



A eficiência de encapsulamento de moléculas bioativas por meio de sistemas lipossomais

The encapsulation efficiency of bioactive molecules through liposomal systems

Beatriz Fogare ¹, Marcelle de Lima Ferreira Bispo ², Renato Márcio Ribeiro Viana ³

RESUMO

O encapsulamento de fármacos visa direcionar as substâncias farmacêuticas para os locais com enfermidades, buscando diminuir efeitos colaterais e aumentar a chance de eficácia. O encapsulamento de medicamentos pode envolver diversos mecanismos para garantir a liberação controlada e segura das substâncias, como, por exemplo, o sistema lipossomal. O objetivo do trabalho consiste em garantir a fácil administração de três moléculas hidrofóbicas (pouco solúveis em água) através de sistemas lipossomais de modo que haja a possibilidade de aumentar a sua solubilidade. As moléculas foram submetidas aos procedimentos de varredura para determinação de λ máximo, construção de curva de calibração, incorporação em sistemas lipossomais contendo 10% DMSO e cálculo da eficiência de encapsulamento de cada molécula após esses processos. Além disso, os lipossomas foram liofilizados para permitir a sublimação do solvente, o que levou à realização de novos cálculos de eficiência de encapsulamento, a fim de validar se as moléculas realmente conseguiram ser solubilizadas em água. Após o encapsulamento, foi notado que as substâncias conseguiram aumentar sua solubilidade em 99%.

PALAVRAS-CHAVE: encapsulamento; lipossoma; molécula.

ABSTRACT

Drug encapsulation aims to direct pharmaceutical substances to the sites of disease, in order to reduce side effects and increase the chance of efficacy. Drug encapsulation can involve various mechanisms to ensure the controlled and safe release of substances, such as the liposomal system. The aim of this work is to guarantee the easy administration of three hydrophobic molecules (not very soluble in water) through liposomal systems so that there is the possibility of increasing their solubility. The molecules were subjected to scanning procedures to determine maximum λ , calibration curve construction, incorporation into liposomal systems containing 10% DMSO and calculation of the encapsulation efficiency of each molecule after these processes. In addition, the liposomes were lyophilized to allow sublimation of the solvent, which led to new encapsulation efficiency calculations being carried out in order to validate whether the molecules really were able to be solubilized in water. After encapsulation, it was noted that the substances managed to increase their solubility by 99%.

KEYWORDS: encapsulation; liposome; molecule.

INTRODUÇÃO

O encapsulamento é um processo que consiste em envolver uma determinada molécula à uma substância. “As primeiras tentativas para a obtenção de um sistema

¹ Discente voluntária do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Desenvolvimento Tecnológico. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: beatrizfogare@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 6745724734031052.

² Docente no curso de Química/Departamento de Química. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: marcellelf@gmail.com ID Lattes: 5387569141840513.

³ Docente no Curso de Engenharia química/Departamento Acadêmico de Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail:renatoviana@utfpr.edu.br. ID Lattes: 4407972768988975.



transportador eficaz tiveram como base os experimentos de encapsulamento das biomoléculas a transportar em vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos” (MACHADO *et al*, 2007).

A utilização de lipossomas como transportadores de substâncias químicas permite uma melhoria na solubilidade do fármaco garantindo a eficiência na administração do mesmo, assegura proteção da molécula através da formação de camadas protetoras em volta da substância preservando seu material até a chegada ao alvo. Além disso, o manuseio do lipossoma pode auxiliar na redução de efeitos colaterais presentes nos fármacos reduzindo sua interação com o organismo.

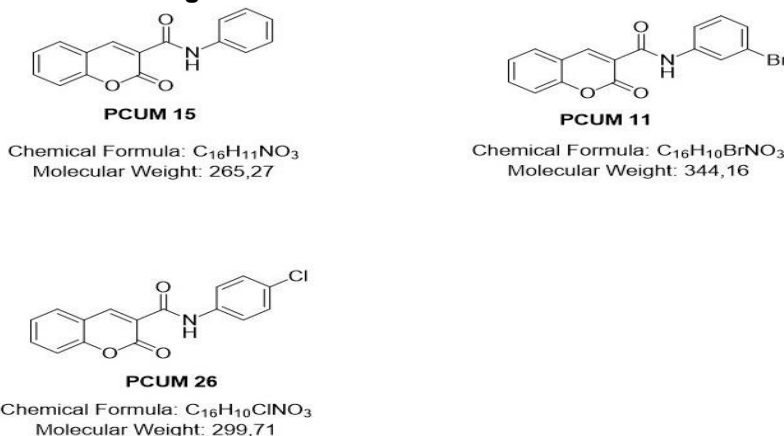
“Lipossomas são vesículas constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso e servem como carreadores de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico” (BATISTA *et al*, 2007).

É possível citar também que os lipossomas são “sistemas altamente versáteis, cujos tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos”(NUNES, *et al*, 2012). Dessa forma, é possível observar que os lipossomas são desenvolvidos para melhor atender às necessidades impostas.

Neste trabalho avaliou-se o processo de encapsulamento de moléculas desenvolvidas como antimicrobianas pelo laboratório da professora Marcelle de Lima Ferreira Bispo da Universidade Estadual de Londrina. Estas substâncias foram projetadas e sintetizadas para interagir com alvos moleculares em bactérias, entretanto, careciam de solubilidade em água, mesmo em soluções contendo DMSO até 5% (v/v).

Portanto, projetou-se encapsular essas substâncias em sistemas lipossomais para que elas pudessem ser avaliadas como sistemas do tipo nanoemulsão e entregues às células alvo. As moléculas podem ser observadas na Figura 1:

Figura 1 – Moléculas desenvolvidas



Fonte: Autoria da Professora Dr. Marcelle de Lima Ferreira Bispo

OBJETIVO

Objetivo geral:

1. Analisar a eficácia do encapsulamento de substâncias antimicrobianas em sistemas lipossomais visando sua entrega eficaz às células alvo.



Objetivos específicos:

1. Projetar sistemas lipossomais para o encapsulamento de moléculas bioativas.
2. Avaliar a solubilidade das moléculas encapsuladas tanto em sistemas lipossomais com Dimetilsufóxido quanto água.

MÉTODOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os métodos utilizados para a implementação dos sistemas lipossomais nas moléculas foram determinação de lambda máximo, curva de calibração, lipossoma (SPC:COL) e eficiência de encapsulamento.

Para a etapa da varredura, foram utilizadas as medidas expostas no Quadro 1, as amostras passaram pelo Uv-Vis contendo 50% H₂O/DMSO e o equipamento realizou uma leitura entre 295 à 800 nanômetros para registrar o lambda máximo. Para a análise, foram preparadas soluções stock de cada uma das moléculas com as seguintes pipetagens:

Quadro 1 – Soluções stock para a varredura

Molécula	Concentração Inicial (mmol/L)	Concentração Final (mmol/L)	Volume da solução (uL)	Volume de DMSO (uL)	Volume de Água (uL)
PCUM-15	20	100	20	1980	2000
PCUM-11	14	0,056	4	496	500
PCUM-26	17	0,1	6	494	500

Fonte: Da própria autora (2022)

No processo de determinação da curva de calibração, as leituras no Uv-Vis foram realizadas através de uma proporção 1:1 contendo H₂O/DMSO e as absorbâncias foram registradas a partir do lambda máximo de cada molécula. Inicialmente, foi preparado uma solução stock de cada molécula e por meio dela foram criadas amostras de diferentes concentrações dissolvidas em Dimetilsulfóxido e água. As soluções stock se encontram no Quadro 2:

Quadro 2 – Soluções stock para criação das amostras

Molécula	Concentração Inicial (mmol/L)	Volume da Solução (mL)	Volume de DMSO (mL)
PCUM-15	20	0,05	0,95
PCUM-11	14	0,071	0,929
PCUM-26	17	0,059	0,941

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Os lipossomas preparados possuíam uma concentração de 1 mmol/L, a sua composição consiste em 58 mg de SPC e 30 mg de Colesterol, em uma proporção de 7:3 SPC/COL, dissolvidos em 1 mL de Clorofórmio. O filme lipídico era formado através de um volume de 9 uL de SPC e 4 uL de Colesterol em uma estimativa de tempo de uma hora aproximadamente. Foram acrescentadas quantidades de solução stock de cada molécula trabalhada, contendo 10 % DMSO, o lipossoma formado passou pelo processo de sonicação por meia hora através de uma frequência de 30Hz, seguidamente, 100 uL da solução sonicada foi analisada no equipamento DLS juntamente com 900 mL de água para determinar o tamanho e o potencial zeta.

Após a análise do DLS, 400 uL do lipossoma foi submetido ao processo de centrifugação por uma hora, posteriormente, 200uL dessa amostra acrescida com 200 mL de DSMO foi analisada novamente no Uv-Vis para leitura da absorbância de cada molécula em seu comprimento de onda específico. Após essa análise, o cálculo da eficiência de encapsulamento foi realizado para o lipossoma 10% DMSO.



Após o cálculo, o lipossoma foi liofilizado, onde foi realizado o processo de sublimação do mesmo, ou seja, o material orgânico presente na solução foi evaporado. A amostra liofilizada passou pelo ultrassom por 10 minutos contendo um volume de 1 mL de água, posteriormente, a absorbância, tamanho e potencial zeta foram analisados nas mesmas medidas do lipossoma 10% DMSO.

Com isso, a eficiência de encapsulamento para o lipossoma suspenso em água foi calculada. As quantidades pipetadas para a formação do lipossoma foram as mesmas e montadas no Quadro 3:

Quadro 3 – Volume do lipossoma

Volume da solução stock (uL)	Volume de SPC (uL)	Volume de Colesterol (uL)	Volume de DMSO (uL)	Volume de água (uL)
50	9	4	50	900

Fonte: Elaborado pela autora (2022)

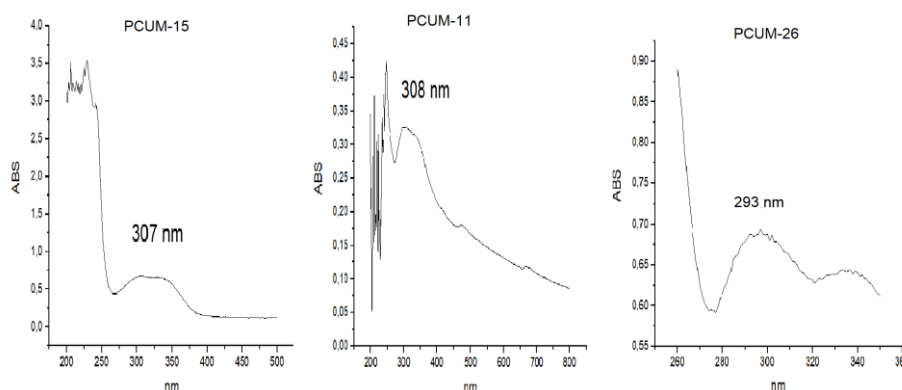
A eficiência de encapsulamento foi calculada através da equação da reta, construída por meio da curva de calibração e da leitura de absorbância de cada molécula após o lipossoma passar pelos processos de centrifugação. A eficiência de encapsulamento foi calculada para os dois momentos, antes e após a liofilização com a seguinte fórmula:

$$E = \frac{CI - CF}{CI}$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir da varredura realizada pelo Uv-Vis, o lambda máximo das moléculas PCUM-15, PCUM-11 e PCUM-26 foram de 307 nanômetros, 308 nanômetros e 293 nanômetros, respectivamente. A leitura pode ser visualizada na Figura 3:

Figura 3 – Varredura das moléculas



Fonte: Própria autora (2023)

Através do valor do lambda máximo encontrado, foi possível realizar a análise das amostras de cada molécula e determinar a absorbância em cada comprimento de onda específico. Os resultados se encontram na Figura 4:

Figura 4 – Resultado da leitura no Uv-Vis

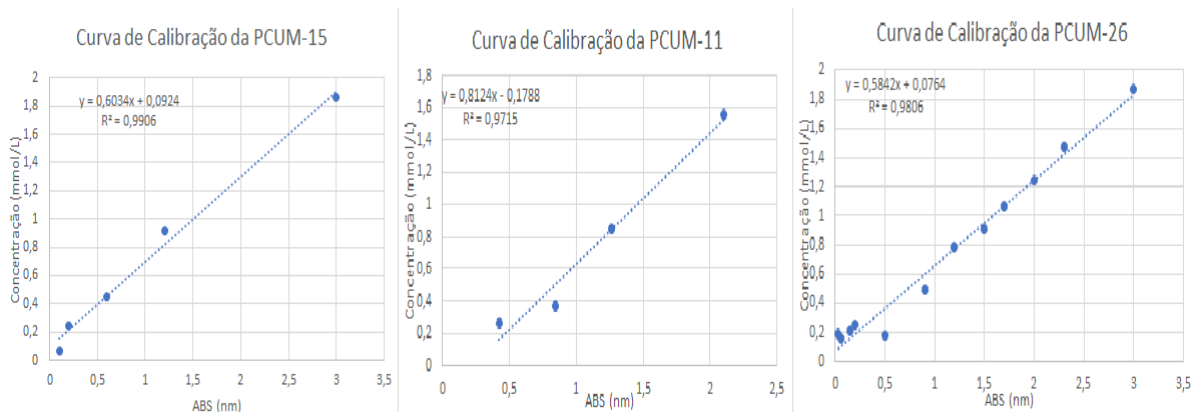


Molécula	Concentração (mmol/L)	ABS (nm)	Molécula	Concentração (mmol/L)	ABS (nm)
PCUM-15	0,1	0,064	PCUM-26	0,03	0,194
	0,2	0,244		0,06	0,161
	0,6	0,453		0,15	0,207
	1,2	0,913		0,2	0,255
	3	1,865		0,5	0,179
PCUM-11	0,42	0,264		0,9	0,492
	0,84	0,368		1,2	0,78
	1,26	0,845		1,5	0,909
	2,1	1,561		1,7	1,067
	-	-		2	1,24
-	-	2,3		1,471	
-	-	3	1,872		

Fonte: Própria autora (2023)

Com os resultados obtidos da leitura dos comprimentos de onda específico, o gráfico da Curva de Calibração de cada molécula foi construído, de modo a obter um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,95, o qual era considerado aceitável para o trabalho. Os gráficos podem ser observados na Figura 5:

Figura 5 – Curva de Calibração das moléculas



Fonte: Da própria autora (2023)

Com a construção da Curva de Calibração de cada molécula, a eficiência de encapsulamento para o lipossoma 10% DMSO foi calculada, a leitura no Uv-Vis após as amostras passarem pela centrifugação foi de 0,147 para PCUM-15, 0,365 da PCUM-11 e 0,462 da PCUM-26. A demonstração do cálculo pode ser visualizada na Figura 6:

Figura 6 – Cálculo da eficiência de encapsulamento da PCUM-15

Para PCUM-15:
 $y = 0,6034x + 0,0924$
 Substituindo o valor de 0,147 em y:
 $0,147 = 0,6034x + 0,0924$
 $x = 0,0905 \text{ } \mu\text{mol/L}$

A concentração inicial foi calculada da seguinte forma:
 $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$
 $C_i \cdot 200 = 0,0905 \cdot 400$
 $C_i = 0,181 \text{ } \mu\text{mol/L}$

Com isso, a eficiência de encapsulamento foi calculada da seguinte forma:
 $EE = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100\%$
 Substituindo os valores:
 $EE = \frac{1 - 0,00181}{1} \times 100\%$
 $EE = 99,98\%$

Fonte: Da própria autora.



Com isso, após a liofilização e retorno ao volume de 1 mL de água, os lipossomas passaram pelo processo de centrifugação e relidos no Uv-Vis, onde foi possível obter as absorvâncias de 0,519, 0,510 e 0,493, respectivamente. O mesmo cálculo foi realizado para as moléculas suspensas em água, com isso os valores finais se encontram no Quadro 4:

Quadro 4 – Resultados Finais

Molécula	Média do Tamanho (nm)	Média do Potencial Zeta (mV)	Eficiência de Encapsulamento	Média do Tamanho Final (nm)	Média do Potencial Zeta Final (mV)	Eficiência de Encapsulamento
PCUM-15	306,2	-20	99,98%	486	-29	99,86%
PCUM-11	326	-18	99,87%	425	-27	99,83%
PCUM-26	232	-30	99,87%	438	-28	99,86%

Fonte: Da própria autora.

CONCLUSÃO

Com todas as análises realizadas pelos equipamentos e cálculos desenvolvidos, todas as moléculas tiveram uma taxa de 99% de eficiência de encapsulamento em ambos os casos, apresentando apenas diferenças nos valores de comprimento de onda específicos, decorrentes da utilização do Dimetilsufóxido e água, sendo assim, o objetivo proposto pelo trabalho foi cumprido com sucesso.

Espera-se que mais trabalhos científicos envolvendo os lipossomas sejam utilizados futuramente, pois se trata de uma ótima ferramenta para profissionais que busquem direcionamento correto, segurança e redução de toxicidades em suas medicações.

Agradecimentos

A autora gostaria de agradecer ao Laboratório Multiusuário do Câmpus Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelas análises realizadas.

Agradece também à CNPq e a Fundação Araucária pela oportunidade de participar de um projeto de forma voluntária.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

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**, v. 43, p. 167-179, 2007.

MACHADO, L. C.; GNOATTO, S. A.; KLÜPPEL, M. L. W. LIPOSSOMAS APLICADOS EM FARMACOLOGIA: Uma revisão da literatura. **Estudos de Biologia**, v. 29, n. 67, 27 nov. 2007.

NUNES, Samanta; TAMURA, Bhertha. Avaliação físico-química e biológica da eficácia de uma água mineral lipossomada na pele. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 1, p. 17-21, 2012.