



# COMPLEXOS ELETROSTÁTICOS FOTORRESPONSIVOS COMO PLATAFORMAS PARA IMOBILIZAÇÃO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS EM CUBOSSOMAS

Palavras-Chave: CUBOSSOMA, POLÍMEROS, FOTOGERADOR DE ÁCIDO

**Autores:**

**Kaiky Lins Silva Santos, IQ-UNICAMP**  
**Prof. Dr. Watson Loh (orientador), IQ-UNICAMP**

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas plataformas de liberação de moléculas ativas tem sido cada vez mais estudado devido à necessidade de se veicular medicamentos de maneira sustentada e/ou direcionada, com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais. Um sistema que se propõe a ser uma alternativa nesta área é o de fases líquido-cristalinas liotrópicas. Fases cúbicas bicontínuas em meio aquoso formam dispersões de cubossomas, que tem a capacidade de carregar fármacos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos e liberá-los de forma controlada, estimulados por fatores como pH, temperatura e presença de enzimas. Os cubossomas podem também ser imobilizados em hidrogéis com a finalidade de aplicações tópica ou subcutânea. Neste contexto, estamos avaliando o uso de complexos eletrostáticos para imobilização dos cubossomas. Utilizando um sistema composto por hidrogel formado pela complexação eletrostática entre polieletrólitos de carga oposta, cubossomas imobilizados

carregados com fármacos e um foto gerador de ácido, responsável por converter um estímulo luminoso em gatilho químico. Ao incidir luz UV, espera-se que este promoverá a descomplexação do sistema, pois haverá a decomposição do PAG (Photoacid generator), liberando  $H^+$  ao meio e, portanto, ocorrerá a alteração de pH do sistema, fazendo com que haja a dissociação dos polissacarídeos e a consequente liberação das partículas e dos fármacos.

## METODOLOGIA

### PURIFICAÇÃO E PREPARO DOS POLÍMEROS

Primeiramente, os polímeros foram submetidos a um processo de purificação baseada no método descrito por Parchen (2019). Assim, 5g de quitosana bruta (massa molar média) foram dispersos em 1L de solução de ácido acético  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , seguido de agitação por 24 horas. Logo após, houve a centrifugação da solução a 8500 rpm,  $25^\circ\text{C}$ , por 30 minutos. O material sobrenadante foi coletado e liofilizado. O procedimento com o alginato de sódio foi semelhante, de modo que

aproximadamente 25 gramas deste foram dispersos em 1L de água deionizada. No entanto, devido à alta viscosidade e grande concentração da solução, o experimento foi realizado a 11000 rpm, 25°C, por 8 horas.

As soluções de quitosana e alginato de sódio foram preparadas em diferentes concentrações. Alginato de sódio a 70°C, em pH neutro, enquanto a quitosana em temperatura ambiente e pH ajustado com ácido acético 1% (m/m), ambos sob agitação por 24 horas.

Por fim, nas titulações de quitosana com NaOH foi adicionado 10 mL de HCl 0,05M em 10 mL do polímero a 1g/L, a fim de que o pH fosse ajustado para em torno de 1. Semelhantemente, no procedimento do polieletrólito titulado com HCl, 20 mL de NaOH 0,1M foi colocado em 10 mL de quitosana para alcançar um pH em torno de 13.

## **DENSIDADE DE CARGA, TESTES DE COMPLEXAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.**

Para o cálculo da densidade de carga, as soluções poliméricas serão submetidas a titulação potenciométrica com NaOH 0,1 M e HCl 0,05M. Os complexos de alginato de sódio e quitosana serão preparados na proporção 1:1 em relação à massa e em pH intermediário aos valores de pka dos polieletrólitos (3,4 – 6,5). Além do mais, a complexação será avaliada em diferentes faixas de pH, de modo que após a mistura das soluções dos polímeros isolados, o meio será deixado em repouso para compactação do gel, o qual será centrifugado em seguida por 15 minutos a 2500 rpm.

Por conseguinte, a equação de Henderson-Hasselbalch será utilizada para expressar a quantidade de carga do complexo após a titulação.

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Em vista disso, poderá se obter a região onde haverá a maior quantidade possível de polieletrólitos complexados na proporção 1:1 em relação à quantidade de carga, espera-se que essa faixa intermediária seja ideal para a formação dos complexos.

Após o preparo dos géis, estes seguirão para a caracterização com o auxílio de um texturômetro, para se avaliar as propriedades mecânicas dos complexos.

## **PREPARO DOS CUBOSSOMAS**

Os cubossomas de fitantriol serão preparados pelo método *top-down*. Serão utilizados fitantriol, Pluronic F-127, difeniliodônio-2-carboxilato monohidratado (PAG) e água MilliQ. O fitantriol será fundido a 40°C e uma solução 5% de Pluronic F-127 é adicionada. O sistema será homogeneizado por um agitador do tipo vortex e o volume será completado com água deionizada e PAG. O sistema será disperso em ultrassom de ponteira por 30 minutos e 40% de amplitude.

## **CARACTERIZAÇÃO DOS CUBOSSOMAS**

Os cubossomas serão caracterizados quanto a diâmetro hidrodinâmico por técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e quanto a estabilidade da fase bicontinua cúbica reversa por técnica de espalhamento de raio-x a baixo ângulo (SAXS). Os cubossomas serão expostos à luz UV (lâmpada de mercúrio, na

faixa de 350-450 nm por até 6 h), para verificar sua fotorresponsividade e capacidade de diminuição do pH do sistema.

## IMOBILIZAÇÃO DOS CUBOSSOMAS NO GEL E CARACTERIZAÇÃO

Os cubossomas carregados com o fotogerador de ácido serão adicionados às soluções poliméricas individuais antes de suas misturas. Com a mistura os cubossomas serão retidos no gel. O sucesso desta etapa será verificado por microscopia confocal, após coramento dos cubossomas com corante hidrofóbico vermelho do nilo. A caracterização do gel será feita por técnicas reométricas (em modos rotacional e oscilatório para a determinação da viscosidade e das características viscoelásticas), termogravimétricas (para avaliação do teor de umidade e do perfil de decomposição térmica) e mecânicas (ensaio de compressão em texturômetro).

Será determinado o perfil de liberação do sistema de cubossomas carregados com diclofenaco e imobilizados no gel. Serão colocados em uma membrana semipermeável de diálise, exposto a luz UV. Alíquotas serão coletadas periodicamente e quantificadas quanto ao teor de diclofenaco por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EFEITO DAS PURIFICAÇÕES NAS TITULAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS DA QUITOSANA

Os resultados obtidos experimentalmente evidenciam que havia uma quantidade considerável de impurezas na

solução do polímero natural, pois comparativamente as curvas de titulação mostraram-se bastante distintas antes e após o processo de purificação. Dessa forma, o pka experimental da quitosana purificada foi de ~6,4, valor este que está próximo ao que é encontrado na literatura (6,2-7,0).

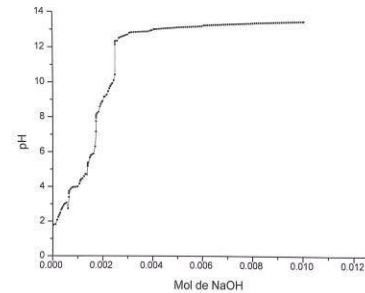


Figura 2- Curva de titulação da quitosana não purificada com HCl

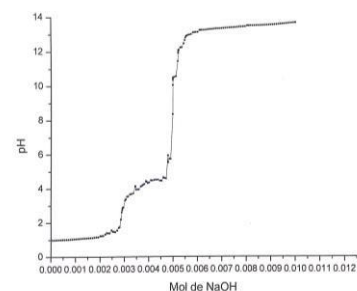


Figura 3- Curva de titulação da quitosana purificada com HCl

### DENSIDADE DE CARGA

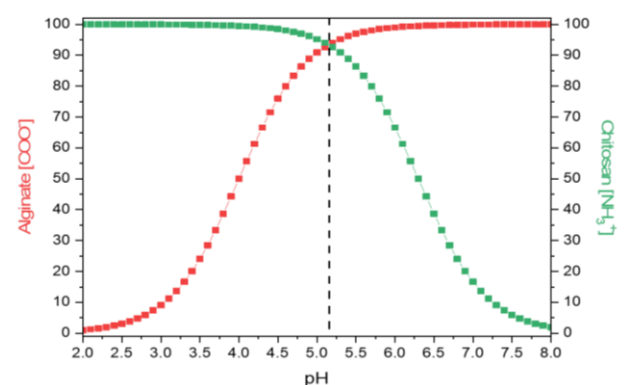


Figura 1- Gráfico de grau de ionização do alginato (vermelho) e da quitosana (verde) em função do pH utilizando os valores de  $pK_a = (6,2-7,0)$ .

O gráfico acima mostra o grau de ionização da quitosana e do alginato, em função do pH. Como a quitosana possui um grupo amino e o alginato um grupo carboxílico,

espera-se que em pH próximo a 5,1 haja a maior proporção de moléculas ionizadas disponíveis para complexação (cerca de 93% de cada um dos polímeros envolvidos estarão na forma ionizada).

## TESTES DE COMPLEXAÇÃO

Inicialmente, foram complexadas as soluções poliméricas a 1g/L cada uma, de modo que não foi possível observar efeitos significativos nos diferentes valores de pH, apenas um precipitado turvo em todas as misturas.

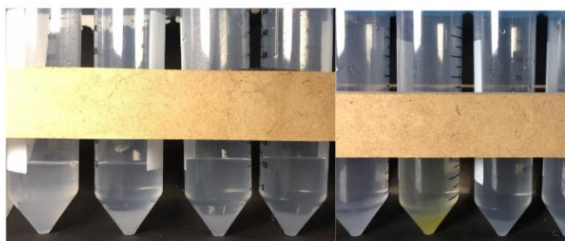


Figura 4-Testes de complexação com soluções poliméricas a 1g/L. pH's da esquerda pra direita: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,1; 5,5; 6,3 e 7,0.

Em segunda oportunidade, o experimento foi feito com alginato e quitosana a 10 g/L e em presença de tampão acetato 25mM/L. Destarte, observou-se visualmente indícios de formação de hidrogel em uma faixa arbitrária de pH's. No entanto, os valores evidenciados experimentalmente não concordam com o que foi previsto no cálculo mostrado previamente, de modo que a complexação ideal seria em pH 5,1, enquanto que os resultados empíricos mostraram que os géis começaram a ser formados na faixa de 3,5 a 4,3.

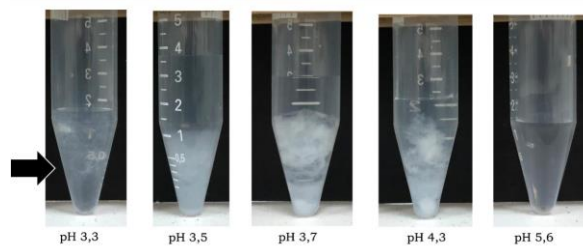


Figura 5 – Testes de complexação com soluções poliméricas a 10g/L com tampão HAC 25 mM/L.

Assim, soluções mais concentradas foram preparadas a 20g/L, sem a presença do tampão acetato e os resultados passaram a concordar com o que foi proposto teóricamente. Foram observadas formações de géis em pH's no intervalo de 5,0 a 6,0.

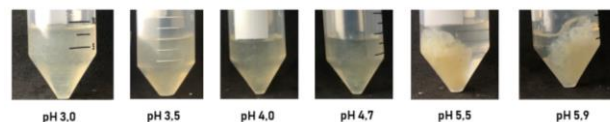


Figura 6- Testes de complexação com soluções poliméricas a 20 g/L, sem HAC.

Por fim, a partir dos dados obtidos anteriormente, foi feito um recorte e novos testes de complexação se procederam na faixa de pH de 5,0 a 6,0. Verificou-se a formação de complexos em todos os valores.

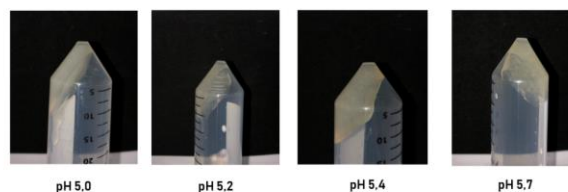


Figura 7- Testes de complexação com soluções poliméricas a 20 g/L em um recorte de pH.

## CONCLUSÕES

Em síntese, foi esclarecido a necessidade de purificação dos polímeros que estão sendo utilizados, haja visto a grande diferença entre as curvas de titulação antes e após o procedimento.

Além do mais, os polieletrólitos de carga oposta mostraram capacidade de se complexar

e formar hidrogéis, especialmente em pH's intermediários, tendo sido determinada uma faixa de 5,0 a 6,0 para prosseguimento no presente estudo.

Por conseguinte, finalizada a investigação dos coacervados, pretende-se realizar a caracterização dos géis, bem como o preparo dos cubossomas carregados com fotogerador de ácido e os ensaios de liberação, avaliando a fotorresponsividade do sistema e sua capacidade de descomplexação.

## BIBLIOGRAFIA

1. PARCHEN, Gabriela Pereira. Efeito do potencial elétrico da superfície de lipossomas revestidos com biopolímeros sobre a liberação cutânea de EGF. UFPR, **2019**
2. Tiwari, G.; Tiwari, R.; Sriwastawa, B.; Bhati, L.; Pandey, S.; Pandey, P.; Bannerjee, S. K. Drug Delivery Systems: An Updated Review. *ijpi* **2012**, 2, 2-11.
3. Barriga, H. M. G.; Holme, M. N.; Stevens, M. M., Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles? *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, 58 (10) 2958-2978.
4. Yang, D.; Armitage, B.; Marder, S. R., Cubic Liquid-Crystalline Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43 (34), 4402- 4409.
5. Mezzenga, R.; Seddon, J. M.; Drummond, C. J.; Boyd, B. J.; Schröder-Turk, G. E.; Sagalowicz, L., Nature-Inspired Design and Application of Lipidic Lyotropic Liquid Crystals. *Advanced Materials* **2019**, 31 (35), 1900818.
6. van 't Hag, L.; Gras, S. L.; Conn, C. E.; Drummond, C. J., Lyotropic liquid crystal engineering moving beyond binary compositional space – ordered nanostructured amphiphile self-assembly materials by design. *Chemical Society Reviews* **2017**, 46 (10), 2705-2731.
7. Negrini, R.; Mezzenga, R., pH-Responsive Lyotropic Liquid Crystals for Controlled Drug Delivery. *Langmuir* **2011**, 27(9), 5296-5303.
8. Fong, W.-K.; Negrini, R.; Vallooran, J. J.; Mezzenga, R.; Boyd, B. J., Responsive self-assembled nanostructured lipid systems for drug delivery and diagnostics. *Journal of Colloid and Interface Science* **2016**, 484, 320-339.
9. Denise G. Villalva, Carla G. França, Watson Loh; "Characterization of cubosomes immobilized in hydrogels of hyaluronic acid and their use for diclofenac controlled delivery" submitted for publication in *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (FAPESP/FCT)*
10. Meka, V. S.; Sing, M. K. G.; Pichika, M. R.; Nali, S. R.; Kolapalli, V. R. M.; Kesharwani, P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discovery Today* **2017**, 22 (11), 1697-1706.
11. Wang, Q.; Schlenoff, J. B. The Polyelectrolyte Complex/Coacervate Continuum. *Macromolecules* **2014**, 47(9), 3108-3116
12. Martin, C. J.; Rapenne, G.; Nakashima, T.; Kawai, T., Recent progress in development of photoacid generators. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2018**, 34, 41-51.