

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE VESÍCULAS LIPOSSOMAIS CONTENDO ANTIMÔNIO E ARSÊNIO¹

PRODUCTION AND SAFETY ASSESSMENT OF LIPOSOMAL VESICLES CONTAINING ANTIMONY AND ARSENIC

**Marcela Guimarães Silva de Moraes², Cláudir Gabriel Kaufmann Júnior³,
Mariana Dutra da Rosa⁴, Camila Medianeira da Silva D'Ávila⁵, Francine Cadoná⁶,
Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden⁷ e Sergio Roberto Mortari⁸**

RESUMO

O Arsênio (As) e o Antimônio (Sb) são elementos químicos com aplicações biomédicas, sendo que o As, na forma de trióxido de arsênio é padrão ouro no tratamento de leucemia promielocítica aguda recidiva, enquanto o Sb, na forma de tartarato de antimônio, vem sendo utilizado há muitos anos, no tratamento de leishmaniose. Por serem elementos químicos, com características físicas e químicas semelhantes, produzir um lipossoma contendo estes dois elementos foi objetivo deste trabalho. Os lipossomas foram obtidos pelo método de injeção de etanol, os quais apresentaram tamanho médio de vesícula de $135,8 \pm 0,03$ nm, índice de polidispersão de $0,152 \pm 0,04$, potencial Zeta de $-30,51 \pm 0,03$ e pH de $7,15 \pm 0,18$. O teor dos ativos foi determinado pela técnica de espectrometria de massa com plasma, sendo $0,242 \pm 0,01$ mg/mL e $0,254 \pm 0,03$ mg/mL, para As e Sb, respectivamente. A formulação manteve a estabilidade por até 60 dias, quando armazenada em temperatura ambiente e em geladeira. Ensaios de segurança da formulação (MTT e NO) indicaram que, na concentração avaliada, não houve viabilidade nem proliferação celular, porém os lipossomas protegeram as células (fibroblastos humanos (HFF-1) quanto a processos inflamatórios.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Nanopartículas Lábeis; Semimetal; Metal.

ABSTRACT

Arsenic (As) and Antimony (Sb) have biomedical applications. As, in the form of arsenic trioxide is the gold standard in the treatment of relapsed acute promyelocytic leukemia, while the metal Sb, in the form of antimony tartrate, has been used for many years in the treatment of leishmaniasis. Because they are chemical elements,

¹ Trabalho de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Nanociências - Universidade Franciscana - UFN.

² Programa de Pós-graduação em Nanociências, Universidade Franciscana (UFN), Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: biomarcelinha@gmail.com

³ Programa de Pós-graduação em Minas, Metalurgica e Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: claudirgabrielkaufmannjr@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1063-5742>

⁴ Programa de Pós-graduação em Minas, Metalurgica e Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: marianadutradarosa@gmail.com

⁵ Curso de Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida, Universidade Franciscana, UFN, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: camila.davila@ufn.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8136-2413>

⁶ Curso de Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida, Universidade Franciscana, UFN, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: f.cadona@ufn.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6761-9743>

⁷ Programa de Pós-graduação em Nanociências, Universidade Franciscana (UFN), Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: cristianorbr@ufn.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6171-4224>

⁸ Programa de Pós-graduação em Nanociências, Universidade Franciscana (UFN), Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: mortari@ufn.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1166-3980>

with similar physical and chemical characteristics, producing a liposome containing these two elements was the objective of this work. The liposomes were obtained by the ethanol injection method. The liposomes obtained had an average vesicle size of 135.8 ± 0.03 nm, polydispersity index of 0.152 ± 0.04 , Zeta potential of -30.51 ± 0.03 and pH of 7.15 ± 0.18 . The content of the actives was determined by mass spectrometry, being 0.242 ± 0.01 mg/mL and 0.254 ± 0.03 mg/mL, for As and Sb, respectively. The formulation maintained stability for up to 60 days when stored at room temperature and in the refrigerator. Safety assays of the formulation (MTT and NO) indicated that, at the concentration evaluated, there was no cell viability or proliferation, but the liposomes protected the cells (human fibroblasts (HFF-1) regarding inflammatory processes.

Keywords: Nanotechnology; Labile Nanoparticles; Semimetal; Metal.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de drogas lipossomais no tratamento de inúmeras doenças vem sendo cada vez mais atual e presente na medicina. Sintetizados por Bangham e Horne, em 1964 os lipossomas são estruturas esféricas, biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicas, compostas por uma bicamada de lipídios exterior, que rodeia um meio interno aquoso capaz de armazenar compostos hidrofílicos. A encapsulação de drogas em lipossomas reduz a toxicidade sistêmica, sendo mais tolerável para terapias como anticâncer (Mirveis *et al.*, 2022, Fidan *et al.*, 2023), antibacteriano e antifúngicas (Large *et al.*, 2021).

Importa ressaltar que o principal componente dos lipossomas são os lipídios e ácidos graxos que, devido à sua ocorrência natural nas membranas celulares, são considerados inherentemente bio-compatíveis e biodegradáveis. Conforme os estudos de Akbarzadeh (2013) em sua estrutura, os lipossomas são definidos pela automontagem de moléculas anfipáticas em uma esfera de bicamada, na qual os grupos de cabeça hidrofílicos estão voltados para o ambiente aquoso externo e as cadeias de hidrocarbonetos se montam dentro do interior hidrofóbico. Com um caráter anfifílico dos lipossomas, se tornam portadores de drogas ideais para moléculas de polaridades diferentes.

Conforme Ahn (2010) o As, na forma de trióxido de arsênio, é padrão ouro no tratamento de leucemia promielocítica aguda reidivada. Já o Sb, na forma de tartarato de antimônio, vem sendo utilizado há muitos anos, no tratamento de leishmaniose (Da Rosa *et al.*, 2029; Azin *et al.*, 2021). Por serem elementos químicos, com características físicas e químicas semelhantes, produzir uma vesícula lipossomal contendo ambos os elementos pode ser uma alternativa para diminuir a concentração de arsênio (mais tóxico) pelo antimônio (menos tóxico), desde que tenhamos a mesma eficiência no tratamento da leucemia.

O perfil de segurança das formulações precisa ser avaliado, visando comprovar a segurança para aplicação em humanos. A primeira fase, chamada pré-clínica, envolve testes *in vitro* e *in vivo* com animais. Nesta fase já se detecta os potenciais problemas de segurança causados pela formulação. A partir disso, neste trabalho avaliou-se a produção, estabilidade e segurança de lipossomas contendo

dois ativos distintos, em uma mesma formulação: o Arsênio (As) e o Antimônio (Sb), visando possíveis aplicações biomédicas.

Propõe-se nesse estudo produzir uma formulação nanoestruturada contendo Antimônio e Arsênio, visando possível aplicação em tratamento de enfermidades, como Leucemia Promielocítica Aguda e Leishmaniose, em que o padrão ouro de tratamento são Arsênio e Antimônio, respectivamente. Foram utilizados fibroblastos humanos (HFF-1) de cultivo primário para estabelecer o perfil de segurança dos lipossomas contendo As e Sb.

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação lipossomal contendo Antimônio (Sb_2O_3) e Arsênio (As_2O_3), na concentração de $0,25\text{ mg mL}^{-1}$ de cada ativo, estável e segura visando possíveis aplicações no tratamento de enfermidades.

2 MATERIAS E METODOS

Os lipossomas foram produzidos e caracterizados no laboratório de nanotecnologia da Universidade Franciscana (UFN). Os estudos *in vitro* foram realizados no laboratório de nanociências da Universidade Franciscana.

2.1 PREPARO DOS LIPOSSOMAS

Os ativos, tanto o trióxido de arsênio quanto o trióxido de antimônio, não são solúveis em água. Com isso, foram produzidas soluções destes ativos da seguinte forma:

2.1.1) solução de trióxido de arsênio $1,0\text{ mg mL}^{-1}$: Pesou-se 100 mg de As_2O_3 (Sigma-Aldrich) em um bequer de 100 mL e solubilizou-se com $NaOH$ (Merck) $2,0\text{ mol L}^{-1}$ em agitação magnética constante. Após, ajustou-se o pH a neutralidade, com HCl $1,0\text{ mol L}^{-1}$, com auxílio de pHgametro. Ajustado o pH, aferiu-se o volume a 100 mL com tampão PBS pH 7,2.

2.1.2) solução de trióxido de antimônio $1,0\text{ mg mL}^{-1}$: Pesou-se 100 mg de Sb_2O_3 (Sigma-Aldrich) em um bequer de 100 mL e solubilizou-se com ácido tartárico ($C_4H_4O_6$, Merck) $2,0\text{ mol L}^{-1}$ em agitação magnética constante. Após ajustou-se o pH a neutralidade com $NaOH$ $1,0\text{ mol L}^{-1}$, com auxílio de pHgametro. Ajustado o pH, aferiu-se o volume a 100 mL com tampão PBS pH 7,2.

Os lipossomas foram produzidos pelo método de injeção de etanol, com metodologia adaptada de Justo e Moraes (2005), a qual consiste em solubilizar em um erlenmayer de 250 mL 400 mg fosfolípidos (Lipoid S-100, Sigma-Aldrich[®]), 20 mg de polietilenoglicol (PEG 1500, Sigma-Aldrich[®]), 75 mg de colesterol (Sigma-Aldrich[®]) e 10 mg de vitamina E (Dermapele), em 20 mL de álcool etílico absoluto

(PA, Synth, 99,5%) e sonicar em ultrassom por 10 minutos (Ultrasonic Cleaner, UNIQUE®), para facilitar a solubilização dos componentes (Fase Orgânica). Para a fase aquosa, em um bequer de 250 mL adicionou-se 65 mg de polisorbato 80 (TWEEN 80, LABSYNTH®), 25 mL solução de trióxido de arsênio 1,0 mg mL⁻¹ e 25 mL de solução de trióxido de antimônio 1,0 mg mL⁻¹ e 50 mL de tampão PBS pH 7,2. A Tabela 1 apresenta os componentes e suas massas utilizadas na produção dos lipossomas.

Tabela 1 - Composição da matéria prima utilizada para a obtenção das vesículas lipossomais (adaptada de Justos e Moraes, 2005), para 100 mL.

Fase orgânica	Fase aquosa		
Lipoid S100 (mg)	400	Polissorbato 80 (mg)	65
Colesterol (mg)	75	Tampão pH 7,4 PBS (mL)	50
Etanol (mL)	20	As ₂ O ₃ (1,0 mg mL ⁻¹) (mL)	25
Vitamina E (mg)	10	Sb ₂ O ₃ (1,0 mg mL ⁻¹) (mL)	25
PEG 1500 (mg)	20		

Fonte: Construção do Autor

Os reagentes, em separado (fase orgânica e fase aquosa) foram mantidos em agitação magnética, por 10 minutos. A seguir, tanto a fase orgânica quanto a fase aquosa, em separado, foram aquecidas em banho maria, a temperatura de 37 °C, com agitação magnética, por 10 minutos. Após, com o auxílio de um funil de plástico com uma ponteira na extremidade, adicionou-se o volume da fase orgânica na fase aquosa. A mistura foi mantida sob agitação por mais 20 minutos e então, colocada em balão de 250 mL e levado ao rotaevaporador (120 RPM, 37 °C, YAMATO - RE801) para eliminação do solvente (etanol). Assim, esta formulação lipossomal contém 0,25 mg mL⁻¹ de As₂O₃ e 0,25 mg mL⁻¹ de Sb₂O₃ denominada de LipAs0,25Sb0,25 (concentração teórica). As formulações foram produzidas em duplicata. Após a produção, a formulação foi aferida a 100 mL, em balão volumétrico, e encaminhada para a caracterização e estudos de estabilidade e viabilidade celular.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

2.2.1 Determinação do pH

Para a determinação do valor de pH, utilizou-se um potenciômetro (Marca Denver) calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente na suspensão coloidal, após a preparação. Foram realizadas medidas em triplicata.

2.2.2 Determinação de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta

Na determinação destes parâmetros utilizou-se o equipamento Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Reino Unido), utilizando o software Dispersion Technology v5.1, conforme recomendações

do fabricante. As formulações foram diluídas 500 vezes em água de alta pureza. A técnica do espalhamento da luz dinâmica mede a difusão do movimento das partículas de acordo com o movimento Browniano na solução. As partículas menores difundem a luz mais rápido do que as maiores, afetando a taxa de flutuação da intensidade da luz espalhada. Os resultados foram expressos em nm para o diâmetro médio de partícula.

Já o potencial Zeta também foi realizado no equipamento Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Reino Unido), pela técnica da mobilidade eletroforetica: um campo elétrico foi aplicado a solução em que as partículas então se movem a uma velocidade relacionada com o seu potencial zeta. Os resultados de potencial Zeta foram expressos em milivolts (mV).

2.2.3 Teor dos Ativos

Para determinação de antimônio e arsênio nas formulações utilizou-se a técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplada (ICP-MS), conforme recomendações do fabricante para a determinação destes elementos (Perkin-Elmer, Elan 6100) e Miekeley e colaboradores (2002). As diluições, quando necessárias, foram realizadas em água ultrapura momentos antes das determinações. Para a calibração instrumental foi utilizada calibração externa com pontos 0,5 a 5,0 ng de antimônio e arsênio. As soluções foram preparadas no dia da análise.

2.2.4 Estudos indicativos de estabilidade

Em duplicata, as formulações LipAs0,25Sb0,25 foram armazenadas sob refrigeração a 5°C e em temperatura ambiente a 25 °C, com códigos LipAs0,25Sb0,25 GE e LipAs0,25Sb0,25 TA, respectivamente. Os estudos de estabilidade foram realizados nos tempos, após a produção: 7, 15, 30, 60 e 90, 100 e 150 dias, para ambos os tipos de armazenamento. A cada data, foram realizadas medidas de pH, tamanho médio de vesícula, índice de polidispersão e potencial Zeta. Já o teor do ativo, e eficiência de encapsulação foram determinados no tempo 1 dia após a produção.

2.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

2.3.1 Cultura de células

A linha celular de fibroblastos humanos (HFF-1) foi adquirida comercialmente no Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivada em condições ideais de cultivo celular, utilizando meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina (100 U/mL) /estreptomicina (100 mg/mL), até aquisição de número de células adequado e confluência para a realização de todos os testes propostos.

2.3.2 Tratamentos

Células HFF-1 foram semeadas na concentração de 5x10⁴ células/poço e 2x10⁴ células/poço, por 24 e 72 horas de incubação, respectivamente. As células foram incubadas por 24 horas em uma incubadora de CO₂ a 37°C para adesão à placa. Posteriormente, as células foram expostas a diferentes concentrações de Nortriptilina, Nortriptilina mais Lipossoma contendo Arsênio e Antimônio 0,25 mg/mL. Essas substâncias foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração de DMSO foi determinada em 0,5%. Um controle usando apenas células e DMSO foi utilizado.

2.4 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA *in vitro*

Estes ensaios foram realizados com a formulação lipossomal contendo 0,25 mg/mL de cada ativo, assim como com os ativos livres, na mesma concentração de 0,25 mg/mL.

2.4.1 Ensaio MTT

A viabilidade celular (tempo de 24 horas) e a proliferação (tempo de 72 horas) foram medidas pelo Ensaio MTT. Neste ensaio, um dos compostos é o sal tetrazolium, este sal é hidrossolúvel e possui coloração amarela e tem como característica a fácil incorporação em células viáveis. Dentro da célula, a mitocôndria é responsável por reduzir o sal tetrazolium a partir da enzima succinato desidrogenase formando um cristal de formazan que tem sua coloração azul e é insolúvel em água. Este cristal de formazan fica preso no citoplasma da célula e é solubilizado no meio pela adição de dimetil sulfóxido (DMSO), a coloração azulada no meio é proporcional ao número de células viáveis na amostra (Fukui *et al.*, 2010).

O sobrenadante dos tratamentos foi descartado e as células lavadas e ressuspensas em tampão fosfato (PBS, 0,01 M; pH 7,4), para evitar a interferência dos tratamentos. Os tratamentos das amostras foram dispostos em uma placa de 96 poços. Após, foi adicionado o reagente MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1:10) (dissolvido em 5 mg/mL PBS) e incubado por 1 h, a 37 °C. Os cristais de formazan gerados foram liberados das células através da adição de DMSO. A quantificação foi realizada colorimetricamente por espectrofotometria no comprimento de onda de 560 nm, sendo o valor da absorbância proporcional ao número de células viáveis.

2.4.2 Determinação de óxido nítrico (NO•)

O ensaio de óxido nítrico (NO•) detecta a presença de nitrito orgânico na amostra (NO²⁻), uma determinação indireta dos níveis de óxido nítrico (ON) sendo utilizada metodologia adaptada de

Choi e colaboradores (2012). O nitrito é detectado e analisado pela formação de uma cor rosa quando o reagente de Griess é adicionado à amostra contendo NO_2^- . A sulfanilamida do reagente de Griess é responsável pela formação de sais de diazônio a partir da amostra NO_2^- . Quando o N-1-naftiletileno-diamina-dicloridrato interage com os sais de diazônio, a cor rosa aparece na amostra, que é detectada usando um comprimento de onda de 540 nm.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram determinadas pelo statistical package for the social (SPSS) versão 23.0. Para comparar os tratamentos realizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste post hoc de Tukey. Foram considerados estatisticamente diferentes valores com $P < 0,05^*$.

Nos testes de citotoxicidade a estatística utilizada foi por meio do teste ANOVA one-way, seguido do teste post hoc de Dunnet, pelo programa gráfico estatístico Graph Pad Prism 5.0. Os tratamentos foram expressos como uma porcentagem do controle (%). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando p é igual ou menor que 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas obtidos apresentaram aspecto característico, ou seja, coloração leitosa levemente azulada (devido ao efeito Thydall, que ocorre quando há a dispersão da luz pelas partículas coloidais, na escala nanométrica), sem precipitados e sem cheiro. Após a produção, as formulações foram armazenadas em geladeira por 24 horas, para então serem caracterizadas. As formulações foram preparadas em triplicata ($n=3$) e caracterizados (diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor). Os resultados são apresentados na tabela 2.

3.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Os resultados das Tabelas 2 e 3 nos indicam que a formulação apresenta valores dentro dos necessários para uma futura aplicação. Nova formulação foi produzida e dividida em dois grupos com duas amostras cada (contendo 25 mL de formulação em cada frasco). Os frascos foram armazenados em diferentes condições de temperatura: Sob refrigeração a 5 °C (LipAs0,25Sb0,25 G) e em temperatura ambiente a 25 °C (LipAs0,25Sb0,25 TA).

As caracterizações foram realizadas em 7, 15, 30, 60, 90, 100 e 150 dias após a produção da formulação e estão apresentados na Tabela 4 para formulação contendo os ativos.

Tabela 2 - Caracterização físico-química da formulação com ativos, 24 horas após o preparo. (n=3).

Formulação	Diâmetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	pH
As0,25Sb0,25	135,8 ± 0,03	0,152 ± 0,04	- 30,51 ± 0,03	7,15 ± 0,18
LipAs0,25Sb0,25 = lipossoma contendo 0,25 mg mL ⁻¹ de As ₂ O ₃ e 0,25 mg mL ⁻¹ de Sb ₂ O ₃ .				

Quanto ao teor, a formulação apresentou valores de 96,8 ± 2,4 % para Arsênio e 101,4 ± 11,9 % para Antimônio, em relação aos 0,25 mg mL⁻¹. Os seja, 0,242 ± 0,01 mg mL⁻¹ com desvio padrão relativo de 4,13 % para arsênio e mg mL⁻¹ com desvio padrão relativo de 11,82 % para antimônio. A tabela 3 apresenta os resultados. Estes valores se assemelham aos encontrados na literatura, embora sendo estudos com um ativo apenas (ou arsênio ou antimônio) (MOREIRA, 2015; SALLES, 2019; VIANA, 2022).

Tabela 3 - Teor dos ativos Arsênio e Antimônio na formulação, após 24 horas da produção (n=3).

Ativo	Média ± Desvio (mg mL ⁻¹)	DPR (%)	Recuperação (%)
Arsênio	0,242 ± 0,01	4,13	96,8 ± 2,4
Antimônio	0,254 ± 0,03	11,82	101,4 ± 11,9

Tabela 4 - Valores de estabilidade da formulação lipossomal contendo 0,25 mg mL⁻¹ de As e Sb, (n=2).

Tempo (dias)	Armazenamento	Diâmetro (nm)	PDI	pZ (mV)	pH
1	-	135,8 ± 0,1	0,152 ± 0,04	- 30,5 ± 0,1	7,15 ± 0,18
	TA	124,6 ± 1,4	0,169 ± 0,08	- 21,8 ± 0,5	7,10 ± 0,10
7	GE	144,1 ± 2,2	0,136 ± 0,11	- 19,5 ± 1,3	7,13 ± 0,10
	TA	128,2 ± 3,5	0,202 ± 0,11	- 15,4 ± 1,6	7,13 ± 0,07
15	GE	130,5 ± 2,1	0,233 ± 1,03	- 17,4 ± 0,9	7,09 ± 0,11
	TA	139,6 ± 1,9	0,297 ± 0,88	- 7,7 ± 1,1	7,06 ± 0,02
30	GE	130,0 ± 0,8	0,201 ± 0,14	- 10,9 ± 0,6	7,10 ± 0,05
	TA	136,0 ± 4,2	0,120 ± 1,04	- 14,5 ± 0,1	7,10 ± 0,11
60	GE	146,6 ± 0,2	0,243 ± 0,23	- 8,2 ± 0,8	7,13 ± 0,02
	TA	157,1 ± 2,6	0,159 ± 0,05	- 11,8 ± 1,0	7,04 ± 0,33
90	GE	149,6 ± 3,2	0,257 ± 0,88	- 9,44 ± 2,1	7,11 ± 0,04
	TA	142,3 ± 0,1	0,173 ± 0,31	- 11,6 ± 0,9	7,03 ± 0,06
100	GE	155,3 ± 2,3	0,237 ± 0,09	- 18,4 ± 1,1	7,08 ± 0,11
	TA	222,8 ± 3,8	0,280 ± 0,07	- 20,7 ± 1,8	6,91 ± 0,07
150	GE	200,5 ± 1,7	0,291 ± 0,12	- 13,3 ± 0,3	6,99 ± 0,13

não houve alteração de cor e odor neste período de avaliação.

Os resultados estão de acordo com dados da literatura, para um único componente. Moreira em 2015 produziu e caracterizou lipossomas contendo trióxido de arsênio pelo método de evaporação em fase reversa seguido de ultrassonicação com sonda para reduzir o tamanho e homogeneização do sistema lipossomal. Os lipossomas continham 1,0 mg de As₂O₃ por mL de formulação com 71,17 ± 0,06 nm de tamanho médio e 0,29 ± 0,04 de PDI, sendo estáveis por até 60 dias. Salles em 2019 desenvolveu e caracterizou lipossomas contendo trióxido de antimônio, com o auxílio de energia ultrasônica, para redução de tamanho de partícula e índice de polidispersão dos lipossomas. Os resultados

obtidos apresentaram tamanho médio de $81,20 \pm 1,18$ nm e PDI de $0,271 \pm 0,44$. O teor de trióxido de antimônio nos lipossomas produzidos foi de $1,0$ mg mL $^{-1}$ e estáveis por até 30 dias, armazenados em temperatura ambiente quanto em geladeira.

Viana em 2022 produziu, caracterizou e avaliou a atividade biológica em linhagens tumorais de lipossomas contendo trióxido de antimônio e lipossomas contendo trióxido de arsênio, ambos com concentração de ativo de $1,0$ mg mL $^{-1}$. As vesículas lipossomais foram produzidas pelo método de evaporação em fase reversa, seguido da utilização de sonda de ultrasom, com potência de 750W com amplitude de 40%. Para os lipossomas contendo Sb_2O_3 as vesículas apresentaram tamanho médio de 80,05 nm e PDI de 0,279. Já os lipossomas contendo As_2O_3 apresentaram tamanho médio de vesícula de $140,1 \pm 1,64$ nm com PDI de $0,259 \pm 0,03$. Segundo o autor, as formulações foram estáveis por até 30 dias, quando armazenadas em geladeira e em temperatura ambiente. Viana avaliou também atividade biológica, concluindo que os lipossomas (tanto de As_2O_3 quanto Sb_2O_3) não foram capazes de interagir e causar degradação na exposição direta ao DNA plasmidial. Os lipossomas com estes ativos possuem potencial efeito biológico nas células tumorais testadas (NB4, HL-60, T98G, U87MG, HepG2, A375 e A549).

3.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA *in vitro*

Neste trabalho utilizou-se os ensaios de MTT e óxido nítrico em linhagem celular de fibroblastos humanos (HFF-1). O MTT é um método colorimétrico que avalia a atividade mitocondrial das células, através da mudança na intensidade de absorbância das amostras.

A Figura 1 apresenta os resultados do ensaio de MTT, sendo a figura 1 A de viabilidade celular em 24 h e a figura 1 B de proliferação celular em 72 h. Os resultados mostraram que nesta concentração ($0,25$ mg/mL) os lipossomas contendo As e Sb apresentaram citotoxicidade em relação ao controle negativo em 24 h, assim como com os ativos livres. O mesmo foi observado na proliferação celular em 72 horas, ou seja, nem a formulação, nem os ativos livres favoreceram a proliferação celular. Acreditamos que a concentração avaliada foi alta ($0,25$ mg/mL). Nova avaliação será conduzida em concentrações menores ($10x$, $100x$ e $1000x$).

Com o ensaio de NO é possível avaliar possível potencial anti-inflamatório, sendo avaliada através da inibição de NO. Possível pois esta molécula pode estar envolvida em diversos outros mecanismos além da inflamação. Os resultados deste trabalho são apresentados na Figura 2, avaliados em 24 e 72 horas, nas Figuras 2A e 2B, respectivamente.

Os resultados mostraram que, em relação ao controle, a formulação lipossomal contendo os ativos não teve diferenças significativas em relação ao controle negativo, tanto em 24 h quanto em 72 horas. Já os ativos livres, pela carga interagem diretamente com a membrana plasmática da célula liberando nitrato e nitrito no meio de cultura, sendo este um resultado de indicativo de inibição

celular. Além disso observa-se que o lipossoma contendo As e Sb protegeu/controlou as interações dos ativos com a membrana plasmática.

Figura 1 - Ensaio MTT com 24 h de incubação. Resultados expressos em porcentagem do controle (100%).

Controle negativo: células em meio de cultura; Concentração dos lipossomas 0,25 mg/mL As e Sb;

Dados expressos em média ± desvio padrão. A) Viabilidade celular; B) Proliferação Celular.

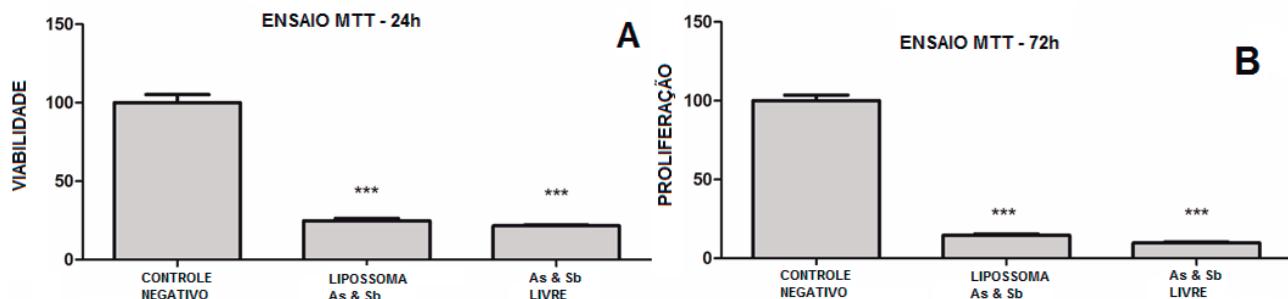
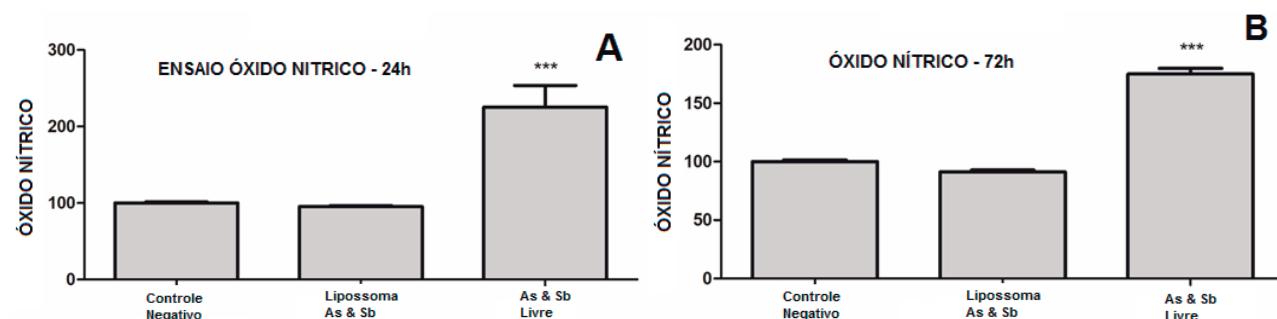


Figura 2 - Ensaio de Óxido nítrico. A) incubadas por 24 horas;

B) incubadas por 72 horas. Linhagem celular HFF1.



4. CONCLUSÃO

O objetivo principal deste trabalho foi atendido, ou seja, uma formulação lipossomal estável, contendo dois elementos químicos (As e Sb). Quanto a segurança da formulação, na concentração dos ativos avaliada houve redução da viabilidade celular, sendo necessários mais ensaios para complementar estes dados (uma curva de concentração, com pontos de menor concentração). O resultado positivo encontrado neste trabalho foi a inibição na produção de óxido nítrico quando os ativos foram incorporados na vesícula lipossomal.

Os lipossomas foram caracterizados, mostrando ser uma formulação manométrica (tamanho médio de vesícula de $135,8 \pm 0,1$ nm). O tamanho está dentro do que é preconizado para que seja denominado como uma estrutura nanométrica, pois todas as análises de tamanho médio mostraram tamanhos inferiores a 150 nm. Em relação a estabilidade, dentro do período de 60 dias, conclui-se que os lipossomas se apresentaram estáveis, quando armazenados em temperatura ambiente e em refrigeração. Quanto ao teor dos ativos, não houve perdas no preparo da formulação, tendo

uma recuperação próxima a 100% ($\text{As} = 96,8 \pm 2,4$ e $\text{Sb} = 101,4 \pm 11,9$), determinadas 24 horas após a produção da formulação.

Já em relação a segurança da formulação, acreditamos que a concentração dos ativos na formulação tenha sido muito alta, uma vez que não houve viabilidade nem proliferação celular (perspectiva para trabalho futuro, investigar o efeito em concentrações menores de As & Sb). O resultado de óxido nítrico nos leva a concluir que a nanoestrutura (lipossoma) protegeu a membrana celular, evitando inflamação. Já os ativos livres provocaram inflamação, aumentando os níveis de NO, tanto em 24 como em 72 h.

REFERÊNCIAS

- AKBARZADEH, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale research letters**, 8, 1-9, 2013. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102
- AHN, R. W. *et al.* A novel nanoparticulate formulation of arsenic trioxide with enhanced therapeutic efficacy in a murine model of breast cancer. **Clin Cancer Res.**, 16(14), 3607-17, 2010. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0068
- AZIM, M. *et al.* Therapeutic advances in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A review. **PLoS neglected tropical diseases**, 15(3), e0009099, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009099
- BANGHAM, A. D., HORNE, R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the éléctron microscope. **Journal of Molecular Biology**, 8, 660-81, 1964. DOI: 10.1016/s0022-2836(64)80115-7
- CHOI, W. S. *et al.* The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cellular Immunology**, 280(2), 164-170, 2012. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.12.007
- DA ROSA, F. C. *et al.* In vitro stability of arsenic trioxide-liposome encapsulates for acute promyelocytic leukemia treatment. **Leukemia research**, 76, 11-14, 2019. DOI: 10.1016/j.leukres.2018.11.008
- FIDAN, Y. *et al.* Recent advances in liposome-based targeted cancer therapy. **Journal of Liposome Research**, 34(2), 316-334, 2023. DOI: 10.1080/08982104.2023.2268710
- FUKUI, M. *et al.* Resveratrol Attenuates the Anticancer Efficacy of Paclitaxel in Human Breast Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **Eur J Cancer**. 46(10), 1882-1891, 2010. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.02.004

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M. Kanamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, 57, 23-30, 2005. DOI: 10.1211/0022357055092

LARGE, D. E. *et al.* Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 113851, 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113851

MOREIRA, M. E. S. **Desenvolvimento e Caracterização de Vesículas Lipossomais Contendo Trióxido de Arsênio.** Dissertação (Mestrado de Nanociências) - Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Universidade Franciscana, Santa Maria, 2015.

MIEKELEY, N. *et al.* Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 372, 495-502, 2002. DOI: 10.1007/s00216-001-1213-7

MIRVEIS, Z. *et al.* Novel and efficient method for loading aptamer-conjugated liposomes with arsenic trioxide for targeting cancer cells. **Journal of Liposome Research**, 32(3), 276-283, 2022. DOI: 10.1080/08982104.2021.2005624.

SALLES, B. C. **Desenvolvimento e caracterização de vesículas lipossomais contendo trióxido de antimônio sintetizadas via energia ultrassônica.** Dissertação (Mestre em Nanociências) - Programa de Pós-Graduação em Nanociências - Universidade Franciscana - UFN, 2019.

VIANA, A. R., **Desenvolvimento, caracterização e atividade biológica de vesículas lipossomais contendo trióxido de antimônio e trióxido de arsênio.** Tese (Doutor em Nanociências) - Programa de Pós-Graduação em Nanociências - Universidade Franciscana - UFN, 2022.