

## Síntese e Caracterização de Lipossomas

Josué D. G. Melo, Maira G. Tosato & Leandro Raniero

Este estudo relata o desenvolvimento e caracterização de uma formulação lipossomal, contendo uma mistura de fosfolipídios, visto que o emprego dos lipossomas é bastante amplo em virtude da veiculação de diversos tipos de ativos: hidrofílicos e lipofílicos. O presente estudo teve como principal objetivo avaliar as principais características das formulações lipossomais sob diferentes tempos de sonicação e filtração. Os lipossomas foram preparados utilizando a técnica de hidratação do filme seco de lipídios, seguida de sonicação e filtração. A determinação da distribuição de diâmetro hidrodinâmico foi realizada Espectroscopia de Correlação de Fótons e as mudanças na estrutura química foram mensuradas por meio da Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os resultados demonstraram a necessidade de se utilizar o ultrassom durante 15 minutos para promover o desgaste das camadas externas de lipídios em excesso levando a diminuição do tamanho das vesículas.

**Palavras-chave:** *lipídios; lipossomas; diâmetro hidrodinâmico; espectroscopia.*

This study reports the development and characterization of a liposomal formulation, containing a mixture of phospholipids, since the use of liposomes is quite wide due to the mediation of various types of active substances: hydrophilic and lipophilic. The present study had as its main objective to evaluate the main characteristics of liposomal formulations under different times of sonication and filtration. The liposomes were prepared using the hydration technique of dry lipid film, followed by sonication and filtration. The determination of the distribution of hydrodynamic diameter was carried out photon correlation spectroscopy and, changes in the chemical structure were measured by means of infrared spectroscopy with Fourier Transformed (FTIR). The results demonstrated the need to use ultrasound for 15 minutes to promote the wear off the external layers of excess lipids leading to the decrease in the size of the vesicles.

**Keywords:** *lipid; liposomes; hydrodynamic diameter; spectroscopy.*

## Introdução

A partir da década de 1950 houve um avanço no tratamento de doenças humanas, aumentando a longevidade a nível mundial de 46,5 a 65 anos. Sem dúvidas, a indústria farmacêutica desempenhou um papel fundamental no descobrimento de novos medicamentos. Entretanto, o desenvolvimento de novas terapias é um processo complexo e prolongado, que demanda investimentos em programas de pesquisas e desenvolvimentos científicos, visto que, poucos compostos estudados chegam na etapa final de teste em humanos. Muitos fármacos candidatos para novas terapias possuem baixa solubilidade em água e, por isso requerem sistemas de liberação, que os solubilizem e permitam alcançar uma concentração biologicamente ativa.

Neste contexto, uma das estratégias mais atrativas se baseiam no desenvolvimento de veículos (carriers ou drug delivery, em inglês), que permitam a liberação controlada de drogas, liberação lenta ou liberação específica no sítio de ação.<sup>1</sup> Além disso, estes veículos podem oferecer outras vantagens tais como: controle de velocidade de liberação das drogas, proteção das mesmas contra as reações de hidrólise ou ações enzimáticas, diminuição da toxicidade e melhor biodisponibilidade do fármaco.<sup>2</sup>

Habitualmente, o desenvolvimento de sistemas de liberação emprega o uso de polímeros, surfactantes ou a mistura de ambos, cujas propriedades de se auto ensamblarem possibilitam a formulação de uma ampla variedade de estruturas em escala nano-micro, com a capacidade de encapsular e proteger diversos tipos de fármacos. A vantagem destes sistemas é a baixa toxicidade e alta biocompatibilidade, quando se pode citar os mais comuns, como micelas, lipossomas, emulsões, microemulsões, géis poliméricos, aerossóis, biomembranas e outras combinações de moléculas.<sup>3</sup>

Os lipossomas destacam-se pela alta aplicabilidade em diversas áreas, como na medicina, na indústria cosmética e na pesquisa científica avançada. Na medicina, os

lipossomas são frequentemente utilizados como sistemas de entrega de fármacos, particularmente úteis na entrega direcionada de agentes quimioterápicos às células cancerígenas, minimizando os danos ao tecido saudável. Na indústria cosmética, a aplicação dos lipossomas melhora a disponibilidade de ingredientes importantes (vitaminas e peptídeos) em cosmecêuticos.<sup>4,5</sup>

As estruturas dos lipossomas são caracterizadas pelo formato de vesículas esféricas coloidais, sendo composta por uma bicamada lipídica, qual as caudas hidrofóbicas dos lipídios se orientam para dentro, criando um ambiente lipofílico. Enquanto, que as cabeças hidrofílicas ficam voltadas para fora, em contato com o meio aquoso, permitindo que os lipossomas transportem substâncias hidrofílicas (solúveis em água) e lipofílicas (solúveis em lipídios) em seu interior que não seriam facilmente solúveis em água ou que precisam ser protegidas de degradação no ambiente externo.

Porém, uma das dificuldades dos sistemas de liberação é devida sua integridade durante o armazenamento. Os lipossomas podem estar sujeitos à agregação, fusão e até mesmo oxidação, levando a perda da substância encapsulada. Neste sentido, os fosfolipídios de origem natural ou sintética são as opções mais indicadas, devido suas propriedades higroscópicas e estado cristalino a temperaturas próximas de 30 °C. Tanto lipídios de cadeia insaturada, quanto os de cadeia saturada apresentam vantagens e desvantagens quanto a estabilidade das vesículas.<sup>6</sup>

Diante do exposto, neste trabalho foram investigadas algumas características dos lipossomas elaborados com uma composição de diferentes lipídios, sendo majoritariamente constituída por fosfatidilcolina de soja (SPC) além de outros lipídios. As vesículas foram caracterizadas pelas técnicas de Espectroscopia de Correlação de Fótons, mensurando o diâmetro hidrodinâmico e o índice de Polidispersividade, e pela Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, avaliando as ligações químicas dos grupos funcionais da membrana dos lipossomas, comparando com o lipídio puro.

# Materiais e Métodos

## MATERIAL

A mistura de fosfolipídios (Lipoid S75) foi adquirida da empresa Lipid Ingredients & Technologies Ltd. (Brasil), sendo composta de 73% de fosfatidilcolina, 9% fosfatidiletanolamina, 1,5% lisofosfatidilcolina, 1,1% ácido fosfatídico, 0,6% fosfatidilinositol e o restante detriglicerídeos e ácidos graxos (Figura 1). O Clorofórmio foi adquirido da Sigma Aldrich com 99% de pureza.

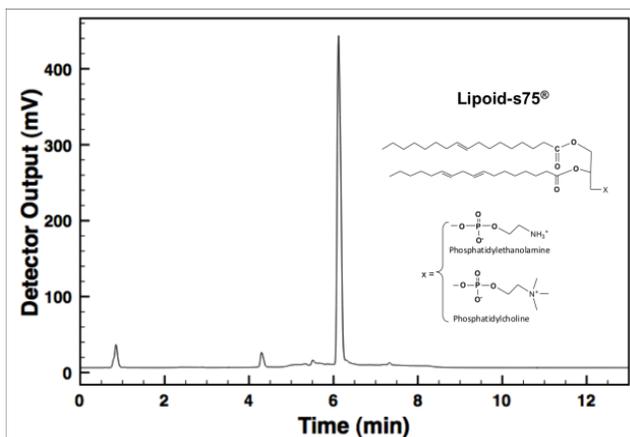


Figura 1. Fórmula estrutural do Lipoid s75.

## PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados utilizando o método de evaporação de solvente com formação de filme, seguido de tratamento de sonicação em banho.<sup>7</sup> 0,02 g de Lipoid S75 foram misturados com 20 ml de clorofórmio. Em seguida, a solução foi seca a vácuo utilizando um evaporador rotativo (Rotavapor Buchi) a 35 °C e 60 rpm durante 2 horas até a formação de um filme fino no vidro do balão. O filme foi reidratado com 20 ml de água ultrapura tipo 1, a temperatura ambiente durante 2 horas (Figura 2). Vesículas de menor tamanho são obtidas submetendo a solução hidratada ao processo de sonicação, seguido de filtração via filtros com poros de tamanhos desejados. Para isso, a suspensão de lipossomas com sintetizada foi dividida em tubos cônicos (tubo Falcon®) e sonicadas em banho ultrassônico por 15 ou 30 min, até obter translucidez.

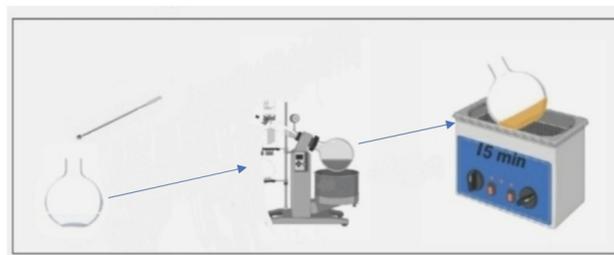


Figura 2. Processo de Síntese do Lipossoma.

## ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO DE FÓTONS

O tamanho da partícula e o índice de polidispersividade (PDI) foram determinados usando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) em um ângulo de dispersão de 90°. As soluções foram analisadas pura e diluídas em água ultrapura, tipo 1. As amostras também foram filtradas utilizando uma membrana de PTFE com poro de tamanho de 0,2 µm. Os resultados foram obtidos de experimentos feitos em triplicata.

## ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A solução lipossoma e o lipídio puro foram analisadas usando um acessório de reflexão total atenuada (ATR), acoplado a um espectrômetro FTIR (Spectrum 400, Perkin Elmer, USA). 5 mg da amostra sólida (lipídio puro) e da solução lipossomal foram medidos sobre a superfície de um cristal de diamante. A solução foi seca sobre o cristal por meio de um fluxo de nitrogênio gasoso. Os espectros são a média de 32 varreduras, que foram registrados no intervalo de 4000cm<sup>-1</sup> a 500 cm<sup>-1</sup>, com 4cm<sup>-1</sup> de resolução espectral.

## Resultados e Discussão

A estrutura dos lipossomas depende da composição e do método de preparação. O método escolhido para a realização deste trabalho é simples, econômico e em linhas gerais compreendeu: dissolução dos lipídios em solvente orgânico, evaporação do solvente e dispersão do lipídeo seco em solução aquosa. As principais diferenças na estrutura dos lipossomas

surtem do método empregado para a dispersão dos lipídios, os quais podem ser induzidos por hidratação de filme, sonicação, extrusão, evaporação em fase reversa, solubilização em etanol, congelamento, eletroformação, etc.

A formação espontânea das vesículas não apresenta um tamanho homogêneo. Entretanto, as multicamadas proporcionam um alto rendimento para eventual encapsulação de ativos. Com o objetivo de obter lipossomas menores, a técnica de ultrassom foi utilizada para romper as camadas mais externas das vesículas multilamelares, transformando-as em vesículas unilamelares de menor tamanho.<sup>8</sup>

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos por meio da Espectroscopia de Correlação de Fótons, indicando os valores de índice de polidispersividade (PDI) para cada tipo de procedimento realizado, como também a distribuição de diâmetro hidrodinâmico da população de lipossomas dispersos na solução coloidal. Pode-se observar que as amostras que apresentaram menores valores de PDI foram as filtradas. Este fato pode ser explicado pela retenção de partículas maiores no filtro e, conseqüentemente uma uniformização dos tamanhos.

A distribuição do tamanho de 88% das partículas ficou entre 118 e 392nm e, 12% apresentaram tamanho médio igual a 1617nm. Por outro lado, para 30 min de sonicação houve um resultado inesperado com o aumento do tamanho das partículas, sendo um indicativo de desestabilização do sistema coloidal. Cada sistema lipossomal requer diferentes tempos e potências de sonicação.

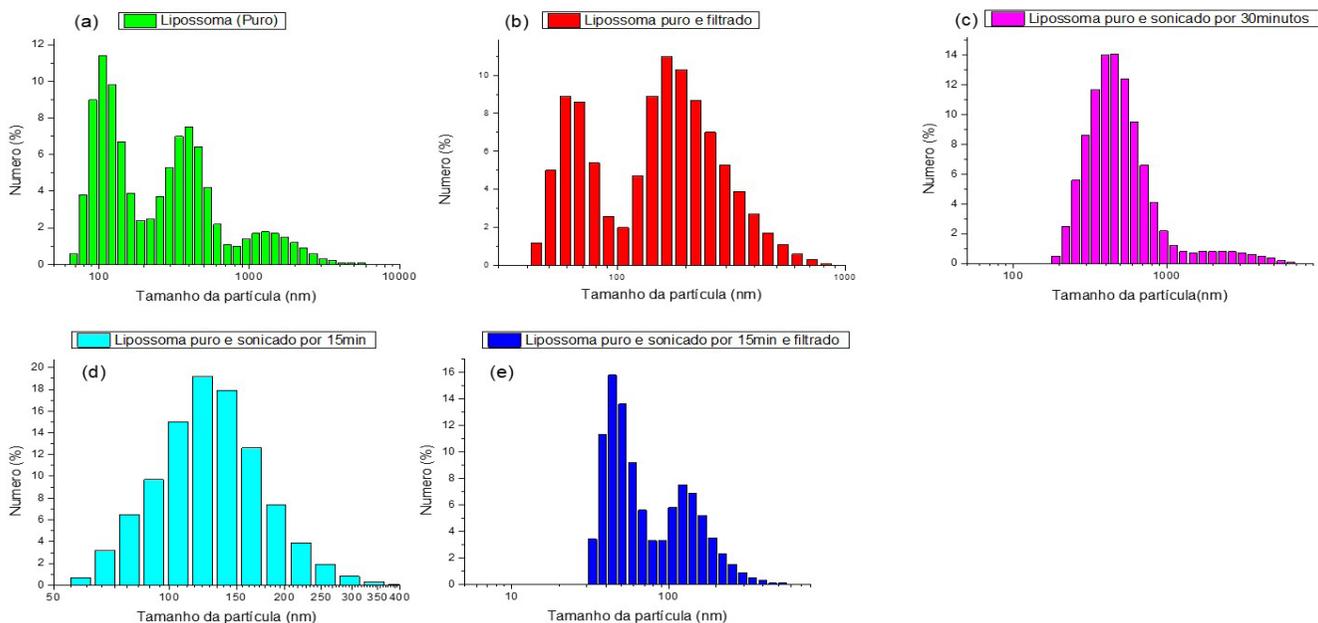
Para maiores tempos, geralmente ocorre uma perda da estabilidade física dos lipossomas, tendo como resultado o subsequente aumento do diâmetro das vesículas. A amostra de lipossoma sonicado em banho de ultrassom por 15 minutos, revelou um valor de PDI igual a 0,69. Comparando este índice com o obtido na amostra pura, nota-se que não houve redução no valor. Entretanto, observa-se redução na distribuição de tamanhos de partículas sendo 99,1% com 135nm e 0,9% foram de 988nm.

**Tabela 1.** Resultados obtidos através da técnica de DLS para a amostra com diferentes tratamentos.

Amostras	PDI	População 1 (nm)	(%) número	População 2 (nm)	(%) número	População 3 (nm)	(%) número
Lipo_puro	0,6	118	46	392,4	42	1617	12
Lipo_Puro-filtrado	0,29	68	33	228	67	0	0
Lipo_Puro-sonicado 15min	0,69	134,7	99,1	988,3	0,9	0	0
Lipo_Puro-sonicado 15min-filtrado	0,29	49,86	60,2	149	39,8	0	0
Lipo_Puro-sonicado 30min	0,63	2794	6,2	493,4	93,8	0	0

A Figura 3 apresenta os gráficos de distribuição de diâmetros hidrodinâmicos das soluções lipossomais, quando pode observar uma ampla distribuição no tamanho de partículas. Estes resultados estatísticos do diâmetro hidrodinâmico e distribuição das populações foram obtidos medindo o coeficiente de difusão da partícula, por meio da função de autocorrelação, devido a dispersão da luz por partículas esféricas em movimento Browniano.<sup>9</sup> Nesta figura é possível observar que a solução de lipossoma puro apresentou distribuição trimodal, quando comparada com os gráficos das outras soluções.

Os valores índice de polidispersão foram mais altos para as soluções de lipossomas puro (fig. 3a) e puro sonicado (fig. 3c, d), quando comparados aos resultados dos lipossomas filtrados (fig. 3b, e). Por este motivo, o processo de filtração é indispensável na redução significativa na distribuição de diferentes tamanhos de partículas e, também no valor do PDI. A utilização do ultrassom indicou uma melhora significativa para a redução do número de populações levando a comportamento monomodal, tanto para sonicação com t=15 min quanto t=30 min (fig. 3c, d).



**Figura 3.** Análise dos lipossomas formados pela Espectroscopia de Correlação de Fótons.

A amostra do lipossoma puro foi colocada no banho de ultrassom por 15 minutos, seguida do processo de filtração por meio de uma membrana de PTFE de 0,2  $\mu\text{m}$ , obtendo-se um PDI de 0,29 conforme apresentado na Tabela 1. Embora a Figura 3e mostre uma distribuição bimodal, nota-se uma redução do tamanho das partículas, demonstrando que o tempo de sonicação e a filtragem da amostra foram efetivos, reduzindo o valor do PDI.

### ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para verificar as interações moleculares após a transformação do Lipoid S75 em lipossoma. A Figura 4 apresenta os espectros no infravermelho da solução lipossomal e do lipídio puro (Lipoid S75). Estudos anteriores demonstram que os números de ondas das ligações de estiramento simétrico e assimétrico do grupo  $\text{CH}_2^{10}$  do Lipoid S75 estão localizados em 2922  $\text{cm}^{-1}$  e 2854  $\text{cm}^{-1}$ . Enquanto, para os lipossomas encontram-se em 2924  $\text{cm}^{-1}$  e 2852  $\text{cm}^{-1}$ .

A banda em 1735  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada a vibração de estiramento simétrico da ligação  $\text{C}=\text{O}$ , estando centradas na mesma posição tanto para o Lipoid S75, quanto para o lipossoma indicando possível estabilidade para este grupo funcional. A banda relacionada ao estiramento assimétrico  $\text{N}(\text{CH}_3)_3$  pode ser observada em 966  $\text{cm}^{-1}$  no Lipoid S75, enquanto nos lipossomas situa-se em 971  $\text{cm}^{-1}$ . Esse deslocamento se deve as ligações de hidrogênio, que promovem uma interação entre a parte polar do lipossoma e as moléculas da água, que foi utilizada no processo de síntese e promovendo um rearranjo na vizinhança.<sup>11</sup>

A vibração de estiramento assimétrico do  $\text{P}=\text{O}$  se encontra aproximadamente em 1200  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>12</sup> As bandas em 1237  $\text{cm}^{-1}$  e 1052  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo funcional  $\text{PO}_2$ .<sup>13</sup> A ligação de estiramento da banda do  $\text{P}=\text{O}$  é sensível a ligações de hidrogênio deslocando-se para números de ondas menores.<sup>14</sup> Este comportamento pode explicar a posição da banda de 1237  $\text{cm}^{-1}$  no Lipoid S75

e o deslocamento dela para  $1232\text{ cm}^{-1}$  nos lipossomas. Observou-se uma banda no lipídeo puro em  $1052\text{ cm}^{-1}$ . Entretanto, no lipossoma essa banda pode ser observada em  $1090\text{ cm}^{-1}$ . Este deslocamento, possivelmente, está ligado a interações com ligações de hidrogênio.

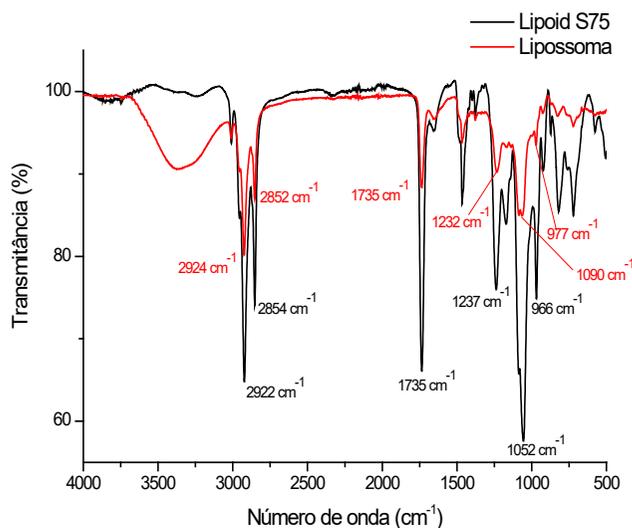


Figura 4. Espectro de FTIR do Lipídeo s75 e dos lipossomas.

## Conclusão

Neste estudo lipossomas formados por um complexo fosfolipídico (Lipoid S75) foram preparados por um método de evaporação de solvente (clorofórmio), seguido de hidratação e sonicação. As análises das soluções demonstraram a necessidade de um tempo de ultrassom de 15 minutos para promover o desgaste das camadas externas de lipídios em excesso, levando a diminuição do tamanho dos lipossomas. Ainda assim, a filtração se fez necessária para selecionar e uniformizar a distribuição dos tamanhos.

A comparação entre as análises por FTIR das amostras do Lipoid S75 e da solução lipossomal evidenciaram interações entre grupos moleculares, como as ligações de hidrogênio e indicam que os fosfolipídios se mantiveram íntegros durante o processo de formação das partículas, mas se reorganizaram em uma estrutura diferente.

## Referências

1. Y. AGRAWAL AND V. PATEL. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, vol. 2, no. 2. p. 81. (2011).
2. M. MALMSTEN. Soft drug delivery systems. *Soft Matter*, vol. 2, no. 9, pp. 760–769 (2006).
3. S. SANTOS; B. MEDRONHO; T. SANTOS AND F. E. ANTUNES. Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable. In: *Personalised Treatment*. vol. 4. (2013).
4. FAISAL RAZA; LAUREN EVANS; MAHZAD MOTALLEBI; HAJRA ZAFAR; MIGUEL PEREIRA-SILVA; KALSOOM SALEEM; DIANA PEIXOTO; ABBAS RAHDAR; ESMAEEL SHARIFI; FRANCISCO VEIGA; CLARE HOSKINS; ANA CLÁUDIA PAIVA-SANTOS. Liposome-based diagnostic and therapeutic applications for pancreatic cancer. *Acta Biomaterialia*. v. 1-23. (2023).
5. MICHAŁDYMEK; ELŻBIETASIKORA. Liposomes as biocompatible and smart delivery systems the current state. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 309, 102757. (2022).
6. SEBAALY; CARINE & GREIGE-GERGES; HELENE & AGUSTI; GERALDINE & FESSI; HATEM & CHARCOSSET; CATHERINE. Large-scale preparation of clove essential oil and eugenol-loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. *Journal of Liposome Research*(2015)DOI: 10.3109/08982104.2015.1057849.
7. SARABANDI, K; JAFARI, S. M; MOHAMMADI, M; AKBARBAGLU, Z., PEZESHKI, A; & HESHMATI, M. K. Production of reconstitutable nanoliposomes loaded with flaxseed protein hydrolysates. Stability and characterization. *Food Hydrocolloids*. 96, 442–450 (2019). DOI: org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.047.
8. MAIRA GASPAR TOSATO; JULIE V. MAYA GIRÓN; AIRTON A. MARTIN; VAMSHI KRISHNA TIPPAVAJHALA; MÓNICA FERNÁNDEZ LORENZO DE MELE; LELIA DICELIO. Comparative study of transdermal drug delivery systems of resveratrol: High efficiency of deformable liposomes. *Materials Science and Engineering*. v. 90356-364. (2018). DOI: org/10.1016/j.msec.2018.04.073.
9. B. J. BERNE AND R. PECORA. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, 2000th ed. Toronto. Canadá. Dover Publications, 1976.
10. TAI, K; LIU, F; HE, X; MA, P; MAO, L; GAO, Y; & YUAN, F. The effect of sterol derivatives on properties of soybean and egg yolk lecithin liposomes: Stability, structure and membrane characteristics. *Food Research International*. 109, 24–34 (2018). DOI: org/10.1016/j.foodres.2018.04.014

11. FANFAN SONG; GUOLONG YANG; YANHONG WANG; SHAOJUN TIAN. Effect of phospholipids on membrane characteristics and storage stability of liposomes. College of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China, **2022**. DOI: org/10.1016/j.ifset.2022.103155.
12. ANTOANETA V. POPOVA; DIRK K. HINCHA. Intermolecular Interactions in Dry and Rehydrated Pure and Mixed Bilayers of Phosphatidylcholine and Digalactosyldiacylglycerol. A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study, *Biophysical Journal*, vol. 85. Issue 3, Pages 1682-1690. ISSN 0006-3495. (**2003**) DOI: org/10.1016/S0006-3495(03)74598-6
13. MANTSCH, H; & MCELHANEY, R. (1991). Phospholipid phase transitions in model and biological MEMBRANES AS STUDIED by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*. 57(2-3), 213-226. (**2018**). DOI: org/10.1016/0009-3084(91)90077.
14. LEWIS AND MCELHANEY (**1996**); R.N.A.H. LEWIS; R.N. MCELHANEY. Fourier transform infrared spectroscopy in the study of hydrated lipids and lipid bilayer membranes H.H. Mantsch. F.D. Chapman (Eds.). *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. WILEY-LISS. New York, pp. 159-202 (1996).

---

## Josué D. G. Melo, Maira G. Tosato & Leandro Raniero\*

Laboratório de Laboratório de Nanosensores, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Av. Shishima Hifumi, nº2911, CEP 12244-000, Brasil.

\*E-mail: lraniero@univap.br