



CUBOSSOMOS CATIÔNICOS COMO NANOCARREADORES PARA TRATAMENTO DE BACTÉRIAS SUPER-RESISTENTES

Palavras-Chave: CUBOSSOMOS, SUPER-BACTÉRIAS, CATIÔNICO.

Autores(as):

POLLYANA BAPTISTA BUIST, IFGW - UNICAMP E LNLS – CNPEM

Dr.^a. IRIS RENATA SOUZA RIBEIRO, LNLS - CNPEM

Prof. Dr. LEANDRO R. S. BARBOSA (orientador), LNLS - CNPEM

INTRODUÇÃO:

Bactérias super-resistentes representam um dos grandes desafios da medicina moderna. (Matsunaga e Hayakawa, 2018). A resistência bacteriana é um fenômeno natural que ocorre quando uma bactéria adquire a capacidade de sobreviver e se reproduzir na presença de um agente antimicrobiano. (Smith e colab., 2023) Existem diferentes meios pelos quais as bactérias tornam-se resistentes aos antibióticos, como por exemplo: Produção de enzimas que os inativam, alterações na estrutura ou função dos alvos dos antibióticos, bombas de efluxo e modificação ou redução da permeabilidade da membrana bacteriana (Darby et al., 2023). Diante da problemática, esse projeto visa uma alternativa para combater as bactérias super-resistentes. Neste contexto, as nanoestruturas oferecem vantagens, devido ao seu tamanho nanométrico e pela possibilidade de possuírem propriedades antimicrobianas intrínsecas, o que pode levar ao combate direto das bactérias. (Ozidal e Gurkok, 2022) Dentre essas nanoestruturas, os cubossomos catiônicos são uma alternativa para combatê-las.

Cubossomos (figura 1) são nanopartículas lipídicas com estrutura de fase cúbica bicontinua, que se autoformam (Lotierzo, e cols, 2021). Eles possuem diversas vantagens como a liberação controlada de medicamentos e a estabilidade. Para torná-lo catiônico, realiza-se a síntese da nanopartícula com a adição de um polímero catiônico. Com isso, acredita-se que há uma interação eletrostática entre cargas positivas presentes na superfície e as cargas negativas da superfície da bactéria. Essa interação resulta em danos à membrana celular desses microrganismos, levando à sua morte ou inativação. A atividade antimicrobiana dos cubossomos catiônicos baseia-se na capacidade desses sistemas de interagir com as membranas celulares dos microrganismos. Então, esse projeto visa sintetizar e caracterizar os cubossomos catiônicos utilizando diferentes técnicas, além de avaliar a ação antimicrobiana frente a bactérias resistentes a antibióticos e verificar a viabilidade celular do sistema.

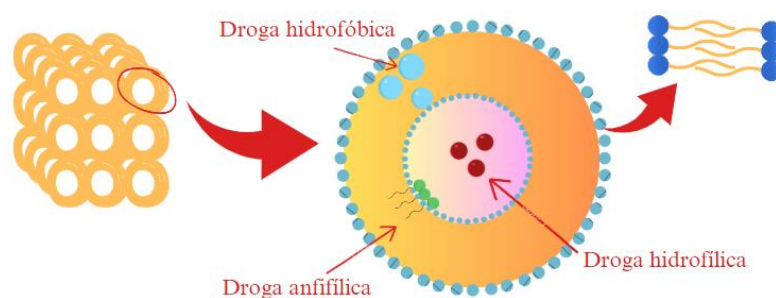


Figura 1: Representação esquemática do cubossomo. Fonte: Do autor.

METODOLOGIA:

Preparação dos Cubossomos Catiônicos

As amostras de cubossomos são sintetizadas com base no protocolo de *bottom up* descrito na literatura (Akhlaghi e colab., 2016; Lotierzo e colab., 2020; Malheiros e colab., 2021) Os compostos são pesados e armazenados em béqueres separadamente nas proporções de 25mg de F-127 e 100mg de fitantriol. Terminada esta etapa ambos os solutos são diluídos por seus respectivos solventes, sendo 22,5 ml de água destilada para o F-127 e 10 ml de álcool etílico para o fitantriol. O próximo passo é levar as amostras ao banho-maria numa temperatura de 45 °C por volta de meia hora ou até o momento que ocorre a estabilização das temperaturas. Após a estabilização da temperatura começamos o processo de adição dos compostos, o F-127 deve ser retirado do banho, adicionado um peixinho magnético ao seu recipiente e colocado sob a plataforma de aquecimento e agitação magnética que iniciará o processo de agitação. Com a agitação da amostra de F-127 iniciada, a solução de fitantriol foi pipetada delicadamente até que toda a substância foi adicionada. Finalizado esta etapa o sistema é levado ao rotaevaporador até atingir um volume final de 5ml, sendo que obtemos uma concentração da ordem de 10^{12} partículas/ml e um tamanho médio de cerca de 200 – 300 nm (Lotierzo e colab.,2020; Malheiros e colab., 2021, 2022) A adição do polímero catiônico é realizada juntamente com o F-127 nas quantidades de 1, 5 e 10% em relação à massa de fitantriol.

Caracterização dos cubossomos

A fim de obter informações relacionadas ao diâmetro hidrodinâmico e da polidispersidade dos cubossomos utiliza-se do espalhamento dinâmico de luz (DLS), com o equipamento Nano HT Zetasizer (Malvern) no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, CNPEM). Ademais, para determinar a carga superficial serão realizadas medidas de potencial zeta utilizando o mesmo equipamento.

Para obter imagens de alta resolução dos cubossomos, será realizada a criomicroscopia eletrônica de transmissão (crio-TEM), onde as amostras são vitrificadas e depositadas em *grids* de cobre. Finalmente, para confirmar a formação de cubossomos e determinar tamanho e polidispersidade serão realizadas

medidas de espalhamento de raios-x a baixo ângulo. Essas medidas serão realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNANO, CNPEM)

Ademais, para verificar a eficiência de encapsulação são realizados por meio da espectroscopia UV-Vis. As amostras com diferentes concentrações são colocadas em um tubo com filtro Amicon® Ultra-4 100K (MerckMillipore® e centrifugadas durante 10 minutos com velocidade de 4000 rpm, ao fim do tempo retira-se a fração de polímero livre, que é analisado na espectroscopia em 298 nm.

Ademais, planejam-se realizar ensaios in vitro dos cubossomos catiônicos com algumas bactérias super-resistentes para avaliar a atividade antimicrobiana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Até o presente momento já foram realizadas produções de cubossomos com a adição do polímero catiônico e foram realizadas medidas de eficiência de encapsulação com concentrações de 1,5 e 10% de polímero utilizando a espectroscopia no UV-Vis, onde percebeu-se que a quantidade de polímero livre foi crescente conforme aumentou-se a concentração do componente na solução.

BIBLIOGRAFIA

AKHLAGHI, Seyedeh Parinaz e colab. **Impact of preparation method and variables on the internal structure, morphology, and presence of liposomes in phytantriol-Pluronic® F127 cubosomes.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 145, p. 845–853, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777651630426X>>.

CRISTINA GOMES LOTIERZO, Mayra e RAMOS SOUZA BARBOSA, Leandro. **Estudo da eficácia de encapsulação da Cinarizina em cubossomos não-iônicos: caracterização estrutural e citotóxica.** Dissertação para obtenção do Título de Mestre. Universidade de São Paulo, 2021.

DARBY, Elizabeth M. e colab. **Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited.** Nature Reviews Microbiology. [S.l.]: Nature Research. , 1 Maio 2023

LOTIERZO, Mayra C.G. e colab. **Cubic-to-inverted micellar and the cubic-to-hexagonal-to-micellar transitions on phytantriol-based cubosomes induced by solvents.** Drug Delivery and Translational Research, v. 10, n. 6, p. 1571–1583, 1 Dez 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13346-020-00828-y>>. Acesso em: 15 jun 2023.

MALHEIROS, Barbara e colab. **Design and manufacturing of monodisperse and malleable phytantriol-based cubosomes for drug delivery applications.** Journal of Drug Delivery Science and Technology, v. 61, p. 102149, 1 Fev 2021. Acesso em: 15 jun 2023.

MALHEIROS, Barbara e colab. **Influence of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in phytantriol-based cubosomes: A structural investigation.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 632, p. 127720, 2 Jan 2022. Acesso em: 15 jun 2023.

MATSUNAGA, Nobuaki e HAYAKAWA, Kayoko. **Estimating the impact of antimicrobial resistance.** The Lancet Global Health. [S.l.]: Elsevier Ltd. , 1 Set 2018

OZDAL, Murat e GURKOK, Sumeyra. **Recent advances in nanoparticles as antibacterial agent.** ADMET and DMPK, v. 10, n. 2, p. 115–129, 2022.

SMITH, William P.J. e colab. **Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance.** Nature Reviews Microbiology. [S.l.]: Nature Research. , 1 Ago 2023