

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

GUILHERME BOENNY STRAPASSON

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS TERMOSENSÍVEIS COM
POTENCIAL PARA ATUAR COMO *DRUG DELIVERY SYSTEMS***

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

GUILHERME BOENNY STRAPASSON

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS TERMOSENSÍVEIS COM
POTENCIAL PARA ATUAR COMO *DRUG DELIVERY SYSTEMS***

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Químico Industrial pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadores:

Antonio Augusto Malfatti Gasperini

Ohanna Maria Menezes Madeiro da Costa

Daniel Eduardo Weibel

PORTO ALEGRE

2019

Agradecimentos

Aos meus orientadores no CNPEM, Antonio e Ohanna, por todos ensinamentos, pela paciência, companheirismo, apoio e disponibilidade, e pela incrível oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao meu orientador na UFRGS, Prof. Daniel, por todos ensinamentos, pela disponibilidade e confiança durante meus anos de graduação.

Aos meus pais pelo suporte, paciência, incentivo e amor durante toda essa jornada.

Às minhas amigas, Nicole e Brenda, por sempre estarem ao meu lado, pelo carinho e companheirismo em todos os momentos e pelo constante incentivo e confiança.

A todos os colegas do Laboratório de Fotoquímica e Superfícies (LAFOS) e do Polibio, pela amizade, companheirismo e disponibilidade, além de toda ajuda e ensinamentos durante esses anos.

Aos meus amigos, por sempre torcerem por mim, e serem sempre uma fonte de carinho, incentivo e forças.

Resumo

Fosfolídeos são moléculas anfífilas que se auto-organizam em meio aquoso formando estruturas variadas. Estas moléculas têm atraído muita atenção não apenas pelas questões fundamentais que levantam, mas também pelo grande potencial de aplicação que possuem. Por serem um importante componente de membranas celulares, elas possuem alta biocompatibilidade, sendo amplamente estudadas para aplicação como carreadores de fármacos e nutracêuticos em áreas como a cosmética, farmacêutica e alimentícia. Lipossomas – ou vesículas de lípidos – por exemplo, são usados como um sofisticado veículo de entrega, com seleção de alvo e liberação controlada. Apesar de serem auto-organizáveis quando expostos a diferentes solventes, as estruturas formadas podem ser controladas e fabricadas de acordo com o propósito de aplicação. Neste projeto realizamos um estudo estrutural e das propriedades físico-químicas de sistemas lipídicos coloidais termossensíveis com potencial aplicação na indústria farmacêutica. Dispositivos microfluídicos foram utilizados para a preparação das amostras lipossomais, que foram caracterizadas através das técnicas de DLS (Espalhamento dinâmico de luz), Potencial Zeta, DSC (Calorimetria exploratória diferencial) e SAXS (Espalhamento de raios-X a baixo ângulo).

Palavras-chave: nanotecnologia; lipossomas termossensíveis; microfluídica; *Drug Delivery*.

Abreviaturas

DDS – *Drug Delivery Systems*

DLS – *Dynamic Light Scattering* - Espalhamento dinâmico de luz

DMPC – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina

DMPG – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol

DSC – *Differential Scanning Calorimetry* - Calorimetria exploratória diferencial

DSPE-PEG₂₀₀₀ – 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-[metoxi(polietilenoglicol)-2000]

FRR – *Flow Rate Ratio* – razão de vazão de fluxo

NPs – nanopartículas

PBS – Tampão fosfato-salino

PDE – Perfil de densidade eletrônica

PdI – Índice de polidispersão

PDMS – Polidimetilsiloxano

PEG – Polietilenoglicol

SAXS – *Small-Angle X-ray Scattering* - Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

Índice

1. Introdução.....	6
2. Estado da Arte	8
2.1. Lipídeos	8
2.2. Empacotamento lipídico	8
2.3. Lipossomas	9
2.4. Temperatura de transição lipídica.....	10
2.5. Métodos de produção de lipossoma.....	11
2.6. Microfluídica	12
3. Objetivos	Erro! Indicador não definido.
4. Proposta Tecnológica	16
5. Materiais e Métodos	17
5.1. Fabricação dos dispositivos de microfluídica.....	17
5.2. Preparação das soluções lipídicas	18
5.3. Síntese dos lipossomas.....	20
5.4. Técnicas de caracterização.....	22
5.4.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	22
5.4.2. Potencial Zeta	22
5.4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	23
5.4.4. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	23
6. Resultados e Discussões.....	26
6.1. DLS e Potencial Zeta	26
6.2. DSC.....	33
6.3. SAXS	34
7. Análise de Custos	42
8. Conclusões	44
9. Perspectivas.....	45
Referências	46
Apêndice A: Lipossomas de DPPC em água/etanol.....	50
Apêndice B: Lipossomas de DMPC/DMPG 95:05 em PBS 1x/etanol	52
Apêndice C: Lipossomas DMPC em PBS 1x/etanol com FRRs 5, 20 e 40	53

1. Introdução

A nanotecnologia e a sua aplicação na área da nanomedicina, em particular em *Drug Delivery Systems* (DDS), tem sido alvo de um desenvolvimento bastante acentuado na pesquisa científica recentemente. Isso se deve à constante busca de alternativas para contornar problemas relacionados ao uso de fármacos administrados de maneira convencional, tais como seu espalhamento por todo o organismo, rápida liberação do agente ativo/terapêutico e necessidade de alta dosagem. Devido a isso, seu uso pode causar efeitos colaterais, além de sofrer uma redução em sua eficácia terapêutica.

As principais características que se buscam em DDS são controlar a liberação de fármacos por um dado período de tempo, diminuir a dose necessária e aumentar a permanência em circulação. Com isso, pretende-se aumentar a eficácia terapêutica através da liberação progressiva e controlada do fármaco por administrações menos frequentes. Além de todas essas vantagens, quando o DDS possui um agente direcionador sua administração possibilita a liberação dos fármacos em locais específicos, tais como em células tumorais, minimizando os efeitos colaterais indesejados dos fármacos em outros locais.

O crescente avanço da nanomedicina levou ao desenvolvimento de diferentes tipos de DDS. Dentre eles, podemos citar os dendrímeros, sistemas lipídicos (nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, micelas), nanopartículas (poliméricas, de sílica ou óxidos metálicos) e nanotubos de carbono (CABRAL, 2015). Dentre os diferentes tipos de estruturas lipídicas existentes, os lipossomas são os mais comuns e estudados para administração direcionada de fármacos, se apresentando como uma ótima opção para diversas aplicações biomédicas devido à estabilização dos compostos terapêuticos, à superação de obstáculos à absorção celular e de tecidos e melhorando a distribuição de compostos em aplicações sítio-específicas *in vivo* (L.M. et al., 2017). Ademais, essas estruturas permitem encapsular e entregar com eficiência tanto substâncias hidrofóbicas quanto hidrofílicas.

Lipossomas são estruturas que apresentam grandes similaridades às membranas celulares, tanto do ponto de vista estrutural como de composição. De maneira geral são produzidos com fosfolípídeos encontrados na natureza, biodegradáveis, não tóxicos e não imunogênicos. Assim, os lipossomas adquiriram uma ampla aceitação tanto na ciência fundamental como em áreas mais aplicadas (MERTINS, 2008). Isso também se deve ao fato de

grande parte dos fosfolipídeos serem aprovados pelo FDA¹ (*Food and Drug Administration*), o que facilitaria futuras aplicações *in-vivo* e a inserção do produto final no mercado.

O principal problema da administração sistêmica de lipossomas é o fato de que quando entram na corrente sanguínea são rapidamente capturados por macrófagos ou outros órgãos que fazem parte do Sistema Retículo-Endotelial (SRE), isto faz com que seu tempo de meia-vida plasmática se reduza a alguns minutos (FAHNING; LOBÃO, 2011). Como uma maneira de aumentar seu tempo de vida, lipossomas furtivos têm sido desenvolvidos, os quais apresentam a superfície modificada com um agente estérico (comumente é utilizado o polietilenoglicol - PEG), assim criando uma barreira física que retarda sua absorção.

Geralmente, processos convencionais para a produção de lipossomas formam vesículas de grandes diâmetros, multilamelares e com alta dispersão de tamanhos, que requerem etapas posteriores para sua redução e homogeneização (BALBINO, 2016). Uma alternativa muito conveniente para o seu preparo se dá através da microfluídica. Microfluídica é uma poderosa tecnologia que manipula quantidades muito pequenas de volume de fluidos dentro de canais de dimensões micrométricas. A vantagem da produção de lipossomas por este método é que dentro de sistemas microfluídicos, é possível controlar a concentração de moléculas tanto no espaço quanto no tempo (WHITESIDES, 2006). Com isto, é possível obter vesículas de pequenos diâmetros, unilamelares e com baixa polidispersão em uma única etapa de forma controlada e reprodutível.

O presente trabalho teve como finalidade o desenvolvimento e caracterização de lipossomas termosensíveis com pequenos diâmetros, unilamelares, com baixa polidispersão e furtivos, obtidos através da técnica de microfluídica. Ainda, a fim de aumentar sua estabilidade, introduziu-se fosfolipídeos de caráter aniônico às estruturas lipossomais.

¹ *Food and Drug Administration (FDA)*: Órgão americano que regulamenta para que a aplicação de medicamentos, alimentos e outros produtos biológicos para consumo humano seja segura e eficaz.

2. Estado da Arte

2.1. Lipídeos

Os lipídeos são biomoléculas que exibem uma grande variedade estrutural. Moléculas como as gorduras e óleos, fosfolipídeos, esteroides e carotenoides, que diferem grandemente tanto em suas estruturas como em suas funções, são considerados lipídeos. São compostos orgânicos heterogêneos pouco solúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos como álcool, clorofórmio, acetona, entre outros (MOTTA, 2009).

Neste trabalho têm-se interesse em estudar estruturas formadas por fosfolipídeos, os quais constituem grande parte das membranas celulares, e são caracterizados por possuírem uma cabeça polar e duas caudas apolares. O fato de apresentarem uma região hidrofóbica e outra hidrofílica confere a essas moléculas o caráter anfifílico. Na Figura 2.1 é apresentado um exemplo de estrutura de um fosfolipídeo.

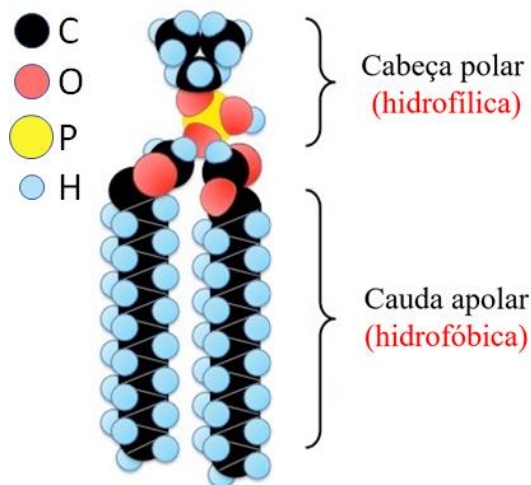


Figura 2.1: Estrutura de um fosfolipídeo saturado. Fonte: <http://ib.bioninja.com.au>.

Em geral, as cabeças polares dos lipídeos apresentam cargas elétricas, que, em pH neutro, podem classificar os lipídeos em catiônicos, quando apresentam carga positiva, aniônico, quando apresentam carga negativa ou zwitteriônicos, quando apresentam carga positiva e negativa, que os tornam neutros (NOMURA et al., 2018).

2.2. Empacotamento lipídico

Por possuírem caráter anfifílico, os lipídeos polares se auto-organizam em meio aquoso formando diferentes estruturas, as quais dependem principalmente da forma geométrica do lipídeo, isto é, da relação entre a seção transversal da cabeça polar e das caudas apolares. Como mostrado na Figura 2.2, lipídeos podem possuir diversas formas, sendo as mais comuns a

cônica, a cilíndrica e a cônica invertida. A auto-organização destes lipídeos levaria a formação de estruturas variadas que dependem do formato da molécula: **(A)** se for cônica, leva à formação de estruturas com grande curvatura, como micelas; **(B)** se for cilíndrica, leva à formação de bicamadas, que podem se fechar formando vesículas; e **(C)** se for cônica invertida, leva à formação de estruturas como micelas inversas esferoidais ou tubulares, estas últimas se organizando, geralmente, em estruturas hexagonais (WANG et al., 2014), (NOMURA et al., 2018).

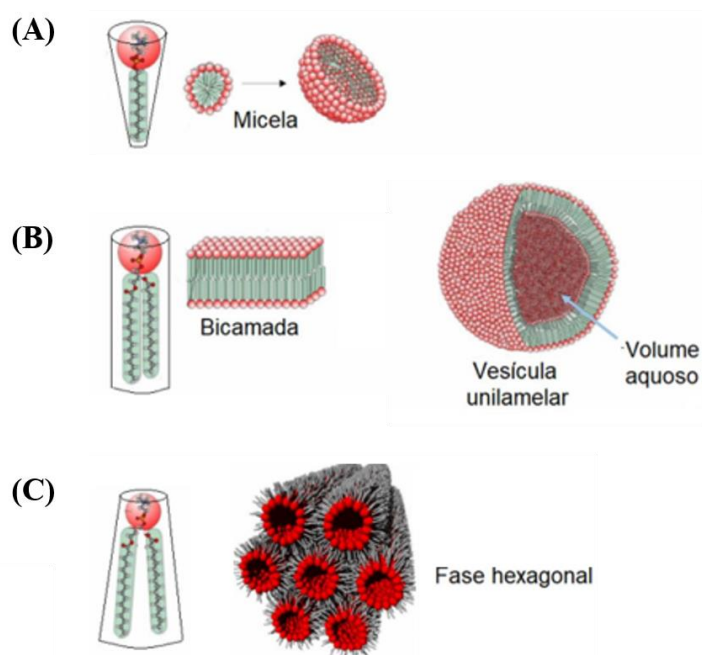


Figura 2.2: Empacotamentos de diferentes lipídeos usados para explicar a preferência das estruturas formadas. Adaptado de (NOMURA et al., 2018).

2.3. Lipossomas

Lipossomas são vesículas microscópicas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Esse tipo de estrutura é muito estudado como um *DDS* por ser constituída por fosfolipídeos que, por comporem grande parte da membrana celular, tornam a estrutura biocompatível e biodegradável. Devido ao seu caráter anfifílico, é possível encapsular substâncias hidrofílicas e/ou hidrofóbicas, sendo que as primeiras ficam no compartimento aquoso e as hidrofóbicas inseridas ou adsorvidas no interior da membrana (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). A Figura 2.3 ilustra a estrutura de um lipossoma e suas conformações uni e multilamelares.

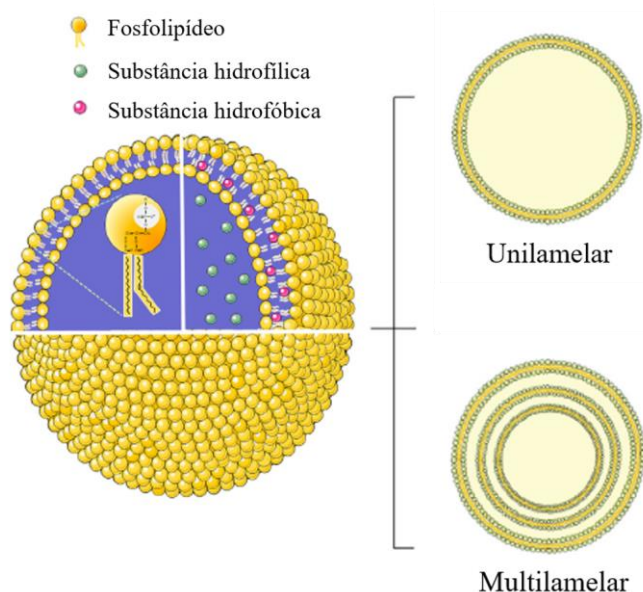


Figura 2.3: Estrutura e classificação de lipossomas. Adaptado de (LIU et al., 2019).

De acordo com a teoria de formação de lipossomas por técnicas de injeção de solventes, quando os fosfolídeos dispersos numa fase orgânica são injetados em uma solução aquosa, os mesmos têm a capacidade de auto-organização em intermediários planares denominados de fragmentos de bicamadas fosfolipídicas, expondo suas cabeças hidrofílicas e escondendo as caudas hidrofóbicas do meio aquoso. A difusão contínua do solvente orgânico na água provoca uma redução na solubilidade dos fosfolídeos e uma instabilidade termodinâmica nas bordas dos fragmentos, induzindo sua curvatura e seu fechamento em vesículas (MICHELON, 2017). Assim, as estruturas resultantes termodinamicamente mais favorecidas são os lipossomas, onde as bicamadas formam esferas nano ou micrométricas.

2.4. Temperatura de transição lipídica

A temperatura de transição de fase (TF) é uma propriedade intrínseca de cada fosfolídeo, na qual a membrana passa de uma fase gel, onde a cadeia hidrocarbônica do lípido está em estado ordenado e rígido, para uma fase fluida, onde as moléculas ficam com movimentos mais livres e desordenados (Figura 2.4) (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). A permeabilidade dos lipossomas é relativamente baixa a temperaturas abaixo da TF, sendo um problema para a liberação de fármacos. Quando a temperatura é maior que a TF, sua permeabilidade à água e aos fármacos hidrofílicos passa a ser maior pois a conformação da fase fluida facilita sua liberação para o meio externo.

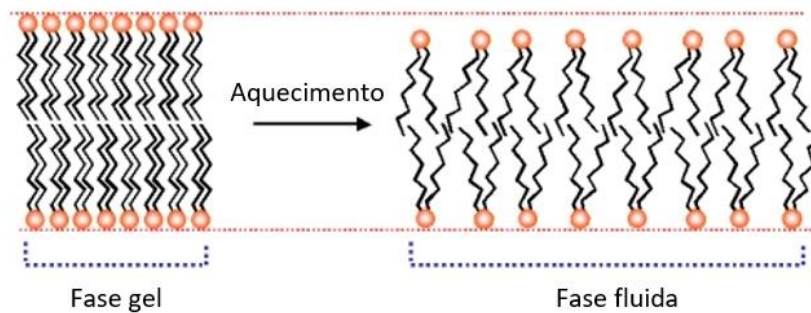


Figura 2.4: Esquema representativo da estrutura da bicamada fosfolipídica quando ocorre transição de fase.

Fonte: www.studocu.com.

Essa temperatura de transição de fase depende principalmente dos fatores associados a(o): (MERTINS, 2008)

a. Tamanho das cadeias hidrocarbônicas: quanto maior o comprimento das cadeias, mais efetivo será o empacotamento, e conseqüentemente a interação entre elas, acarretando numa maior TF.

b. Grau de saturação das cadeias hidrocarbônicas: cadeias saturadas são mais organizadas e interagem mais, enquanto que cadeias insaturadas não apresentam um ordenamento muito compacto devido às dobras nas cadeias nos pontos de insaturação. Assim, quanto maior o grau de insaturação das cadeias, menor é a TF.

c. Composição: a presença de compostos misturados aos fosfolípeos confere alterações de organização e de interações moleculares na bicamada. Determinados compostos podem fornecer uma blindagem entre os grupos polares reduzindo a TF; outros podem formar altas energias de interação com os fosfolípeos promovendo um aumento da TF.

d. Força iônica do meio: a presença de íons no meio de dispersão também pode agir sobre os grupos polares aumentando ou diminuindo as interações entre os grupos e alterando assim a TF.

Existem diversos estímulos externos capazes de auxiliar na liberação de fármacos encapsulados por estruturas lipossomais, como por exemplo, mudanças de pH, incidência de radiação (visível, raios X) e aplicação de campos magnéticos. No entanto, neste trabalho utilizaram-se sistemas lipídicos termosensíveis, a fim de liberar fármacos de forma controlada com o auxílio da temperatura.

2.5. Métodos de produção de lipossoma

A maioria dos métodos para a preparação de lipossomas inclui a hidratação de um filme lipídico. Para formar este filme, os lípeos são dissolvidos em solvente orgânico e, em seguida, faz-se a evaporação do solvente, com conseqüente formação do filme lipídico. A hidratação

deste filme é efetuada com água ou solução tampão, sob agitação magnética vigorosa, o que promove a formação da dispersão de lipossomas sem controle da lamellaridade. Outra técnica que também pode ser utilizada no preparo de lipossomas é a de injeção de etanol ou éter. Neste método, os lipídeos são dissolvidos no solvente e então injetados em solução aquosa, seguido de evaporação do solvente. Quando essas técnicas são utilizadas, ainda são necessárias etapas posteriores para a redução e homogeneização de tamanho. Para isto, pode-se empregar processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos. Os mais frequentes são os processos mecânicos, em que estão incluídos, por exemplo, a extrusão e a sonicação (COTTAGES, 1994). Além da necessidade de várias etapas, essas técnicas não permitem que a auto-organização das estruturas lipossomais ocorra de maneira controlada. Dessa forma, a microfluídica surge como uma opção bastante promissora, sendo fundamentada nos princípios da dinâmica de fluidos para produção de lipossomas em processo contínuo. Isto é compatível com as boas práticas de fabricação de produtos farmacêuticos devido a eficiência de controle na concentração local, o que torna o sistema muito mais homogêneo.

2.6. Microfluídica

A microfluídica é definida como a ciência e tecnologia de sistemas que processam e manipulam pequenas quantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} litros)(WHITESIDES, 2006), utilizando canais com dimensões de dezenas a centenas de micrômetros, com aplicações nas áreas de biologia, medicina, eletrônica e química (DORNELAS, 2013).

A maioria dos fluxos em canais macroscópicos, como em um cano de água da torneira, são turbulentos. Na medida em que o diâmetro do canal diminui, as características do fluxo mudam para um fluxo constante, homogêneo e previsível, o fluxo laminar (LARA, 2016). Nestes canais, a razão superfície/volume é muito maior que em outros sistemas, o que lhes confere propriedades únicas de transporte. Dentre as vantagens dos sistemas microfluídicos com relação a seus análogos de sistemas convencionais, se destacam: reações muito mais rápidas; tamanho mínimo de dispositivos; menor consumo de amostra e reagente; controle preciso de fenômenos de transferência térmico e mássico; controle do tipo de escoamento (laminar/caótico); baixo consumo e dissipação de energia; e baixo custo relativo de produção por dispositivo. Em aplicações na área de biotecnologia, o uso de dispositivos microfluídicos permite a manipulação de diferentes biomateriais, com investigações em diversas áreas, desde o desenvolvimento de biorreatores enzimáticos e microbianos, processos de separação, até a obtenção de nanopartículas (BALBINO, 2016). Para executar essas diferentes tarefas de forma confiável e satisfatória, é necessário desenvolver dispositivos com designs adequados de acordo

com sua aplicação. Alguns exemplos de designs de dispositivos podem ser visualizados na Figura 2.5.

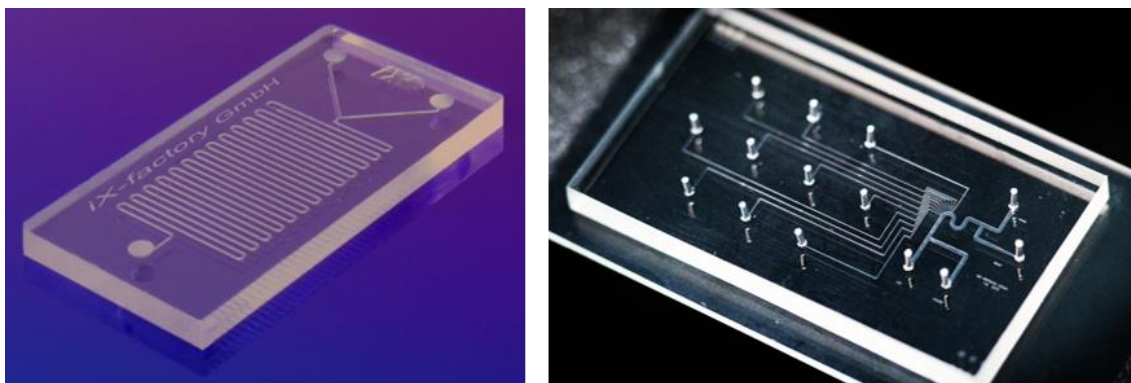


Figura 2.5: Exemplos de designs de dispositivos de microfluídica. Fonte: <https://www.findlight.net>.

A utilização de dispositivos microfluídicos para a produção de lipossomas deste trabalho foi idealizada empregando um dispositivo baseado na técnica da focalização hidrodinâmica, em conformação de T longo. Com esta técnica, a formação dos lipossomas ocorre através do contato de duas fases de fluidos solúveis entre si, uma aquosa e outra orgânica (solúvel na fase aquosa). A fase orgânica é aquela na qual os lipídeos estão dispersos em um solvente (solúvel em água), como etanol ou isopropanol. À medida que ocorre o escoamento entre as correntes (orgânica e aquosa), ocorre a difusão entre essas fases. Conforme ocorre a difusão na região de contato entre as fases, os lipídeos se tornam cada vez menos solúveis no meio aquoso, e começam a se autoagregar, formando bicamadas lipídicas planares. À medida que essas bicamadas crescem, elas começam a se ligar, a fim de diminuir a área superficial das cadeias hidrofóbicas dos lipídeos expostas ao meio aquoso. Esta é a força motriz que faz com que as bicamadas tendam a se organizar até adquirirem estrutura de vesículas esféricas, caracterizada por ser a estrutura mais estável energeticamente para esse tipo de sistema (BALBINO, 2016). Um esquema ilustrando como ocorre a formação das estruturas lipossomais pode ser visto na Figura 2.6.

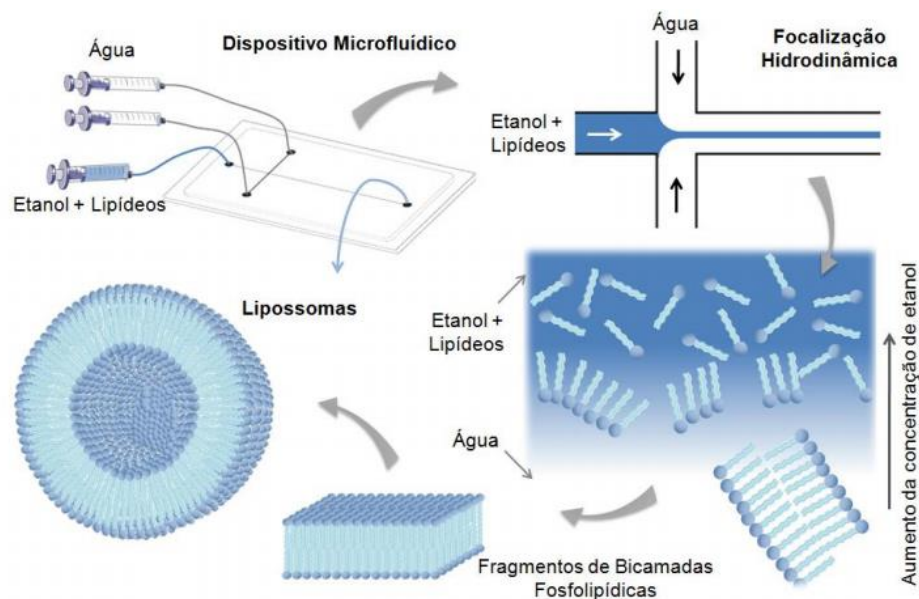


Figura 2.6: Processo de síntese dos lipossomas por focalização hidrodinâmica utilizando dispositivo de microfluídica em conformação de T longo (BALBINO, 2016).

Um parâmetro importante no preparo dos lipossomas através da técnica de focalização hidrodinâmica é o *flow rate ratio* (FRR), que é definido pela razão da vazão da solução aquosa pela vazão da solução etanólica de lipídeos. Para um dispositivo em conformação de T longo (como aquele utilizado neste trabalho), a FRR será dada de acordo com a equação 1:

$$FRR = \frac{2 * Q_1}{Q_2} \quad (1)$$

Onde Q_1 é a vazão da solução aquosa em cada uma das seringas e Q_2 a vazão da solução etanólica de lipídeos (MICHELON, 2017).

Essa técnica possibilita a obtenção de vesículas uni ou multilamelares, com controle de tamanho e dispersão de acordo com a vazão dos fluxos empregada. Além disso, o processo é realizado em uma única etapa e de maneira constante e reprodutível (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de lipossomas termossensíveis com potencial para atuarem como carreadores de fármacos. Buscou-se obter estruturas lipossomais com pequenos diâmetros, unilamelares, com baixa polidispersão e furtivos, através da técnica de microfluídica. Ainda, a fim de aumentar sua estabilidade, buscou-se aumentar a repulsão eletrostática dessas estruturas através da adição de fosfolípídeos de caráter aniônico.

4. Proposta Tecnológica

A pesquisa científica e a busca incessante pela melhora da saúde humana tendem a acelerar o surgimento de técnicas inovadoras para prevenção e tratamento de diversas patologias. Isso explica o fato de as indústrias farmacêuticas estarem em constante evolução e prontas para absorverem novas tecnologias. Um ótimo exemplo disso é a nanotecnologia, pois ela vem se revelando altamente potencial para otimizar o tratamento de algumas doenças, tendo como destaque os DDS, que possibilitam o aumento da eficiência do fármaco, diminuem os custos de produção, reduzem efeitos colaterais e possibilitam uma ação localizada do fármaco. Apesar de ainda se encontrar numa fase relativamente inicial, a incorporação desta tecnologia revela um enorme potencial, permitindo otimizar técnicas de diagnóstico e tratamento já existentes, assim como idealizar novas formas de melhorar a qualidade de vida da população. (DA SILVA, 2016) (COSTA et al., 2014).

A comercialização de produtos farmacêuticos e médicos utilizando nanotecnologia tem apresentado grandes avanços desde a primeira aprovação, em 1990, da anfotericina B lipossomal pelo FDA. Diversos desses sistemas estão atualmente disponíveis comercialmente para o tratamento de várias doenças, incluindo sistemas lipossomais para tratamento de câncer, infecções fúngicas, meningite, leucemia, etc. (BAMRUNGSAP et al., 2012) (NATARAJAN et al., 2014) (IWAMOTO, 2013).

Assim, o presente trabalho visou avaliar o desenvolvimento e caracterização de lipossomas termosensíveis obtidos através da técnica de microfluídica, possibilitando a obtenção de vesículas de pequenos diâmetros, unilamelares, com baixa polidispersão e furtivos em uma única etapa de forma controlada e reprodutível. Ainda, a fim de aumentar sua estabilidade, fosfolipídeos de caráter aniônico foram introduzidos às estruturas lipossomais.

5. Materiais e Métodos

5.1. Fabricação dos dispositivos de microfluídica

Os dispositivos de microfluídica foram fabricados na sala limpa do Laboratório de Microfabricação (LMF) no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano/CNPEM). O processo para a fabricação dos dispositivos utilizados consiste em duas etapas – a fotolitografia e a litografia macia –, mas antes disso é necessário produzir uma fotomáscara com o desenho do sistema desejado.

A fotolitografia consiste em transferir estruturas micrométricas para um substrato com o auxílio de radiação UV ou raios X. No nosso caso, utilizamos radiação UV. Para fazer a fotolitografia, deposita-se o fotorresiste negativo SU-8 sobre um *wafers* de silício por *spin-coating*. Em seguida, a superfície do fotorresiste é iluminada com radiação UV através da fotomáscara, que fica entre a fonte de radiação e o substrato. A imagem gravada no fotorresiste é revelada removendo o fotorresiste não iluminado com clorofórmio, obtendo-se, assim, o molde para ser utilizado na próxima etapa.

A litografia macia consiste na réplica do molde produzido com um polímero. Para isto, mistura-se polidimetilsiloxano (PDMS), que é um polímero linear de cadeia longa, com um agente reticulador, despejando-os sobre o molde. O polímero torna-se sólido após a reticulação e a estrutura do microdispositivo do molde fica desenhada no PDMS. Em seguida, é realizada a selagem do dispositivo, onde coloca-se o substrato de vidro e o PDMS em contato com plasma, ativando as superfícies desses materiais, resultando em uma ligação covalente entre eles. Por fim os canais de entrada e saída são perfurados e os dispositivos são guardados evitando qualquer contato com partículas externas.

Um esquema de como é feito todo o processo de fabricação dos dispositivos microfluídicos pode ser visto na Figura 5.1.

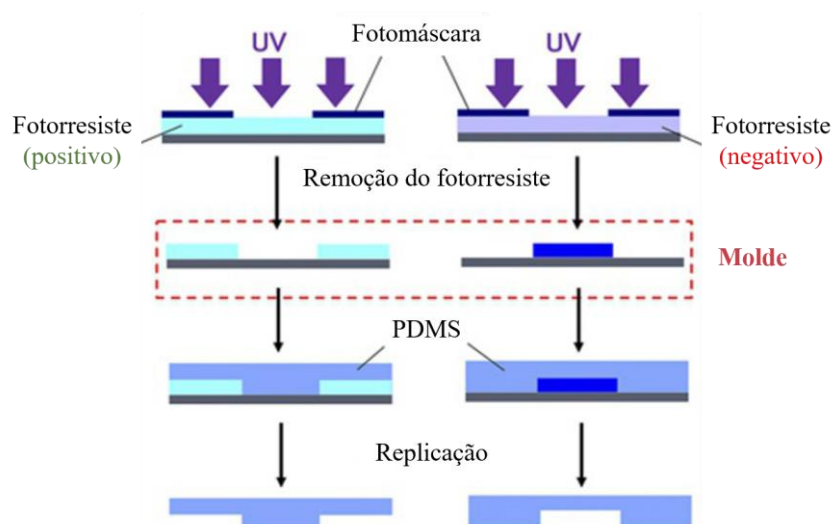


Figura 5.1: Esquema com etapas de fotolitografia e litografia macia da fabricação de dispositivos de microfluídica utilizando fotorresistes positivo e negativo. Adaptado de (MICHELON, 2017).

Para o desenvolvimento dos lipossomas deste projeto utilizou-se dispositivos de microfluídica em conformação de T longo, conforme Figura 5.2, que foram previamente fabricados por outra integrante do grupo de pesquisa.

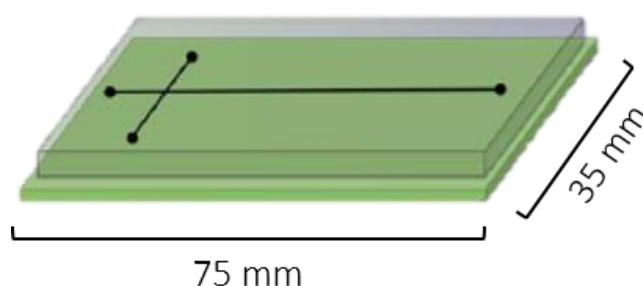


Figura 5.2: Dispositivo em conformação de T longo. Adaptado de (BALBINO, 2016).

5.2. Preparação das soluções lipídicas

Para as sínteses dos lipossomas utilizaram-se os seguintes fosfolipídeos fornecidos pela AVANTI Polar Lipids ®:

- 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC);
- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC);
- 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol (DMPG);
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina-N-[metoxi(poli(etileno)glicol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀).

Suas fórmulas estruturais são apresentadas nas Figuras 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6, respectivamente.

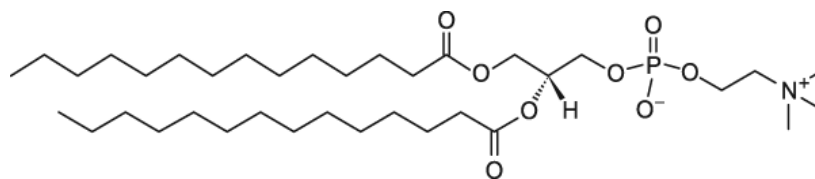


Figura 5.3: Fórmula estrutural do DMPC, composta por duas caudas apolares saturadas com 14 carbonos e cabeça polar zwitteriônica formada por um grupo fosfato (negativo) e um grupo colina (positivo).

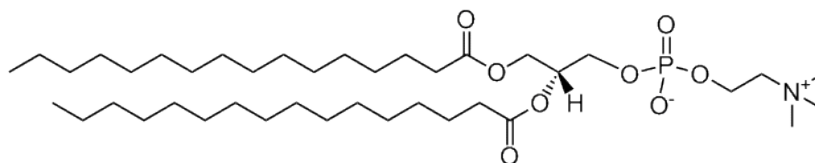


Figura 5.4: Fórmula estrutural do DPPC, composta por duas caudas apolares saturadas com 16 carbonos e cabeça polar zwitteriônica formada por um grupo fosfato (negativo) e um grupo colina (positivo).

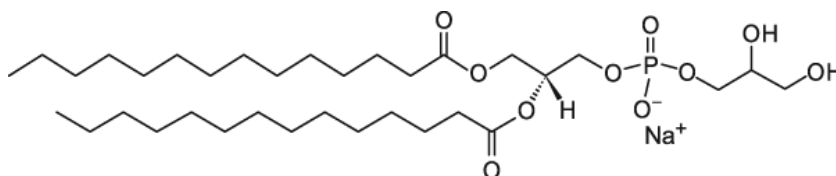


Figura 5.5: Fórmula estrutural do DMPG, composta por duas caudas apolares saturadas com 14 carbonos e cabeça polar aniônica formada por um grupo fosfato (negativo) e um grupo glicerol.

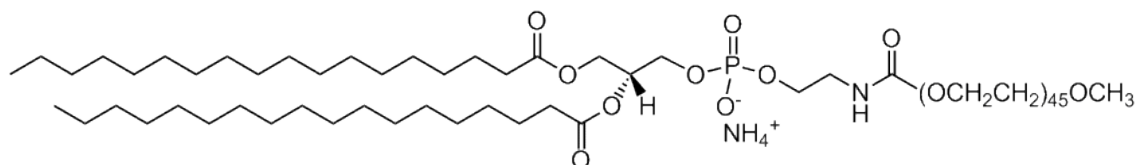


Figura 5.6: Fórmula estrutural do DSPE-PEG₂₀₀₀, composta por duas caudas apolares saturadas com 18 carbonos, cabeça polar aniônica formada por um grupo fosfato (negativo) e um grupo etanolamina onde está ligada uma cadeia de PEG com um metoxi terminal.

As soluções lipídicas foram preparadas em sistema simples apenas com DMPC ou DPPC e em sistemas mistos com DMPC/DMPG ou DMPC/DMPG/DSPE-PEG₂₀₀₀. Cada um desses fosfolipídeos possui uma temperatura de transição de fase característica, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Temperaturas de transição de fase dos fosfolipídeos utilizados. (WANG et al., 2014)

Fosfolipídeo	TF (°C)
DMPC	23
DPPC	41
DMPG	23*
DSPE-PEG ₂₀₀₀	55

* Varia de acordo com a força iônica do meio (LAMY-FREUND; RISKE, 2003)

Sistema simples com DMPC

Preparou-se solução com concentração de 25 mmol.L⁻¹ de DMPC em etanol absoluto (mantido em peneira molecular e filtrado em filtro de seringa com poro de 0,20µm) e sonicou-se a 32°C por 15 minutos.

Sistema simples com DPPC

Preparou-se solução com concentração de 25 mmol.L⁻¹ de DPPC em etanol absoluto (mantido em peneira molecular e filtrado em filtro de seringa com poro de 0,20µm) e sonicou-se a 42°C por 15 minutos.

Sistema misto com DMPC/DMPG

Foram preparadas soluções com proporções molares 95:05 e 90:10 de DMPC:DMPG, considerando uma concentração final de 25 mmol.L⁻¹. Para o preparo desse sistema pesou-se o DMPG em um frasco âmbar, seguido da adição de DMPC 25 mmol.L⁻¹ (previamente preparado e sonicado a 50°C por 30 minutos) e de etanol absoluto (mantido em peneira molecular e filtrado em filtro de seringa com poro de 0,20µm) a fim de obter a proporção final desejada. Por fim o sistema foi sonicado a 50°C por 30 minutos.

Sistema misto com DMPC/DMPG/DSPE-PEG₂₀₀₀

Preparou-se solução com proporções molares de 89:10:01, considerando uma concentração final de 25 mmol.L⁻¹. O procedimento segue os mesmos passos do sistema misto anterior, mas ao final é adicionada a respectiva massa de DSPE-PEG₂₀₀₀ seguido de sonicação a 50°C por mais 30 minutos.

Buscou-se preparar os diferentes sistemas em temperaturas acima das temperaturas de transição de fase de cada um dos fosfolipídeos empregados, de modo a obter dispersões mais homogêneas. Além disso, utilizou-se temperatura e tempo de sonicação mais altos nos sistemas mistos devido à baixa solubilidade do DMPG em etanol.

Todas as soluções foram preparadas em fluxo laminar e armazenadas em um refrigerador a -20°C para manter a integridade dos fosfolipídeos.

5.3. Síntese dos lipossomas

Para a síntese dos lipossomas, utilizou-se dispositivos microfluídicos em conformação de T longo, possuindo três canais de entrada e um de saída. Em dois dos canais de entrada determinou-se uma vazão de água ou tampão fosfato-salino (PBS) 1x, enquanto que no outro canal de entrada determinou-se uma vazão de solução etanólica contendo os lipídeos responsáveis pela formação do lipossoma (Figura 5.7). A fim de manter as vazões controladas,

utilizaram-se bombas automatizadas e as sínteses foram realizadas acima da TF dos fosfolipídeos empregados a fim de não ocorrer precipitações no interior do microcanal.

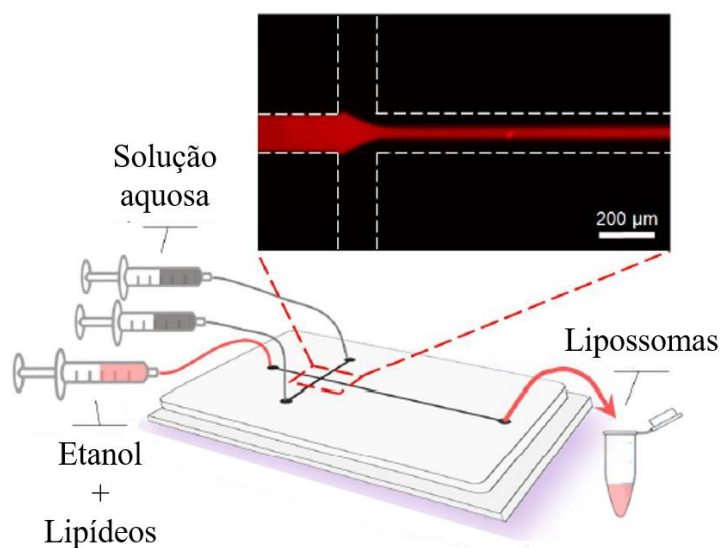


Figura 5.7: Esquema utilizado com dispositivo de microfluídica em conformação de T longo. Adaptado de (BALBINO, 2016).

A Figura 5.8 mostra o sistema experimental empregado para a síntese dos lipossomas e o trecho onde ocorre a focalização hidrodinâmica no dispositivo.

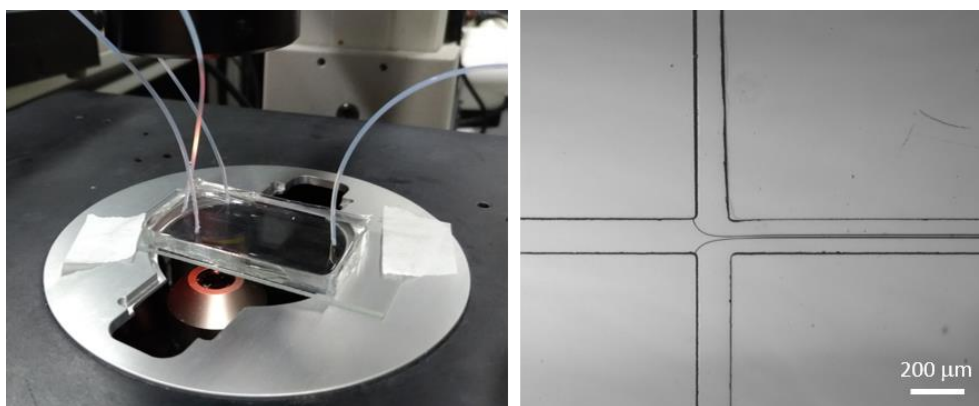


Figura 5.8: Dispositivo de microfluídica em conformação T longo utilizado para as sínteses dos lipossomas e trecho onde ocorre focalização hidrodinâmica.

Neste trabalho sintetizou-se lipossomas formados com os seguintes sistemas:

- DMPC formado em água;
- DPPC formado em água (Apêndice A);
- DMPC/DMPG com proporção molar 90:10 formado em água;
- DMPC formado em PBS 1x;
- DMPC/DMPG com proporção molar 95:05 formado em PBS 1x (Apêndice B);
- DMPC/DMPG com proporção molar 90:10 formado em PBS 1x;
- DMPC/DMPG/DSPE-PEG₂₀₀₀ com proporção molar 89:10:1 formado em PBS 1x.

Em todas as amostras obteve-se uma concentração final de lipossomas igual a 2,27mM com 9% de etanol, empregando-se FRR igual 10, onde se manteve Q_1 com vazão de 54,6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e Q_2 com vazão de 10,92 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. (BALBINO et al., 2013)

Ainda realizou-se testes variando o FRR da amostra de DMPC formado em PBS 1x, mantendo o valor de Q_1 constante com vazão de 54,6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e variando Q_2 para obter FRRs de 5, 20 e 40 com vazões iguais a 21,84 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 5,46 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e 2,73 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente. Os dados relativos a esses testes se encontram no Apêndice C.

5.4. Técnicas de caracterização

5.4.1. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de DLS consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada pela amostra em um determinado ângulo. Essa análise fornece informações sobre o movimento das partículas (objetos presentes na amostra os quais possuem índice de refração diferente do solvente) presentes na amostra, que são os responsáveis pelas flutuações da intensidade (NOMURA et al., 2013).

Para suspensões diluídas, o espalhamento múltiplo da luz em duas ou mais partículas pode ser desprezado e as flutuações na intensidade são devidas somente ao movimento browniano de cada partícula. Fazendo uma aproximação de que as partículas são pequenas esferas não permeáveis pelo solvente, pode-se relacionar as flutuações de intensidade medida com o diâmetro hidrodinâmico e da distribuição de tamanho das partículas analisadas. A distribuição de tamanhos é determinada através do índice de polidispersão (PdI); esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos heterogênea é a amostra (ALBERNAZ, 2014).

As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Malvern Zetasizer – Nano ZS90. Para isso, adicionou-se cerca de 1 mL de amostra com concentração de 0,3mM à uma cubeta de acrílico e realizou-se a medida a 25°C em triplicata.

5.4.2. Potencial Zeta

A carga superficial dos lipossomas foi determinada através de medidas de potencial Zeta. Esse valor se refere à carga elétrica que recobre a partícula sendo, então, um indicativo da estabilidade coloidal: quanto maior o valor das cargas em módulo, maior a repulsão eletrostática entre as partículas e menor será a probabilidade de agregação, floculação ou sedimentação (ALBERNAZ, 2014).

Sua magnitude é bastante sensível a variações no meio, e serve como poderosa ferramenta para definição das melhores condições de trabalho. Quando o potencial Zeta é nulo,

é denominado como ponto isoeletrico, e a região em torno desse valor corresponde à região de menor estabilidade das suspensões do ponto de vista eletrostático (SOARES, 2009).

Para a determinação do potencial Zeta das amostras deste estudo utilizou-se o equipamento Malvern Zetasizer – Nano ZS90. Adicionou-se cerca de 750µL de amostra na *dip cell* de poliestireno e as medidas foram realizadas a 25°C em triplicata.

5.4.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica termoanalítica na qual as variações de entalpia da amostra são monitoradas em relação a um material de referência termicamente inerte enquanto ambas são submetidas a uma programação controlada de temperatura.

No ensaio de DSC de aquecimento a amostra e a referência são aquecidas a uma taxa constante, e a diferença da potência fornecida necessária para aquecê-las é medida. Inicialmente a diferença entre a potência necessária para aquecê-las é constante; porém, durante transições de fase, a amostra irá requer maior ou menor potência do que a referência para que ambas permaneçam com a mesma temperatura: quando a amostra absorve energia (processo endotérmico) o equipamento estabiliza a temperatura fornecendo-lhe maior potência. Quando a amostra libera energia (processo exotérmico) o equipamento estabiliza a temperatura fornecendo-lhe menos potência (MARTINI, 2010).

A realização de medidas de DSC com estruturas lipossomais possibilita determinar a temperatura onde ocorre a transição de fase gel-fluido. Isso é possível porque quando as cadeias dos lipídeos fundem, elas liberam calor (reação exotérmica), fazendo com que um sinal intenso surja no termograma e possibilite determinar a temperatura em que ocorre a transição de fase.

As medidas deste estudo foram realizadas utilizando amostras com concentração igual a 2,27mM, no equipamento VP-DSC Microcal-Malvern, com uma taxa de aquecimento de 1°C/min na faixa de 15°C a 45°C. Após obtidos os dados, realizou-se um ajuste aos termogramas utilizando o método *non-2-state*. Todas as medidas e ajustes foram realizados no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do LNBio/CNPEM.

5.4.4. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Espalhamento de raios X a baixo ângulo (*Small Angle X-ray Scattering, SAXS*) é uma técnica de caracterização estrutural que permite obter informações acerca da forma, tamanho e organização de nanoestruturas. As áreas de aplicação são muito amplas, e incluem materiais biológicos, polímeros, coloides, nanocompósitos, metais, minerais, alimentos e produtos farmacêuticos.

Nesta técnica, o feixe de raios-X incidente (direção representada por \vec{k}_i), de comprimento de onda da ordem de $\sim 1\text{Å}$, é espalhado elasticamente, ou seja, sem perda de energia por parte dos fótons (direção representada por \vec{k}_e) pelos elétrons presentes na amostra, sendo coletado a ângulos muito baixos (2θ tipicamente entre $0,1^\circ$ e 10°), como mostrado na figura 5.9. As grandezas de interesse podem ser calculadas a partir do perfil de intensidade da onda espalhada em função do vetor de espalhamento (\vec{q}), definido pela diferença entre os vetores de onda \vec{k}_e e \vec{k}_i

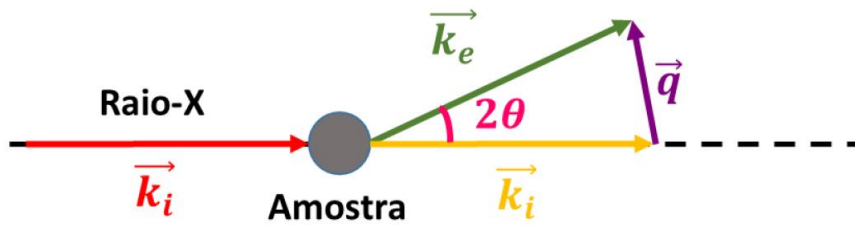


Figura 5.9: Esquema representativo do espalhamento dos raios-X pela amostra. (NOMURA et al., 2018)

Geralmente, se escreve o perfil de intensidade espalhada em função do módulo do vetor de espalhamento q , dado pela Equação 2.

$$|q| = \frac{4\pi \text{sen}\theta}{\lambda} \quad , \quad (2)$$

onde θ é o semi-ângulo de espalhamento e λ é o comprimento de onda da radiação.

Como as bicamadas lipídicas formam um sistema lamelar, devemos analisar o espalhamento para estruturas deste tipo. Neste caso, a intensidade de radiação espalhada em função do módulo do vetor de espalhamento $I(q)$ é dada pelo produto do fator de forma $F(q)$, o qual descreve como cada subunidade espalha raios X, e do fator de estrutura $S(q)$, que está relacionado com a organização das subunidades no sistema; a relação entre eles é descrita pela Equação 3.

$$I(q) = \frac{S(q) |F(q)|}{q^2} \quad . \quad (3)$$

Através dessa técnica é possível obter informações sobre o perfil de densidade eletrônica (PDE) das membranas, o qual sugere a posição média dos elementos presentes na bicamada. O PDE está relacionado com o Fator de Forma da bicamada, e está mostrado esquematicamente na figura 5.10.

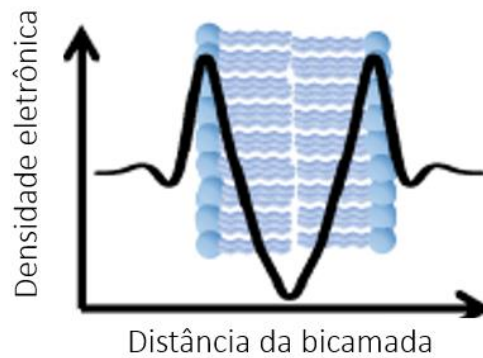


Figura 5.10: Perfil de densidade eletrônica para uma bicamada lipídica (RUBIM, 2014).

Além disso, também é possível obter informações sobre o empacotamento (lamelaridade) destas bicamadas. Esta informação está contida no Fator de Estrutura. Caso o sistema em estudo seja unilamelar, o perfil de intensidade espalhada será composto apenas pelo Fator de Forma da bicamada, e será como aquele apresentado esquematicamente na Figura 5.11 (a). Caso este sistema possua uma fração organizada de forma multilamelar, o perfil de intensidade espalhada será composto pelo produto do Fator de Forma pelo Fator de estrutura; este último pode gerar desde pequenas ondulações até picos intensos no perfil de densidade espalhada, dependendo do grau de lamelaridade e da fração multilamelar. A Figura 5.11 (b) exemplifica o efeito da lamelaridade num padrão de espalhamento.

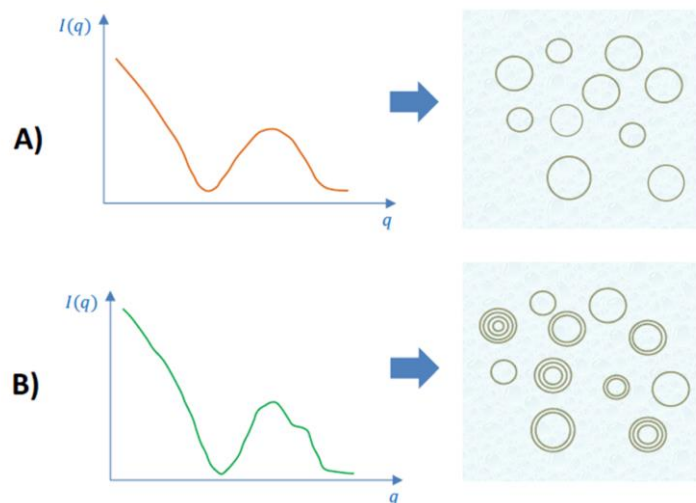


Figura 5.11: Perfis das curvas de espalhamento de SAXS para vesículas (a) unilamelares e (b) com uma fração multilamelar (FARKUH, 2016).

As medidas de SAXS foram realizadas na linha SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), com o intuito de determinar lamelaridade, espessura da bicamada e perfil de densidade eletrônica dos sistemas. As medidas foram realizadas com q na faixa de 0,05 a 4,5 nm^{-1} , a 25 °C e com rampas de temperaturas de 15 a 40 °C.

6. Resultados e Discussões

Os dados relativos às caracterizações que serão apresentadas nos próximos tópicos foram divididos em 3 etapas:

Experimentos de estabilidade (DLS e Potencial Zeta)

Com o intuito de verificar a estabilidade dos lipossomas produzidos, medidas de DLS e potencial Zeta foram realizadas logo após a síntese, 3 horas, 24 horas, 3 e 7 dias depois.

Análise térmica (DSC)

Realizaram-se medidas de DSC a fim de determinar a faixa de temperatura onde ocorre a transição de fase dos diferentes sistemas lipídicos produzidos.

Análise estrutural (SAXS)

Utilizamos a técnica de SAXS como principal ferramenta para a obtenção de informações sobre a forma e organização das membranas lipídicas. Além disso, realizamos estudos do efeito da temperatura na lamelaridade e espessura das bicamadas lipídicas para as amostras de DMPC e DMPC/DMPG 90:10 em água/etanol e PBS 1x/etanol, variando-se de 15 °C até 40 °C. Os dados da amostra PEGuilada com variação de temperatura não puderam ser utilizados devido a um problema ocorrido durante as medidas.

6.1. DLS e Potencial Zeta

Os dados relativos às distribuições de tamanho, diâmetros hidrodinâmicos e PDI durante os 7 dias para os lipossomas formados por DMPC em água/etanol podem ser vistos na Figura 6.1. O perfil de distribuições de tamanho é majoritariamente monomodal, sendo possível observar um leve deslocamento para diâmetros maiores ao longo do tempo, com um aumento de aproximadamente 13nm após 7 dias. Isto pode ser um indicativo de que está ocorrendo aglomeração e/ou coalescência entre os lipossomas a medida em que o tempo passa, que pode ser explicado devido as estruturas serem formadas por uma espécie lipídica zwitteriônica, conferindo baixa estabilidade coloidal ao sistema.

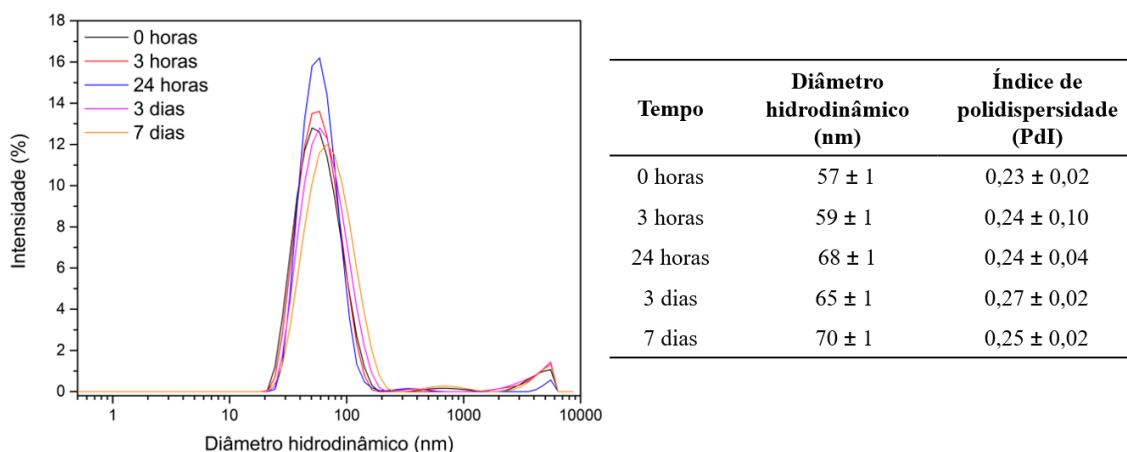


Figura 6.1: Distribuições de tamanho, diâmetros hidrodinâmicos e PDI da amostra de DMPC em água/etanol.

Apesar das estruturas serem formadas por um lipídeo zwitteriônico, é possível verificar na Figura 6.2 que o potencial Zeta é negativo para todo o período analisado.

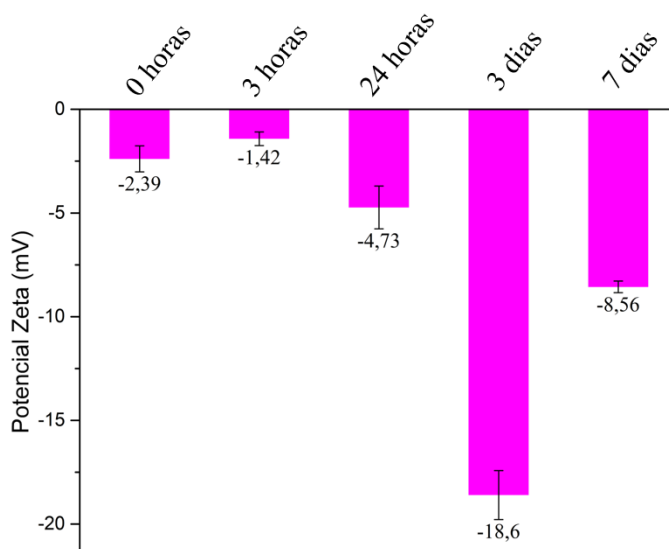


Figura 6.2: Dados de potencial Zeta da amostra de DMPC em água/etanol.

Tal fato pode ser explicado devido à cabeça da espécie zwitteriônica ser instável quanto a sua orientação, de modo que os valores de potencial Zeta mudem de acordo com sua conformação, como pode ser visualizado na Figura 6.3. A orientação preferencial da cabeça fosfolipídica está intrinsecamente relacionada com a força iônica do meio, onde através de estudos encontrados na literatura (KIMURA et al., 2002), verificou-se que quando os lipossomas estão dispersos em água (baixa força iônica) o grupo fosfato tende a ficar mais exposto à superfície da estrutura lipossomal.

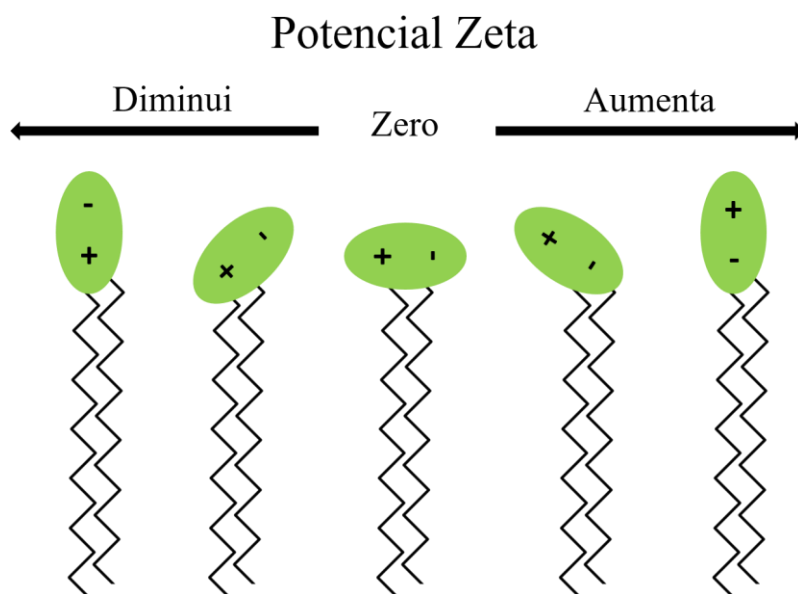


Figura 6.3: Diferentes possibilidades de orientação da cabeça de fosfolípidos zwitteriônicos, onde a carga negativa é referente ao grupo fosfato e a carga positiva ao grupo colina.

Além disso, estudos demonstraram que o potencial Zeta também está diretamente relacionado a uma razão da temperatura do meio pela TF. Para o DMPC, à medida que a razão aumenta o potencial Zeta tende a diminuir. Em temperaturas acima da TF a diminuição do potencial não é mais tão significativa, chegando a uma temperatura em que o sistema se torna estável (SIERRA et al., 2015). Esse fenômeno está associado ao fato de que abaixo da TF as cabeças dos fosfolípidos estão mais compactadas, devido a uma maior rigidez e empacotamento da estrutura, enquanto que acima da TF pode haver uma maior exposição das cabeças dos fosfolípidos, pois a estrutura está fluída, permitindo que os grupos fosfato estejam mais expostos à superfície da bicamada lipídica. Assim, tendo em vista a preferência de exposição do grupo fosfato e a instabilidade das conformações das cabeças fosfolipídicas, os valores de potencial Zeta são negativos e variam de maneira significativa ao longo do tempo.

Almejando a obtenção de estruturas carregadas, para uma maior estabilidade através de repulsão eletrostática, produziu-se sistemas mistos, com a adição de uma espécie lipídica aniônica à estrutura. Na Figura 6.4 (a), são apresentados dados de distribuição de tamanho do lipossoma formado por DMPC/DMPG 90:10 em água/etanol, na qual é possível visualizar que existe uma distribuição multimodal com alta dispersão de tamanho, sendo possível supor que, além de lipossomas podem haver outros tipos de estruturas no sistema.

Estudos demonstraram que lipossomas adquirem maior estabilidade quando dispersos em meio com maior força iônica, tendo um menor aumento de tamanho ao longo do tempo (SABÍN et al., 2006). Deste modo, aumentou-se a força iônica do meio, diluindo-se essa

amostra em PBS 1x. Na Figura 6.4 (b), é possível visualizar que sua distribuição de tamanho mudou consideravelmente, obtendo-se um perfil próximo ao monomodal. Então, sugere-se que os sistemas mistos de DMPC/DMPG necessitam de uma força externa para formarem estruturas lipossomais estáveis e monodispersas e, por esse motivo, realizou-se sínteses de lipossomas simples e mistos em PBS 1x para verificar seu efeito na formação dessas estruturas.

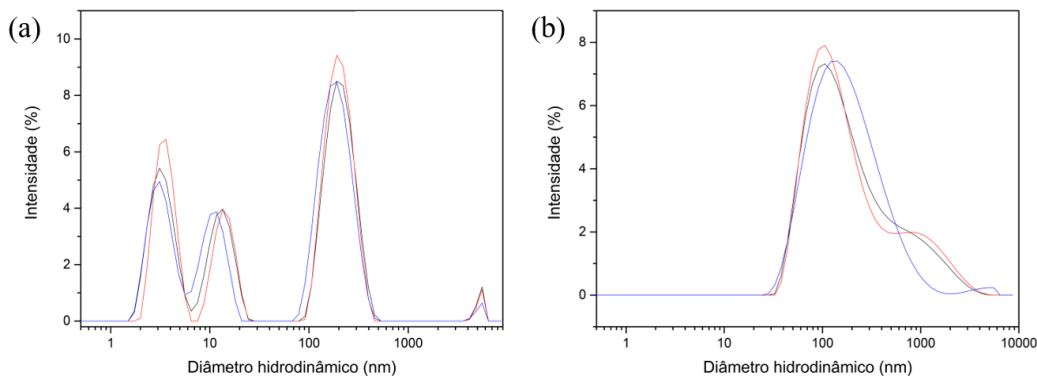


Figura 6.4: Distribuição de tamanho da amostra de DMPC/DMPG 90:10 sintetizada com água/etanol, onde: (a) diluída em água e (b) diluída em PBS 1x.

A Figura 6.5 mostra as distribuições de tamanho, diâmetros hidrodinâmicos e PDI ao longo dos 7 dias do lipossoma de DMPC formado em PBS 1X/etanol. É possível verificar que o gráfico possui um perfil monomodal e um deslocamento muito pequeno ao longo do tempo, sendo possível observar através dos dados de diâmetro hidrodinâmico que houve uma variação de apenas 2 nm após 7 dias, demonstrando que sua estrutura é bastante estável do ponto de vista coloidal.

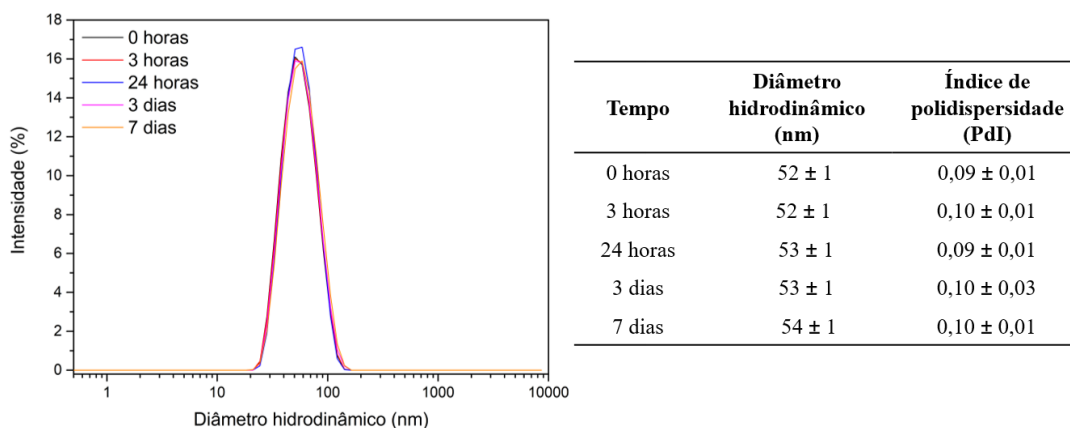


Figura 6.5: Distribuições de tamanho, diâmetros hidrodinâmicos e PDI da amostra de DMPC em PBS 1X/etanol.

Através da Figura 6.6 é possível observar que o potencial Zeta teve oscilações próximas do ponto isoelétrico, se mantendo majoritariamente com potenciais negativos. Isso se deve à força iônica do meio, que faz com que os grupos fosfato e colina se orientem de modo que ambos estejam expostos na superfície do lipossoma, mas com uma preferência um pouco maior

do grupo fosfato (KIMURA et al., 2002). Deste modo os valores de potencial Zeta da amostra tendem a ser negativos, mas bastante próximos do ponto isoelétrico.

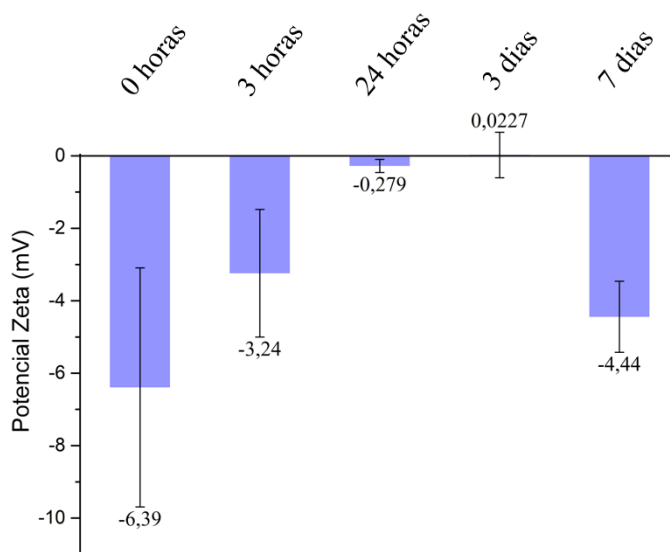


Figura 6.6: Dados de potencial Zeta da amostra de DMPC em PBS 1X/etanol.

A fim de se obter estruturas mais estáveis através de repulsão eletrostática, sintetizou-se amostras formadas por DMPC/DMPG em PBS1X/etanol. Na Figura 6.7 são apresentadas distribuições de tamanho, diâmetros hidrodinâmicos e PDI da amostra ao longo do tempo, a qual apresentou um perfil bastante similar aos lipossomas de DMPC em PBS1X/etanol, tendo uma variação de tamanho de aproximadamente 4 nm após 7 dias.

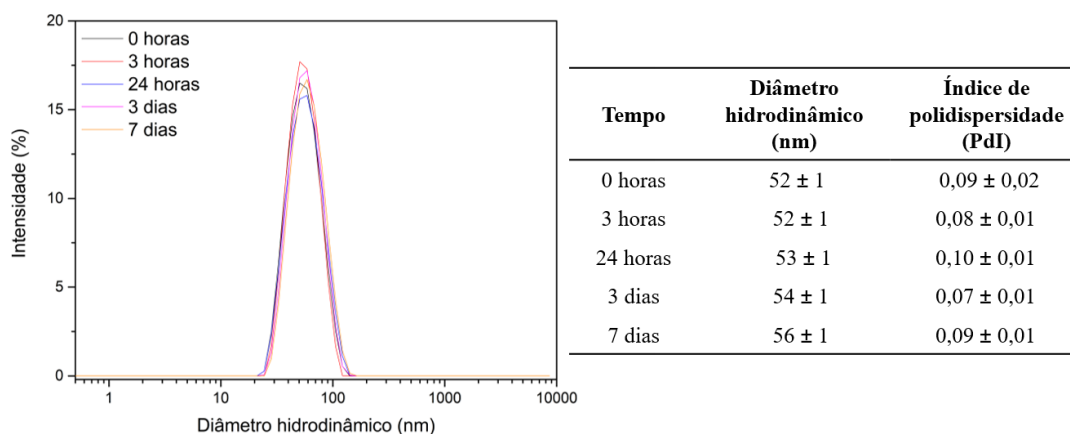


Figura 6.7: Distribuições de tamanho, diâmetros hidrodinâmicos e PDI da amostra de DMPC/DMPG 90:10 em PBS 1X/etanol.

Verificou-se que a adição da espécie lipídica aniônica conferiu um potencial Zeta menor às estruturas lipossomais, conforme apresentado na Figura 6.8. Os valores variaram pouco ao longo do período analisado, quando comparado com a amostra anterior. Por esse motivo, acreditamos que quando o lipossoma está carregado negativamente, os grupos da cabeça fosfolipídica adquirem uma orientação preferencial de modo a não rearranjarem. Deste modo,

os valores de potencial Zeta obtidos estariam mais diretamente associados à carga que a espécie aniônica conferiu à estrutura lipossomal.

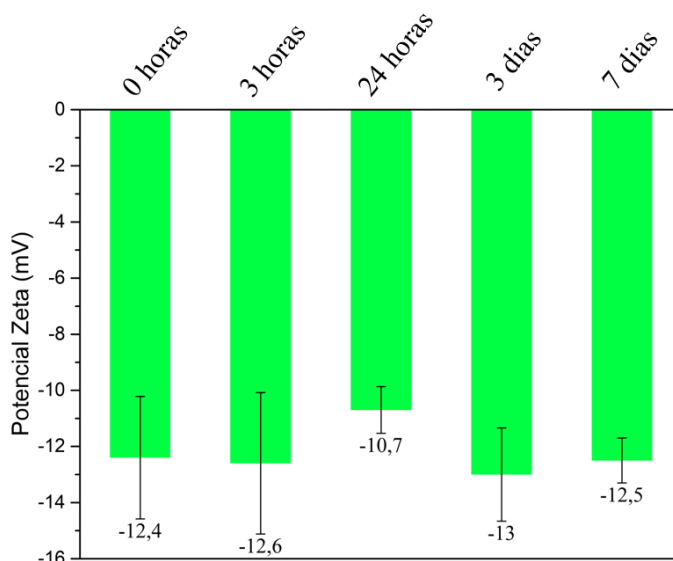


Figura 6.8: Dados de potencial Zeta da amostra de DMPC/DMPG 90:10 em PBS 1X/etanol.

Devido ao sistema misto formado em PBS 1X/etanol ter demonstrado ser o mais estável quanto a tamanho e potencial Zeta, ele foi escolhido para ser a estrutura na qual a espécie lipídica PEGuilada seria inserida, a fim de aumentar seu tempo de circulação e estabilidade.

Na Figura 6.9 estão apresentadas as distribuições de tamanho, diâmetros hidrodinâmicos e PDI dessa amostra ao longo do tempo. Foi observado um perfil de distribuição monomodal e foi verificado um grande deslocamento após 3 horas de sua síntese, diminuindo aproximadamente em 28 nm no diâmetro hidrodinâmico. Ao longo do restante do período de monitoramento, o sistema se manteve com alta estabilidade, tendo um aumento de apenas 1 nm.

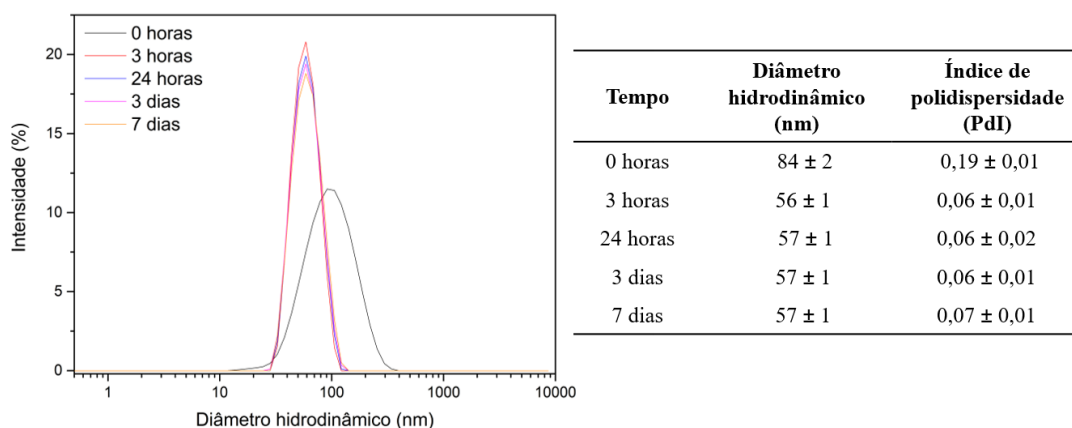


Figura 6.9: Distribuições de tamanho, diâmetros hidrodinâmicos e PDI da amostra de DMPC/DMPG/DSPE-PEG 89:10:1 em PBS 1X/etanol.

O PEG presente na superfície da bicamada pode assumir a conformação *mushroom* (em baixas concentrações de DSPE-PEG₂₀₀₀), ou configuração *brush* (quando as concentrações de DSPE-PEG₂₀₀₀ são altas) como ilustrado na Figura 6.10 (CARMO, 2007).

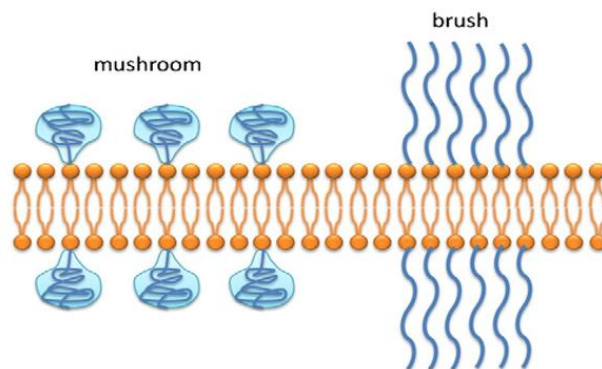


Figura 6.10: Conformações *mushroom* e *brush* do PEG em bicamadas lipídicas. (CARMO, 2007)

Sendo assim, supõe-se que a diminuição do diâmetro hidrodinâmico após 3 horas se deve ao fato de que o PEG pode estar inicialmente na conformação *brush*, e que, devido à baixa concentração de DSPE-PEG₂₀₀₀ na amostra, rapidamente mude para a conformação *mushroom*, de maneira a estabilizar a superfície do lipossoma.

O grupo amino da molécula de DSPE é derivatizado e não pode ser protonado enquanto que a ionização do grupo fosfato em pH neutro gera uma carga negativa (CARMO, 2007), justificando a diminuição do potencial Zeta ao longo dos três primeiros dias (Figura 6.11). Após o terceiro dia o sistema adquiriu estabilidade mantendo-se com um potencial Zeta na faixa de -14,4 mV.

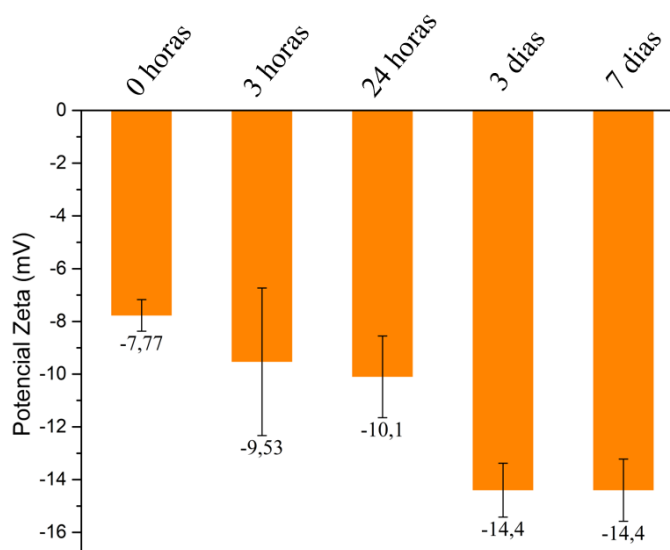


Figura 6.11: Dados de potencial Zeta da amostra de DMPC/DMPG/DSPE-PEG 89:10:1 em PBS 1X/etanol.

Os dados de dispersão de tamanho e estabilidade dos lipossomas obtidos através dessas técnicas são extremamente importantes para verificar se essas estruturas têm potencial para

serem utilizadas como DDS. Os dados obtidos mostraram que a força iônica do meio possui um papel importante na estabilidade das estruturas lipossomais. Além disso, a adição da espécie lipídica aniônica aumentou ainda mais a estabilidade dessas estruturas por meio de repulsão eletrostática.

6.2. DSC

Na Tabela 2 estão apresentadas as temperaturas de início e fim da transição de fase das amostras de sistemas simples e mistos, em água/etanol e PBS 1x/etanol. A faixa de temperatura na qual ocorre a TF foi extraída dos termogramas respectivos de cada amostra, que podem ser encontrados na Figura 6.12.

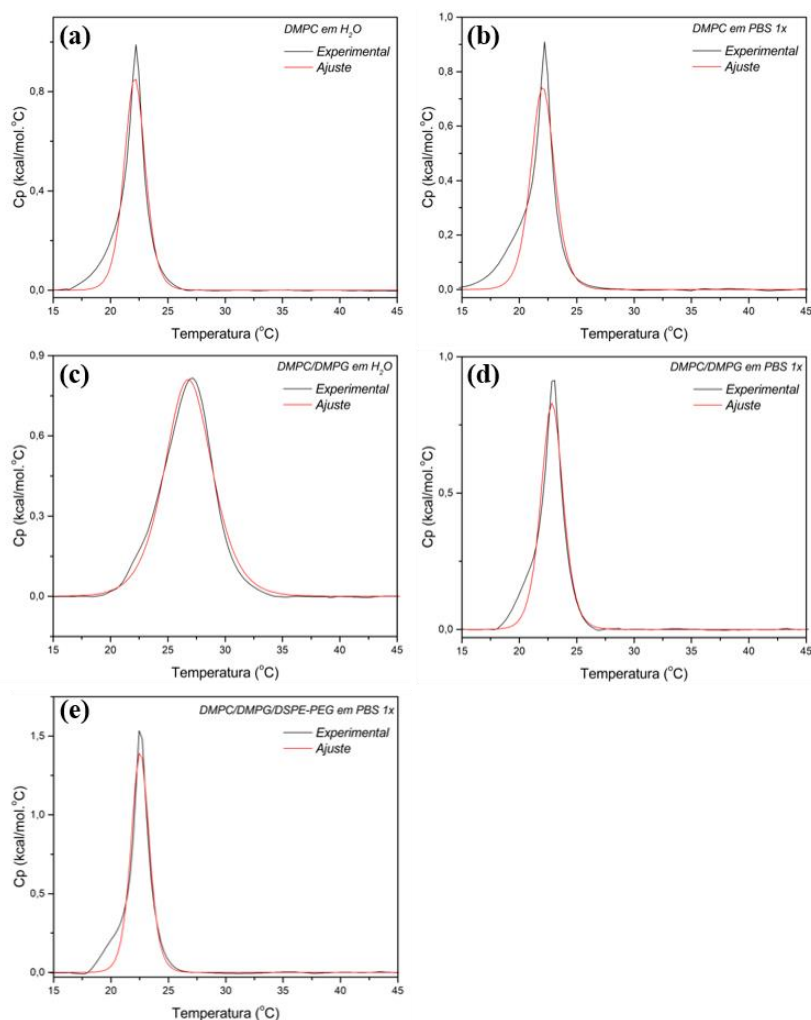


Figura 6.12: Termogramas de DSC de lipossomas formados com: DMPC (a) em água e (b) em PBS 1x; DMPC/DMPG 90:10 (c) em água e (d) em PBS 1x; e (e) DMPC/DMPG/DSPE-PEG₂₀₀₀ 89:10:1 em PBS 1x.

Tabela 2: Temperaturas de início e fim da transição de fase das amostras sintetizadas.

Amostra	TF inicial (°C)	TF final (°C)
DMPC em H ₂ O	19,0	25,4
DMPC em PBS 1x	18,7	25,7
DMPC/DMPG 90:10 em H ₂ O	20,3	33,5
DMPC/DMPG 90:10 em PBS 1x	19,6	26,1
DMPC/DMPG/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 89:10:1 em PBS 1x	20,1	25,2

Ao comparar as faixas na qual ocorre a transição de fase para as amostras de DMPC em água/etanol e PBS 1x/etanol, percebeu-se que a variação é muito pequena, demonstrando que a força iônica do meio não afeta de maneira significativa essa propriedade quando o fosfolípido empregado é a espécie zwitteriônica.

Comparando as amostras de DMPC/DMPG em água/etanol e PBS 1X/etanol, é possível visualizar que as transições de fase ocorrem em faixas de temperatura bastante distintas. Quando o lipossoma é formado em água/etanol (baixa força iônica) a faixa em que ocorre a transição é muito mais ampla do que no formado em PBS 1X/etanol (força iônica maior). Isso se deve ao fato de que o DMPG é sensível a pequenas variações da força iônica do meio em que está disperso, de modo que a baixas forças iônicas sua transição de fase se estende por uma faixa de temperatura mais ampla (LAMY-FREUND; RISKE, 2003), (RISKE; AMARAL; LAMY-FREUND, 2001).

Ainda, quando se comparam os 3 sistemas sintetizados em PBS 1X/etanol, percebe-se que as faixas de temperatura em que ocorre a transição de fase são similares. Há um pequeno aumento da temperatura de início da transição de fase nos sistemas mistos, decorrente da adição de fosfolípidos com cabeças e/ou caudas diferentes.

A faixa de temperatura na qual ocorre a transição de fase da bicamada lipídica é de extrema importância para futuras aplicações, pois acima da TF a permeabilidade do sistema aumenta, de modo que a liberação de fármacos é impulsionada de maneira significativa. Por esse motivo, é necessário adequar a TF à temperatura do local onde se deseja realizar a aplicação do DDS.

6.3. SAXS

Na Figura 6.13 são apresentados os perfis de intensidade espalhada de SAXS e de densidade eletrônica obtidos para os lipossomas formados com DMPC e DMPC/DMPG formadas em água/etanol.

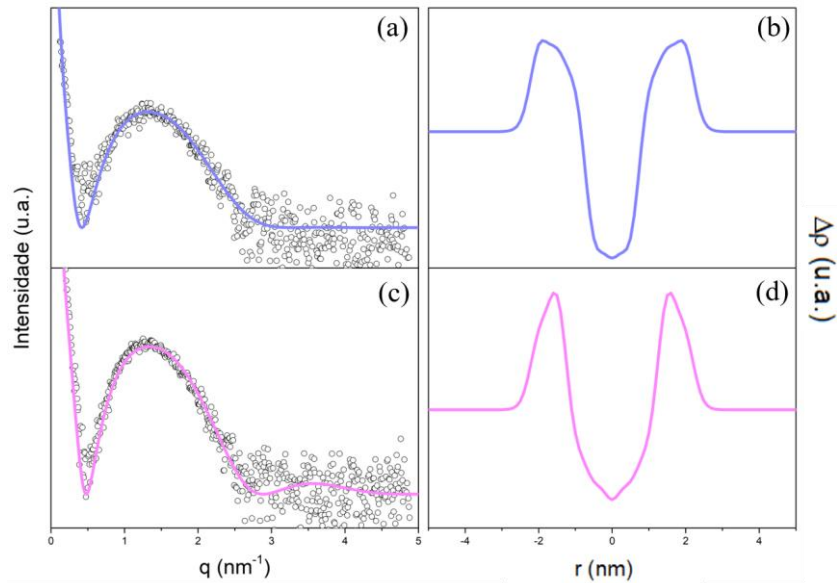


Figura 6.13: Perfis de intensidade espalhada de SAXS e de densidade eletrônica de amostras formadas em água/etanol medidas a 25 °C: (a) e (b) DMPC; (c) e (d) DMPC/DMPG 90:10.

Os dados dos perfis de intensidade demonstraram que ambas amostras são unilamelares. Além disso, através dos perfis de densidade eletrônica obteve-se espessuras iguais a $(4,53 \pm 0,05)$ nm e $(4,49 \pm 0,05)$ nm, para as amostras de DMPC e DMPC/DMPG, respectivamente. As bicamadas de ambas as amostras possuem espessura bastante similar devido aos fosfolipídeos utilizados possuírem o mesmo comprimento de cauda.

Os perfis de intensidade de SAXS e perfis de densidade eletrônica obtidos para as amostras de DMPC, DMPC/DMPG e DMPC/DMPG/DSPE-PEG₂₀₀₀ formadas em PBS 1x/etanol podem ser visualizados na Figura 6.14.

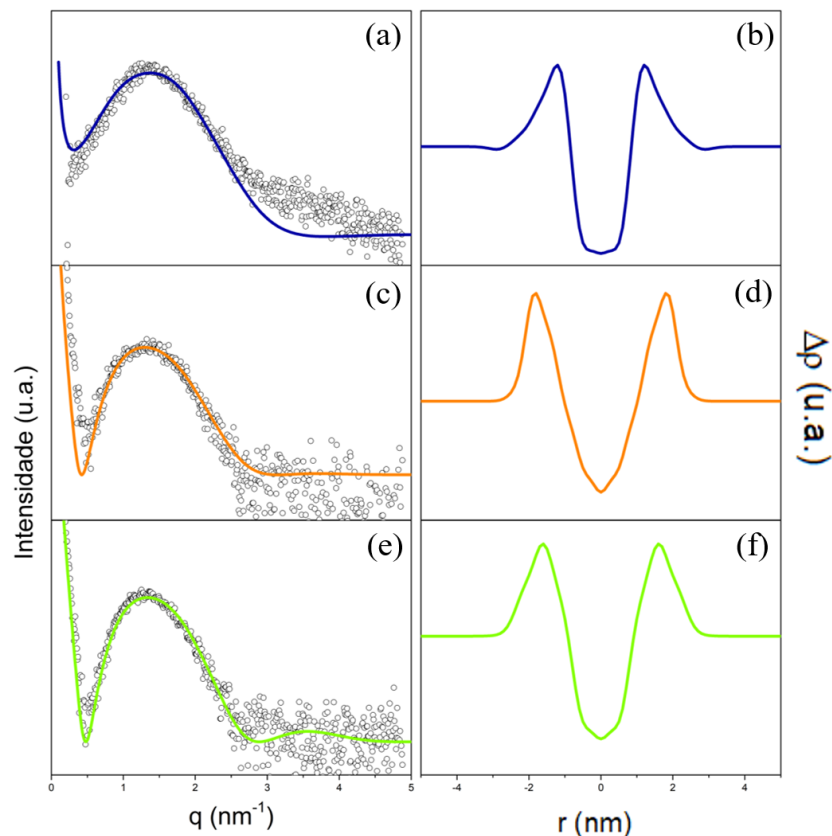


Figura 6.14: Perfis de intensidade de SAXS e de densidade eletrônica de amostras formadas em PBS 1x/etanol medidas a 25 °C: (a) e (b) DMPC; (c) e (d) DMPC/DMPG 90:10; (e) e (f) DMPC/DMPG/DSPE-PEG 89:10:1.

Os dados obtidos através dos perfis de intensidade dessas amostras são semelhantes às formadas em água/etanol, demonstrando que todas as estruturas formadas são unilamelares. As espessuras da bicamada lipídica calculadas foram de: $(4,18 \pm 0,05)$ nm, $(4,49 \pm 0,05)$ nm e $(4,69 \pm 0,05)$ nm, para as amostras de DMPC, DMPC/DMPG e DMPC/DMPG/DSPE-PEG₂₀₀₀, respectivamente. A diferença da espessura entre os lipossomas formados por DMPC e DMPC/DMPG pode ser justificada devido à presença de íons que interagem com os grupos das cabeças fosfolipídicas zwitteriônicas, assim alterando seu empacotamento (REDONDO-MORATA; ONCINS; SANZ, 2012). Já na amostra PEGuilada, supomos que o aumento pode estar associado à penetração do PEG na bicamada lipídica.

Na Figura 6.15 são apresentados os perfis de intensidade de SAXS, perfis de densidade eletrônica e espessuras de bicamada lipídica da amostra de DMPC formada em água/etanol analisada em diferentes temperaturas.

Através deles verificou-se que a estrutura lipossomal se manteve unilamelar ao longo da temperatura, porém houve alargamento dos sinais à medida que a temperatura aumentou. Conseqüentemente, os picos referentes ao PDE das cabeças polares se aproximam, indicando a

diminuição na espessura da bicamada, conforme é esperado após a transição da fase gel para a fase fluida.

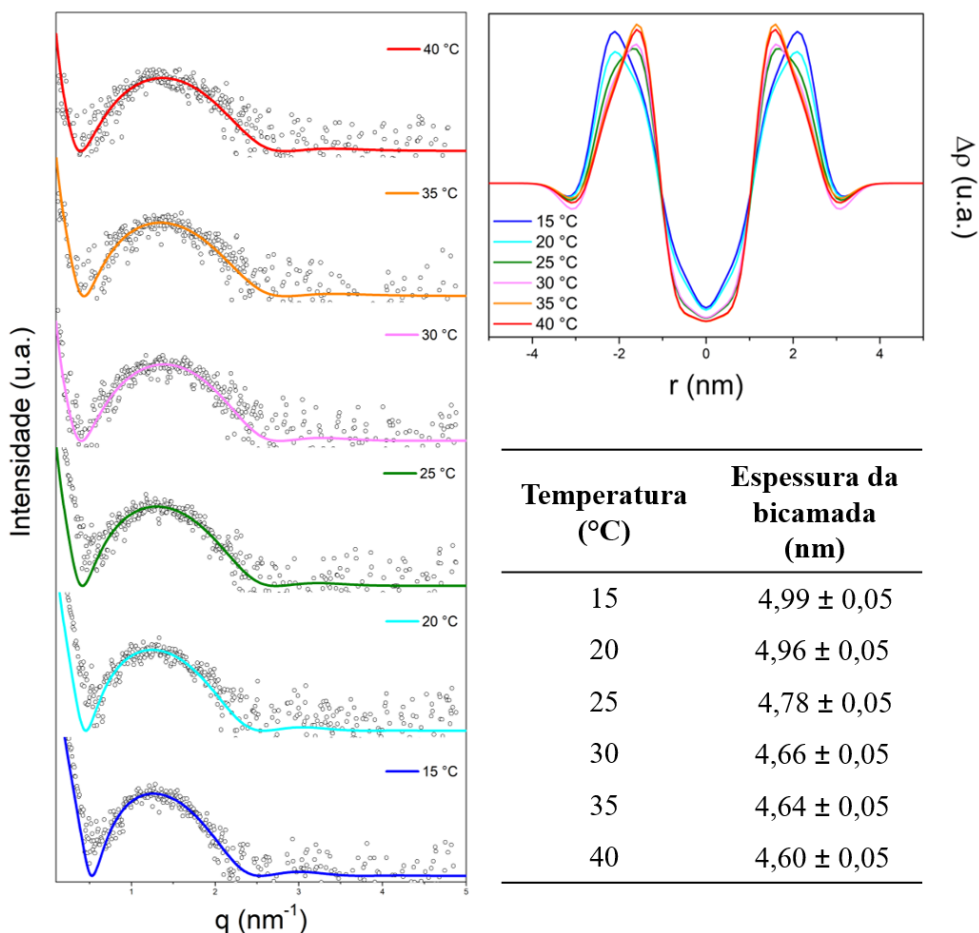


Figura 6.15: Perfis de intensidade de SAXS, perfis de densidade eletrônica e espessura de bicamada da amostra de DMPC formada em água/etanol medidos de 15 °C a 40 °C.

Na Figura 6.16 estão apresentados os dados dos perfis de intensidade de SAXS, perfis de densidade eletrônica e espessuras de bicamada lipídica da amostra de DMPC/DMPG formada em água/etanol ao longo da temperatura.

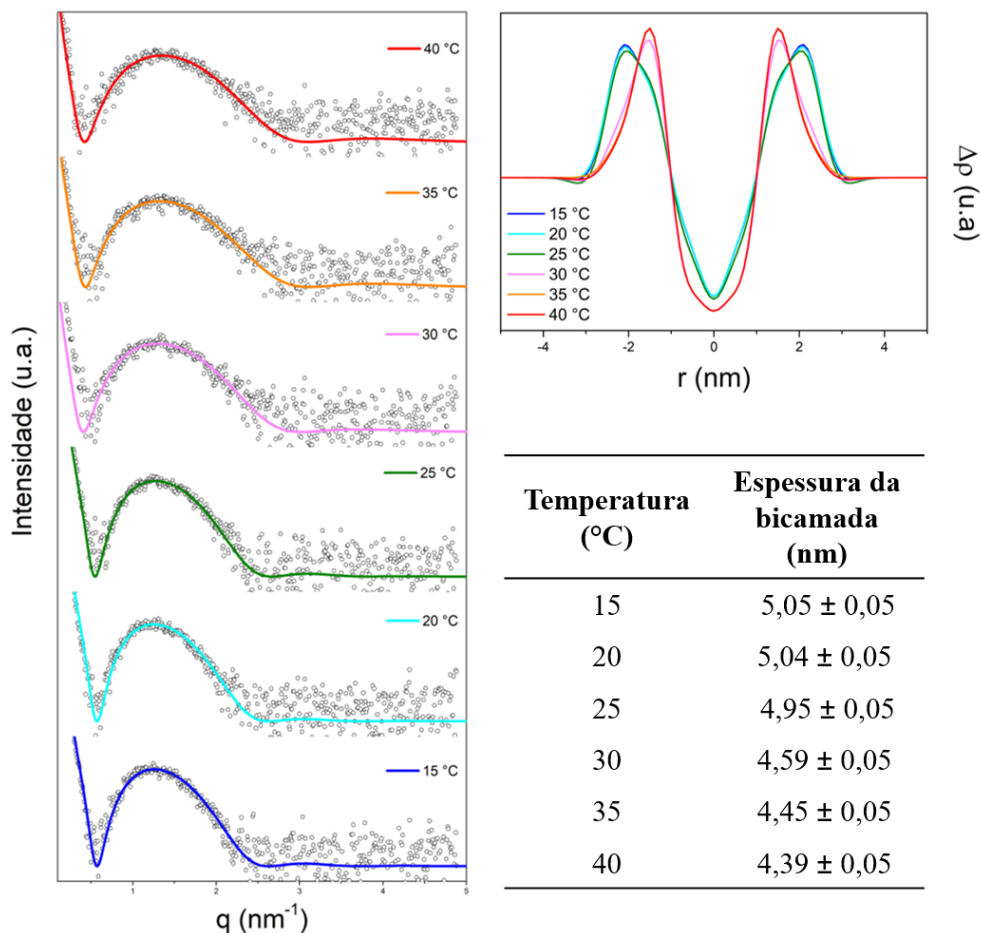


Figura 6.16: Perfis de intensidade de SAXS, perfis de densidade eletrônica e espessura de bicamada da amostra de DMPC/DMPG 90:10 formada em água/etanol medidos de 15 °C a 40 °C.

O comportamento das curvas de espalhamento foi semelhante a amostra anterior, nas quais manteve-se um Fator de Estrutura característico de estruturas unilamelares ao longo da temperatura e também foi possível visualizar que os máximos nas curvas do PDE, referentes às cabeças polares, se aproximam, confirmando a diminuição da espessura da bicamada, conforme os valores apresentados.

De forma análoga, as amostras de DMPC e DMPC/DMPG em PBS 1x/etanol tiveram diminuição da espessura da bicamada com o aumento da temperatura, conforme apresentado nas Figuras 6.17 e 6.18.

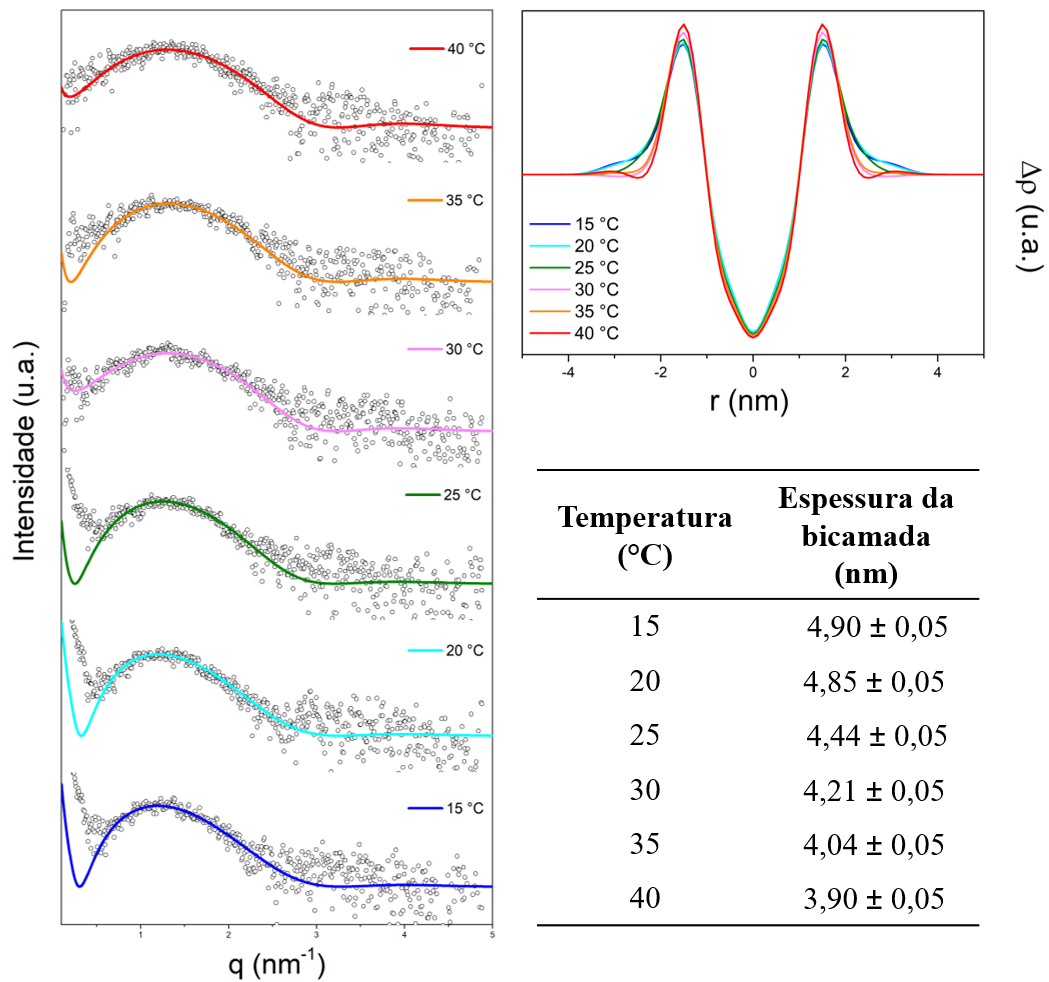


Figura 6.17: Perfis de intensidade de SAXS, perfis de densidade eletrônica e espessura de bicamada da amostra de DMPC formada em PBS 1x/etanol medidos de 15 °C a 40 °C.

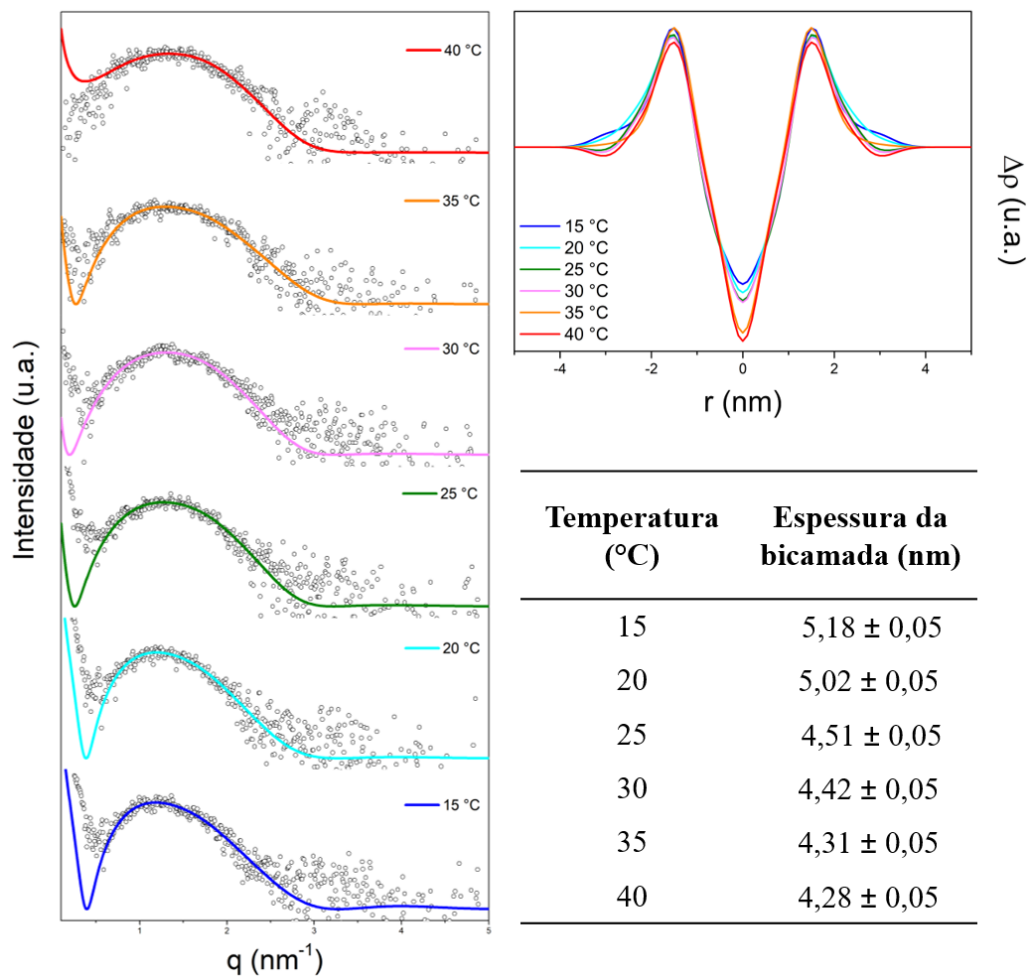


Figura 6.18: Perfis de intensidade de SAXS, perfis de densidade eletrônica e espessura de bicamada da amostra DMPC/DMPG 90:10 formada em PBS 1x/etanol medidos de 15 °C a 40 °C.

Os dados obtidos por SAXS permitiram determinar a forma e organização das membranas lipídicas e, juntamente com os dados obtidos por DLS, se houve ou não a formação de lipossomas. O comportamento desses sistemas no organismo depende de suas características estruturais, e por esse motivo buscamos obter estruturas unilamelares, pois são capazes de encapsular uma maior quantidade de fármacos e liberá-los de maneira mais controlada do que sistemas multilamelares. Dessa maneira, quanto mais homogêneos forem os sistemas, melhor será sua capacidade como DDS.

Além disso, estudamos o comportamento da bicamada lipídica em diferentes temperaturas, de maneira a verificar mudanças estruturais em função da TF. Observou-se que ocorreu uma diminuição da espessura da bicamada lipídica com o aumento da temperatura (Figura 6.19), mas os lipossomas se mantiveram intactos e unilamelares.

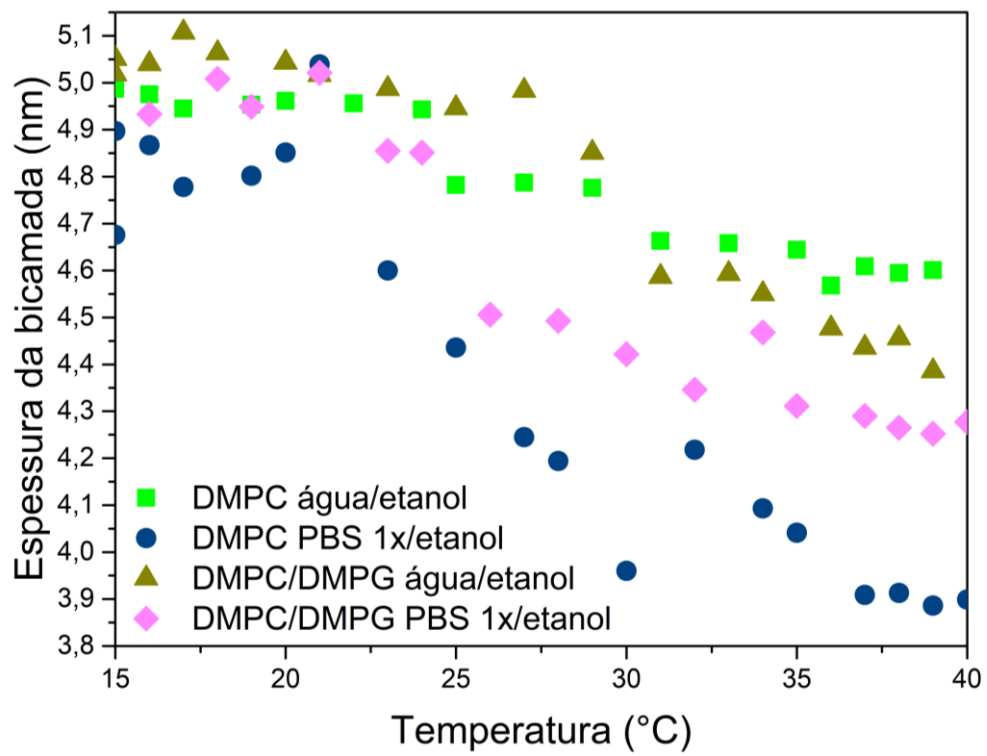


Figura 6.19: Espessura da bicamada lipídica das amostras de DMPC e DMPC/DMPG 10:90 em água/etanol e PBS 1x/etanol de 15 °C a 40 °C.

7. Análise de Custos

Foram realizadas estimativas do custo necessário: para a fabricação de um dispositivo de microfluídica (somente para a etapa de litografia macia); e para a síntese de 1mL da amostra de lipossomas (concentração de lipídeos igual a 2,27mM) compostos por DMPC/DMPG/DSPE-PEG 89:10:1 em PBS 1X/etanol.

Os cálculos foram realizados somente cotando os preços de reagentes e solventes utilizados, sem a inclusão dos gastos relativos a equipamentos, vidrarias, energia elétrica e mão-de-obra. Na Tabela 3 encontram-se os custos para a fabricação de um dispositivo de microfluídica e na Tabela 4 para a síntese de 1mL de lipossomas compostos por DMPC/DMPG/DSPE-PEG 89:10:1 em PBS 1X/etanol.

Tabela 3: Custos empregados na fabricação de um dispositivo de microfluídica (etapa de litografia macia).

Reagente/Solvente	Quantidade Utilizada	Valor (R\$)
PDMS:reticulante (10:1)	21,00mL:5,25mL	22,93
Lâmina Vidro	1	0,10
Valor total		23,03

Tabela 4: Custos empregados na síntese de 1mL de lipossomas (concentração de lipídeos igual a 2,27mM) compostos por DMPC/DMPG/DSPE-PEG 89:10:1 em PBS 1X/etanol.

Reagente/Solvente	Quantidade Utilizada	Valor (R\$)
Etanol	91 μ L	0,01
PBS 1x	909 μ L	0,15
DMPC	1,370mg	0,75
DMPG	0,156mg	0,27
DSPE-PEG ₂₀₀₀	0,064mg	0,20
Valor total		1,38

Através de pesquisa no mercado atual, verificou-se que a empresa FormuMax Scientific possui um produto similar ao que foi sintetizado nesse trabalho. Os lipossomas comercializados por essa empresa² são vendidos como uma plataforma para o carregamento de fármacos hidrofóbicos, compostos por 95:5 mol% de fosfatidilcolina:DSPE-PEG₂₀₀₀, com uma concentração de lipídeos igual a 50mM e com custo de R\$233,01 por mL de produto. Além disso, são necessárias várias etapas até a obtenção do sistema lipossomal final, fazendo com que o produto tenha um maior valor agregado.

Em contrapartida, sabendo que os lipossomas obtidos nesse trabalho possuem 2,27mM de lipídeos (aproximadamente 22x menos do que o produto comercial encontrado), e supondo que seja possível concentrá-los até 50mM mantendo sua integridade, teríamos um valor de aproximadamente R\$30,36 a cada mL de lipossomas.

Portanto os lipossomas sintetizados no presente estudo são economicamente mais viáveis que o produto comercial encontrado. Além disso, a técnica utilizada permite a obtenção de vesículas de pequenos diâmetros, unilamelares e com baixa polidispersão em uma única etapa de forma controlada e reprodutível.

² Link de acesso para o produto: <http://www.liposomeexpert.com/liposomes-for-loading-hydrophobic-drugs/liposomes-for-loading-hydrophobic-drugs-5-0ml/>

8. Conclusões

Através dos dados de DLS e SAXS pudemos ver que para todos os sistemas estudados os lipossomas obtidos foram unilamelares, possuíam diâmetros médios muito próximos e baixa dispersão de tamanhos. Isto mostra que a microfluídica é uma técnica bastante valiosa para a produção de sistemas lipídicos, devido ao seu controle e reprodutibilidade nos parâmetros de síntese.

Os dados de dispersão de tamanho e estabilidade dos lipossomas obtidos pelas técnicas de DLS e Potencial Zeta mostraram que a força iônica do meio possui um papel importante na estabilidade das estruturas lipossomais. Além disso, através da adição da espécie lipídica aniônica obteve-se estruturas estáveis devido à repulsão eletrostática entre as partículas.

A faixa de temperatura na qual ocorre a transição de fase da bicamada lipídica, obtida por DSC, demonstrou que a adição de espécies lipídicas aniônicas e PEGuiladas não tiveram influência significativa nas temperaturas de início e fim da transição de fase. Enquanto que a força iônica do meio, para as amostras de DMPC/DMPG, demonstrou afetar a faixa de temperatura que a TF ocorre, sendo maior em baixas forças iônicas.

Os dados obtidos por SAXS permitiram determinar a forma e organização das membranas lipídicas e, juntamente com os dados obtidos por DLS, provaram a formação de lipossomas. As estruturas formadas foram unilamelares, e não sofreram variação na lamelaridade ou integridade do lipossoma na faixa de temperatura estudada. Além disso foi possível verificar a diminuição da espessura da bicamada lipídica com o aumento da temperatura, onde a maior diferença foi quando a temperatura de medida passa de abaixo da TF para acima da TF, evidenciando a mudança estrutural sofrida pela membrana próxima da TF.

Os dados encontrados no Apêndice A demonstraram que para realizar a síntese de lipossomas de maneira que não ocorra precipitação no microcanal é necessário que a temperatura das soluções injetadas no dispositivo microfluídico sejam superiores à TF do fosfolípideo utilizado.

Por meio dos dados de DLS e Potencial Zeta obtidos para diferentes FRRs (Apêndice C) verificou-se que o tamanho dos lipossomas variou de acordo com os valores de FRR empregados, não influenciando de maneira significativa os valores de Potencial Zeta. Deste modo foi possível perceber que quanto maior o valor de FRR menor foi tamanho dos lipossomas obtidos.

9. Perspectivas

A fim de aprimorar o trabalho desenvolvido a próxima etapa será desenvolver sistemas lipídicos mistos formados por fosfolípídeos com TFs diferentes, a fim de obter lipossomas com diferentes TF, podendo assim adequar os sistemas lipídicos de acordo com a aplicação desejada. Além disso, para complementar os dados obtidos nesse trabalho, poderiam ser obtidas imagens dos lipossomas através de Cryo-TEM.

Visando obter o sistema de *Drug Delivery* final, ainda seriam necessários alguns testes antes e depois de encapsular o fármaco à estrutura lipossomal, conforme apresentados a seguir:

- Testes de estabilidade em meio biológico;
- Testes de nanotoxicologia dos sistemas lipídicos;
- Encapsulamento de fármacos nas estruturas lipossomais;
- Testes *in vitro* para verificar a liberação do fármaco;
- Ensaios biológicos para verificar eficácia terapêutica.

Referências

- ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. Universidade de Brasília, [s. l.], 2014.
- BALBINO, Tiago A. et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 226, p. 423–433, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.053>>
- BALBINO, Tiago A. **Sistemas Microfluídicos para a Formação de Nanoestruturas Lipossomais para o Carreamento de Genes**. 2016. Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2016.
- BAMRUNGSAP, Suwussa et al. Nanotechnology in therapeutics : a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 7, p. 1253–1271, 2012.
- BATISTA, Cinthia Meireles; CARVALHO, Cícero Moraes Barros De; MAGALHÃES, Nereide Stela Santos. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.
- CABRAL, C. S. M. **Nanopartículas híbridas para sistemas de drug delivery inteligentes**. 2015. Instituto Politécnico do Porto, [s. l.], 2015.
- CARMO, Vildete Aparecida Sousa. **Preparação , caracterização e marcação de lipossomas ph-sensíveis com tecnécio-99m para identificação de focos inflamatórios**. 2007. Universidade Federal de Minas Gerais, [s. l.], 2007.
- COSTA, Marcilia Pinheiro et al. **Current approach on the impact of drug delivery systems in advances on nanomedicine**. [s.l: s.n.].
- COTTAGES, The. Liposomes : From Physics to Applications by D . D . Lasic Biophysique Moleculaire : Structures en Mouvement by Michel Daune. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 67, n. September, p. 1358–1359, 1994.
- DA SILVA, Carlos André Ferreira Machado. **Nanotecnologia em Drug Delivery Systems e a sua aplicação em terapêuticas anti-cancerígenas**. 2016. Universidade de Coimbra, [s. l.], 2016.

DORNELAS, Karina Lopes. **Fabricação de dispositivos microfluídicos a base de papel utilizando materiais de baixo custo**. 2013. [s. l.], 2013. Disponível em:

<<http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933>>

FAHNING, Bárbara Mathias; LOBÃO, Elyomar Brambati. **Nanotecnologia aplicada a fármacos**. 2011. [s. l.], 2011. Disponível em: <<http://www.ucv.edu.br/fotos/files/06.pdf>>

FARKUH, Laura. **Estudo e desenvolvimento de lipossomas com potencial para aplicação em base cosmética**. 2016. [s. l.], 2016.

IWAMOTO, Takuya. Current Topics Challenges of Drug Delivery Systems That Contribute to Cancer Chemotherapy Clinical Application of Drug Delivery Systems in Cancer Chemotherapy : Review of the Efficacy and Side Effects of Approved Drugs. [s. l.], v. 36, n. May, p. 715–718, 2013.

KIMURA, Mariko et al. Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. **Biophysical Chemistry**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 175–183, 2002.

L.M., Mesquita, et al. Prospecção tecnológica: lipossomas como veículos de drug delivery com potencial terapêutico. **Anais do Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. I, p. 2116, 2017.

LAMY-FREUND, M. Teresa; RISKE, Karin A. The peculiar thermo-structural behavior of the anionic lipid DMPG. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s. l.], v. 122, n. 1–2, p. 19–32, 2003.

LARA, D. S. **Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para caracterização de bioprocessos**. 2016. Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2016.

LIU, Weilin et al. Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 263, p. 52–67, 2019.

MARTINI, Denise dos Santos. **Polímeros Derivados Do Biodiesel Do Óleo De Linhaça : Obtenção E Propriedades Físico-Químicas**. 2010. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2010.

MERTINS, Omar. **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compostos de fosfatidilcolina e quitosana**. 2008. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2008.

- MICHELON, Mariano. **Produção de Sistemas Lipossomais em Dispositivos Microfluídicos Visando Aplicações Alimentícias**. 2017. Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2017.
- MOTTA, Valter T. Lípidos e Membranas. **Bioquímica Básica**, [s. l.], p. 212–239, 2009.
- NATARAJAN, Jayaganesh V et al. Sustained-release from nanocarriers : a review. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.029>>
- NOMURA, D. A. et al. **Discussing the use of light scattering in the characterization of polydisperse colloidal systems**São Paulo, 2013.
- NOMURA, Daniela Akiko et al. **Caracterização estrutural de dispersões aquosas de lipídios aniônicos**. 2018. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2018.
- REDONDO-MORATA, Lorena; ONCINS, Gerard; SANZ, Fausto. Force spectroscopy reveals the effect of different ions in the nanomechanical behavior of phospholipid model membranes: The case of potassium cation. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 66–74, 2012.
- RISKE, Karin A.; AMARAL, Lia Q.; LAMY-FREUND, M. Teresa. Thermal transitions of DMPC bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1511, n. 2, p. 297–308, 2001.
- RUBIM, Rafael Leite. **Estudo de interações entre membranas lipídicas por experimentos de SAXS : o efeito da composição**. 2014. Universidade de São Paulo, [s. l.], 2014.
- SABÍN, J. et al. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. **European Physical Journal E**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 401–408, 2006.
- SIERRA, M. B. et al. Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 131, p. 54–58, 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.054>>
- SOARES, Viviane Faria. **Dispersão e estabilização de partículas submicrométricas de óxido de alumínio em sistemas líquidos destinados à produção de materiais refratários**. 2009. [s. l.], 2009.
- WANG, Xuling et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 81–98, 2014.

WHITESIDES, George M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, [s. l.], v. 442, n. 7101, p. 368–373, 2006.

Apêndice A: Lipossomas de DPPC em água/etanol

As sínteses por microfluídica utilizando DPPC em água/etanol foram realizadas em um primeiro momento à temperatura ambiente, porém, devido à TF desse fosfolípídeo ser aproximadamente 41°C, houve precipitação no interior do microcanal, conforme podemos ver da Figura A.1.

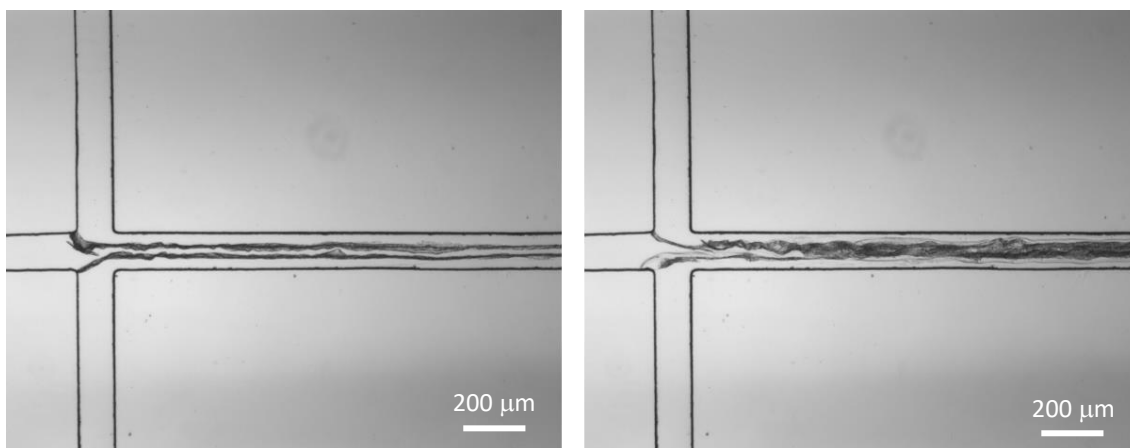


Figura A.1: Imagens por microscopia óptica do microcanal do dispositivo de microfluídica em conformação de T longo durante a síntese de lipossomas de DPPC.

Através de dados obtidos por DLS (Figura A.2) verificou-se que o sistema utilizado não possibilitou a obtenção das estruturas lipossomais desejadas, devido ao alto Pdl e aos grandes diâmetros das estruturas. Além disso, o potencial Zeta obtido foi bastante baixo para uma estrutura zwitteriônica, sendo igual a -13,2mV.

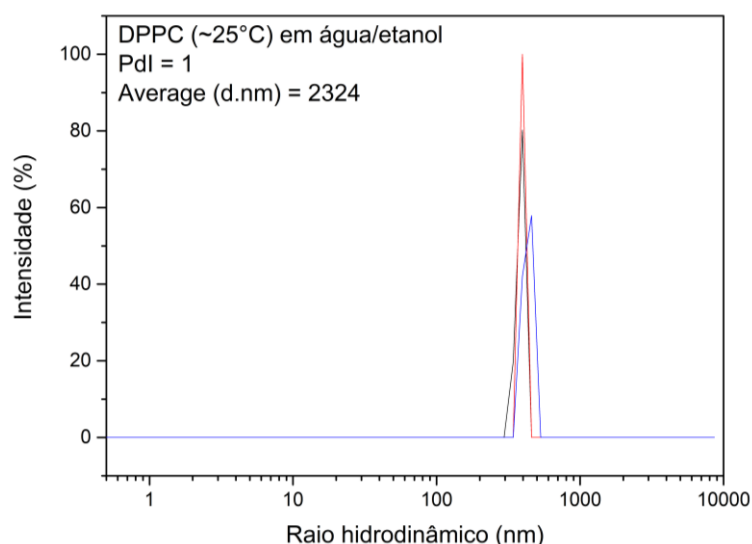


Figura A.2: DLS da amostra de DPPC em água/etanol sintetizada a 25°C após 2 dias de sua síntese.

Sabendo que a formação dos lipossomas é facilitada quando a síntese é realizada acima da TF do fosfolípídeo utilizado, testou-se o mesmo sistema com a solução etanólica de lipídeos previamente aquecida a aproximadamente 50°C. Inicialmente não se verificou precipitação no

microcanal, mas com o decorrer da síntese a temperatura da solução de lipídeos foi diminuindo e começou a ocorrer precipitação. Dados de DLS da amostra coletada antes da precipitação se encontram na Figura A.3. O potencial Zeta para esse sistema foi ainda mais baixo que o anterior, sendo igual a -28,6mV.

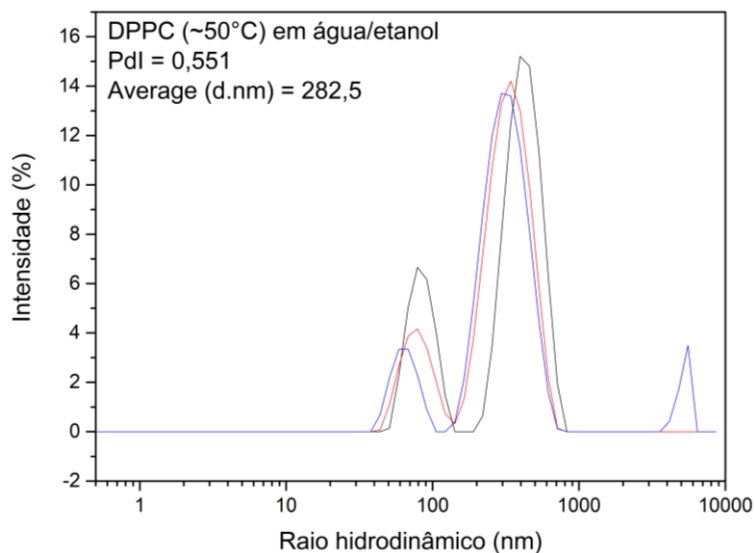


Figura A.3: DLS da amostra de DPPC em água/etanol sintetizada com a solução etanólica a 50°C após 2 dias de sua síntese.

Este experimento mostrou a necessidade de sintetizar os lipossomas em temperaturas acima da TF. Entretanto, para um controle maior das condições de síntese, seria necessário não apenas a solução etanólica estar acima da TF mas também o resto do sistema (tanto as correntes aquosas como a temperatura do dispositivo). Como não tínhamos condições de preparar um dispositivo que permitisse estas condições, não pudemos garantir a síntese dos lipossomas acima da TF e optamos por não realizar mais testes com o fosfolípido DPPC.

Apêndice B: Lipossomas de DMPC/DMPG 95:05 em PBS 1x/etanol

Comparando o sistema misto composto por DMPC/DMPG 95:05 com o de DMPC/DMPG 10:90, foi possível verificar que o sistema com 5% da espécie aniônica apresentou dados de diâmetro hidrodinâmico e PDI maior e Potencial Zeta menor (-7,36mV). Por esses motivos estudos mais aprofundados foram realizados somente na amostra com 10% da espécie aniônica. Dados de DLS da amostra contendo 5% da espécie aniônica se encontram na Figura B.1.

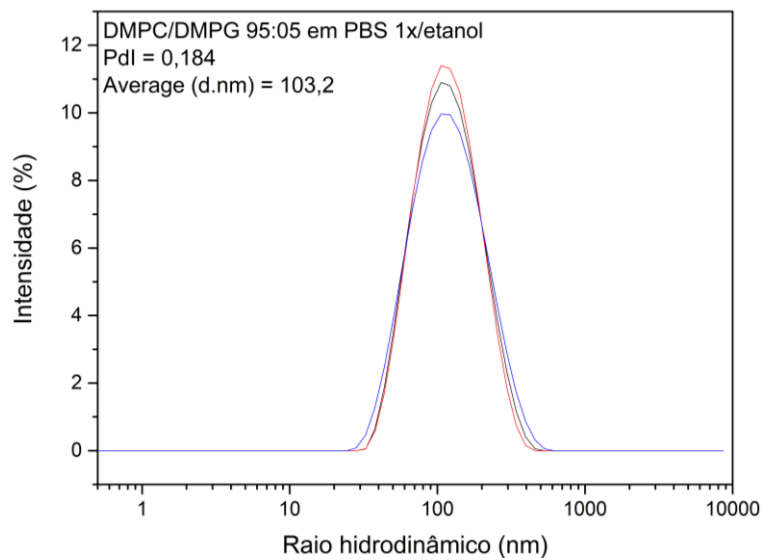


Figura B.1: DLS da amostra de DMPC/DMPG 95:05 em PBS 1x/etanol medido no dia da síntese medida em triplicata.

Apêndice C: Lipossomas DMPC em PBS 1x/etanol com FRRs 5, 20 e 40

Testes variando-se o FRR da amostra de DMPC em PBS 1x/etanol foram realizados a fim de verificar o efeito desse valor no diâmetro hidrodinâmico e no PDI dos lipossomas obtidos, variando-se o FRR em 5, 20 e 40. Imagens do microcanal e dados referentes ao DLS de cada um desses sistemas podem ser encontradas nas Figuras C.1, C.2 e C.3.

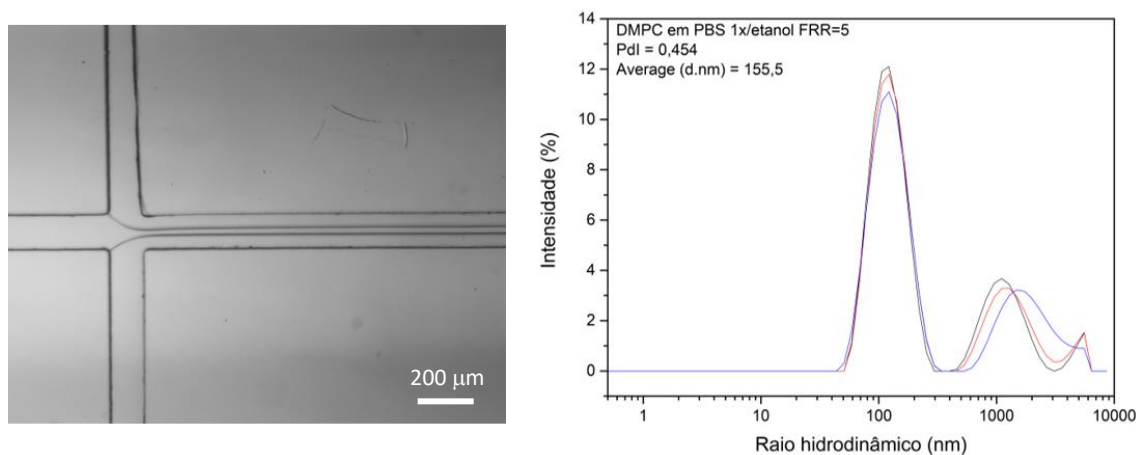


Figura C.1: Imagem do microcanal e dados de DLS da amostra sintetizada com FRR igual a 5.

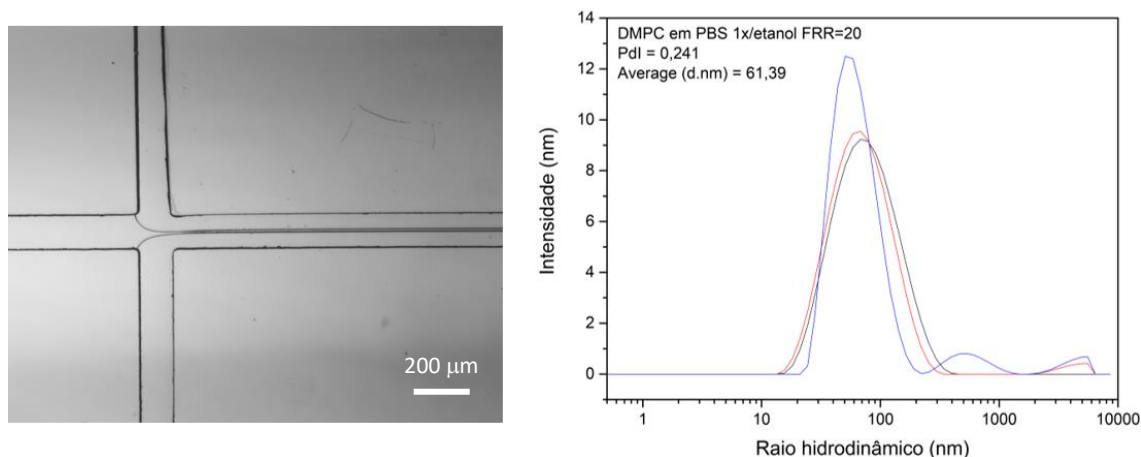


Figura C.2: Imagem do microcanal e dados de DLS da amostra sintetizada com FRR igual a 20.

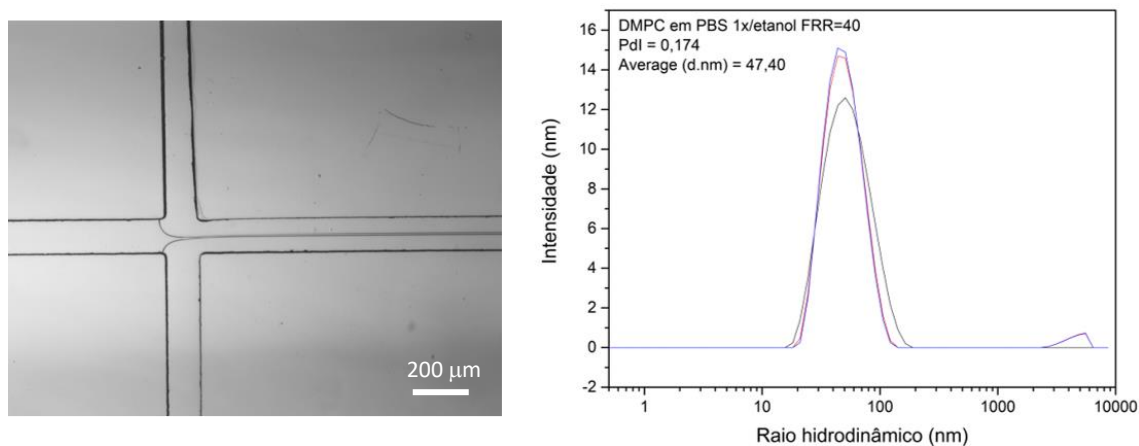


Figura C.3: Imagem do microcanal e dados de DLS da amostra sintetizada com FRR igual a 40.

Foi possível verificar que quanto maior o valor do FRR, menor o diâmetro hidrodinâmico e PDI obtidos para as estruturas lipossomais. Além disso observou-se que o potencial Zeta para os FRRs de 5, 20 e 40 foram similares, sendo de -1,04mV, -2,98mV e -2,40mV, respectivamente. Utilizou-se FRR 10 no restante das sínteses deste trabalho por que foi o melhor parâmetro encontrado na literatura quando se empregou solução lipídica com concentração de 25mmol.L⁻¹ (BALBINO et al., 2013).