



Desenvolvimento de sistemas bimodais fotoativáveis para aplicação biomédica

Development of photoactivatable bimodal systems for biomedical application

Millena Maria Leandro da Silva¹, Ana Claudia Pedrozo da Silva², Augusto César Gracetto³, André Luiz Tessaro⁴

RESUMO

A resistência crescente aos antibióticos tem gerado sérias preocupações em relação às infecções bacterianas na sociedade. Nesse contexto, a nanotecnologia e a Terapia Fotodinâmica surgem como soluções promissoras. A Terapia Fotodinâmica utiliza fotossensibilizadores ativados por luz para seletivamente destruir células-alvo, liberando oxigênio singlete. Os corantes xantênicos, como a Rosa de Bengala decil-éster, são amplamente empregados devido à sua alta eficácia na geração de oxigênio singlete, apesar de sua hidrofobicidade. Sistemas lipossomais mostram-se viáveis nesse contexto, pois possuem uma camada fosfolipídica anfifílica que isola os componentes internos, minimizando a resposta imunológica e direcionando o tratamento de forma compatível com o organismo. Formulações multimodais envolvendo nanopartículas de ouro também podem ser vantajosas para aumentar a produção de oxigênio singlete e, adicionalmente, aumentar a toxicidade via efeito fototérmico. Este estudo envolveu a síntese de lipossomas contendo Rosa de Bengala Decil-Ester e nanopartículas de ouro para avaliar sua eficiência na geração de oxigênio singlete e sua estabilidade estrutural. As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, potencial zeta, polidispersão, resistência à diluição, temperatura e absorvância. Durante o período de observação, os sistemas mantiveram sua estabilidade, o sistema com ouro apresentou uma pequena redução na taxa de rendimento quântico, porém ainda manteve um valor eficiente e que será futuramente testado em sistemas microbiológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Oxigênio singlete, Rosa de Bengala decil éster, Terapia fotodinâmica,

ABSTRACT

The increasing resistance to antibiotics has raised serious concerns regarding bacterial infections in society. In this context, nanotechnology and Photodynamic Therapy (PDT) emerge as promising solutions. Photodynamic Therapy utilizes light-activated photosensitizers to selectively destroy target cells, releasing singlet oxygen. Xanthene dyes, such as Decyl-Ester Rose Bengal, are widely employed due to their high efficiency in generating singlet oxygen, despite their hydrophobic nature. Liposomal systems prove to be viable in this context as they possess an amphiphilic phospholipid layer that isolates internal components, minimizing the immune response and directing treatment in a manner compatible with the organism. Multimodal formulations involving gold nanoparticles can also be advantageous in increasing singlet oxygen production and, additionally, enhancing toxicity via photothermal effects. This study involved the synthesis of liposomes containing Decyl-Ester Rose Bengal and gold nanoparticles to assess their efficiency in singlet oxygen generation and structural stability. The nanoparticles were characterized for size, zeta potential, polydispersity, dilution resistance, temperature, and absorbance. Over the observation period, the systems maintained their stability, with the gold-containing system showing a slight reduction in the quantum yield rate, but still maintaining an efficient value, which will be further tested in microbiological systems in the future.

KEYWORDS: Singlet oxygen, Rose Bengal decyl ester, Photodynamic therapy,

¹ Discente de Iniciação Científica (Fundação Araucária) UTFPR, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: millenamaria@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 0034212950318686

² Técnica de laboratório Lamap. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: anapedrozo1@gmail.com ID Lattes: 8944540024267429

³ Docente no Curso Licenciatura em Química-COLIQ. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: agracetto@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes: 6580168641383982

⁴ Docente no Curso Licenciatura em Química-COLIQ. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: andreteessaro@utfpr.edu.br ID Lattes: 7041730332413143



INTRODUÇÃO

Após a pandemia de Covid-19, a resistência bacteriana aos tratamentos convencionais, como antibióticos, aumentou substancialmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Nesse cenário, a nanotecnologia e a Terapia Fotodinâmica (TFD) surgem como promissoras alternativas terapêuticas (MAHMOUDI et al., 2018). A TFD é um procedimento que usa um fotossensibilizador, geralmente um corante, que se concentra na área-alvo e é ativado por luz específica. Durante a TFD, o corante converte o oxigênio molecular em oxigênio singleto, que é crucial para danificar estruturas internas de células-alvo e destruir seletivamente as células bacterianas. (SHACKLEY et al., 1999).

A Rosa de Bengala (RB), um corante alimentar da classe dos xantenos, destaca-se por sua notável geração de oxigênio singleto, essencial na TFD (BATOUL et al., 2023). A RB tem sido utilizada na inativação fotodinâmica de bactérias (KIM S et al., 2020), porém seu uso encontra-se limitado devido à sua natureza hidrofílica, que interfere na captação celular e na distribuição. Nesse caso, seu derivado Rosa de Bengala decil éster (RBDEC), revela-se mais eficaz devido a seu caráter hidrofóbico (SILVA, 2023), aumentando a eficiência de sua ação. Adicionalmente, a encapsulação da RB tem demonstrado resultados mais promissores (DEMARITS et al., 2021).

Soluções lipossomais têm se destacado como um método eficaz de entrega e proteção de compostos (SINGH, 2020). Lipossomas são vesículas constituídas por uma membrana de dupla camada, que forma um compartimento interno capaz de armazenar fármacos. Os lipossomas exibem afinidade por tecidos e células específicos, facilitando sua absorção (YADAV et al., 2017). A combinação de lipídeos com o surfactante polimérico F127 tem gerado vesículas com alta estabilidade e simples procedimento sintético. (FREITAS et al., 2019).

Além disso, o uso de nanopartículas de ouro (AuNps) para potencializar o rendimento quântico, vem sendo empregado (SAJID et al, 2021). Esses materiais funcionam a partir da ação da sua ressonância plasmônica de superfície que induz um campo elétrico, ao ser ativada por luz. Assim o objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de sistemas lipossomais bimodais visando sua aplicação no controle microbiano via TFD.

METODOLOGIA

PREPARO DAS NANOPARTICULAS DE OURO(AuNPS)

Utilizando a metodologia Turkevich inversa, uma solução aquosa de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ foi aquecida até a ebulição. Sob agitação constante adicionou-se uma solução de $\text{AuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Após, interrompeu-se o aquecimento para permitir o resfriamento e a formação das nanopartículas.



PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados conforme a metodologia de Freitas et al. (2019), dissolvendo 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC, $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em clorofórmio e F127 ($2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em metanol (proporção 4:1). A RBDEC foi adicionada por metodologia ativa. O solvente foi evaporado a 40°C por 15 minutos, formando um filme fino mantido em dessecador por 24 horas. O filme foi hidratado com PBS (pH 7,4) a $45\text{-}50^\circ\text{C}$ com sonicação constante por 6 a 8 minutos. Nas amostras com AuNPs, as nanopartículas foram introduzidas durante o processo de sonicação.

O diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (IP) e potencial Zeta (ζ) foram medidos, a 25°C , através da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS) em um analisador de partículas Litesizer™ 500 da Anton Paar. As vesículas também foram caracterizadas quanto aos ativos carregados via espectrofotometria de absorção UV-Vis, realizada em equipamento Cary-60 da Agilent Technologies. As análises foram realizadas no LAMAP-UTFPR.

ESTUDOS DA ESTABILIDADE

Avaliou-se a estabilidade temporal das vesículas monitorando DH, PI e ζ por 7 dias, assim como, a estabilidade dos ativos RBDEC e AuNPs monitorando as bandas de absorção e de plasmon de superfície, respectivamente. Avaliou-se também a estabilidade das vesículas quanto a variação de temperatura (25 e 50°C) e diluição (10 e 100 vezes) a partir de medidas de DH, PI e ζ .

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO ABDA: RENDIMENTO QUÂNTICO DE $^1\text{O}_2$

A avaliação da produção de $^1\text{O}_2$ foi feita de forma indireta usando ABDA ($6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) como sonda. A presença de $^1\text{O}_2$ converte o ABDA em seu endoperóxido, resultando na redução de sua absorvância. As análises foram conduzidas com um espectrofotômetro Cary-60. Nas amostras com lipossomas, o ABDA foi adicionado e o sistema repousou no escuro por 1 hora para permitir a incorporação da sonda. Em seguida, a iluminação ocorreu com LEDs (branco, 32 mW cm^{-2}) a uma distância de 3,0 cm da superfície do líquido. O cálculo do rendimento quântico foi determinado a partir das equações abaixo.

$$N_{ABS} = \frac{t}{hcNa} \int_0^t \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda') (1 - 10^{-Abs(\lambda')}) e^{-kPBt(t')} d\lambda' dt' \quad (1)$$

Onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, I é a irradiância da fonte (em mW cm^{-2}), N_A é o número de Avogadro e λ_f e λ_i são os comprimentos de onda final e inicial, respectivamente. Com o valor de N_{ABS} , foi possível determinar por fim a Eficiência Fotodinâmica Química (Eq. 2) e o rendimento quântico de oxigênio singleto $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ (Eq. 3).



$$EF = \frac{k_{ABDA}}{N_{ABS}} \quad (2)$$

$$\Phi_{\Delta} {}^1O_2 = \frac{\phi_{\Delta}^s}{\gamma_{\Delta}^s} \gamma_{\Delta} \quad (3)$$

Um sistema DPPC/F127/ERI foi usado como padrão ($\Phi_{\Delta} {}^1O_2 = 0,52$, Freitas et al., 2019).

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS

Os sistemas foram preparados de maneira similar, com a única distinção ocorrendo durante a etapa de sonicação no sistema DPPC/F127/RBDEC/AuNP. Os resultados apresentados na tabela 1 indicam que a incorporação da RBDEC ou do conjunto RBDEC/ AuNP não interfere no DH ou em ζ . Os valores de PI abaixo de 0,3 ainda indicam a baixa polidispersão das formulações.

Tabela 1 — Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (IP) e potencial Zeta (ζ). [FS] = $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; pH 7,4 e 25 °C.

Amostra	DH(nm± DP)	IP	ζ (mV)
DPPC/F127	40,94±6,35	0,284	--
DPPC/F127/RBDEC	35,61±6,73	0,261	-0,14
DPPC/F127/RBDEC/AuNP	42,20 ± 7,82	0,249	-0,31

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Os espectros de absorção da RBDEC e da banda plasmônica da AuNP mantiveram suas características após a incorporação nas vesículas de DPPC/F127.

ESTUDOS DA ESTABILIDADE

Ao longo de sete dias, ambas as amostras de lipossomas mantiveram diâmetros constantes, variando de 40 a 50 nm. O sistema DPPC/F127/RBDEC/AuNP apresentou pequenas aglomerações após uma semana, indicando interações entre as AuNps não encapsuladas, porém, o diâmetro médio das partículas permaneceu em torno de 42 nm, com um índice de polidispersão (IP) de 0,2284, demonstrando a estabilidade do sistema lipossomal. O sistema DPPC/F127/RBDEC mostrou-se extremamente estável, mantendo-se sua absorbância constante ao longo de 7 dias. O sistema DPPC/F127/RBDEC/AuNP, embora tenha apresentado pequenas variações na banda plasmônica da AuNP também se mostrou estável ao longo do mesmo intervalo de tempo. Os testes de influência da temperatura mostraram estabilidade em uma faixa de 25°C a 50°C, com o sistema DPPC/F127/RBDEC/AuNP apresentando ligeiras variações no DH em temperaturas mais elevadas. Quanto à diluição, o sistema DPPC/F127/RBDEC permaneceu estável, enquanto o sistema contendo AuNPs obteve um aumento no IP após uma



diluição de 10 vezes, mas manteve DH semelhante ao original. Porém, uma diluição de 100 vezes resultou na desestabilização para esse sistema.

Tabela 2 — Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (IP) e potencial Zeta (ζ). Para diluições de 10x e 100x.

Amostra	DH (nm \pm DP) Diluição 10x	IP	DH (nm \pm DP) Diluição 100x	IP
DPPC/F127/RBDEC	33,39 \pm 6,31	0,220	43,69 \pm 8,49	0,237
DPPC/F127/RBDEC/AuNP	47,64 \pm 7,46	0,324	10,05 \pm 1,13	0,241

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO ABDA

Para o sucesso da TFD, a capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ deve ser eficaz. Para isso foram realizadas análises cinéticas e foram obtidos os parâmetros da tabela 3.

Tabela 3 — Constante de fotobranqueamento (K_{FB}), Constante de degradação ABDA (K_{ABDA}), Eficiência da absorvância (N_{ABS}), Eficiência fotodinâmica (EF) e Redimento Quântico de Oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$).

Amostras	K_{FB} (10^{-4} s^{-1})	K_{ABDA} (10^{-3} s^{-1})	N_{ABS} ($E 10^{-5}$) ^c	EF	$\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$
DPPC/F127/RBDEC ^a	2,31	9,54	8,59	111,06	0,75
DPPC/F127/ERI ^b	3,66	3,33	9,32	35,73	0,52
DPPC/127/RBDEC	1,68	5,87	12,4	47,15	0,69
DPPC/F127/RBDEC/AuNP	1,75	4,04	12,8	31,57	0,46

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Sendo DPPC/F127/RBDEC^a disponibilizado por (SILVA, 2023) e DPPC/F127/ERI^b por (FREITAS, 2019) e N_{ABS} ($E 10^{-5}$)^c calculado em 21600 s.

É notável que o sistema lipossomal DPPC/F127/RBDEC é eficiente pois possibilitou uma produção de $^1\text{O}_2$ acima do produzido pelo padrão, demonstrando claramente o sucesso da formulação. Embora o valor de $^1\text{O}_2$ gerado pela RBDEC na presença de AuNPs seja satisfatório para a aplicação fotodinâmica, o valor foi $\sim 34\%$ menor do que o observado na ausência das AuNPs. Este fato, pode estar associado ao maior fotobranqueamento do sistema conjugado ou até mesmo relacionado ao formato das AuNPs, uma vez que a área pode interferir na formação do campo eletromagnético (YANG, 2018). Tal diminuição, não sugere um sistema ineficiente, pois ainda estudos serão realizados para avaliar as demais propriedades frente a sistemas microbiológicos.

CONCLUSÃO

Neste estudo, criamos sistemas lipossomais com DPPC e F127 para incorporar RBDEC e AuNPs. Estudos de DLS e UV-Vis demonstraram alta estabilidade das vesículas ao longo do tempo, temperatura e diluição. Ambos os sistemas possuem excelente rendimento quântico de



oxigênio singlete, apresentando potencial para controle antimicrobiano. Estamos avaliando o tempo de vida do estado tripleto, eficiência de encapsulação e realização de ensaios antimicrobianos para validar o sistema.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse

REFERÊNCIAS

- BATOUL, D.; *et al.* Rose Bengal coupled to AuX NPs for anti-cancer photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 41, p. 103424, 2023. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2023.103424.
- FREITAS, C. F.; *et al.* PEG-coated vesicles from Pluronic/lipid mixtures for the carrying of photoactive erythrosine derivatives. **Colloids Surf B Biointerfaces**, [S.l.], v. 175, p. 530-544, Mar. 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.12.031.
- DEMARITS, S.; *et al.* Nanotechnology-based rose Bengal: A broad-spectrum biomedical tool. **Dyes and Pigments**, v. 188, p. 109236, 2021. DOI: 10.1016/J.DYEPIG.2021.109236.
- KIM, S.; *et al.* A study of Rose Bengal against a 2-keto-3-deoxy-d-manno-octulosonate cytidyltransferase as an antibiotic candidate. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 1414-1421, dezembro de 2020. DOI:10.1080/14756366.2020.1751150.
- MAHMOUDI, H.; *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. **J Lasers Med Sci**, v. 9, n. 3, p. 154-160, verão de 2018. DOI: 10.15171/jlms.2018.29.
- SAJID, F; ARAUJO, E. Identifying high performance gold nanoshells for singlet oxygen generation enhancement. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 35, p. 102466, 2021. DOI: 10.1016/J.PDPDT.2021.102466.
- SHACKLEY, DC *et al.* Photodynamic therapy . **Jornal da Royal Society of Medicine**, v. 92, n. 11, p. 562-565, 1999. DOI: 10.1177/014107689909201106.
- SILVA, A.; Síntese e caracterização de fotossensibilizadores incorporados em sistemas lipossomais visando a Terapia Fotodinâmica. 2023
- SINGH, A.; *et al.* Liposomes – a review. **International Journal of Innovations in Health and Development**, p. 1-6, 2020. DOI: 10.46956/IJHD.VI.116.
- YADAV, D.; *et al.* Liposomes for Drug Delivery. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2017. DOI: 10.4172/2155-952X.1000276.
- Yang, Y.; *et al.* Colloidal plasmonic gold nanoparticles and gold nanorings: shape-dependent generation of singlet oxygen and their performance in enhanced photodynamic cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 2065-2078, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S156347.