



Desenvolvimento e caracterização de formulações contendo Eritrosina B e seus derivados ésteres em sistemas nanoestruturados visando aplicações em Terapia Fotodinâmica

Nicola Leone da Rocha (PIBIC/CNPq/UEM), Wilker Caetano (Orientador)
e-mail: nicola.rleone@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.
Grande Área: Ciências Exatas e da Terra/ Área: Química.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Eritrosina B, Micelas Poliméricas.

Resumo:

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade clínica que atua na inibição de tumores e no controle de infecções. A técnica baseia-se na combinação de um composto fotossensibilizador (FS) com radiação de comprimento de onda adequado e oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) na geração de espécies citotóxicas, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que ocasionam a morte celular. A eritrosina B (ERI) e seus derivados ésteres mais hidrofóbicos possuem elevados valores de absorvidade molar (ϵ) e rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2$), o que os tornam potenciais FS para aplicações fotodinâmicas. A incorporação destes FS em sistemas nanoestruturados pode evitar a ocorrência de processos de auto-agregação, além de carrearem o fármaco até o alvo celular. Neste estudo a ERI e seus derivados ésteres mais hidrofóbicos foram formulados nos surfactantes poliméricos do tipo tribloco P-84 e F-108 e suas propriedades físico-químicas e fotofísicas foram avaliadas. Os resultados mostraram que os FS foram devidamente encapsulados nos copolímeros, apresentando elevados valores de absorvidade molar (ϵ). Adicionalmente, os parâmetros de ligação (K_b) e localização (K_{SV}) indicam que os FS mais hidrofóbicos interagem mais fortemente e internamente nas micelas. As formulações apresentaram propriedades fotofísicas adequadas. Além disso, obteve-se elevada estabilidade térmica e cinética dos FS encapsulados em micelas com tamanhos inferiores a 50 nm. Em geral, as formulações mostraram resultados interessantes, sendo fortes candidatas para a TFD.

Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica eficiente, seletiva e pouco invasiva no tratamento de tecidos carcinogênicos e no combate aos microrganismos. A técnica baseia-se na ativação de um composto fotossensibilizador (FS) que na presença de luz de comprimento de onda





adequado pode transferir energia para o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), gerando espécies citotóxicas, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que levam à morte celular. O xanteno Eritrosina B (ERI), possui elevados valores de absorvidade molar (Batistela et al, 2011) e rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2 = 0,63$ Gandin *et al*, 1983) além de fácil obtenção e baixo custo, o que o torna um FS potencial para aplicações fotodinâmicas.

A ERI é hidrofílica em pH fisiológico devido às duas cargas negativas, o que resulta em baixa interação com membranas biológicas, importante sítio de ação fotodinâmica. Já seus derivados ésteres, eritrosina metil-éster (ERIMET), eritrosina butil-éster (ERIBUT) e eritrosina decil-éster (ERIDEC), sintetizadas por alquilação na região benzênica da molécula (Amat-Guerri *et al*, 1990), fornecem características mais lipofílicas com possível aumento da interação com as membranas biológicas, sendo fortes candidatos a FS. Apesar disso, os derivados mais hidrofóbicos apresentam baixa interação com o plasma sanguíneo (polar), ocorrendo a formação de auto-agregados do corante ou mesmo precipitados, acarretando na diminuição da geração de $\phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ (processo de auto-supressão de estados excitados). Portanto, o encapsulamento em sistemas de entrega é necessário para garantir a forma monomérica e maior eficácia no tratamento. Nesse estudo foram utilizados os copolímeros tribloco P-84 e F-108 (Pluronic®) com intuito de solubilizar e carrear os fármacos até o tecido alvo (Fendler, 1982).

Materiais e métodos

A eritrosina B foi obtida pela Sigma Aldrich e seus derivados ésteres foram sintetizados pelo grupo de pesquisas NUPESF a partir da metodologia descrita na literatura (Amat-Guerri, 1990). Os Pluronic® (Aldrich) foram utilizados sempre acima da sua concentração micelar crítica (CMC) 4% (m/V). Para a obtenção de espectros de absorção ([FS]: $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e emissão ([FS]: $5,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) foram utilizados respectivamente, o espectrofotômetro Beckman DU® 800 e espectrofluorímetro Cary Eclipse. Utilizou-se também um DLS, modelo nanoplus para monitoramento do tamanho das partículas.

Resultados e Discussão

Primeiramente determinou-se os valores de ϵ determinados dos xantenos encapsulados em P-84 e F-108. Os resultados foram elevados (superiores a $8,0 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e similares aos observados em etanol, meio no qual os xantenos apresentam-se na forma monomérica. Além disso, os resultados foram semelhantes aos citados na literatura em outros copolímeros (Freitas





et al, 2014). Posteriormente, a afinidade/interação dos FS pelas micelas foi avaliada medindo-se a constante de ligação FS/micela (K_b). Os valores obtidos estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1 – Constante de ligação (K_b) xantenos.

Copolímero	K_b (10^3)/L ⁻¹ mol			
	ERI	ERIMET	ERIBUT	ERIDEC
F-108	2,6	22,4	50,6	70,1
P-84	2,2	26,7	28,3	44,2

Nota-se na Tabela 1, que a ERI apresentou os menores valores de K_b , indicando pequena interação deste FS com as micelas de P-84 e F-108, resultado já esperado devido ao seu caráter hidrofílico. Por outro lado, os derivados ésteres apresentaram valores de K_b significativamente superiores, aumentando de acordo com a hidrofobicidade do FS. Os resultados ainda permitem afirmar que a ERI e seus ésteres interagem mais fortemente com o copolímero F-108, devido aos maiores valores de K_b . Aliado a isso, os valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) foram maiores em ambiente micelar do que em meio aquoso, novamente indicando a internalização dos xantenos nas micelas poliméricas. O parâmetro de localização (K_{sv}), também foi determinado por supressão de fluorescência usando supressor aquo-solúvel (íon iodeto), os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Constantes de supressão de Stern-Volmer dos xantenos.

FS		ERI	ERIMET	ERIBUT	ERIDEC
F-108	K_{sv1}	10,82	6,53	5,87	5,23
	K_{sv2}	2,75	0,60	0,43	0,27
P-84	K_{sv}	0,84	0,41	0,31	0,26

K_{sv} (L mol⁻¹)

Observa-se na Tabela 2 que em F-108 foram obtidas duas populações do FS, K_{sv1} (FS livre) e K_{sv2} (FS incorporado), provavelmente devido à sua maior fluidez. Em P-84, por sua vez, apenas uma população foi verificada (K_{sv}). Nota-se ainda que os compostos mais hidrofóbicos encontram-se alocados em regiões mais internas das micelas (K_{sv} menores) e a penetração do FS na micela parece ser um pouco maior em P-84. Avaliou-se também a estabilidade térmica das amostras (20°C – 50 °C). Os resultados mostraram que a diminuição da temperatura acarretou em um





leve deslocamento espectral (*blue-shift*). Apesar disso, o perfil inicial foi reobtido após subsequente aumento de temperatura (processo reversível). Adicionalmente, as análises de tamanho por espalhamento de luz dinâmico (DLS) evidenciaram micelas com tamanhos entre 25-45 nm, condizentes com o esperado.

Conclusões

Os experimentos demonstraram que os FS avaliados foram devidamente encapsulados nas micelas poliméricas, dado os elevados valores de absorvidade molar observados. Além disso, a partir dos valores de K_B e K_{SV} foi possível constatar que os compostos mais hidrofóbicos tendem a interagir mais fortemente e internamente com a estrutura micelar. Para mais, as formulações apresentaram elevada estabilidade cinética (30 dias) e térmica (20°C-50°C), resultando bastante importante quando se pensa em armazenamento. Em geral, as formulações avaliadas mostraram que Eritrosina B e seus derivados ésteres apresentam características favoráveis para aplicações em TFD.

Agradecimentos

CNPq (PIBIC-UEM), Fundação Araucária/SETI, CAPES.

Referências

- Amat-Guerri, F.; López-Gonzalez, M. M. C.; Martínez-Utrilla, R.; Sastre, R.; Spectrophotometric determination of ionization and isomerization constants of Rose -Bengal, eosin Y and some derivatives. *Dyes and pig.*, **1990**, 12, 249.
- Batistela V. R.; Pellosi D. S.; Souza F. D.; Costa W. F.; Santin, S. M. O.; Souza V. R.; Caetano, W.; Oliveira, H. P. M.; Scarminio, I. S. S.; Hioka, N. pK_a determination of xanthenes derivatives in aqueous solution by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data. *Spectrochim Acta A.*, **2011**, 79, 897.
- Gandin, E.; Lion, Y.; Van de Vorst, A.; Quantum yield of singlet oxygen production by xanthenes derivatives. *Photochem. Photobiol.*, **1983**, 37(3), 1271.
- Freitas, C. F.; Estudos físico-químicos da Eritrosina B, Eosina Y e derivados ésteres formulados em micelas poliméricas do tipo Plurônicos: aspectos fotofísicos e fotodinâmicos. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, **2014**.

