

ESTUDO DA ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA APLICADA À TERAPIA FOTODINÂMICA.

Henry Melcher Aquino (PIBIC/CNPq/UEM), Isabella Martins (PIBIC/CNPq/UEM),
Luis Carlos Malacarne (Orientador). E-mail: lomalacarne@uem.br.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Exatas e da Terra, Física /Física da Matéria Condensada.

Palavras-chave: Permeação; UV-VIS; Fotossensibilizador.

RESUMO

A espectroscopia fotoacústica (PAS) possui diversas aplicações para o estudo de características físico-químicas de diferentes tipos de materiais. Neste projeto, sua eficiência em determinar a permeação de substâncias em materiais biológicos se mostrou o fator chave para sua utilização. Tal capacidade se mostrou útil para a determinação da difusividade do corante Azul de Metileno (AM) em tecido biológico. Aplicando cerca de 1 mM de AM em pele de orelhas de suínos foi possível constatar a difusão da substância após 15 minutos, se tornando mais intensa após 30 minutos. Todavia após 60 minutos sua concentração diminuiu, indicando a presença de outros fenômenos não identificados. A continuidade de estudos referentes à difusão de AM em função do tempo é necessária para o entendimento destes fenômenos.

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento que utiliza uma substância fotossensível à luz para destruir células anormais ou micro-organismos [Robertson et al., 2009]. Um medicamento fotossensibilizador é aplicado na área afetada, e depois, essa área é exposta à luz em um comprimento de onda específico, ativando o medicamento e causando a destruição das células indesejadas ou inativação dos micro-organismos. O Azul de Metileno (AM) é um corante que, devido às suas características fotossensibilizadoras, tem uma boa eficiência na TFD, apresentando pouca toxicidade em humanos (Lepore, 2022). Dessa forma, vem se tornando um corante muito explorado em tratamentos clínicos como na inativação de micro-organismos nocivos. Porém devido a seu uso tópico, se faz necessário obter informações sobre sua permeação em tecido biológico.

Uma vez que a Espectroscopia Fotoacústica (PAS) tem se mostrado uma técnica muito efetiva na determinação da difusão de substâncias em tecidos de natureza biológica, ela foi a técnica escolhida para este estudo (Sehn, 2006). A PAS é usada para medir a radiação absorvida por uma amostra analisando a variação de

pressão no meio (gasoso) interno à câmara fotoacústica devido à difusão de calor pela amostra. Pelas características da técnica, pode-se correlacionar os processos de absorção com a estrutura química e a funcionalidade da amostra analisada (Souza 2019). Assim, foi-se utilizada a PAS para avaliar a permeação de AM em pele de orelha de suíno.

MATERIAIS E MÉTODOS

A montagem do equipamento espectroscópico, consiste em uma lâmpada de Xenônio de 1000 W de potência máxima, um monocromador, um trocador de filtros automático, um *Chopper* de 2 pás com capacidade para selecionar frequências até 200 Hz, uma célula fotoacústica no modelo de RG e, por fim, um amplificador *Lock-in 7265 DSP Amplifier* responsável por ler os dados obtidos da fase e do sinal captados por um microfone (veja figura 1).

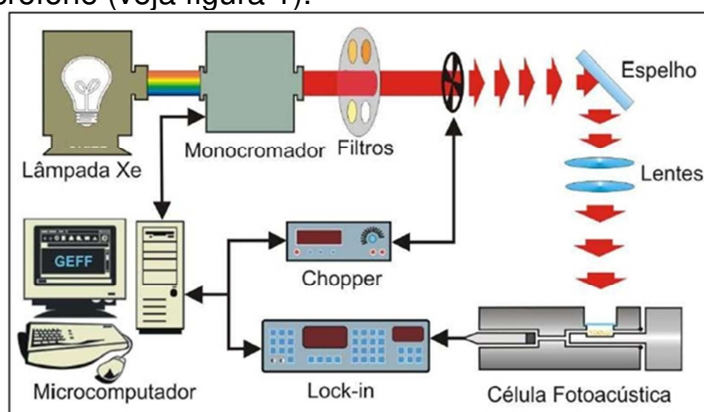


Figura 1: Representação da montagem da Espectroscopia Fotoacústica para a região UV-Vis (Souza, 2019).

Para o AM, foi escolhida a concentração de 1 mM em água Milli-Q. De acordo com a literatura (Lepore, 2022), as concentrações de AM podem variar de 10 μ M a 2 mM para tratamentos clínicos, *in vitro* e *in vivo*. Para melhor entender o seu comportamento quando em interação com o tecido biológico *in vivo*, utiliza-se estruturas semelhantes ao que será utilizado na aplicação clínica (Bergmann et al., 1963).

As peles de orelha de suíno, escolhidas devido à sua semelhança com a pele humana, foram obtidas por meio de doação o abatedouro da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá. Estas foram dissecadas e seccionadas em amostras com aproximadamente 6 mm de diâmetro, com espessuras variando de 800 a 900 μ m.

Para análise de permeação do AM foi simulado o processo de aplicação tópica. Assim, aplicou-se a solução de AM na epiderme, e então realizada a medida para os intervalos de 15, 30, e 60 minutos, além da amostra controle (sem a aplicação de AM), iluminando a superfície da derme. A frequência de modulação da

luz foi ajustada em 13 Hz e a potência da lâmpada em 800 W. A irradiação foi feita na faixa do UV-Vis de 300 a 800 nm. As medidas foram feitas em triplicatas para cada intervalo de tempo, a partir dos espectros obtidos foi realizado uma média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao observar os espectros obtidos na figura 2 é possível notar uma banda por volta dos 400 nm devido à possível presença de hemoglobina residual no tecido. Já para o intervalo de 15 minutos há a presença de uma banda larga de 500 a 700 nm, a qual pode ser atribuída ao AM, visto que de acordo com a literatura suas bandas de absorção estão em torno de 592 e 664 nm (Bergmann et al., 1963). Para o intervalo de 30 min da aplicação apresenta as mesmas bandas, no entanto, com uma maior intensidade devido à possível maior concentração do corante, enquanto para o espectro da derme após 60 não apresenta a correspondente banda do AM, demonstrando algum processo adicional, como uma possível fotodegradação ou formação da configuração leuco, uma forma reduzida e incolor do AM. Esta configuração se forma quando o AM reage com um agente redutor, como a glicose, e perde sua cor azul característica, tornando-se transparente ou branco.

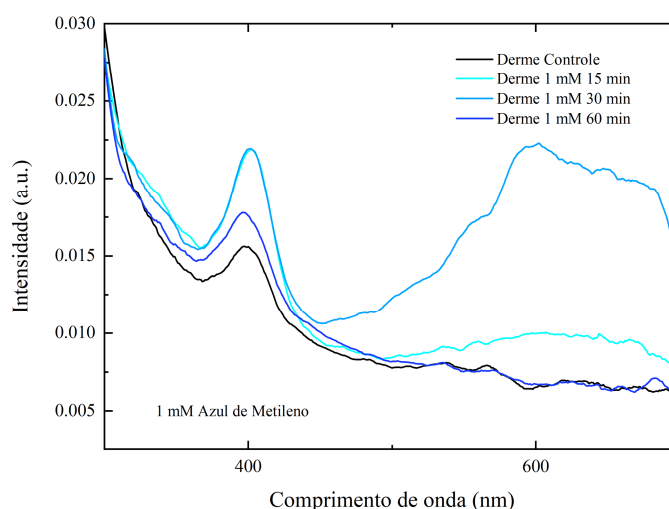


Figura 2 – Espectros de absorção óptica da derme antes e após a aplicação da solução de AM na epiderme, em diferentes intervalos de tempo de permeação.

CONCLUSÕES

Por meio da análise feita da aplicação do fotossensibilizador foi possível constatar que, após 15 minutos da aplicação já pode-se observar a permeação do AM, com 30 minutos tem-se uma permeação mais intensa e com 60 minutos observa-se uma presença muito inferior de AM em comparação aos intervalos

anteriores, o que indica a ocorrência de outros fenômenos não identificados pela técnica. Dessa forma, fica evidente que o intervalo entre a aplicação do corante e início da aplicação da luz pode ser significativo na eficiência da TFD. Entretanto mais estudos são necessários para o melhor entendimento do processo de difusão do AM em função do tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à fundação CNPq por proporcionar a possibilidade de desenvolver este estudo juntamente à Universidade Estadual de Maringá, e claro, ao professor Doutor Luís Carlos Malacarne pela oportunidade.

REFERÊNCIAS

BERGMANN, K.; O'KONSKI, C. T. A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite. **The Journal of Physical Chemistry**. v.67. n.10, p. 2169-2177, out. 1963. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/j100804a048>.

LEPORE, G. **Cinética de fotoclareamento do azul de metileno em sistemas que mimetizam tecidos biológicos para aplicações em terapia fotodinâmica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, 2022.

ROBERTSON C.A., HAWKINS EVANS D., ABRAHAMSE H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** 96 (2009) 1–8.

SEHN, E. **Utilização da Espectroscopia Fotoacústica na determinação da propagação das formulações de uso tópico utilizadas para a caracterização de lesões ulceradas da pele**. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SOUZA, M. **Espectroscopia Fotoacústica no UV-Vis e no IR para avaliação ex vivo da difusão na pele de emulsões contendo nanocristais de celulose e saponinas**. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.