



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

# Formulação de lipossomas furtivos teranósticos para liberação de ativos

*Theranostic stealth liposome formulation for active release*

Fernando de Moura Sommer\*, Luis Fernando Cabeça†

## RESUMO

Lipossomas são estruturas vesiculares e microscópicas formadas, basicamente, por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas. Os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas em seu cerne aquoso e hidrofóbicas e anfílicas em suas bicamadas, sendo um eficiente carreador de fármacos. Neste trabalho foi abordado métodos de injeção e sonicação, para obtenção de estruturas vesiculares para o encapsulamento do fármaco oxacilina, obtendo conclusões bem relevantes para trabalhos futuros.

**Palavras-chave:** Oxacilina, Lipossomas, injeção, sonicação.

## ABSTRACT

Liposomes are vesicular and microscopic structures basically formed by phospholipids organized in concentric bilayers. Liposomes can encapsulate hydrophilic substances in their aqueous core and hydrophobic and amphiphilic substances in their bilayers, being an efficient drug carrier. In this work, injection and sonication methods were approached to obtain vesicular structures for the encapsulation of the oxacillin drug, obtaining very relevant conclusions for future work.

**Keywords:** Oxacillin, Liposomes, injection, sonication.

## 1 INTRODUÇÃO

Alguns anos atrás, Alec Bangham discutia pela primeira vez a formação espontânea de estruturas de membranas fechadas, que consistem de vesículas esféricas microscópicas de tamanhos variados, sendo em micrômetros ou nanômetros, após a dispersão de fosfolipídeos em um meio aquoso (RANADE, 1989). O termo lipossoma (LP) surgiu com Weissman, juntando duas palavras gregas, lipo (gordura) e soma (corpo), sendo assim um corpo formado por gordura (SESSA; WEISSMANN, 1968).

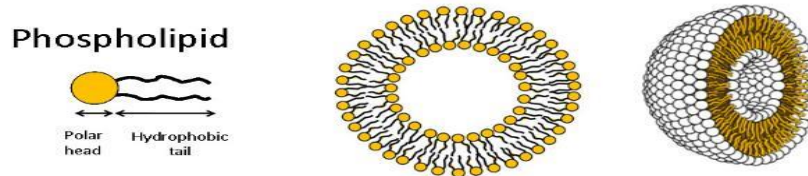
Lipossomas contém uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas separadas por compartimentos aquosos, em que as caudas hidrofóbicas dos lipídios estão voltadas para o interior e a outra extremidade são polares para o exterior da bicamada (Figura 1), mantendo contato com a fase aquosa (RANADE, 1989). Eles podem encapsular substâncias hidrofílicas em seu cerne aquoso e as hidrofóbicas e anfílicas em suas bicamadas (CABEÇA, 2009).

\* Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, Paraná, Brasil; [fernandosommer@alunos.utfpr.edu.br](mailto:fernandosommer@alunos.utfpr.edu.br)

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina; [luiscabeca@utfpr.edu.br](mailto:luiscabeca@utfpr.edu.br)



**Figura 1 – Representação esquemática da organização de um lipossoma unilamelar**



**Fonte: Adaptada (ZEINELDIN; SKANDANI, 2012)**

Os lipossomas apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação, de forma que, quando alcançam os tecidos alvos podem liberar a droga encapsulada do seu cerne, aumentando a eficácia do tratamento (SANTOS et al., 2002; GONIOTAKI et al., 2004; PUGLIA et al., 2004).

Quando o fármaco é liberado gradualmente dos sistemas lipossomais tem-se uma melhor resposta farmacológica e com maior absorção do que os mesmos livres (DISAPIO, 1999), aumentando, dessa forma, a eficiência da ação terapêutica e retenção da sua estrutura e atividade por mais tempo (MORAES, 1996; ZALLOUM, 2001; FRACETO et al., 2002).

Assim a utilização de fármacos como antibióticos encapsulados em lipossomas pode melhorar sua biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, prolongamento de ação. O uso do antibiótico oxalicina encapsulada em lipossomas e sua caracterização é uma formulação que pode ser usada em diferentes meios: uso em exortia ósseo, uso de forma tópica, uso em aplicação injetável e também uso em curativos a base de celulose bacteriana.

O desenvolvimento desse complexo lipossomas/oxalicina é fundamental pois essa formulação será utilizada em outros trabalhos, em especial na formulação de um curativo a base de celulose bacteriana modificado.

## 2 OBJETIVO

Encapsulação e caracterização do antibiótico oxalicina em lipossomas.

### 2.1 Objetivos específicos

- Preparar os lipossomas a partir de lipídios fosfatidilcolina de soja e colesterol (7:3).
- Preparar os lipossomas a partir de lipídios fosfatidilcolina de soja, DOPG e colesterol (6:2:2).
- Incorporar o fármaco oxalicina nas vesículas lipossomais.
- Caracterizar o complexo (eficiência de encapsulação, tamanho de vesícula, potencial zeta e ressonância magnética nuclear).

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 - Preparo dos lipossomas com oxalicina

Em virtude do baixo índice de eficiência de encapsulação diversos testes de preparo de lipossomas/oxalicina foram realizados:



*Método 1:* O método utilizado para a preparação do lipossoma foi por filme lipídico (HAERI et al., 2013). Foi utilizado os seguintes componentes: fosfatidilcolina de soja (SPC), colesterol, para realizar a formação do lipossoma na proporção de 7:3 (mols). Os componentes foram adicionados em um frasco juntamente com a oxacilina 1 mM, e deixando secar em temperatura ambiente. Após ressuspendeu-se o filme lipídico com solução tampão fosfato pH 7.5 0,005M utilizando um vortex. A solução foi transferida para um mini extrusor Avanti Polar com membrana de policarbonato com abertura de 400nm.

*Método 2:* Uma mistura de fosfatidilcolina de soja (SPC), 1,2-dioleil glicerol 3-fosfatoglicerol (DOPG) e colesterol (1 mM) em solvente clorofórmio (SPC-DOPG-COI) (proporção de concentração 6:2:2 em mols) foi preparada. O preparo foi realizado em duplicata, a fim de formar lipossomas com fármaco e para controle. Deixou-se secar a em temperatura ambiente por 24h para formação do filme lipídico. Os filmes secos foram hidratados, cada um com a solução correspondente: solução de oxacilina (1 mmol/L) e solução tampão (tampão fosfato pH 7,4 0,05 M), para os lipossomas controle. Cada solução foi levada ao vortex, por pelo menos 1 minuto. As soluções foram extrusadas em um mini extrusor Avanti Polar com membrana de policarbonato de 400 nm, passando por 13 ciclos completos. A fim de analisar a eficiência de encapsulação, foram testadas algumas variações no procedimento.

*Método 3 –* Após preparado o filme lipídico como descrito no Método 2, SPC-DOPG-COI (6:2:2 em mols), os filmes secos foram hidratados com a solução de oxacilina (1 mmol/L). A solução levada para ciclos de congelamento e descongelamento (2 ciclos 60 °C seguido de 50 °C).

*Método 4 -* Após preparado o filme lipídico como descrito no Método 2, SPC-DOPG-COI (6:2:2 em mols), os filmes secos foram hidratados com a solução de oxacilina (1 mmol/L). A solução foi levada para vortex por 1 minuto, seguido de banho de ultrassom por 30 minutos.

*Método 5 -* Após preparado o filme lipídico como descrito no Método 2, SPC-DOPG-COI (6:2:2 em mols), os filmes secos foram hidratados com a solução de oxacilina (1 mmol/L). Na sequência, os lipossomas obtidos foram então levados ao homogeneizador ultrassônico (QSonica, Q500). Durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e com 30% de amplitude. Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo.

### 3.2 Eficiência de encapsulação.

Uma alíquota de 0,8 mL da amostra extrudada foi transferida para uma unidade de filtro e foi submetida a uma ultracentrifugação (filtro Millipore, USA, ME Cut-off 10,000Da). O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 1:

$$\%OXAencapsulada = (C_i - C_x) / C_i \times 100 \quad (1)$$

Em que  $C_i$  e  $C_x$  representam, respectivamente, as concentrações iniciais e a analisada.

Para padronizar as nossas contas, realizou-se uma curva padrão da solução tampão com a oxacilina. Para sua construção foi feita seis soluções com concentrações diferentes, após a medição com comprimento de onda à 225nm, plotamos os pontos absorvância x concentração.

### 3.3 Medidas de tamanho da partícula e Potencial Zeta.

Análises de potencial zeta e do índice de polidispersividade das amostras foram realizadas com o aparelho Zetasizer NanoPlus (NanoPlus Particle Size Analyzer). Para o teste de potencial zeta amostras



foram diluídas (4 µL da formulação para 996 µL de água deionizada) e feitas em triplicata, na temperatura de 25°C.

### 3.4 Espectroscopia Ressonância Magnética Nuclear

Todos os experimentos de RMN foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de Londrina - UEL. O equipamento de RMN utilizado foi o Bruker 400 MHz para a frequência de hidrogênio. O sinal de deutério do solvente foi utilizado como trava do campo e ajuste da homogeneidade do campo magnético. Foram realizados experimentos de DOSY, os quais são espectros de pseudo duas-dimensões com deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  em um eixo e o coeficiente de difusão calculado ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \times 10^{-10}$ ) em outra dimensão. O tempo médio de aquisição do experimento foi de 25 minutos.

## 4 RESULTADOS

Para mensurar a eficiência de encapsulação da oxacilina nos lipossomas foi realizado uma curva de calibração variando a concentração da oxacilina.

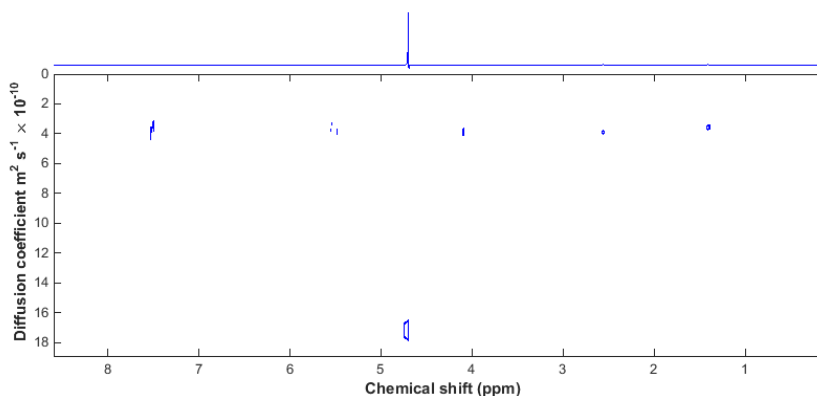
O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) foi de 0,998. Equação da reta obtida:

$$A = 0,014x + 0,0668 \quad (2)$$

Após preparado o método 1, o complexo Lipossomas/oxalina, obteve a eficiência de encapsulação da oxacilina no lipossoma de aproximadamente 31%.

Ao analisar os espectros de DOSY RMN observa-se que as substâncias livres, OXA e Lipossomas apresentam valores de coeficiente de difusão de  $D$  ( $3,63 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$  e  $0,2 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) respectivamente. Isso se dá pelo fato da molécula de OXA apresentar uma estrutura menor, o qual gera uma difusão mais rápida em relação ao lipossoma. A análise do espectro do complexo OXA/LF (Figura 2) demonstra que a difusão do OXA em sua forma complexada sofreu uma pequena redução comparada a sua forma livre ( $3,56 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) evidenciando a formação de um fraco complexo de inclusão (fração complexada 2 %). Esse resultado corrobora com os pequenos valores de eficiência de encapsulação de 31%.

Figura 2 - Figura 1 - Espectro de RMN-DOSY (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ / referência  $\text{H}_2\text{O}$  residual em 4,7 ppm) da OXA em Lipossomas  $D = 3,56 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} 10^{-10}$



Fonte: Autoria própria



O método 2 foi usado o DOPG, assim deixando o lipossoma com carga negativa, com isso foi analisada apenas a eficiência de encapsulação, potencial zeta e o tamanho da partícula. Os métodos 3, 4 e 5, são variações do método 2, sendo na mudança da suspensão do filme lipídico. As eficiências de encapsulação é 4,56%, 0%, 1,21%, 88,9% respectivamente.

Feito as análises de tamanho de partículas dos lipossomas, teve-se um tamanho médio de  $246,5 \pm 22,1$  nm (PDI 26%), e o potencial Zeta de  $-29,6 \pm 1,0$  mV.

## 5 CONCLUSÕES

Após os resultados obtidos, concluiu-se que usar o DOPG, deixando o lipossoma com carga negativa, teve maior interação com o fármaco, assim tendo uma maior eficiência de encapsulação. Também o uso de método de sonicação foi o que melhor proporcionou resultados de efeito de maior encapsulação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR pela Bolsa de Iniciação Científica e pela infraestrutura que foi disponibilizada para a realização dos testes em laboratório. Em contrapartida agradeço a CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. de; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 2, n. 43, p. 167-179, 2007.

SESSA, G.; WEISSMANN, G. **Phospholipidspherules (liposomes) as a model for biological membranes.** *J. Lipid Res.*, v. 9, p. 310-318, 1968.



BOERMAN, O.C.; LAVERMAN, P.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F.H.M.; STORM, G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 461-475, 2000.

BRAGAGNI, M.; MAESTRELLI, F.; MENNINI, N.; GHELARDINI, C.; MURA, P. Liposomal formulations of prilocaine: effect of complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on drug anesthetic efficacy. **J Liposome Res.** 2010.

CABEÇA, L.F. Tese de doutorado “**Topologia de complexos entre fármacos/ $\beta$ -ciclodextrinas/lipossomas/células, aplicando técnicas de ressonância magnética nuclear**”. 2009. Instituto de Química, Departamento de Orgânica. Universidade de Campinas – Unicamp – Campinas-SP.

NUNES, Paula S., et al. "Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011.

KLEMM, Dieter, et al. "Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state." *Materials Today* 21.7 (2018).

MUTHUA, M.S.; KULKARNI, S.A.; RAJU, A.; FENG, SI-S. **Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots.** *Biomaterials*, 2012, 33, 3494-3501.