

## NOVOS FOTODISPOSITIVOS PARA A LIBERAÇÃO DE ANFOTERICINA B

Letícia S. Vitorino<sup>1\*</sup>, Isabela A. Albuquerque Bessa<sup>1</sup>, Thiago Custódio<sup>2</sup>, Evelyn C. S. Santos<sup>2</sup>, Célia M. Ronconi<sup>3</sup>

1. Estudantes de IC do Instituto de Química da UFF

2. Alunos do Programa de Pós-graduação em Química da UFF

3. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, Outeiro São João Batista s/n, Centro, 24020-150 Niterói-RJ, Brasil - Departamento de Química Inorgânica / Orientadora

**Resumo:** Este trabalho relata a síntese de um sistema veiculador de fármacos baseado em óxido de grafeno reduzido (rGO) funcionalizado com o polímero plurônico P123 e carregado com o fármaco anfotericina B (AmB) a ser empregado no tratamento da leishmaniose.

O sistema rGO-P123 foi sintetizado a partir do grafite que foi submetido a um processo de oxidação, seguido de esfoliação para produzir o óxido de grafeno (GO). O GO foi funcionalizado e reduzido com hidrazina hidratada. Por meio de caracterizações como MET e potencial zeta observou-se que o rGO-P123 é formado por folhas bidimensionais empilhadas e enrugadas e apresenta carga superficial negativa na faixa de pH 2 a 10. O dispositivo apresenta alta eficiência de carregamento com o fármaco AmB (94%) e sua liberação tem sido realizada empregando-se pH ácido e radiação na região do infravermelho próximo ( $\lambda=800$  nm). A AmB, juntamente com o calor proveniente da radiação NIR pode ser eficaz no combate à leishmaniose cutânea.

**Palavras-chave:** leishmaniose; sistemas de veiculação de fármacos; radiação na região do infravermelho próximo.

**Apoio financeiro:** CNPq, Faperj e Capes

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFF

**Introdução:** A leishmaniose, uma doença parasitária infecciosa que pode acometer a pele e órgãos vitais, é causada por protozoários intracelulares obrigatórios (desenvolvem-se necessariamente no interior de células) pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*.<sup>1</sup> Devido a sua grande abrangência e ocorrência em países de baixa renda é classificada como uma doença negligenciada, que incapacita ou leva ao óbito milhões de pessoas ao redor do mundo.<sup>2</sup>

O baixo investimento da indústria farmacêutica na busca por novos meios de tratamento para a leishmaniose faz com que a variedade de medicamentos disponíveis para tratar esta enfermidade seja reduzida. Além disso, outro fator agravante são os efeitos adversos gerados por estes fármacos.

Uma das opções de medicamentos para o tratamento da leishmaniose é o antifúngico anfotericina B (AmB), fármaco pouco solúvel em meio aquoso que resulta em um tratamento doloroso para o paciente e gera efeitos tóxicos graves, como nefrotoxicidade e hipocalcemia.<sup>3</sup> Com o objetivo de melhorar o controle das propriedades farmacocinéticas e atenuar a toxicidade dos fármacos, como a AmB, tem-se desenvolvido sistemas de veiculação de fármacos (SVF).<sup>4,5</sup>

Neste âmbito, materiais derivados de carbono, como o óxido de grafeno reduzido (rGO) têm surgido como potenciais plataformas para aplicações biológicas, pois são biocompatíveis quando funcionalizados com surfactantes e apresentam alta capacidade para serem carregados com fármacos via interações supramoleculares. Além disso, o rGO apresenta-se como um excelente agente fototérmico, pois absorve radiação na região do infravermelho próximo - NIR - (780 – 2500 nm) transformando-a em energia térmica que pode ser empregada como estímulo de liberação do fármaco carregado no rGO.<sup>6</sup>

Impulsionados pela busca de melhores condições de tratamento para pacientes acometidos com a leishmaniose, este trabalho objetiva a síntese de um fotodispositivo baseado em rGO funcionalizado com o polímero plurônico P123 e posteriormente carregado com o fármaco AmB a ser empregado no tratamento da leishmaniose, principalmente em sua manifestação cutânea. Como estímulo de liberação pretende-se utilizar radiação na região do NIR que, ao atuar juntamente com o fármaco, poderá potencializar a morte dos parasitas que se encontram na lesão.

**Metodologia:** Os procedimentos descritos neste trabalho foram realizados no Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia (LQSN) localizado na UFF pelas alunas de iniciação científica supervisionadas pelos alunos de pós-graduação que fazem parte do projeto.

Inicialmente, o grafite foi pré-oxidado e submetido à oxidação de acordo com o método de Hummers modificado, sendo esfoliado e centrifugado logo em seguida, fornecendo o óxido de grafeno (GO) como produto.<sup>7</sup> O GO disperso em meio aquoso foi funcionalizado com o polímero plurônico P123 e reduzido pela adição de hidrazina hidratada. O sólido obtido (coloração preta) foi lavado com água destilada e submetido a uma diálise para purificação. Em seguida, o produto purificado foi liofilizado resultando na obtenção do sistema pretendido (rGO-P123).

O dispositivo foi caracterizado por meio das técnicas de espectroscopia na região do infravermelho (IV-

ATR) no equipamento Thermo Scientific Nicolet iS50, análise termogravimétrica (TGA) no aparelho Shimadzu TGA-60, análise de potencial zeta realizada no equipamento Zetasizer Nano ZS 90 da Malvern e os ensaios de absorção em solução na região do ultravioleta visível (UV-Vis) e os estudos de liberação foram realizados no aparelho UV Varian Cary 50 conc. Estas análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (LAMATE) localizado na Universidade Federal Fluminense. As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas no microscópio eletrônico JOEL JEM-1011 e aceleração de 80 kV operado por um técnico especializado. Este equipamento pertence à plataforma de microscopia eletrônica do curso de Biologia da Universidade Federal Fluminense. A análise de difração de raios X de policristal foi realizada no aparelho D8 ADVANCE (Bruker) localizado no Instituto de Física da Universidade Federal Fluminense. Esta medida foi realizada a 298 K utilizando-se radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$ ).

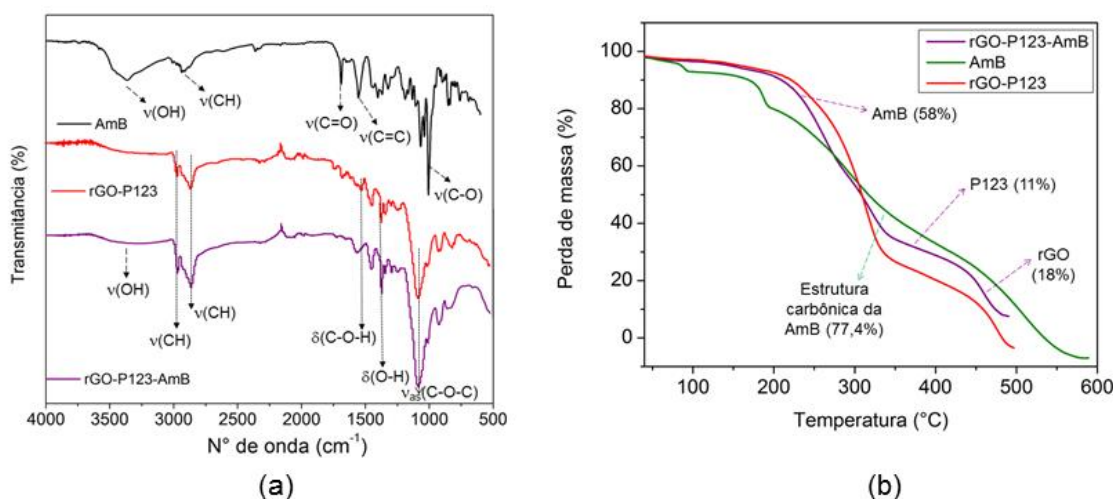
A incorporação do fármaco ao dispositivo foi realizada utilizando-se o sistema rGO-P123 disperso em uma solução de AmB em PBS:DMSO (60:40). A solução foi mantida em agitação juntamente com o sólido, centrifugada e lavada com PBS gerando como produto final o sistema rGO-P123-AmB.

Para os estudos de liberação foi utilizada uma lâmpada de Xe contínua de 150 W ( $\lambda = 800 \text{ nm}$ ). Além da radiação na região do NIR foram utilizados como estímulo de liberação agitação magnética e pH 4,5. Inicialmente, os ensaios foram realizados utilizando-se uma cubeta de quartzo para acomodar a amostra de rGO-P123-AmB, porém fazia-se necessária uma etapa de centrifugação para eliminar as partículas em solução antes da análise do sobrenadante por estudos de absorção na região do UV-Vis. De maneira a eliminar a etapa de centrifugação, a amostra passou a ser acondicionada em sacos de diálise. Para acompanhar a liberação do fármaco alíquotas do sobrenadante foram recolhidas periodicamente e analisadas por espectroscopia na região do UV-Vis.

**Resultados e Discussão:** Os sistemas rGO-P123 e rGO-P123-AmB assim como seus precursores foram caracterizados por meio de diversas técnicas.

A fim de avaliarmos a eficácia das etapas de funcionalização, redução e carregamento do material foi realizada a medida de espectroscopia na região do IV (Figura 1a). O espectro de IV do rGO-P123 apresentou bandas em  $2970 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_3$ ),  $2860 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2$ ) e em  $1091 \text{ cm}^{-1}$  (C-O-C) que indicam a funcionalização do rGO com o polímero P123. No IV do sistema carregado foi observado o aparecimento da banda de deformação axial das ligações  $-\text{OH}$  em  $3300 \text{ cm}^{-1}$  que também estão presentes no espectro da AmB indicando que o sistema foi carregado com o fármaco.

A perda de massa referente à decomposição dos sistemas e da AmB devido ao aumento de temperatura foi avaliada a partir da análise termogravimétrica (Figura 1b). No termograma do rGO-P123 foram observados dois patamares de perda de massa, sendo o primeiro na faixa de  $173\text{-}340^\circ\text{C}$  referente à decomposição do polímero P123 e o segundo acima de  $350^\circ\text{C}$  devido à degradação da estrutura carbônica do material, o correspondente a 20% da massa total do rGO-P123. Comparando-se o TGA do rGO-P123-AmB com o do sistema descarregado foi possível observar uma faixa de temperatura adicional em que houve perda de massa, sendo esta referente à degradação da AmB, pois de acordo com o TGA do fármaco, sua decomposição ocorre nesta mesma faixa de temperatura ( $198\text{-}525^\circ\text{C}$ ). Desta forma, pode-se inferir que a AmB estava carregada no dispositivo.



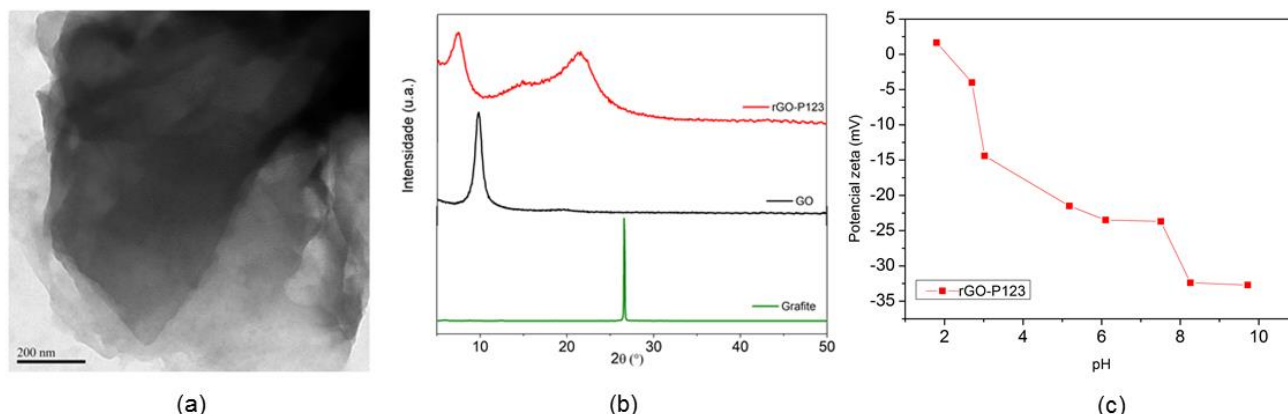
**Figura 1:** (a) Espectros de IV da AmB, rGO-P123 e rGO-P123-AmB e (b) TGA do rGO-P123, rGO-P123-AmB e AmB.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi realizada a fim de conhecermos os aspectos morfológicos do sistema rGO-P123. Através desta técnica foi observado que o sistema é composto por finas folhas empilhadas e enrugadas que compõem uma estrutura bidimensional, como observado na Figura 2a. Além disso, pode-se observar que as folhas são intactas e não apresentam imperfeições que poderiam ser ocasionados pelo processo de redução.

Através da técnica de difração de raios X de policristal foi possível observar a distância interplanar entre

as folhas e analisá-la com relação a seus precursores. No difratograma do grafite foi observado um único pico de difração em  $2\theta = 26,6^\circ$  ( $d = 3,8 \text{ \AA}$ ), enquanto que no DRX do GO foi observado um halo em  $2\theta = 10,1^\circ$  ( $d = 9,7 \text{ \AA}$ ). O aumento da distância observada no GO com relação ao grafite deve-se à inserção dos grupos oxigenados (epóxido, hidroxila e carboxila) provenientes da oxidação do material. No DRX do rGO-P123 foram observados dois halos, um com  $2\theta = 21,4^\circ$  ( $d = 4,6 \text{ \AA}$ ) referente à fase característica do rGO e outro em  $2\theta = 7,37^\circ$  ( $d = 13,3 \text{ \AA}$ ), mostrando que nem todo o GO foi reduzido e desta forma apresenta uma distância interplanar um pouco maior do que a fase do rGO, onde pode ter ocorrido um reempilhamento parcial das folhas diminuindo, assim, a distância entre elas (Figura 2b).

Por meio da medida de potencial zeta foi possível avaliar a carga superficial do dispositivo em função do pH do meio. O rGO-P123 apresentou carga superficial negativa em praticamente toda a faixa de pH empregada (pH 2 a 10), pois os grupos carboxílicos remanescentes presentes nas folhas de rGO encontravam-se desprotonados (Figura 2c).

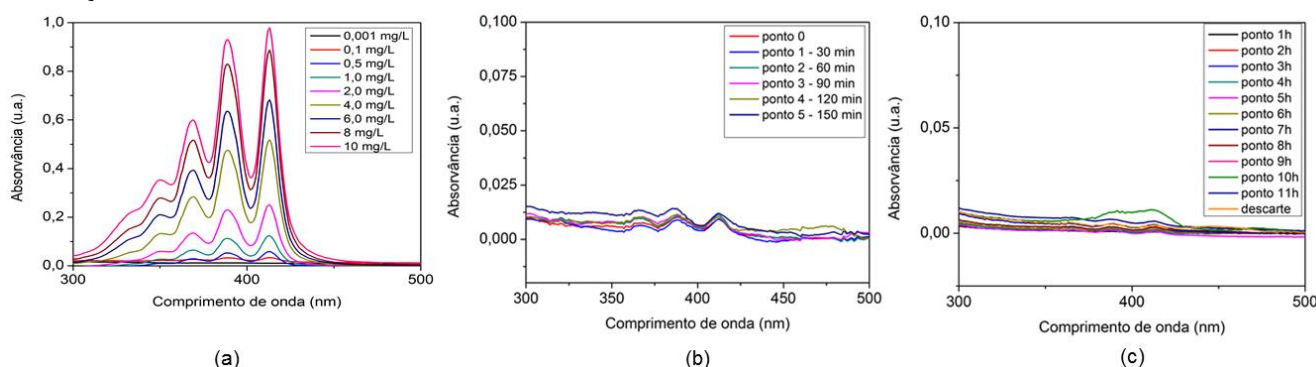


**Figura 2:** (a) MET do dispositivo rGO-P123, (b) DRX de policristal do rGO-P123, GO e grafite e (c) Potencial zeta do rGO-P123 (0,1 mg/mL) na faixa de pH 2 a 10.

O sistema carregado com AmB apresentou eficiência de carregamento de 0,01 mmol/g (o correspondente a 94% de AmB disponível para o carregamento) e os estudos de liberação foram realizados utilizando-se cubetas de quartzo e sacos de diálise para acomodar as amostras empregando agitação, pH ácido e incidência de luz na região do *NIR* ( $\lambda = 800 \text{ nm}$ ) como estímulos de liberação.

Primeiramente, o rGO-P123-AmB disperso em PBS:DMSO (60:40) e pH = 4,5 foi acomodado em uma cubeta de quartzo mantida em agitação magnética e irradiada com radiação na região do *NIR* proveniente de uma lâmpada de Xe. Entretanto, era necessário que a dispersão fosse centrifugada antes de ser analisada por espectroscopia na região do UV-Vis. Porém, mesmo após a centrifugação, ainda haviam partículas em suspensão que interferiam na análise do sobrenadante. A fim de eliminar a etapa de centrifugação e melhorar a obtenção dos espectros de UV-Vis foram empregados sacos de diálise para acomodar a amostra dispersa no mesmo sistema de solventes. Neste último estudo, a liberação do fármaco também foi monitorada observando a influência dos mesmos estímulos anteriormente utilizados.

Os espectros de UV-Vis obtidos a partir da análise do sobrenadante das amostras apresentavam perfil semelhante ao espectro da AmB pura (Figura 3a), a partir do qual foi obtido uma curva de calibração para que a quantidade de fármaco liberada pudesse ser quantificada. O perfil dos espectros obtidos pela análise de UV-Vis dos sobrenadantes (Figuras 3b e 3c) revela que houve liberação do fármaco, porém esta não pôde ser quantificada, pois os valores de absorvância das amostras foram inferiores aos compreendidos pela curva de calibração.



**Figura 3:** (a) Estudo de absorção em solução na região do UV-Vis para a AmB (em PBS:DMSO (60:40)). Estudos realizados em pH = 4,5, agitação magnética e incidência de luz na região do *NIR* ( $\lambda = 800 \text{ nm}$ ) (b) na cubeta de quartzo e (c) na membrana de diálise.

**Conclusões:** Em suma, neste trabalho foi sintetizado um novo fotodispositivo baseado em rGO funcionalizado com o polímero plurônico P123 para veiculação do fármaco AmB a fim de ser empregado no tratamento da leishmaniose. Os dados obtidos através das técnicas de caracterização permitem concluir que o sistema proposto

foi obtido com sucesso e apresenta comportamento coloidal em diferentes faixas de pH e boa estabilidade em condições fisiológicas (pH = 7,4). Adicionalmente, o rGO-P123 apresenta alta capacidade de carregamento com o fármaco (94%) cuja interação ocorre por meio de interações supramoleculares.

Os estudos de liberação foram realizados empregando-se diferentes estímulos de liberação como agitação magnética, pH ácido e irradiação com luz na região do *NIR* ( $\lambda = 800$  nm). Nestes estudos observou-se que houve liberação do fármaco, porém as quantidades liberadas foram muito pequenas para quantificação.

Este dispositivo apresenta grande potencial para ser utilizado no tratamento da leishmaniose cutânea, tendo em vista que a ação do fármaco juntamente com o calor gerado pela incidência da radiação na região do *NIR* pode ser eficiente na eliminação dos parasitas que se encontram nas lesões cutâneas. Desta forma, o fármaco será aplicado diretamente na lesão evitando que outras áreas sadias sejam afetadas, atenuando os efeitos colaterais.

### Referências bibliográficas

- <sup>1</sup> Cruz, A. K., *et al.*, *Curr. Drug Targets*, **2009**, *10*, 178.
- <sup>2</sup> Valverde, R. Doenças Negligenciadas. Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, 2013. Disponível em <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>> Acesso em: 07 fev. 2018.
- <sup>3</sup> Chappuis, F. *et al.*, *Nat. Rev. Microb.*, **2007**, *5*, 873.
- <sup>4</sup> Silveira, G. Q. *et al.*, *Micropor. Mesopor. Mat.*, **2015**, *206*, 226.
- <sup>5</sup> Santos, E. C. S. *et al.*, *New J. Chem.*, **2018**, *42*, 671.
- <sup>6</sup> Robinson, J. T. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 6825.
- <sup>7</sup> Santos, T. C., Ronconi, C. M. *J. CO<sub>2</sub> Util.*, **2017**, *20*, 292.