ÁREA DE SUBMISSÃO: TERAPIAS EM SAÚDE - TES01

GÉIS POLIMÉRICOS CONTENDO AZUL DE METILENO COMO NOVAS FORMULAÇÕES PARA TERAPIA FOTODINÂMICA

L. A. G. da COSTA¹, H. K. M. PEREIRA¹, A. FONTES², J. S. A. FALCÃO³, B. S. SANTOS¹

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco,

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco

³ Unidade Acadêmica de Saúde, Universidade Federal de Campina Grande,

E-mail para contato: lucasamadeusc2@hotmail.com

RESUMO – O azul de metileno (AM) em solução é utilizado na clínica como um eficiente fotossensibilizador para terapia fotodinâmica, ainda não existindo uma formulação tópica padronizada. O objetivo principal do trabalho é o desenvolvimento de um gel contendo AM para aplicação em terapia fotodinâmica. Neste estudo foram empregados géis a base de carbopol 940[®] (CBP) ou hidroxietilcelulose (HEC), adicionados de metilparabeno 0,15%, trietanolamina q.s. pH~7, água destilada ou solução hidroalcoólica 10%, ou solução de ureia 10% q.s.p. e azul de metileno (1%). Foram realizados testes de espalhabilidade das formulações, bem como sua caracterização óptica e a estimativa de eficiência de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As formulações apresentaram coloração azul, pH ~7 e espalhabilidade máxima ~5000 mm² para CBP e ~6500 mm² para HEC. As melhores formulações no que se refere à geração de EROs foram CBP 940[®] com etanol 10% (61% de geração) e HEC com água (60% de geração). Estes valores correspondem a um aumento em torno de 23% com relação ao valor obtido na solução de AM (48% de geração de EROs), sugerindo que a formulação propicia um ambiente físico-químico propício para a amplificação do efeito fotodinâmico.

Palavras-chave: fotossensibilizador; azul de metileno; formulação tópica; géis.

ABSTRACT – Methylene blue (MB) in aqueous solution used as a photosensitizer in clinical photodynamic therapy and there is not a standardized topical formulation yet. The main objective of this study is to develop a gel containing MB for topic photodynamic therapy. We prepared carbomer 940 (CBP) or hydroxyethylcellulose (HEC) based gels containing also 0.15% methylparaben, triethanolamine q.s. pH~7, distilled water or 10% hydroalcoholic solution or 10% urea solution s.q.t. and methylene blue (1%). Scatterability test was carried out for the formulations, as well as their optical characterization and the determination of reactive oxygen species (ROS). The formulations presented a blue color, pH~ 7 and maximum spreadability close to 5000 mm² for CBP and 6500 mm² for HEC in water. The best formulations, in terms of generation of ROS

were CBP with ethanol 10% (61% ROS) and of HEC with 10% H₂O (60% ROS), presenting a 23% relative to the solution of MB (48% ROS production), suggesting that the formulation provides a favorable chemical physical environment for the amplification of the photodynamic effect.

Keywords: *photosensitizer; methylene blue; topic formulation; gels.*

1. INTRODUÇÃO

Terapia fotodinâmica é definida como uma modalidade terapêutica que utiliza reações fotoquímicas para destruição seletiva de células e/ou tecido. Os fotossensibilizadores (FS), administrados de forma exógena ou presentes de forma endógena, são ativados pela luz e transferem sua energia para o oxigênio molecular presente no meio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem morte celular (ISSA, MANELA-AZULAY, 2010). O azul de metileno (AM) é um fotossensibilizador que vem sendo empregado no tratamento de infecções bucais, periodontite e descontaminação endodôntica, sendo também relatado o uso no tratamento de alguns tipos de cânceres e micoses ungueais (TARDIVO *et al.*, 2005). O AM possui ainda, boa eficácia de geração de ¹O₂ e ³O₂ (em torno de 50%) segundo Nunez *et al.* (2013). Uma das preparações mais comuns de uso em clínica é solução de azul de metileno com concentrações entre 1 e 2% (m/v). Neste sentido, este trabalho visa o desenvolvimento de uma formulação simples na forma gel para aumento do tempo de contato do FS com o ponto de aplicação e, portanto, aumento da eficácia da terapia fotodinâmica tópica. Sendo assim, os objetivos do trabalho são: (i) preparar formulações semissólidas a base de gel para uso tópico contendo azul de metileno com concentração terapêutica; (ii) determinar pH e a espalhabilidade das formulações; (iii) caracterizar os sistemas obtidos através de espectroscopia de absorção, emissão e excitação e (iv) comparar o rendimento de geração de EROs do AM em solução e após sua incorporação em formulação gel.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Resumidamente, na preparação do gel carbopol (CBP) com pH ~7,0 utilizou-se carbopol 940[®] a 1%, metilparabeno a 0,15%, trietanolamina q.s. pH~7 e água destilada q.s.p., obtendo-se um sistema homogêneo a partir de mistura manual vigorosa. Para o gel de hidroxietilcelulose (HEC ou natrosol) foi empregada concentração de 2% no lugar do carbopol 940[®], mantendo-se os demais componentes. O azul de metileno foi veiculado nos géis para uma concentração final de $50 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (para ensaios de geração de EROs) ou 1% (para ensaios de propriedades físico-químicas). Todos os valores em % representam % m/v no que se refere às proporções de componentes. Ensaios foram aplicados alterando-se fatores experimentais, dentre eles a concentração do AM na formulação e adição de adjuvantes farmacotécnicos, como ureia a 10% e etanol (EtOH) também a 10% com o propósito de verificar interações de possíveis agentes de permeação. As formulações foram armazenadas a T = 4 a 10 °C e protegidas da luz. Os testes de detecção de EROs foram realizados tanto na solução quanto nas formulações utilizando-se a metodologia descrita por Krajlic & Mohsni (1978), em que as EROs geradas diminuem indiretamente a absorbância da N,N-dimetil-para-nitrosoanilina (RNO), sendo sua absorbância avaliada no comprimento de onda em $\lambda = 440 \text{ nm}$. A degradação foi feita utilizando-se laser MMOptics de fluência 33 J/cm^2 para 10 s de irradiação, comprimento de onda em 660 nm e com frequência de irradiação em intervalos de 20 s ou 1 min entre cada leitura até totalizar 5 min. A leitura dos espectros de absorção e

emissão/excitação eletrônica foi feita através do espectrofotômetro Lambda 650 UV/Vis e do fluorímetro modelo LS55, ambos da Perkin Elmer. O cálculo da porcentagem de geração de EROs equivale a $100 - \%RNO$ consumido (denominado RNOc) o qual é estimado experimentalmente pelo cálculo: $(\text{absorbância final do FS} \times 100) / (\text{absorbância inicial do FS})$. A determinação do pH foi realizada diretamente na preparação através da utilização de fitas de pH e a espalhabilidade foi realizada de acordo com metodologia descrita por Zanin *et al.* (2001), em que uma massa da formulação foi submetida ao peso de placas de vidro sucessivamente e a área ocupada, calculada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as formulações apresentaram-se azuis, típicas do AM e os valores de pH apresentaram-se em torno de 7 para todas as formulações, inclusive as contendo ureia ou etanol a 10%. No que se refere à espalhabilidade, não houveram alterações significativas comparadas com a do placebo, apresentando-se em torno de $5000 \pm 231 \text{ mm}^2$ para formulação de CBP e em torno de $6500 \pm 40 \text{ mm}^2$ para formulação de HEC. Foram observados deslocamentos (ca. 6 nm) no máximo de emissão do AM ($\lambda_{\text{máx}}$ (AM) = 700 nm) após sua incorporação nas formulações, sugerindo interação entre os géis e o ativo (SANTOS, 2015), porém sem correlação direta com a capacidade de geração de EROs. Todas as seis formulações (e suas reproduções) apresentaram-se estáveis com a presença do ativo. Observou-se que nos sistemas CBP/EtOH e HEC/H₂O (Tabela 1) foram obtidos os melhores resultados na produção de EROs. Sugere-se que este aumento decorra de uma distribuição efetiva do ativo na malha do gel, minimizando sua dimerização (NUÑEZ *et al.*, 2015), citado como um dos processos responsáveis por reduzir a eficiência do AM. A redução da eficiência de produção de EROs nas formulações ocorre mais extensivamente nas amostras incorporadas de ureia, o que sugere alguma interferência desta espécie no mecanismo de formação das espécies reativas.

Tabela 1 – Comparação entre a capacidade de produção de EROs das diferentes formulações.

Sistema/Aditivo	Produção de EROs (%)		
	H ₂ O	EtOH	Ureia
AM (1%) em Solução	48,0 ± 4,1	64,0 ± 0,5	56,0 ± 3,8
Gel CBP 1,0%	37,0 ± 0,9	61,0 ± 4,4	40,0 ± 2,5
Gel HEC 2,0%	60,0 ± 1,7	56,0 ± 0,9	39,0 ± 1,6

4. CONCLUSÃO

Os resultados apontam que em todas as formulações preparadas no presente estudo, a incorporação de AM foi realizada com sucesso, mas que em duas (CBP com EtOH 10% e HEC 10% em H₂O) houve um aumento ~ 23% com relação ao valor obtido na solução de AM (48% de geração de EROs), sugerindo que a formulação propicia um ambiente físico-químico adequado para a amplificação do efeito fotodinâmico. Os resultados sugerem certo grau de interação entre o AM e a malha polimérica e que o aumento da

produção de EROs pode decorrer da reduzida mobilidade das moléculas tornando o processo de dimerização do AM ineficiente. Estudos estão sendo realizados para otimização das formulações com maior geração de EROs, levando em conta a padronização dos parâmetros físico-químicos, bem como sua aplicação em experimentos envolvendo inativação fotodinâmica.

5. REFERÊNCIAS

- ISSA MCA, MANELA-AZULAY, M. 2010. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **An Bras Dermatol.** 85(4):501-11.
- KRALJIC; MOHSNI, S. El. 1978. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solution. **Photochem. Photobiol.** 28, 577-581.
- NUÑEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. 2013. **Princípios da terapia fotodinâmica.** Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na odontologia, p.312.
- NUÑEZ, C.S., YOSHIMURA, T.M., RIBEIRO, M.S., JUNQUEIRA, H.C., MACIEL, C., COUTINHO-NETO, M.D., BAPTISTA, M.S. (2015) Urea enhances the photodynamic efficiency of methylene blue, J. Photochem. Photobiol. B
- TARDIVO, J. P. *et al.* 2005. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiag. Photodynamic Ther.** 2(3), 175-191.
- SANTOS, L. B. M. Incorporação de Zinco porfirina e Azul de Metileno em Gel e Avaliação para Uso em Terapia Fotodinâmica. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado) - UFPE, Recife, 2016.
- ZANIN, S. M. W. *et al.* 2001. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica**, 2(2) 47-58.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, sem a qual não seria quem eu sou. Depois à minha orientadora e a todos os demais profissionais que me auxiliaram nesse caminho que estou a percorrer. Agradeço à UFPE pela bolsa de estudos. Este trabalho faz parte de um projeto financiado pelo CNPq através do Instituto de Ciência e Tecnologia em Fotônica (INCT-INFo).