

Fabricação, Caracterização Fotofísica e Fotoquímica de Nanopartículas de Gelatina Carregadas com Azul de Toluidina para Material Nanoestruturado Promissor para Sistema de Liberação de Fármacos

Jéssica A. R. Ambrosio, Janicy A. Carvalho, Milton B. Júnior & Andreza R. Simioni

A dificuldade na aplicação de medicamentos e sua baixa eficiência em determinados tratamentos leva a necessidade da criação de sistemas de liberação modificada (Drug Delivery systems -DDS). O azul de toluidina (AT) é um fotossensibilizador (FS) solúvel em água e em álcool, utilizado em tratamentos envolvendo a terapia fotodinâmica (TFD). A TFD é uma modalidade de tratamento que envolve uma fonte de luz em comprimento de onda específico, um FS e oxigênio molecular que em conjunto levam a uma cadeia de reações responsável por causar a morte celular do alvo do tratamento. O objetivo deste trabalho foi a síntese de nanopartículas de gelatina (NPGs) pelo método de dessolvatação em dois passos encapsuladas com azul de toluidina (AT). As NPGs sintetizadas foram caracterizadas utilizando as seguintes técnicas: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Análise de tamanho de partícula e potencial zeta, análises no ultravioleta, eficiência de encapsulamento (EE%) e estudos de liberação. As amostras apresentaram morfologia esférica, diâmetro médio de 398,50 nm potencial zeta de +21,2 mV e +22,5 mV para NPGs e NPGs-AT respectivamente, EE% de aproximadamente 85%. As análises do ultravioleta não apontaram para diferenças no perfil espectral do AT em sua forma encapsulada, por fim as análises de liberação apontaram para um perfil controlado de distribuição do FS. Conclui-se, portanto, que o sistema NPGs-AT é um potencial candidato para uso como DDS em aplicações futuras utilizando os protocolos de TFD.

Palavras-chave: *Azul de Toluidina; gelatina; nanopartículas; sistemas de liberação modificada.*

The difficulty in administering drugs and their low efficiency in certain treatments leads to the need to create modified release systems (Drug Delivery systems -DDS). Toluidine blue (TA) is a water- and alcohol-soluble photosensitizer (PS) used in treatments involving photodynamic therapy (PDT). PDT is a treatment modality that involves a light source at a specific wavelength, a PS and molecular oxygen that together lead to a chain of reactions responsible for causing the cell death of the treatment target. The objective of this work was the synthesis of gelatin nanoparticles (NPGs) by the two-step desolvation method encapsulated with toluidine blue (TA). The synthesized NPGs were characterized using the following techniques: Scanning electron microscopy (SEM), Particle size and zeta potential analysis, ultraviolet analysis, encapsulation efficiency (EE%) and release studies. The

Introdução

É cada vez mais recorrente o número de casos de câncer e de outras doenças que apresentam tratamentos com algumas características negativas, como efeitos colaterais diversos ou intervenção cirúrgica dificultada. Diante disso, surge a necessidade do desenvolvimento de modalidades de tratamento alternativas. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade promissora de tratamento baseada em três pilares: oxigênio molecular, uma fonte de luz (em comprimento de onda específico) e um fotossensibilizador (FS). A combinação destes três componentes leva a reações de transferência de energia que causam a morte celular do alvo do tratamento por um processo de necrose ou apoptose.^{1,2}

O Azul de Toluidina (AT) é um FS solúvel em água e em álcool e que apresenta máxima absorção de luz dentro da região do vermelho do espectro (600-800nm), conhecida como janela terapêutica. O AT é utilizado em aplicações envolvendo TFD antimicrobiana e como corante em diversos tipos de tecidos.^{3,4}

No entanto, a administração de um FS isolado no organismo é inviável devido ao efeito de autoagregação, o que reduz significativamente o efeito desejado do ativo biológico no organismo. Visando a superação nessa barreira de administração, a utilização de sistemas de liberação modificada (*Drug Delivery Systems*) é uma alternativa. Nestes modelos o FS é veiculado a um sistema base que pode ser metálico, cerâmico ou polimérico.^{5,6}

O uso de um polímero na formulação auxilia na preservação do FS, entrega específica no alvo do tratamento e liberação modificada do FS (preferencialmente de maneira prolongada, diminuindo efeitos colaterais e a dosagem do ativo no organismo do paciente).^{7,8}

A gelatina é um polímero natural derivado da hidrólise do colágeno, que apresenta propriedades como: biodegradabilidade e biocompatibilidade que tornam o material atrativo quando se trata da produção de um DDS. A administração de DDS em forma de nanopartículas se tornou atraente por conta de características como facilidade

de absorção pelo organismo (tamanho de partículas reduzido) e liberação prolongada do ativo.^{9,10}

O objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de liberação modificada com base em nanopartículas de gelatina encapsuladas com o Azul de Toluidina para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD) buscando um desenvolvimento científico amplamente multidisciplinar combinando-se protocolos, técnicas e ensaios experimentais da área de tecnologia farmacêutica, nanotecnologia e fotobiologia.

Materiais e Métodos

As nanopartículas de gelatina (NPGs) foram produzidas com base no método descrito por VINJAMURI, B.P e colaboradores (2021) e alterações baseadas em COESTER, C.J et.al (2000) (Figura 1). A gelatina tipo A (1,25 g) foi dissolvida em 25 mL de água purificada a 40°C. Posteriormente foram adicionados 25 mL de acetona, levando a formação de um precipitado. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi dissolvido em água purificada a 40 °C. O pH foi ajustado para 3 e 50 mL de acetona foram adicionados gota a gota até a formação das nanopartículas. A reticulação foi realizada pela adição de 0,25 mL de glutaraldeído seguido de agitação por 12h. As nanopartículas foram purificadas por ciclos de centrifugação (10 min, 5000 rpm). O resíduo da centrifugação foi diluído com solução de acetona (75%).^{11,12}

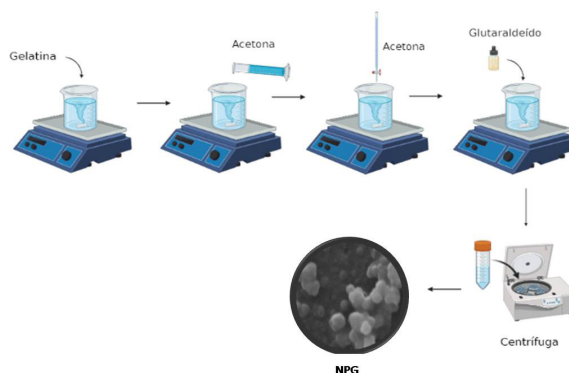


Figura 1. Esquema de síntese das NPGs

As NPGs encapsuladas com azul de toluidina (AT) foram sintetizadas da mesma maneira, e o processo de encapsulamento foi feito a partir da mistura das NPGs com uma solução de 1mL de AT 5,0 mg.mL⁻¹, conforme a representação da Figura 2.

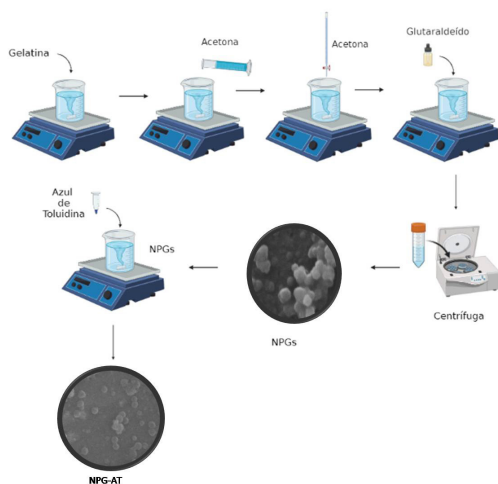


Figura 2. Esquema de síntese das NPGs-AT

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As morfologias de superfície das amostras NPGs e NPGs-AT foram examinadas por um microscópio eletrônico de varredura (EVO-MA10, Zeiss) com filamento de tungstênio. Uma pequena quantidade de amostra foi dispersa em uma quantidade mínima de água e sonicada por 30 min usando um sonificador de sonda com amplitude de 80% (ciclo completo), 1 (uma) gota dessa solução foi retirada em lamínula e seca completamente em temperatura ambiente. Em seguida, a amostra seca foi depositada em um suporte de latão salpicado com ouro e, em seguida, observada no microscópio para obtenção de imagens SEM.

ANÁLISE DE TAMANHO DE PARTÍCULA

O tamanho da partícula e o potencial zeta foram analisados por um analisador dinâmico de dispersão de luz (DLS) (Zetasizer® Nano ZS, Malvern PCS Instruments, Reino Unido). 100 mg (aproximadamente)

das nanopartículas foram dispersos em quantidade mínima de água e sonicados por 15 min usando um sonificador de sonda com amplitude de 80% (ciclo completo). Em seguida, a solução foi retirada em uma cubeta e colocada no aparelho DLS para analisar o tamanho médio de partícula e o potencial zeta das nanopartículas.

Para a estabilidade coloidal e mudança de tamanho da partícula, o efeito de prateleira sobre as características da amostra NPGs-AT (distribuição de tamanho e potencial zeta) foi sondado por três medições coletadas em tempos de armazenamento distintos. As suspensões de NPGs-AT foram protegidas da luz durante o tempo (cerca de 90 dias) do teste de estabilidade da amostra. Para cada medição, uma alíquota de amostra de NPGs-AT de 20 µL foi dispersa em 2000 µL de água ultrapura. Todas as medições foram realizadas em uma cubeta de acrílico padrão de 1,0 cm.

MEDIÇÕES DE ESTADO ESTACIONÁRIO

As medições de absorção foram realizadas para a amostra em AT, com um Cary 50 BIO-Varian Inc. Scientific Instruments que foi corrigido em segundo plano usando cubetas de quartzo correspondentes com varredura na faixa de comprimento de onda de 400 a 900 nm. Para estabelecer a linearidade dos métodos propostos, uma curva de calibração foi construída em oito níveis de concentração dentro da faixa de 0,5 – 5,0 µmol L⁻¹ para o método espectrofotométrico. Nas análises espectrofotométricas a lei de Beer foi obedecida. Análise de regressão de mínimos quadrados foi feita para os dados. A análise de variância (ANOVA) de uma via e um teste de falha de ajuste (p = 0,05) foram usados para determinar se o modelo linear explica adequadamente os dados obtidos.

CÁLCULO DO RENDIMENTO DO PROCESSO

A nanopartículas em pó foram obtidas após liofilização. O rendimento do processo foi calculado pela Equação 1. O método de encapsulamento foi realizado em triplicata (n = 3).

$$\frac{[(\text{Peso das nanopartículas} \times 100)]}{[\text{peso (FS+Nanopartículas)}]} \quad (1)$$

CÁLCULO DA CARGA DE DROGA E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE) DAS NPGs-AT

A carga de droga e a eficiência de encapsulamento das nanopartículas foram calculadas após o processo de centrifugação das amostras NPGs-AT à temperatura ambiente por 15 min. A quantidade de AT livre foi determinada a partir do líquido sobrenadante a 660 nm usando um espectrofotômetro UV-visível.¹³

A eficiência de encapsulamento (%EE - Equação 2) e a eficiência de carregamento de droga (%EC - Equação 3) foram calculadas usando as seguintes equações:

$$EE: \frac{\text{Quantidade total de FS} - \text{Quantidade de FS livre}}{\text{Peso das nanopartículas secas}} \times 100 \quad (2)$$

$$EC: \frac{(\text{Peso das nanopartículas} \times 100)}{[\text{Peso (FS + polímero)}]} \quad (3)$$

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LIBERAÇÃO DE DROGAS IN VITRO

Para avaliar o desempenho de liberação de drogas *in vitro*, os AT de NPGs (5,0 mg) foram dispersos em solução tampão PBS (5 mL, pH = 7,4) e agitados a 37 °C. Em diferentes intervalos predeterminados, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante (3 mL) foi retirado e substituído por solução fresca de PBS (3 mL) para continuar a avaliação da liberação do fármaco. A concentração de AT no sobrenadante foi determinada pela absorbância UV-Vis. Os dados foram relatados como média ± DP com base em medições triplicadas

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes foram realizados em triplicata, e todos os dados foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Tukey. O Microsoft Excel foi usado para criar os gráficos gerados. Todos os dados são expressos como a média ± DP de três experimentos independentes. Um valor P de probabilidade < 0,05 foi considerado significativo neste estudo.

Resultados e Discussão

A técnica de dessolvatação em dois passos para a produção de NPGs utiliza a acetona como agente dessolvatante, atuando em diversos processos como: desidratação das moléculas de gelatina, separação das frações de alto e baixo peso molecular e formação das partículas, sendo que este último processo também sofre influência da ação do agente reticulante utilizado (glutaraldeído).^{14,15}

As imagens de MEV das NPGs produzidas (Figura 3) apresentam morfologia esférica, condizente com a literatura em AZIMI, B e colaboradores (2014).¹⁶ KOLETTI, A.E e colaboradores (2020) produziram nanopartículas de gelatina com formato esférico, superfície lisa e homogênea.¹⁷

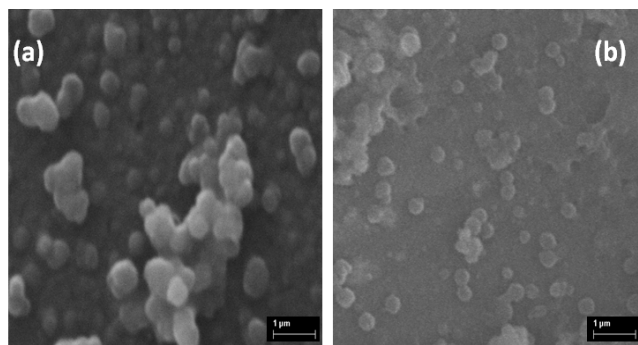


Figura 3. Microscopia Eletrônica de Varredura das Amostras de NPGs(a) eNPGs-AT (b)

A técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) (Figura 4) permitiu a análise do tamanho das partículas e da sua distribuição. O diâmetro médio das nanopartículas foi encontrado na faixa de 398,50 nm. FENG, X e colaboradores (2019) produziu nanopartículas de gelatina pelo método de dessolvatação em dois passos (utilizando etanol, como agente dessolvatador) e obteve tamanhos de partícula na faixa de 300-400nm. As partículas sintetizadas apresentaram Índice de polidispersão (PDI) de 0,072 (índices baixos de PDI apontam uniformidade da amostra).^{18,19}

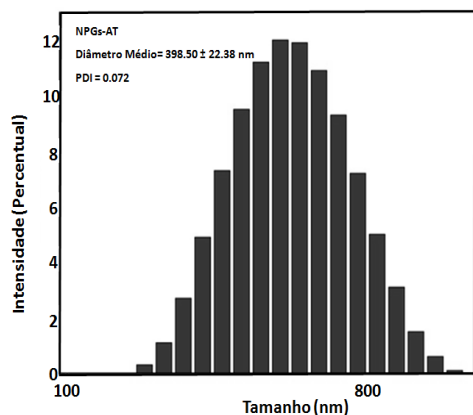


Figura 4. Distribuição de tamanho da nanopartícula medida por DLS da amostra NPGs-AT

A estabilidade das partículas produzidas foi avaliada a partir de medições do potencial zeta (Figura 5) das amostras de NPGs e NPGs-AT, os valores obtidos foram +21,2 mV e +22,5 mV respectivamente. De acordo com SAHOO, N e colaboradores (2015) e RASMUSSEN, M. K e colaboradores (2020) altos valores de potencial zeta se relacionam diretamente com a elevada concentração de cargas na superfície das NPGs, o que leva ao fenômeno de repulsão entre elas, o que dificulta a ocorrência do processo de agregação.^{14, 20}

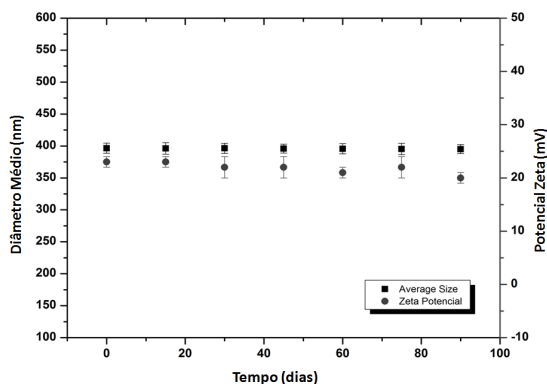


Figura 5. Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra NPGs-AT monitorado durante 90 dias após a preparação.

O pico máximo de absorção do AT em 630nm (Figura 6) foi encontrado tanto na amostra isolada do FS, quanto na amostra de NPGs-AT. A região de ocorrência do pico máximo está de acordo com as leituras realizadas por PAUL, P e colaboradores (2015) e WU, Y e colaboradores (2020).^{21,22} As amostras de NPGs-AT não apresentaram alteração de perfil espectral, um indicativo de que o AT não perdeu as suas propriedades durante o processo de encapsulamento. Ou seja, o FS mantém sua atividade com a vantagem de ser encapsulado em um sistema biocompatível, no caso o sistema NPGs-AT. Uma vez liberada das NPGs a molécula apresenta o mesmo comportamento que em meio orgânico. Assim, se o AT estiver presente no meio em estado de agregação dimérica, seria possível observar alterações no perfil espectral dele, o que não foi observado. Em nosso estudo não houve deslocamento de banda na análise espectroscópica, na faixa de concentração estudada, sugerindo que o FS está no estado monomérico quando é destinado a veículos para liberação do fotossensibilizador.

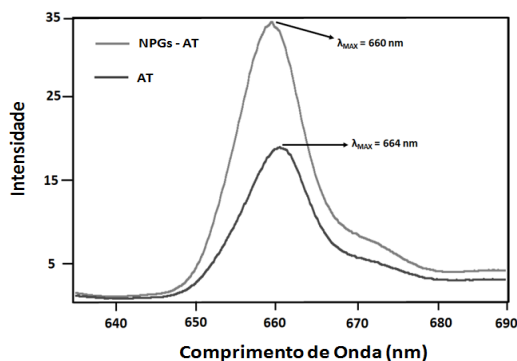


Figura 6. Espectros de absorção de AT (livre e extraído das amostras de NPGs-AT) ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em etanol

Para determinação do carregamento do AT nas NPGs, a quantidade de AT presente no sobrenadante límpido após um ciclo de centrifugação foi determinada por espectrofotometria UV. Para isso, foi traçada uma curva de calibração padrão de concentração versus

absorbância (Figura 7). A quantidade de AT no sobrenadante foi então subtraída da quantidade total de AT droga adicionada durante a formulação. Das NPGs. Por fim, a eficiência de encapsulamento refere-se à razão entre a quantidade de fármaco encapsulado/absorvido e a quantidade total (teórica) de AT utilizado, em relação ao sistema final de liberação de fármaco da dispersão de nanopartículas.²³ O fotossensibilizador AT foi carregado por adsorção no NPGs-AT. Rendimentos satisfatórios para o carregamento e encapsulamento de NPGs-AT foram obtidos (EC = 74,0% ± 1,9 e EE = 85,0% ± 1,1). A eficiência geral de encapsulamento do AT nas NPGs foi próxima a 85% valor significativamente maior do que o encontrado na literatura para nanopartículas de gelatina convencionais (<45%) conforme relatado por SAXENA, A e colaboradores (2005) e VANDERVOORT.^{24,25}

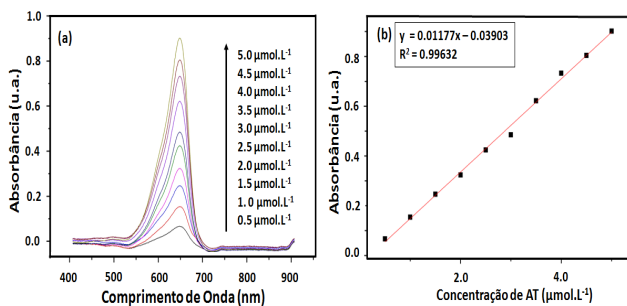


Figura 7. Curva de calibração AT.

Para avaliar a liberação *in vitro* de AT a partir do método de difusão de nanopartículas de gelatina e a concentração de AT foram quantificadas por espectrometria a 630 nm usando uma curva de calibração. A análise do perfil de liberação da amostra NPGs- AT mostra que aproximadamente 18% são liberados em um *burst* inicial nas primeiras 6 h, seguido por uma liberação lenta ao longo de 7 dias que excede 40% (Figura 8).

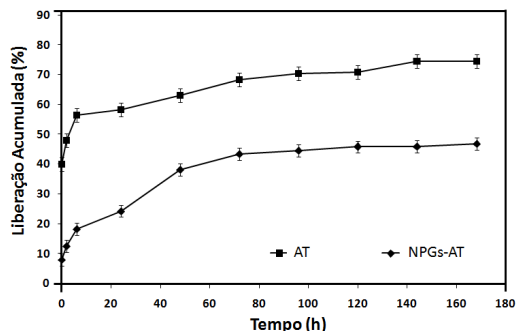


Figura 8. Perfil de liberação de amostras de AT e NPGs-AT

O perfil de liberação sustentada de AT pode ser atribuído a interações eletrostáticas entre o AT e matriz de nanopartículas.²⁶ Além disso, o perfil de liberação sustentada das NPGs-AT oferece a possibilidade de exposição repetida à fototerapia após administração única de nanopartículas. Esses resultados demonstram claramente as vantagens da formulação de nanopartículas sobre o corante livre.

Conclusão

O desenvolvimento de nanopartículas de gelatina carregadas com Azul de Toluidina foi relatado neste trabalho com uma análise físico-química e fotofísica detalhada da formulação da nanopartícula. A incorporação de AT em nanopartículas melhora alguns parâmetros das propriedades fotofísicas de AT. A metodologia de dessolvatação em duas etapas foi adequada para incorporar AT em nanopartículas de tamanho pequeno feitas de polímero biodegradável com uma distribuição de tamanho estreita. As vantagens da incorporação de AT ficaram claras nos estudos de liberação. NPGs foram capazes de reter AT no meio de liberação do coletor por mais de 7 dias, o que resultou em um perfil de liberação sustentada. Este trabalho mostrou o desenvolvimento de um sistema de entrega eficiente de AT em sua forma não agregada e que pode apresentar uma capacidade viável de permear a membrana celular e realizar uma atividade fotobacteriana.

Referências

1. PHAM, T. C; NGUYEN, V; CHOI, Y; LEE, S; YOON, J. Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.* 2021, 121.
2. CORREIA, J.H; RODRIGUES, J. A.; PIMENTA, S; DONG, T; YANG, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics*. 2021, 13, 9.
3. SRIDHARAN, G; SHANKAR, A. A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012,16, 2.
4. AFKHAMI, F; KARIMI, M; BAHADOR, A; AHMADI, P; POURHAJIBAGHER, M; CHINIFORUSH, N. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy with toluidine blue against *Enterococcus faecalis*: Laser vs LED. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020, 32, 102036.
5. AVRAMOVIĆ, N; MANDIĆ, B; SAVIĆ-RADOJEVIĆ, A; SIMIĆ, T. Polymeric Nanocarriers of Drug Delivery Systems in Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 2020,12, 298.
6. DENG, S; GIGLIOBIANCO, M.R; CENSI, R; DI MARTINO, P. Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. *Nanomaterials (Basel)*. 2020,10,5.
7. BHOWMIK, D; GOPINATH, H; KUMAR, B.P; DURAIVEL, S; KUMAR, K.P.S. Controlled Release Drug Delivery Systems. *Pharma innov.* 2012,1, 10.
8. WANG, S; LIU, R; FU, Y; KAO, W. J. Release mechanisms and applications of drug delivery systems for extended-release. *Expert Opin Drug Deliv.* 2020,17, 9.
9. MADKHALI, O; MEKHAIL, G; WETTIG, S.D. Modified gelatin nanoparticles for gene delivery. *Int. J. Pharm.* 2019,554, 10.
10. KHAN, M.R; SADIQ, M. B. Importance of gelatin, nanoparticles, and their interactions in the formulation of biodegradable composite films: a review, 2021, 78.
11. VINJAMURI, B.P; PAPACHRISANTHOU, K; HAWARE, R.V; CHOUGULE, M.B. Gelatin solution pH and incubation time influences the size of the nanoparticles engineered by desolvation. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2021, 63, 102423.
12. COESTER, C.J; LANGER, K; VON BRIESEN, H. Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J. Microencapsul.* 2000,17,2.
13. SARMAH, M; BANIK, N; HUSSAIN, A; RAMTEKE, A; SHARMA, H.K; MAJI, T, K. Study on crosslinked gelatin–montmorillonite nanoparticles for controlled drug delivery applications. *J Mater Sci.* 2015, 50.
14. SAHOO, N; SAHOO, R.K; BISWAS, N; GUHA, A; KUOTSU, K. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 81.
15. YASMIN, R; SHAH, M; KHAN, S.A; ALI, R. Gelatin nanoparticles: a potential candidate for medical applications. *Nanotechnol Rev.* 2016, 6, 2.
16. AZIMI, B; NOURPANAH, P; RABIEE, M; ARBAB, S. Producing Gelatin Nanoparticles as Delivery System for Bovine Serum Albumin. *Iran. Biomed. J.* 2014,18, 1, 2014.
17. KOLETTI, A.E; TSAROUCHI, E; KAPOURANI, A; KONGOIANNPOULOS, K.N; ASSIMOPOULOU, A.N; BARMPALEXIS, P. Gelatin nanoparticles for NSAID systemic administration: Quality by design and artificial neural networks implementation. *Int. J. Pharm.* 2020, 578, 119118.
18. FENG, X; DAI, H; MA, L; YU, Y; TANG, M; LI, Y; HU, W; LIU, T; ZHANG, Y. Nanopartículas de gelatina de grau alimentício: preparação, caracterização e aplicação preliminar para estabilizar emulsões de separação. *Foods.* 2019, 8, 10.
19. SHAMAREKH, K.S; GAD, H. A; SOLIMAN, M.E; SAMMOUR, O.A. Towards the production of monodisperse gelatin nanoparticles by modified one step desolvation technique. *J. Pharm. Investig.* 2020, 50.
20. RASMUSSEN, M.K; PEDERSEN, J.N; MARIE, R. Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nat Commun.* 2020,11,1.
21. PAUL, P; KUMAR, G, S. Spectroscopic studies on the binding interaction of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure B to DNA. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol Spectrosc.* 2013, 107.
22. WU, Y; LIU, M; PEI, W; ZHAO, Y; WANG, D; LIU, T; SUN, B; WANG, Q; HAN, J. Thermodynamics, *in vitro* release and cytotoxicity studies on doxorubicin–toluidine blue O combination drugs co-loaded in aptamer-tethered DNA nanostructures. *J.Mol. Liq.* 2020, 320, 114390.
23. CARVALHO, J.A; ABREU, A, S; FERREIRA, V.T.P; GONÇALVES, E.P; TEDESCO, C; PINTO, J.G; FERREIRA-STRIXINO, J; BELTRAME JUNIOR, M; SIMIONI, A.S. Preparation of Gelatin Nanoparticles by Two Step Desolvation Method for Application in Photodynamic Therapy. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2018, 29, 11.
24. SAXENA, A; SACHIN, K; BOHIDAR, H.B; VERMA, A.K. Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. *Colloids Surf. B.* 2005, 45, 1, 25.
25. VANDERVOORT, J; LUDWIG, A. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004, 57.

26. CHAVANPATIL, M.D; KHDAIR, A; PATIL, Y; HANDA, H; MAO, G; PANYAM, J. Polymer-surfactant nanoparticles for sustained release of water-soluble drugs. *J. Pharm. Sci.* **2007**, 96, 12.

**Jéssica A. R. Ambrosio, Janicy
A. Carvalho, Milton B. Júnior
& Andreza R. Simioni***

Laboratório de Sistemas Micro e Nanoparticulados, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

*E-mail: simioni@univap.br