

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COMBINADAS COM CURCUMINA PARA APLICAÇÕES EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Vinicius de Jesus Perrut (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Wilker Caetano (Orientador), Camila Fabiano de Freitas (Co-orientadora), Thais Lazzarotto Braga (Co-orientadora), e-mail: wcaetano@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / CCE/DQI-UEM

Química - Físico-Química.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Nanopartículas de Prata, curcumina.

Resumo:

O presente trabalho traz a Terapia Fotodinâmica (TFD) como alternativa ao tratamento de neoplasias malignas. Nesse estudo, a curcumina (CUR) foi utilizada como fotossensibilizador associada às nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas na presença do copolímero F-127. Os sistemas nanoestruturados de F-127/AgNPs/CUR foram obtidos empregando-se a metodologia de dispersão sólida associada à incorporação ativa e passiva da CUR. As amostras foram caracterizadas por espectroscopia de absorção eletrônica e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Em geral, as amostras obtidas por incorporação passiva foram mais eficientes no processo de solubilização da CUR em sua forma monomérica. Em geral, as amostras apresentaram manutenção das propriedades fotofísicas da CUR e AgNPs mediante a incorporação nas nanopartículas poliméricas, apresentando bandas de absorção e diâmetro hidrodinâmico coerentes com dados da literatura. Além disso, os estudos de supressão de fluorescência permitiram avaliar a localização da CUR nas micelas na região mais hidrofóbica.

Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) envolve a ativação de um fotossensibilizador (FS) por luz de comprimento de onda adequado na presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) (Alexandridis, 1995). A interação dessas três espécies acarreta na geração de espécies citotóxicas, como o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Ao incidir a luz o FS é levado para seu estado singleto excitado, podendo sofrer cruzamento intersistemas atingindo o estado excitado tripleto. A partir desse estado o FS pode transferir sua energia para as moléculas de $^3\text{O}_2$, gerando espécies reativas e dando origem aos efeitos fotodinâmicos. É necessário a escolha adequada do FS, tal como a curcumina (CUR), considerando os benefícios já descritos na literatura (de Freitas, C. F., 2020). Outro fator importante para a eficácia da TFD é a geração de $^1\text{O}_2$. Contudo, a CUR apresenta valores baixos de formação de $^1\text{O}_2$ (DeRosa, M. C., 2002). Para contornar esse fato, é feita a combinação de FS com nanopartículas metálicas, que apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas únicas,

especialmente as de prata (AgNPs) que apresentam ação contra uma ampla faixa de microrganismos e possui comprovado aumento na geração de $^1\text{O}_2$ da CUR (de Freitas, C. F., 2020), fenômeno denominado de efeito MEO (*Metal Enhanced singlet Oxygen generation*).

Para sintetizar as AgNPs e estabilizar o sistema AgNPs/CUR, podem ser empregados polímeros que apresentem baixo custo, biocompatibilidade, fácil funcionalização e versatilidade para o desenvolvimento de plataformas nanoestruturadas “*drug-delivery*”. Nesse sentido, destaca-se o copolímero F-127 (EO)₁₀₀(PO)₇₀(EO)₁₀₀, capaz de atuar como agente redutor na obtenção das AgNPs, além de atuar também como sistema micelar de carregamento para a CUR e AgNPs (Alexandridis, 1995). Nesse contexto, a utilização do copolímero F-127 na estabilização e carregamento de AgNPs associadas à CUR oferece uma importante e promissora alternativa no tratamento de neoplasias malignas.

Materiais e Métodos

Materiais

A CUR (MM=368,38 g/mol) foi adquirida na Merck e a solução estoque (1×10^{-3} mol/L) foi preparada em etanol (Merck). O nitrato de prata (MM= 169,87 g/mol) foi adquirido da Sigma Aldrich e seu estoque (6×10^{-3} mol/L) foi preparado em água ultrapura. O Pluronic[®] F-127 (MM= 12600 g/mol) foi adquirido da Sigma Aldrich.

Métodos

Síntese das AgNPs combinadas com CUR estabilizadas em micelas de F-127

A síntese das nanopartículas metálicas foi realizada na presença do copolímero F-127. O processo de formação das AgNPs pelo F-127 foi realizado utilizando-se diferentes porcentagens (0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 e 8,00% m/V) de F-127 seguindo a metodologia de dispersão sólida (Huang, Y., 2013). A CUR foi adicionada às combinações F-127/AgNPs pelo método de incorporação passivo e ativo.

a) Método de incorporação passiva de CUR

Após a pesagem da massa correspondente do copolímero F-127, a mesma foi solubilizada em etanol. Em seguida, a solução foi transferida para um balão de síntese de fundo redondo, onde foram adicionados 420,0 μL de sal de prata (AgNO_3 - $6,0 \times 10^{-3}$ mol/L) e então a amostra foi colocada em um rotaevaporador para a remoção do solvente, formando um filme fino. Ao término da rotaevaporação, o balão foi protegido da luz com papel alumínio e colocado em um dessecador sob vácuo *overnight*. Depois desse período, foram adicionados 25,0 mL de água ultrapura e 420,0 μL de CUR ($6,0 \times 10^{-3}$ mol/L). O balão foi colocado sob agitação em um banho Dubnoff de homogeneização a 60 °C por 8 horas. Após atingir a temperatura ambiente, as amostras obtidas foram imediatamente caracterizadas por absorção eletrônica, emissão de fluorescência e espalhamento de luz dinâmica (DLS).

b) Método de incorporação ativa de CUR

A única diferença existente entre a incorporação passiva e ativa relaciona-se à adição da CUR. No último método, a CUR é adicionada em conjunto com o AgNO_3 na etapa de obtenção do filme fino.

Espectroscopia de Absorção eletrônica

As F127/AgNPs/CUR foram avaliadas pela técnica de absorção eletrônica na região do visível e ultravioleta (200 - 800 nm) com um espectrofotômetro de absorção UV-Vis Cary-60.

Análise do tamanho e potencial Zeta das nanopartículas

O diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (PI) e potencial de superfície (Zeta, ζ) dos sistemas de F-127/AgNPs/CUR foram determinados por meio do espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um equipamento NanoPlus Particle Size Analyzer (Particulate Systems Ltd).

Estudos de supressão de fluorescência: ajuste de Stern-Volmer

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Cary-Eclipse com sistema Peltier para controle eletrônico de temperatura.

Estudos de estabilidade das formulações

A estabilidade das formulações foi monitorada pelas técnicas de espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis e DLS, em um período de 30 dias.

Resultados e Discussão

Caracterização das AgNPs/F-127

As análises preliminares mostraram que as amostras obtidas na presença de 1,00; 2,00 e 4,00% (m/V) de F-127 apresentaram a banda plasmônica associada à formação das AgNPs. Dessa forma, essas as amostras foram também caracterizadas por DLS. Observa-se diferenças na intensidade de absorção pautadas na quantidade de copolímero utilizada, e pelo DLS observa-se que com o aumento da concentração, houve uma diminuição do diâmetro hidrodinâmico. Assim, de acordo com os espectros obtidos e os resultados do DLS, pode-se afirmar que o sistema F-127/AgNPs foi devidamente obtido em todas as concentrações de F-127, destacando-se que as AgNPs foram obtidas na ausência de agentes redutores convencionais que podem ser tóxicos para aplicações (Kavirayani, 2014).

Incorporação e caracterização da CUR nas F-127/AgNPs

Após a obtenção das AgNPs realizou-se a incorporação da CUR pelos métodos passivo e ativo. Os resultados obtidos, mostram que, a adição de CUR levou ao aumento da banda de absorção sobreposta à banda das AgNPs, fato crucial para a obtenção dos efeitos sinérgicos na geração de $^1\text{O}_2$ (de Freitas, C. F., 2020). Somado a isso, com o aumento da concentração de CUR a intensidade de emissão vai aumentando até um certo ponto de saturação suportado pela micela. Além disso, os espectros de absorção eletrônica para as amostras nas quais a CUR foi incorporada pelo método ativo, observou-se um alargamento da banda de absorção, indicando a atuação da CUR como agente redutor para a Ag^+ . Por outro

lado, a ausência da CUR durante a formação da AgNPs (incorporação passiva) permite que apenas os sítios redutores do F-127 estejam atuando na redução da Ag^+ , de modo que o espectro de absorção da CUR seja inalterado.

Estudo de Supressão de Fluorescência

Com o intuito de compreender a localização das espécies na micela, estudos de supressão de fluorescência utilizando o íon iodeto, supressor aquo-solúvel, foram realizados. Foi possível concluir que praticamente não houve redução na intensidade de emissão. O ajuste de Stern-Volmer, confirmou a ausência de supressão, logo, foi possível determinar que a CUR está incorporada na nanoestrutura micelar e encontra-se alocada em seu core hidrofóbico (PPO), onde não havia o inibidor de fluorescência.

Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade foi feito por meio dos espectros de absorção eletrônica, durante 30 dias, para as amostras obtidas pelo método de incorporação passiva e ativa da CUR. De modo geral, notou-se pelos espectros de absorção uma redução na intensidade após o décimo dia subsequente à síntese, tanto para a CUR como para as AgNPs. Porém, é possível observar que maiores concentrações de copolímero corroboram para a manutenção de sua estrutura micelar.

Conclusões

O presente estudo reporta a obtenção de sistemas micelares nanoestruturados constituídos por diferentes concentrações de F-127. As amostras de F-127/AgNPs/CUR foram sintetizadas pela metodologia de dispersão sólida, onde foram testados dois métodos de incorporação da CUR. Assim, pode-se afirmar que a incorporação passiva da CUR apresentou os melhores resultados em todas as análises, mostrando-se promissora para a continuação dos estudos em um próximo projeto. Com isso, os resultados obtidos reportam a eficiente formação das F-127/AgNPs/CUR e o seu potencial para futuras aplicações em tratamento de neoplasias malignas.

Agradecimentos: CNPq/PIBIC-UEM; Fundação Araucária, SETI-UGF.

Referências

- [1] Alexandridis, P.; Hatton, T. A. **Colloids Surfaces A Physicochem.** (1995) p.7757.
- [2] de Freitas, C. F.; Kimura, E.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. **Effect. Mater. Sci. Eng. C**, 112 (2020), p110853.
- [3] DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. **Coordination Chemistry Reviews.** (2002) p.351–371.
- [4] Huang, Y.; Dai, W. **Acta Pharm. Sin. B.** (2013) p 2013, 1–8.
- [5] Kavirayani Indira Priyadarsini. **Molecules.** 19 (2014) p20091–20112.