

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
BIOQUÍMICA-FARMACÊUTICA
ÁREA DE TECNOLOGIA QUÍMICO-FARMACÊUTICA

Heidie da Silva Torres

Caracterização de cubossomos não-iônicos em presença de proteínas
modelo: uma abordagem estrutural e funcional

São Paulo
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
BIOQUÍMICA-FARMACÊUTICA
ÁREA DE TECNOLOGIA QUÍMICO-FARMACÊUTICA

Heidie da Silva Torres

Caracterização de cubossomos não-iônicos em presença de proteínas
modelo: uma abordagem estrutural e funcional

Versão original

Dissertação para obtenção do título de Mestre em
Ciências; Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Tec-
nologia Químico-Farmacêutica.

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

T693c	Torres, Heidie Caracterização de cubossomos não-iônicos em presença de proteínas modelo: uma abordagem estrutural e funcional / Heidie Torres. - São Paulo, 2023. 82 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Barbosa, Leandro 1. Drug Delivery. 2. Cubossomos. 3. Lisozima. 4. Curcumina. I. T. II. Barbosa, Leandro, orientador.
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Heidie da Silva Torres

Caracterização de cubossomos não-iônicos em presença de proteínas modelo: uma abordagem estrutural e funcional; Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências; Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Tecnologia Químico-Farmacêutica.

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza Barbosa
Orientador/presidente

Prof. Dr. André Moreni Lopes

1o. Examinador

Profa. Dra. Fernanda Poletto

2o. Examinador

Prof. Dr. Valter Araujo Feitosa

3o. Examinador

São Paulo, 02 de Fevereiro de 2024.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador a oportunidade de desenvolver este projeto de pesquisa.

Agradeço à minha família, por se entusiasmar com minhas conquistas, não importa o tamanho delas.

Agradeço à minha amiga de pesquisa e de vida, Amanda Bellini, por toda a companhia, e por se fazer presente em todas as situações que estamos vivendo ao longo de nossas pesquisas.

Agradeço à pesquisadora Dr^a Iris Renata que, enquanto pós doutora no nosso grupo de pesquisa, se fez sempre disponível a me auxiliar e a me ajudar a encontrar as melhores soluções para as situações que me iam surgindo.

Agradeço aos demais colegas de laboratório - Amanda Santos, Luiz Fernando e Juliana Raw, pela companhia maravilhosa ao longo destes dois anos.

Agradeço à pesquisadora Tania M. Yoshimura, que em nome da professora Martha S. Ribeiro, pacientemente me ensinou e auxiliou em toda a parte de microbiologia.

Agradeço à minha amiga de laboratório e de vida, Clara Bispo, pelas vivências e pelo auxílio à execução de meus experimentos com microrganismos no Laboratório Nacional de Biociências, LNBio.

Agradeço à minha amiga pessoal e de programa de pós graduação, Natália Santos, que me encorajou a ingressar neste mestrado desde o momento em que soube da minha inscrição, sempre se colocando a disposição para o que eu precisasse, inclusive nesta etapa de conclusão quanto aos trâmites a serem realizados.

Agradeço ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), pela oportunidade de desenvolver meu projeto, contando com os melhores equipamentos e os mais experientes profissionais. Agradeço também a Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), por abrirem as portas para que experimentos de suma importância neste projeto fossem executados.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), por ter me abraçado e me acolhido como aluna da faculdade.

Agradeço à Universidade de São Paulo (USP), pela excelência enquanto instituição. É um prazer inenarrável carregar o nome da melhor universidade do nosso país em meu currículo enquanto eterna aprendiz.

Agradeço a todos os outros que, de forma direta ou indireta, fizeram esse mestrado acontecer.

Agradeço a mim, pela realização deste sonho, mesmo com tantos percalços; os demais momentos fizeram tudo valer a pena.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço também à FAPESP (2015/15822-1) e ao CNPq (155970/2018-6) pelo suporte financeiro.

*“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova
pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela.”
(Albert Einstein)*

RESUMO

TORRES, H. S. Caracterização de cubossomos não-iônicos em presença de proteínas modelo: uma abordagem estrutural e funcional. 2023. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Uma área de pesquisa que vem ganhando muita atenção nos últimos anos é a nanomedicina, com especial atenção para os sistemas com entrega controlada de fármacos, ou *drug delivery*. Dentre as diversas nanopartículas utilizadas para este fim, destacam-se os sistemas formados por lipídeos e polímeros, como por exemplo os lipossomos e os cubossomos. Neste trabalho, é estudada a influência estrutural da encapsulação da lisozima e da curcumina, compostos modelo. Lisozima é uma enzima antimicrobiana produzida por animais e que faz parte do sistema imunológico. Ela é uma hidrolase glicosídica que catalisa a hidrólise dos componentes da parede celular de bactérias gram-positivas. Esta hidrólise, por sua vez, compromete a integridade das paredes celulares, causando a lise (e como consequência a morte) das bactérias. Curcumina é um composto cristalino de cor amarelada brilhante, encontrada no caule da *Curcuma longa* (ou açafrão), que tem sido utilizada como corante ou até mesmo como aditivo alimentar. Este composto tem sido uma grande aposta no tratamento de doenças crônicas como inflamação, artrite, síndrome metabólica, doença hepática, obesidade, doenças neurodegenerativas e principalmente cânceres, sendo também utilizada em estudos como potencial agente antibacteriano. O principal objetivo deste trabalho é construir sistemas nanoestruturados com potencial de atuarem como sistemas antimicrobianos, com a liberação controlada de ambos os fármacos. Estes sistemas são compostos por cubossomos de fitantriol (PHY) em ausência e presença da lisozima, da curcumina e de suas combinações, a fim de analisar ação antimicrobiana conjunta da lisozima e da curcumina. As técnicas biofísicas utilizadas para caracterização são SAXS (espalhamento de raios-X em baixos ângulos), DLS (espalhamento dinâmico de luz), Cryo-TEM (criomicroscopia eletrônica de transmissão) e NTA (análise de rastreamento de nanopartículas). Foi possível verificar que as formulações lipídicas são eficazes na formação de estruturas cúbicas com estabilidade desejável. As nanopartículas cúbicas demonstraram alta capacidade de encapsulação da lisozima e da curcumina. A cinética de liberação desses medicamentos mostrou-se promissora, sugerindo que a encapsulação dos fármacos é eficaz, bem como sua liberação controlada e direcionada. Duas linhagens de bactérias foram estudadas, sendo que a *E. coli*, não sofreu nenhum dano citotóxico, enquanto a *Bacillus subtilis* sim. Tal resultado indica o potencial antimicrobiano do sistema para alguns tipos de bactérias.

Palavras-chaves: Drug delivery, cubossomos, lisozima, curcumina.

ABSTRACT

TORRES, H. S. Characterization of non-ionic cubosomes in the presence of model proteins: a structural and functional approach. 2023. 69f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

An area of research that has gained significant attention in recent years is nanomedicine, with a particular focus on *drug delivery systems*. Among the various nanoparticles used for this purpose, lipid and polymer-based systems, such as liposomes and cubosomes, stand out. This study investigates the structural influence of encapsulating lysozyme and curcumin, model compounds. Lysozyme is an antimicrobial enzyme produced by animals and is part of the immune system. It is a glycosidic hydrolase that catalyzes the hydrolysis of components in the cell walls of gram-positive bacteria. This hydrolysis compromises the integrity of cell walls, leading to the lysis (and consequently the death) of bacteria. Curcumin is a bright yellow crystalline compound found in the stem of *Curcuma longa* (or turmeric), commonly used as a dye or even a food additive. It has been a significant focus in the treatment of chronic diseases such as inflammation, arthritis, metabolic syndrome, liver disease, obesity, neurodegenerative diseases, and especially cancers. It is also studied as a potential antibacterial agent. The main objective of this work is to construct nanostructured systems with the potential to act as antimicrobial agents, with controlled release of both drugs. These systems consist of phytantriol (PHY) cubosomes in the absence and presence of lysozyme, curcumin, and their combinations to analyze the joint antimicrobial action of lysozyme and curcumin. Biophysical techniques used for characterization include Small-Angle X-ray Scattering (SAXS), Dynamic Light Scattering (DLS), Cryo-Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM), and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). It was observed that lipid formulations are effective in forming cubic structures with desirable stability. Cubic nanoparticles have demonstrated high encapsulation capacity for lysozyme and curcumin. The release kinetics of these drugs have shown promise, suggesting that drug encapsulation is effective, as well as their controlled and targeted release. Two bacterial strains were studied, with *E. coli* showing no cytotoxic damage, while *Bacillus subtilis* did. This result indicates the antimicrobial potential of the system against certain types of bacteria.

Keywords: Drug delivery, cubosomes, lysozyme, curcumin.

Lista de Abreviações e siglas

CDD - Câmera de Dispositivo Acoplada

Cryo-TEM - Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão

DLS - Espalhamento Dinâmico de Luz

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Médium

EE - Eficiência de Encapsulação

EL - Eficiência de Liberação

ER - Receptores de Estrogênio

FBS - Soro Fetal Bovino

GMO - Monooleína

HER2 - Receptores 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

NTA - Análise de Rastreamento de Nanopartículas

PEO - Polietileno

PPO - Polipropileno

PR - Receptores de Progesterona

SAXS - Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

Lista de Figuras

- 1 Representação esquemática das dimensões de materiais na escala nanométrica. As reta superior indica a escala de comprimento, destacando diferentes estruturas e materiais, tais como nanopartículas, nanofios e nanotubos. As dimensões são apresentadas em nanômetros (nm), ilustrando a variedade de tamanhos observados em materiais na escala nanométrica. Fonte: BetaEQ. 14
- 2 Representação esquemática de uma nanopartícula lipídica de fase cúbica, destacando as regiões de encapsulação de moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas e anfífilas. A estrutura exibe a organização lipídica em uma matriz cúbica, com áreas distintas para acomodar diferentes tipos de moléculas. Fonte: adaptada de [1]. 18
- 3 Esquematização da estrutura química 2D do Pluronic F-127. Fonte: Pubchem 19
- 4 Representação esquemática da estrutura anfífilica de uma molécula. A molécula é composta por uma região hidrofílica, localizada na cabeça polar, e uma região hidrofóbica, ao longo da cauda apolar. Fonte: adaptada de [2] 19
- 5 Estrutura química da monooleína. A monooleína é um lipídio comum encontrado na natureza, composto por uma cadeia hidrofóbica longa e uma cabeça hidrofílica. Fonte: [3] 20
- 6 Esquematização da estrutura química 2D do Fitantriol. Fonte: Pubchem . 20
- 7 Esquema do método *top-down* para preparo de amostras. Neste processo, uma amostra inicial de tamanho macroscópico (topo) é reduzida em escala até alcançar as dimensões desejadas para análise ou aplicação específica (base). Fonte: o autor. 21
- 8 Esquema do método *bottom-up* para preparo de amostras. Neste processo, as estruturas são construídas a partir de componentes moleculares ou nanopartículas individuais (topo), que se auto-organizam ou são montadas em uma escala maior para formar a amostra final (base). Fonte: o autor. . 22
- 9 Estrutura cristalográfica da lisozima. Nesta representação, a estrutura tridimensional da lisozima é mostrada, destacando seus domínios funcionais e a organização cristalina. Fonte: Wikipedia 23
- 10 Estrutura química da curcumina. Sua estrutura é caracterizada por dois anéis de fenol ligados a uma cadeia de carbono central com grupos metoxi e hidroxila. Fonte: Pubchem 24
- 11 Sistema *home-made* construído para a preparação de cubossomos de modo reprodutível, com velocidade de injeção controlada. Com ele, a solução de F-127 (A) é transferida de forma automática ao *becker* contendo a solução de fitantriol (B). Fonte: o autor. 32

12	Representação do potencial zeta. O potencial zeta é uma medida da carga elétrica na superfície de partículas dispersas em um líquido. O potencial zeta é uma importante propriedade físico-química em sistemas coloidais e influencia a estabilidade e o comportamento de dispersão das partículas. Fonte: UTFPR	35
13	Espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS). Os raios-X incidentes (representados pela linha reta) interagem com as estruturas da amostra, resultando em espalhamento de raios-X em direções próximas à da fonte incidente (ângulos pequenos). Fonte: adaptado de Anton Paar	39
14	Diagrama de fases da composição de temperatura do sistema binário fitantriol/água. As diferentes fases, como a fase lamelar, cúbica, hexagonal e isotrópica, são representadas por regiões distintas no gráfico. As linhas de transição de fase indicam os pontos de equilíbrio entre diferentes fases na temperatura e composição específicas. Fonte: adaptada de [4]	41
15	Microscopia eletrônica de varredura de <i>Escherichia coli</i> , cultivada em cultura e aderida a uma lamínula. A microscopia eletrônica de varredura fornece uma visão detalhada da morfologia e organização das bactérias em nível microscópico, Fonte: Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH - NIAID.	45
16	Microscopia eletrônica de varredura de <i>Bacillus subtilis</i> . <i>Bacillus subtilis</i> é uma bactéria gram-positiva comumente encontrada no solo e conhecida por suas propriedades metabólicas diversificadas e sua capacidade de formar esporos resistentes. Fonte: adaptada de Trends in Microbiology.	46
17	Distribuição dos tamanhos (a) e polidispersão (b) das nanopartículas cúbicas pela técnica de DLS.	48
18	Carga superficial das nanopartículas cúbicas pela técnica de DLS.	49
19	Dados de tamanho das nanopartículas obtidos através da técnica de NTA.	50
20	Dados de concentração para as nanopartículas em solução através da técnica de NTA.	51
21	Dados de toxicidade obtidos através do ensaio de viabilidade celular com a linhagem HaCat.	52
22	Dados de toxicidade obtidos através do ensaio de viabilidade celular com a linhagem MDA-MB-231.	53
23	Distribuição dos tamanhos (a) e polidispersão (b) das nanopartículas cúbicas na presença da lisozima e da curcumina pela técnica de DLS.	55
24	Carga superficial das nanopartículas cúbicas na presença da lisozima e da curcumina pela técnica de DLS.	56

25	Distribuição dos tamanhos (a) e polidispersão (b) das nanopartículas cúbicas na presença da lisozima e da curcumina no intervalo de 30 dias pela técnica de DLS.	58
26	Carga superficial das nanopartículas cúbicas na presença da lisozima e da curcumina no intervalo de 30 dias pela técnica de DLS.	59
27	Dados de tamanho das nanopartículas na presença da lisozima e da curcumina obtidos através da técnica de NTA.	60
28	Dados de concentração para as nanopartículas em solução, na presença da lisozima e da curcumina através da técnica de NTA.	61
29	Dados obtidos através do ensaio de liberação para a lisozima encapsulada pelo cubossomo.	62
30	Dados obtidos através do ensaio de liberação para a curcumina encapsulada pelo cubossomo.	63
31	Dados obtidos através do ensaio de liberação para a lisozima e a curcumina encapsuladas pelo cubossomo.	64
32	Dados obtidos através da técnica de SAXS para as amostras de cubossomo em presença ou ausência dos fármacos.	65
33	Imagem de Cryo-TEM para a amostra de cubossomo com 0,5 mg/ml de lisozima (cub_liso) preparada através do método de sonificação, e seus padrões correspondentes de Transformada Rápida de Fourier (FFT).	67
34	Resultados obtidos para a bactéria <i>Bacillus subtilis</i> em função das concentrações de cubossomo utilizadas	68
35	Resultados obtidos para a bactéria <i>Escherichia coli</i> em função das concentrações de cubossomo utilizadas	69
36	Fluxo de trabalho realizado durante a execução deste projeto de mestrado. Em verde, os experimentos/análises que foram executados; em vermelho, os que complementam o trabalho e ainda não foram realizados para os sistemas apresentados.	72

Lista de Tabelas

1	Descrição das amostras sintetizadas e analisadas ao longo do período de execução deste projeto de mestrado.	33
2	Concentrações de cubossomo e de lisozima utilizadas no ensaio de viabilidade celular	52
3	Dados de eficiência de encapsulação para as amostras de cubossomo e os respectivos fármacos encapsulados	62
4	Posição dos picos obtidos através da técnica de SAXS.	66
5	Comparação dos valores de referência para as simetrias $In3m$ e $Pn3m$ com os valores encontrados para as amostras analisadas através dos picos de SAXS.	66

Sumário

1	Introdução	14
1.1	Nanotecnologia	14
1.2	Resistência Antibiótica	15
1.3	Sistemas para entrega controlada de fármacos: <i>drug delivery systems</i> . . .	16
1.3.1	Cubossomos	17
1.4	Moléculas Anfífilas	19
1.4.1	Monooleína	20
1.4.2	Fitantriol	20
1.5	Métodos de preparo dos cubossomos	20
1.5.1	Método <i>Top-down</i>	21
1.5.2	Método <i>bottom-up</i>	22
1.6	Ativos para incorporação nos cubossomos	23
1.6.1	Lisozima	23
1.6.2	Curcumina	24
1.7	Ensaio biológicos	25
1.7.1	Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	25
1.7.2	Susceptibilidade bacteriana	26
2	Objetivos	28
2.1	Objetivo Geral	28
2.2	Objetivos Específicos	28
3	Materiais e Métodos	29
3.1	Materiais	29
3.1.1	Cubossomos	29
3.1.2	Tampão HEPES	29
3.1.3	Preparo celular	29
3.2	Equipamentos	30
3.3	Preparo de amostras	31
3.4	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	33
3.5	Potencial- ζ (ZP)	34
3.6	Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	36
3.7	Eficiência de encapsulação (E.E.) e liberação (E.L.)	37
3.8	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)	39
3.9	Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)	42
3.10	Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis)	43
3.11	Viabilidade celular	43

3.12	Susceptibilidade bacteriana	44
4	Resultados e discussões	47
4.1	Cubossomos com diferentes concentrações de lisozima	47
4.1.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS/ Potencial Zeta)	47
4.1.2	Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	49
4.1.3	Viabilidade celular	51
4.2	Cubossomos com lisozima e curcumina encapsuladas	54
4.2.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	54
4.2.2	Estabilidade coloidal das amostras ao longo do tempo	57
4.2.3	Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	60
4.2.4	Eficiência de Encapsulação	61
4.2.5	Eficiência de Liberação	62
4.2.6	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)	65
4.2.7	Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)	66
4.2.8	Susceptibilidade bacteriana	67
5	Conclusão	70

1 Introdução

1.1 Nanotecnologia

Nanotecnologia é a área da ciência que estuda fenômenos da matéria em escala nanométrica [5, 6, 7]. O termo foi inicialmente utilizado pelo químico austríaco Richard Zsigmondy, que o usou para se referir à caracterização de partículas quanto ao seu tamanho.

Sendo uma das mais promissoras área da ciência [8], a nanotecnologia permite que a nanociência seja aplicada em diversos problemas atuais, que envolvam a Química, Física, Medicina, diversas áreas da Engenharia, dentre outros. Essa interdisciplinaridade torna possível que a nanotecnologia seja utilizada da forma mais precisa possível para fins diversos, dentre eles as aplicações medicinais [9].

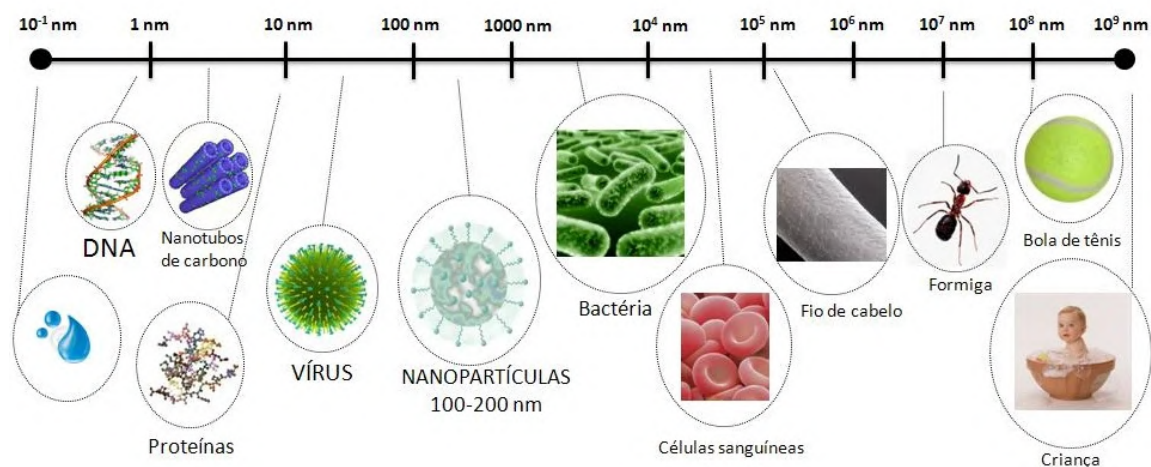


Figura 1: Representação esquemática das dimensões de materiais na escala nanométrica. A reta superior indica a escala de comprimento, destacando diferentes estruturas e materiais, tais como nanopartículas, nanofios e nanotubos. As dimensões são apresentadas em nanômetros (nm), ilustrando a variedade de tamanhos observados em materiais na escala nanométrica. Fonte: BetaEQ.

Os progressos notáveis em tecnologias como bioinformática, biologia de sistemas e bio-imagens tornam possível a aplicação da nanotecnologia no enfrentamento de questões fundamentais que perduram ao longo dos anos nas áreas de biofísica e bioquímica. Essa abordagem pode contribuir significativamente para a compreensão das alterações moleculares que ocorrem nesses materiais [9]. Na área de nanomedicina, o progresso da nanotecnologia contribui para o desenvolvimento de novos medicamentos e tratamentos clínicos [9] que visam combater doenças que demonstram certa resistência às formas tradicionais de terapia.

Hoje em dia, especial atenção tem sido dada para os materiais nanométricos em aplicações na área da saúde e medicina, como carregadores de fármacos para o trata-

mento de diversas doenças [10]. Em especial, nos últimos dois anos ocorreu um grande desenvolvimento de sistemas lipídicos nanoestruturados, muito por causa dos avanços científicos gerados pela pandemia do SARS-CoV-2 [11, 12].

O uso de nanopartículas como transportadoras de moléculas ativas para administração controlada de fármacos tornou-se alvo de estudo de inúmeros grupos de pesquisa ao redor do mundo. Muitos avanços no tratamento do câncer têm sido alcançados através do uso de nanofármacos, como a utilização do Doxil[®], primeiro nanofármaco aprovado pelo órgão federal americano FDA em 1995 para tratamento de tumores [13]. Além do câncer, os nanossistemas também vem sendo explorados para tratamento de doenças degenerativas, como o Mal de Parkinson [14] e de Alzheimer [15], abrindo um variado leque de novas opções para o eventual tratamento não só das neuropatias, mas também de outras enfermidades, como por exemplo a Leishmaniose [16].

A utilização dos nanocarregadores surgem com o propósito de superar diversas dificuldades físico-químicas inerentes aos fármacos, como a baixa solubilidade em água para fármacos hidrofóbicos, a escassa biocompatibilidade resultando em curtos períodos de circulação no organismo e a distribuição generalizada dos fármacos no organismo, ampliando significativamente os efeitos adversos associados [10]. Essa abordagem se torna crucial devido às propriedades das nanopartículas que as diferem dos outros materiais, como os encontrados na forma bulk, como o aumento da área superficial do material, permitindo a exploração de novas aplicações para os materiais nanoestruturados. A capacidade de controlar suas propriedades através de modificações na superfície, como o ajuste do tamanho, forma e funcionalização com grupos químicos específicos, amplia ainda mais o potencial desses nanomateriais.

1.2 Resistência Antibiótica

A história da resistência antibiótica é diretamente ligada à descoberta dos primeiros antibióticos e à subsequente era antibiótica. A descoberta desses fármacos representou um marco essencial no tratamento de doenças infecciosas [17, 18]. Na década de 1920, o pioneirismo de Alexander Fleming resultou na descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico amplamente utilizado, inaugurando a era dos agentes antimicrobianos [18]. No entanto, o sucesso inicial dos antibióticos foi seguido pela era pós-antibiótica, caracterizada pelo aumento alarmante da resistência bacteriana [19]. A capacidade natural das bactérias de se adaptarem e evoluírem rapidamente levou ao desenvolvimento de cepas resistentes aos antibióticos existentes. Esse fenômeno, conhecido como resistência antibiótica, tornou-se uma ameaça global à saúde pública.

A resistência antibiótica é um desafio complexo, amplificado pela resistência bacteriana e pela resistência antimicrobiana, abrangendo não apenas antibióticos, mas também outros agentes antimicrobianos. O uso indiscriminado e inadequado de antibióticos em medicina

humana, veterinária e na agricultura tem contribuído para o aumento dessa resistência. Estudos reinteram a necessidade urgente de se abordar o tema de forma abrangente, levando em consideração os efeitos globais de tal situação [19, 17, 20].

Diante desse cenário crítico, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos. Pesquisas como as realizadas por Rossato [21], que relaciona a pandemia de coronavírus com o agravamento da resistência antimicrobiana, ou por Llor [22], que associa o uso em excesso de antibióticos com o aumento da resistência antimicrobiana, destacam a importância de inovações terapêuticas para combater infecções em estágio de aumento de resistência antibiótica. Para isto, a avaliação da resistência antibiótica é essencial na compreensão da gravidade do problema e na orientação de estratégias de prevenção e controle [19].

Sendo assim, a abordagem da resistência antibiótica exige uma colaboração global, regulamentação rigorosa do uso de antibióticos, bem como a promoção de práticas responsáveis de prescrição medicamentosa e investimentos contínuos em pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. A superação desse desafio crítico é vital para garantir a eficácia contínua dos tratamentos antimicrobianos e preservar a saúde pública mundial [19, 23].

1.3 Sistemas para entrega controlada de fármacos: *drug delivery systems*

O modelo de entrega de fármacos, ou *drug delivery*, é uma modalidade de entrega de fármacos que vem crescendo substancialmente nos últimos anos, devido aos avanços tecnológicos associados a este tipo de entrega [24, 25]. Fatores como aumento nos custos de manutenção de entregas convencionais de fármacos, complicações ao paciente na entrega desses medicamentos de forma tradicional, e o número de empresas que têm se dedicado ao desenvolvimento na área de farmácia são motivos que levam o modelo de entrega controlada de fármacos ganhar a atenção dos pesquisadores [26, 27, 28].

Dr. Gordon Flynn, pesquisador de renome na área farmacêutica, define o sistema de entrega controlada de fármacos como "o uso de qualquer meio possível, seja químico, físico-químico ou mecânico, para regular a taxa de acesso de uma droga ao compartimento central do corpo ou, em alguns casos, diretamente ao tecidos envolvidos" [25]. Essa definição traz à tona as principais qualidades desses modelo de entrega de fármacos, como a possibilidade de entrega exclusiva ao organismo desejado, a utilização de componentes específicos à doença em questão, a proteção do corpo evitando que locais indesejados no organismo recebam este fármaco, a liberação controlada deste fármaco ao organismo e principalmente, a redução da dose de fármaco necessária para combater tal doença [25]. Todas essas vantagens levam os sistemas de entrega controlada de fármacos a serem um dos mais cobiçados pelas indústrias farmacêuticas ao redor do mundo; nos Estados Uni-

dos, nos anos de 2000, essa modalidade já atingia cerca de 40% das comercializações no país [24].

Dentre as estruturas mais utilizadas como encapsulador de fármacos para a entrega controlada, destacam-se as estruturas lipossomais, que quimicamente se caracterizam como partículas com tamanho entre algumas dezenas de nanômetros a micrômetros. Os lipossomas podem variar de tamanho e morfologia de acordo com sua composição e preparo [24]. Basicamente, são constituídos de uma bicamada fosfolipídica que encapsula uma área aquosa, sendo capazes de se apresentarem na forma líquida ou sólida e tendo sua distribuição ao longo do organismo receptor dependentes de sua carga na vesícula [25, 24]. Vesículas carregadas negativamente apresentam a possibilidade de entrada nas células do organismo por meio da fusão, sendo eliminadas do organismo de forma mais rápida, enquanto as vesículas neutras são incorporadas às células por meio do processo de fagocitose, sendo as vesículas neutras e as positivas eliminadas do organismo de forma mais lenta [25]. Para além dos lipossomos, outras nanopartículas vêm se destacando na literatura, dentre elas os cubossomos.

1.3.1 Cubossomos

Os cubossomos são partículas nanoestruturadas compostas por uma combinação específica de alguns tipos de lipídios, como a monoleína e o fitantriol (Fig. 2) em presença de um polímero não-iônico utilizado como estabilizador da fase cúbica. Os cubossomos são estruturas organizadas em uma espécie de bicamada lipídica, contínua e altamente curvada. Essas estruturas são organizadas em três dimensões sendo compostas por canais de água não conectados (Fig. 2). Devido a sua estrutura única, essas partículas podem ser utilizadas tanto para a encapsulação de uma droga altamente hidrofóbica, justamente nessa região do interior lipofílico, bem como um fármaco altamente hidrofílico, nos canais de água, ou ainda na interface polar/apolar dos lipídeos. Devido a essa sua geometria especial e também às suas propriedades de encapsulação, os cubossomos são considerados veículos promissores para diferentes rotas de administração.

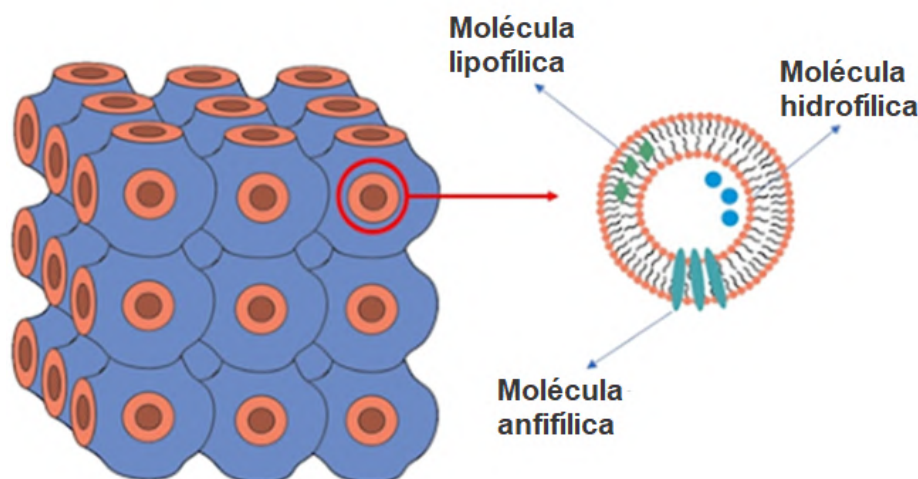


Figura 2: Representação esquemática de uma nanopartícula lipídica de fase cúbica, destacando as regiões de encapsulação de moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas e anfifílicas. A estrutura exibe a organização lipídica em uma matriz cúbica, com áreas distintas para acomodar diferentes tipos de moléculas. Fonte: adaptada de [1].

Os cubossomos surgiram como uma plataforma promissora para a entrega controlada de proteínas e peptídeos, chamando a atenção de vários grupos de pesquisa. Em um estudo recente realizado por Boge *et al.* [29], foi demonstrado o potencial uso de cubossomos na proteção do peptídeo LL-37, conhecido por sua atividade antimicrobiana, contra a degradação proteolítica. O resultado foi um efeito antimicrobiano significativamente aprimorado em comparação com o peptídeo não encapsulado. Essa descoberta sugere que os cubossomos podem desempenhar um papel crucial na preservação da integridade e eficácia de peptídeos antimicrobianos. Além disso, a literatura destaca a versatilidade dos cubossomos na encapsulação de uma variedade de agentes terapêuticos, incluindo medicamentos e compostos bioativos. Estudos enfatizaram sua capacidade de encapsular moléculas como lisozima [30], curcumina [31] e até nanocristais metálicos como magnetita, óxido de prata e cobre [32]. Essa versatilidade caracteriza os cubossomos como um sistema eficiente de entrega de fármacos para proteínas e peptídeos antimicrobianos [33].

O papel protetor dos cubossomos contra a degradação proteolítica é particularmente notável, pois aborda um desafio comum na entrega de agentes bioativos. A encapsulação de peptídeos e proteínas antimicrobianos dentro dos cubossomos não apenas os protege da quebra enzimática, mas também facilita a liberação controlada, garantindo um efeito terapêutico sustentado e direcionado. O sucesso demonstrado dos cubossomos na encapsulação de vários compostos bioativos destaca seu potencial como um sistema de entrega de fármacos versátil e eficiente. À medida que a pesquisa nesse campo avança, os cubossomos continuam a ser considerados promissores em aprimorar os resultados terapêuticos de proteínas e peptídeos antimicrobianos, abrindo a possibilidade para o desenvolvimento de tratamentos inovadores para uma variedade de condições médicas.

Para a síntese dos cubossomos, dois lipídios vêm sendo os mais utilizados ao longo dos

anos. Ambos apresentam boa biocompatibilidade, além de apresentarem bons resultados em teste *in vivo* [34], sendo eles a monooleína [35] e o fitantriol [4, 36], que serão apresentadas no próximo tópico. Em seu preparo, é também necessário a adição de um agente estabilizador, que impeça a formação de nanopartículas agregadas. O mais utilizado para este fim é o Pluronic® F127, um polímero tribloco linear, não-iônico, que contém um bloco de óxido de polipropileno (PPO - hidrofóbico) entre dois blocos de óxido de polietileno (PEO - hidrofílico) e atua como estabilizador através da adsorção e incorporação de seus blocos hidrofóbicos na superfície ou internamente às nanopartículas, mantendo a estrutura cúbica.

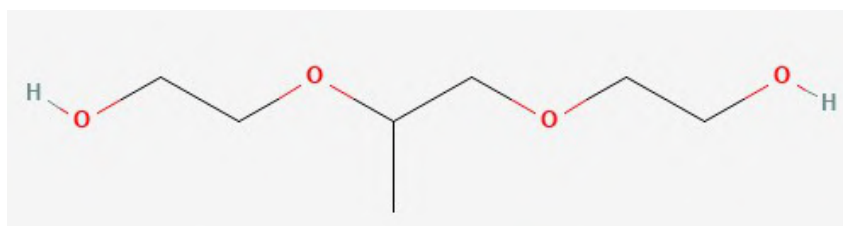


Figura 3: Esquematização da estrutura química 2D do Pluronic F-127. Fonte: Pubchem

1.4 Moléculas Anfílicas

Moléculas anfílicas são definidas por possuírem em sua estrutura grupos polares, que possuem alta afinidade aquosa (hidrofílicos), localizados na região denominada cabeça, e grupos apolares, com pouca afinidade com a água (hidrofóbicos), geralmente localizados na cauda de estrutura carbônica [37]. Quando expostos à soluções aquosas, essas moléculas apresentam a propriedade de se auto agregarem, propriedade esta que é diretamente relacionada ao parâmetro de empacotamento crítico (CPP) [38], que determina a máxima distância possível entre as regiões hidrofóbicas e a maior interação das regiões hidrofílicas com a água. Essa relação leva à formação das mais variadas estruturas, como os cubosomas [39].

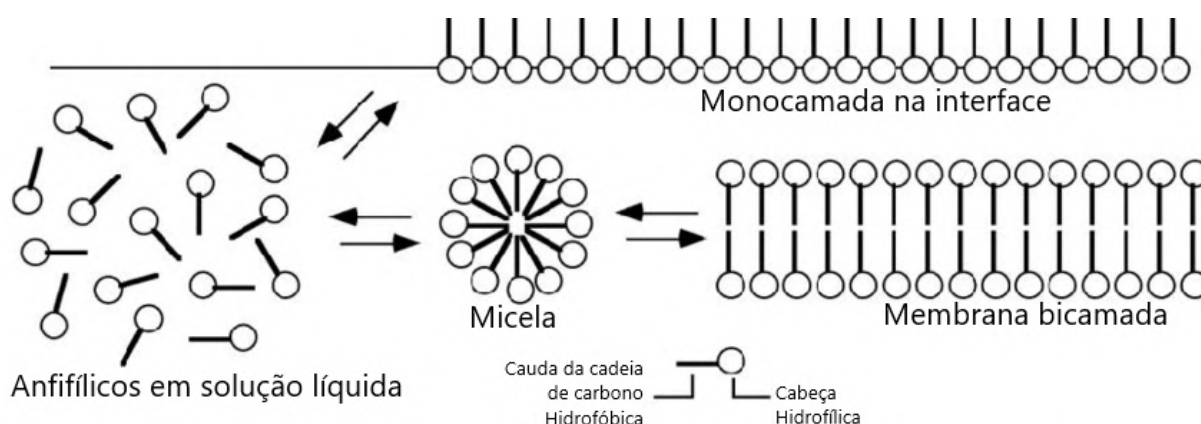


Figura 4: Representação esquemática da estrutura anfílica de uma molécula. A molécula é composta por uma região hidrofílica, localizada na cabeça polar, e uma região hidrofóbica, ao longo da cauda apolar. Fonte: adaptada de [2]

1.4.1 Monooleína

A monooleína, lipídio muito utilizado na síntese de nanopartículas para entrega controlada de fármacos, possui aplicações desde a estabilização da solução emulsificada até cristalização de proteínas [35]. Possui uma cadeia de hidrocarboneto, ligada a uma estrutura de glicerol por uma ligação éster. Sua polaridade torna possível a ligação de hidrogênio entre a composição química da monooleína e a água em solução aquosa [35].

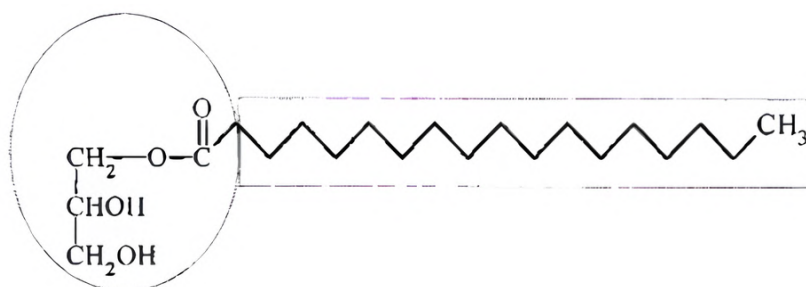


Figura 5: Estrutura química da monooleína. A monooleína é um lipídio comum encontrado na natureza, composto por uma cadeia hidrofóbica longa e uma cabeça hidrofílica. Fonte: [3]

1.4.2 Fitantriol

O fitantriol é um líquido com elevada viscosidade, comumente utilizado no preparo de cosméticos [4, 36]. Com fórmula 3,7,11,15-tetrametil-1,2,3-hexadecanetriol, o fitantriol se caracteriza como álcool com três grupos hidroxila na extremidade da molécula, ligados a uma extensa cadeia de carbono localizada na outra extremidade. O fitantriol tem ganhado interesse maior na biomedicina, em comparação à monooleína, por apresentar características mais desejadas a este tipo de aplicação, como estabilidade estrutural, grande porcentagem de pureza em relação à monooleína, graças à ausência do grupo éster em sua composição [4, 36].

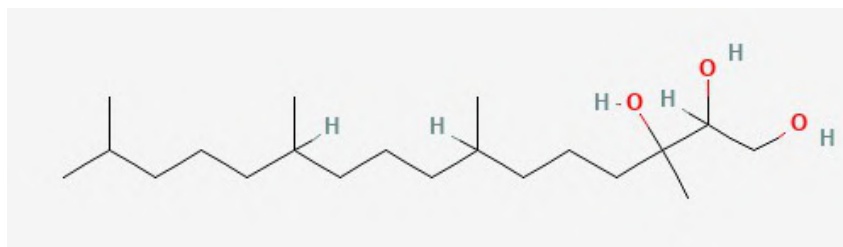


Figura 6: Esquematização da estrutura química 2D do Fitantriol. Fonte: Pubchem

1.5 Métodos de preparo dos cubossomos

Há dois métodos principais de preparo de nanopartículas lipídicas de fase cúbica: o método *top-down* e o *bottom-up*. Ambos são discutidos com mais detalhes a seguir.

1.5.1 Método *Top-down*

O método "*top-down*" é uma técnica amplamente empregada na preparação de cubossomos, sendo realizada em duas etapas. Na primeira etapa, ocorre a formação da fase cúbica viscosa em massa, alcançada pela mistura de lipídios com estabilizadores para evitar a agregação. Em seguida, o resultado da etapa anterior é disperso em meio aquoso por meio da aplicação de alta energia, como homogeneização de alta pressão ou sonicação, resultando na formação dos cubossomos [40, 41, 42].

No entanto, um desafio na produção em larga escala usando a abordagem "*top-down*" é a necessidade prévia da formação da estrutura cúbica viscosa [40]. Para dispersar a fase cúbica em nanocubossomos, é necessário aplicar uma quantidade significativa de energia, o que pode limitar a incorporação de ingredientes sensíveis à temperatura, especialmente peptídeos e proteínas. Além disso, os cubossomos preparados por meio dessa abordagem frequentemente coexistem com vesículas, como as nanopartículas dispersas da fase cristalina líquida lamelar ou estruturas semelhantes a vesículas [40].

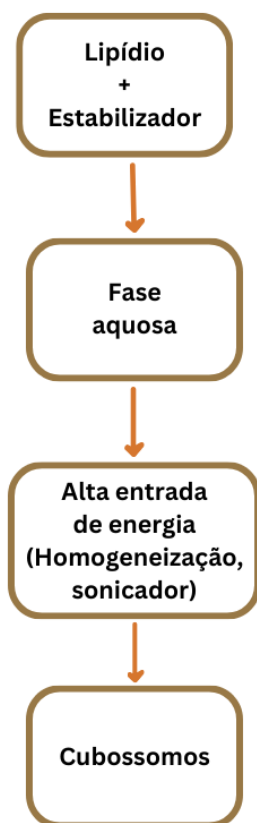


Figura 7: Esquema do método *top-down* para preparo de amostras. Neste processo, uma amostra inicial de tamanho macroscópico (*topo*) é reduzida em escala até alcançar as dimensões desejadas para análise ou aplicação específica (*base*). Fonte: o autor.

1.5.2 Método *bottom-up*

O método "*bottom-up*" oferece uma alternativa para a produção de cubossomos, sendo realizada a temperaturas ambiente por meio da cristalização a partir de precursores [40, 41, 42]. Este método, conhecido como método de precursor líquido ou diluição de solvente, envolve a dispersão de uma mistura composta por lipídios formadores de cristal líquido, polímero e um hidrótropo em excesso de água a 80°C com uma entrada mínima de energia para formar nanopartículas discretas. O hidrótropo desempenha um papel fundamental na criação dos precursores líquidos pela dissolução dos lipídios e prevenção da formação de uma fase víscida de cristal líquido em alta concentração [40].

Apesar das vantagens ao se adicionar hidrótropo, algumas considerações devem ser levadas em conta, como o efeito das concentrações de hidrótropo nas propriedades físico-químicas dos cubossomos e a possível ocorrência de irritação e respostas alérgicas quando as formulações contendo cubossomos são administradas [40]. Além disso, a abordagem "*bottom-up*" não consegue evitar efetivamente a formação de vesículas da mesma forma que a abordagem "*top-down*".

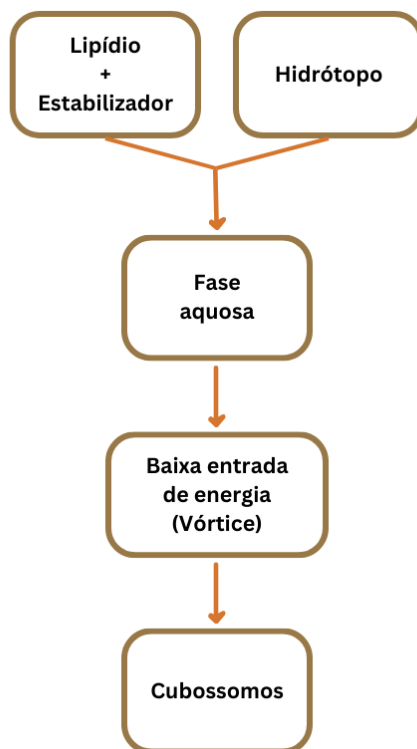


Figura 8: Esquema do método *bottom-up* para preparo de amostras. Neste processo, as estruturas são construídas a partir de componentes moleculares ou nanopartículas individuais (*topo*), que se auto-organizam ou são montadas em uma escala maior para formar a amostra final (*base*). Fonte: o autor.

1.6 Ativos para incorporação nos cubossomos

1.6.1 Lisozima

A lisozima (Fig. 9) é uma proteína monomérica, que pode ser encontrada em vários tipos de organismos vivos. Nos seres humanos, ela pode ser encontrada na lágrima, na saliva, ou até mesmo em órgãos do corpo. Possui características anti-inflamatórias, antissépticas, anti-histamínica e também atividade antineoplásica [43, 44]. Essas características fazem dela um agente em potencial para a indústria farmacêutica. Devido ao fato de que as bactérias estão cada vez mais resistentes aos antibióticos, é interessante veicular a ideia de usar a lisozima para o tratamento dessas bactérias como uma possível rota alternativa às bactérias super-resistentes. Estudos recentes indicam o grande potencial antibacteriano de ação da lisozima em diversos sistemas [43, 44]. Além do seu uso como agente farmacológico, a lisozima apresenta uma série de características únicas, como sua capacidade de ser biocompatível, biodegradável, e de não alterar o pH do organismo que a recebe [45].

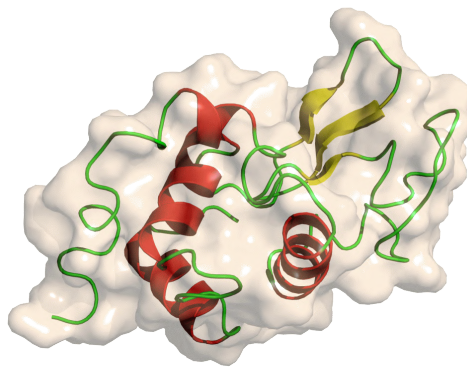


Figura 9: *Estrutura cristalográfica da lisozima. Nesta representação, a estrutura tridimensional da lisozima é mostrada, destacando seus domínios funcionais e a organização cristalina. Fonte: Wikipedia*

A encapsulação da lisozima pode impedir que a proteína se aglomere ou desnature durante o processo de *drug delivery*, além de melhorar sua ação bactericida [46]. Edmans *et al* propuseram a criação de um *patch* mucoadesivo de camada dupla polimérica e o investigaram para a entrega de proteínas à mucosa oral. A lisozima foi usada como proteína antimicrobiana modelo e incorporada às nanofibras de polímero de poli (vinilpirrolidona)/Eudragit [46]. Segundo os autores, as membranas poliméricas fibrosas resultantes liberaram a proteína a uma taxa clinicamente desejável, atingindo $90 \pm 13\%$ da liberação cumulativa após 2 h. Além disso, foi também observado uma alta eficiência de encapsulação e preservação da atividade enzimática, alcançando valores de $(93,4 \pm 7,0\%$ e $96,1 \pm 3,3\%$, respectivamente para a eficiência de encapsulação e atividade enzimática). A lisozima liberada inibiu o crescimento da bactéria oral *Streptococcus ratti*, fornecendo mais evidências de retenção da atividade biológica e ilustrando uma aplicação potencial

para o tratamento e prevenção de infecções orais.

1.6.2 Curcumina

Curcumina é um composto cristalino de cor amarelada brilhante, encontrada no caule da *Curcuma longa* (ou açafrão), que possui grande fama por ser utilizada como corante ou até mesmo como aditivo alimentar [47, 48]. Caracterizado como polifenol, ou (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, com fórmula $C_{21}H_{20}O_6$ e com massa molecular de 368,4 g/mol (PubChem CID: 969516), este composto tem sido uma grande aposta no tratamento de doenças crônicas como inflamação, artrite, síndrome metabólica, doença hepática, obesidade, doenças neurodegenerativas e principalmente cânceres [48]; efeitos estes que se devem ao grande potencial antioxidante e anti-inflamatório da curcumina.

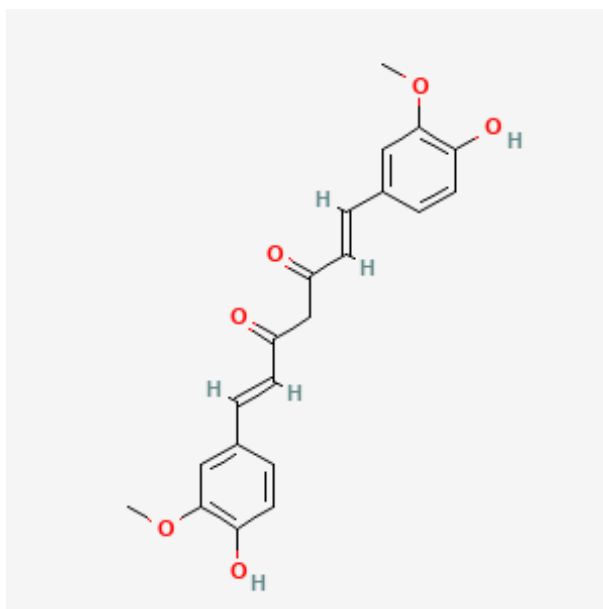


Figura 10: Estrutura química da curcumina. Sua estrutura é caracterizada por dois anéis de fenol ligados a uma cadeia de carbono central com grupos metoxi e hidroxila. Fonte: Pubchem

Estudos mostram que a curcumina desenvolve um bom papel antibacteriano. Teow & Ali [49] descrevem em seu trabalho que a curcumina, em combinação com os antibióticos Amicacina, Gentamicina, Ciprofloxacina, demonstra índice considerável de inibição contra cepas de *Staphylococcus aureus*. Izui *et al.* [50] estuda o efeito da curcumina contra bactérias periodontais. Segundo o estudo realizado, o composto apresentou bom índice de inibição de crescimento contra as bactérias *P. gingivalis*, *Pre-votella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, e *Treponema denticolain*, dependendo da dose utilizada. Gunes *et al.* [51] demonstra em seu estudo que, através do método de Concentração Mínima Inibitória (MIC), a curcumina apresenta boa atividade contra as bactérias *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (MSSA), *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Ente-*

rococcus faecalis, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, quando utilizada em altas dosagens em relação à antibióticos padrões.

1.7 Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos podem ser definidos como uma ferramenta de pesquisa essencial para determinar a potência de ação ou toxicidade de materiais, visto que algumas substâncias necessitam de experimentos *in vivo* para comprovação de suas atividades, que farão com que este organismo gere algum tipo de reação após o contato com tal material [52, 53]. Com os diversos avanços quantitativos na avaliação da toxicidade destas substâncias, sua análise é realizada por meio da relação da dose utilizada com a resposta obtida [53], se tornando uma ferramenta de pesquisa eficaz na compreensão da interação entre as substâncias e os organismos vivos.

No campo dos nanomateriais, os ensaios biológicos são utilizados na análise de nanomateriais com finalidade de avaliação em sistemas biológicos [54, 55]. Pela variedade de propriedades que os nanomateriais possuem, suas aplicações em áreas correlatas à biologia (como a medicina), bem como em áreas de desenvolvimento de novos materiais, como a eletrônica, tem sido cada vez mais utilizada e aprimorada. Neste sentido, compreender os possíveis efeitos e/ou impactos da utilização destes materiais em sistemas animais, ambientais ou humanos se torna crucial [55]. Os ensaios biológicos podem então ser realizados em escala celular ou até mesmo com organismos vivos maiores, fornecendo informações sobre a toxicidade dos nanomateriais em contato com organismos biológicos, a resposta imunológica destes sistemas pós contato com os nanomateriais, seu metabolismo, os impactos de tais interações no meio ambiente, além de ser uma etapa crucial para o desenvolvimento e validação de padrões de preparo de nanomateriais, dentre outros [52, 53].

1.7.1 Ensaios biológicos *in vitro*

O aumento do uso de nanopartículas como *drug delivery systems* requer a aplicação de metodologias assertivas na compreensão aprofundada do desempenho desses sistemas em modelos biológicos, visando aprimorar sua eficácia de entrega e determinar parâmetros toxicológicos [56, 57, 58]. Os testes *in vitro* ganham destaque nos estudos biofísicos, permitindo compreender a relação entre a liberação de fármacos *in vitro* e *in vivo*, proporcionando informações sobre o mecanismo de interação entre nanopartículas e células humanas [56, 57]. Essa relação, conhecida como correlação *in vitro* - *in vivo* (IVIVC) [56], tem sido cada vez mais utilizada em estudos que avaliam a liberação modificada e/ou controlada de fármacos, mostrando-se promissora na transposição de barreiras como a falta de biodisponibilidade *in vivo*, possibilitando a obtenção da relação de concentração-efeito em organismos celulares.

A utilização de linhagens celulares para avaliação da toxicidade de nanomateriais deu origem a um dos primeiros testes no estudo de sua biocompatibilidade para fins biomédicos [58, 57]. O ensaio de citotoxicidade *in vitro*, caracterizado como um sistema bem definido para estudos da relação estrutura-atividade envolvendo nanomateriais [57], consiste no contato direto ou indireto da cultura celular com esses materiais, buscando identificar possíveis alterações provocadas por essa interação [58]. Este ensaio utiliza mecanismos de avaliação da toxicidade do material, como a incorporação de corantes na cultura de células, para definir o parâmetro de viabilidade celular. Dentre suas diversas vantagens, destacam-se a redução do tempo de desenvolvimento de fármacos e sistemas de entrega controlada, economia de recursos, maior controle de qualidade no processo de aprovação de formulações, e a possibilidade de identificação de mecanismos primários de toxicidade dos nanomateriais em contato com as linhagens celulares, dentre outros [56, 57, 58].

A cultura celular, por definição, é a utilização de células conservadas em local artificial propício à sua conservação e/ou proliferação - células estas que outrora pertenciam a um órgão ou tecido de um animal ou planta - para estudos e testes variados *in vitro* [59]. Sua importância se destaca na pesquisa farmacêutica, especialmente em células cancerígenas, onde os ensaios de viabilidade fornecem insights sobre o impacto de novos agentes em populações celulares.

A viabilidade celular, elemento vital na cultura de células, diz respeito à quantidade de células saudáveis em uma amostra. Essa métrica é crucial em diversas aplicações, sobretudo em experimentos como ensaios de toxicidade e na análise de correlações entre o comportamento celular e a contagem de células [60, 61, 62]. Nos ensaios baseados em células, a triagem de compostos avalia não apenas a proliferação e citotoxicidade, desempenhando um papel crucial na medição de eventos de transdução de sinal. A avaliação da viabilidade vai além de um papel meramente funcional, tornando-se o foco principal, especialmente em ensaios de toxicidade. A variedade de métodos, desde os tradicionais até análises avançadas em célula única, como a microscopia Raman, leva em consideração fatores como custo, rapidez e complexidade do equipamento.

1.7.2 Susceptibilidade bacteriana

A toxicidade dos nanomateriais se relaciona de forma direta aos impactos negativos que podem surgir quando há o contato destes materiais com organismos vivos, incluindo os bacterianos. O resultado desta interação é uma resposta destes organismos à atividade antimicrobiana destes materiais, denominada de susceptibilidade bacteriana. Tal susceptibilidade gera um nível de sensibilidade destas bactérias aos efeitos de tais agentes antimicrobianos, que possuem em sua premissa a intenção de inibir o crescimento bacteriano.

A realização de estudos de susceptibilidade bacteriana auxilia na compreensão da eficácia de tratamentos com nanomateriais, além de fornecer informações quanto a possíveis

efeitos colaterais, evitando a utilização de substâncias com atividade antibiótica que já não possuem mais efeito contra à bactéria analisada. Tal falta leva à situação de resistência bacteriana, fato extremamente preocupante que surge com o uso indevido e inadequado de antibióticos. É necessário então o monitoramento constante da susceptibilidade dessas bactérias e implementar, em escala global, práticas de conscientização, a fim de se garantir o sucesso dos tratamentos utilizados.

Visando contornar o desafio da resistência bacteriana, o uso de nanopartículas com atividade antimicrobiana tem sido cada vez mais almejado nos estudos de eficiência farmacológica. Mas, apesar de significar uma solução temporária eficaz, já há estudos na literatura relatando o início de uma possível resistência bacteriana à nanopartículas. Por tal motivo, a realização de testes de susceptibilidade bacteriana se fazem cada vez mais essenciais no processo de síntese de novos materiais antibióticos.

Para o preparo do teste de susceptibilidade bacteriana, alguns métodos são bem padronizados, dentre eles o teste de difusão em disco (ou antibiograma), que fornece informações sobre a resistência bacteriana através da zona de inibição do crescimento bacteriano no disco em que a cultura bacteriana cresceu e foi exposta ao antibiótico; ou o teste de diluição em caldo, que através da Concentração Mínima Inibitória (MIC) fornece informações quanto à concentração mínima de antibiótico a ser utilizada para inibição do crescimento bacteriano.

A ação de toxicidade dos nanomateriais aos organismos bacterianos se dá de diversas formas, como a ação danosa à membrana celular da bactéria, a indução de estresse oxidativo, a interferência nos processos metabólicos, ou até mesmo a indução à alterações genéticas. Para isto, variáveis referentes aos nanomateriais precisam ser levados em consideração, como sua composição, sua escala de tamanho e até mesmo seu formato. Além de suas grandes vantagens, como a possibilidade de descoberta de novas estratégias terapêuticas e a ação direcionada à bactérias específicas através da funcionalização das nanopartículas, o uso de nanomateriais para fins antibacterianos traz também grandes desafios, como a compreensão dos efeitos colaterais, a minimização da resistência bacteriana, a garantia de segurança ambiental e a redução da toxicidade destes materiais á células e tecidos saudáveis.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Tem-se como objetivo geral caracterizar, dos pontos de vista estrutural e funcional, formulações compostas por cubossomos em presença da lisozima e da curcumina, visando a obtenção de uma formulação antimicrobiana.

2.2 Objetivos Específicos

Para conseguir alcançar o objetivo geral, foi buscado de modo mais específico:

- Produzir, de modo reprodutível, cubossomos em ausência e presença da lisozima e da curcumina, testando diversas condições experimentais de acordo com a concentração proteica;
- Caracterizar, estruturalmente, as formulações de cubossomos obtidos no item anterior quanto à sua estrutura interna (SAXS), tamanho e polidispersão (DLS e TEM), carga superficial (Potencial- ζ), análise da estrutura interna (Crio-EM) concentração da nanopartícula (NTA), perfil de encapsulação e liberação do fármaco (E.E e E.L);
- Caracterizar, funcionalmente, as formulações de cubossomos quanto à sua citotoxicidade (ensaio de viabilidade celular e concentração mínima inibitória).

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os materiais utilizados ao longo deste projeto de mestrado estão listados abaixo.

3.1.1 Cubossomos

- Phytantriol (mixed isomers) 3,7,11,15 – tetramethyhexadecane – 1,2,3 – triol (mixed isomers) (85005560) - Avanti Polar Lipids INC®
- Pluronic® F-127 - Sigma-Aldrich
- Lysozyme from chicken egg white - Sigma-Aldrich
- Direct-Q® Water Purification System - Sigma-Aldrich
- Alcool Etílico Absoluto P.A. ACS - Dinâmica Química Contemporânea LTDA
- HEPES - Ácido 4 - (2-HidroxiEtil) - 1 - Piperazin Etanol Sulfônico - Grau Biologia Celular em pó - LGC Biotecnologia
- Curcumina - Sigma-Aldrich

3.1.2 Tampão HEPES

- HEPES - Ácido 4 - (2-HidroxiEtil) - 1 - Piperazin Etanol Sulfônico) - Grau Biologia Celular em pó - LGC Biotecnologia
- Cloreto de Sódio P.A. ACS - Dinâmica Química Contemporânea LTDA
- Hidróxido de Sódio P.A. - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda

3.1.3 Preparo celular

- Dulbecco's Modified Eagle's MédiuM - High Glucose (D5648) - Sigma-Aldrich
- Sodium Bicarbonate (S5761) - Sigma-Aldrich
- Phosphate Buffered Saline (P4417) - Sigma-Aldrich
- Solução Tripsina/EDTA 250 mg% (T2077) - Vitrocell Embriolife
- Soro Fetal Bovino (S0011) - Vitrocell Embriolife
- Álcool etílico 99.8º INPM – Itajá
- Água ultrapura tipo I (Purelab Option) - Elga

- AlamarBlue (BUF012A) - BIO-RAD
- Trypan Blue Stain 0,4% (15250-061) - Gilco
- Penicilina/Estreptomicina (P0223) - Vitrocell Embriolife

3.2 Equipamentos

- Balança Analítica Bel M214-AIH 0,0001G - Bel Equipamentos Analíticos
- Balança Analítica Marte - Série AY - SHIMADZU AY220
- Elma Elmasonic E30H 2.75 Liter Heated Ultrasonic Cleaner
- Banho maria com circulação Isotemp 2100 Fault - Fisher Scientific
- MA184 - Banho Ultratermostatizado Chiller - Marconi Equipamentos para laboratórios
- Banho maria com circulação Isotemp 2100 Fault - Fisher Scientific
- Evaporador Rotativo para 50 a 150 °C Mod. 804 - 230V - Fisatom
- Rotaevaporador IKA RV 10 Digital
- Micropipetas Monocanal - Labmate Pro
- Micropipetas Monocanal - Thermo Fisher Scientific
- Micropipeta Multicanal F1 (8 canais, 30 a 300µL) - Thermo Fisher Scientific
- Phmetro de bancada PHS3BW - Bel Equipamentos Analíticos
- Phmetro de bancada - Sinergia Científica
- Agitador Magnético com Aquecimento 5L LGI-MSH-5 - LGI SCIENTIFIC
- Agitador Magnético com aquecimento C-MAG HS 7 - IKA
- Zetasizer Nano ZS - Malvern Panalytical
- Espectrômetro 8453 G1103A - Agilent Technologies
- Enspire 2300 - PerkinElmer
- Countess 3 Automated Cell Counter - Thermo Fisher Scientific
- Fluxo laminar biológico Tipo A/B3 - Thermo Scientific
- NanoSight NS300 – Malvern Panalytical

- Capela de Exaustão - Oxicamp
- Microscópio TMS Listing 685723 - Nikon
- Purificador de Água Purelab Option - Elga
- Centrífuga 5810R - Eppendorf
- Estufa Series II Water Jacketed CO2 Incubator - Thermo Forma
- Sonic Dismembrator Model 100 - Fisher Scientific

3.3 Preparo de amostras

Os cubossomos foram preparados segundo a metodologia apresentada nos trabalhos do grupo [63, 64]. Em resumo, foram pesadas cinco amostras de fitantriol, cada uma com 100 mg, e cinco amostras de pluronic F-127, cada uma com 25 mg. As amostras de fitantriol foram solubilizadas em 10 ml de álcool etílico, enquanto o pluronic foi solubilizado em 22,5 ml de tampão HEPES (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4). Após a solubilização, as amostras receberam porcentagens de lisozima e curcumina, para que chegassem às concentrações finais, descritas na tabela a seguir. As amostras então foram colocadas em banho maria, a 45°C, temperatura esta acima do ponto de fusão do lipídio, durante uma hora. Para a realização dos experimentos, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente. Inicialmente, foi-se utilizado o evaporador rotativo para finalização das amostras (cubossomo branco, cubossomo + lisozima, cubossomo + curcumina, cubossomo + lisozima + curcumina); posteriormente, todas as amostras foram finalizadas pelo sonificador.

Para o tampão HEPES, utilizado no processo de preparo das amostras, foi pesado 4766 mg de HEPES livre de ácido, e 8766 mg de cloreto de sódio. Ambos foram solubilizados de forma conjunta em 1000 ml de água ultrapura do tipo I, que logo após recebe o hidróxido de sódio, também solubilizado em água ultrapura, para que seja corrigido o pH, alcançando o valor de 7,4. O tampão HEPES é amplamente usado em preparos químicos/biofísicos devido a possibilidade de trazer estabilidade química às amostras preparadas [65].

O primeiro objetivo, dentro deste projeto, foi a caracterização de um equipamento construído pelo grupo de pesquisa (Fig. 11). Este equipamento foi desenvolvido para tornar possível a obtenção de cubossomos de modo reprodutível. Um dos desafios enfrentados no processo de síntese dos cubossomos é que, mesmo seguindo fielmente o protocolo, pessoas diferentes obtêm cubossomos de tamanhos diferentes. No entanto, a mesma pessoa obtém sempre o mesmo tamanho de cubossomo, mesmo reproduzindo o protocolo em dias diferentes. Em outras palavras, pode-se dizer que o protocolo é sólido, reprodutível, no entanto, é dependente de parâmetros experimentais cruciais para determinar o tamanho do cubossomo, como a velocidade de pipetagem, as condições de umidade, dentre outros.

Visando corrigir este problema, foi desenvolvido pelo grupo um equipamento *home-made* que utiliza eletrônica do tipo Arduino (Fig. 11), todo feito em uma impressora 3D, que funciona como uma espécie de bomba peristáltica, injetando uma solução A em uma outra solução B. Além disto, o usuário pode escolher entre 5 diferentes velocidades de injeção, podendo então caracterizar suas nanopartículas quanto ao tamanho e a polidispersão em função destas velocidades.

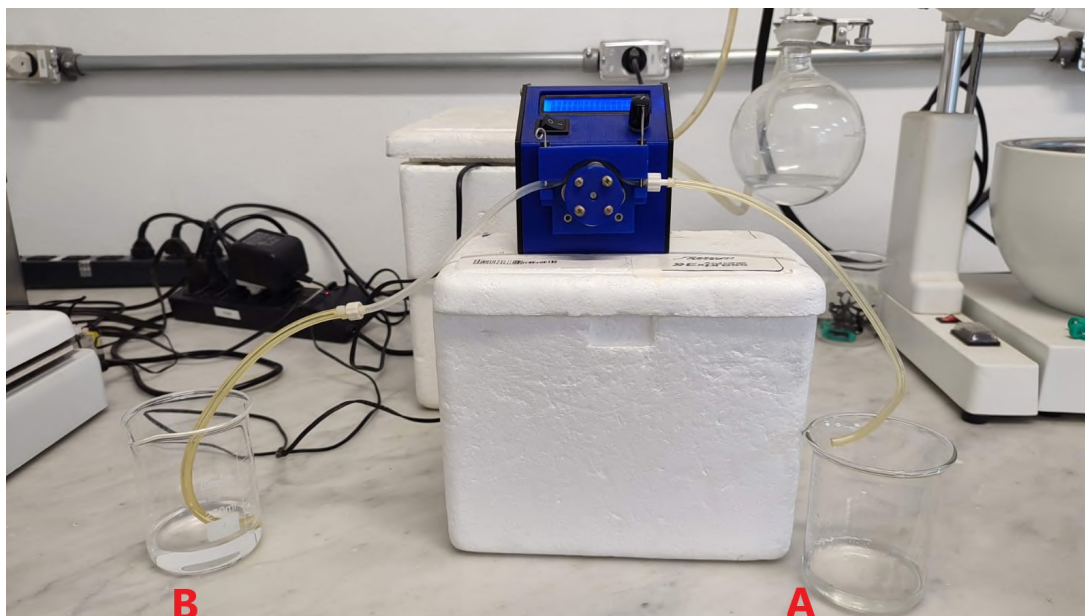


Figura 11: Sistema *home-made* construído para a preparação de cubossomos de modo reprodutível, com velocidade de injeção controlada. Com ele, a solução de F-127 (A) é transferida de forma automática ao becker contendo a solução de fitantriol (B). Fonte: o autor.

A primeira etapa refere-se à síntese e análise dos cubossomos com 5 diferentes concentrações de lisozima em relação ao fitantriol. Tais cubossomos foram sintetizados fazendo-se uso da bomba peristáltica na velocidade 2, conforme ilustrado na figura 11, bem como do evaporador rotativo para finalização do processo. Esta etapa é importante pois possibilita a escolha da melhor concentração de fármaco encapsulado para os subsequentes ensaios. Para isto, foram obtidos a partir destes sistemas dados de DLS, NTA e viabilidade celular, que revelam informações quanto às dimensões, concentrações e efeitos de citotoxicidade das nanopartículas na solução utilizada (tampão Hepes pH 7.4).

Na segunda etapa deste projeto, a concentração de lisozima a ser encapsulada foi fixada em 0,5 mg/ml; tal concentração foi escolhida baseada nos resultados dos testes outrora citados. Paralelo a isto, a curcumina foi escolhida como um novo ativo a ser também encapsulado nas nanopartículas. Sua concentração foi fixada também em 0,5/ml em relação ao fitantriol, para efeito de comparação entre os fármacos escolhidos. Sendo assim, foram sintetizados cubossomos contendo lisozima e curcumina, na concentração citada, também em tampão Hepes pH 7.4, utilizando-se o sonicador para finalização do

processo.

Na tabela a seguir, há mais informações sobre as amostras citadas.

Código	Concentração de fármaco	Processo de síntese
cub_branco_er	cubossomo branco	evaporador rotativo
cub_0,1_er	cubossomo 0,1 mg/ml liozima	evaporador rotativo
cub_0,3_er	cubossomo 0,3 mg/ml liozima	evaporador rotativo
cub_0,5_er	cubossomo 0,5 mg/ml liozima	evaporador rotativo
cub_1_er	cubossomo 1 mg/ml liozima	evaporador rotativo
cub_branco_s	cubossomo branco	sonicador
cub_liso	cubossomo 0,5 mg/ml liozima	sonicador
cub_cur	cubossomo 0,5 mg/ml curcumina	sonicador
cub_liso_cur	cubossomo 0,5 mg/ml de ambos	sonicador

Tabela 1: Descrição das amostras sintetizadas e analisadas ao longo do período de execução deste projeto de mestrado.

3.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (no inglês *Dinamic Light Scattering*) é uma técnica que utiliza a luz visível para analisar o comportamento de moléculas em solução [66, 67]. Em seu livro publicado nos anos 2000, Berne e Pecora discorrem sobre a teoria por detrás desse experimento muito utilizado na área de biofísica, e será este o texto base desse tópico do trabalho.

Pode-se dizer que um campo eletromagnético que é incidido sobre as cargas que compõem o sistema em questão possui a capacidade de polarizar o meio, devido à força que este campo exerce nessas cargas, fazendo com que eles ganhem uma aceleração no processo e irradiem luz. Tem-se ainda que, se cada uma das regiões do material que recebem a incidência deste campo eletromagnético tiverem as mesmas propriedades ópticas (mesma constante dielétrica), as ondas espalhadas por cada uma dessas regiões serão iguais, com somente um fator de fase que as diferem, devido à posição de cada uma dessas regiões no espaço. Por consequência, a luz é espalhada na direção direta. Se, por outro lado, há uma diferença na constante dielétrica dessas regiões que compõem o material, as ondas espalhadas por cada uma dessas regiões serão diferentes entre si, levando à difusão de luz além da direção direta.

Einstein explica que a dispersão da luz é resultado de flutuações locais na constante dielétrica do meio [67]. Isso porque, para que haja espalhamento de luz, a constante dielétrica de cada uma dessas regiões desse material deve flutuar, devido à dependência da constante dielétrica das posições e orientações das moléculas dessas regiões, que estão em constante movimentos de rotação e translação.

A função de autocorrelação mede a flutuação na intensidade de espelhamento de luz em um dado ângulo (que em geral, mas não necessariamente, é de 90°). O decaimento

desta função de auto correlação está relacionado com o coeficiente de difusão translacional das partículas no meio. A função de autocorrelação é dada por:

$$g^2(q, \tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (1)$$

onde τ é o tempo de atraso, $I(t)$ é a intensidade de espalhamento medida no detector do equipamento.

Adotando que as nanopartículas do sistema possam ser consideradas esféricas, é possível obter o seu diâmetro hidrodinâmico médio, D_H . A dinâmica de espalhamento pode ser derivada da função de autocorrelação, dada pela já bem conhecida relação de Stokes-Einstein:

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (2)$$

3.5 Potencial- ζ (ZP)

O potencial zeta é definido como o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento da partícula em estudo, ou seja, logo após a camada de Stern (Fig. 12) [68]. Por exemplo, supond uma partícula coloidal carregada negativamente, como ilustrado na (Fig. 12). Imediatamente em contato com esta partícula negativa, existirão íons positivos fortemente ligados a ela. Estes íons se encontram na chamada camada de Stern (Fig. 12), e irão se deslocar juntamente com a partícula [68]. O potencial zeta é definido, então, como o potencial elétrico ao final da camada iônica que rodeia a partícula em estudo.

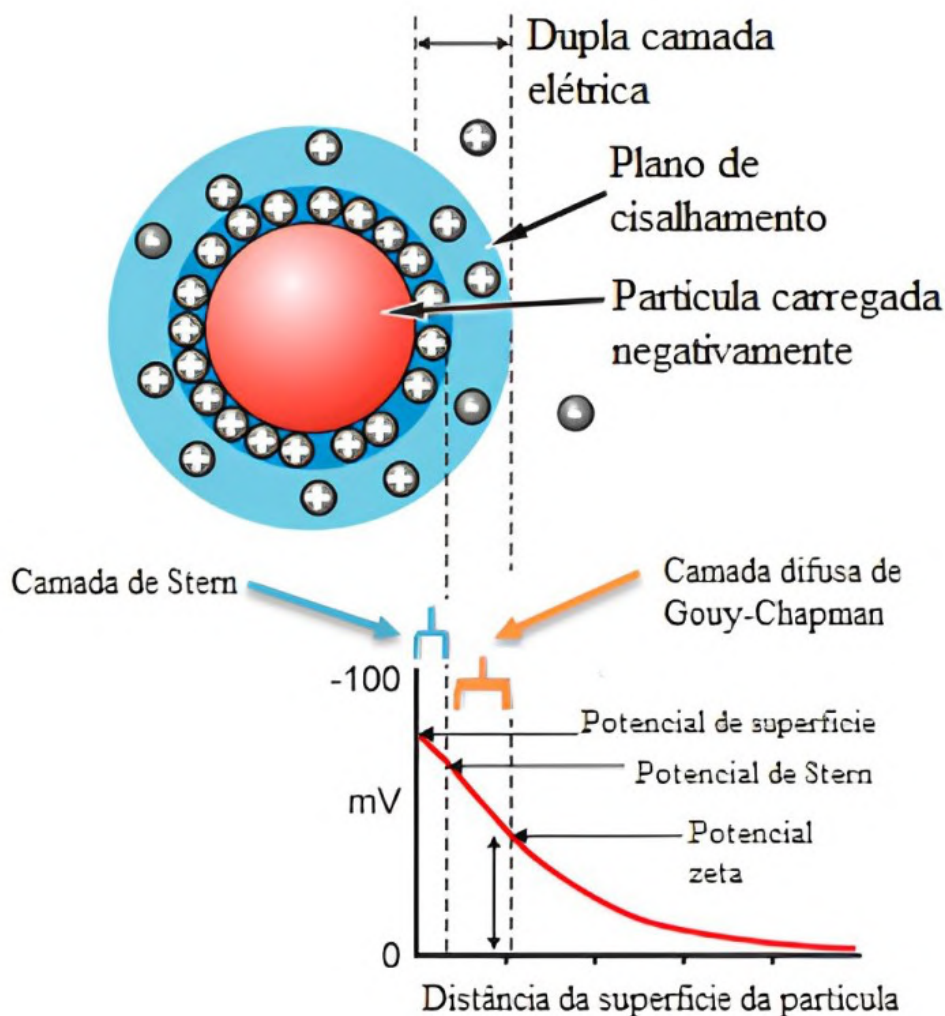


Figura 12: Representação do potencial zeta. O potencial zeta é uma medida da carga elétrica na superfície de partículas dispersas em um líquido. O potencial zeta é uma importante propriedade físico-química em sistemas coloidais e influencia a estabilidade e o comportamento de dispersão das partículas. Fonte: UTFPR

De um ponto de vista mais objetivo, o potencial zeta depende não somente da superfície da partícula, mas também do meio dispersante como por exemplo do pH, força iônica e temperatura, já que sua medida está diretamente relacionada à estabilidade de um sistema coloidal [69]. É consenso na literatura que sistemas coloidais com valores de potencial zeta da ordem de $|\zeta| > 30$ mV são ditos estáveis, já que sua agregação é dificultada pela existência de um potencial eletrostático repulsivo entre as partículas [70]. Vale a pena ressaltar que a grandeza física realmente medida neste experimento não é propriamente o potencial- ζ , mas sim a chamada mobilidade eletroforética, μ_E . Em poucas palavras, aplica-se um campo elétrico constante na solução e as partículas, dependendo de sua carga efetiva, se deslocam para um dado eletrodo (obviamente sempre o de sinal oposto ao das partículas). Utilizando então um feixe laser e o efeito doppler (variação da frequência de luz em função da existência de uma velocidade não nula de uma partícula) mede-se a

velocidade escalar dessas partículas (em unidades de $\mu\text{m}/\text{s}$). A mobilidade eletroforética, então é definida através da razão:

$$\mu_E = \frac{2\epsilon\zeta}{3\eta} f(ka) \quad (3)$$

onde $f(ka)$ é a chamada função de Huckel e é definida de acordo com a força iônica do meio (representada pelo inverso do comprimento de Debye, k) e matematicamente como: $f(ka) = 1.5$ para sistemas em que $(ka) \gg 1$ ou ainda, $f(ka) = 1.0$ para sistemas em que $(ka) < 1$. A mobilidade eletroforética é definida como a razão entre a velocidade escalar de uma partícula e o campo elétrico externo aplicado à solução.

Os dados de Espalhamento Dinâmico de Luz foram obtidos através do equipamento ZetaSizer ZS90 (Malvern Panalytical Ltd., UK), no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPEM - Campinas/Brasil). Para a obtenção dos dados, o detector esteve posicionado a 173° , com modo automático, e um laser de He-Ne, com comprimento de onda de 632,8 nm foi utilizado como fonte de luz. Previamente, as amostras foram preparadas para as leituras. Alíquotas de 10 μl de amostra foram diluídas em 200 μl de tampão Hepes, para que a alta concentração da amostra não espalhe a luz utilizada na leitura das amostras. Para o ensaio de potencial zeta, 10 μl fora diluídos em 900 μl de água ultrapura tipo I. Foram realizadas três medidas para cada amostra, todas na temperatura de 25°C . Os dados de DLS apresentados neste trabalho são o resultado da média das 3 medidas para cada amostra.

3.6 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) é uma metodologia avançada empregada na avaliação das propriedades de nanopartículas em uma determinada amostra, permitindo a observação e medição precisa do movimento Browniano de partículas nanométricas em solução [71].

O procedimento de NTA compreende a iluminação das nanopartículas por meio de um feixe de laser, seguido pela captura de vídeos em alta velocidade que registram o movimento individual de cada partícula. Posteriormente, algoritmos de rastreamento são aplicados para analisar os deslocamentos das partículas ao longo do tempo, fornecendo informações cruciais sobre tamanho, forma e distribuição das nanopartículas na amostra.

Uma das principais vantagens da NTA reside na capacidade de gerar dados a nível de partícula, possibilitando a análise de subpopulações específicas dentro de amostras complexas. Além disso, essa técnica é adaptável a uma ampla faixa de tamanhos de partículas, tornando-a particularmente eficaz na caracterização de sistemas nanométricos heterogêneos [71].

A fórmula derivada da equação de Stokes-Einstein é comumente empregada na NTA para calcular a velocidade quadrática média das partículas, estabelecendo relações com

parâmetros como temperatura e viscosidade do meio em que as partículas estão dispersas.

$$\overline{(x, y)^2} = \frac{2k_B T}{3r_h \pi \eta} \quad (4)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann e $\overline{(x, y)^2}$ é a velocidade quadrática média de uma partícula a uma temperatura T , em um meio de viscosidade η , com raio hidrodinâmico de r_h .

Análise de Rastreamento de Nanopartículas representa uma ferramenta valiosa na caracterização de nanopartículas, proporcionando insights precisos sobre suas propriedades físicas em escala individual. Essa técnica desempenha um papel essencial em diversas áreas, incluindo pesquisa biomédica, nanotecnologia e ciências dos materiais.

Os dados de NTA foram obtidos através do equipamento NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd., UK), no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM - Campinas/Brasil). Para a obtenção dos dados, as amostras foram previamente diluídas, na proporção de 1 μ l de amostra para 7500 μ l de água ultrapura tipo I filtrada. Os dados foram coletados em quintuplicata para cada uma das amostras, na temperatura de 20°C. As análises apresentadas neste trabalho são então resultado da média dessas 5 medidas de cada amostra.

3.7 Eficiência de encapsulação (E.E.) e liberação (E.L.)

Neste trabalho, a Eficiência de Encapsulação (EE) dos fármacos nos cubossomos foi determinada utilizando o método de filtração-centrifugação [72]. As amostras de cubossomos contendo lisozima foram filtradas-centrifugadas a 22 °C, durante 20 minutos e 4000 rpm, em eppendorfs contendo filtros de celulose com poros de 30 kDa (onde o fármaco livre atravessou o filtro e os cubossomos não). Os filtrados foram diluídos com tampão Hepes 20 mM pH 7,4 e o fármaco presente no filtrado (não encapsulado) foi então quantificado por espectroscopia de absorção eletrônica (UV-vis).

Para o ensaio de eficiência de encapsulação, quatro amostras contendo a lisozima e curcumina encapsulada passaram previamente por um processo de filtração-centrifugação. 4 ml de cada uma das amostras foram colocados em um tubo com filtro de 30 kDa. Esses tubos então foram levados à centrífuga a 4000 rpm por 10 minutos. O que houve de sobrenadante dessas amostras, ou seja, o quantitativo de amostra que passou pelo filtro, foi novamente filtrado e centrifugado nas mesmas configurações por mais 3 vezes, garantindo assim que as amostras obtivessem um padrão de pureza e uniformidade. O sobrenadante resultante da última filtração-centrifugação foi levado ao espectrofotômetro no ultravioleta visível (UV-vis) para que fosse lida a absorbância dessas amostras no comprimento de onda de 280 nm e 420 nm, comprimentos estes que estão relacionados ao valor de absorbância da lisozima e da curcumina, respectivamente. Estes dados podem ser relacionados entre si, fornecendo informações quanto à eficiência de encapsulação da lisozima e da curcumina

no cubossomo, ou seja, o quanto de lisozima e curcumina o cubossomo foi capaz de encapsular para que posteriormente essa enzima seja liberada no organismo receptor. Em um segundo momento, o mesmo processo foi repetido para as amostras finalizadas no sonicador. Para a leitura da absorbância da curcumina encapsulada individualmente no cubossomo, no comprimento de onda de 420 nm, foi separada uma alíquota da amostra que é lida após 24 horas de descanso, e comparada com a leitura feita logo após o preparo da amostra. Este processo foi necessário e se difere do processo de leitura da absorbância das amostras contendo lisozima pois a curcumina é retida praticamente por completo pelo filtro utilizado no processo.

Em alternativa a esta metodologia para as medidas de encapsulação da proteína, também foram utilizadas medidas de diálise dos cubossomos em presença do fármaco. Nesta metodologia, foi colocada a amostra em um saco de diálise, de 100 kDa, a 37 °C, e este dentro de uma solução tampão com volume de 98 ml. Então, foram recolhidas alíquotas desta solução em tempos específicos (a cada 10 minutos nas duas primeiras horas, e cada 60 minutos nas horas sequenciais) e mensurada a absorção dessa alíquota para determinar a concentração proteica e, como consequência, a taxa de liberação da proteína.

Para preparo do experimento, dois aparatos foram preparados, um para a enzima livre, e outro com a mesma configuração para a enzima encapsulada no cubossomo. Em um primeiro instante, o filtro permanecia submerso em um becker contendo água ultrapura do tipo I durante 10 minutos, para que o mesmo seja umidificado. Logo após, o filtro recebeu uma solução de 1 ml do sistema em questão (lisozima, cubossomo + lisozima ou cubossomo + lisozima + curcumina). Sendo adicionado este volume no filtro, o mesmo foi colocado em um becker com 49 ml de tampão HEPES, sem deixar que o filtro fique submerso na solução. Coletou-se 100 µl tanto de dentro do filtro, como de dentro do becker, para que os mesmos sirvam de solução estoque e forneçam informações da quantidade de fármaco pré-início do experimento. O becker com o filtro foi então transferido para a superfície de uma placa aquecedora, onde permaneceu na temperatura de 37 °C, sob a agitação de um peixe magnético no interior do becker. Nos primeiros 120 minutos de experimento, uma amostra de 100 µl foi retirada a cada 10 minutos de cada um dos dois filtros, enquanto que de cada um dos beckers foi coletado 1 ml; logo após a retirada destes volumes, 100 µl de HEPES foi adicionado a cada um dos filtros, e 1 ml de HEPES foi devolvido a cada um dos beckers. Este procedimento foi repetido a cada 60 minutos a partir das duas primeiras horas de experimento. Todos os experimentos tiveram duração mínima de 100 minutos, sendo que os mesmos não possuem a mesma duração em minutos devido à velocidade que as soluções possuem para passar no filtro. As alíquotas de 100 µl das amostras coletadas do filtro foram então diluídas em 900 µl de álcool metílico, para que o cubossomo fosse destruído e os fármacos pudessem ser quantificados. Para a quantificação dos mesmos, 100 µl desta solução foi adicionada a uma cubeta para leitura de absorbância da lisozima

e da curcumina no ultravioleta visível (UV-vis). Após a leitura, foram obtidos os valores de absorvância para cada uma das amostras coletadas em diversos comprimentos de onda, sendo que para a lisozima foi utilizado o comprimento de onda de 280 nm [73] enquanto para a curcumina foi utilizado o de 420 nm [74], que correspondem ao comprimento de onda de excitação dos fármacos em respectivo. Com estes valores, foram obtidas as porcentagens de liberação dos fármacos em função do tempo de realização do experimento, ou seja, o quanto da lisozima e da curcumina foi liberado ao receptor no decorrer do tempo.

3.8 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

O Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) é uma técnica de análise de tamanho e forma de estruturas na faixa de k-MDa [75]. Através do SAXS, é possível analisar os padrões de espalhamento das amostras estudadas, sendo possível observar características como por exemplo a estrutura interna de uma nanopartícula e sua interação com a proteína encapsulada, sistema esse de interesse neste projeto [76, 77, 78, 79]. Em suma, a amostra recebe um feixe de raios x incidente, que irá sofrer um espalhamento elástico, ou seja, mesmo esta amostra interagindo com o feixe incidente, sua energia interna não muda, porém, o feixe de raio X espalhado possui mudança de fase em relação ao feixe incidido na amostra, levando à detecção de padrões de ondas construtivas e destrutivas, que serão captadas durante o experimento [76]. No caso das amostras de cubossomo, o sistema será analisado através da difração de raios X [76].

O termo baixo ângulo deriva do fato de que o ângulo do raio-X espalhado no experimento de SAXS varia de 0.1 a 2° , fazendo com que a técnica seja eficaz no estudo de nanoestruturas, ou sejam, materiais na faixa de 10 a 20 \AA [80]

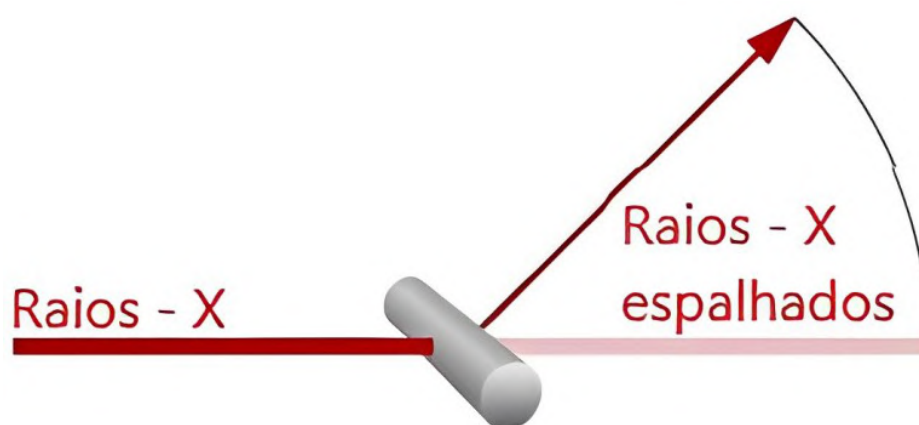


Figura 13: *Espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS). Os raios-X incidentes (representados pela linha reta) interagem com as estruturas da amostra, resultando em espalhamento de raios-X em direções próximas à da fonte incidente (ângulos pequenos). Fonte: adaptado de Anton Paar*

A análise das curvas de SAXS dos cubossomos em ausência e presença de lisozima é

feita através das alterações na estrutura cristalográfica das nanopartículas. É bem conhecido que a estrutura cristalográfica que toma uma dada molécula anfifílica depende de diversos fatores, dentre os quais a razão entre os volumes da região polar e apolar determina a estrutura do auto-agregado. Esta grandeza é chamada de fator de empacotamento e tem alguns valores associados a diferentes estruturas [81].

Para compreender melhor a estrutura interna dos cubossomos, a saber, as dimensões dos canais de água que formam a estrutura cúbica dessa nanopartícula, é utilizado o parâmetro de rede, que de forma generalizada, fornece informações sobre a estrutura interna do cristal [82].

Tem-se que a intensidade de raios X dispersos que são medidos através da técnica é dada por:

$$I \propto N.V^2.\Delta\rho^2.P(q).S(q) \quad (5)$$

Onde:

N é o número de centros de espalhamento; V é o volume da estrutura espalhada; $\Delta\rho$ é a densidade eletrônica da estrutura espalhada; $P(q)$ é o fator de forma e $S(q)$ é o fator de estrutura. No caso da nanopartícula estudada neste projeto, os cubossomos, não é possível determinar o fator de forma pois é extremamente difícil descrever como se dá a densidade eletrônica na bicamada dessa nanoestrutura [76].

Através dos picos encontrados nas curvas de SAXS, é possível organizar os planos de difração para uma amostra com arranjo periódico; a posição de cada um destes picos traz informações sobre a estrutura cristalográfica do sistema analisado [76]. No caso das amostras estudadas através deste projeto, a saber, os cubossomos, que possuem em sua composição o lipídio fitantriol, é possível obter informações quanto a duas possíveis simetrias através de seus diagramas de fase: $Pn3m$ e $Im3m$ [4].

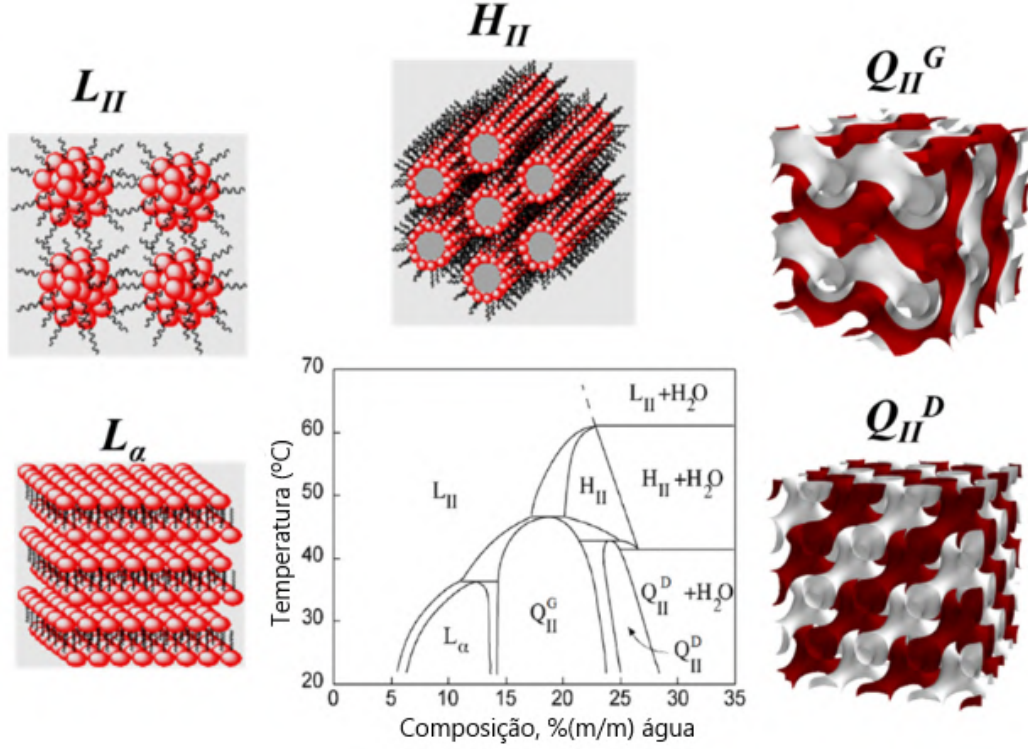


Figura 14: Diagrama de fases da composição de temperatura do sistema binário fitantriol/água. As diferentes fases, como a fase lamelar, cúbica, hexagonal e isotrópica, são representadas por regiões distintas no gráfico. As linhas de transição de fase indicam os pontos de equilíbrio entre diferentes fases na temperatura e composição específicas. Fonte: adaptada de [4]

Para determinar em qual grupo de simetria espacial a amostra se encontra, utiliza-se todos os picos obtidos através dos dados de SAXS, e é feita uma proporção entre eles, a saber:

$$\frac{q_i}{q_1} = \frac{\sqrt{h_i^2 + k_i^2 + l_i^2}}{\sqrt{h_1^2 + k_1^2 + l_1^2}} \quad (6)$$

As simetrias Pn3m e Im3m, possíveis de serem visualizadas nas nanopartículas cúbicas de fitantriol, possuem proporção de $\frac{q_2}{q_1} = \sqrt{\frac{3}{2}}$ e $\frac{q_2}{q_1} = \sqrt{2}$, respectivamente. Essas proporções entre o primeiro e o segundo pico obtidos com o experimento de SAXS fornecem informações quanto ao tipo de simetria que a nanopartícula possui, sendo as razões dos outros picos utilizadas apenas para verificação da estrutura cristalográfica das amostras, bem como calcular seu parâmetro de rede [76, 83].

Os dados de SAXS foram obtidos linha de luz CoSAXS no laboratório MAX IV (Lund, Suécia). As faixas de energia e comprimento de onda foram de 5 a 20 keV, respectivamente. A resolução de energia era 2×10^{-4} , e a fonte de fótons apresentava um ondulator de vácuo com comprimento de 2 m, comprimento de período de 19,3 mm e valor K de 2,2. O foco do feixe e a resolução espacial estavam em um foco de 2m, com um tamanho de

feixe na amostra de $150 \times 150 \mu\text{m}$, no detector de $30 \times 5 \mu\text{m}$ e no tamanho do foco da amostra de $24 \times 5 \mu\text{m}$, resultando em um fluxo de fótons esperado na amostra de 10^{13} @ 12 keV. Foi utilizado um detector Eiger2 4M. Para a obtenção dos dados, 100 μl de amostra foram utilizados para preenchimento do capilar. As curvas obtidas para o buffer foram subtraídas das curvas obtidas para as amostras para evitar interferência nos dados finais. A intensidade de luz espalhada na amostra (I) foi obtida como função do vetor de espalhamento q (\AA).

3.9 Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)

A Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão, conhecida como cryo-TEM, emergiu como uma técnica fundamental para investigar líquidos nanoestruturados. Em primeiro lugar, essa abordagem revela diretamente os elementos estruturais fundamentais do sistema, com uma resolução impressionante de 1 a 2 nanômetros [84, 85]. Para muitos sistemas, essa informação direta no nível supramolecular é valiosa e dispensa a necessidade de processamento adicional da imagem. Além disso, ao contrário de métodos em larga escala, como espalhamento, que dependem de modelos e avaliam propriedades médias, as imagens obtidas por cryo-TEM fornecem informações específicas sobre agregados. Isso é particularmente benéfico em sistemas nos quais coexistem múltiplas estruturas com diferentes morfologias, tamanhos ou ordens internas complexas [84, 85].

A estratégia eficaz na cryo-TEM envolve a construção de um modelo físico básico da estrutura com base nas imagens, utilizado como ponto de partida para análises quantitativas por métodos indiretos. Essa técnica é bem-sucedida no estudo de processos dependentes do tempo [84], sendo crucial para capturar intermediários metaestáveis em estruturas complexas e compreender mecanismos de auto montagem.

Embora poderosa e esclarecedora, a cryo-TEM é uma técnica exigente, demandando prática e profundo entendimento dos princípios, sendo considerada uma habilidade especializada. O microscópio eletrônico de transmissão (TEM) é concebido como um microscópio de luz invertido, iluminando a amostra com feixes de elétrons. O canhão de elétrons na coluna superior, com lentes eletromagnéticas, focaliza o feixe na amostra. A obtenção de contraste em TEM ocorre pela interação dos elétrons com o material, com metais pesados como chumbo, urânio e platina frequentemente usados para melhorar o contraste [85]. A resolução em TEM é diretamente proporcional à voltagem de aceleração dos elétrons. Na cryo-TEM, a amostra é visualizada no estado congelado e hidratado, exigindo adaptações ao microscópio convencional. O suporte crio é crucial, contendo um recipiente para nitrogênio líquido, resfriando a ponta e garantindo o contato térmico adequado com a grade. Durante o transporte, sistemas de proteção evitam danos por formação de gelo. Essas ferramentas permitem observações tridimensionais e remoção de moléculas de água durante a observação.

Os dados de cryo-TEM foram obtidos através do equipamento Talos Arctica G2 (Thermo Fisher Scientific, EUA), no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano/CNPEM - Campinas/Brasil). Aproximadamente 3 µl de amostra foram utilizados para a aquisição dos dados. A voltagem de aceleração foi de 200 kV, e as imagens foram obtidas através da câmera CMOS 4k x 4k, com detector direto de elétrons.

3.10 Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis)

Os dados de Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-vis) foram obtidos através do equipamento 8453 G1103A (Agilent Technologies, EUA). A técnica foi utilizada para obtenção dos dados referentes à Eficiência de Encapsulação e de Liberação. Para ambas as técnicas, foram coletados os comprimentos de onda de 190 a 1100 nm; porém, para a obtenção da absorbância da lisozima e da curcumina, os comprimentos de onda utilizados foram os de 280 e 420nm, respectivamente. O comprimento de onda de 600nm foi utilizado para a subtração em ambos os casos. Inicialmente, é medida a absorbância do metanol, que por ser utilizado no processo de diluição das amostras, é considerado o branco dos dados obtidos. As amostras então são diluídas no metanol, na proporção de 50: 450 µl, e então são lidas em triplicata. Os dados então são recolhidos e analisados conforme as especificações de cada um dos ensaios citados. As análises de E.E e E.L. são resultado da média dessas 3 medidas realizadas em cada amostra.

3.11 Viabilidade celular

As linhagens celulares utilizadas no teste de viabilidade celular foram MDA-MB-231 e HaCat, cultivadas em meio dulbecco's modified eagle medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Foram realizados repiques de 1 a 3 vezes por semana, em ambiente estéril dentro do fluxo laminar, utilizando materiais esterilizados.

A linhagem MDA-MB-231 é uma linhagem de células de câncer de mama. É uma das mais utilizadas em estudos experimentais *in vitro*, tendo sua origem em um adenocarcinoma mamário humano extraído de uma paciente caucasiana de 51 anos de idade. Esta linhagem apresenta alterações numéricas em seu cariótipo, além de apresentar tripla negatividade, referente aos receptores de estrogênio (ER), receptores de progesterona (PR), e receptores 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), demonstrando que possui alto grau de agressividade [86, 87].

A HaCat, queratinócito epidérmico humano, é uma linhagem celular derivada de células da periferia distante de um melanoma humano. Possui fácil reprodução, além de não apresentar a capacidade de formar neoplasias *in vivo* [88]. Por estes motivos, esta linhagem é amplamente utilizada em ensaios de viabilidade celular.

Aproximadamente 104 células, contadas automaticamente com lâminas Countess™

(Thermo Fisher Scientific, EUA) foram adicionadas às placas de cultura celular de 96 poços. Inicialmente, as células incubadas tiveram seu meio de cultivo antigo aspirado, seguido por uma lavagem com solução de PBS para remover resíduos do meio antigo. O PBS foi então aspirado, e uma solução de tripsina-EDTA 0,02% foi adicionada às células. Em cinco minutos, as células aderidas à placa tornaram-se sobrenadantes. A solução foi então transferida para um falcon de 15 ml, juntamente com 8 ml de meio, e centrifugada a 300 força centrífuga relativa (RCF) durante 5 minutos. O meio sobrenadante foi aspirado, e uma nova alíquota de meio foi adicionada, para que as células fossem ressuspensas. Uma alíquota dessa solução contendo células foi pipetada e misturada com o corante trypan blue. Essa mistura foi colocada em uma câmara de contagem de Countess™, e a concentração celular foi determinada. As concentrações desejadas foram incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ durante 24 horas para crescimento. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo diferentes concentrações das drogas em estudo, seguido de incubação por 24 horas.

A viabilidade celular foi então avaliada através do teste de alamarBlue™ (DAL1025, Thermo Fisher Scientific) conforme as instruções do fabricante. Para isto, após a incubação de 24 horas, as drogas foram aspiradas, e uma solução de Alamar Blue a 10% em meio foi adicionada aos poços. O teste foi realizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM - Campinas/Brasil).

3.12 Susceptibilidade bacteriana

Os testes de susceptibilidade bacteriana foram realizados para os mesmos sistemas analisados no ensaio de viabilidade celular. Para isto, foi realizado o ensaio de Concentração Mínima Inibitória (MIC). O ensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM - Campinas/Brasil). Foram utilizadas uma amostra bacteriana de *Bacillus subtilis* (ATCC 23857) e uma de *Escherichia coli* (5880).

Escherichia coli, ou *E. coli*, é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, encontrada na microbiota intestinal humana por se tratar de uma região com acesso à mucosa dos tratos digestivos [89].

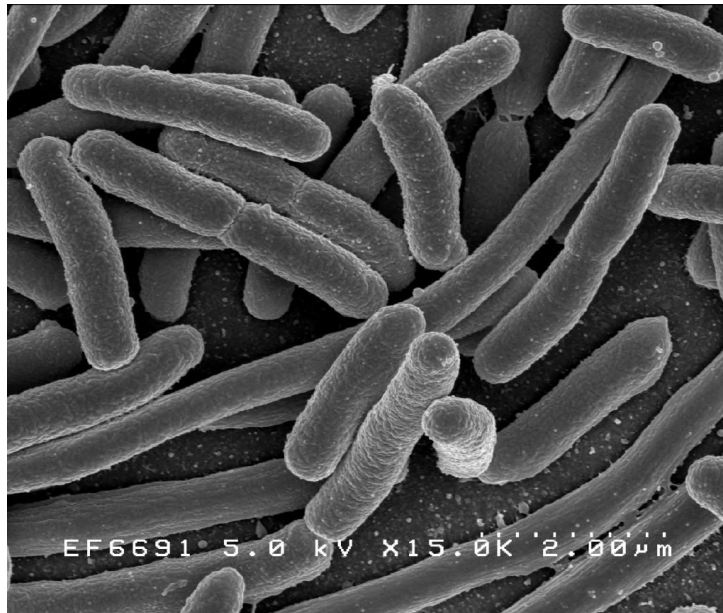


Figura 15: *Microscopia eletrônica de varredura de Escherichia coli, cultivada em cultura e aderida a uma lamínula. A microscopia eletrônica de varredura fornece uma visão detalhada da morfologia e organização das bactérias em nível microscópico, Fonte: Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH - NIAID.*

Bacillus subtilis ou *B. subtilis*, do gênero *Bacillus*, é uma bactéria Gram-positiva muito utilizada em estudos microbiológicos pois possui grande capacidade de captação de DNA extracelular, que facilita a simples modificação genética e a ocorrência de esporulação, um dos primeiros processos de diferenciação de células bacterianas estudados [90]. Nomeada como *Bacillus subtilis* por Ferdinand Cohn em 1872, é o primeiro genoma sequenciado de uma bactéria classificada como Gram-positiva. Possui grande variedade de aplicações, que vão desde a produção de enzimas, fermentação de alimentos entre outros, pois é possível isolá-la de vários ambientes, como o solo ou até mesmo regiões marinhas [90]. É uma bactéria referência nos estudos de que envolvem processos celulares e afins.

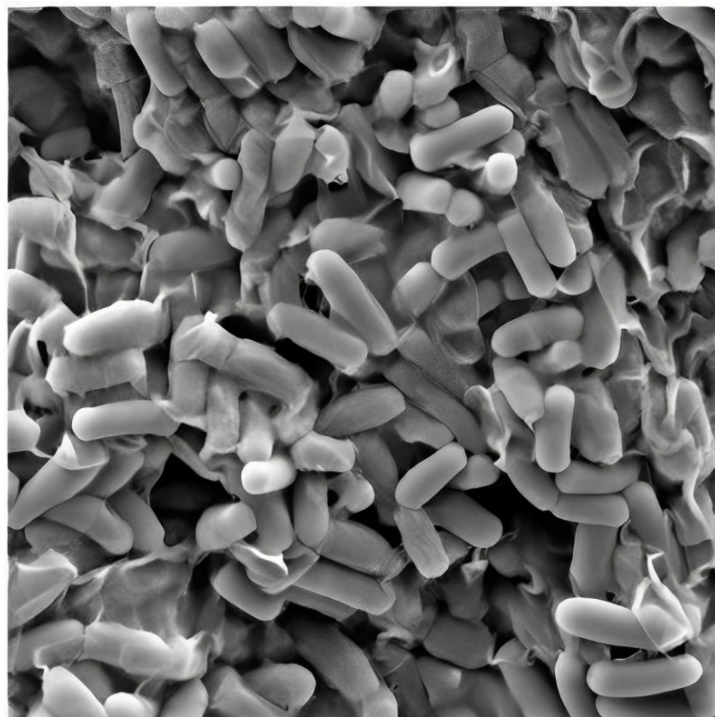


Figura 16: *Microscopia eletrônica de varredura de Bacillus subtilis. Bacillus subtilis é uma bactéria gram-positiva comumente encontrada no solo e conhecida por suas propriedades metabólicas diversificadas e sua capacidade de formar esporos resistentes. Fonte: adaptada de Trends in Microbiology.*

Para a realização do teste, 200 μl de solução bacteriana contendo 1×10^6 UFC/ml foi incubado por 24 h em meio de cultura - Caldo de Soja Tryptic (TSB) para a *Bacillus subtilis* e Luria Bertani (LB) para a *Escherichia coli*. O ensaio foi realizado baseado em [91], onde os inóculos bacterianos foram preparados pela suspensão de colônias, previamente crescidas em caldo Mueller Hinton (DifcoTM), em solução salina 0,9%. A densidade óptica da suspensão do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro com absorvância de 0,5 a 600 nm. 100 μl de solução estoque de bactérias foram adicionados a parte dos poços, enquanto outros 100 μl foram adicionados a poços que serviram como parâmetro de controle. Os poços foram então preenchidos até o volume de 200 μl com as soluções contendo os cubossomos nas concentrações também utilizadas no teste de viabilidade celular, com microdiluições seriadas 1:2, de modo que a faixa de concentração de cada material foi de 4 a 33 $\mu\text{g/ml}$ de cubossomo por amostra. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h. Os dados foram obtidos em quadruplicata e em cada placa foram mantidos controles negativo e positivo de cada bactéria. A avaliação de inibição de crescimento é feita, visualmente: os poços cujas concentrações de antimicrobiano inibiram o crescimento ficam com a coloração transparente, enquanto os poços nos quais houve crescimento bacteriano se tornam turvos.

4 Resultados e discussões

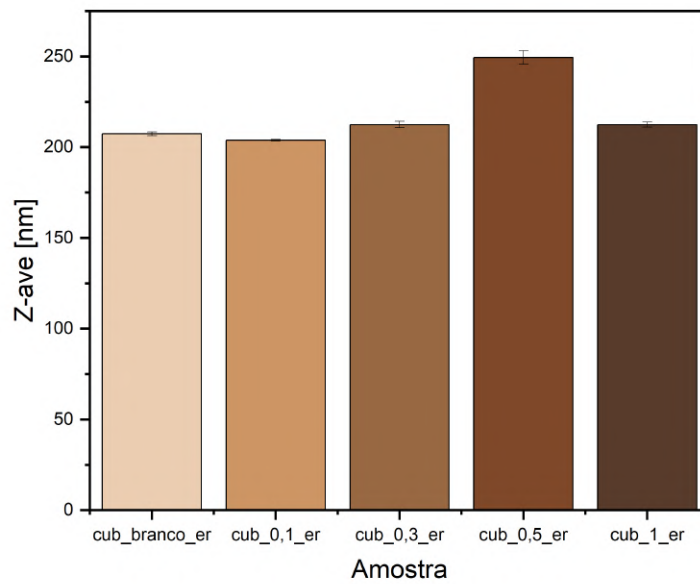
Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos através deste projeto de mestrado. A análise será dividida em 2 partes, a saber: cubossomos com variação na concentração de lisozima, e cubossomos em combinação da lisozima e da curcumina.

4.1 Cubossomos com diferentes concentrações de lisozima

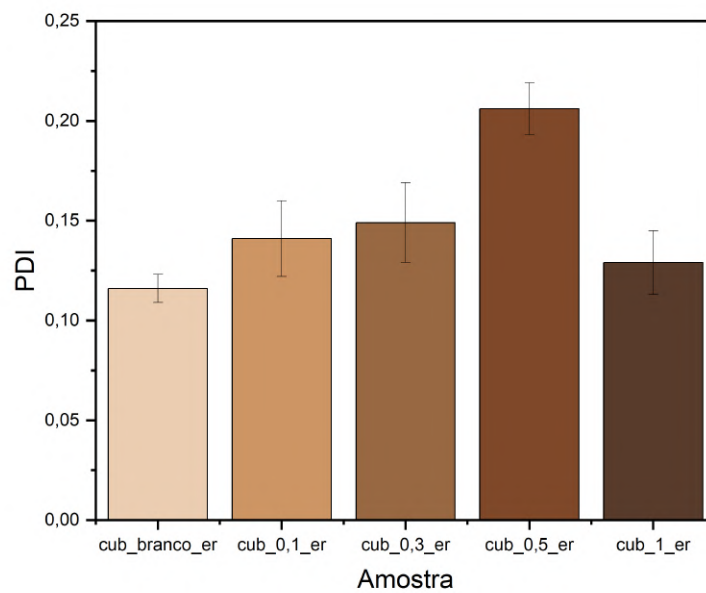
Nesta primeira parte da seção, serão apresentados os resultados para os cubossomos encapsulando as 5 diferentes concentrações de lisozima, como descrito em 3.3. Como anteriormente descrito, tais amostras foram sintetizadas fazendo-se uso da bomba peristáltica e do evaporador rotativo.

4.1.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS/ Potencial Zeta)

Através da técnica de DLS, foram obtidos dados referentes à média de tamanho hidrodinâmico e à carga superficial. Os dados de z-average, índice de polidispersão e potencial zeta são exibidos abaixo.



(a)



(b)

Figura 17: *Distribuição dos tamanhos (a) e polidispersão (b) das nanopartículas cúbicas pela técnica de DLS.*

Os cubossomos com lizozima encapsulada em diferentes concentrações apresentaram tamanho médio de 217 nm, com índice médio de polidispersão de 0,15. Tais resultados se mostram em conforme com os encontrados na literatura [92, 29, 93], indicando que o acréscimo na concentração do fármaco não induz ao aumento do tamanho hidrodinâmico

do cubossomo.

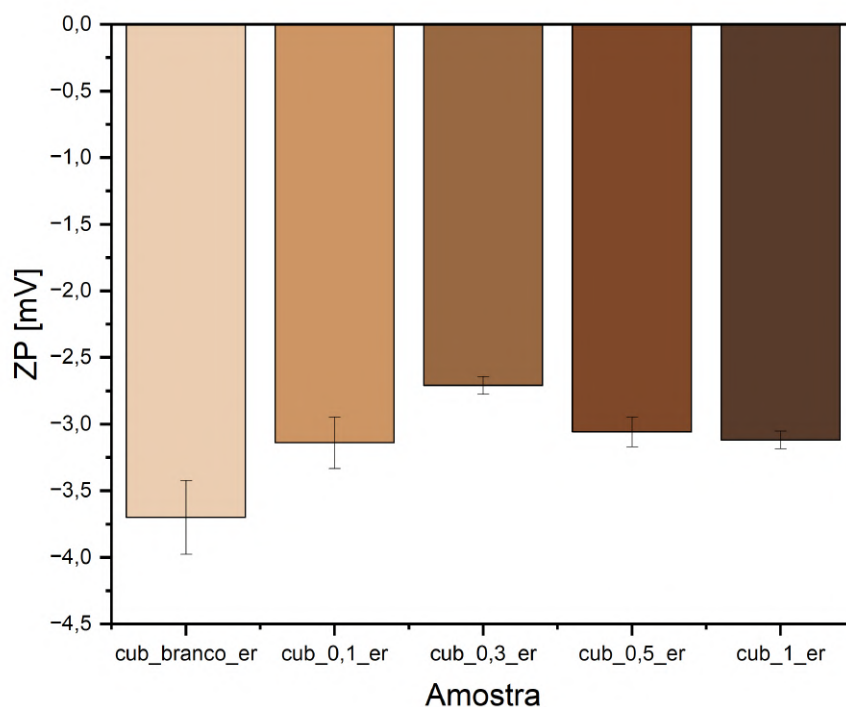


Figura 18: *Carga superficial das nanopartículas cúbicas pela técnica de DLS.*

Para análise de potencial- ζ , os dados obtidos para as 5 formulações analisadas revelam carga superficial média de -3,15 mV. Através destes dados, também é possível observar que o acréscimo na concentração de lisozima encapsulada não leva ao aumento da carga na superfície dos cubossomos, como relatado na literatura em [94]. Tais resultados são considerados dentro do esperado, pois todos os componentes utilizados na síntese do mesmo não apresentam carga, fazendo com que o cubossomo formado tenha o perfil de neutralidade. Além disto, a encapsulação da lisozima não influenciou em tal característica observada nessas nanopartículas.

4.1.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

Através da técnica de NTA, foram obtidos dados de tamanho e concentração das amostras analisadas. Tais dados são de extrema importância pois, a partir deles, são calculadas as concentrações de cubossomos na ausência/presença do fármaco a serem utilizadas no ensaio de viabilidade celular, que será discutido no próximo tópico.

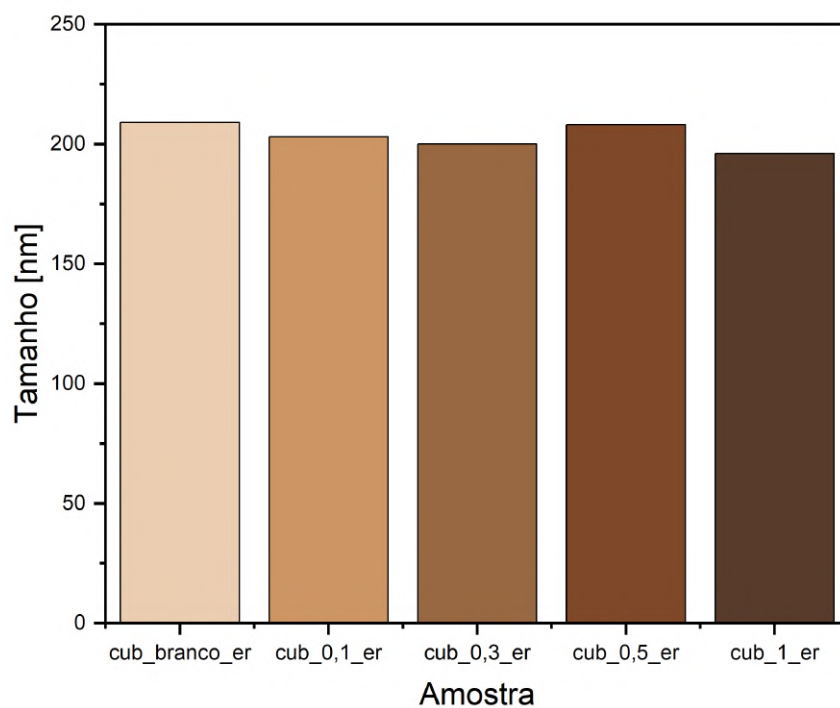


Figura 19: *Dados de tamanho das nanopartículas obtidos através da técnica de NTA.*

Através destes dados, não é possível observar indução no aumento de tamanho dos cubossomos quando a concentração de lisozima é aumentada. Os cubossomos apresentaram tamanho médio de 203,2 nm, que se mostram compatíveis com os dados obtidos pela técnica de DLS.

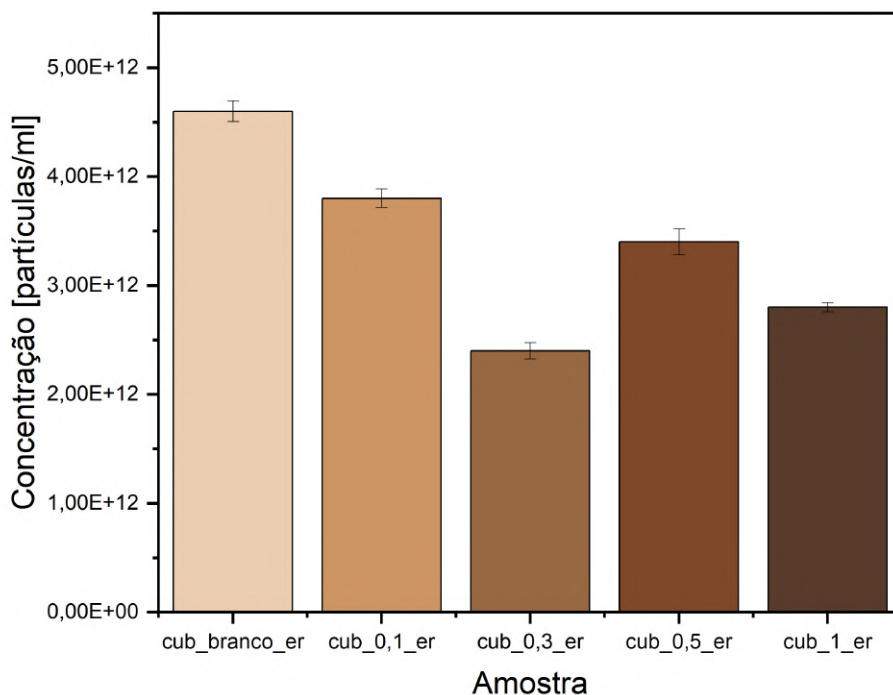


Figura 20: *Dados de concentração para as nanopartículas em solução através da técnica de NTA.*

Para os dados de concentração das partículas em solução, também obtidos pela técnica de NTA, é possível ver uma variação mínima entre os valores para as amostras analisadas, que variam entre 2,4 e 4,6 x10¹² partículas/ml (figura 20). Novamente, não é possível relacionar o acréscimo da concentração com o aumento da concentração da lisozima encapsulada no cubossomo. A análise de cubossomos pela técnica de NTA não possui muitos relatos na literatura, levando à dificuldade de comparação com resultados obtidos em outros estudos realizados. Há, porém, alguns relatos de concentração de cubossomos de fitantriol entre 4,09 a 6,67 x10¹² partículas/ml [64], dados estes que se aproximam dos obtidos neste projeto de mestrado.

4.1.3 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o cubossomo de fitantriol, nas concentrações descritas na tabela 2. Para o ensaio, foram utilizadas as células HaCat e MDA-MB-231, como anteriormente relatado neste texto.

Amostra	Composição
cel	célula (branco)
cub1	cubossomo 4 µg/ml
cub2	cubossomo 16,5 µg/ml
cub3	cubossomo 33 µg/ml
liso1	lisozima 0,06 µg/ml
liso2	lisozima 0,3 µg/ml
liso3	lisozima 0,5 µg/ml
cub1liso1	cubossomo 4 µg/ml e lisozima 0,06 µg/ml
cub2liso2	cubossomo 16,5 µg/ml e lisozima 0,3 µg/ml
cub3liso3	cubossomo 33 µg/ml e lisozima 0,5 µg/ml

Tabela 2: Concentrações de cubossomo e de lisozima utilizadas no ensaio de viabilidade celular

Nos gráficos abaixo, é possível ver os resultados obtidos para o ensaio de viabilidade celular.

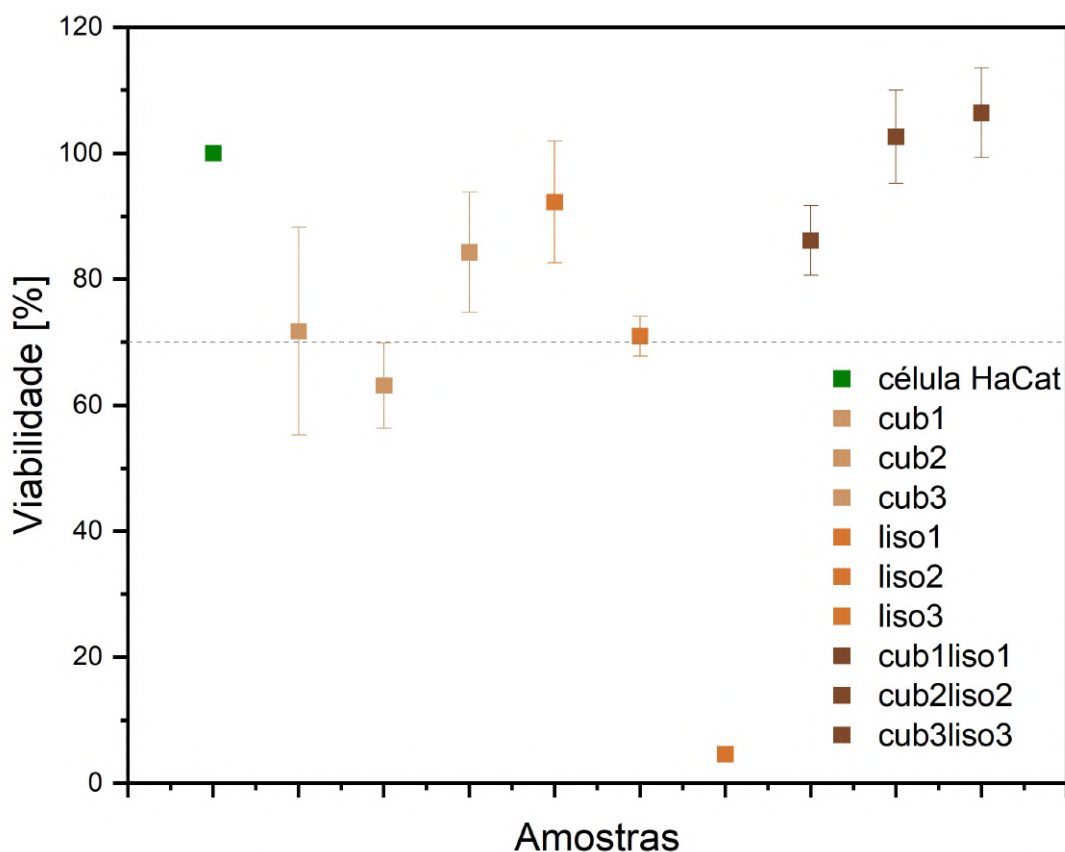


Figura 21: Dados de toxicidade obtidos através do ensaio de viabilidade celular com a linhagem HaCat.

Através dos resultados obtidos com a teste realizado com a linhagem HaCat, é possível observar o comportamento não tóxico do cubossomo, se tornando indiferente a presença ou a ausência do fármaco encapsulado. Apenas as amostras de lisozima pura na concentração de 0,5 µg/ml apresentou perfil de toxicidade; porém, quando incorporada no

cubossomo, não houve efeito citotóxico. É possível que a liberação da enzima tenha ocorrido de forma mais lenta quando internalizada no cubossomo, fazendo com que o contato com a célula ocorra de forma mais tardia. Zatloukalová et al. [95] obtém resultados de citotoxicidade células HaCat expostas a cubossomos de monoleína a partir da concentração de 90 $\mu\text{g/ml}$; já Al-Zuhairy et al. [96], encontra valores de viabilidade celular superiores a 98% para cubossomos formados por cristais líquidos de petrolato nas concentrações de 100 a 500 $\mu\text{g/ml}$, que decresce de forma suave para 90% com o aumento da concentração das formulações para 1000 $\mu\text{g/ml}$. Tais resultados fundamentam a baixa toxicidade das formulações de cubossomos nas concentrações testadas ao longo deste projeto de mestrado para células da linhagem HaCat.

Quanto às concentrações escolhidas, estudos realizados previamente pelo grupo mostram que em concentrações próximas a 40 $\mu\text{g/ml}$, o cubossomo de fitantriol já se mostra tóxico às células. Uma possível alternativa é o aumento da concentração da enzima encapsulada, a fim de se obter valores maiores de citotoxicidade celular.

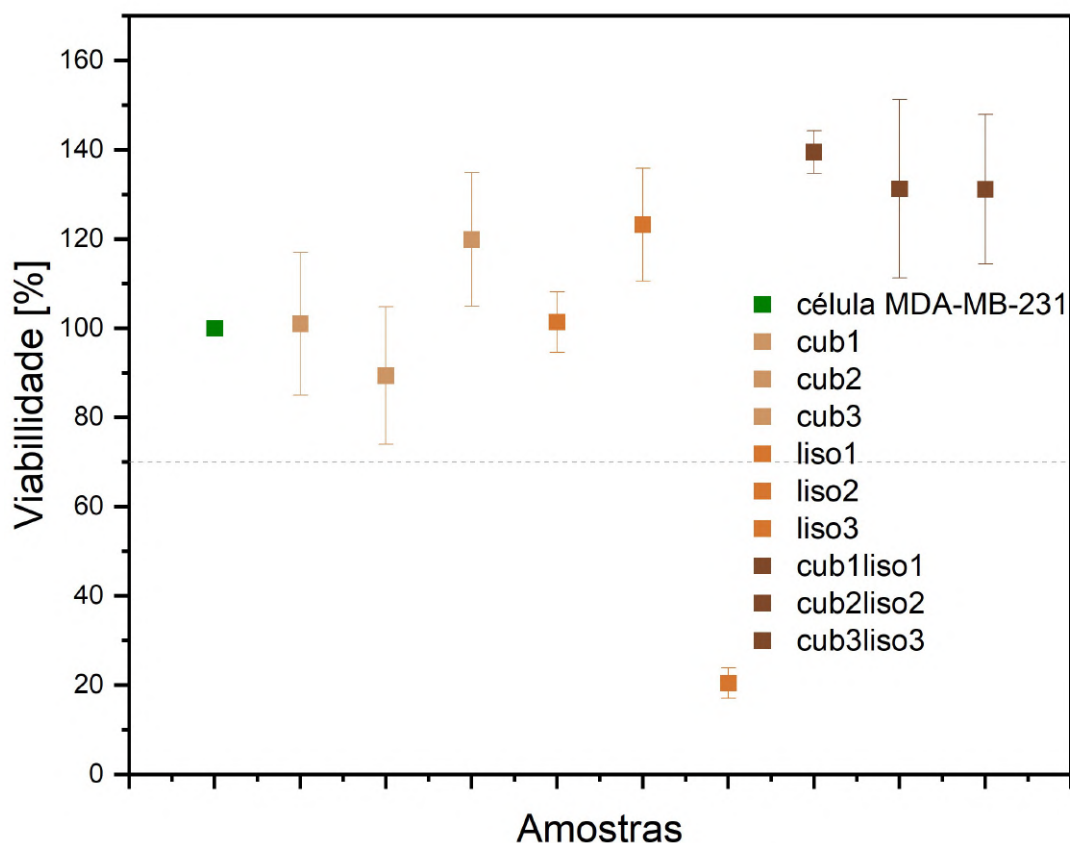


Figura 22: Dados de toxicidade obtidos através do ensaio de viabilidade celular com a linhagem MDA-MB-231.

Para a linhagem MDA-MB-231, valores similares de citotoxicidade foram encontrados. Apenas a amostra de lisozima na concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ induziu às células a uma viabilidade inferior à 70%, de aproximadamente 4%. Zaki et al. [97] relata valores de viabilidade celular para a linhagem MDA-MB-231 em tratamento com cubossomos de

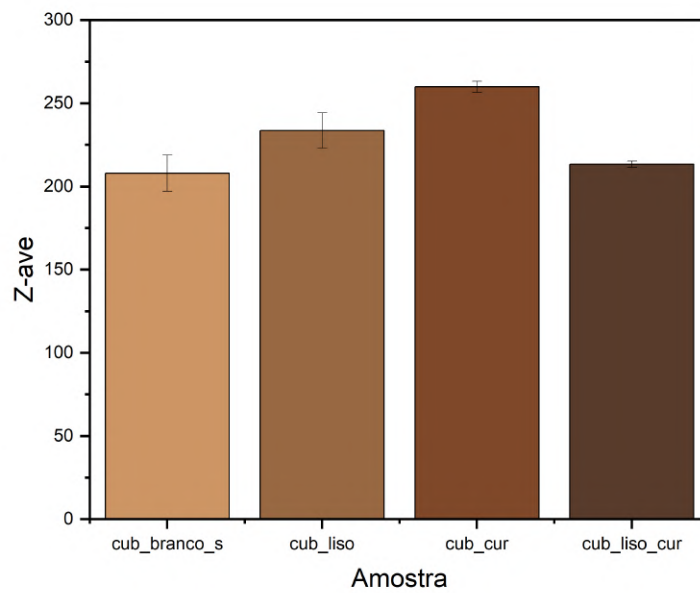
monoleína carregados com sinvastatina de aproximadamente 70 e 40% para as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$. Pramanik et al. [98], encontra valores de viabilidade de 41 e 63% para as células MDA-MB-231 tratadas com cubossomos de monoleína marcado com ácido hialurônico nas concentrações de 75 e 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Novamente, estudos publicados demonstram que, para haver toxicidade dos cubossomos em contato com células tumorais de mama, é necessário a realização do ensaio com concentrações relativamente maiores.

4.2 Cubossomos com lisozima e curcumina encapsuladas

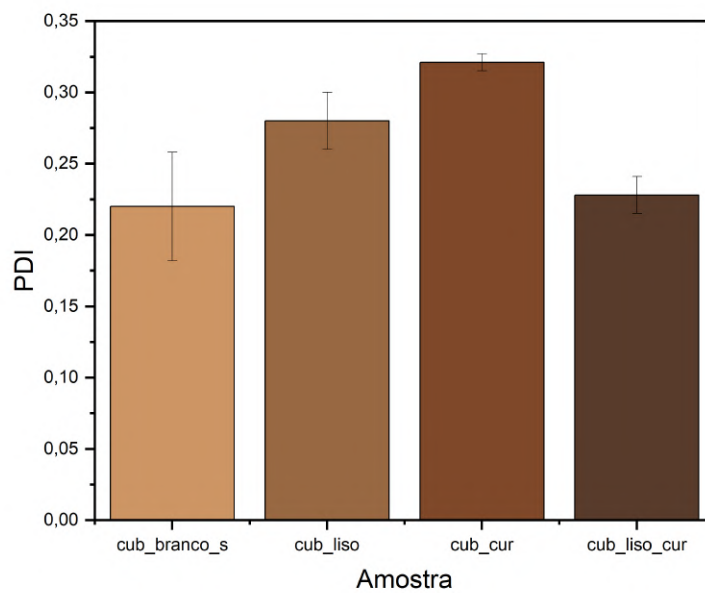
Na segunda parte da seção, serão apresentados os resultados para os cubossomos encapsulando a lisozima e a curcumina, ambas na concentração de 0,5 mg/ml , como descrito em 1. Nesta etapa, as amostras foram finalizadas pelo uso do sonicador.

4.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A técnica de DLS foi utilizada para obtenção dos dados de média de tamanho hidrodinâmico e carga superficial das amostras de cubossomo em combinação com a lisozima e a curcumina, como descrito na tabela 1. Os dados são exibidos nos gráficos a seguir.



(a)



(b)

Figura 23: *Distribuição dos tamanhos (a) e polidispersão (b) das nanopartículas cúbicas na presença da lisozima e da curcumina pela técnica de DLS.*

Pela técnica de DLS, foi possível obter uma média de tamanho hidrodinâmico de 228nm para as amostras analisadas. Os tamanhos não variam de forma linear em função das concentrações de fármacos, sendo a amostra de cubossomo + curcumina 0,5 mg/ml a apresentar o maior valor obtido. Apesar da diferença nas concentrações dos fármacos e

no processo de finalização das amostras, é possível observar valores próximos aos obtidos para os cubossomos com as diferentes concentrações de lisozima, exibidos no gráfico 17. Para os dados de polidispersão, foi obtido um valor médio de 0,26, também próximo dos valores obtidos para os cubossomos encapsulando as diferentes concentrações de lisozima. É possível observar que as amostras de cubossomo + lisozima 0,5 mg/ml e cubossomo + curcumina 0,5 mg/ml apresentam valores maiores, se comparado com as amostras de cubossomo branco e cubossomo + lisozima + curcumina 0,5 mg/ml; mas, devido ao desvio dos dados obtidos, não é possível associar tão diferença à concentração dos fármacos encapsulados.

Por fim, foram obtidos os dados de carga superficial das amostras, também pela técnica de DLS. A média de potencial zeta foi de -2,9 mV, sendo as amostras de cubossomo + curcumina 0,5 mg/ml e cubossomo + lisozima + curcumina 0,5 mg/ml as com maior valor de carga em módulo. Novamente não é possível observar um comportamento linear dos dados obtidos em função do aumento da concentração dos fármacos, levando a hipótese de que o fármaco e sua respectiva concentração não alteram tais características da nanopartícula. Em comparação com os dados de potencial zeta mostrados na seção 4.1.1, também não é possível ver diferença significativa nos valores obtidos.

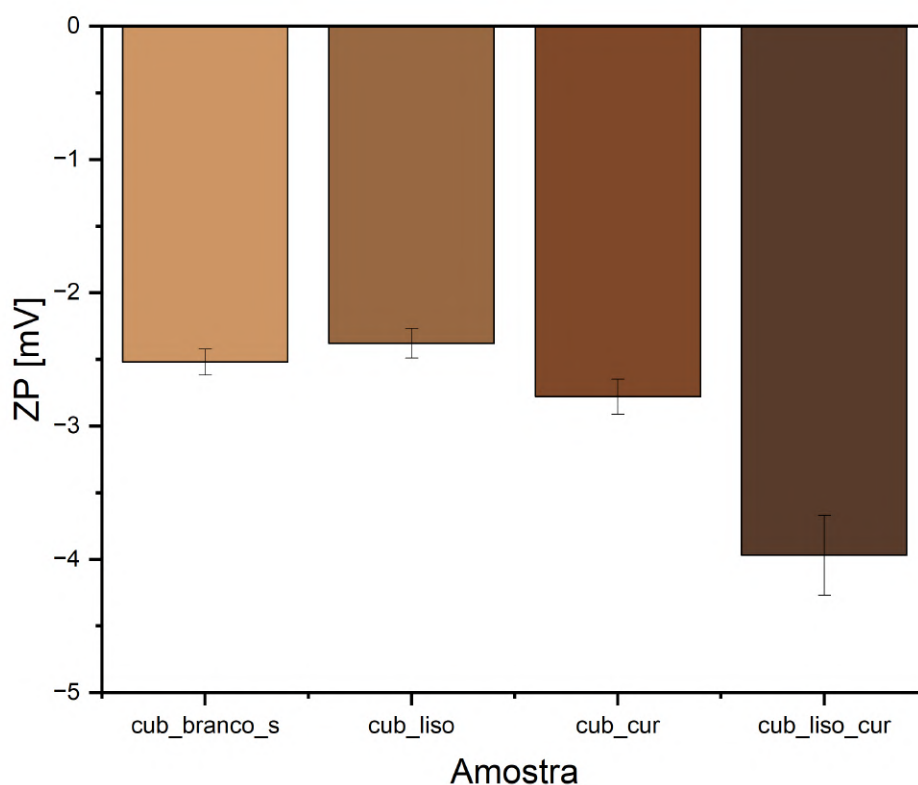
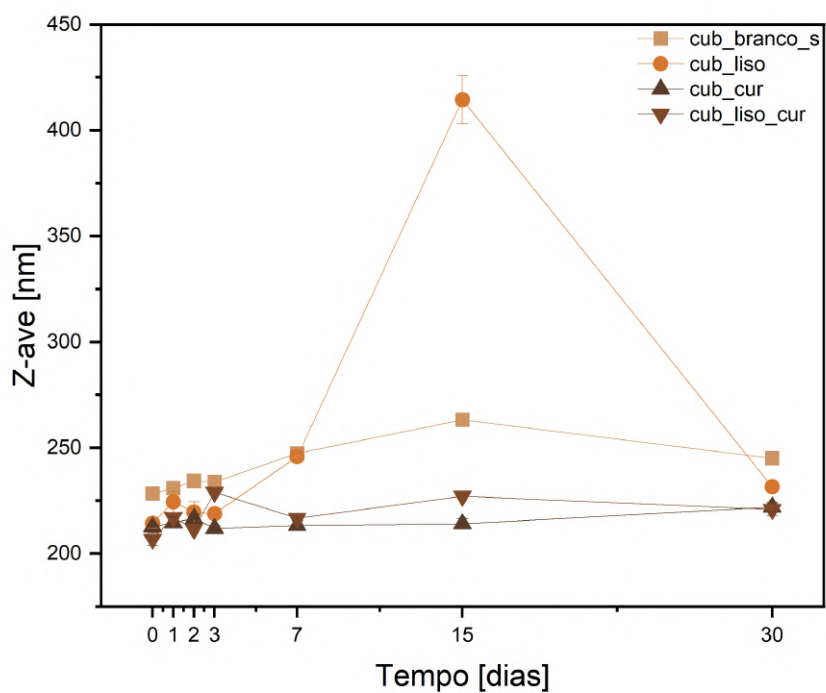


Figura 24: Carga superficial das nanopartículas cúbicas na presença da lisozima e da curcumina pela técnica de DLS.

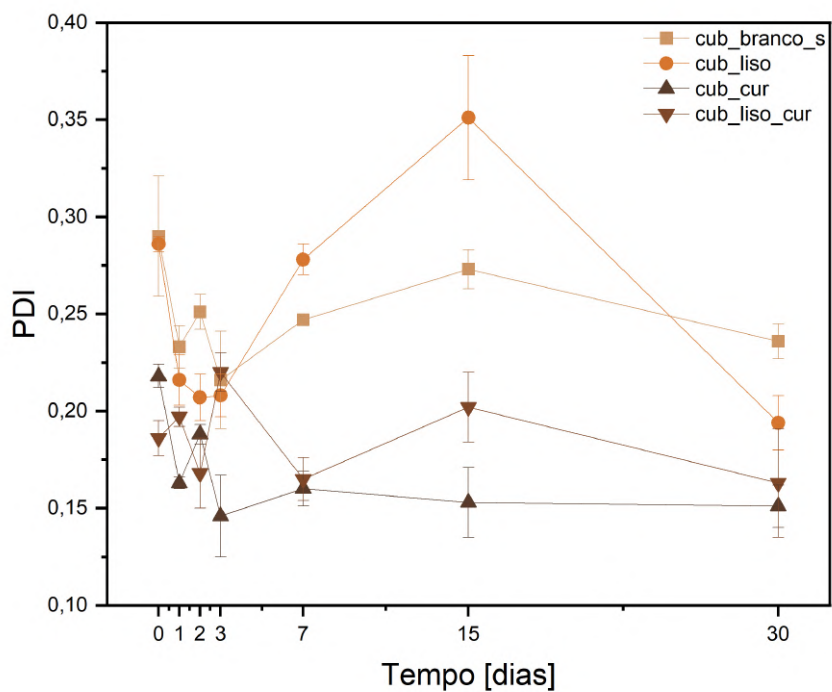
Comparando os dados das amostras sintetizadas com o uso da bomba peristáltica e finalizadas com o evaporador rotativo 4.1.1 com os dados desta seção, é possível afirmar que o processo de finalização das amostras não interferiu de forma efetiva nos valores obtidos através da técnica de DLS. Sendo assim, a escolha por prosseguir utilizando o sonicador para finalização da síntese das amostras foi pautada no menor tempo gasto para tal.

4.2.2 Estabilidade coloidal das amostras ao longo do tempo

A estabilidade coloidal das amostras estudadas na segunda etapa deste projeto de mestrado 1 foi analisada através das medidas de DLS. Tais medidas foram repetidas com as mesmas amostras em suspensão ao longo de 30 dias. A estabilidade das nanopartículas é um fator desejável e necessário, para que possam ser utilizadas com a finalidade de *drug delivery systems* em meios biológicos [4, 36, 99]. Para isto, foram coletados dados das amostras de cubossomo encapsulando a lisozima e a curcumina finalizadas pelo sonicador, como descrito na tabela 1. Os dados foram coletados nos dias 0, 1, 2, 3, 7, 15 e 30 em relação ao dia do preparo das amostras. A seguir, são exibidos os dados coletados.



(a)



(b)

Figura 25: Distribuição dos tamanhos (a) e polidispersão (b) das nanopartículas cúbicas na presença da lisozima e da curcumina no intervalo de 30 dias pela técnica de DLS.

O gráfico (a) apresentado na figura 25 apresenta os valores de tamanho hidrodinâmico obtidos para as amostras analisadas. Através dele, é possível observar que o tamanho das nanopartículas se manteve estável em aproximadamente 232 nm, indicando que as amostras provavelmente não tiveram aumento de aglomeração ao longo dos 30 dias. Há porém uma variação considerada na coleta realizada no 15^o dia de análise, onde todas as amostras (em especial a de cubossomo + lisozima 0,5 mg/ml, com valor médio de 414 nm) apresentaram valores muito acima dos obtidos nos demais dias. Tais variações podem ser relacionadas a um erro na leitura executada pelo equipamento, uma vez que a próxima medida realizada no 30^o dia de análise volta a exibir valores próximos dos outrora obtidos.

Para os dados de polidispersão, foi obtido um valor de aproximadamente 0,2 ao longo dos 30 dias de análise. Apesar do valor indicar boa homogeneidade das amostras, há variações consideráveis nos valores obtidos para o índice de polidispersão no 15^o dia de análise; tal fato se assemelha ao ocorrido com os dados de tamanho hidrodinâmico, indicando de fato uma possível interferência das configurações do equipamento nos dados obtidos.

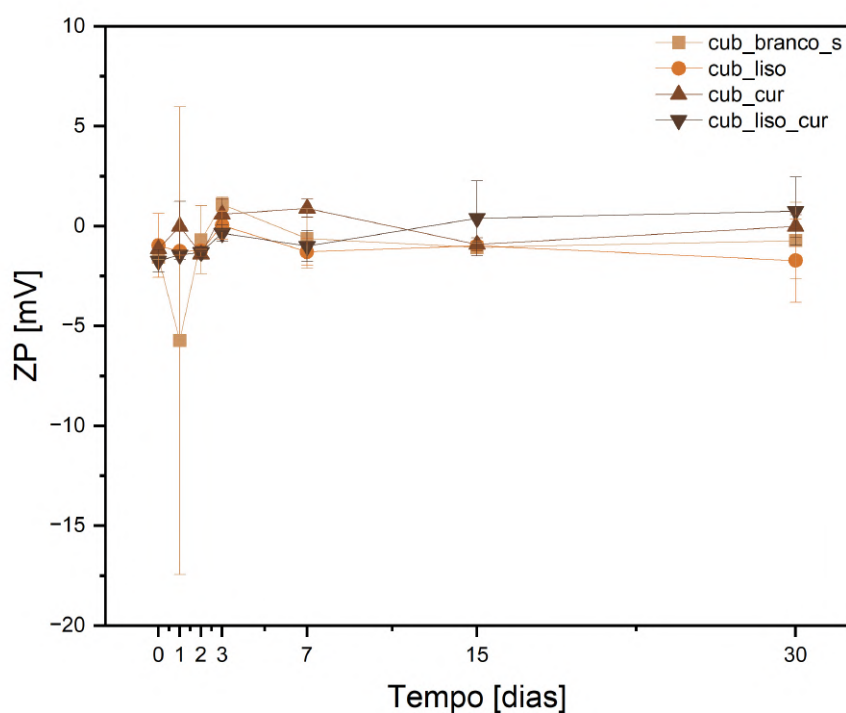


Figura 26: Carga superficial das nanopartículas cúbicas na presença da lisozima e da curcumina no intervalo de 30 dias pela técnica de DLS.

Quanto à carga superficial das amostras, foi obtido um valor médio de -0,8 mV, indicando que a estabilidade coloidal foi mantida em relação à mobilidade eletroforética das amostras. A amostra de cubossomo branco apresentou grande desvio padrão na segunda

coleta de dados, indicando um possível erro de medida.

4.2.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

As amostras foram analisadas através da técnica de NTA, a fim de se obter informações quanto ao tamanho e à concentração das nanopartículas em solução.

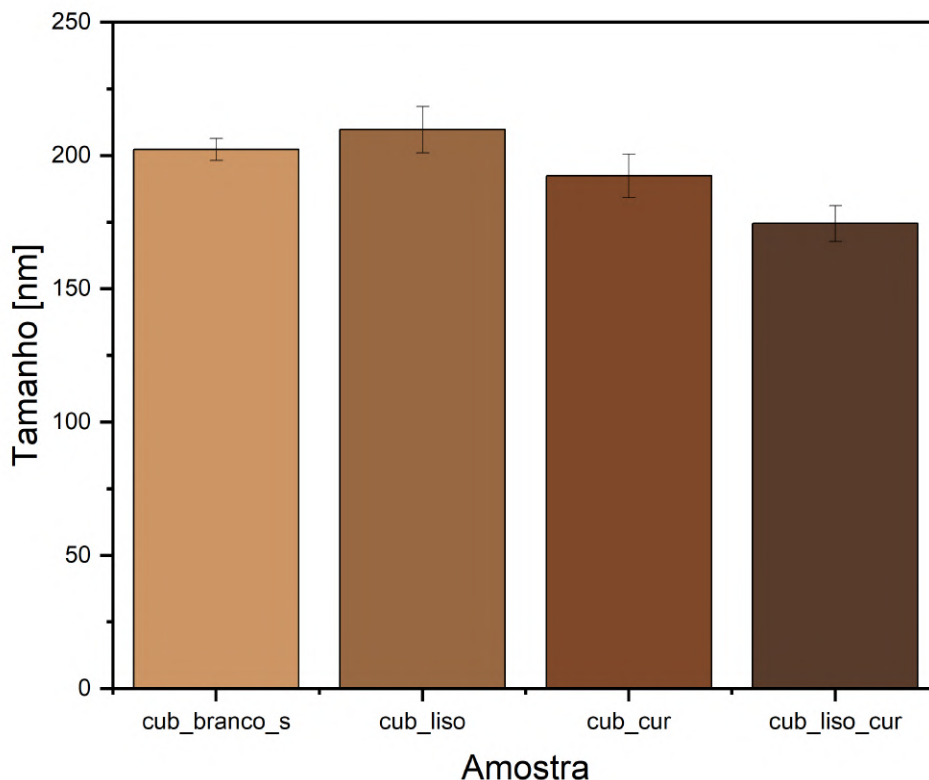


Figura 27: *Dados de tamanho das nanopartículas na presença da lisozima e da curcumina obtidos através da técnica de NTA.*

Com os dados obtidos pela técnica de NTA, foram obtidos tamanhos entre 175 e 210 nm. Tais valores se diferem minimamente dos valores encontrados através da técnica de DLS (4.2.1); Tais diferenças podem ser atribuídas ao fato de que o DLS faz suas análises a partir da dispersão da luz em partículas maiores, enquanto que o NTA realiza suas medições individualmente em cada nanopartícula, fazendo-se posteriormente a média ponderada em função da concentração dessas nanopartículas em solução [100, 101]. Além disto, o aumento do tamanho das nanopartículas não pode ser relacionado ao aumento da concentração de fármaco encapsulado nos cubossomos.

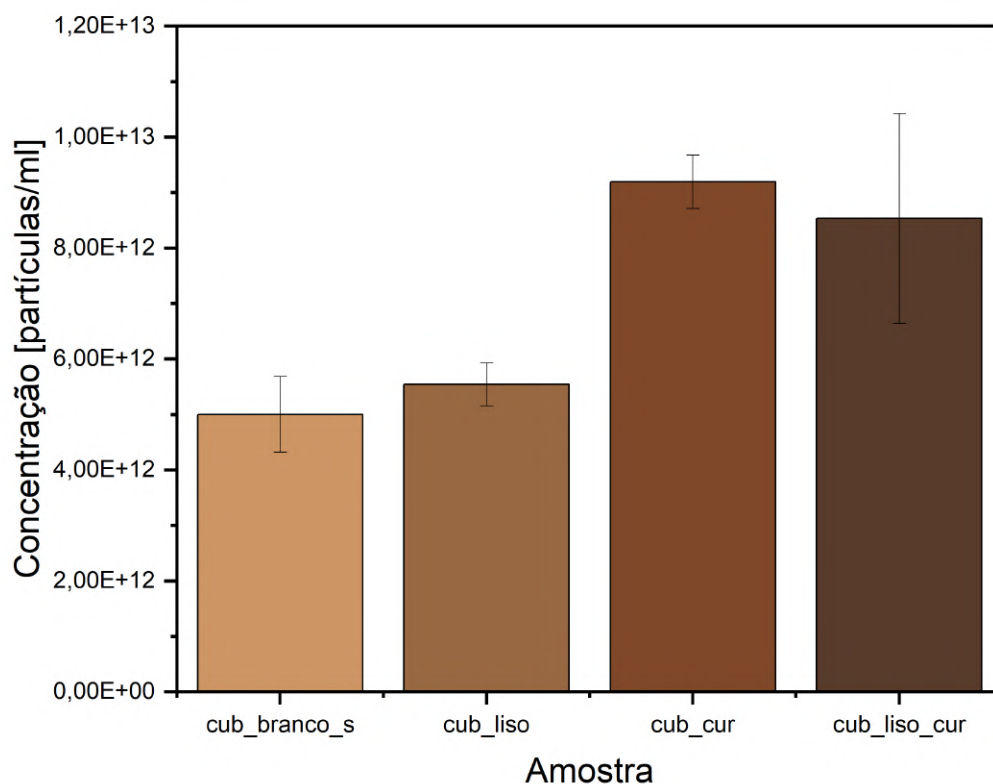


Figura 28: *Dados de concentração para as nanopartículas em solução, na presença da lisozima e da curcumina através da técnica de NTA.*

Quanto à concentração das nanopartículas em solução, foram obtidos valores entre 5 e $9,2 \times 10^{12}$ partículas/ml, que não se apresentam de forma linear. Apesar de não ser possível relacionar o acréscimo nos valores de concentração ao aumento da concentração dos fármacos encapsulados, novamente é possível observar a proximidade dos valores encontrados neste projeto com os relatados na literatura [64].

4.2.4 Eficiência de Encapsulação

Os dados de Eficiência de Encapsulação foram obtidos através da quantificação da concentração dos fármacos encapsulados pela técnica de UV-vis. Cada medida foi feita em triplicata, para que depois os dados pudessem ser tratados, e representar o percentual real de encapsulação. Os dados são exibidos na tabela a seguir.

Através dos dados obtidos, é possível observar que os fármacos possuem valores próximos entre si quanto às suas encapsulações. É possível então relacionar os valores de concentração com o percentual efetivo de encapsulação, sendo que o resultado percentual é obtido em função da concentração inicial de fármaco que desejou-se encapsular [101]. Além disto, é possível encontrar trabalhos na literatura com valores de encapsulação em cubossomos

Amostra	E.E [%]
cub_liso	90
cub_cur	82
cub_liso_cur	83 (liso), 80 (cur)

Tabela 3: *Dados de eficiência de encapsulação para as amostras de cubossomo e os respectivos fármacos encapsulados*

próximos aos obtidos neste projeto [102, 103].

4.2.5 Eficiência de Liberação

O ensaio de liberação dos fármacos encapsulados no cubossomo foi realizado conforme metodologia apresentada em 3.7. A fim de acompanhar a cinética de liberação de ambos os fármacos, foi realizado o experimento de diálise, para obtenção dos dados de eficiência de liberação. As figuras abaixo apresentam os resultados do ensaio, e as discussões serão feitas em sequência.

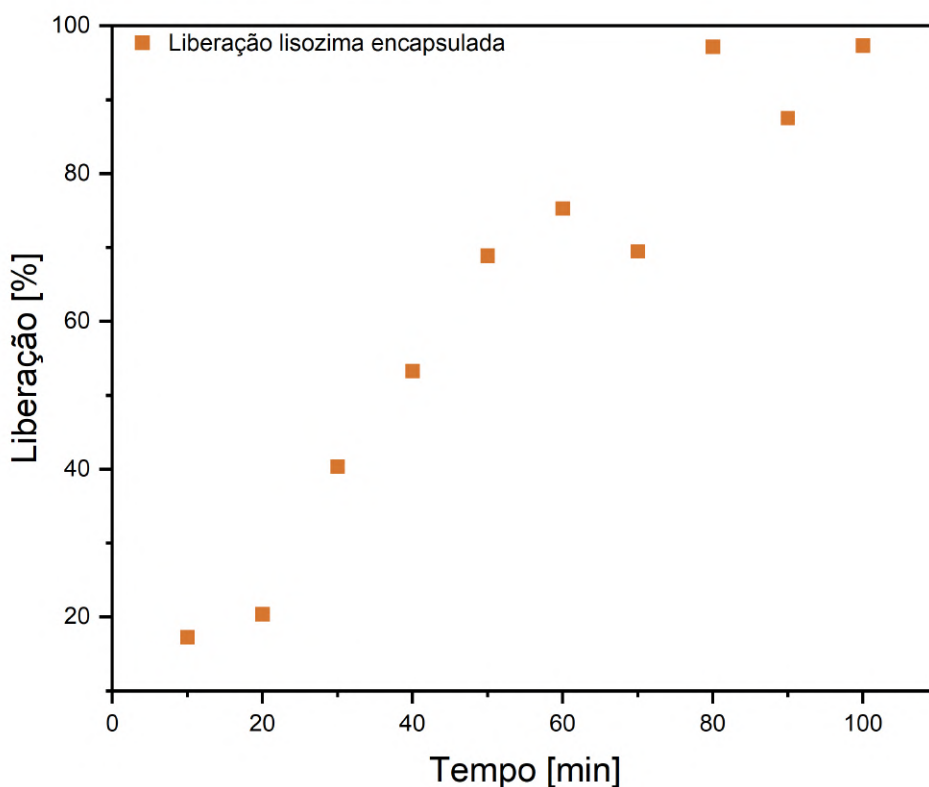


Figura 29: *Dados obtidos através do ensaio de liberação para a lisozima encapsulada pelo cubossomo.*

Para o sistema cubossomo-lisozima, é possível observar que a difusão para o meio

externo alcança sua totalidade próximo aos 100 minutos após ao início do experimento. A liberação não segue um padrão linear, e pelo fato do experimento não ter sido replicado, não há como afirmar que tal comportamento de liberação não sofre influências dos erros atribuídos ao próprio experimento.

Além disto, é possível observar que a liberação começa com cerca de 20% do fármaco já liberado; Tal comportamento é atribuído ao fato de que previamente é realizado o experimento de quantificação de fármaco encapsulado, e que neste período o fármaco já sofre liberação do cubossomo que o encapsula.

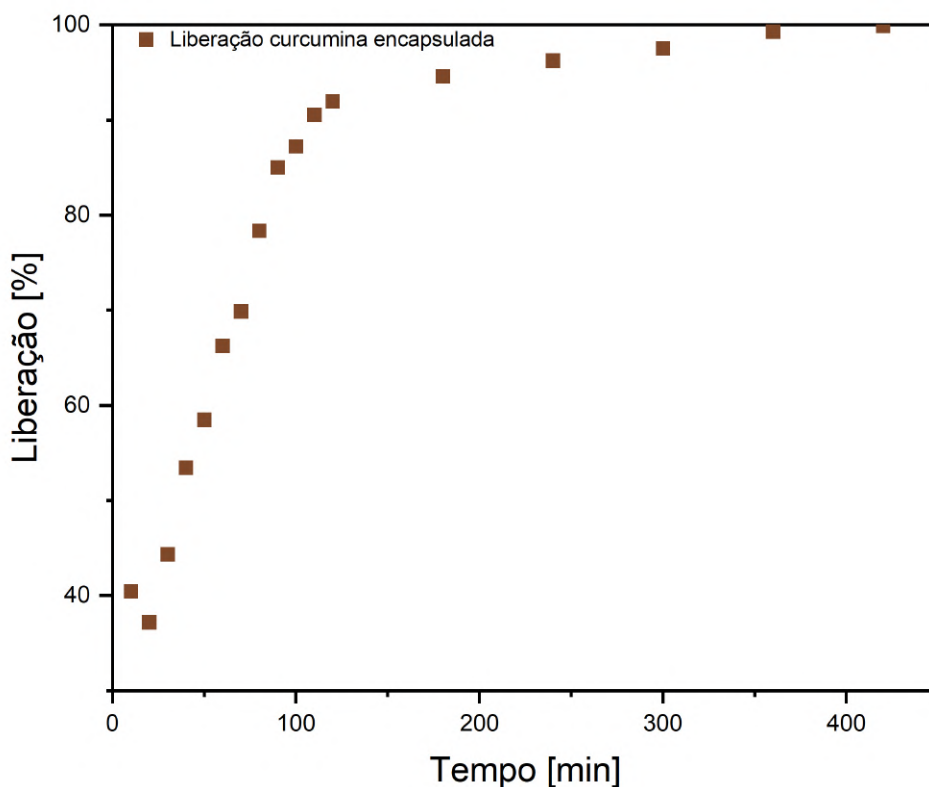


Figura 30: *Dados obtidos através do ensaio de liberação para a curcumina encapsulada pelo cubossomo.*

Para o sistema cubossomo-curcumina, a liberação total do fármaco acontece em 420 minutos. O tempo de liberação do fármaco é maior, se comparado ao experimento realizado com o sistema cubossomo-lisozima, que alcança a totalidade de liberação da enzima em 1/4 do tempo estimado para a liberação da curcumina. Novamente, tal sistema necessita de novas replicatas para que possa ser analisado o tempo de liberação, bem como para obtenção do desvio padrão das medidas.

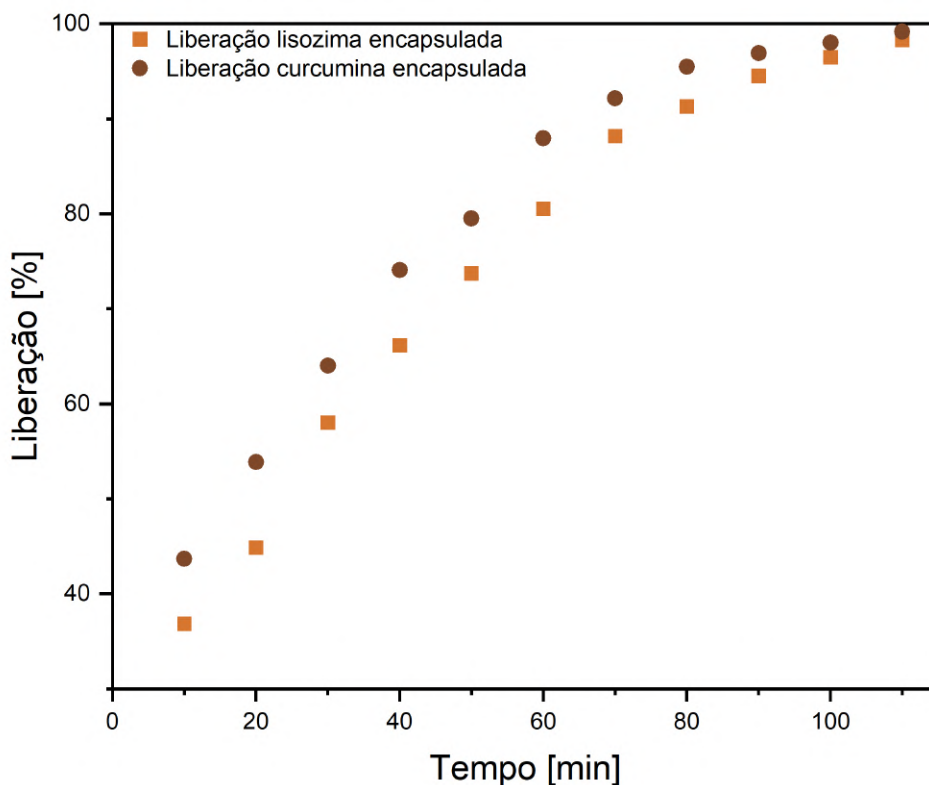


Figura 31: *Dados obtidos através do ensaio de liberação para a lisozima e a curcumina encapsuladas pelo cubossomo.*

Para o sistema cubossomo-lisozima-curcumina, a liberação dos fármacos ocorreu de forma similar. Tanto a lisozima quanto a curcumina tiveram sua liberação máxima em 110 minutos, e ambos os fármacos já haviam sido liberados em cerca de 40% quando o experimento aconteceu, fato este relacionado ao experimento de encapsulação que também foi realizado de forma prévia a este experimento.

O tempo de liberação se assemelha ao obtido com o experimento realizado no sistema cubossomo-lisozima. Apesar disto, não é possível afirmar que o tempo de liberação obtido para o sistema cubossomo-curcumina extrapola o tempo esperado para este sistema, devido à falta de reprodutividade do experimento para as três amostras. Poucos estudos sobre liberação de fármacos encapsulados em cubossomos de fitantriol são encontrados na literatura, principalmente sobre a lisozima e a curcumina, para que sejam utilizados a fim de comparação com os resultados obtidos neste projeto de mestrado. Apesar disto, os resultados encontrados na literatura sugerem tempos de liberação variados, que vão desde poucas horas [104] até dias [105]; estes resultados diferem dos encontrados através deste projeto de mestrado, e tais diferenças podem ser atribuídas ao uso do tampão HEPES pH 7.4 como simulador do meio externo, além das diferenças na própria execução dos experimentos, como filtração prévia, diâmetro do filtro, umidade local, dentre outros. A

interação dos agentes encapsulados com os cubossomos, bem como o lipídio utilizado para síntese do mesmo (sendo possível a utilização do fitantriol ou da monoleína) também são fatores a serem considerados.

4.2.6 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Os dados de SAXS obtidos foram analisados, a fim de se obter informações quanto à estrutura interna das nanopartículas lipídicas de fase cúbica. Com os dados iniciais, foi plotado o gráfico da intensidade de raios-x em função do vetor de espalhamento. Abaixo, tem-se o respectivo gráfico:

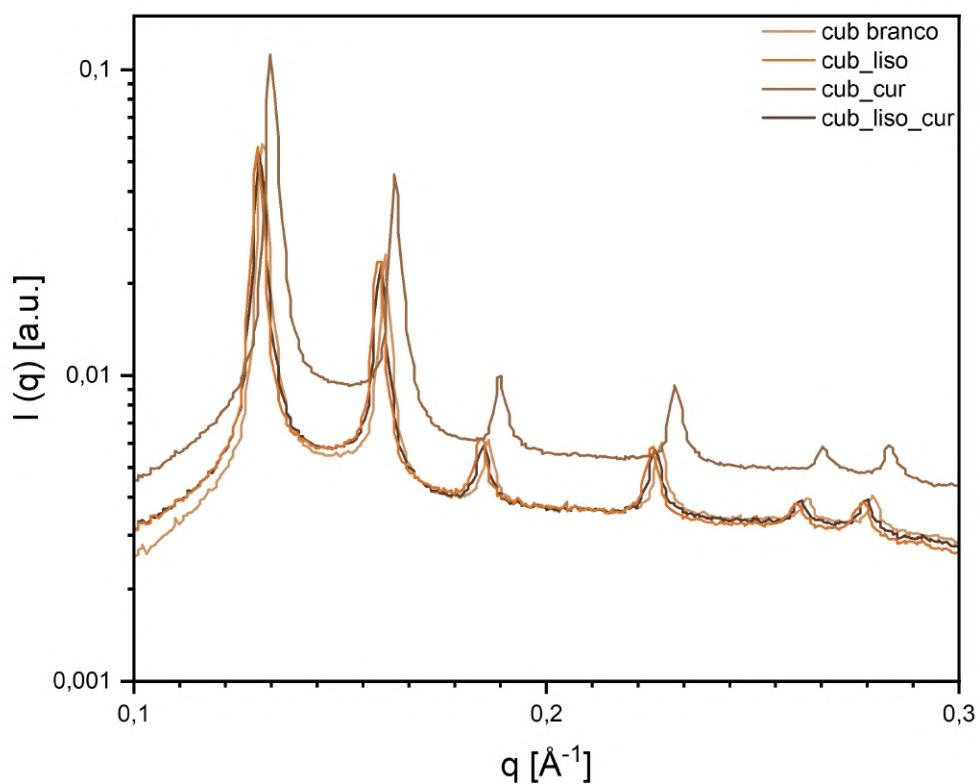


Figura 32: *Dados obtidos através da técnica de SAXS para as amostras de cubossomo em presença ou ausência dos fármacos.*

A partir dos picos de difração obtidos pela técnica, foi calculado o parâmetro de rede. A tabela abaixo mostra os valores obtidos para as amostras analisadas.

Amostra	pico q_1 [Å]	pico q_2 [Å]	pico q_3 [Å]	pico q_4 [Å]	pico q_5 [Å]	pico q_6 [Å]
cub branco	0,131	0,161	0,186	0,228	0,263	0,279
cub_liso	0,13	0,159	0,184	0,225	0,26	0,277
cub_cur	0,133	0,163	0,189	0,231	0,267	0,283
cub_liso_cur	0,13	0,16	0,185	0,226	0,262	0,277

Tabela 4: Posição dos picos obtidos através da técnica de SAXS.

Sabe-se que, para as amostras de cubossomos, duas possíveis simetrias são esperadas, a saber: $Im\bar{3}m$ ou $Pn\bar{3}m$. Para confirmação da simetria encontrada, basta encontrar a relação entre os picos q_2 e q_3 em relação ao pico q_1 . A tabela abaixo mostra os valores encontrados para esta relação.

Amostra	Relação pico q_2/q_1	Relação pico q_3/q_1	Valor de referência simetria $Im\bar{3}m$	Valor de referência simetria $Pn\bar{3}m$
cub branco	1,229	1,419		
cub_liso	1,223	1,415	$q_2/q_1 = 1,414$	$q_2/q_1 = 1,224$
cub_cur	1,225	1,421	$q_3/q_1 = 1,732$	$q_3/q_2 = 1,414$
cub_liso_cur	1,230	1,423		

Tabela 5: Comparação dos valores de referência para as simetrias $Im\bar{3}m$ e $Pn\bar{3}m$ com os valores encontrados para as amostras analisadas através dos picos de SAXS.

Comparando os resultados obtidos com os valores de referência para as duas possíveis simetrias do cubossomo, confirma-se que as amostras apresentam valores próximos aos encontrados para a simetria $Pn\bar{3}m$, confirmando então a estrutura destes cubossomos de fitantriol. E, apesar, de haver um deslocamento da curva obtida para a amostra de cubossomo + curcumina, atribuído à diminuição dos canais de água dessas nanopartículas, a estrutura deste cubossomo não se altera, sendo desejado novas análises de SAXS desta amostra para investigação de tal deslocamento.

4.2.7 Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)

As imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão foram obtidas para critério de avaliação da morfologia das nanopartículas, bem como obtenção do tamanho. Devido à disponibilidade do equipamento, somente foi analisada através da técnica a amostra de cubossomo + lisozima, na concentração já citada em 1.

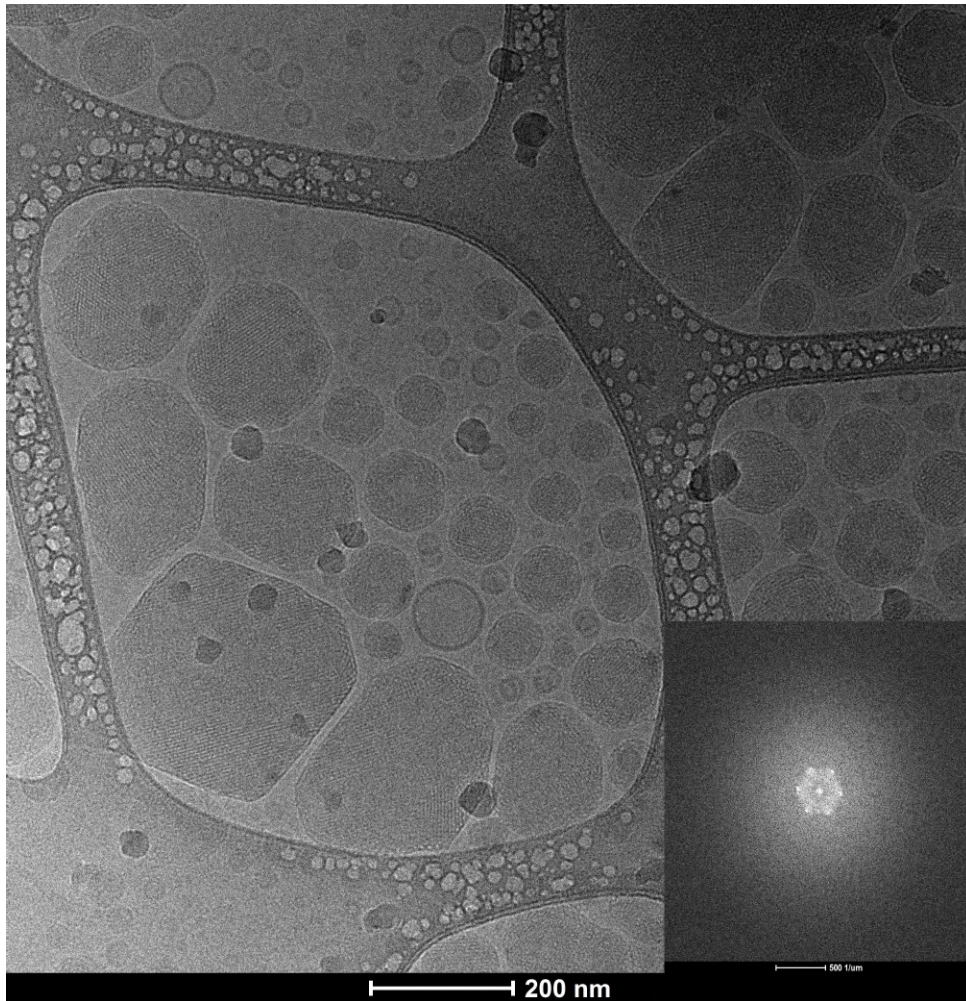


Figura 33: Imagem de Cryo-TEM para a amostra de cubossomo com 0,5 mg/ml de lisozima (*cub_liso*) preparada através do método de sonificação, e seus padrões correspondentes de Transformada Rápida de Fourier (FFT).

As imagens de Cryo-TEM permitiram verificar cubossomos de tamanho médio de 200 nm, que se aproxima do valor médio obtido pela técnica de DLS. A imagem obtida pela técnica de Cryo-TEM foi analisada pelo software ImageJ, para que fosse possível obter os padrões de Transformada Rápida de Fourier (FFT). Através destes padrões, foi possível analisar a estrutura interna dos cubossomos. Os cubossomos apresentaram simetria hexagonal, que é esperado quando se tem a projeção em duas dimensões da rede cúbica tridimensional ($Pn3m$) alinhada na direção de visualização [106].

4.2.8 Susceptibilidade bacteriana

O ensaio de susceptibilidade bacteriana foi realizado a fim de se quantificar as concentrações ideais para que a nanopartícula não interfira na homeostase do organismo ao receber tal fármaco nanoencapsulado. Para a realização do ensaio, foram utilizadas as concentrações de 4, 16.5 e 33 $\mu\text{g/ml}$ de cubossomo, com ou sem os fármacos encapsulados. Os gráficos abaixo mostram os resultados obtidos.

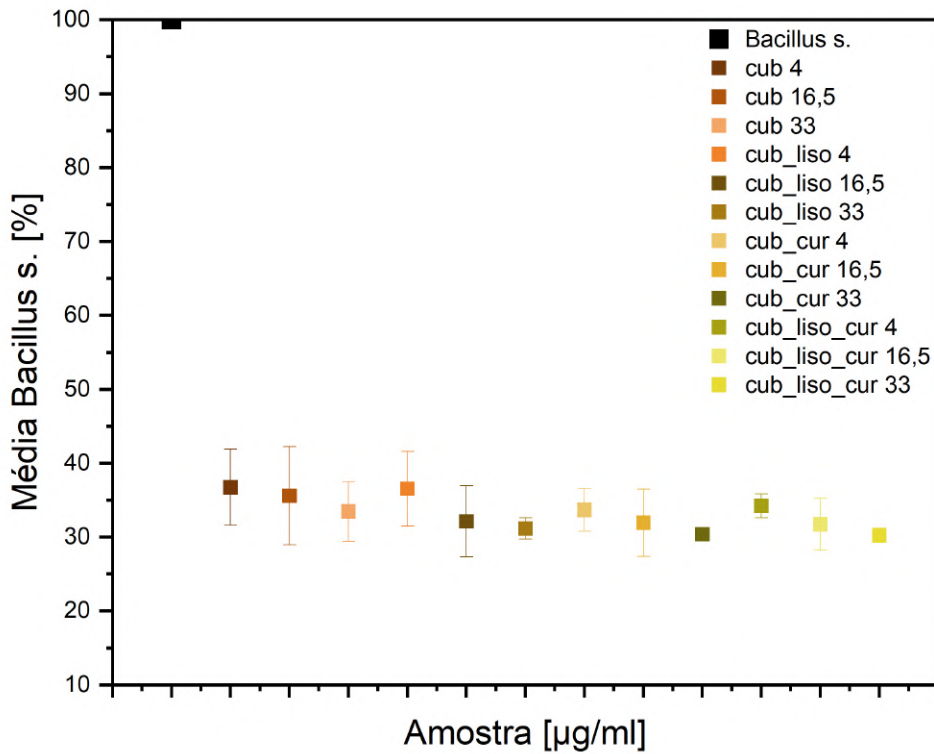


Figura 34: Resultados obtidos para a bactéria *Bacillus subtilis* em função das concentrações de cubossomo utilizadas

Quanto aos resultados obtidos para o ensaio realizado com a *Bacillus subtilis*, foi possível verificar que o cubossomo na sua menor concentração já mostrou efeitos antimicrobianos. Quando houve a adição dos fármacos, nenhum efeito foi observado além do obtido para o cubossomo puro. Tal resultado é interessante pois demonstra que o próprio cubossomo pode ser utilizado como agente antibacteriano, sem a necessidade de adição de fármacos em sua composição.

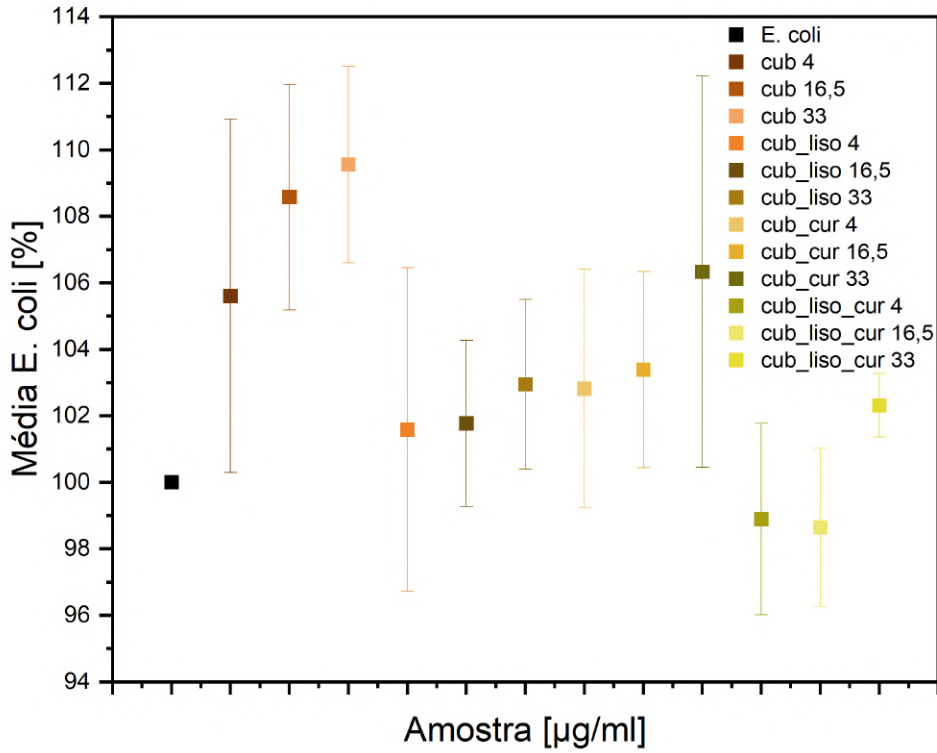


Figura 35: Resultados obtidos para a bactéria *Escherichia coli* em função das concentrações de cubossomo utilizadas

Já para a bactéria *Escherichia coli*, os resultados obtidos mostram que as bactérias não sofreram nenhum efeito quando expostas aos cubossomos, diferentemente do resultado obtido para a bactéria *Bacillus s.*; além disto, nenhum efeito foi observado quando expostas aos fármacos encapsulados no cubossomo. Este resultado revela que para se determinar a concentração mínima necessária para ação na bactéria em questão, são necessários novos testes com aumento significativo da concentração dos fármacos e do cubossomo.

5 Conclusão

Neste projeto de mestrado, foram sintetizadas nanopartículas lipídicas de fase cúbica, através da utilização do lipídio fitantriol, na presença do estabilizador f-127. O tampão Hepes pH 7.4 foi utilizado para manter as nanopartículas em estado neutro.

Na primeira etapa de execução, amostras de nanopartículas em presença de 5 concentrações diferentes da lisozima foram analisadas. Dados de DLS revelaram tamanho médio de 217 nm, com PDI de 0,15. O potencial zeta médio encontrado foi de -3,15 mV. Pela técnica de NTA, o tamanho médio obtido foi de 203,2 nm, se aproximando aos valores obtidos pelo DLS, e os dados de concentração de mostraram próximos aos encontrados na literatura. Para a viabilidade celular, os nanocompósitos foram testados nas células HaCat e MDA-MB-231. Tais resultados mostraram que as concentrações de lisozima utilizadas não se mostraram tóxicas às células utilizadas, sendo necessário outros testes com concentrações maiores para visualização dos seus efeitos.

Na segunda etapa do projeto, foram sintetizados cubossomos na presença de concentrações definidas de lisozima e curcumina. Tais sistemas foram analisados pelas técnicas utilizadas na primeira etapa de execução deste projeto. Pelo DLS, o tamanho médio obtido foi de 228 nm, que não se distancia do valor obtido para a encapsulação de somente um fármaco. Com PDI médio de 0,26, e potencial zeta médio de -2,9 mV, é possível observar que os valores não se alteram de forma substancial quando é encapsulado um segundo fármaco no cubossomo, mesmo quando a lisozima apresenta perfil hidrofílico enquanto a curcumina apresenta perfil hidrofóbico. Com a análise de estabilidade coloidal das amostras ao longo de 30 dias, foi possível observar que não são obtidas alterações nos dados de DLS para as amostras, indicando o potencial dos cubossomos em manter suas características físicas ao longo do tempo. Através da técnica de NTA, o tamanho médio obtido se aproximou dos valores obtidos pelo DLS, bem como a concentração que novamente esteve em conforme com os encontrados na literatura. Os cubossomos apresentaram grande capacidade de encapsulação dos fármacos, que esteve entre 80 e 90 %, bem como uma boa liberação temporal dos fármacos, que esteve entre 100 e 420 minutos. Pela técnica de SAXS, a estrutura cúbica $Pn\bar{3}m$ se confirmou, mesmo com o deslocamento de pico observado para a amostra contendo curcumina encapsulada. Já pelas imagens obtidas pela técnica de Cryo-TEM, o tamanho médio obtido de 200 nm confirma os dados de tamanho obtidos pelas técnicas de DLS e NTA, bem como se relaciona de forma visual à estrutura interna obtida pelo SAXS. Quando testadas nas culturas de bactérias *Bacillus subtilis* e *E. coli*, as nanopartículas puras mostraram comportamentos desejados para a primeira bactéria citada; porém, a adição de fármacos ao cubossomo não resultou em nenhum efeito citotóxico para ambas as bactérias.

Em suma, as nanopartículas lipídicas cúbicas demonstram resultados físicos promissores, destacando-se como sistemas eficazes para a entrega controlada de fármacos. Resulta-

dos promissores também são obtidos para os cubossomos branco, indicando uma possível ação desta nanopartícula como próprio agente antimicrobiano. Contudo, novos testes biológicos são essenciais para obter dados mais precisos sobre a capacidade citotóxica desses sistemas, especialmente para fins antimicrobianos. Propõe-se, assim, a realização de encapsulação dos fármacos em maior concentração no interior do cubossomo, ou até mesmo a síntese do cubossomo a partir de outros compostos. A partir desses novos sistemas, sugere-se a condução de estudos estruturais utilizando técnicas como o SAXS para verificar possíveis mudanças internas nas nanopartículas, bem como novos ensaios de susceptibilidade bacteriana para avaliar os efeitos citotóxicos.

É desejável que os sistemas sintetizados continuem a ser analisados pelo grupo de pesquisa. A partir dos ensaios realizados, é possível realizar modificações na formulação dos cubossomos visando diminuir a toxicidade ao organismo. Além disso, expor os sistemas sintetizados a diferentes condições ambientais pode ser explorado para analisar possíveis variações em sua estabilidade coloidal. Variar a concentração de fármacos é uma abordagem interessante para verificar um possível incremento na capacidade de encapsulação. Testar os sistemas em diferentes modelos biológicos também é uma estratégia relevante para entender sua interação com as nanopartículas. Outras possibilidades incluem marcar os cubossomos com um marcador fluorescente para melhor visualização de sua interação com as células, entre outros.

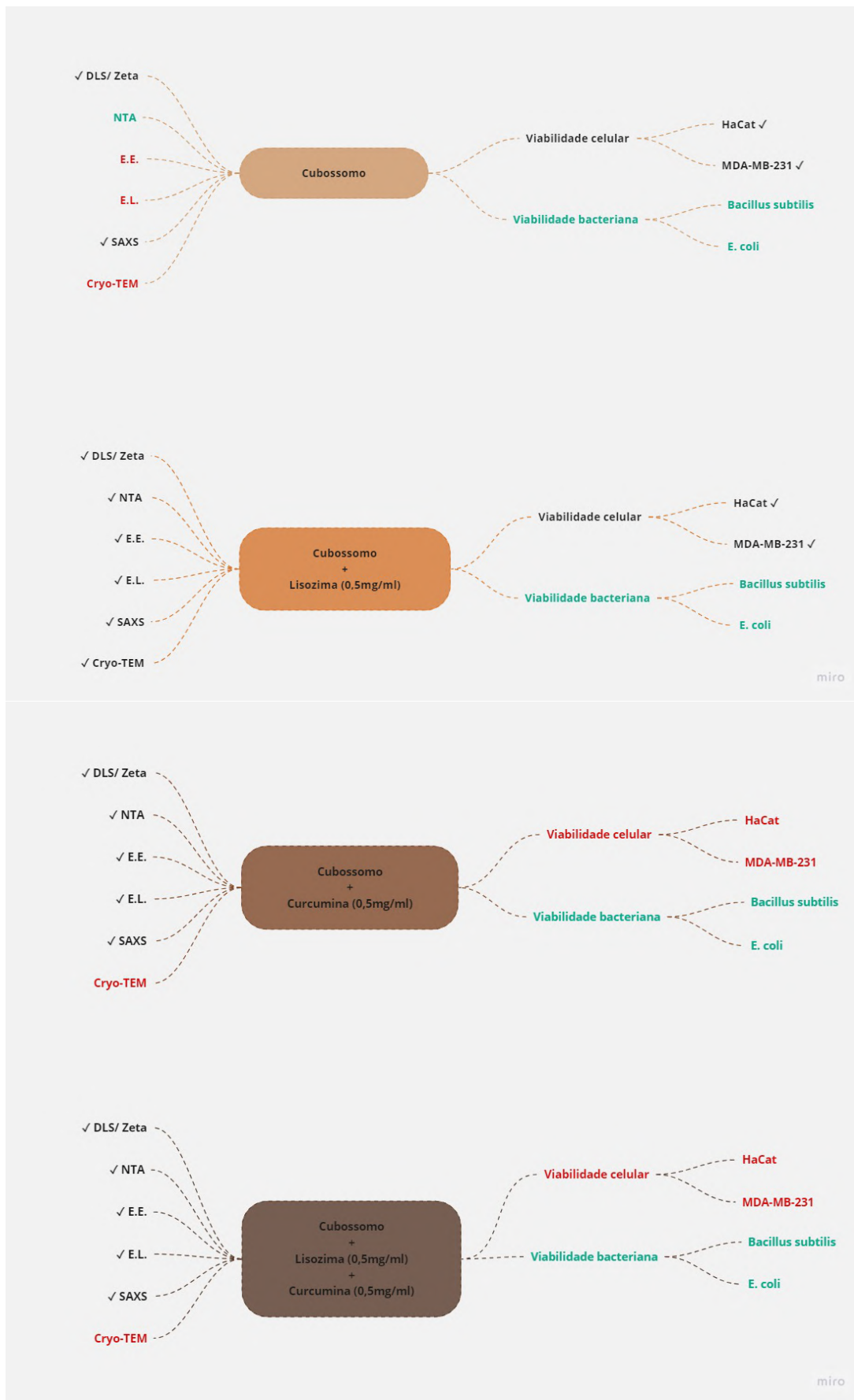


Figura 36: Fluxo de trabalho realizado durante a execução deste projeto de mestrado. Em verde, os experimentos/análises que foram executados; em vermelho, os que complementam o trabalho e ainda não foram realizados para os sistemas apresentados.

Referências

- [1] A. S. Palma, B. R. Casadei, M. C. Lotierzo, R. D. de Castro, and L. R. S. Barbosa, “A short review on the applicability and use of cubosomes as nanocarriers,” *Biophysical Reviews*, vol. 15, no. 4, pp. 553–567, 2023.
- [2] D. Deamer, J. P. Dworkin, S. A. Sandford, M. P. Bernstein, and L. J. Allamandola, “The first cell membranes,” *Astrobiology*, vol. 2, no. 4, pp. 371–381, 2002.
- [3] A. Ganem-Quintanar, D. Quintanar-Guerrero, and P. Buri, “Monoolein: a review of the pharmaceutical applications,” *Drug development and industrial pharmacy*, vol. 26, no. 8, pp. 809–820, 2000.
- [4] S. Akbar, A. Anwar, A. Ayish, J. M. Elliott, and A. M. Squires, “Phytantriol based smart nano-carriers for drug delivery applications,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 101, pp. 31–42, 2017.
- [5] L. J. Peek, C. R. Middaugh, and C. Berkland, “Nanotechnology in vaccine delivery,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 60, no. 8, pp. 915–928, 2008.
- [6] I. D. L. Cavalcanti and M. Cajuba de Britto Lira Nogueira, “Pharmaceutical nanotechnology: which products are been designed against covid-19?,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 22, no. 9, p. 276, 2020.
- [7] D. Bazile, “Nanotechnologies in drug delivery-an industrial perspective,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 24, no. 1, pp. 12–21, 2014.
- [8] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, “The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine,” *Molecules*, vol. 25, no. 1, p. 112, 2020.
- [9] S. E. McNeil, “Nanotechnology for the biologist,” *Journal of leukocyte biology*, vol. 78, no. 3, pp. 585–594, 2005.
- [10] O. M. Elsharkasy, J. Z. Nordin, D. W. Hagey, O. G. de Jong, R. M. Schiffelers, S. E. Andaloussi, and P. Vader, “Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how?,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 159, pp. 332–343, 2020.
- [11] I. Ribeiro, R. da Silva, C. Silveira, F. Galdino, and M. Cardoso, “Nano-targeting lessons from the sars-cov-2,” *Nano Today*, vol. 36, p. 101012, 2021.
- [12] I. R. Sousa Ribeiro, F. E. Galdino, C. P. Silveira, and M. B. Cardoso, “Precision medicine based on nanoparticles: the paradigm between targeting and colloidal stability,” *Nanomedicine*, vol. 16, no. 17, pp. 1451–1456, 2021. PMID: 34080440.

- [13] Y. C. Barenholz, “Doxil®—the first fda-approved nano-drug: Lessons learned,” *Journal of controlled release*, vol. 160, no. 2, pp. 117–134, 2012.
- [14] A. Paul and K. S. Yadav, “Parkinson’s disease: Current drug therapy and unraveling the prospects of nanoparticles,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 58, p. 101790, 2020.
- [15] H. Akel, R. Ismail, and I. Csóka, “Progress and perspectives of brain-targeting lipid-based nanosystems via the nasal route in alzheimer’s disease,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 148, pp. 38–53, 2020.
- [16] B. R. Casadei, M. C. Lotierzo, B. Malheiros, and L. R. Barbosa, “Chapter 11 - drug repurposing and nanoparticles: New strategies against leishmaniasis,” in *Applications of Nanobiotechnology for Neglected Tropical Diseases* (F. R. Formiga, Inamuddin, and P. Severino, eds.), pp. 217–241, Academic Press, 2021.
- [17] K. de Sousa Oliveira, L. de Lima, N. Cobacho, S. Dias, and O. Franco, “Mechanisms of antibacterial resistance: shedding some light on these obscure processes,” *Antibiotic Resistance*, vol. 4, pp. 19–35, 2016.
- [18] R. I. Aminov, “A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future,” *Frontiers in microbiology*, vol. 1, p. 134, 2010.
- [19] W. H. Organization *et al.*, “Global action plan on antimicrobial resistance,” 2015.
- [20] J. Rodríguez-Baño, G. M. Rossolini, C. Schultsz, E. Tacconelli, S. Murthy, N. Ohmagari, A. Holmes, T. Bachmann, H. Goossens, R. Canton, *et al.*, “Antimicrobial resistance research in a post-pandemic world: Insights on antimicrobial resistance research in the covid-19 pandemic,” *Journal of global antimicrobial resistance*, vol. 25, pp. 5–7, 2021.
- [21] L. Rossato, F. J. Negrão, and S. Simionatto, “Could the covid-19 pandemic aggravate antimicrobial resistance?,” *American journal of infection control*, vol. 48, no. 9, pp. 1129–1130, 2020.
- [22] C. Llor and L. Bjerrum, “Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem,” *Therapeutic advances in drug safety*, vol. 5, no. 6, pp. 229–241, 2014.
- [23] M. Ahmad and A. U. Khan, “Global economic impact of antibiotic resistance: A review,” *Journal of global antimicrobial resistance*, vol. 19, pp. 313–316, 2019.
- [24] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, and S. K. Bannerjee, “Drug delivery systems: An updated review,” *International journal of pharmaceutical investigation*, vol. 2, no. 1, p. 2, 2012.

- [25] V. V. Ranade, M. A. Hollinger, and J. B. Cannon, *Drug delivery systems*. CRC press, 2003.
- [26] A. Streubel, J. Siepmann, and R. Bodmeier, “Gastroretentive drug delivery systems,” *Expert opinion on drug delivery*, vol. 3, no. 2, pp. 217–233, 2006.
- [27] Y. Dang and J. Guan, “Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy,” *Smart Materials in Medicine*, vol. 1, pp. 10–19, 2020.
- [28] W. Zhang, Z. Zhang, and Y. Zhang, “The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies,” *Nanoscale research letters*, vol. 6, pp. 1–22, 2011.
- [29] L. Boge, K. Hallstenson, L. Ringstad, J. Johansson, T. Andersson, M. Davoudi, P. T. Larsson, M. Mahlapuu, J. Håkansson, and M. Andersson, “Cubosomes for topical delivery of the antimicrobial peptide ll-37,” *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 134, pp. 60–67, 2019.
- [30] C. Neto, G. Aloisi, P. Baglioni, and K. Larsson, “Imaging soft matter with the atomic force microscope: cubosomes and hexosomes,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, no. 19, pp. 3896–3899, 1999.
- [31] C. Chang, T. G. Meikle, C. J. Drummond, Y. Yang, and C. E. Conn, “Comparison of cubosomes and liposomes for the encapsulation and delivery of curcumin,” *Soft Matter*, vol. 17, no. 12, pp. 3306–3313, 2021.
- [32] T. G. Meikle, B. P. Dyett, J. B. Strachan, J. White, C. J. Drummond, and C. E. Conn, “Preparation, characterization, and antimicrobial activity of cubosome encapsulated metal nanocrystals,” *ACS applied materials & interfaces*, vol. 12, no. 6, pp. 6944–6954, 2020.
- [33] T. G. Meikle, D. Dharmadana, S. V. Hoffmann, N. C. Jones, C. J. Drummond, and C. E. Conn, “Analysis of the structure, loading and activity of six antimicrobial peptides encapsulated in cubic phase lipid nanoparticles,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 587, pp. 90–100, 2021.
- [34] H. M. Barriga, M. N. Holme, and M. M. Stevens, “Cubosomes: the next generation of smart lipid nanoparticles?,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 58, no. 10, pp. 2958–2978, 2019.
- [35] C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. Iglesias-Salto, S. Engelskirchen, and S. Ahualli, “Monoolein: a magic lipid?,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 13, no. 8, pp. 3004–3021, 2011.

- [36] S. Rizwan, D. Assmus, A. Boehnke, T. Hanley, B. Boyd, T. Rades, and S. Hook, "Preparation of phytantriol cubosomes by solvent precursor dilution for the delivery of protein vaccines," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 79, no. 1, pp. 15–22, 2011.
- [37] B. Lindman and H. Wennerström, "Micelles: Amphiphile aggregation in aqueous solution," *Micelles*, pp. 1–83, 2006.
- [38] A. Marzzoco and B. B. Torres, "Bioquímica básica," in *Bioquímica básica*, pp. 355–355, 1999.
- [39] K. Letchford and H. Burt, "A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes," *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 65, no. 3, pp. 259–269, 2007.
- [40] Z. Karami and M. Hamidi, "Cubosomes: remarkable drug delivery potential," *Drug discovery today*, vol. 21, no. 5, pp. 789–801, 2016.
- [41] B. K. Nanjwade, Y. R. Hundekar, M. S. Kamble, and T. Srichana, "Development of cuboidal nanomedicine by nanotechnology," *Austin J Nanomed Nanotechnol*, vol. 2, no. 4, p. 1023, 2014.
- [42] M. Köhler and W. Fritzsche, *Nanotechnology: an introduction to nanostructuring techniques*. John Wiley & Sons, 2008.
- [43] M. Shamsipur, L. Farzin, and M. A. Tabrizi, "Ultrasensitive aptamer-based on-off assay for lysozyme using a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles and electrochemically reduced graphene oxide," *Microchimica Acta*, vol. 183, no. 10, pp. 2733–2743, 2016.
- [44] M. Alves, N. S. Vieira, L. P. N. Rebelo, J. M. Araujo, A. B. Pereiro, and M. Archer, "Fluorinated ionic liquids for protein drug delivery systems: Investigating their impact on the structure and function of lysozyme," *International journal of pharmaceutics*, vol. 526, no. 1-2, pp. 309–320, 2017.
- [45] L. Lin, W. Xu, H. Liang, L. He, S. Liu, Y. Li, B. Li, and Y. Chen, "Construction of pH-sensitive lysozyme/pectin nanogel for tumor methotrexate delivery," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 126, pp. 459–466, 2015.
- [46] J. G. Edmans, C. Murdoch, M. E. Santocildes-Romero, P. V. Hatton, H. E. Colley, and S. G. Spain, "Incorporation of lysozyme into a mucoadhesive electrospun patch for rapid protein delivery to the oral mucosa," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 112, p. 110917, 2020.

- [47] M. L. Lestari and G. Indrayanto, “Curcumin,” *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, vol. 39, pp. 113–204, 2014.
- [48] A. Giordano and G. Tommonaro, “Curcumin and cancer,” *Nutrients*, vol. 11, no. 10, p. 2376, 2019.
- [49] S.-Y. Teow and S. A. Ali, “Synergistic antibacterial activity of curcumin with antibiotics against staphylococcus aureus,” *Pak. J. Pharm. Sci*, vol. 28, no. 6, pp. 2109–2114, 2015.
- [50] S. Izui, S. Sekine, K. Maeda, M. Kuboniwa, A. Takada, A. Amano, and H. Nagata, “Antibacterial activity of curcumin against periodontopathic bacteria,” *Journal of periodontology*, vol. 87, no. 1, pp. 83–90, 2016.
- [51] H. Gunes, D. Gulen, R. Mutlu, A. Gumus, T. Tas, and A. E. Topkaya, “Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study,” *Toxicology and industrial health*, vol. 32, no. 2, pp. 246–250, 2016.
- [52] C. Bliss and M. Cattell, “Biological assay,” *Annual Review of Physiology*, vol. 5, no. 1, pp. 479–539, 1943.
- [53] J. Irwin, “Statistical method applied to biological assays,” *Supplement to the Journal of the Royal Statistical Society*, vol. 4, no. 1, pp. 1–60, 1937.
- [54] S. G. Penn, L. He, and M. J. Natan, “Nanoparticles for bioanalysis,” *Current opinion in chemical biology*, vol. 7, no. 5, pp. 609–615, 2003.
- [55] A. S. de Dios and M. E. Díaz-García, “Multifunctional nanoparticles: analytical prospects,” *Analytica chimica acta*, vol. 666, no. 1-2, pp. 1–22, 2010.
- [56] J. Emami *et al.*, “In vitro-in vivo correlation: from theory to applications,” *J Pharm Pharm Sci*, vol. 9, no. 2, pp. 169–189, 2006.
- [57] S. Arora, J. M. Rajwade, and K. M. Paknikar, “Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour,” *Toxicology and applied pharmacology*, vol. 258, no. 2, pp. 151–165, 2012.
- [58] S. O. Rogero, A. B. Lugão, T. I. Ikeda, and Á. S. Cruz, “Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias,” *Materials Research*, vol. 6, pp. 317–320, 2003.
- [59] M. Arora, “Cell culture media: a review,” *Mater methods*, vol. 3, no. 175, p. 24, 2013.

- [60] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, and L. Minor, “Cell viability assays,” *Assay Guidance Manual [Internet]*, 2016.
- [61] M. J. Stoddart, “Cell viability assays: introduction,” *Mammalian cell viability: methods and protocols*, pp. 1–6, 2011.
- [62] S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, and E. Capanoglu, “Guidelines for cell viability assays,” *Food Frontiers*, vol. 1, no. 3, pp. 332–349, 2020.
- [63] M. C. Lotierzo, B. R. Casadei, R. D. de Castro, B. Malheiros, and L. R. Barbosa, “Cubic-to-inverted micellar and the cubic-to-hexagonal-to-micellar transitions on phytantriol-based cubosomes induced by solvents,” *Drug Delivery and Translational Research*, vol. 10, no. 6, pp. 1571–1583, 2020.
- [64] B. Malheiros, R. D. de Castro, M. C. Lotierzo, B. R. Casadei, and L. R. Barbosa, “Design and manufacturing of monodisperse and malleable phytantriol-based cubosomes for drug delivery applications,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 61, p. 102149, 2021.
- [65] J. Xie, J. Y. Lee, and D. I. Wang, “Seedless, surfactantless, high-yield synthesis of branched gold nanocrystals in hepes buffer solution,” *Chemistry of materials*, vol. 19, no. 11, pp. 2823–2830, 2007.
- [66] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, “Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences,” *Biophysical reviews*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, 2016.
- [67] B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation, 2000.
- [68] D. Biriukov, P. Fibich, and M. Predota, “Zeta potential determination from molecular simulations,” *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 124, no. 5, pp. 3159–3170, 2020.
- [69] S. Bhattacharjee, “Dls and zeta potential—what they are and what they are not?,” *Journal of controlled release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016.
- [70] R. J. Hunter, *Zeta potential in colloid science: principles and applications*, vol. 2. Academic press, 2013.
- [71] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot, “Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (nta) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates,” *Pharmaceutical research*, vol. 27, no. 5, pp. 796–810, 2010.

- [72] B. V. Kilikian, “Filtração e centrifugação,” *Purificação de Produtos Biotecnológicos: Operações e processos com aplicação industrial*, p. 105, 2005.
- [73] C. Labella, F. Lelario, S. A. Bufo, M. Musto, P. Freschi, and C. Cosentino, “Optimization and validation of a chromatographic method for quantification of lysozyme in jenny milk,” *Journal of Food & Nutrition Research*, vol. 55, no. 3, 2016.
- [74] M. Ghosh, A. T. Singh, W. Xu, T. Sulchek, L. I. Gordon, and R. O. Ryan, “Curcumin nanodisks: formulation and characterization,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 7, no. 2, pp. 162–167, 2011.
- [75] M. d. Oliveira Neto, *Espalhamento de raios-X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2008.
- [76] B. Malheiros, *Biophysical Characterization of cubosomal nanoparticles intended for drug delivery applications and its interaction with a model drug: the miltefosine case*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2018.
- [77] A. Angelova, B. Angelov, V. M. Garamus, P. Couvreur, and S. Lesieur, “Small-angle x-ray scattering investigations of biomolecular confinement, loading, and release from liquid-crystalline nanochannel assemblies,” *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 3, no. 3, pp. 445–457, 2012.
- [78] Z. Khatun, A. Bhat, S. Sharma, and A. Sharma, “Elucidating diversity of exosomes: biophysical and molecular characterization methods,” *Nanomedicine*, vol. 11, no. 17, pp. 2359–2377, 2016.
- [79] M. C. Pillon and A. Guarné, “Complementary uses of small angle x-ray scattering and x-ray crystallography,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, vol. 1865, no. 11, pp. 1623–1630, 2017.
- [80] L. R. S. Barbosa, *Estudo de sistemas de relevância biológica por espalhamento de raios X a baixos ângulos*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2008.
- [81] T. W. Gräwert and D. I. Svergun, “Structural modeling using solution small-angle x-ray scattering (saxs),” *Journal of molecular biology*, vol. 432, no. 9, pp. 3078–3092, 2020.
- [82] E. Esposito, N. Eblovi, S. Rasi, M. Drechsler, G. M. Di Gregorio, E. Menegatti, and R. Cortesi, “Lipid-based supramolecular systems for topical application: a preformulatory study,” *Aaps Pharmsci*, vol. 5, no. 4, pp. 62–76, 2003.
- [83] Y.-D. Dong, A. J. Tilley, I. Larson, M. J. Lawrence, H. Amenitsch, M. Rappolt, T. Hanley, and B. J. Boyd, “Nonequilibrium effects in self-assembled mesophase

- materials: unexpected supercooling effects for cubosomes and hexosomes,” *Langmuir*, vol. 26, no. 11, pp. 9000–9010, 2010.
- [84] D. Danino, “Cryo-tem of soft molecular assemblies,” *Current opinion in colloid & interface science*, vol. 17, no. 6, pp. 316–329, 2012.
- [85] J. Kuntsche, J. C. Horst, and H. Bunjes, “Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-tem) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems,” *International journal of pharmaceuticals*, vol. 417, no. 1-2, pp. 120–137, 2011.
- [86] A. L. d. G. d. Silva, “Avaliação do potencial anti-tumoral de nanopartículas magnéticas conjugadas a azul de metileno para carcinoma de mama e de ovário,” 2020.
- [87] L. N. Tubarão *et al.*, *Estabelecimento de um modelo in vitro de câncer de mama para Avaliação do Receptor Ativado por Protease (PAR) como alvo terapêutico*. PhD thesis, 2017.
- [88] J. D. Zeidler, *Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2012.
- [89] J. P. Nataro and J. B. Kaper, “Diarrheagenic escherichia coli,” *Clinical microbiology reviews*, vol. 11, no. 1, pp. 142–201, 1998.
- [90] Á. T. Kovács, “Bacillus subtilis,” *Trends in microbiology*, vol. 27, no. 8, pp. 724–725, 2019.
- [91] M. Dec, R. Urban-Chmiel, D. Stepień-Pyśniak, and A. Wernicki, “Assessment of antibiotic susceptibility in lactobacillus isolates from chickens,” *Gut pathogens*, vol. 9, no. 1, pp. 1–16, 2017.
- [92] N. Alcaraz, Q. Liu, E. Hanssen, A. Johnston, and B. J. Boyd, “Clickable cubosomes for antibody-free drug targeting and imaging applications,” *Bioconjugate Chemistry*, vol. 29, no. 1, pp. 149–157, 2018.
- [93] D. K. Flak, V. Adamski, G. Nowaczyk, K. Szutkowski, M. Synowitz, S. Jurga, and J. Held-Feindt, “At101-loaded cubosomes as an alternative for improved glioblastoma therapy,” *International journal of nanomedicine*, pp. 7415–7431, 2020.
- [94] F. D. Victorelli, L. S. Manni, S. Biffi, B. Bortot, H. H. Buzzá, V. Lutz-Bueno, S. Handschin, G. Calixto, S. Murgia, M. Chorilli, *et al.*, “Potential of curcumin-loaded cubosomes for topical treatment of cervical cancer,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 620, pp. 419–430, 2022.

- [95] M. Zatloukalová, L. Jedinák, D. Riman, J. Franková, D. Novák, A. Cytryniak, E. Nazaruk, R. Bilewicz, J. Vrba, B. Papoušková, *et al.*, “Cubosomal lipid formulation of nitroalkene fatty acids: Preparation, stability and biological effects,” *Redox Biology*, vol. 46, p. 102097, 2021.
- [96] S. A. Al-Zuhairy, W. R. Kadhum, M. Alhijaj, M. M. Kadhim, A. S. Al-Janabi, A. W. Salman, H. K. Al-Sharifi, and A. A. Khadom, “Development and evaluation of biocompatible topical petrolatum-liquid crystal formulations with enhanced skin permeation properties,” *Journal of Oleo Science*, vol. 71, no. 3, pp. 459–468, 2022.
- [97] R. M. Zaki, A. El Sayeh Abou El Ela, A. S. Almurshedi, B. N. Aldosari, A. A. Aldossari, and M. A. Ibrahim, “Fabrication and assessment of orodispersible tablets loaded with cubosomes for the improved anticancer activity of simvastatin against the mda-mb-231 breast cancer cell line,” *Polymers*, vol. 15, no. 7, p. 1774, 2023.
- [98] A. Pramanik, Z. Xu, N. Ingram, P. L. Coletta, P. A. Millner, A. I. Tyler, and T. A. Hughes, “Hyaluronic-acid-tagged cubosomes deliver cytotoxics specifically to cd44-positive cancer cells,” *Molecular Pharmaceutics*, vol. 19, no. 12, pp. 4601–4611, 2022.
- [99] A. d. C. Schneid, C. P. Silveira, F. E. Galdino, L. F. Ferreira, K. Bouchmella, and M. B. Cardoso, “Colloidal stability and redispersibility of mesoporous silica nanoparticles in biological media,” *Langmuir*, vol. 36, no. 39, pp. 11442–11449, 2020.
- [100] L. N. d. M. Ribeiro, V. M. Couto, L. F. Fraceto, and E. De Paula, “Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids,” *Scientific reports*, vol. 8, no. 1, p. 982, 2018.
- [101] M. C. G. Lotierzo, *Estudo da eficácia de encapsulação da Cinarizina em cubossomos não-iônicos: caracterização estrutural e citotóxica*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2021.
- [102] J. Huang, T. Peng, Y. Li, Z. Zhan, Y. Zeng, Y. Huang, X. Pan, C.-Y. Wu, and C. Wu, “Ocular cubosome drug delivery system for timolol maleate: preparation, characterization, cytotoxicity, ex vivo, and in vivo evaluation,” *Aaps Pharmscitech*, vol. 18, pp. 2919–2926, 2017.
- [103] Y. Tu, J. Fu, D. Sun, J. Zhang, N. Yao, D. Huang, and Z. Shi, “Preparation, characterisation and evaluation of curcumin with piperine-loaded cubosome nanoparticles,” *Journal of microencapsulation*, vol. 31, no. 6, pp. 551–559, 2014.

- [104] F. Zakaria, S. E. Ashari, I. D. M. Azmi, and M. B. A. Rahman, “Recent advances in encapsulation of drug delivery (active substance) in cubosomes for skin diseases,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 68, p. 103097, 2022.
- [105] A. Ramalheiro, J. L. Paris, B. F. Silva, and L. R. Pires, “Rapidly dissolving microneedles for the delivery of cubosome-like liquid crystalline nanoparticles with sustained release of rapamycin,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 591, p. 119942, 2020.
- [106] I. R. Ribeiro, *Investigação da responsividade de nanopartículas líquido-cristalinas a gatilhos de interesse biomédico pela incorporação de surfactantes cliváveis*. PhD thesis, [sn], 2017.