

Funcionalização de Pontos Quânticos (CdSe) em Lipossomas Furtivos (LF)

Functionalization of Quantum Dots (CdSe) in Stealth Liposomes (SL)

RESUMO

Caio César Soares

Caio8135@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

Luís Fernando Cabeça

luiscabeca@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil.

Os sistemas de liberação de fármacos “Drugs delivery systems”, controlam tanto a taxa de liberação dos fármacos quanto ao sítio a ser liberado, apresentando inúmeras vantagens quando comparados com outros sistemas convencionais. Entre as moléculas e sistemas estudados para o encapsulamento de ativos, os lipossomas são sistemas transportadores eficientes de biomoléculas. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento dos lipossomas furtivos (LF) através da funcionalização das nanopartículas de ponto quântico (CdSe) para o desenvolvimento de lipossomas teranósticos (sistemas para imagem e tratamento). Para a caracterização dos lipossomas teranósticos (EPC+COL e DOPE+CHEMS a uma razão molar 6:4), seria necessário realizar medidas de fotoluminescência para a verificação da funcionalização dos pontos quânticos e medidas de espalhamento dinâmico de luz para a confirmação da sensibilidade do lipossoma à variação do pH.

PALAVRAS-CHAVE: Lipossomas furtivos. Lipossomas teranósticos. Sistema de liberação. Pontos Quânticos (CdSe). Fotoluminescência.

ABSTRACT

The drugs delivery systems can control both the drug release and the site of action, showing countless advantages compared to other conventional systems. Among the molecules and systems studied for the encapsulation, the liposomes are the most efficient carrier systems for biomolecules. The objective of this study was the development of stealth liposomes (SL) through the functionalization of nanoparticles of quantum dot (CdSe) for the development of theranostic liposomes (imaging and treatment systems). For the characterization of theranostic liposomes (EPC+CHOL and DOPE+CHEMS at a molar ratio 6:4), it would be necessary to carry out photoluminescence measurements to verify the functionalization of quantum dots and dynamic light scattering measures to confirm the sensitivity of the liposome to pH variation.

KEYWORDS: Stealth liposomes. Teranostic liposomes. Delivery Systems. Quantum Dots (CdSe). Photoluminescence.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos, a utilização da maioria dos compostos terapêuticos tem sido sempre limitada pela posologia, retenção ou degradação do ativo, pequena solubilidade e, principalmente, pelos efeitos adversos provenientes da dosagem necessária para se atingir a ação terapêutica desejada. Estas dificuldades impulsionaram pesquisas no sentido de desenvolver sistemas capazes de transportar o ativo terapêutico até o alvo específico para diminuir os efeitos indesejáveis e aumentar a eficiência, com decréscimo da dose administrada.

Entre as moléculas e sistemas estudados na química supramolecular os lipossomas são sistemas transportadores eficientes de biomoléculas (LASIC, et al., 1995). Lipossomas mais eficientes com longo tempo de duração no sistema circulatório dão origem aos lipossomas furtivos (LF) (lipossomas com superfície modificada com polímeros – PEG) (BOERMAN, et al., 2000). Os LF ainda podem apresentar especificidade de interação dos lipossomas com as células-alvo através do preparo dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada, os quais podem apresentar melhor eficiência em regiões tumorais que apresentam pH menor que o sistema circulatório (FATTAL et al., 2004). Para o preparo dos lipossomas pH-sensíveis, derivados da fosfatidiletanolamina (PE), por exemplo o DOPE constitui o principal componente das formulações. Esse lipídio encontra-se associado as moléculas anfífilas contendo um grupo de ácido protonável, o CHEMS (FERREIRA et al., 2013).

As vesículas lipossomais podem ainda ser modificadas para facilitar simultaneamente o diagnóstico e terapia, são os chamados lipossomas teranósticos. Agentes para bioimagem tais como os pontos quânticos “Quantum Dots” podem ser encapsulados na parte hidrofóbica do lipossoma ou ligados covalentemente em sua superfície (MUTHUA, et al., 2012). Portanto, o objetivo central do trabalho é a funcionalização de nanopartículas de pontos quânticos CdSe nas vesículas de lipossomas furtivos pH sensível.

METODOLOGIA

PREPARAÇÃO DO LIPOSSOMA CONVENCIONAL PARA A FUNCIONALIZAÇÃO DE PONTO QUÂNTICO, UTILIZANDO O MÉTODO DE FORMAÇÃO DO FILME LIPÍDICO

Primeiramente foi preparado o lipossoma convencional contendo fosfatidilcolina de ovo (EPC) e colesterol a uma razão molar de 6:4. Em seguida, os compostos foram solubilizados em clorofórmio juntamente com CdSe 0,8 μ M e posteriormente o solvente foi retirado por evaporação à temperatura ambiente para obtenção de um filme lipídico (HAERI et al., 2013). Os lipídeos foram hidratados com solução tampão fosfato pH 7,4 e agitado no vortex. A mistura foi transferida para um mini extrusor Avanti Polar com membrana de policarbonato de 400 nm (Figura 1).

Figura 1- Sistema de extrusão utilizado



Fonte: Autoria própria (2019).

PREPARAÇÃO DO LIPOSSOMA PH SENSÍVEL PARA A FUNCIONALIZAÇÃO DE PONTO QUÂNTICO, UTILIZANDO O MÉTODO DE FORMAÇÃO DO FILME LIPÍDICO

Para a preparação dos lipossomas de pH sensível foram utilizados: dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e hemisuccinato de colesterilo (CHEMS), a uma razão molar de 6:4. Os componentes foram solubilizados em clorofórmio juntamente com CdSe 0,8 μM e posteriormente o solvente foi retirado por evaporação à temperatura ambiente para obtenção de um filme lipídico (HAERI et al., 2013). Em seguida, os lipídeos foram hidratados com solução tampão 7,4 e agitado no vortex. A mistura foi transferida para um mini extrusor Avanti Polar com membrana de policarbonato de 400 nm.

CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO PONTO QUÂNTICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE UV-VIS

Para o cálculo da concentração do ponto quântico sintetizado, calcula-se o diâmetro da nanopartícula de CdSe a partir do modelo empírico de Henglein que relaciona o tamanho da partícula e o comprimento de onda de absorção excitônica. A equação (1) é dada a seguir.

$$2R_{CdSe}(nm) = \frac{0,1}{(0.1338 - 0.0002345 \times \lambda_{QD})} \quad (1)$$

Onde R é o raio da nanopartícula e λ_{QD} é o comprimento de onda referente ao *onset*, na curva de UV-vis.

Em seguida determina-se o coeficiente de extinção molar (ϵ) que é dado pela equação (2) a seguir.

$$\epsilon = 5500. \Delta E. (D)^{2,5} \quad (2)$$

Onde ϵ é o coeficiente de extinção molar, ΔE é energia correspondente à transição do primeiro pico de absorção (em eV) e D é o diâmetro da partícula (em nm).

Por fim determina-se a concentração molar do ponto quântico CdSe de acordo com a Lei Lambert-Beer pela equação (3).

$$A = \epsilon . C . L \quad (3)$$

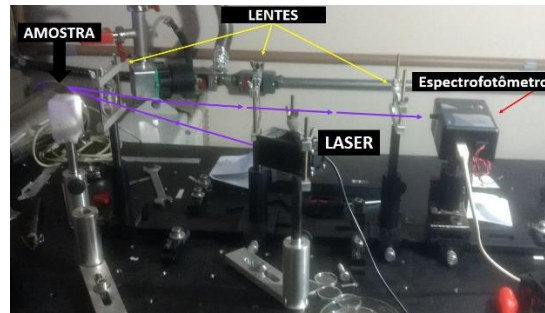
Onde A é a absorbância do pico da primeira absorção excitônica, C a concentração (em mol.L⁻¹) e L o caminho ótico da cubeta (em cm).

ENSAIO DE FOTOLUMINESCÊNCIA

A fim de confirmar a manutenção da fluorescência dos pontos quânticos após seu encapsulamento na bicamada lipídica, foi realizada a técnica de fotoluminescência, que consiste na excitação da amostra por meio de um *laser*, com uma angulação de aproximadamente 30°. Para o teste foi utilizado amostras de lipossoma convencional (EPC+COLESTEROL) juntamente com o ponto quântico (CdSe) e lipossomade pH sensível (DOPE+CHEMS) com o ponto quântico (CdSe).

A técnica foi realizada no laboratório DFMnano da UTFPR Londrina (Figura 2).

Figura 2- Equipamento utilizado para o ensaio de fotoluminescência



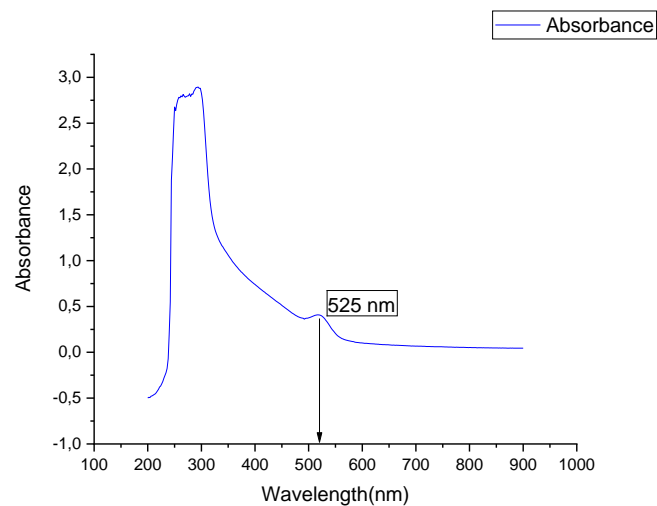
Fonte: Autoria própria (2019).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

CARACTERIZAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO PONTO QUÂNTICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE UV-VIS

O primeiro teste realizado foi a caracterização do CdSe para a determinação de sua concentração, através da técnica de UV-VIS (200- 900 nm). O comprimento de onda onde o CdSe se encontrava era em 525 nm. Onde a partir da equação (1) do modelo empírico de Henglein e da equação (3) da Lei Lambert-Beer, foi possível determinar sua concentração molar com o valor de $5,335 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 3).

Figura 3- Espectrofotometria de UV-VIS (200-900nm) do CdSe.



Fonte: Autoria própria (2020).

FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE PONTOS QUÂNTICOS CALCOGENETOS COM LIPOSSOMAS CONVENCIONAL (EPC+COLESTEROL) E PH SENSÍVEL (DOPE+CHEMS), UTILIZANDO O ENSAIO DE FOTOLUMINESCÊNCIA

Em detrimento do atraso ocorrido da importação do lipídio neutro dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) da Alemanha, como sendo a base importante da formulação do lipossoma de pH sensível e do momento complicado pelo qual estamos passando, não foi possível realizar os testes de fotoluminescência em laboratório por demandar um grande período de tempo.

Através do ensaio de fotoluminescência seria possível determinar a funcionalização das nanopartículas de CdSe nas vesículas lipossomais de pH sensível (DOPE+CHEMS) e convencional (EPC+COLESTEROL), utilizando o método de formação do filme lipídico. Partindo de 10 mM de concentração de lipossoma e 100 µL de CdSe.

As análises de fotoluminescência seriam realizadas em um período de tempo de 30 minutos, medindo de 5 em 5 minutos, utilizando 1,4 mL de solução tampão pH (7,4; 7,0; 6,6; 6,2; 5,8; e 5,0) e 100 µL de solução lipossomal de pH sensível e convencional. Medidas da intensidade do sinal de luminescência iriam variando de acordo com a concentração de CdSe em solução. Desse modo seria possível observar que com o passar do tempo ocorreria uma quebra nos lipossomas de pH sensível em pHs mais ácidos, comprovando ser um lipossoma de pH sensível e determinando a funcionalização do CdSe. Entretanto, essas conclusões devem ser mais estudadas em função da complexidade do sistema.

A fim de comprovar que os lipossomas estudados se tratava de um sistema lipossoma de pH sensível, seria necessário realizar experimentos acerca do diâmetro hidrodinâmico (DH) da nanopartícula.

CONCLUSÃO

O objetivo principal do trabalho, que tinha como proposta inicial a formulação do lipossoma convencional (EPC+COLESTEROL) e pH sensível (DOPE+CHEMS) através da funcionalização da superfície de pontos quânticos (CdSe) foi cumprido. Em contrapartida, devido ao atraso ocorrido na importação do (DOPE) da Alemanha, como sendo um composto importante na formulação do lipossoma de pH sensível e do momento complicado pelo qual estamos passando, não foi possível realizar os testes de fotoluminescência em laboratório para a comprovação da sensibilidade do pH e funcionalização do CdSe.

Portanto, os testes de fotoluminescência e potencial zeta para a comprovação da funcionalização do CdSe e diâmetro hidrodinâmico (DH), serão realizados em um momento breve quando retornarmos para a normalidade de nossas rotinas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR pela infraestrutura que foi disponibilizada para a realização dos testes em laboratório. Faço um reconhecimento simbólico ao professor Marco Aurelio Toledo do departamento de física da UTFPR – Campus Londrina pelo fornecimento das nanopartículas de pontos quânticos (CdSe).

REFERÊNCIAS

- [1] BOERMAN, O. C.; LAVERMAN, P.; OYEN, W. J. G.; CORSTENS, F. H. M.; STORM G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 461-475, 2000.
- [2] FATTAL, E.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. “Smart” delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 931-946, 2004.

- [3] FERREIRA, D. S.; LOPES, S. C. A.; FRANCO, M. S.; DE OLIVEIRA, M. C. pH sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. **Therapeutic delivery**, 2013, v. 4, p. 1-24.
- [4] HAERI, A.; SADEGHIAN, S.; RABBANI, S.; ANVARI, M.S.; LAVASANIFAR, A.; AMINI, M.; SIMIN, D. Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: a comparison of phospholipid micelles and liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, 2013, v.455, p. 320–330.
- [5] LASIC, D.; MARTIN, F. Stealth liposomes / edited by (1995). BOCA RATON, CRC. LOMMENS, P., SMET, P.F. Photoluminescence properties of Co²⁺-doped ZnO nanocrystals. **Journal of Luminescence**, 2016, v.118(2), p. 245-250.
- [6] MUTHUA, M.S.; KULKARNI, S.A.; RAJU, A.; FENG, SI-S. Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots. **Biomaterials**, 2012, v. 33, p. 3494-3501.
- [7] WANG, Y.; CHEN, L. Quantum dots, lighting up the research and development of nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 2011, v.7, p.385-402.