

INCORPORAÇÃO DE UMA FTALOCIANINA DE SILÍCIO EM NANOPARTÍCULAS DE PLGA PARA APLICAÇÃO EM PROCESSOS FOTODINÂMICOS

***Vitória Tonini Porto Ferreira¹, Milton Beltrame Júnior¹, Antônio Cláudio Tedesco²,
Andreza Ribeiro Simioni¹***

¹ Laboratório de Síntese Orgânica. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D – Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos – São Paulo – Brasil.

² Departamento de Química, Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto- São Paulo- Brasil.
vitoriatonini@gmail.com; beltrame@univap.br; atedesco@usp.br; simioni@univap.br

Resumo- Neste trabalho foi realizada a preparação, caracterização morfológica e caracterização espectroscópica no estado estacionário de nanopartículas de PLGA como sistema de liberação controlada de fármacos com potencial aplicação em Terapia Fotodinâmica. Os dados obtidos mostraram que as propriedades fotofísicas de absorção e fluorescência do composto são preservadas quando veiculado em nanopartículas. Os estudos *in vitro* utilizando cultura celular em monocamadas como modelo biológico demonstrou a excelente atividade fotodinâmica do ativo em estudo, que apresentou toxicidade celular somente quando irradiado com luz visível na região do vermelho do espectro eletromagnético, característica de fundamental importância para compostos avaliados como potenciais de aplicação em protocolos envolvendo processos fotodinâmicos.

Palavras-chave: Ftalocianina, Nanopartículas, Nanotecnologia, Terapia Fotodinâmica.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica

Introdução

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das muitas fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana e tem se beneficiado diretamente com os avanços da nanobiotecnologia. Os sistemas de liberação, freqüentemente descritos como “*drug delivery systems* (DDS)”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros sistemas de dosagem convencional em escala macroscópica, como por exemplo, maior eficácia terapêutica, diminuição da toxicidade do ativo, menor dosagem de administração, direcionamento sitio-específico, dentre outros (STEVANOVIĆ et al, 2008).

Recentemente, pesquisadores do mundo todo têm concentrado esforços no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada na escala nanométrica, especialmente nanopartículas de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, que é um co-polímero bioabsorvível bastante promissor por sofrer degradação por hidrólise gerando produtos que são absorvidos pelo organismo, como o ácido láctico e o ácido glicólico (SANTOS JR., 2007).

No Brasil, desde a década de 90, vem sendo utilizada como tecnologia terapêutica para tratamento de câncer e outras doenças uma

técnica conhecida como Terapia Fotodinâmica (TFD). O protocolo de aplicação da TFD envolve a absorção de luz, geralmente na região visível do espectro eletromagnético (600-800 nm) por um composto conhecido como fármaco fotossensível ou fotossensibilizador (FS) que transfere a energia absorvida para o oxigênio molecular produzindo espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete, considerado como a principal espécie citotóxica causando danos nas membranas celulares, danos vasculares, dentre outros (SIMIONI et al, 2008).

Dentre os fotossensibilizadores utilizados em TFD podemos destacar a classe das ftalocianinas, que são chamados compostos de segunda geração e apresentam algumas vantagens frente aos compostos de primeira geração (ALLISON et al., 2004). As ftalocianinas são eficientes geradoras de oxigênio singlete e possuem um pico de forte absorção na faixa de 600-800 nm (dentro da Janela Terapêutica), ou seja, a faixa de comprimentos de onda na qual a penetração da luz no tecido é maximizada sem interferência de cromóforos endógenos do próprio sistema biológico (OCHSNER, 1997).

Neste trabalho nós realizamos a preparação, caracterização e estudos fotobiológicos de nanopartículas poliméricas de PLGA visando à aplicação biológica em TDF.

Metodologia

As nanopartículas de PLGA foram preparadas pelo método de dupla emulsificação água/óleo/água como descrito por Gomes e colaboradores (GOMES et al, 2006). O fotossensibilizador (NzPc) utilizado foi uma ftalocianina de silício com dois grupos n-dimetil-amino-etanoxil como ligantes axiais no silício (Dye Pharmaceuticals, São Paulo). A morfologia externa das nanopartículas foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nos estudos espectrofotométricos foram utilizados o espectrofotômetro de absorção modelo Lambda20 da Perkin Elmer e o espectrofluorímetro Fluorog 3 da Spex, ambos com controle de temperatura e agitação magnética. Como modelo celular foi utilizada cultura em monocamadas de fibroblastos epiteliais pulmonar-WS-21 (ATCC-232) em fase logarítmica de crescimento (Figura 1).

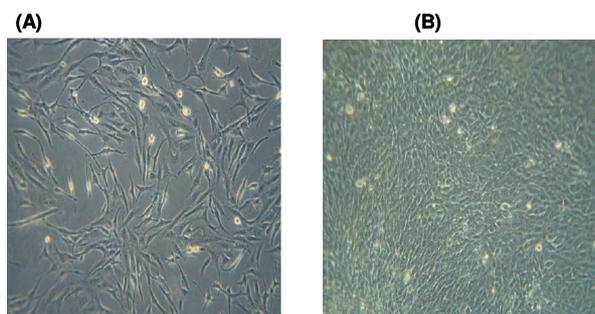


Figura 1: micrografia das células WS-21 em fase subconfluyente (A) e em fase confluyente (B) utilizada nos testes de MTT (microscópio invertido CK2 da Olympus, objetiva de 10x)

A viabilidade celular foi medida pelo teste do MTT, que é um teste apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

Os trabalhos rotineiros com culturas celulares foram realizados em capelas de fluxo laminar (modelo A152-Veco), esterilizadas com luz germicida e fluxo contínuo de ar. O sistema laser utilizado nos estudos fotobiológicos foi uma laser Eagle em 675 nm (Quantum-Tech, Brasil). Também utilizamos os seguintes aparelhos nos estudos de cultura e crescimento celular: sistema Elisa de absorção da Molecular Device AS, microscópio invertido CK2 da Olympus (para análise de forma, tamanho e crescimento de cultura), centrífuga refrigerada modelo 5810 R da Eppendorf e banhos termostataáveis Fisher Scientific, modelo 801. Além destes materiais foram utilizados diferentes solventes orgânicos bem como outros sais inorgânicos normalmente usados em laboratório.

Resultados

A morfologia das nanopartículas foi examinada por MEV (Figura 1) e as mesmas apresentaram tamanho médio de 435 ± 5.1 nm.

A NzPc associada as nanopartículas de PLGA apresentou forte banda de absorção na região do vermelho com máximo de absorção localizado em 682 nm (Figura 2) e o máximo de emissão de fluorescência em 702 nm (Figura 3).

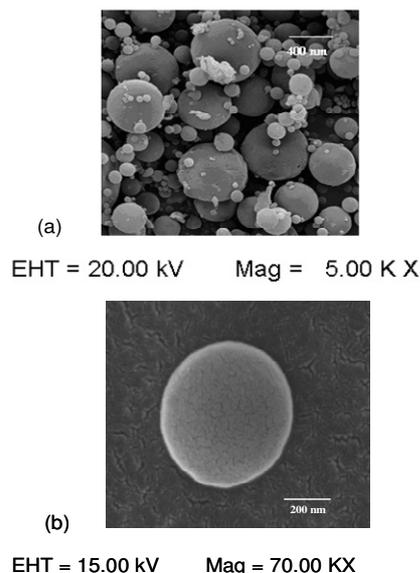


Figura 1-Microscopia eletrônica das partículas de PLGA associada com o fármaco fotossensível NzPc: (a) visão panorâmica das nanopartículas; (b) nanopartícula isolada.

Estes resultados foram comparados com a NzPc na sua forma livre, ou seja, quando não associada a um sistema de liberação controlada.

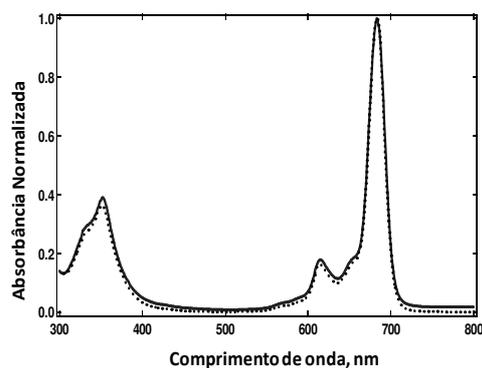


Figura 2- Espectro de absorção (UV-vis) da suspensão de nanopartículas em água (···) e da NzPc livre (em solução).

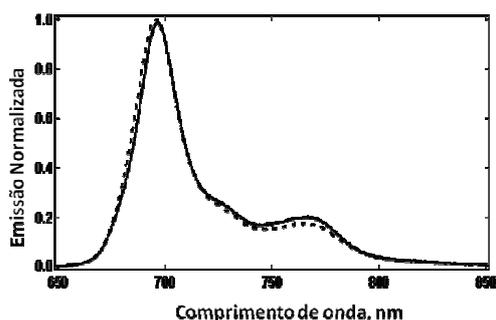


Figura 3- Espectro de fluorescência da suspensão de nanopartícula em água (···) e da NzPc em solução.

Nos estudos biológicos em cultura de monocamadas, o experimento na ausência de luz demonstrou que o sistema nanoparticulado não apresenta efeito citotóxico (viabilidade celular em torno de 95%) na faixa de concentração de 1-5 μM , sendo esta última a concentração utilizada nos estudos fotobiológicos. No experimento de fototoxicidade, nós variamos a fluência do laser de 1-10 J/cm^2 (doses normalmente utilizadas nos tratamentos clínicos) e o sistema apresentou uma viabilidade celular de 30% quando irradiado com uma dose de 10 J/cm^2 .

Discussão

As partículas de PLGA sintetizadas pela técnica de dupla emulsificação água/óleo/água apresentaram tamanho nanométrico na faixa de 435 nm, sendo este valor considerado satisfatório para a injeção intravenosa, uma vez que os capilares na corrente sanguínea apresentam tamanho na faixa de 5-6 μm .

A avaliação morfológica realizada por MEV mostrou que as nanopartículas apresentam formato esférico e superfície regular, como esperado para este tipo de sistema (KOMPELLA et al, 2001).

Nos estudos de absorção no estado estacionário, o sistema apresentou uma forte banda de absorção em 682 nm. A banda de absorção no vermelho permite que o fármaco absorva na região onde a penetração de luz no tecido é maximizada (600-800 nm, janela terapêutica), o que pode aumentar a eficiência no fototratamento. (PRIMO et al. 2008). Os resultados obtidos relacionados ao estado estacionário (absorção e fluorescência) do fotossensibilizador demonstraram que não houve modificação nos máximos de absorção e fluorescência do ativo quando veiculado nas nanopartículas de PLGA como sistema de liberação, demonstrando que as propriedades fotofísicas do fotossensibilizador são mantidas quando associada a um sistema de liberação controlada sem que haja perda na sua atividade fotodinâmica, uma vez que um sistema

de liberação considerado ideal é aquele que mantém ou maximiza as propriedades do ativo, garantido assim a sua atividade (JORI, 1996).

Os experimentos *in vitro* demonstraram que o sistema é não-citotóxico no escuro, mas exibe potencial toxicidade quando irradiado. A combinação de 5 μM e 10 J/cm^2 é suficiente para matar em torno de 70% das células, confirmando assim a potencialidade do sistema nanoparticulado como sistema de liberação controlada para uso em Terapia Fotodinâmica.

Conclusão

Os resultados espectroscópicos demonstraram os excelentes parâmetros fotofísicos do fotossensibilizador em estudo e todos os parâmetros são mantidos quando o ativo é veiculado em nanopartículas como sistema de liberação controlada, característica essencial para um sistema de liberação. Os estudos *in vitro* comprovam a grande potencialidade das nanopartículas de PLGA como sistema carreador de compostos ativos em Terapia Fotodinâmica.

Referências

- ALLISON, R.; DOWNIE, G.; CUENCA, R.; HU, X.H.; CHILDS, C.J.; SIBATA, C.H. Photosensitizers in clinical PDT, **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 1, p. 27-42, 2004.
- GOMES, A. J., LUNARDI, L. O., MARCHETTI, J. M., LUNARDI, C., TEDESCO, A. C. Indocyanine Green Nanoparticles Useful for Photomedicine, **Photomed. Laser Surg.**, v. 24, p. 514-521, 2006.
- KOMPELLA, U.B., BANDI, S.P. Ayalasomayajula, Poly (lactic acid) nanoparticles for sustained release of budesonide. **Drug Deliv. Technol.** V.1, p. 28-34, 2001.
- SANTOS Jr., A. R ; WADA, M. L. F. Synthesis, Characterization and in Vitro Degradation of Poly (DL-lactide)/Poly(DL-coGlycolide). **Polímeros: Ciência e Tecnologia.** V. 17, nº 4, p. 308 – 317, 2007.
- STEVANOVIĆ, M., RADULOVIC, A., JORDOVIC, B., USKOKOVIC, D. Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid, **J. Biomed. Nanotechnol.** V.4, p. 349-358, 2008.
- SIMIONI, A.R., PELISSON, M.M.M., BELTRAME JR, M., TEDESCO, A.C. Photophysical and photobiological studies of a silicon tribenzophenoneporphyrin incorporated into liposomes for photodynamic therapy use. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, V. 8, pp. 3208–3215, 2008.
- JORI, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of

XVINIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XI EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

VINIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B**, v.36, p.87-93, 1996.

-OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 39, p. 1-18, 1997.

- PRIMO, F.L., RODRIGUES, M.M.A., SIMIONI, A.R., BENTLEY, M.V.L.B., MORAIS, P.C., TEDESCO, A.C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **J. Mag. Mat.**, V. 320, P. 211-214, 2008.