

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO DE MOURA SOMMER

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO
LIPOSSOMA/CARBOXIMETILCELULOSE DE SÓDIO**

**LONDRINA
2024**

FERNANDO DE MOURA SOMMER

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO
LIPOSSOMA/CARBOXIMETILCELULOSE DE SÓDIO**

**Development and characterization of the liposome/sodium
carboxymethylcellulose complex**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça
Coorientador: Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana

**LONDRINA
2024**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

FERNANDO DE MOURA SOMMER

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO
LIPOSSOMA/CARBOXIMETILCELULOSE DE SÓDIO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Materiais
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 27/05/2024

Prof. Dr. Luís Fernando Cabeça
Doutorado em Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Prof. Dra. Délia do Carmo Vieira
Doutorado em Ciência e Engenharia Materiais
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Prof. Dr. Francisco Rosário
Doutorado em Ciência e Engenharia dos Materiais
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

**LONDRINA
2024**

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Jesus Cristo e a Maria mãe Santíssima pela condição e saúde.

Agradeço ao laboratório Multiusuário pelos serviços prestados.

“Faça o que fizer, escolha algo pelo qual você seja apaixonado e onde sinta que pode causar um grande impacto. E não tenha medo de falhar.”

Robert Samuel Langer Jr.

RESUMO

O presente trabalho visa desenvolver um complexo lipossomal/carboximetilcelulose de sódio (CMC), para explorar as sinergias entre esses dois componentes para otimizar sistemas de entrega de fármacos. Lipossomas são vesículas esféricas constituídas primariamente por lipídios, que apresentam uma extremidade polar e outra apolar. Quando em contato com água, formam vesículas que encapsulam substâncias polares em seu núcleo aquoso e substâncias apolares entre as camadas lipídicas. A CMC, um polímero derivado da celulose, é notável por suas propriedades de retenção de água, sendo amplamente utilizada em aplicações médicas como curativos e também como colírio. A investigação avalia eficácia de encapsulamento e estabilidade do complexo lipossoma-CMC, utilizando métodos de caracterização quantitativos e qualitativos. Este estudo também examina as interações físico-químicas entre os lipossomas e a CMC, visando entender como essas interações afetam a liberação e a biodisponibilidade dos fármacos encapsulados. Através de técnicas de análise como Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Análise Termogravimétrica (TGA). Este trabalho busca estabelecer as bases para o desenvolvimento de sistemas de entrega que combinem eficácia terapêutica com alta estabilidade e precisão na liberação de tratamentos médicos.

Palavras-chave: Lipossomas. Carboximetilcelulose. Sistemas de entrega de fármacos. Estabilidade.

ABSTRACT

This study aims to develop a liposomal complex integrated with sodium carboxymethyl cellulose (CMC), exploring the synergies between these two components to optimize drug delivery systems. Liposomes are spherical vesicles primarily composed of lipids, featuring a polar and an apolar group. When in contact with water, they form vesicles that encapsulate polar substances in their aqueous core and apolar substances between the lipid layers. CMC, a polymer derived from cellulose, is notable for its water retention properties and is widely used in medical applications such as dressings and eye drops. The investigation focuses on assessing the encapsulation efficacy and stability of the liposome-CMC complex, using quantitative and qualitative characterization methods. This study also examines the physicochemical interactions between the liposomes and CMC, aiming to understand how these interactions affect the release and bioavailability of the encapsulated drugs. Through advanced analysis techniques such as Dynamic Light Scattering (DLS) and Thermogravimetric Analysis (TGA). This work seeks to establish the foundations for the development of delivery systems that combine therapeutic efficacy with high stability and precision in the release of medical treatments.

Keywords: Liposomes. Carboxymethylcellulose. Drug Delivery Systems. Stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Lipossomas | 18 |
| Figura 2 - Moléculas de lipídios empregadas em lipossomas: A) fosfatidilcolina, B) fosfatidilserinas e C) fosfatidilgliceróis..... | 18 |
| Figura 3 - Preparação de Lipossoma por hidratação de filme lipídico | 19 |
| Figura 4 - Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de entrega de medicamentos lipossomais. | 20 |
| Figura 5 - Molécula PEG (Polietilenoglicol) | 22 |
| Figura 6 - Molécula CMC (Carboximetilcelulose) | 23 |
| Figura 7 - Fluxograma: Metodologia da Pesquisa | 25 |
| Figura 8 - Sonicador | 28 |
| Figura 9 - DLS | 30 |
| Figura 10 - TGA..... | 31 |
| Gráfico 1 - Curva de Calibração CMC..... | 32 |
| Gráfico 2 - Curvas de TGA para diferentes formulações de lipossomas em porcentagem de peso inicial..... | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Tamanho das Partículas, Potencial Zeta e Eficiência de Encapsulamento | 33 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMC: Carboximetilcelulose

LUV: Large Unilamellar vesicles

MLV: Multilamellar Vesicles

PEG: Polietilenoglicol

SPC: Fosfatidilcolina de Soja

SUV: Small Unilamellar Vesicles

UTFPR: Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 OBJETIVOS | 15 |
| 1.1.1 OBJETIVO GERAL | 15 |
| 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA | 16 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 LIPOSSOMAS | 17 |
| 2.2 POLIETILENOGLICOSE (PEG) | 22 |
| 2.3 CARBOXIMETILCELULOSE (CMC) | 23 |
| 3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS | 25 |
| 3.1 METODOLOGIA | 25 |
| 3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS | 26 |
| 3.2.1 MATERIAL EM ESTUDO | 26 |
| 3.2.2 PREPARO DO LIPOSSOMA | 26 |
| 3.2.2.1 Dissolução dos Lipídios | 26 |
| 3.2.2.2 Formação do Filme lipídico | 27 |
| 3.2.2.3 Hidratação do Filme Lipídico | 27 |
| 3.2.3 SONICAÇÃO | 27 |
| 3.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO | 28 |
| 3.3.1 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR NA REGIÃO DO ULTRAVILOETA - VISÍVEL (UV-VIS) | 29 |
| 3.3.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) | 29 |
| 3.3.3 TERMOGRAVIMETRIA (TGA) | 31 |
| 4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO | 32 |
| 4.2 ESTABILIDADE TÉRMICA | 33 |

| | |
|--------------------------|-----------|
| 5 CONCLUSÃO | 35 |
| REFERÊNCIAS..... | 36 |

1 INTRODUÇÃO

No âmbito da engenharia biomédica e da ciência dos materiais, o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos tem apresentado uma área de intensa pesquisa e inovação. Entre os diversos materiais e métodos explorados, o encapsulamento de substâncias ativas por meio de lipossomas destaca-se por oferecer um equilíbrio promissor entre eficácia e biocompatibilidade. Neste contexto, a carboximetilcelulose (CMC), um polímero derivado da celulose com excelente solubilidade em água e propriedades de gelificação, surge como um candidato promissor para a encapsulação. Este trabalho visa explorar o potencial do encapsulamento de CMC por lipossomas, um enfoque que almeja combinar as propriedades únicas destes dois componentes para superar desafios na entrega direcionada de fármacos.

O interesse no uso de CMC em sistemas de entrega de medicamentos reside na sua natureza biocompatível, biodegradável e não tóxica, tornando-a adequada para aplicações biomédicas como o uso de colírios para olhos secos. Além disso, a capacidade da CMC de formar hidrogéis oferece a possibilidade de criar sistemas de liberação prolongada, que podem ser particularmente úteis em terapias que requerem administração de fármacos de maneira controlada e sustentada. Por outro lado, os lipossomas, vesículas formadas por camadas lipídicas, apresentam uma metodologia versátil para o encapsulamento tanto de compostos hidrofílicos quanto lipofílicos, além de permitirem a modificação superficial para direcionamento específico de células ou tecidos.

No entanto, a complexação efetiva de CMC em lipossomas enfrenta desafios técnicos e científicos significativos. Logo, a interação da CMC e lipossomas precisa ser meticulosamente compreendida e otimizada. Este estudo foca em identificar e superar esses obstáculos, empregando uma abordagem sistemática para a síntese e caracterização de sistemas de encapsulamento baseados em CMC e lipossomas. Serão explorados métodos de encapsulamento, condições de formulação e estratégias de caracterização, visando maximizar a eficiência de encapsulamento e a estabilidade do sistema.

Ao investigar o potencial de encapsulamento de carboximetilcelulose (CMC) em lipossomas, vislumbra-se a oportunidade de aprimorar o tratamento para olhos

secos e irritados. Fatores ambientais comuns como vento, exposição solar, uso de aquecimento ou ar-condicionado, e tempo prolongado diante de telas de computador são causas conhecidas para a síndrome do olho seco. Lubrificantes oculares são empregados para manter a umidade dos olhos, auxiliando na proteção contra lesões e infecções e na redução dos sintomas associados aos olhos secos. No entanto, esses lubrificantes exigem aplicações frequentes, a cada 30 minutos, o que pode ser um processo estressante e frequentemente abandonado pelos usuários.

Uma abordagem promissora para mitigar este problema é a utilização de sistemas de entrega de fármacos com liberação controlada, como os lipossomas encapsulando CMC. Tais sistemas permitem a liberação dirigida e prolongada do tratamento, o que pode aumentar significativamente a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos colaterais, contribuindo assim para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Entretanto, a CMC por se tratar de um polímero pode apresentar dificuldades de ser encapsuladas em vesículas lipossomais. Portanto, este estudo não apenas aborda um desafio técnico dentro da engenharia de materiais, mas também contribui para o campo da medicina. Através da compreensão aprofundada das interações entre CMC e lipossomas, e da otimização dos sistemas de encapsulamento, esta pesquisa visa fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de novas estratégias de entrega de fármacos. Com isso, espera-se que os resultados deste trabalho possam servir de base para futuras aplicações clínicas e avanços tecnológicos na área de sistemas de liberação de medicamentos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização do complexo Lipossoma/Carboximetilcelulose de sódio.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para obter êxito no objetivo principal são necessários procedimentos intermediários, conforme abaixo:

- Preparo dos lipossomas utilizando duas formulações distintas: a primeira consiste em fosfatidilcolina e colesterol na proporção de 7:3; a segunda formulação inclui fosfatidilcolina, colesterol e polietilenoglicol nas proporções de 6,5:3:0,5, respectivamente.
- Tentativa de formação do complexo lipossoma/Carboximetilcelulose de Sódio utilizando a técnica de sonicação.
- Caracterização do complexo (eficiência de encapsulação, potencial zeta, espalhamento de luz dinâmico, termogravimetria).

1.2 JUSTIFICATIVA

Esta monografia aborda a inovação nos sistemas de entrega de fármacos, focando no desenvolvimento do complexo lipossoma/carboximetilcelulose de sódio (CMC) para superar limitações em termos de liberação prolongada. .

Ao explorar a interação entre lipossomas e polímeros, este estudo visa contribuir para o avanço da medicina, promovendo terapias mais eficientes e personalizadas.

Os lipossomas são destacados por sua habilidade de encapsular uma ampla gama de compostos, e a adição de polímeros como a CMC pode aprimorar sua estabilidade e biodisponibilidade. Situando-se na fronteira da nanotecnologia farmacêutica, o projeto visa impulsionar a criação de soluções terapêuticas mais seguras.

O Laboratório de Biomateriais e Biomoléculas Orgânicas na UTFPR - *Londrina* apresenta conhecimento em sistemas de liberação de ativos utilizando lipossomas como carreador.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os sistemas de liberação controlada de fármacos têm sido objeto de intensa pesquisa global devido às suas vantagens significativas sobre os métodos convencionais de administração de medicamentos em forma livre (KONING et al., 2002; SERCOMBE ET AL., 2015). Entre esses sistemas, os lipossomas se destacam particularmente no transporte e liberação de drogas de baixa massa molecular, como anestésicos locais.

Ativos encapsulados em lipossomas demonstram uma resposta farmacológica superior em comparação com suas formas ativas livres. Esta encapsulação não só melhora a biodisponibilidade do fármaco, mas também amplia sua eficácia terapêutica ao aumentar a taxa de permeabilidade. Além disso, os lipossomas ajudam a reduzir a toxicidade sistêmica, limitando os efeitos secundários tóxicos e aumentando a segurança do paciente (ALLEM et al., 2013; GUBERNATOR, 2011).

Desta forma, os lipossomas são reconhecidos por sua capacidade eficaz como transportadores e liberadores de moléculas com atividade terapêutica. Eles oferecem uma estabilidade notável para o complexo fármaco-lipossoma, aprimoram a liberação controlada do medicamento e promovem uma maior eficiência na terapia aplicada. Esta tecnologia representa um avanço considerável na farmacologia, facilitando tratamentos mais eficientes e menos invasivos.

2.1 LIPOSSOMAS

Lipossomas são vesículas formadas por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas, que encapsulam um núcleo aquoso. Eles são amplamente utilizados na entrega de medicamentos devido à sua capacidade de encapsular substâncias tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, oferecendo uma proteção eficaz contra a degradação externa e aumentando a biodisponibilidade dos fármacos (NUNES et al., 2018; MUTHUA et al., 2012).

Os lipídeos que formam os lipossomas, tais como fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas e fosfatidilgliceróis, são insolúveis em água. Essa insolubilidade faz com que, ao serem introduzidos em meio aquoso, os lipídeos se organizem de maneira a evitar interações desfavoráveis com a água. Eles formam uma bicamada lipídica com uma região hidrofóbica interna. Essa estrutura é crucial para a

Os lipossomas são categorizados conforme o tamanho e a quantidade de camadas lipídicas. Segundo Torchilin (2005), eles podem ser classificados em vesículas unilamelares pequenas (SUV), com tamanho de 20 a 50 nm; vesículas unilamelares grandes (LUV), com 200 a 1000 nm; e vesículas multilamelares grandes (MLV), que possuem várias bicamadas, com diâmetro de 400 a 3500 nm.

O método mais comum de preparação de lipossomas é a hidratação de filme lipídico, no qual os lipídios dissolvidos em solvente orgânico são evaporados para formar um filme. Este filme é hidratado com solução aquosa, sob agitação, formando lipossomas multilamelares ou unilamelares, dependendo do tratamento subsequente, como sonicação ou extrusão através de membranas de polycarbonato (SANTOS; CASTANHO, 2002).

A **Figura 3** ilustra a Preparação de Lipossoma por hidratação de filme lipídico.



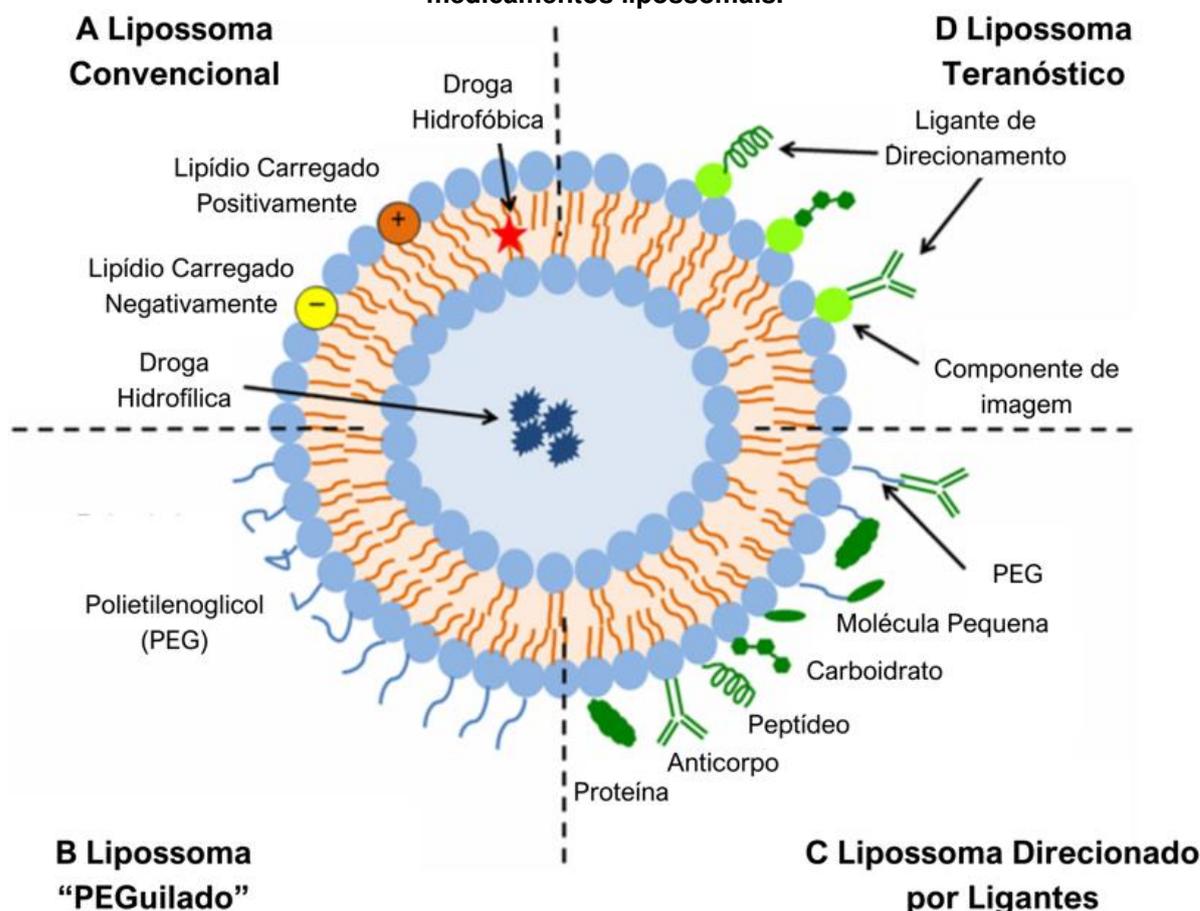
Fonte: Adaptado de Souza, (2007).

Um avanço significativo na tecnologia de lipossomas é o desenvolvimento de lipossomas "furtivos", modificados com polímeros como o polietilenoglicol (PEG). Esses lipossomas são projetados para evadir o sistema imunológico, prolongando sua circulação sanguínea e melhorando a entrega de fármacos. O PEG na superfície dos lipossomas cria uma camada de hidratação que impede a adesão de proteínas plasmáticas, crucial para evitar a captura pelo sistema mononuclear fagocitário (BATISTA et al., 2007; KLÜPPEL et al., 2007).

Esses sistemas representam uma chave importante na nanoengenharia para a entrega de fármacos, com aplicações que variam desde o tratamento de câncer até a administração de vacinas, prometendo avanços significativos na medicina personalizada (MODULEVSKY et al., 2014).

A **Figura 4** demonstra uma representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de entrega de medicamentos lipossomais.

Figura 4 – Representação esquemática dos diferentes tipos de sistemas de entrega de medicamentos lipossomais.



Fonte: Adaptado de Sercombe et al. (2015) pg.2.

- (A) Lipossoma Convencional

Lipossomos convencionais consistem em uma bicamada lipídica que pode ser composta de lipídios catiônicos, aniônicos ou neutros (fosfolipídios) e colesterol, que envolve um núcleo aquoso. Tanto a bicamada lipídica quanto o espaço aquoso podem incorporar compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, respectivamente (SERCOMBE et al., 2015).

- (B) Lipossoma Peguilado

As características e o comportamento dos lipossomas in vivo podem ser modificados pela adição de um revestimento polimérico hidrofílico, polietilenoglicol (PEG), à superfície do lipossomo para conferir estabilização estérica (SERCOMBE et al., 2015). Também são conhecidos como lipossomas furtivos.

- (C) Lipossoma Direcionado por Ligantes

Lipossomas podem ser utilizados para direcionamento específico ao acoplar ligantes (por exemplo, anticorpos, peptídeos e carboidratos) à sua superfície ou à extremidade terminal das cadeias de PEG acopladas (SERCOMBE et al., 2015).

- (D) Lipossoma Teranóstico

Um único sistema consiste em uma nanopartícula, um elemento de direcionamento, um componente de imagem e um componente terapêutico (SERCOMBE et al., 2015).

O desenvolvimento de lipossomas furtivos é um exemplo de como a inovação continua a abrir novos caminhos para aplicações clínicas. Estas vesículas são especialmente úteis em terapias direcionadas, onde a precisão na entrega de fármacos pode significar um aumento significativo na taxa de sucesso dos tratamentos para doenças complexas como o câncer. Além disso, a capacidade dos lipossomas de encapsular múltiplos fármacos simultaneamente oferece oportunidades para terapias combinadas, sendo que diferentes agentes podem ser entregues juntos para alcançar efeitos sinérgicos (BATISTA et al., 2007; KLÜPPEL et al., 2007).

Essa capacidade de personalização dos lipossomas permite que sejam ajustados para atingir especificamente tecidos ou células, minimizando os efeitos colaterais e maximizando a eficácia terapêutica. Além disso, a flexibilidade na manipulação de seu tamanho e composição permite que os lipossomas sejam adaptados para diversas aplicações farmacológicas e biológicas. (SERCOMBE et al., 2015).

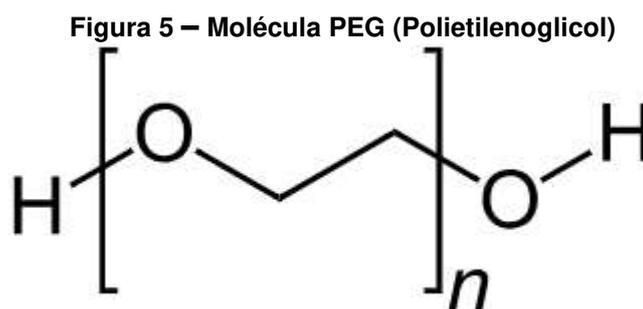
Ainda assim, apesar dos avanços, o uso de lipossomas enfrenta desafios significativos, especialmente relacionados à estabilidade e à liberação controlada de fármacos. Na corrente sanguínea, por exemplo, lipossomas não modificados são rapidamente eliminados pelo sistema fagocitário mononuclear, limitando sua eficácia. A introdução de moléculas de PEG e outros polímeros hidrofílicos têm sido uma estratégia eficaz para combater esse problema, pois essas modificações ajudam a estender a circulação dos lipossomas e reduzir sua captação por células do sistema imune (LOPES; OLIVEIRA, 2000; SANTOS; CASTANHO, 2002).

2.2 POLIETILENOGLICOSE (PEG)

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero sintético solúvel em água, biologicamente inerte e amplamente utilizado em carreadores farmacológicos devido à sua biocompatibilidade e inércia biológica. O termo peguilação é usado para descrever o processo que envolve a adição de cadeias de PEG à superfície dos lipossomas, é empregada para criar uma barreira estérica e hidratada ao redor destas vesículas. Este revestimento protege os lipossomas contra proteínas plasmáticas, opsonização e captura pelo sistema mononuclear fagocitário, prolongando sua circulação sanguínea e melhorando a biodisponibilidade dos fármacos encapsulados (ANCHIÊTA-JÚNIOR et al., 2014; LOPES; OLIVEIRA, 2000).

Este método estratégico de modificação superfície dos lipossomas por PEG e outros polímeros formam uma camada protetiva nos lipossomas e permite que eles evadam o sistema imunológico, favorecendo a acumulação em tecidos alvo como tumores, através do efeito de permeabilidade e retenção (EPR). Tal característica é crucial para tratamentos direcionados e terapias de liberação controlada (SERCOMBE et al., 2015).

Na **Figura 5**, há a ilustração de uma Molécula de PEG.



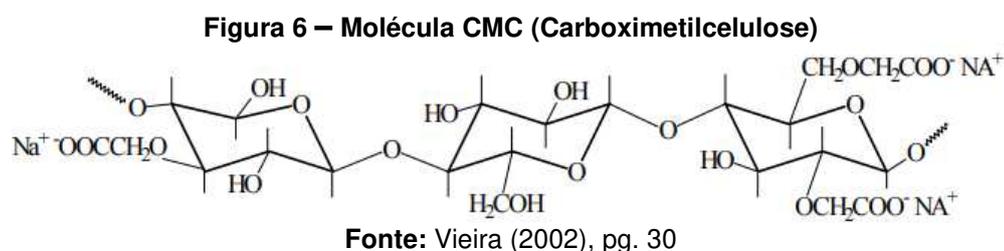
Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_glycol

Apesar das vantagens, o seu uso apresenta desafios, como a possibilidade de desenvolvimento de uma resposta imunológica contra o PEG ("Anti-PEG IgM") após múltiplas administrações, o que pode reduzir a eficácia de tratamentos subsequentes. Essa problemática destaca a importância de pesquisas contínuas para encontrar alternativas ao PEG ou novas estratégias que minimizem esses efeitos adversos (KLÜPPEL et al., 2007).

2.3 CARBOXIMETILCELULOSE (CMC)

A Carboximetilcelulose (CMC) é um derivado solúvel em água da celulose, o polímero mais abundante na natureza, encontrado tanto em plantas como sintetizado por certas bactérias, como *Acetobacter xylinum*. A CMC se diferencia da celulose natural por ser produzida através de uma reação de esterificação que substitui os grupos hidroxila da glicose por grupos carboximetil, conferindo-lhe propriedades de alta viscosidade, solubilidade em água e biocompatibilidade, além da habilidade de formar hidrogéis de alta consistência (DONINI et al., 2010).

Na **Figura 6**, há a ilustração de uma Molécula de CMC.



Devido à sua compatibilidade biológica e capacidade de reter água, a CMC é amplamente empregada como espessante, estabilizante e emulsificante em várias formulações médicas e farmacêuticas, tais como hidrogéis para curativos e colírios para tratamento de olhos secos (CARVALHO et al., 2019). Além disso, a CMC é utilizada na criação de hidrogéis polieletrólitos sensíveis ao pH, ideais para a liberação controlada de medicamentos em diversos ambientes gastrointestinais. CMC também é usada como colírios para tratamento em olhos secos. As causas comuns de olhos secos incluem vento, sol, aquecimento/ar-condicionado, leituras excessivas no computador. Os lubrificantes oculares mantêm os olhos úmidos, ajudam a protegê-los de lesões e infecções e diminuem os sintomas de olhos secos. Entretanto, o uso do lubrificante ocular deve ocorrer de 30 em 30 min. Esse processo muitas vezes é estressante para o usuário e muitas vezes descontinuado. Uma das soluções para esse problema é tornar a entrega do CMC prolongada através do uso de sistema de “*drug delivery*” (liberação controlada). A capacidade de entregar terapias de forma direcionada e controlada pode significativamente aumentar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos colaterais, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (VICENTE, 2020).

Assim, a integração da CMC em sistemas lipossomais é uma estratégia promissora para melhorar e controlar a liberação de CMC. A adição de CMC aos lipossomas pode proporcionando uma liberação mais controlada e prolongada dos agentes terapêuticos encapsulados (NUNES et al., 2011).

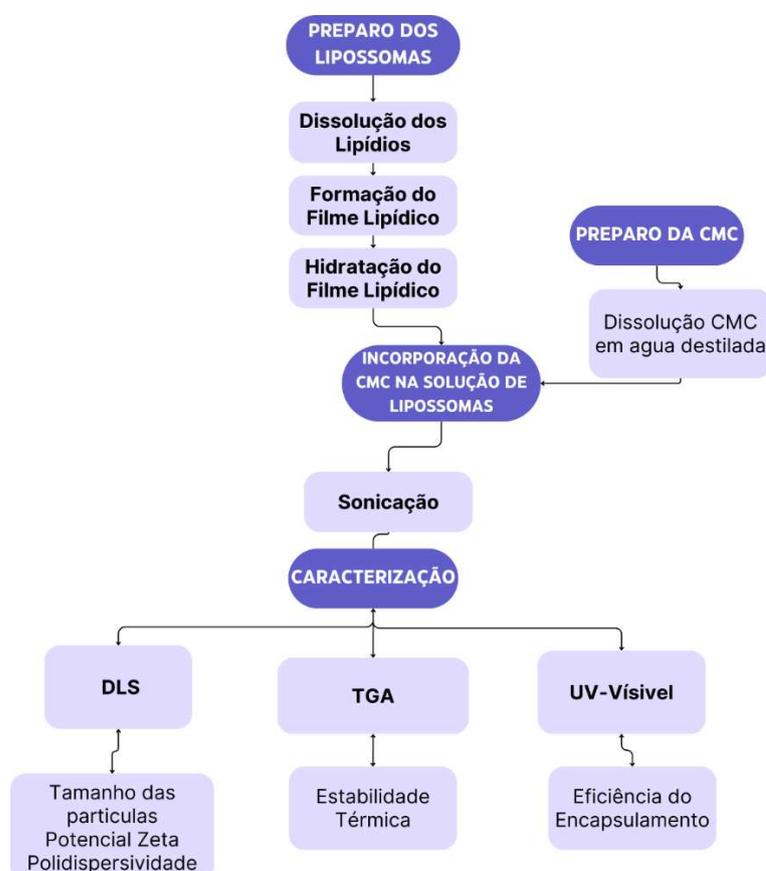
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 METODOLOGIA

Os lipossomas foram preparados por métodos como a hidratação de filme lipídico, seguida de sonicação, para assegurar a uniformidade no tamanho das vesículas. As propriedades físico-químicas das formulações foram caracterizadas utilizando-se Análise Termogravimétrica (TGA) para avaliar a estabilidade térmica, e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) para determinar o tamanho das partículas, a distribuição e o potencial zeta, como indicador de cargas e estabilidade coloidal. Além disso, a eficiência de encapsulamento do CMC pelos lipossomas foi verificada através da Espectroscopia molecular na região do UV-Visível (UV-Vis).

A **Figura 7** apresenta o fluxograma da metodologia da pesquisa.

Figura 7 – Fluxograma: Metodologia da Pesquisa



Fonte: Autor (2024).

3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1 MATERIAL EM ESTUDO

As amostras de fosfatidilcolina de soja (SPC) com pureza superior a 95% e 770g/mol, colesterol com pureza superior a 95% e 386,65g/mol e polietilenoglicol DSPE-PEG-2000 de 1800g/mol foram adquiridos da Avast lipids. Enquanto as amostras de carboximetilcelulose (CMC) de pureza mínima 99% 242N g/mol , foram adquiridas da Êxodo Científica.

3.2.2 PREPARO DO LIPOSSOMA

Formação de filme lipídico e hidratação: Este método é comumente utilizado na literatura para preparar lipossomas devido à sua eficácia em formar vesículas estáveis.

A técnica é apoiada por estudos como o de Haeri et al. (2013), que discutem como a formação de filme e subsequente hidratação permite uma encapsulação eficaz e uniforme dos fármacos. Este método ajuda a garantir que os lipossomas sejam formados com características controladas, como tamanho e lamelaridade, que são cruciais para suas propriedades de liberação e estabilidade, o esquema dessa técnica está demonstrada na **Figura 3**.

O método utilizado para a preparação do lipossoma foi repetido três vezes por lipossoma e envolve as seguintes etapas:

3.2.2.1 Dissolução dos Lipídios

Lipídios e colesterol, nas proporções desejadas, são dissolvidos em um solvente orgânico volátil, como clorofórmio, metanol ou uma mistura dos dois. Esta solução lipídica contém os componentes que formarão a bicamada lipídica dos lipossomas (HAERI et al., 2013).

Assim, neste estudo, foram feitos dois tipos de formulação para formação do lipossoma (10mL):

- **Formulação (A):** Composta por fosfatidilcolina de soja (SPC) e colesterol, em uma proporção de 70% de SPC e 30% de colesterol. Esta proporção indica

que, para cada 10 partes da mistura, 7 partes são de SPC e 3 partes de colesterol.

- **Formulação (B):** Consiste em fosfatidilcolina de soja (SPC), colesterol e polietilenoglicol (PEG), nas proporções de 65%, 30% e 5%, respectivamente. Isso significa que, em cada 100 partes da mistura, 65 partes são de SPC, 30 partes de colesterol e 5 partes de PEG.

3.2.2.2 Formação do Filme lipídico

A mistura lipídica em solvente clorofórmio (1mL) é transferida para um balão de fundo redondo e o solvente é evaporado sob vácuo, utilizando um evaporador rotativo. A evaporação do solvente deixa um filme fino e uniforme de lipídios secos aderido às paredes do frasco. Este filme representa a matéria-prima para as bicamadas lipídicas dos lipossomas (HAERI et al., 2013).

O filme lipídico foi feito a partir das soluções estoques a base de clorofórmio como solvente.

3.2.2.3 Hidratação do Filme Lipídico

Após a formação do filme lipídico, o filme é hidratado com uma solução aquosa, que pode conter o composto ativo a ser encapsulado. A hidratação é tipicamente realizada sob agitação suave e a uma temperatura acima da temperatura de transição de fase dos lipídios, para facilitar a formação das vesículas lipossomal. Durante este processo são formando vesículas multilamelares (MLVs) - lipossomas com múltiplas camadas concêntricas (HAERI et al., 2013).

No presente estudo a solução hidratante (1 mL) era composta por 10 mg/mL de CMC. A mistura foi agitada até resuspender todo o filme lipídico, posteriormente o lipossoma é levado para o sonicador ultrassônico a fim de formar o complexo lipossoma/CMC.

3.2.3 SONICAÇÃO

O Sonicador utilizado foi um Qsonica Q500 de 20kHz. As ondas de ultrassom de alta frequência, são fundamentais na preparação de lipossomas para alcançar vesículas de tamanho uniforme e aumentar a eficiência de encapsulamento de fármacos. Este equipamento aplica energia mecânica às suspensões lipídicas, reduzindo o tamanho das vesículas por cisalhamento.

A **Figura 8** ilustra o sonicador usado na pesquisa.

Figura 8 – Sonicador



Fonte: Autor (2024).

Tal processo, conhecido como sonicação, favorece a formação de vesículas unilamelares pequenas (SUVs), essenciais para aplicações que exigem liberação controlada e direcionada de fármacos. A sonicação também homogeneiza a mistura, garantindo distribuição uniforme do fármaco nos lipossomas. A solução lipossomas/CMC foi levada a sonicação com 100% de amplitude com 1 min de funcionamento e 1 min de descanso em banho de gelo pelo tempo de 20 min.

(THOMPSON et al., 2017; WANG et al., 2018).

3.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

3.3.1 ESPECTROSCOPIA MOLECULAR NA REGIÃO DO ULTRAVILOETA - VISÍVEL (UV-VIS)

A eficiência de encapsulação (EE) do CMC em lipossomas foi determinada utilizando a técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação (Millipore, USA, ME Cut-off 10,000Da). Uma quantidade de 400 µL da amostra foi colocada no filtro e levada para ultracentrifugação (13000 rpm). A quantidade de CMC que passou através do filtro foi quantificada utilizando espectrofotometria de UV com comprimento de onda de 270 nm. O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 1:

$$\% CMC_{encapsulado} = \frac{(C_i - C_x)}{C_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

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

Para obter a quantidade de CMC encapsulado na vesícula lipossomal foi realizada uma curva de calibração do CMC utilizando diferentes concentrações (Espectrofotômetro UV/Vis – Modelo: Libra Biochromem).

3.3.2 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

Dynamic Light Scattering (DLS) é uma técnica crucial para determinar o tamanho médio e a distribuição do tamanho de partículas dispersas. Esta técnica mede a dispersão de luz causada pelo movimento browniano das partículas, permitindo calcular seu diâmetro hidrodinâmico (Muthua et al. 2012).

A distribuição de tamanho dos lipossomas presentes nas amostras foi medida a partir alíquotas de 600 µL de concentrações 1 mM em um aparelho LITESIZER 500 – Anton Paar no Laboratório multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Londrina (UTFP-LD). A **Figura 9** mostra o equipamento utilizado na pesquisa.

Figura 9 – DLS

Fonte: Autor(2024).

O estudo do potencial zeta foi realizado diluindo a amostra em solução tampão, foi utilizada a célula de medida Omega cuvette Mat.No. 225288 com o fator de Henry de 1,5 na equação de Smoluchowski. Foram realizadas análises do potencial zeta e do índice de polidispersividade das amostras (1 mM). Para o teste de potencial zeta, as amostras foram diluídas e testadas em triplicata.

Além do tamanho das partículas, o potencial zeta, medido pelo DLS, é essencial para avaliar a carga superficial e a estabilidade coloidal dos lipossomas. Este procedimento envolve submeter as partículas a um campo elétrico, medindo a mobilidade eletroforética das partículas, que é então convertida em potencial zeta. A análise do potencial zeta, corroborada por Zhang et al. (2015), fornece insights sobre a interação dos lipossomas com células e biomoléculas, sendo um indicador chave da estabilidade coloidal. Este aspecto é amplamente utilizado na literatura para prever o comportamento dos lipossomas em ambientes biológicos, conforme discutido por Carvalho et al. (2019).

As análises de DLS são realizadas em condições controladas de temperatura para garantir a precisão dos dados, como indicado por Kumar et al. (2014), o que assegura a qualidade e funcionalidade dos lipossomas como sistemas de entrega eficazes.

3.3.3 TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

A Análise Termogravimétrica (TGA) é um método analítico essencial que mede a mudança na massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo sob condições controladas de atmosfera.

O Analisador termogravimétrico (TGA) marca Shimadzu , até 1.500°C, pode ser visto na **Figura 10**.

Figura 10 – TGA



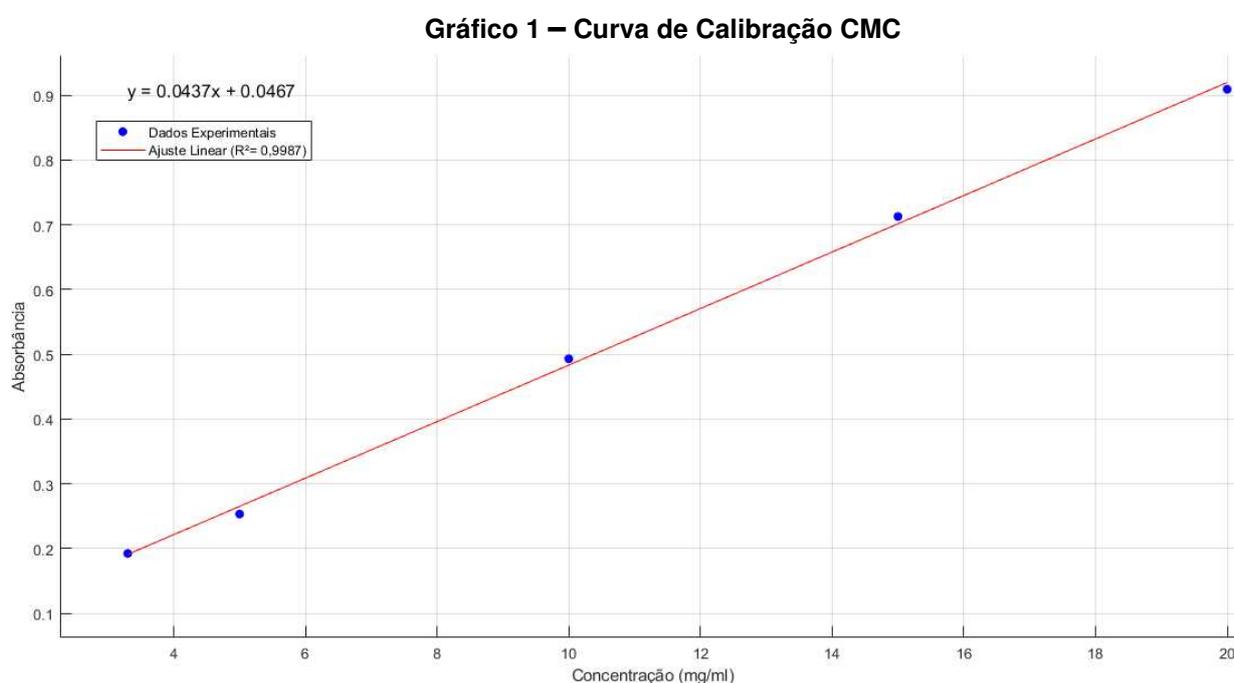
Fonte: Autor(2024).

As amostras de CMC, lipossomas e CMC/lipossomas foram sonicadas e liofilizadas, em seguida acomodadas no analisador térmico Shimadzu TGA- 51H e submetidas a temperatura crescente e controlada de 25°C até atingir 600°C em atmosfera inerte. A taxa de fluxo utilizado foi de 50ml/min de nitrogênio. As amostras tinham massa média de 10mg, colocadas em cadinhos de platina e submetidas a taxa de aquecimento de 10°C/min.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Para obter a quantidade de fármaco encapsulado na vesícula lipossomal foi realizada uma curva de calibração do CMC utilizando diferentes concentrações, apresentada pelo **Gráfico 1**.



Fonte: Autor(2024).

Com esses dados, foi encontrado que a relação entre Absorbância do CMC e suas respectivas concentrações respeitam a seguinte equação ($R^2 = 0,9987$):

$$A = 0,0437x + 0,0467 \text{ (eq.2)}$$

A primeira tentativa de cálculo da porcentagem de encapsulação da CMC em lipossomas foi determinada através da análise por espectroscopia UV-Vis em 270nm após ultracentrifugação do lipossoma. Após a centrifugação, foi observado que não houve encapsulamento. A primeira hipótese pode ser devido a relação de tamanho das partículas do CMC e dos lipossomas.

Experimentos de tamanho de partículas e potencial zeta foram determinados utilizando análise de DLS. A **Tabela 1** mostra os resultados do DLS:

Tabela 1 – Tamanho das Partículas, Potencial Zeta e Índice de Polispersividade

| Amostra | Diâmetro médio das partículas (nm) | Potencial Zeta (mV) | Índice de Polidispersividade |
|----------------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| SPC e Colesterol | 280 | -15 | 28% |
| SPC, Colesterol e PEG | 98 | -32 | 21% |
| SPC, Colesterol e CMC | 600 | -12 | 35% |
| SPC, Colesterol, PEG e CMC | 340 | -23 | 29% |
| CMC | 1300 | -35 | - |

Fonte: Autor(2024).

A **tabela 1** revela aspectos críticos sobre as formulações de lipossomas, especialmente em relação à falha no encapsulamento de CMC. As medidas de tamanho de partículas, potencial zeta e índice de polidispersividade (PDI) indicam variações significativas. As formulações compostas apenas por SPC e colesterol apresentaram tamanho de partícula de 280 nm e na presença do CMC de 340 nm. O mesmo comportamento foi observado para lipossomas peguados com tamanho de 98 nm para 340 na presença de CMC. Os índices de Polidispersividade apresentaram valores dentro dos padrões de solução homogênea (valores menores que 30%). (Muthua et al., 2012 e (Sercombe et al., 2015).

As formulações que incluem CMC mostraram um tamanho de partícula de 1300 nm. Esse alto valor no tamanho das partículas dificultam o encapsulamento nas vesículas lipossomais. Talvez outras condições de preparo dos lipossomas, como temperatura da solução durante a sonicação e pH possam ter afetado o encapsulamento da CMC.

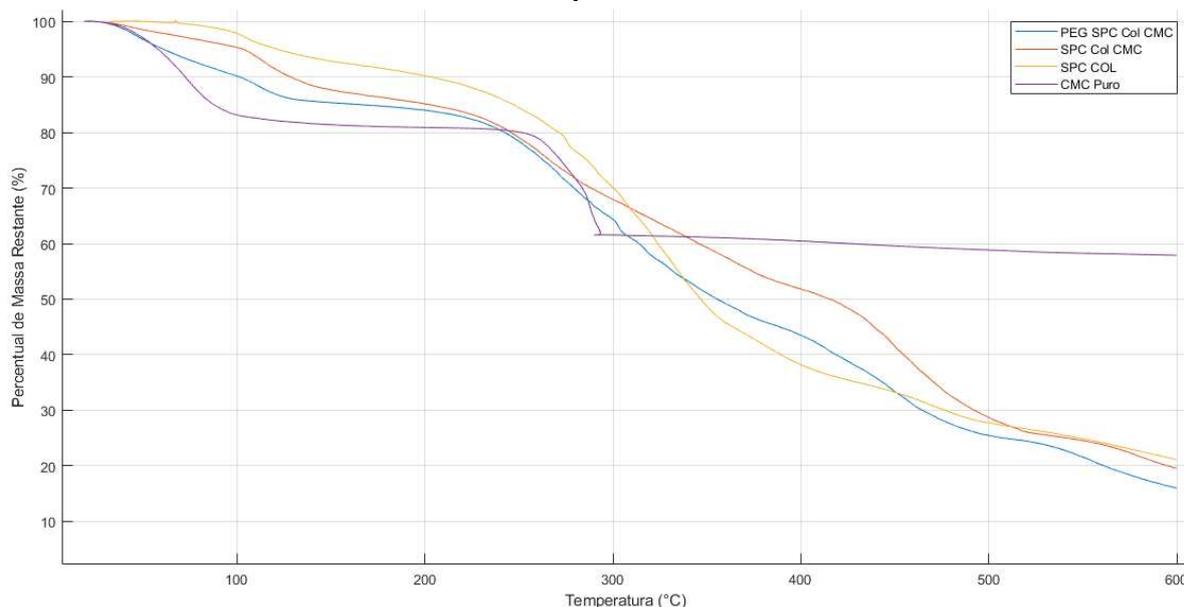
4.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

Para exemplificar o não encapsulamento do CMC nas vesículas lipossomias testes de TGA foram realizados.

Houve um erro em relação a amostra de SPC, PEG e Col, e, portanto, essa curva não está presente nessa seção.

O TGA foi realizado a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e temperatura inicial de 25°C e final de 600°C. O **Gráfico 2** mostra os resultados do TGA:

Gráfico 2 – Curvas de TGA para diferentes formulações de lipossomas em porcentagem de peso inicial



Fonte: Autor(2024).

A análise dos dados de Termogravimetria (TGA) para diversas formulações de lipossomas mostra que todas começam com quase 100% de massa restante em temperaturas abaixo de 50°C, indicando mínima degradação inicial. Conforme as temperaturas aumentam (até 600 C°), todas as amostras apresentam redução progressiva na massa, com variações notáveis entre as formulações. Observa-se que a amostra de CMC pura ainda apresentou uma massa restante de quase 60%. As amostras com lipossomas perderam praticamente toda a massa, restando somente 20% após a queima. A não presença de massa de CMC nas amostras com lipossomas corrobora com todos os outros experimentos e indicam a não encapsulação da CMC nas vesículas lipossomais.

5 CONCLUSÃO

Os lipossomas são fundamentais na ciência dos biomateriais e na engenharia biomédica, destacando-se pela capacidade de encapsular uma ampla gama de substâncias terapêuticas e pela adaptabilidade para modificações que aumentam sua funcionalidade e eficácia.

Este estudo teve como objetivo principal desenvolver e comparar diferentes formulações de lipossomas, explorando o potencial do encapsulamento de Carboximetilcelulose (CMC) para aprimorar sistemas de entrega de fármacos. As técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Análise Termogravimétrica (TGA) foram essenciais para demonstrar a interação entre lipossomas e CMC, sugerindo que a incorporação do polímero modifica as propriedades físico-químicas dos lipossomas, como estabilidade e tamanho de partículas. Esta interação indica uma via promissora para futuras investigações na otimização de formulações lipossomais.

A falta de encapsulamento efetivo observada ressalta a necessidade de revisão nas estratégias de formulação, onde a composição lipídica e as condições de preparação desempenham papéis cruciais. Este estudo destaca a necessidade de pesquisa contínua para desenvolver tecnologias de entrega que sejam seguras, eficazes e personalizadas para o tratamento de diversas doenças, potencializando assim a transformação significativa na prática médica.

REFERÊNCIAS

CABEÇA, L.F. **Topologia de complexos entre fármacos/ β ciclodextrinas/lipossomas/células, aplicando técnicas de ressonância magnética nuclear.** 2009. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Departamento de Orgânica. Universidade de Campinas – Unicamp – Campinas-SP, 2009.

CARVALHO, T. et al. **Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Materials for Wound Healing, Delivery Systems, and Tissue Engineering.** *Biotechnology Journal*, v. 14, n. 12, 2019.

DONINI, I., et al. **Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose.** *Eclét. Quím.* 2010, 35, 165-178.

GALLO, A. **Estudo da Interação de Lipossomas Furtivos com Anestésico Local Ropivacaína.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.

GUBERNATOR, K. **Liposomes in drug delivery: a review.** *Journal of Controlled Release*, v. 154, n. 1, p. 18-24, 2011.

HAERI, A.; SADEGHIAN, S.; RABBANI, S.; ANVARI, M. S.; LAVASANIFAR, A.; AMINI, M.; SIMIN, D. **Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: A comparison of phospholipid micelles and liposomes.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 455, p. 320-330, 2013.

KUMAR, V.; et al. **Application of dynamic light scattering in nanoparticle research.** *Nanotechnology Science and Applications*, v. 7, p. 123-134, 2014.

LEE, J. H.; et al. **Thermogravimetric analysis of nanomaterials: Fundamentals and applications.** *Composites Part B: Engineering*, v. 98, p. 120-128, 2016.

MODULEVSKY, Daniel J., et al. **Apple derived cellulose scaffolds for 3D mammalian cell culture.** *PloS one* 9.5 (2014): e97835.

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

NUNES, P. S., et al. **Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, art. 761593.

SERCOMBE, L., et al. **Advances and challenges of liposome assisted drug delivery.** *Frontiers in pharmacology* 6 (2015): 286.

SMITH, T.; et al. **Methods for quantifying the encapsulation efficiency of drugs in liposomes.** Journal of Controlled Release, v. 256, p. 249-259, 2017.

SOUSA, I. C. S C. **Interação da Enrofloxacin com modelos biomembranares: Influência das suas propriedades físico-químicas.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Cidade do Porto, Portugal. 2007

THOMPSON, D. P.; et al. **Enhancing drug encapsulation in liposomes through sonication techniques: Applications in contemporary pharmaceutical compounding.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 105, p. 75-84, 2017.

TISCHER, P.C.S.F.; VIANA, R.M.R.; TISCHER, C.A. **Bio-based nanocomposites: strategies for cellulose functionalization and tissue affinity studies.** In: GRUMEZESCU, Valentina.; GRUMEZESCU, M, Alexandru. Materials for Biomedical Engineering: Biopolymer Fibers. Elsevier,2019. p. 205-244.

VASCONCELLOS, P. et al. **Influence of laser therapy on the dynamic formation of extracellular matrix in standard second-degree burns treated with bacterial cellulose membrane.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 182 (2018): 1-8.

VICENTE, D. A. A. **Preparação de insertos oculares para libertação controlada de substâncias bioativas.** Tese (Mestrado) Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 2020.

VIEIRA, D. C. **Fabricação de elementos vítreos porosos para o depósito de polímeros visando a obtenção de membranas com superfícies ativas.** Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

WANG, Y.; et al. **Optimization of liposome formulation for drug delivery: An update on recent developments.** Drug Delivery, v. 25, n. 1, p. 569-582, 2018.

ZHANG, X.; et al. **Stability and bioactivity analysis of liposomal drug delivery systems: Potentials and challenges.** Pharmaceutics, v. 7, n. 4, p. 46-59, 2015.