



DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS SEMISSÓLIDOS CONTENDO AZUL DE METILENO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA PARA USO NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Cláudio Henrique Rodrigues^{1*}, Débora Cristina Silva Nascimento¹, Wilma Andreza Alves de Oliveira¹, Adriana Fontes², Juliana de Souza Alencar Falcão³, Goreti Carvalho Pereira⁴, Beate Saegesser Santos¹

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE; ²Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE; ³Curso de Farmácia, Centro de Educação e Saúde, UFCG; ⁴Departamento de Química Fundamental, UFPE
*claudiohrodrigues@live.com

INTRODUÇÃO

Nanopartículas de prata (AgNPs) são sistemas coloidais que apresentam uma fase dispersa e uma fase contínua líquida, e a redução do metal de um cristal para a escala nanométrica, confere características únicas, como catalíticas e ópticas para potencial uso nas ciências biomédicas, farmacêuticas e sensores (FAIRUZI et al., 2018). Esses efeitos são observados devido à ressonância da banda de plásmons que estão presentes na superfície dessas partículas, o que as tornam aptas para o uso no campo da plasmônica, amplificando processos de absorção e de fluorescência, mecanismos que são de amplo uso na Terapia Fotodinâmica (TFD) (MELO, 2011).

Diversas metodologias podem ser empregadas para a obtenção de AgNPs (SAADE, 2013). Entre essas metodologias, temos a síntese por crescimento por semente, descrita por Aherne et. al., (2008), que mostra o crescimento de AgNPs de forma rápida, reprodutível caracterizada pelo uso de agentes surfactantes, que vão interagir com partículas esféricas previamente sintetizadas, denominadas sementes, de forma a criar defeitos que vão ordenar o crescimento, modelando então a partícula final.

Essa metodologia também permite o controle da forma e do tamanho da partícula, por meio da quantidade de semente que é utilizada no meio coloidal, sob a adição de um mesmo volume final de prata, gerando então nanopartículas prismáticas. O agente surfactante Poliestireno sulfonato de sódio (PSSS) é de fundamental importância para a forma final da partícula, devido aos defeitos que são criados em algumas faces do cristal, impedindo a adição de mais prata se ligue naquele ponto. A ressonância de plásmons que essa partícula apresenta está ligada diretamente com o tamanho da partícula e sua forma, e regulando-se o tempo de formação dos prismas, se consegue alcançar regiões onde se encontram os agentes de uso na terapia fotodinâmica (SANTOS et al, 2016).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que envolve a interação de espécies químicas (fotossensibilizadores - FS) com a luz e com espécies de oxigênio molecular (O_2), presentes no tecido, a qual vai produzir as espécies reativas de oxigênio (EROs), como pode ser visto na Figura 1. Quando esses FS são irradiados na região da luz visível, com o comprimento de onda correspondente ao espectro de absorção é possível a indução de morte celular devido às reações de oxirredução e a geração dos EROs após a absorção dos fótons. Os três principais componentes da TFD são o FS, a luz visível e o oxigênio (VIANA, 2015).

A eficiência de um FS como agente terapêutico está relacionada a determinadas características do composto como solubilidade, pH, seletividade, parâmetros fotofísicos, absorção de luz, toxicidade e

estabilidade (MENEZES, 2006). Quanto a seletividade, uma característica relevante dos FS é sua carga, que vai garantir sua interação com as membranas, sendo preferível os catiônicos, visto a carga negativa das membranas biológicas. Existem vários compostos que vêm sendo testados como FS e utilizados comercialmente, segundo a literatura. Dentre eles, podem ser citados a classe dos fenotiazínicos, como o azul de metileno e os compostos porfirínicos (Porfirinas e Metaloporfirinas).

O azul de metileno (AM) é um corante catiônico que, por ser relativamente lipofílico, é capaz de permear membranas e por possuir carga positiva, é atraído pelo potencial negativo das mitocôndrias, podendo atuar nesta organela. Este FS é atualmente empregado no tratamento de infecções bucais, periodontite e descontaminação endodôntica. Possui ainda, boa eficácia de geração de 1O_2 e de tripleto (3O_2) em torno de 50% (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013a).

Este estudo teve o objeto de desenvolver e avaliar o potencial uso de sistemas semissólidos como insumo em tratamentos que utilizam a TFD, por meio de caracterização tanto dos sistemas coloidais utilizados quanto das formulações obtidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Síntese de AgNPs

A metodologia para síntese das AgNPs foi adaptada da proposta por Aherne et. Al., (2008). Em um experimento típico, combinou-se 5 mL de citrato de sódio (5 mL, 2,5 mmol.L⁻¹), solução de PSSS (0,25 mL, 500 mg.L⁻¹) e borohidreto de sódio [NaBH₄ (0,3 mL, 10 mmol.L⁻¹, recém preparada)], com posterior adição de nitrato de prata (5 mL, 0,5 mmol.L⁻¹, gota a gota), resultando em partículas esféricas e uma solução de coloração amarelada. Para o crescimento dessas partículas, utilizou-se as mesmas condições, onde combinou-se água deionizada (5 mL), ácido ascórbico (75 µL, 10 mmol.L⁻¹) e volumes variados da semente (90, 200 e 650 µL), seguido pela adição de solução aquosa de AgNO₃ (3 mL, 0,5 mmol.L⁻¹).

2. Caracterização das AgNPs

Os sistemas coloidais foram caracterizados através de espectroscopia Uv-Visível, com varredura entre 350 e 750 nm, e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3. Preparação das formulações semissólidas

Os géis foram manipulados de acordo com metodologia adaptada de Lachman, Lieberman e Kanig (2001). Resumidamente, foram preparados 100 g do gel de Carbopol 940®, Hidroxietilcelulose (HEC) e Alginato de sódio. Os géis tiveram pH final igual a 7, sendo armazenados para os estudos de geração de EROs e de parâmetros físicos. O azul de metileno foi incorporado ao gel e, quando com

AgNPs, utilizou um volume de forma que a concentração também permanecesse $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

4. Detecção de Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para detecção da produção de EROs, utilizou-se o método químico indireto utilizando N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e a L-histidina (TOFFOLI, 2008). As amostras foram irradiadas por um intervalo de tempo de 5 min e a cada 1 min será verificada a absorção no comprimento de onda de 440 nm, correspondendo comprimento de absorção máximo do RNO. Tais medidas serão realizadas em triplicata para assegurar a significância estatística do método. Foram realizadas medidas dos ensaios em solução, dos géis contendo azul de metileno, e com e sem AgNPs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como os crescimentos já mostrados na literatura, foram obtidas duas bandas de crescimento após o crescimento da partícula, uma que corresponde as sementes que não reagiram no meio coloidal, e a outra ao crescimento evidenciado, região essa que varia de acordo com o volume de semente adicionado no sistema. A Figura 1 mostra que todas as AgNPs ainda apresentaram um resíduo de semente, o que pode ser justificado pelo tamanho do polímero utilizado, que foi de 70 kDa, não sendo suficiente para que houvesse uma disposição ordenada dos núcleos e subsequente distribuição da prata, resultando num crescimento uniforme e progressivo, que aumentou de acordo com a diminuição da semente.

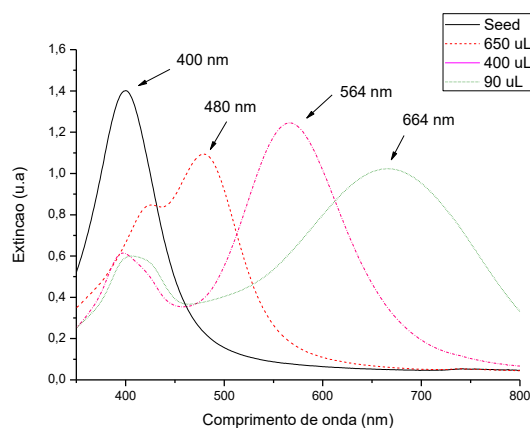


Figura 1. Espectros de varredura UV-Vis observados para a síntese utilizando PSSS 70 kDa, onde (a) semente, (b) 650 μL , (b) 400 μL e (c) 90 μL retirados da semente.

Isso também refletiu na análise por microscopia eletrônica de transmissão do sistema coloidal, para a qual se observou que as sementes estavam em maior proporção do que as partículas crescidas no meio coloidal. A Figura 2 mostra uma maior quantidade de sementes no meio, frente a poucos produtos prismáticos formados durante a síntese, corroborando com a varredura obtida, que mostra uma alta intensidade para a extinção das sementes e uma menor para a banda de crescimento dos prismas. Para a escolha da AgNP utilizada com o AM, foi observada a banda de ressonância dos plasmons que mais se aproximava da banda de absorção do FS (~ 660 nm). A Figura 3 mostra o conjunto de síntese obtido através da metodologia previamente descrita, da qual selecionou-se potenciais sistemas coloidais para os experimentos.

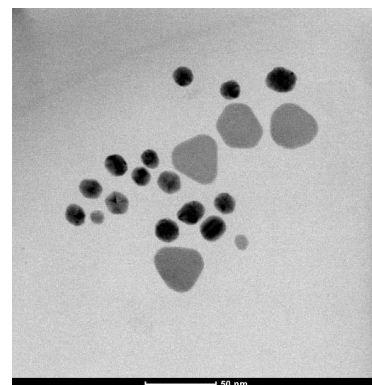
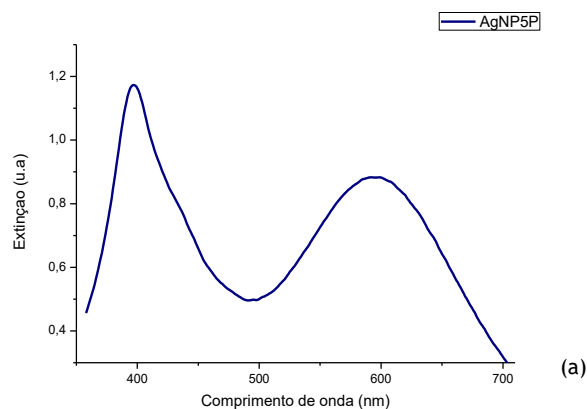


Figura 2. Espectro de extinção UV-Vis (a) e imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão (b), relativos à AgNP sintetizada utilizando 200 μL de semente contendo PSSS 70 kDa.



Figura 3. Conjunto de AgNPs obtidas das síntese utilizando PSSS de tamanho molecular 70 kDa, onde podemos ver a evolução da semente até menores volumes retirados, tendo evolução da cor do amarelo para o azul.

Quanto às formulações semissólidas do tipo gel, foram preparados sistemas contendo três tipos de agentes geleificantes: o alginato de sódio, o carbopol e a hidroxietilcelulose, com concentrações variadas de forma a identificar as melhores para uso nesse estudo, com e sem a incorporação dos sistemas coloidais, e verificando também as interações que os polímeros tiveram, tanto com o AM quanto na presença de AgNPs. Para as formulações com o alginato de sódio, obteve-se uma base fortemente iônica, de modo que, ao promover a agitação, a grande eletronegatividade do polímero promoveu a reação de dimerização do AM por meio grande interação, mudando os picos de absorção da molécula, como pode ser visto na Figura 4. Podemos ver que, quando a base HEC foi utilizada, os picos de absorção ficaram similares a aqueles observados na solução, o que muda quando são adicionadas quaisquer concentrações de alginato. Esse efeito tem grande contribuição na diminuição da eficácia do ativo, devido a presença de duas espécies, monômero e dímero (SEVERINO et. al., 2003).

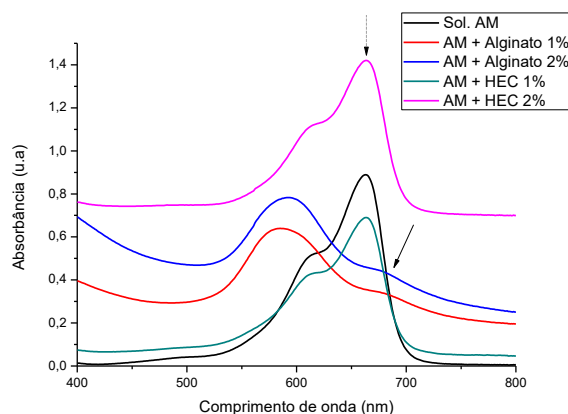


Figura 4. Espectros de absorção da solução de AM, e em bases geleificantes, evidenciando o pico de absorção no gel de HEC (seta tracejada) e o pico de dimerização quando incorporado na base de alginato (seta contínua).

O estudo de geração de espécies reativas de oxigênio foi realizado em solução e com as formas semissólidas preparadas, contendo ou não os sistemas coloidais, utilizando a solução de AM na concentração especificada na metodologia, junto com a técnica indireta contendo RNO e L-Histidina. Esse estudo foi realizado sem a presença das AgNPs (controle) e na presença da AgNP. A Figura 5 mostra o espectro de extinção que representa o experimento utilizado, para o qual o %EROs foi coletado de acordo com o monitoramento da absorbância do RNO, no tempo inicial e no final. Para os estudos em solução, foram obtidos $76,8\% \pm 1,3$, e quando avaliou-se os sistemas semissólidos, esses valores decaíram, provavelmente por conta da interação do azul de metileno com a malha polimérica, o que reduz a mobilidade das moléculas do FS e consequentemente, o choque com o O_2 .

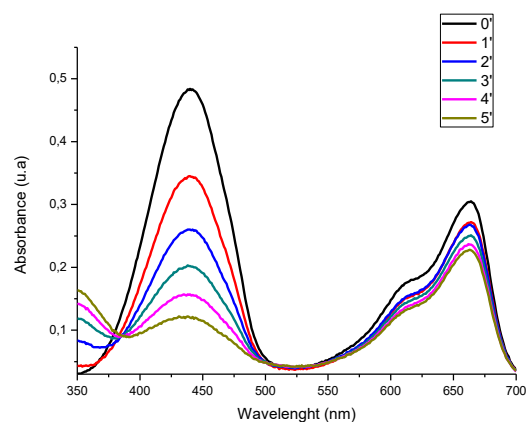


Figura 5. Espectro de varredura para a avaliação de Eros utilizando metodologia do RNO com L-Histidina, baseado no trabalho de Toffoli et. al., (2008).

As medidas contendo alginato não foram satisfatórias, uma vez que ocorreu o fenômeno de dimerização, impedindo que o pico máximo de absorção do AM estivesse presente (~660 nm). Não foi realizado então a incorporação do AMNP nessa base, uma vez que a turbidez apresentada pela formulação e a grande força iônica fazem com que ocorra a inversão das bandas. Quanto aos estudos físicos realizados com as formulações, todas obtiveram um pH final em torno de 7, não havendo variação de pH quando adicionou-se AgNPs, que também tem pH em torno dessa faixa, não afetando a forma farmacêutica final dos géis. A incorporação das AgNPs nos sistemas foi realizada no veículo da formulação semissólida, de forma que a concentração terapêutica do FS continuasse a utilizada no experimento controle, sendo a metodologia para a combinação dos dois realizada pela agitação

durante um tempo específico. Para os sistemas coloidais escolhidos, prezou-se por uma banda de extinção que estivesse próxima ou que tivesse superposição à banda de absorção do AM, como pode ser visto na Figura 7, que esquematiza um sistema de combinação, gerando o AMNP. Foi retirado também 1 mL desse sistema e incorporado na mesma metodologia proposta para a quantificação de EROs.

Tabela 1. Eros observadas para o controle em solução e para as formulações semissólidas.

BASE	% EROS
Solução AM	72 ± 1
CBP 0,5%	54 ± 4
HEC 1%	47 ± 3

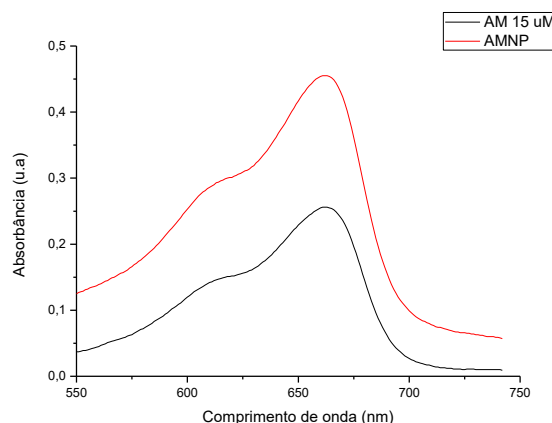


Figura 7. Espectro de varredura da solução de AM e do solução AMNP.

Quanto ao sistema obtido no final (AMNP), não foi observado precipitação, o que mostra que houve uma interação entre as moléculas de ambos. Houve um aumento da absorção das bandas do azul de metileno, observadas em 605 e 660 nm, respectivamente, provavelmente por conta da banda de extinção observada para as AgNPs, que era larga e presente na região de 630 - 660 nm.

Não houveram incompatibilidades após a incorporação do AMNP nas formas semissólidas, onde foram obtidos géis com a mesma faixa de pH daqueles controles, contendo apenas AM.

Houveram desafios para aplicação da metodologia de detecção de EROs nos géis de carbopol, por conta do seu aspecto, o que impossibilitava a determinação de um volume específico. Foi então utilizada uma seringa de 1 mL para aspirar o volume necessário. A Figura 8 mostra a %ROS para o sistema, comparando-o com a solução de AM e com a solução AMNP.

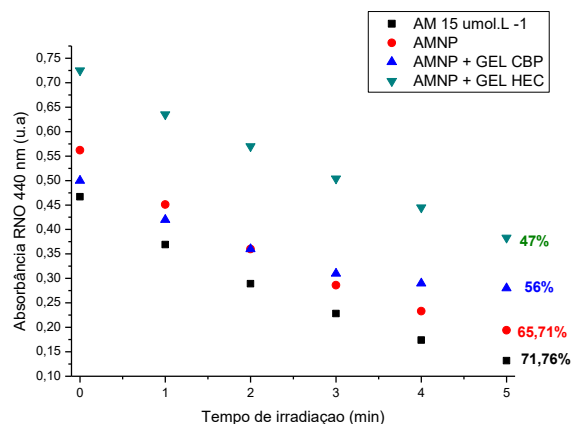


Figura 8. Consumo do RNO ao longo do tempo de irradiação.

A incorporação de AgNPs nos sistemas diminuiu a %EROs formados ao longo de todo o tempo de irradiação, e isso pode ser explicado por conta da presença de sementes no sistema. Essas sementes tem extinção na faixa de ~400 nm, o que pode interferir na detecção da absorbância do RNO. Além disso, a presença do agente redutor que permanece após a síntese também pode estar interferindo no sistema, por interferir quimicamente com o AM.

Apesar da redução na geração de EROs, o sistema ainda apresenta potencial à para terapia fotodinâmica antimicrobiana, uma vez que a prata também exibe ação antibacteriana já amplamente descrita na literatura, tendo mecanismos elucidados frente a uma gama de bactérias (NUNEZ, RIBEIRO, GARCEZ, 2013b; VIANA, 2015). A estabilidade apresentada pelos géis também classifica os materiais semissólidos para diversas aplicações que exijam uso tópico.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a adição de AgNPs em sistemas de terapia fotodinâmica não obteve uma eficácia maior do que o mesmo ensaio contendo apenas o FS. Quando comparamos a geração de EROs entre os sistemas semissólidos e em solução, observa-se que há uma queda na percentagem de Eros, podendo ter sofrido direta influência entre a malha do polímero com o AM e os sistemas coloidais, e vários fatores podem ser responsáveis, , como a interação da malha com o ativo e os sistemas coloidais. Ainda assim, foram obtidos sistemas estáveis que são potenciais insumos para a terapia, principalmente *in vivo* e de uso tópico, de forma a tornar a metodologia menos invasiva para o paciente ou animal a ser tratado.

REFERÊNCIAS

- FAIRUZI, A. A. *et al.* Degradation of methylene blue using silver nanoparticles synthesized from *imperata cylindrica* aqueous extract. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, [S. l.], 2018.
- MELO, L. S. A. Síntese de nanopartículas metálicas para aplicação em terapia fotodinâmica e espectroscopia. 153f. Dissertação (Doutorado), Centro De Ciências Exatas e da Natureza, **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2011.
- AHERNE, D.; LEDWITH, D. M.; GARA, M.; KELLY, J. M. Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature. *Advanced Functional Materials*. v. 18, p 2005-2016, 2008.
- SAADE, J. Síntese/Fabricação e caracterização de micro e nanoestruturas para aplicação na fotônica e plasmônica. 134f. Dissertação (Doutorado), Centro De Ciências Exatas e da Natureza, **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2013.
- SANTOS, L. B. M. Incorporação de zincoporfirina e azul de metileno em gel e avaliação para uso em terapia fotodinâmica. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado), Centro de Ciências da Saúde, **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2016.
- VIANA, O. S. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados à base de quantum dots livres e associados à porfirinas para aplicação em sistemas biológicos. Tese - Doutorado, Centro de Ciências da Saúde, **Universidade Federal do Pernambuco**, Recife, 2015.
- MENEZES, P. F. C. D. Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser. Tese - Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, **Universidade de São Paulo**, São Carlos, 2006.
- NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. Princípios da terapia fotodinâmica. *Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na odontologia*, p.312, 2013a.

NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. Princípios da terapia fotodinâmica. *Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na odontologia*, p.37, 2013b.