

NANOPARTÍCULAS DE OURO COMBINADAS COM AZUL DE METILENO ESTABILIZADAS EM P-123 ALMEJANDO APLICAÇÕES EM TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTERMIA

Thais Lazzarotto Braga (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Camila Fabiano de Freitas (Co-orientadora), Wilker Caetano (Orientador), e-mail: thais.lazzarotto.braga@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas /Maringá, PR.

Ciências exatas e da terra – Química

Palavras-chave: Terapia Combinada Anticâncer, Nanopartículas, Corante.

Resumo:

A elevada incidência do câncer associada à sua resistência aos tratamentos convencionais vem sendo um dos principais problemas da saúde pública mundial. Para contornar esse cenário, destacam-se terapias alternativas como a Terapia Combinada Anticâncer, na qual duas ou mais modalidades são empregadas em conjunto. Assim, no presente estudo a Terapia Fotodinâmica (TFD) empregando-se o fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) e a Terapia Fototérmica (TFT), utilizando-se nanopartículas de ouro (AuNPs) como agente fototérmico, foram combinadas. Além disso, para melhorar a estabilidade e o tempo de circulação *in vivo* desses fármacos, tanto o AM como as AuNPs foram sintetizadas e incorporadas em copolímeros tribloco ABA, especificamente o Plurônico® P-123. As amostras foram caracterizadas por absorção eletrônica, emissão de fluorescência e espalhamento de luz dinâmico (DLS). Avaliou-se também a estabilidade das AuNPs e a localização do AM nas micelas por supressão de fluorescência via gráficos de Stern-Volmer. Também foram realizadas análises estruturais por microscopia eletrônica de transmissão, e determinação indireta do rendimento quântico de oxigênio singleto ($\phi\Delta^1\text{O}_2$), bem como ensaios de fototermia empregando-se à técnica de espectroscopia de lente fototérmica. De modo geral, os resultados mostraram que os sistemas P-123/AuNPs/AM foram eficientemente obtidos, sendo promissores candidatos a medicamentos para a Terapia Combinada Anticâncer.

Introdução

A TFD envolve a ativação de um FS com luz de comprimento de onda adequado e oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), na geração de espécies citotóxicas como o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (WAINWRIGHT, 1998). A Fototermia, por outro lado, envolve a fotoativação de um fármaco levando à morte celular

por aquecimento. No presente estudo, foram empregados o AM e as AuNPs, como fármaco FS e agente fototérmico, respectivamente. Além disso, o copolímero tribloco P-123, composto por dois blocos externos hidrofílicos de poli(óxido de etileno) e por um bloco interno hidrofóbico de poli(óxido de propileno), foi empregado como nanorreator/nanocarreador para os fármacos fotoativos citados. Isso se deve à sua biocompatibilidade e capacidade de se automontar em estruturas *micelares* acima de sua concentração e temperatura micelar crítica (ALEXANDRIDIS; HOLZWARTH; HATTON, 1994).

Materiais e métodos

A síntese das AuNPs foi realizada na presença de diferentes concentrações (entre 0,25% e 8,00% m/V) do copolímero P-123. As amostras foram obtidas pelo método de dispersão sólida. Assim, tanto o P-123 como o AuCl_3 (1×10^{-4} mol. L^{-1}) foram cossolubilizados em etanol, seguido pela rota-evaporação. O conjunto foi deixado no dessecador por 24 horas, e, por fim, hidratados com água ultrapura em banho de homogeneização a 60 °C por 4 horas. O AM ($1,25 \times 10^{-5}$ mol. L^{-1}) foi incorporado por duas diferentes metodologias. No método I, o AM foi adicionado durante a reidratação da matriz sólida (incorporação passiva). No Método II, o AM participou da etapa de formação do filme fino, sendo cossolubilizado com o P-123 e AuCl_3 na etapa inicial (incorporação ativa). Após atingirem a temperatura ambiente, as amostras foram caracterizadas por absorção eletrônica (200 – 800 nm) em UV-Vis Cary-60 com banho de circulação de água para o controle de temperatura, por emissão de fluorescência em um fluorímetro Varian Cary Eclipse com controle eletrônico de temperatura.

O diâmetro hidrodinâmico (DH), o índice de polidispersidade (PI) e o potencial de superfície (Zeta, ζ) P-123/AuNPs/AM a 25,0 °C foram determinados em um NanoPlus Particle Size Analyzer (Particulate Systems Ltd). A estabilidade das formulações foi monitorada pelas técnicas de espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis e DLS. Os formulados foram armazenados e protegidos da luz para evitar possíveis reações de fotobranqueamento do AM.

Para a determinação da absortividade molar das espécies, uma alíquota de cada formulação foi sistematicamente diluída, registrando-se os espectros de absorção a 25,0 °C. O valor da absortividade molar foi obtido pela lei de Lambert-Beer. A morfologia das micelas e AuNPs foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão utilizando-se uma grade de cobre (300 mesh) com filme de carbono como porta amostra.

A supressão de fluorescência do AM incorporado nas micelas copoliméricas foi estudada utilizando-se o íon iodeto como agente supressor aquo-solúvel (iodeto de sódio). A constante de Stern-Volmer (K_{SV}) foi calculada pela

$$\text{equação: } \frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[I^-]$$

na qual F_0 e F : são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, e $[I^-]$: é a concentração de iodeto (1 mol. L^{-1}). Os valores de $\phi_{\Delta^1\text{O}_2}$ foram determinados pelo método relativo e indireto avaliando-se a degradação da sonda ácido 9,10-antracenediilbis (metileno) dimalonico (ABDA) com LED ($\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$ e $32,8 \text{ mWcm}^{-2}$). As reações de foto-oxidação foram realizadas em uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 1 cm) contendo ABDA (3,0 mL, 50 mM) e as amostras acima sintetizadas. Os valores de $\phi_{\Delta^1\text{O}_2}$ foram calculados conforme a metodologia descrita na literatura (GEROLA *et al.* 2012). Por fim, utilizou-se a técnica de espectroscopia de lente térmica em parceria com o Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá. Os lasers de excitação e de prova foram selecionados de acordo com a necessidade das amostras e foram utilizados com emissão no regime contínuo. Os dados foram modelados para a descrição dos processos Fototérmicos.

Resultados e Discussão

Os espectros de absorção eletrônica das AuNPs em diferentes concentrações do copolímero P-123 resultaram em uma banda de absorção eletrônica com comprimento de onda máximo (λ_{max}) em 546 nm, característica de nanopartículas de ouro esféricas com tamanho entre 10 e 20 nm. As análises de DH das nanoestruturas de P-123/AuNPs resultou em duas diferentes populações (10 nm e 40 nm) atribuídas às AuNPs e micelas poliméricas, respectivamente. Após eficiente formação das AuNPs em P-123, avaliou-se a incorporação do AM, conforme Figura 1.

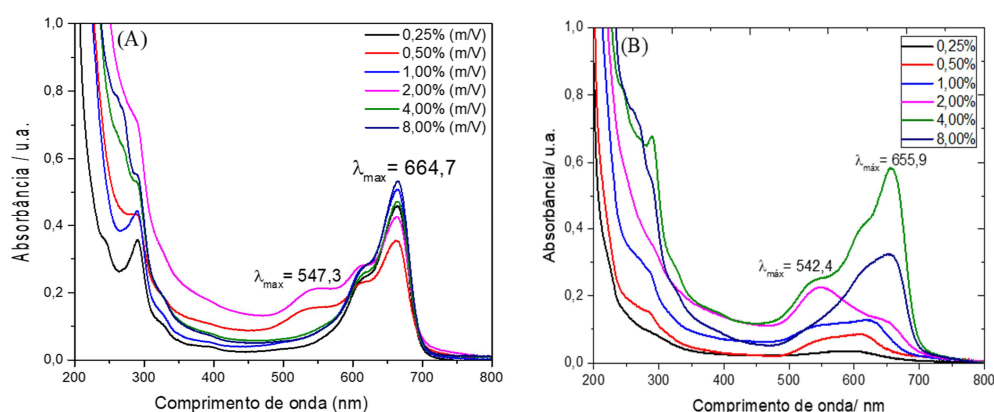


Figura 1. Espectros de absorção eletrônica dos sistemas nanoestruturados P-123/AuNPs/AM para Método I (A) e II (B).

Notou-se o surgimento de uma banda de absorção eletrônica com λ_{max} na região de 665 nm, característico do AM. Contudo, pelo Método II observou-se a alteração da banda de absorção atribuída à formação da espécie leuco do AM (incolor). As análises de DLS mostraram a existência de uma única população, contudo mais alargada. Além disso, verificou-se que, em geral, DH aumenta com a %P-123 empregada. Os estudos de estabilidade

mostraram que as amostras contendo 0,50%, 1,00% e 2,00% mostraram melhores perfis em ambos os Métodos. Apesar disso, as amostras obtidas pelo método I apresentaram absorvidades molares condizentes com a literatura ($\epsilon \sim 38 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Contudo, pelo Método II, a prevalência da espécie leuco levou a menores valores de ϵ nas menores concentrações do copolímero. A análise das micrografias de transmissão mostrou que na presença do AM são obtidas AuNPs com diâmetros da ordem de 2,6 nm. Essa faixa de tamanhos é bastante interessante e tem sido almejada em vários estudos envolvendo não apenas a fototermia, mas também a inibição direta de linhagens cancerígenas.

Os estudos de localização via Stern-Volmer, utilizando o íon iodeto como supressor aquo-solúvel, mostraram que o AM se localiza na corona e no core das micelas preparadas pelos Métodos I e II, respectivamente. O $\phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ do AM (0,56) foi mantido quando nanoeancapsulado em P-123 juntamente com as AuNPs. Ademais, a presença do AM não influenciou na quantidade de calor gerado pelas AuNPs, sendo a estratégia potencial para a Terapia Combinada Anticâncer.

Conclusões

Os resultados apresentados mostraram a eficiente formação de P-123/AuNPs/AM pelo método de dispersão sólida, principalmente pelo Método de adição passiva do AM. Vale destacar que as AuNPs foram reduzidas e estabilizadas pelo P-123, eliminando-se a utilização dos convencionais agentes redutores tóxicos e inviáveis para aplicações biológicas. As amostras apresentaram estrutura nanométrica, perfis espectrais definidos e capazes de serem fotoativados por radiação no espectro visível, além de potenciais propriedades fotofísicas. Sendo assim, o presente estudo mostrou-se promissor para futuras aplicações na Terapia Combinada Anticâncer mediada pela TFD e TFT.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá, ao CNPQ, à Fundação Araucária, à coorientadora Camila e ao orientador Wilker Caetano.

Referências

- ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J. F.; HATTON, T. A. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. **Macromolecules**, Berlin-Dahlem, v. 27, p. 2414–2425, 1994.
- GEROLA, A. P. *et al.* Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: New calculation methodology considering the influence of photobleaching. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Maringá, v. 232, p. 14–21, 2012.
- WAINWRIGHT, M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v. 42, p. 13–28, 1998