectivamente. Os resultados obtidos (Fig. 3) demonstram maior sensibilidade do microchip de litografia em relação a FRR, em que o diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas produzidos foi inversamente proporcional à FRR utilizada. Esse comportamento está alinhado ao descrito

por Jahn *et al.*⁵, que atribuem esse fenômeno à dinâmica de difusão do álcool na mistura de fluidos, visto que a maior concentração de álcool na interface inicial, FRRs baixos, favorece a formação de lipossomas maiores.

Por outro lado, os microdispositivos de xerografia produziram, em geral, lipossomas menores (cerca de 98 nm) com PDIs maiores (na faixa de 0,20), mas ainda baixos, em comparação com os de litografia macia (diâmetro médio de 143 nm e PDI na faixa de 0,16). Entretanto, em condições de menor diluição, FRR 5, os PDIs entre os dois métodos foram muito próximos, sendo o obtido em litografia 0,22 e o de xerografia 0,21.

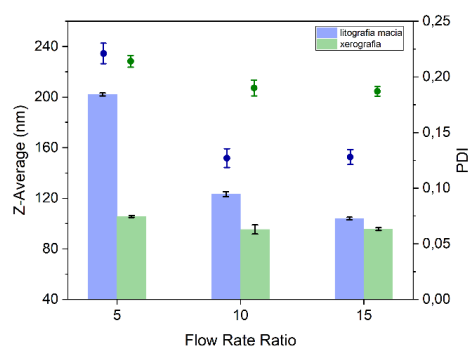


Fig. 3 - Valores de diâmetro médio dos lipossomas baseado no Z-Average (colunas de barras) e respectivos PDIs (círculos) para lipossomas em função da FRR a uma mesma v_m igual a 1,2 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.

Na segunda etapa deste estudo, foi investigada a condição que maximizava a produtividade mássica final. Para tal, outras condições de produção foram testadas, variando a v_m — 0,6, 1,2 e 1,8 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ — a uma FRR fixa de 5 com concentração final de lipossomas de 5 mM (Fig. 4). No microchip de xerografia, lipossomas maiores (188 nm) foram obtidos na menor velocidade (0,6 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Isso ocorre porque há uma contradifusão etanol/PBS, na qual a concentração local de etanol diminui, favorecendo a autoagregação do lipídio⁶. Em velocidades mais altas, essa diferença é menos pronunciada, sugerindo que o tempo do processo de transferência de massa para ocorrer a mistura é menor.

Para os testes realizados nos microchips de litografia, a v_m não apresentou impacto relevante no tamanho dos lipossomas. Essa menor sensibilidade pode estar relacionada à maior resistência hidráulica do canal em comparação com o de xerografia, que limita a aceleração do fluxo e mantém o tempo de residência relativamente constante mesmo com o aumento da v_m ⁷.

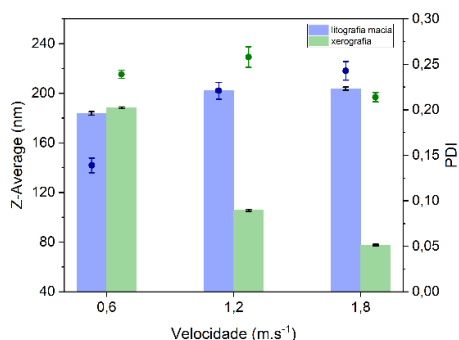


Fig. 4 - Valores de diâmetro médio dos lipossomas baseado no Z-Average (colunas de barras) e respectivos PDIs (círculos) para lipossomas em função da v_m a uma mesma FRR igual a 5.

A comparação dos lipossomas produzidos nas condições de v_m de $1,8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ mostrou que o diâmetro médio obtido em litografia foi de 215 nm e em xerografia de 77 nm. O menor diâmetro tido em xerografia é explicado pelo perfil de velocidade do fluxo, em que o impacto da condição de contorno sem deslizamento nas paredes é reduzido, resultando numa distribuição de velocidade mais homogênea na região de mistura⁶.

Independentemente do dispositivo e das condições operacionais, os lipossomas produzidos apresentaram distribuição unimodal, com estreita faixa de tamanho e valores de PDI próximos de 0,2, indicando boa homogeneidade. A carga superficial das vesículas foi avaliada pelo PZ, mantendo-se entre $-4,5$ e $-9,5 \text{ mV}$ em todas as condições. Tal perfil reflete a estabilidade das partículas e está em conformidade com a natureza zwitteriônica do lipossoma EPC/Col produzido, com leve negatividade atribuída à orientação do grupo fosfato e às interações na interface com íons da solução.

Sendo assim, os microchips de xerografia possibilitaram a produção de estruturas lipossomais menores com resultados comparáveis de estabilidade e homogeneidade sob as mesmas condições de dinâmica de fluxo aplicadas na litografia, por meio do ajuste adequado do FRR e da v_m . Além disso, a produção mostrou-se mais eficiente em canais maiores, cuja geometria reduziu a resistência hidráulica e promoveu maior produtividade. Em conjunto, esses resultados reforçam a viabilidade do método da xerografia para aplicações com alta reprodutibilidade, ampliando seu potencial para uso tecnológico.

ENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA EM LIPOSSOMAS:

Nesse estudo, foi avaliada a encapsulação da curcumina em lipossomas EPC/Col produzidos por

microfluídica, utilizando-se uma FRR fixa de 5 e v_m de $0,6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ — parâmetros previamente analisados, visando maior produtividade e características físicas consistentes entre os métodos de litografia macia e xerografia. Os lipossomas foram produzidos com concentrações diferentes de curcumina — 1, 2,5, 5 e 10% m/m — para avaliar o impacto da carga lipídica sobre a encapsulação do bioativo através de valores de EE e CC (Tab. 1).

Tab. 1 - Valores de EE (%) e respectivos CC (%) para lipossomas (EPC/Col) carregados de curcumina em função da proporção mássica (curcumina/lipídio) a uma v_m de $0,6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e FRR igual a 5.

Curcumina (% m/m)	Xerografia		Litografia	
	EE (%)	CC (%)	EE (%)	CC (%)
1	$41,4 \pm 2,3$	$0,36 \pm 0,02$	$50,5 \pm 4,1$	$0,44 \pm 0,04$
2,5	$44,4 \pm 3,6$	$1,14 \pm 0,09$	$40,2 \pm 4,1$	$1,03 \pm 0,07$
5	$49,9 \pm 0,8$	$2,50 \pm 0,04$	$53,4 \pm 4,7$	$2,67 \pm 0,23$
10	$39,9 \pm 1,2$	$3,52 \pm 0,11$	$32,5 \pm 3,1$	$2,86 \pm 0,27$

A análise estatística realizada por meio de ANOVA bifatorial, com nível de significância de 0,05, revelou efeitos distintos da diferença de metodologias de fabricação dos microchips em relação a EE e a CC. Quanto à CC se mostrou estatisticamente significativo ($p \approx 0,0395$), sugerindo que o microchip e a dinâmica de fluxo influenciam na quantidade de curcumina incorporada. Por outro lado, na EE, esse mesmo fator não apresentou significância estatística isolada ($p \approx 0,60$), indicando que o tipo de microdispositivo, por si só, não impacta de forma consistente esse parâmetro.

No caso da concentração da curcumina adicionada, esta apresentou efeito altamente significativo ($p < 0,0001$), demonstrando que variações na quantidade do bioativo influenciam diretamente a encapsulação. Os resultados experimentais mostraram uma tendência crescente da EE até 5%, com valores como $49,9 \pm 0,8\%$ nos microchips de xerografia, seguidos de uma queda para $39,9 \pm 1,2\%$ em 10%, sugerindo uma possível saturação da bicamada lipídica ou não total solubilização do bioativo na solução lipídica. Resultados similares foram observados nos de litografia, com EE de $50,5 \pm 4,1\%$ em 1% e de $32,5 \pm 3,1\%$ em 10%.

Em relação à CC, foi observado um aumento progressivo conforme concentração de curcumina, com valores de 0,39% em 1% adicionado até 3,19% em 10%, evidenciando menor sensibilidade à saturação da bicamada lipídica e refletindo o acúmulo total de bioativo

incorporado. A análise de comparação de médias (Tukey) confirmou que todas as concentrações diferem significativamente entre si ($p < 0,0001$), reforçando o impacto das variações na proporção de bioativo.

Além disso, a interação entre os fatores dos métodos de fabricação do microchip e da concentração de curcumina revelou-se altamente significativa ($p \approx 0,0004$ a $p \approx 0,0005$), demonstrando que o desempenho da encapsulação depende da combinação entre estes.

Ao comparar os dados deste estudo com os de Gómez-Mascaraque *et al.*², foi verificado que os microchips de xerografia apresentaram EE semelhante aos da literatura, que registraram uma média de 50% em concentrações intermediárias. No entanto, na concentração de 1%, o estudo reportado na literatura apresentou EE maior (~74%) em relação ao obtido (~40%), podendo ser atribuído à composição lipídica e geometria do canal. Por outro lado, a capacidade de carga nos microchips de xerografia atingiu $3,52 \pm 0,11\%$, mais que o dobro do valor anterior (~1,5%).

Diante dos resultados obtidos, o microdispositivo de xerografia demonstrou desempenho consistente, com EE e CC crescentes até 5%, favorecido por sua geometria ampla e baixa resistência hidráulica, tornando-o uma alternativa promissora para formulações lipossomais com alta reprodutibilidade e potencial de aplicação.

CONCLUSÕES:

A aplicação da xerografia na fabricação de dispositivos microfluídicos mostrou-se uma alternativa viável e reprodutível para a produção de lipossomas contendo curcumina, destacando-se pela simplicidade e rapidez do processo em relação à litografia macia. Os dispositivos apresentaram boa precisão dimensional e desempenho hidrodinâmico comparável ao convencional, com destaque para a influência da geometria dos canais na estabilidade das vesículas. Nos ensaios de encapsulação, o microchip de xerografia demonstrou boa eficiência e capacidade de carga até 5% de curcumina. Com isso, a técnica de xerografia se consolida como promissora para aplicação em formulações terapêuticas e sistemas de liberação controlada de baixo custo.

BIBLIOGRAFIA

1. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* **8**, 102 (2013).
2. Gómez-Mascaraque, L. G., Casagrande Sipoli, C., de La Torre, L. G. & López-Rubio, A. Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. *Food Chem* **233**, 343–350 (2017).
3. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442**, 7101 **442**, 368–373 (2006).
4. Speller, N. C. *et al.* Cutting edge microfluidics: Xurography and a microwave. *Sens Actuators B Chem* **291**, 250–256 (2019).
5. Jahn, A. *et al.* Preparation of nanoparticles by continuous-flow microfluidics. *Journal of Nanoparticle Research* **10**, 925–934 (2008).
6. Hood, R. R. & DeVoe, D. L. High-Throughput Continuous Flow Production of Nanoscale Liposomes by Microfluidic Vertical Flow Focusing. *Small* **11**, 5790–5799 (2015).
7. Beebe, D. J., Mensing, G. A. & Walker, G. M. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annu Rev Biomed Eng* **4**, 261–286 (2002).