

## ESTUDO DE ÁCIDOS HIDROXÂMICOS ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMOS DE ASOLECITINA DE SOJA OBSERVADOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE $^1\text{H}$ E $^{31}\text{P}$

LUCAS THADEU FELIPE KOKUSZI <sup>1</sup>; SANDRA CRUZ DOS SANTOS <sup>2</sup>; KARINA  
DOS SANTOS MACHADO <sup>3</sup>; JULIANO ROSA DE MENEZES VICENTI <sup>4</sup>; YAGO  
PAES <sup>5</sup>; VÂNIA RODRIGUES DE LIMA <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – lucaskokuszi96@gmail.com

<sup>7</sup> Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – vrlima23@hotmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma infecção bacteriana crônica causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que infecta aproximadamente um terço da população global (LIBREROS-ZUNIGA et al., 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 10 milhões de pessoas desenvolveram TB em 2018 e mais de 1,5 milhões de mortes foram causadas por esta doença (DOS SANTOS et al., 2021). Nas últimas décadas, o tratamento da TB segue sendo desafiador, uma vez que a efetividade da combinação de fármacos de primeira opção usada se dá de forma lenta acarretando em longos períodos de tratamento. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos, a investigação sobre o uso da reposição de fármacos e outras estratégias farmacocinéticas eficazes contra o patógeno (REID et al., 2019). Neste contexto, os ácidos hidroxâmicos e seus sais derivados, tais como o benzohidroxamato de potássio (BH) e o nitrobenzohidroxamato de potássio (NBH) são considerados promissores para o estudo no tratamento da TB (ADIGUZEL et al., 2017). Isto pode estar relacionado os à capacidade desses compostos de se ligarem a íons metálicos de enzimas como ureases e metaloproteinases inibindo a sua atividade, assim como de competir contra sideróforos bacterianos para o  $\text{Fe}^{3+}$  (MURI et al., 2002; GONÇALVES et al., 2019). No entanto, os ácidos hidroxâmicos apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, fator que limita o seu potencial farmacocinético *in vivo* (MOHAMED et al., 2012). A fim de aumentar a biodisponibilidade dos ácidos hidroxâmicos dentro do organismo, torna-se interessante o seu encapsulamento em nanocarreadores lipídicos, como os lipossomos (DARAE et al., 2016). Os lipossomos são estruturas vesiculares formadas por fosfolípidios organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos (NISINI et al., 2018). De fato, os lipossomos são úteis no transporte de fármacos *in vivo* tendo em vista as suas propriedades de encapsular compostos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos em suas camadas internas, superficiais ou ainda na interface, além de serem biodegradáveis, não tóxicos e não-imunogênicos (NISINI et al., 2018). Torna-se assim necessário realizar a caracterização espectroscópica das interações entre os ácidos hidroxâmicos e lipossomos, visto que tais interações refletem em parâmetros como estabilidade e vetorização do sistema como um todo ao sítio alvo. Logo, este trabalho tem como objetivo realizar o estudo da caracterização espectroscópica de um sistema lipossomal baseado em asolecitina de soja (ASO), contendo BH e NBH, através do uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{31}\text{P}$ .

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Preparo dos lipossomos e Incorporação dos ácidos hidroxâmicos

Os lipossomos de ASO (50 mg/mL) foram produzidos através do método de evaporação por fase reversa (MERTINS et al., 2005), utilizando clorofórmio como solvente. Os ácidos BH e NBH foram incorporados na etapa de hidratação do filme, na concentração de 5 mg/mL solubilizados em tampão tricina/MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4.

### 2.2 Medidas de RMN de <sup>1</sup>H (T<sub>1</sub>) e de <sup>31</sup>P

As medidas de tempo de relaxação longitudinal (T<sub>1</sub>) de <sup>1</sup>H do grupo colina (N<sup>+</sup> (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) e dos metilenos (CH<sub>2</sub>) lipídicos foram obtidas através do equipamento Bruker a 400 MHz através da sequência de pulsos de recuperação da inversão à temperatura ambiente. A faixa de tempo de correlação (τ) utilizada foi de 0,4 a 12,8 s. Os lipossomos foram dispersos em água:água deuterada na proporção de 80:20 (v/v). As medidas de anisotropia de deslocamento químico de <sup>31</sup>P (via RMN de <sup>31</sup>P) foram realizadas a 161 MHz também a temperatura ambiente (TRAÏKIA et al., 2000).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de RMN estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Influência dos derivados de ácidos hidroxâmicos na anisotropia do deslocamento químico de <sup>31</sup>P e no tempo de relação longitudinal (T<sub>1</sub>) na região da colina (N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 3,2 ppm) e metilenos (CH<sub>2</sub>, 1-2 ppm) em lipossomos de ASO.

	ASO	ASO+BH	ASO+NBH
<b>Largura do pico de RMN de <sup>31</sup>P (ppm)</b>	14,91	18,75	15,11
<b>T<sub>1</sub> (s) de <sup>1</sup>H da N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	0,68	0,57	0,89
<b>T<sub>1</sub> (s) de <sup>1</sup>H de CH<sub>2</sub></b>	0,67	0,53	0,82

Os valores apresentados na Tabela 1 indicam que, para as análises de RMN de <sup>31</sup>P, a inserção dos ácidos BH e NBH no sistema induziram um aumento na largura de <sup>31</sup>P de 3,84 ppm e 0,2 ppm, respectivamente, em relação ao valor inicial do ASO. Isto indica uma restrição da liberdade de movimento relacionado ao grupo fosfato lipídico. Com respeito as análises de RMN de <sup>1</sup>H, para a região da colina, a inserção de NBH no sistema acarretou no aumento de 0,21s nos valores de T<sub>1</sub> de ASO. Isto sugere uma menor mobilidade molecular do grupo colina lipídico. Entretanto este comportamento não foi observado nas análises com BH que resultou na diminuição de 0,11s nos valores de T<sub>1</sub>, propiciando maior mobilidade molecular da colina lipídico. Em relação a região dos metilenos foi observado que a inserção de NBH no sistema aumentou 0,15s nos valores de T<sub>1</sub> de ASO indicando uma menor mobilidade molecular da região hidrofóbica lipídica. Já a inserção de BH no sistema promoveu efeito oposto diminuindo os valores de T<sub>1</sub> em 0,14 s, o que indicou maior mobilidade molecular da região dos metilenos lipídicos.

#### 4. CONCLUSÕES

A presença do grupo nitro no NBH testado parece influenciar em uma menor interação com o grupo fosfato, restringindo a mobilidade do grupo colina e metileno lipídicos quando comparado ao BH. Isto pode influenciar ou modular propriedades funcionais e parâmetros farmacocinéticos dos sistemas. Além disso o encapsulamento em lipossomos pode promover maior interação entre os sais derivados dos ácidos hidroxâmicos e a parede celular da Mtb. Isto torna o emprego dos lipossomos uma promissora alternativa no tratamento da TB.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIGUZEL, Ekrem et al. Synthesis and characterization of two new hydroxamic acids derivatives and their metal complexes. An investigation on the keto/enol, E/Z and hydroxamate/hydroximate forms. **Journal of Molecular Structure**, v. 1127, p. 403-412, 2017.
- DARAE, Hadis et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 381-391, 2016.
- DOS SANTOS, Marinalva Cardoso et al. Mefloquine synergism with anti-tuberculosis drugs and correlation to membrane effects: biologic, spectroscopic and molecular dynamics simulations studies. **Bioorganic Chemistry**, p. 104786, 2021.
- GONÇALVES, Bruna Lisboa et al. Synthesis, modeling and biological activity of new zinc (II) hydroxamates against streptococcus pneumoniae. **Chemical Data Collections**, v. 22, p. 100240, 2019.
- LIBREROS-ZUNIGA, G. A., DOS SANTOS, S. C., SALGADO, F., DIAS, M. V. B. Structural Basis for the Interaction and Processing of  $\beta$ -Lactam Antibiotics by I, d-Transpeptidase 3 (LdtMt3) from Mycobacterium tuberculosis. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 2, p. 260-271, 2018.
- MERTINS, Omar et al. Production of soybean phosphatidylcholine–chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. **Chemistry and physics of lipids**, v. 138, n. 1-2, p. 29-37, 2005.
- MOHAMED, Elham A. et al. Vorinostat with sustained exposure and high solubility in poly (ethylene glycol)-b-poly (dl-lactic acid) micelle nanocarriers: Characterization and effects on pharmacokinetics in rat serum and urine. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 10, p. 3787-3798, 2012.
- MURI, Estela MF et al. Hydroxamic acids as pharmacological agents. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 17, p. 1631-1653, 2002.
- NISINI, Roberto et al. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 155, 2018.
- REID, Michael JA et al. Building a tuberculosis-free world: The Lancet Commission on tuberculosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10178, p. 1331-1384, 2019.
- TRAÏKIA, Mounir et al. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and  $^{31}\text{P}$ -nuclear magnetic resonance. **European Biophysics Journal**, v. 29, n. 3, p. 184-195, 2000.