

INFLUÊNCIA DE ULTRASONICAÇÃO NO DIÂMETRO MÉDIO DE VESÍCULAS LIPOSSOMAIS¹

THE ULTRASONICATION INFLUENCE ON THE AVERAGE DIAMETER OF LIPOSOMAL VESICLES

Mauber Eduardo Schultz Moreira², Claudio Germano Herbst Junior³, Paola de Azevedo Mello³, Aline Ferreira Ourique⁴ e Sergio Roberto Mortari⁵

RESUMO

Vesículas lipossomais podem ser definidas como associações coloidais de lipídios anfipáticos que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas; tipo concha esférica. São estruturas compostas por fosfolipídios que em meio aquoso organizam-se formando uma estrutura em bicamada. Uma das formas de redução do tamanho e lamelaridade das vesículas lipossomais é submetê-las à sonicação. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do processo de ultrassonicação no diâmetro médio das vesículas, variando-se o tempo de sonicação e a potência de ultrassom. Os lipossomas foram produzidos pelo método de evaporação em fase reversa, sendo o tamanho de partícula homogeneizado e reduzido por ultrassonicação. Os dados da caracterização físico-química mostraram que a melhor condição de sonicação foi com potência de 750 W, amplitude de 40% e aplicação de ciclos de 8 segundos ligado e 2 segundos desligado, para evitar o aquecimento. O tamanho médio e índice de polidispersão obtidos foram de $71,17 \pm 0,63$ nm e $0,29 \pm 0,04$ para as vesículas lipossomais contendo trióxido de arsênio, respectivamente.

Palavras-chave: caracterização físico-química, nanopartículas poliméricas, ultrassom.

ABSTRACT

Liposomal vesicles can be defined as colloidal association of amphipathic lipids that spontaneously organize into closed structures, like a spherical shell. These are structures composed of phospholipids that in an aqueous medium get organized forming a bilayer structure. One way of reducing the size and lamellarity of liposomal vesicles is subjecting them to sonication. The objective of this study is to investigate the influence of the ultrasonication process in the average diameter of the vesicles, with different sonication time and power of ultrasound. The liposomes were produced by the evaporation method in reverse phase, and the size of particle was homogenised and reduced by ultrasonication. The data of the physical-chemical characterization showed that the best sonication condition is with a power of 750 W, 40% amplitude and application of cycles of 8 seconds turned on and 2 seconds turned off, in order to avoid heating. The average size and polydispersity index obtained were 71.17 ± 0.63 nm and 0.29 ± 0.04 for liposomal vesicles containing arsenic trioxide, respectively.

Keywords: physical-chemical characterization, polymeric nanoparticles, ultrasound.

¹ Trabalho realizado no Programa de Pós-graduação em Nanociências.

² Aluno de mestrado do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mail: mauber.moreira@gmail.com

³ Colaborador. Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Maria.

⁴ Coorientadora. Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano.

⁵ Orientador. Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mail: mortari@unifra.br

INTRODUÇÃO

Equipamentos baseados em ultrassom têm uma gama de aplicações nas diversas áreas do conhecimento, embora, ainda pouco explorada nos laboratórios (KORN et al., 2003). São empregados no rompimento de paredes de células, na homogeneização, desgaseificação, limpeza de recipientes, funcionalização de nanotubos de carbono, sínteses orgânicas, em exames para diagnósticos na medicina, assim como para o desgaste de superfícies nas engenharias. O ultrassom compreende a faixa de som que ultrapassa o limiar de audição humano, acima de 20 kHz. O espectro sonoro pode ser dividido em infrassons (abaixo de 20 Hz), sons audíveis (20 Hz a 20 kHz) e ultrassons (acima de 20 kHz). Os equipamentos de ultrassom utilizados em processos químicos possuem uma frequência de 20 kHz a 2 MHz.

Vesículas lipossomais foram descritas, em 1965, por Bangham e colaboradores (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965), quando estes investigavam a difusão de íons por membranas lipídicas artificiais. Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídios anfipáticos que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas tipo concha esférica (SANTOS; CASTANHO, 2002). São estruturas esféricas, biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicas, compostas por uma bicamada de lipídios exterior, que rodeia um meio interno aquoso. Os métodos de produção de lipossomas são os mais variados, com geração de vários tamanhos, lamelaridade e polidispersidade, sendo o controle sobre esses parâmetros ainda um desafio. Quando se tenta transpor para a escala industrial, o problema é ainda maior (MOZAFARI et al., 2008). Na utilização de lipossomas, visando a liberação de fármacos, o tamanho preferencialmente deve ser entre 50 e 200 nm (WOODLE; ENGHES; ZALIPSKY, 1994). Uma das formas de reduzir do tamanho e lamelaridade dos lipossomas é submetê-los a ultrasonicação. O mecanismo primário de redução do tamanho dos lipossomas se deve a um alongamento mediado por cisalhamento e subsequente ruptura de lipossomas cilíndricos, causada pelo micro-fluxo em torno das bolhas, e não como uma consequência do colapso de bolhas implodidas (RICHARDSON; PITT; WOODBURY, 2007). Foi também relatado que o aumento do poder de sonicação resulta em lipossomas menores, enquanto lipossomas maiores são obtidos quando a pressão do sistema é aumentada (RICHARDSON; PITT; WOODBURY, 2007). A redução de tamanho dos lipossomas por ultrassom é uma função da frequência do ultrassom. As ondas de baixa frequência produzem oscilações de maior amplitude e um fluxo microjato elevado, o qual é responsável pela formação de lipossomas pequenos (YAMAGUCHI et al., 2009). Para sonicação são utilizados as sondas e o banho. O uso de sonda pode gerar muita energia para a solução e levar a um maior aquecimento, causando oxidação e degradação dos fosfolipídios. As sondas podem ainda liberar partículas de titânio que devem ser removidas antes do uso dos lipossomas (POPOVSKA et al., 2013; URUSHIBARA; HICKS, 2013). Assim, neste trabalho, se teve como objetivo avaliar a influência do processo de ultrasonicação, no parâmetro diâmetro médio das vesículas lipossomais,

variando-se o tempo de sonicação, a potência e a amplitude da sonda de ultrassom, em um sistema de vesículas lipossomais contendo trióxido de arsênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Os lipossomas foram preparados pelo método de evaporação em fase reversa, conforme Cortesi et al., em 1999 e Mertins et al., em 2005, o qual permite obter melhores taxas de encapsulação para compostos hidrofílicos e utiliza como solvente orgânico o acetato de etila (CORTESI et al., 1999; MERTINS et al., 2005). Este método leva a formação de lipossomas do tipo multilamelares REV (*reverse phase evaporation vesicles*) (FRÉZARD et al., 2005).

Para a preparação de 100 mL de lipossomas, os componentes lipofílicos utilizados foram: fosfolipídio (Lipoid S100®, Alemanha), colesterol (Sigma-Aldrich®, EUA) e vitamina E. Os mesmos foram solubilizados em 40 mL de acetato de etila com auxílio de um banho ultrassônico (frequência de 37 kHz e amplitude 100% - Elmasonic P120H, Alemanha) durante 5 min a temperatura de 25°C (o banho ultrassônico foi utilizado apenas no preparo da formulação, na solubilização dos componentes lipofílicos). Após, foi adicionado uma alíquota de 4 mL da fase aquosa, composta por polissorbato 80 (Nuclear, Brasil), trióxido de arsênio 1,0 mg mL⁻¹ (As₂O₃, Merck, Alemanha) e tampão fosfato pH 7,4 e levado novamente ao banho de ultrassom, nas mesmas condições anteriores, onde ocorreu a formação das micelas reversas. Posteriormente a formulação, foi levada ao rota evaporador (Rotavapor® R-210 em banho Heatingbath B-491, Vacuum pump V-700 e Vacuum controler V-850 -BUCHI, Suíça) a 40°C para remoção do solvente orgânico e formação do organogel, ao qual adicionou-se o restante da fase aquosa (96 mL) e manteve-se sob alta agitação (200 rpm), em banho a 25°C por 30 minutos para formação das vesículas lipossomais.

Os lipossomas obtidos pelo método de evaporação de fase reversa tiveram seus tamanhos de partícula homogeneizado empregando-se a técnica de ultrassonicação, com o equipamento Vibra-Cell VCX 130 (130 W de potência) e VCX 750 (750 W de potência) equipado com sonda de titânio CV18 e CV33 (Sonics & Materials Inc., EUA). Para verificar a influência do processo sobre o diâmetro das vesículas, diferentes protocolos foram avaliados. Variou-se o tempo de sonicação, modo de operação da sonda, a potência bem como a amplitude. Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Análise Química e Ambiental (LAQIA) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

Para a determinação de diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão (IPD), utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Reino Unido), utilizando o software Dispersion Technology v5.1, disponível no Laboratório de Nanotecnologia do Centro Universitário Franciscano. A técnica do espalhamento da luz dinâmica mede a difusão do movimento das partículas de acordo com o movimento Browniano na solução. As partículas menores difundem a luz mais rápido do que as maiores, afetando a taxa de flutuação da intensidade da luz espalhada.

RESULTADOS

Na tabela 1 estão representados os resultados obtidos para a formulação utilizada neste trabalho. O pH da formulação foi de $7,13 \pm 0,05$ com potencial Zeta de $-8,56 \pm 0,93$ mV. Procedeu-se, assim, a variação no processo de ultrasonicação para homogeneização com redução no tamanho médio de partícula, objetivo principal do trabalho.

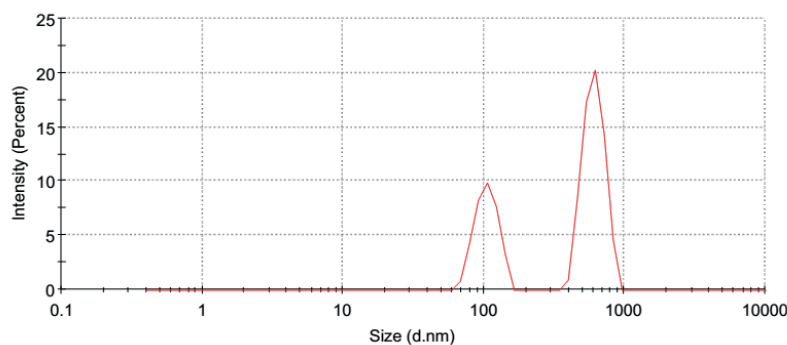
Tabela 1 - Composição da matéria prima utilizada para a obtenção das vesículas lipossomais (adaptada de CORTESI et al., 1999 e de MERTINS et al., 2005).

Fase orgânica		Fase aquosa	
Fosfatidilcolina (g)	0,80	Polissorbato 80 (g)	0,25
Colesterol (g)	0,15	Tampão pH 7,4 PBS (mL)	100,00
Acetato de etila (mL)	40,00	Trióxido de arsênio (mg.mL^{-1})	1,00
Vitamina E (g)	0,02		

HOMOGENEIZAÇÃO SEM USO DE ULTRASONICAÇÃO

Na formulação lipossomal contendo trióxido de arsênio (Figura 1), sem homogeneização por ultrassom, obteve-se lipossomas multilamelares, com tamanho médio de 1069,0 nm, com distribuição polimodal e alto índice de polidispersão ($\text{IPD} = 0,786$). Mostrando que é necessário adotar um procedimento, após a obtenção das vesículas lipossomais, para se obter homogeneidade e tamanho médio desejado (< 100 nm) na formulação.

Figura 1 - Distribuição do tamanho de partícula sem a aplicação de ultrasonicação. Pico 1 = 605,8 nm; pico 2 = 105,1 nm. Tamanho médio = 1069,0 nm, $\text{IPD} = 0,786$.



HOMOGENEIZAÇÃO ULTRASÔNICA COM POTÊNCIA DE 130 W

Visando obter vesículas lipossomais com tamanho nanométrico, empregou-se ultrasonicação na homogeneização. Utilizou-se sonda com potência de 130W, variando-se a amplitude e o tempo de sonicação. Na tabela 2 são apresentados resultados de tamanho médio e IPD das formulações quando

variou-se os ciclos de sonicação (ligado e desligado). Quanto ao tamanho médio, obteve-se, em ambos os ciclos, vesículas lipossomais em escala manométrica. Porém, os índices de polidispersão não foram satisfatórios, com uma leve diminuição no ciclo intermitente (ultrasonicação ligada/desligada).

Tabela 2 - Uso de ultrasonicação: variações testadas de amplitude e ciclo de tempo para obtenção de vesículas lipossomais. Potência 130 W. Resultados de tamanho médio de partícula e IPD.

Amplitude (%)	Ciclos (ligado/ desligado)(s)	Tempo total (min)	Tamanho médio \pm DP	IPD \pm DP
40	8/2	3,0	159,9 \pm 3,80	0,437 \pm 0,01
	8/2	6,0	133,0 \pm 1,40	0,370 \pm 0,01
45	10/20	0,5	221,5 \pm 12,56	0,744 \pm 0,01
	10/20	1,0	210,2 \pm 9,03	0,586 \pm 0,04
	10/20	1,5	186,9 \pm 4,07	0,510 \pm 0,08
45	60/60	20,0 ⁱ	126,1 \pm 2,95	0,378 \pm 0,01
	60/60	20,0 ^c	130,0 \pm 1,76	0,462 \pm 0,05

i=intermitente, c=contínuo

A distribuição de tamanho de partícula (por intensidade) para a formulação, com amplitude de sonicação 40% e tempo de 6 minutos, com ciclos de 8s ligado e 2s desligado, numa potência de 130W, produziu partículas com tamanho médio de 133,0 \pm 1,40 com IPD de 0,370 \pm 0,01. A mesma formulação foi avaliada nessa amplitude e nessa potência, porém, com um maior tempo de sonicação: 20 minutos com ciclos de 60s ligado/desligado. O ciclo ligado/desligado foi utilizado para evitar aquecimento da formulação. Valores obtidos são mostrados na tabela 3.

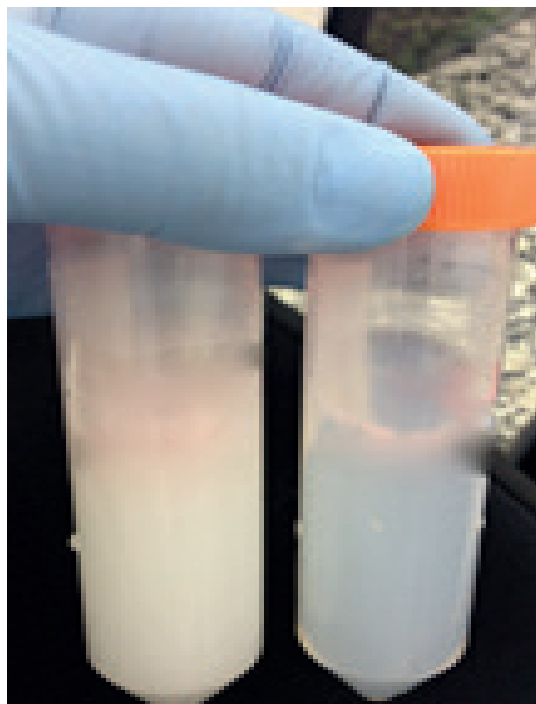
Verifica-se que não há diferença significativa, na mesma amplitude, nos valores de tamanho médio e IPD para ciclo contínuo ou intermitente. No entanto, com ciclo contínuo, os valores de tamanho não são uniformes (tomando-se como valores individuais e não médios), disto a escolha por ciclo intermitente. No ciclo contínuo há um aumento de temperatura, mesmo com o sistema imerso em banho de gelo que, provavelmente, interfira no processo. Quanto a amplitude, na potência de 130W, 60% foi a que apresentou melhores resultados.

Tabela 3 - Otimização dos parâmetros de ultrasonicação para obtenção de lipossomas. Tempo de sonicação de 6 minutos, ciclo intermitente de 8s ligado e 2s desligado, potência de 130W.

Amplitude (%)	Ciclo	Tamanho médio obtido	IPD
30	Contínuo	113,9 \pm 4,91	0,393 \pm 0,02
	Intermitente	134,9 \pm 1,20	0,588 \pm 0,01
45	Contínuo	94,33 \pm 3,29	0,362 \pm 0,03
	Intermitente	103,70 \pm 4,82	0,363 \pm 0,04
60	Contínuo	85,66 \pm 0,39	0,312 \pm 0,01
	Intermitente	86,31 \pm 0,88	0,310 \pm 0,03
70	Contínuo	85,41 \pm 1,24	0,279 \pm 0,02
	Intermitente	119,20 \pm 6,44	0,346 \pm 0,05

O uso de ultrasonicação favorece a homogeneidade das vesículas lipossomais. É visível a diferença das formulações com e sem ultrasonicação. A figura 2 mostra o aspecto mais translúcido da formulação após uso de sonicação.

Figura 2 - Aspecto das vesículas lipossomais obtidas antes (formulação da esquerda) e após sonicação (formulação da direita).



A posição da sonda de ultrassom, imersa na solução, pode influenciar no tamanho médio e na homogeneidade da distribuição das partículas (SILVA et al., 2010), uma vez que fornece maior ou menor energia ao sistema. Com isso, neste trabalho, a sonda foi fixada numa posição em que ela ficasse submersa em 40% da solução.

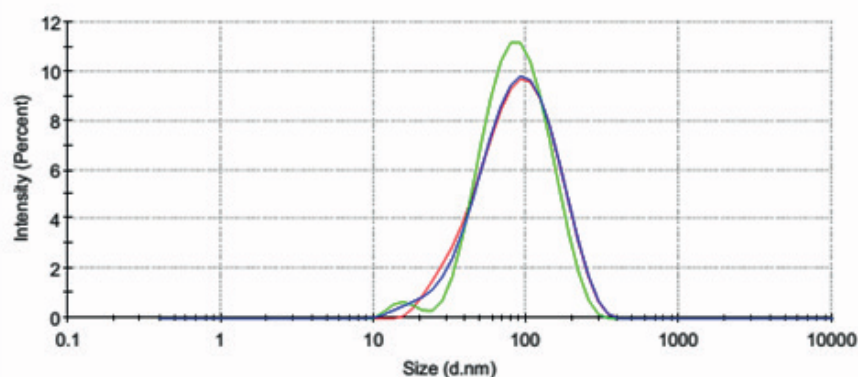
HOMOGENEIZAÇÃO ULTRASÔNICA COM POTÊNCIA DE 750 W

Também, avaliou-se a influência de uma maior potência sobre o perfil de distribuição de tamanho médio de partícula. Para isso, utilizou-se uma sonda com potência de 750W, variando-se a amplitude em 20%, 40% e 60%, com sonicação intermitente nos tempos de sonicação de 6 minutos (8s ligado e 2s desligado) e 20 minutos (60s ligado e 60s desligado).

Os resultados obtidos demonstram que a melhor formulação é obtida quando se aplica 6 minutos de sonicação com ciclo de 8s ligado e 2s desligado: diâmetro médio = $74,21 \pm 0,83$ nm e IPD = $0,237 \pm 0,01$ (perfil apresentado na figura 3) enquanto que em 20 minutos com ciclo de 60s ligado e 60s desligado a formulação apresentou diâmetro médio = $75,72 \pm 1,9$ nm e IPD = $0,318 \pm 0,04$.

Figura 3 - Distribuição do tamanho de partícula das vesículas lipossomais.

Potência da sonda de 750W, amplitude de 40%, tempo de 6 min com ciclos de 8s ligado e 2s desligado.



Estatisticamente, não há diferenças nos tamanhos dos lipossomas produzidos nos diferentes tempos (6 e 20 min). Optou-se pelo ciclo de 6 minutos por ser o menor tempo. Nas amplitudes de 20% e 60%, os resultados foram satisfatórios em relação ao tamanho médio de partícula ($79,64 \pm 0,21$ nm e $88,10 \pm 0,88$ nm, para 20% e 60% respectivamente), porém, a homogeneidade do IDP ($0,285 \pm 0,01$ e $0,435 \pm 0,01$, respectivamente) foi comprometida.

Após a avaliação da influência da ultrassonicação, uma formulação foi produzida e avaliada por meio de parâmetros físico-químicos, conforme resultados apresentados na tabela 4. Os dados foram obtidos com a melhor otimização para homogeneização das vesículas lipossomais, com uso de ultrassonicação: sonda com Potência de 750W, 40% amplitude, tempo de 6 minutos com ciclo de 8s ligada/2s desligada.

Tabela 4 - Caracterização físico-química das formulações de lipossoma contendo trióxido de arsênio (TOA). Potência 750W, 40% amplitude, tempo de 6 minutos com ciclo de 8s ligada/2s desligada, n = 3.

Parâmetro Avaliado	Formulações contendo TOA				
	1	2	3	Média	DP
Tamanho médio (nm)	71,76	70,51	71,25	71,17	$\pm 0,63$
IPD	0,333	0,259	0,270	0,287	$\pm 0,04$
pH	7,54	7,55	7,57	7,55	$\pm 0,02$
Potencial Zeta (mV)	-4,44	-12,00	-4,50	-6,98	$\pm 4,35$

CONCLUSÃO

Conclui-se que é possível produzir vesículas lipossomais, de tamanho menor que 100 nm, pelo método de evaporação em fase reversa seguido de ultrassonicação. Sem o emprego de ultrassonicação, as vesículas lipossomais obtidas apresentaram tamanho médio na ordem de micrometros.

Com o aumento de potência (130 W para 750 W) na sonda e o uso de ciclo intermitente proporcionam menor tamanho médio de partículas. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se sonda de ultrassom com potência de 750 W, numa amplitude de 40%, no tempo de 6 minutos com ciclos de 8s ligado e 2s desligado.

REFERÊNCIAS

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J Mol Biol.**, v. 13, n. 1, p. 238-252, 1965.

CORTESI, R. et al. Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents. **J. Microencapsul**, v. 16, n. 2, p. 251-256, 1999.

FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

KORN, M et al. Procedimentos Analíticos Assistidos por Ultrassom. **Revista Analytica**, v. 3, p. 34-39, 2003.

MERTINS, O. et al. Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. **Chem. Phy. Lipids**, v. 138, n. 1-2, p. 29-37, 2005.

MOZAFARI, M. R. et al. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **J Liposome Res**, v. 18, n. 4, p. 309-27, 2008.

POPOVSKA, O. et al. An Overview : Methods for Preparation and Characterization of Liposomes as Drug Delivery Systems. **Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.**, v. 3, n. 2, p. 13-20, 2013.

RICHARDSON, E. S.; PITT, W. G.; WOODBURY, D. J. The role of cavitation in liposome formation. **Biophys J.**, v. 93, n. 12, p. 4100-4107, 2007.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Quim. Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SILVA, R. et al. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 3, p. 628-632, 2010.

URUSHIBARA, T.; HICKS, R. Effect of Liposome Surface Charge and Peptide Side Chain Charge Density on Antimicrobial Peptide-Membrane Binding as Determined by Circular Dichroism and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **J. Membra. Sci. Technol.**, v. 3, n. 3, p. 1-9, 2013.

WOODLE, M. C.; ENGHERS, C. M.; ZALIPSKY, S. New Amphipatic Polymer-Lipid Conjugates Forming Long-Circulating Reticuloendothelial System-Evading Liposomes. **Bioconjug Chem.**, v. 5, n. 6, p.493-496, 1994.

YAMAGUCHI, T. et al. Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. **Chem Phys Lipids**, v. 160, n. 1, p. 58-62, 2009.

