

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EM NANOPLATAFORMAS À BASE DE COPOLÍMEROS COLOIDAIS VISANDO APLICAÇÕES FOTOQUIMIOTERAPÊUTICAS E FOTOTÉRMICA.

Carlos Eduardo da Silva Cardoso (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Thais Lazzarotto Braga (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Camila Fabiano de Freitas, (Coorientadora), Wilker Caetano (Orientador), e-mail: ra112296@uem.br.
Universidade Estadual de Maringá / Centro de ciências exatas e da Terra/Maringá, PR.

Química / Físico-Química

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro, nanopartículas poliméricas, Câncer, fotoquimioterapia..

Resumo:

No presente estudo avaliou-se a combinação das Terapias Fotodinâmica e Fototérmica, almejando o tratamento de neoplasias malignas. Para isso, foram sintetizadas nanopartículas de ouro (AuNPs) combinadas com Azul de Metileno (AM) e estabilizadas em diferentes concentrações dos copolímeros triblocos P-84 e F-127. As amostras obtidas foram caracterizadas por espectrofotometria de absorção eletrônica, emissão de fluorescência, espalhamento de luz dinâmico, estudos de supressão de fluorescência, avaliação da geração de oxigênio singleto, análise fototérmica, estabilidade mediante o aquecimento e microscopia eletrônica de transmissão. Em geral, os resultados reportam a eficiente formação das amostras e o seu potencial para futuras aplicações na Terapia Combinada do Câncer. Vale destacar que a incorporação passiva do AM (síntese 1), apresentou os melhores resultados em todas as análises, sendo, portanto, a metodologia de preparo mais promissora.

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um procedimento clínico minimamente invasivo que atua seletivamente na destruição de tumores malignos (Oniszczyk et al., 2016). A técnica envolve a ativação de um composto fotossensibilizador (FS) por luz de comprimento de onda adequado na presença de oxigênio molecular (O_2) atuando na geração de espécies citotóxicas como o oxigênio singleto (1O_2) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) (Castano et al., 2004). Esses agentes citotóxicos são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas. Então, as regiões ricas em elétrons, presentes nas células lesadas são diretamente atacadas. Dentre os mecanismos de morte celular, a apoptose é a principal modalidade de induzida pela TFD (Castano et al., 2004). Dentre os fármacos fotossensibilizadores (FS) empregados na TFD, destaca-se o azul de metileno (AM). De um modo geral, a eficácia do AM está relacionada à sua

forte absorção de luz na região do vermelho, disponibilidade comercial, capacidade comprovada de gerar oxigênio singlete, entre outras.

Por outro lado, a Terapia fototérmica (TFT) é um procedimento terapêutico que envolve o aquecimento de uma região no corpo (entre 40 e 44°C) afetada pelo câncer ou por outras doenças. Portanto, podemos dizer que a Fototermia é um processo que envolve a conversão da energia luminosa em calor com o intuito de destruir tumores malignos ou regiões acometidas por processos infecciosos. A morte por hipertermia pode ser desencadeada por vários mecanismos, como degradação da membrana celular e desnaturação protéica. A energia de excitação eletrônica absorvida pelos fármacos Fototérmicos relaxa através do decaimento não radioativo, levando ao superaquecimento do ambiente local. É esse aumento de temperatura o responsável pela destruição de células ou tecidos locais. Portanto, a escolha de agentes fototérmicos exógenos é realizado com base na sua absorção de luz e conversão em calor. Sendo assim, para a realização do presente estudo optou-se por trabalhar com as nanopartículas de ouro (AuNPs) dadas as suas características favoráveis à TFT. Além disso, concluímos que a combinação entre as excelentes propriedades fototérmicas das AuNPs com as propriedades fotodinâmicas do AM podem ser aproveitadas sinergicamente na Terapia Combinada do Câncer.

Por fim, almejando o carreamento e entrega simultânea do AM e das AuNPs optou-se por trabalhar com sistemas copoliméricos. Dentre os inúmeros polímeros empregados na nanomedicina, copolímeros anfífilicos em bloco têm atraído muita atenção devido a seu baixo custo, fácil funcionalização e versatilidade para formar vários tipos de nanopartículas automontadas (Adams et al., 2003). Dentre os copolímeros existentes, destacam-se os copolímeros tribloco do tipo ABA comercialmente conhecidos por Pluronic®. A vantagem da utilização destes copolímeros está relacionada à elevada estabilidade *in vitro* e *in vivo*, elevada solubilidade em água e capacidade de se automontar em nanoestruturas micelares. Por isso, optou-se pela utilização dos copolímeros P-84 e F-127 na estabilização e carreamento AuNPs associadas ao AM. Assim, micelas copoliméricas constituem uma promissora alternativa no tratamento de neoplasias malignas, eficiente nas cavidades superficiais e nucleação ininterrupta sem transições estruturais.

Materiais e métodos

A síntese das AuNPs foi realizada na presença de diferentes concentrações (1,00 e 2,00% m/V) dos copolímeros F-127 ou P-84. As amostras foram obtidas pelo método de dispersão sólida. Para isso, tanto os copolímeros 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. Na síntese 1, o AM foi adicionado durante a reidratação da matriz sólida (incorporação passiva). Na síntese 2, o AM participou da etapa de formação do filme fino, sendo

cosolubilizado com o F-127 ou P-84 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) copolímero/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.

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 foi utilizada 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). Os ensaios permitiram estimar a localização do AM na nanoestrutura micelar.

A geração de oxigênio singleto foi avaliada a partir da degradação do ácido 9,10-antracenediilbis-(metileno)-dimalônico (ABDA) com LED ($\lambda_{\text{max}}=660$ nm e $32,8$ 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. Fez-se também um estudo Fototérmico para avaliar a atividade das amostras na TFT, utilizando-se um sistema de LEDs, vermelho (660 nm) e verde (535 nm), produzidos pelo Departamento de Física da UEM, as amostras foram aquecidas e a variação da temperatura foi obtida.

Resultados e Discussão

Primeiramente, sintetizaram-se as nanopartículas de ouro em diferentes porcentagens dos copolímeros e mediu-se o espectro de absorção eletrônica das diferentes amostras. Os melhores resultados foram obtidos nas porcentagens 2,00% de ambos os polímeros. Vale ressaltar que as nanopartículas foram sintetizadas na ausência de agentes redutores tóxicos. Fez-se, em seguida, a incorporação do AM pelos dois métodos propostos, passivo e ativo, e, a partir dos espectros de absorção eletrônica, verificou-se que a síntese 1 seria melhor rota para as etapas seguintes.

Os resultados obtidos por DLS mostraram que para o copolímero P-84 houve uma diminuição do DH com o aumento da concentração de 1,00 para a 2,00%. Para o copolímero F-127, observou-se um grande aumento do DH pela síntese 1, porém, para a síntese 2 o aumento foi mais discreto. Em ambas não houve um grande aumento do índice de polidispersão e, com exceção da porcentagem 1,00% (m/V) da síntese 1, o potencial zeta manteve-se negativo. As microscopias mostraram a existência de micelas esféricas (~30 nm), contendo AuNPs (1-3 nm) em toda a sua extensão,

estando o processo de formação das AuNPs associados à oxidação dos oxigênios presentes nos ésteres copoliméricos. Contudo, dentre os diferentes copolímeros analisados, nota-se que o F-127 apresentou os melhores parâmetros. A técnica de supressão de fluorescência utilizando íon iodeto como agente supressor, permitiu estimar de maneira razoável a localização do FS no sistema coloidal (Lakowicz, 2006). De acordo com os resultados obtidos, o AM encontra-se em todos os casos alocado na região mais externa das micelas, estando de acordo com o seu caráter hidrofílico.

A avaliação da geração de oxigênio a partir das constantes de velocidade de fotodegradação do ABDA mostraram que independente do copolímero empregado, observou-se uma rápida cinética da degradação do ABDA, indicando a formação de oxigênio singleto (Yu, Y, 2016). No entanto, para as maiores concentrações (2,00 %) de ambos copolímeros, as constantes de velocidade praticamente o dobraram. Isso, pode ser explicado em termos do maior rendimento na obtenção de AuNPs capazes de transferir energia para o AM. As amostras também foram avaliadas quanto à geração de calor fotoinduzida. Os resultados obtidos mostraram uma variação entre 8 e 11°C para todas as amostras contendo AuNPs. Trata-se de um resultado promissor, visto que no corpo humano, essa variação alcançaria uma temperatura local de 46°C, suficiente para a destruição dos tecidos doentes. Por fim, os estudos de fotoestabilidade mostraram uma pequena redução na banda de absorção do AM, dada a sua fotodegradação. Porém, a redução não seria suficiente para impactar a eficácia da terapia.

Conclusões

Obtiveram-se resultados promissores para os sistemas nanoestruturados combinados constituídos por diferentes concentrações dos copolímeros F-127 e P-84, e nanopartículas de ouro com fármacos fotoativos, para o tratamento multimodal antitumoral.

Agradecimentos

Agradeço o CNPq, UEM, a Fundação Araucária, e aos professores que me orientaram nesse projeto.

Referências

Khullar P., et al. (2010) **How PEO-PPO-PEO Triblock Polymer Micelles Control the Synthesis of Gold Nanoparticles: Temperature and Hydrophobic Effects.** Langmuir. doi: 10.1021/la100734p

Lakowicz, J. R. (2006). **Principles of Fluorescence Spectroscopy** (3rd ed.)

Oniszczyk, A., et al. (2016). **ScienceDirect The potential of photodynamic therapy (PDT) — Experimental investigations and clinical use.** Biomedicine & Pharmacotherapy, 83, 912–929.

Yu, Y., et al. **Bovine Serum Albumin Protein-Templated Silver Nanocluster (BSA-Ag13): An Effective Singlet Oxygen Generator for Photodynamic Cancer Therapy.** *Adv. Healthc. Mater.* 2016, 5 (19), 2528–2535.