

# Teorias e Métodos da **BIOFÍSICA**

Sabrina Passoni Maravieski  
(Organizadora)

 **Atena**  
Editora  
Ano 2019

**Sabrina Passoni Maravieski**  
(Organizadora)

# **Teorias e Métodos da Biofísica**

Atena Editora  
2019



2019 by Atena Editora  
Copyright © da Atena Editora  
**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
**Diagramação e Edição de Arte:** Lorena Prestes e Geraldo Alves  
**Revisão:** Os autores

**Conselho Editorial**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice  
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

| <b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)</b><br><b>(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T314                                                                                                      | Teorias e métodos da biofísica [recurso eletrônico] / Organizadora Sabrina Passoni Maravieski. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019.<br><br>Formato: PDF<br>Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader<br>Modo de acesso: World Wide Web<br>Inclui bibliografia<br>ISBN 978-85-7247-189-3<br>DOI 10.22533/at.ed.893191403<br><br>1. Biofísica. I. Maravieski, Sabrina Passoni.<br><br>CDD 571.4 |
| <b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

A obra “Teorias e Métodos da Biofísica” faz parte de uma série de livros publicados pela Atena Editora, e neste volume único, em seus 12 capítulos, apresenta uma diversidade de estudos realizados nas diversas áreas da biofísica, bem como relação com outras áreas que esta exige nos dias atuais.

A biofísica é uma ciência interdisciplinar na qual se emprega as teorias, os métodos ou técnicas específicas da física para resolver questões biológicas. Atualmente, com o avanço tecnológico a biofísica está presente na maioria das ciências da saúde, tais como: Medicina, Fonoaudiologia, Odontologia, Enfermagem, Terapia Ocupacional, Fisioterapia, Bioengenharia e Biomedicina. Na área de Ecologia, temos também a biofísica Ambiental. Algumas especializações em biofísica podem ser ainda multidisciplinares, como por exemplo: a Bioinformática, a Biologia Estrutural, Toxicologia Ambiental e Biologia de Sistemas.

Dessa forma, o leitor poderá encontrar nesta obra, uma variedade pesquisas cujas áreas que envolvem a biofísica estão interligadas nas quais muitos pesquisadores buscam por soluções emergentes. A interdisciplinaridade entre estas diversas áreas aqui citadas é um processo natural e inevitável, pois a formação dos profissionais das ciências da saúde ou biológicas, seja qual for a sua formação, necessita da relação entre diversas áreas do conhecimento.

Hoje o profissional se destaca pela capacidade de saber inovar e alcançar resultados positivos em suas pesquisas com base nas diversas ciências, utilizando uma ou mais tecnologias. Isso se faz possível se este profissional tiver conhecimento das demais áreas, pois não basta ser bom em uma única ciência, é preciso ser multi-intelectual.

Nesta obra, portanto, o leitor poderá encontrar parcerias estabelecidas entre diversas áreas do conhecimento de diversos departamentos de pesquisa: Engenharia Elétrica e de Computação, Semicondutores, Biocalorimetria, Bioquímica Médica, Nanotecnologia e Nanomedicina, Bioquímica e Biofísica, Farmácia, Química do Estado Sólido, Ciências Médica, Clínica Médica (Nefrologia), Radioterapia, Histologia e Embriologia, Biofísica e Radiobiologia, Morfologia e Fisiologia Animal, Nanociências e Materiais Avançados.

Logo, este volume é dedicado à interdisciplinaridade nas diversas áreas das Ciências da Saúde e Biológica, pois o mercado atual exige uma revolução tecnológica e cabe a aos pesquisadores, dessas diversas áreas, buscar conhecer as demandas atuais para promover essas inovações de forma interdisciplinar, e não isoladamente. Neste sentido, esta obra foi dividida em 6 áreas temáticas da Biofísica: Bioeletricidade, Bioestatística, Biomecânica, Biofísica Ambiental, Biomedicina, e Radiobiologia.

Na área de Bioeletricidade, composta apenas de um capítulo (capítulo1), apresentamos uma pesquisa realizada entre os cursos de Engenharias de Computação e Elétrica e o curso de Ciências Médicas, em que envolve os Departamentos de Química de Estado Sólido, Semicondutores, Instrumentos e Fotônica e o de Clínica Médica

(Nefrologia). Trata-se da investigação do nível de fósforo no sangue, em que, quando este apresenta-se acima do normal está associado a casos de óbitos de pacientes renais crônicos. Para isto os autores propõem o desenvolvimento de um transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET) que possa ser utilizado para quantificar a massa de fósforo no dialisato total final extraída durante o processo de hemodiálise.

Na área de Bioestatística, apresentamos dois capítulos. No capítulo 2, a pesquisa foi desenvolvida pelos Departamentos de Morfologia e Fisiologia em conjunto com o Departamento de Biofísica e Radiobiologia de uma Faculdade Rural. Na pesquisa foi utilizando o método da complexidade de Lempel-Ziv (CLZ), o qual permite calcular a complexidade de uma série temporal sem a necessidade de longos segmentos de dados. Este método, estatístico é baseado em dinâmica não linear e costumam ser são amplamente empregado na análise e descrição adequada de processos nas áreas de química, física e biologia. Neste, o método foi desenvolvido com o objetivo de determinar a complexidade de sequências finitas na análise do particionamento do polietilenoglicol no nanoporo unitário de alfa-hemolisina inserido em uma bicamada lipídica plana. O objetivo foi investigar o processo de chegada e permanência da molécula polimérica (analito) no nanoporo (biossensor). No capítulo 3, os pesquisadores avaliaram diferentes espectrômetros utilizados em análises clínicas e laboratórios de pesquisa os quais permitem determinar as concentrações de espécimes químicas diversas. Por considerarem a aplicabilidade destes dispositivos importante no quesito qualidade dos resultados fornecidos, os autores apresentam técnicas de estatística e os métodos de obtenção de indicadores de qualidade, por meio da realização de experimentos laboratoriais utilizando espectrofotômetros.

O capítulo 4, inserido na área temática de Biomecânica, trata-se de uma pesquisa onde a Oftalmologia e a Estética Funcional, estão intimamente ligadas aos fenômenos de transferência de massa estudados na Física. Neste, os autores mostraram como a falha da transferência de massa intraocular, por convecção forçada, pode afeta o movimento oculomotor e provoca diversas enfermidades, tais como: erro de refração, ceratocone, glaucoma de ângulo aberto ou fechado. Sugerindo por fim, a necessidade do SUS incluir, em seus procedimentos, a cirurgia corretiva de elevação de sobrancelhas, assim como a ANS regulamentar esta cirurgia em todos os planos de saúde.

Na área temática de Biofísica Ambiental, pesquisadores do Laboratório de Nanociências e Materiais Avançados realizaram estudos por meio da técnica de espectroscopia UV-visível com o intuito de promover uma formação interdisciplinar entre alunos de Pós-Graduação. Nesse sentido, os autores desenvolveram estratégias experimentais que permitem aos estudantes dominarem o uso da técnica de espectroscopia UV-visível para análises qualitativas e quantitativas com uso de um corante altamente conhecido e de larga aplicação como é o azul de metileno (capítulo 5). No capítulo 6, pesquisadores realizaram um levantamento do número de veículos na cidade de Recife para verificação da poluição atmosférica. Para eles, a poluição

atmosférica é comprovadamente um agente causador e de piora do quadro de diversas doenças, entre elas doenças respiratórias, câncer de pulmão, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. No capítulo 7, pesquisadores do Departamento de Biofísica e Radiobiologia utilizaram o ensaio cometa em hemócitos do moluscos de água doce *Biomphalaria glabrata*, é um biodicador natural utilizados para a detecção de possíveis danos no DNA após a exposição ao MMS e para avaliar a potencial aplicação para monitoramento da genotoxicidade do ambiente de água doce.

Na área temática de Biomedicina, o leitor poderá aprofundar seus estudos em três capítulos. No capítulo 8, os autores do Departamento de Histologia e Embriologia, analisaram e avaliaram a atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico do *Allium sativum* L. frente às formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Na área de Bioquímica Médica no Laboratório de Biocalorimetria (capítulo 9), pesquisadores realizaram estudos de uma importante enzima a L-asparaginase, a qual é amplamente utilizada no tratamento da leucemia. Tendo em vista a importância de seu uso, surgiu a necessidade de buscar alternativas para reduzir seus efeitos adversos e aumentar sua estabilidade. Assim a pesquisa resultou na obtenção de nanopartículas de quitosana de alto peso molecular sem e com ZnCl<sub>2</sub>. A alta concentração de quitosana, segundo os autores, permite maior incorporação de fármaco, mas aumenta o tamanho da partícula, o que não é interessante para a liberação intravenosa de fármaco. Já no capítulo 10, os autores analisaram e caracterizaram nanopartículas de quitosana-tripolifosfato (QT-TPP) associadas ao fármaco sumatriptano (SMT) como uma alternativa na terapia de enxaqueca via uso tópico.

A última área temática é a Radiobiologia, composta de dois capítulos promissores para as pesquisas atuais. Essa área vem crescendo em interdisciplinaridade, principalmente devido o crescimento das pesquisas em Medicina Nuclear, em Engenharia Biomédica e das técnicas de obtenção de imagem, as quais sofrem constantes avanços tecnológicos. Com isso, no capítulo 11, os autores investigaram a ação radioprotetora do extrato bruto da casca de *Anadenanthera colubrina* sobre os embriões de *Biomphalaria glabrata* e os resultados obtidos mostraram que o extrato da casca de A. colubrina apresentou uma discreta atividade radioprotetora. E por fim, no capítulo 12, com o intuito de fornecer mais dados sobre os efeitos da radiação ionizante no sistema nervoso central, os pesquisadores avaliaram a atividade elétrica cerebral de ratos expostos à radiação ionizante através do exame de eletrocorticograma (ECoG) e pode-se observar alterações nas ondas cerebrais através do uso de dois métodos matemáticos: a Transformada de Fourier (TF) Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) concluindo que a exposição a essa radiação causa alterações eletrofisiológicas, que incluem diminuição da complexidade e modificações nas ondas cerebrais.

Aos autores dos diversos capítulos, pela dedicação e esforços sem limites, que viabilizaram esta obra que retrata os recentes avanços científicos e tecnológicos nas Ciências da Saúde e Biofísica, os agradecimentos dos Organizadores e da Atena Editora.

Por fim, esperamos que este livro possa colaborar e instigar mais estudantes, professores e pesquisadores na constante busca de novas tecnologias promovendo a interdisciplinaridade nas diferentes áreas das Ciências da Saúde e Biofísica.

Sabrina Passoni Maravieski

## SUMÁRIO

### ÁREA TEMÁTICA BIOELETRICIDADE

#### CAPÍTULO 1 ..... 1

DESENVOLVIMENTO DE TRANSISTOR DE EFEITO DE CAMPO SENSÍVEL A ÍONS (ISFET) PARA QUANTIFICAÇÃO DA MASSA DE FÓSFORO REMOVIDO DE PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS NAS SESSÕES DE HEMODIÁLISE

*Sergio Henrique Fernandes*

*Leandro Tiago Manera*

*Helder José Ceragioli*

*Rodrigo Bueno de Oliveira*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914031**

### ÁREA TEMÁTICA BIOESTATÍSTICA

#### CAPÍTULO 2 ..... 17

COMPLEXIDADE DE LEMPEL-ZIV NA ANÁLISE DO TRANSPORTE DO POLIETILENOGLICOL ATRAVÉS DO NANOPORO DE ALFA-HEMOLISINA

*Gesilda Florenço das Neves*

*Dijanah Cota Machado*

*Carlos Manuel Machado Carneiro*

*Luiz Hamiel Almeida Consoni*

*Cláudio Gabriel Rodrigues*

*Romildo Albuquerque Nogueira*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914032**

#### CAPÍTULO 3 ..... 25

METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESPECTROFOTÔMETROS:ANÁLISE DA DISPERSÃO DAS MEDIDAS

*Cleonilde Maria do Nascimento*

*Carla Luiza Barros Bernardes Borja*

*Bruno Edberg Alves de Lira*

*Jabson Herber Profiro de Oliveira*

*Dijanah Cota Machado*

*Milton Marcelino Filho*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914033**

### ÁREA TEMÁTICA BIOMECÂNICA

#### CAPÍTULO 4 ..... 36

MOVIMENTO OCULOMOTOR E ALGUMAS PATOLOGIAS

*Humberto Dória Silva*

*Eduardo Dória Silva*

*Maria Tamires Dória Silva*

*Cristiana Pereira Dória*

*Cristiane Pereira Dória*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914034**



**CAPÍTULO 5 ..... 43**

**ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE ESTADOS AGREGADOS DE CORANTES**

*Adrianne Marlise Mendes Brito*

*Hebert Freitas dos Santos*

*Iseli Lourenço Nantes-Cardoso*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914035**

**CAPÍTULO 6 ..... 60**

**POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E POSSÍVEIS EFEITOS À POPULAÇÃO DE RECIFE**

*Cleonilde Maria do Nascimento*

*Nicolas Nunes Ferreira*

*Helotônio Carvalho*

*Sheilla Andrade de Oliveira*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914036**

**CAPÍTULO 7 ..... 66**

**UTILIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA DETECTAR EFEITO GENOTÓXICO DO METANOSULFONATO DE METILA EM CÉLULAS DE *Biomphalaria glabrata***

*Dewson Rocha Pereira*

*Maíra de Vasconcelos Lima*

*Williams Nascimento de Siqueira*

*Gabrielly Christynne Nascimento Sales*

*Hianna Arely Milca Fagundes Silva*

*José Luis Ferreira Sá*

*Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914037**

**ÁREA TEMÁTICA BIOMEDICINA**

**CAPÍTULO 8 ..... 73**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DO *Allium sativum* L**

*Gleyka Daisa de Melo Santos*

*Erwelly Barros de Oliveira*

*Paloma Lys de Medeiros*

*Eliete Cavalcanti da Silva*

*João Soares Brito da Luz*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914038**

**CAPÍTULO 9 ..... 82**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE ALTO PESO MOLECULAR - TRIPOLIFOSFATO PARA CARREAMENTO DE PROTEÍNA**

*Caroline Dutra Lacerda*

*Patrícia Severino*

*Maria Lucia Bianconi*

**DOI 10.22533/at.ed.8931914039**

**CAPÍTULO 10 ..... 94**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-TRIPOLIFOSFATO PARA APLICAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS**

*Aryane Alves Vigato*

*Renato Grillo*

*Leonardo Fernandes Fraceto*

*Daniele Ribeiro de Araújo*

**DOI 10.22533/at.ed.89319140310**

**ÁREA TEMÁTICA RADIOBIOLOGIA**

**CAPÍTULO 11 ..... 109**

**AÇÃO RADIOPROTETORA DO EXTRATO BRUTO DA CASCA DE *Anadenanthera colubrina* SOBRE OS EMBRIÕES DE *Biomphalaria glabrata***

*José Luís Ferreira Sá*

*Williams Nascimento Siqueira*

*Hianna Arely Milca Fagundes Silva.*

*Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra*

*Dewson Rocha Pereira*

*Larissa Silva de Azevedo Melo*

*Maíra de Vasconcelos Lima*

*Luiz Alberto Lira Soares*

*Márcia Vanusa Silva*

*Maria Tereza Santos Correia*

*Ana Maria Mendonça Albuquerque Melo*

**DOI 10.22533/at.ed.89319140311**

**CAPÍTULO 12 ..... 117**

**MÉTODOS MATEMÁTICOS DE ANÁLISE DA ATIVIDADE ELÉTRICA CEREBRAL DE RATOS EXPOSTOS A RADIAÇÃO IONIZANTE**

*Camilla de Andrade Tenorio Cavalcanti*

*Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes*

*Leandro Álvaro de Alcântara Aguiar*

*Alexandre Parísio Barbosa de Oliveira*

*Jonas Sérgio de Oliveira Filho*

*Romildo de Albuquerque Nogueira*

**DOI 10.22533/at.ed.89319140312**

**SOBRE A ORGANIZADORA..... 126**

## DESENVOLVIMENTO DE TRANSISTOR DE EFEITO DE CAMPO SENSÍVEL A ÍONS (ISFET) PARA QUANTIFICAÇÃO DA MASSA DE FÓSFORO REMOVIDO DE PACIENTES RENAI CRÔNICOS NAS SESSÕES DE HEMODIÁLISE

### **Sergio Henrique Fernandes**

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC), Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica (DSIF).  
Campinas - São Paulo

### **Leandro Tiago Manera**

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação (FEEC), Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica (DSIF).  
Campinas - São Paulo

### **Helder Jóse Ceragioli**

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Departamento de Química do Estado Sólido.  
Campinas - São Paulo

### **Rodrigo Bueno de Oliveira**

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Departamento de Clínica Médica (Nefrologia).  
Campinas - São Paulo

**RESUMO:** A hemodiálise é um procedimento que busca remover o excesso de líquidos e de substâncias acumuladas no organismo do paciente com insuficiência renal. Substâncias como o fósforo em excesso são prejudiciais ao organismo, e o controle do seu nível sérico no paciente renal crônico durante a hemodiálise representa um desafio aos nefrologistas. O nível de fósforo no sangue acima do normal

está associado à casos de óbitos de pacientes renais crônicos. Para isto se propõe o desenvolvimento de um transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET) que possa ser utilizado para quantificar a massa de fósforo no dialisato total final extraída durante o processo de hemodiálise. Inicialmente foi projetado e caracterizado o dispositivo eletrólito-isolante-semicondutor (EIS) para as medidas de pH e para as medidas da concentração de fosfato em solução. Utilizou-se filmes finos de óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) amorfo depositado sobre uma estrutura composta de uma camada fina de óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) sobre o substrato de silício. Com o dispositivo EIS construído se obteve uma sensibilidade de 107 mV/pH e sensibilidade na medida da concentração de fosfato de 347 mV/mg/dl. Para a realização das medidas da massa de fósforo no dialisato total final, o ISFET será implementado em um dispositivo eletrônico conectado a saída da máquina de hemodiálise. Os testes com o ISFET serão realizados no dialisato total final fornecidas pelo Departamento de Clínica Médica (Nefrologia) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, e os resultados obtidos serão comparados com os realizados em laboratório.

**PALAVRAS-CHAVE:** ISFET, ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), hemodiálise, fosfato, filmes finos.

**ABSTRACT:** Hemodialysis is a procedure that seeks to remove excess fluid and accumulated substances in the body of the patient with renal failure. Substances such as excess phosphorus are harmful to the body, and controlling their serum levels in the chronic renal patient during hemodialysis poses a challenge to nephrologists. The level of phosphorus in the blood above normal is associated with cases of deaths of chronic kidney patients. For this purpose the development of an ion-sensitive field effect transistor (ISFET) is proposed which can be used to quantify the mass of phosphorus in the final total dialysate extracted during the hemodialysis process. Initially, the electrolyte-insulation-semiconductor device (EIS) was designed and characterized for the pH measurements and for the measurements of the phosphate concentration in solution. Thin films of amorphous aluminum oxide ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) deposited on a thin layer of silicon oxide ( $\text{SiO}_2$ ) layer on the silicon substrate were used. With the built-in EIS device a sensitivity of 107 mV/pH and sensibility was obtained for the measurement of the phosphate concentration of 347 mV/mg/dl. For the measurement of the mass of phosphorus in the final total dialysate, the ISFET will be implemented in an electronic device connected to the output of the hemodialysis machine. The ISFET tests will be performed in the final total dialysate provided by the Department of Clinical Nephrology of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas, and the results obtained will be compared with those performed in the laboratory.

**KEYWORDS:** ISFET, ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), hemodialysis, phosphate, thin films.

## 1 | INTRODUÇÃO

A regulação da homeostase do fósforo é um papel fundamental exercido pelo rim (RIZZOLI R.). A manutenção de níveis séricos adequados de fósforo é um desafio constante para os profissionais da saúde ligados à nefrologia tanto quanto para os pacientes. Retenção de fósforo e hiperfosfatemia (nível de fósforo no sangue acima do normal) são comumente presentes nos pacientes renais crônicos e são fatores envolvidos na calcificação extra-óssea (YOUNG EW,; KATES DM.). Níveis elevados de fósforo também são associados à maior mortalidade nos pacientes em diálise (BLOCK GA.). A hemodiálise remove o fósforo por difusão e convecção, mas em geral de forma insuficiente para manter um balanço neutro (HOU SH,; GUTZWILLER JP.). A limitação para a remoção do excesso de fósforo durante o procedimento dialítico se deve principalmente a sua cinética entre os compartimentos intra e extracelular. A remoção de fósforo ocorre principalmente nos primeiros 60 a 90 minutos da sessão, decaindo a seguir (SCHUCK O.). Isto se deve ao fato do fósforo estar presente em grande quantidade no compartimento intracelular e, à medida que o fósforo é removido do sangue para o dialisato, há uma transferência de fósforo do intracelular para o compartimento sanguíneo, no entanto de forma mais lenta do que sua remoção pela diálise (MINUTOLO R). O principal fator determinante da quantidade de fósforo removido é o seu nível sérico no início da hemodiálise (SPALDING EM.). No entanto,



outros fatores podem influenciar a sua remoção, como fatores hormonais e o estado de remodelação óssea. A remodelação óssea, estimulada pelo hormônio da paratireóide (PTH), também afeta a remoção de fósforo. Níveis mais elevados do hormônio da paratireóide (PTH) estão associados com maior remoção de fósforo (GALLAR P.). Ou seja, a remodelação óssea influencia a remoção de fósforo durante a diálise. Dessa forma percebe-se que a remodelação óssea seja levada em consideração nos futuros modelos de cálculo da cinética do fósforo, assim como na escolha da solução do dialisato mais apropriada para cada paciente em tratamento hemodialítico. A remoção de fósforo durante a diálise afeta o equilíbrio do metabolismo mineral. Por hipótese o metabolismo mineral e ósseo pode, por sua vez, afetar a cinética do íon durante a diálise (ALBALATE M.). O método comumente empregado para a determinação da quantidade de fosfato removido de pacientes renais crônicos é através de análise química da solução do dialisato total final. Amostras do dialisato total final (dialisato final + ultrafiltrado) para dosagem de fósforo são coletadas após drenagem no início e no final da sessão de hemodiálise, a figura (1) ilustra o ponto de coleta após drenagem. Determinação da remoção de fósforo durante a hemodiálise (SIGRIST M.):

$$M_p = \frac{C_p}{10} \times (V_{DF} + V_{UF})$$

Onde:

$M_p$  representa a massa de fósforo removida em mg;

$C_p$  representa a concentração de fósforo em mg/dl;

$V_{DF}$  representa o volume do dialisato final em litros;

$V_{UF}$  representa o volume do ultrafiltrado em litros.

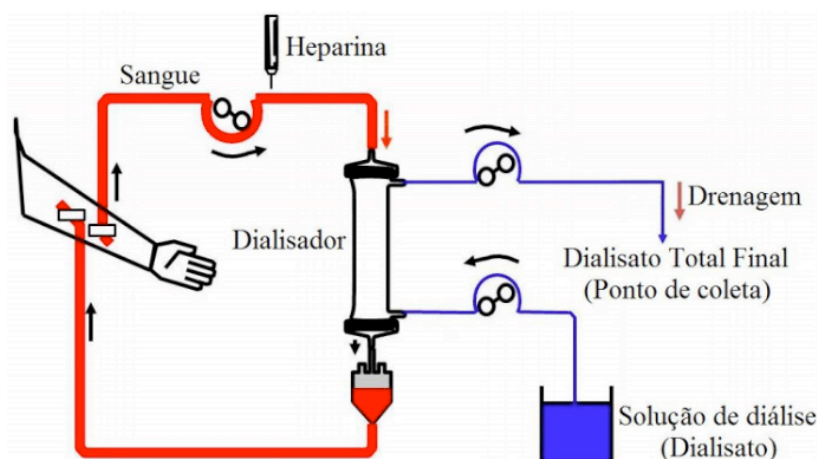


Figura-1 Ilustração do ponto de coleta das amostras do dialisato total final para dosagem de fósforo.

Esse processo de avaliação da massa extraída de fósforo durante a hemodiálise geralmente só é realizado em pesquisas clínicas, contudo o médico precisa quantificar a massa de fósforo removida através do líquido pós-diálise drenado do paciente para se conhecer a concentração do íon fósforo no sangue do paciente após a sessão de

hemodiálise. Sendo essa análise necessária, pois a medida da depuração da uréia calculada pela uréia sérica pode não refletir a remoção total de outros solutos com diferentes pesos moleculares e cinéticas, tal como o fósforo (SPALDING EM.). A cinética da uréia é bicompartimental e apresenta uma remoção constante no curso da sessão de hemodiálise, enquanto o fósforo tem um comportamento multicompartimental (SPALDING EM.). Níveis elevados do fósforo no sangue podem acarretar danos consideráveis ao organismo humano. Quando em excesso, o íon fósforo sanguíneo liga-se ao cálcio circulante, formando o fosfato de cálcio, uma substância insolúvel que se precipita nos vasos sanguíneos (BLOCK GA.). O resultado final é a calcificação destes vasos, obstruindo o fluxo de sangue. Uma das principais causas de morte em pacientes com insuficiência renal são as doenças cardiovasculares como infarto e acidente vascular cerebral (BLOCK GA.). Sendo este tipo de análise da concentração de fósforo no líquido pós-hemodiálise (dialisato total final) essencial para o paciente renal crônico. Neste contexto é por isso que se propõem confeccionar transistor de efeito de campo sensível ao íon fósforo que possa ser utilizado na quantificação da massa de fósforo removido do paciente renal crônico na sessão de hemodiálise. O transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET) (CASTELLARNAU, M.; SANT, W. ), é uma tecnologia permite produção em massa dos dispositivos, tornando-os de baixo custo(MARTINOIA, S.; MIDDELHAEK, S.; WOHLTJEN, H.). No campo dos sensores de estado sólido, destacam-se aqueles construídos com tecnologia microeletrônica (JIMENEZ, C.; LEE, C. H.; MARTINOIA, S.). O ISFET é um dos mais investigados sensores químicos baseado no MOSFET, inventado em 1970 (BERGVELD, P.), não apresenta o contato de porta como em um dispositivo MOS convencional. A figura (2) ilustra essa diferença e apresenta um diagrama eletrônico comum para ambos os dispositivos.

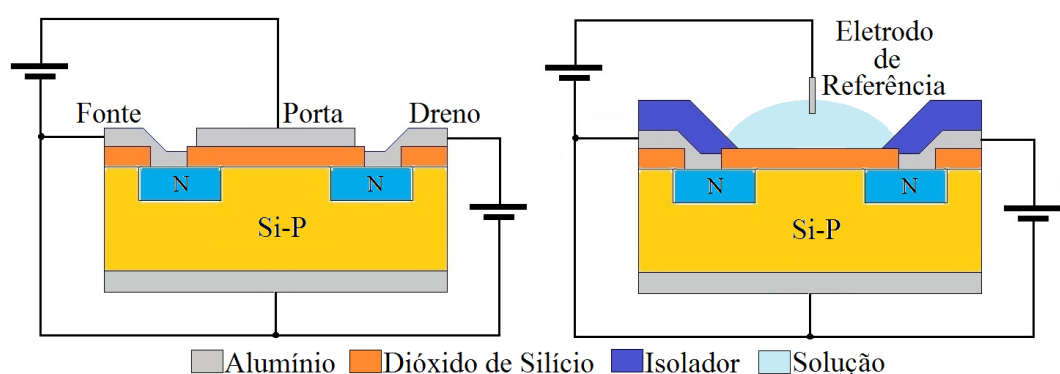


Figura-2: Ilustra a diferença entre o MOSFET e o ISFET e apresenta um diagrama eletrônico comum para ambos os dispositivos.

Uma das principais aplicação do ISFET consiste na medida do pH de um eletrólito (BERGVELD, P.), uma vez que a tensão de limiar do mesmo varia linearmente com o pH da solução. Juntamente com outros sensores, o ISFET possui uma ampla gama de aplicações em sistemas de sensores e atuadores, sistemas de realimentação, medidas dinâmicas, dentre outras. O ISFET pode apresentar diferentes materiais

como dielétrico de porta de acordo com a aplicação do dispositivo. Sua sensibilidade depende do material dessa camada de porta em contato com o eletrólito. Dentre os materiais mais utilizados se destacam o óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ), o nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), o óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), o óxido de tântalo ( $\text{Ta}_2\text{O}_5$ ) e a estrutura  $\text{Si}/\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$  (BOUSSE, L.; CASTELLARNAU, M.; MATSO, T.). O ISFET trabalha com o auxílio de um eletrodo de referência, como mostrado na figura (2). Um eletrodo de referência promove um potencial fixo que não varia e apresenta estabilidade, reprodutibilidade, reversibilidades termodinâmica e química, dentre outras características (GALSTER, H.). Dentre os eletrodos de referência mais comuns estão o de calomelano ( $\text{Hg}/\text{HgCl}$ ) e o de prata/cloreto de prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ). Além destes eletrodos comerciais, pseudoeletrodos podem ser utilizados em substituição aos eletrodos de referência comerciais pela sua maior compatibilidade com a integração em circuitos integrados (CASTELLARNAU, M.; ISHIJI, T.). Nesse trabalho, será utilizado ISFET com dielétrico de porta formado por uma camada de óxido de silício (camada de passivação) e óxido de alumínio (camada sensível), sobre um substrato de silício formando uma estrutura  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2/\text{Si}$ , para medidas da concentração do íon fosfato. Com a colaboração do Departamento de Clínica Médica (Nefrologia) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, os testes com o ISFET poderão ser realizados em amostras do dialisato total final e os resultados serão comparados com as medidas da massa extraída de fósforo pelo método convencional.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Para a fabricação do ISFET, inicialmente foi projetado e caracterizado o dispositivo EIS (eletrólito-isolante-semicondutor) para a verificação da sensibilidade do óxido de alumínio em relação ao pH e ao íon fosfato.

### 2.1 Fabricação do Dispositivo EIS

Para a fabricação do ISFET, inicialmente foi projetado e caracterizado o dispositivo EIS contendo como dielétrico a sobreposição do óxido de alumínio sobre o óxido de silício crescido por oxidação seca a partir de um substrato de silício, formando assim a estrutura  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2/\text{Si}$ . O óxido de alumínio foi obtido por ALD (Atomic Layer Deposition). Na fabricação do dispositivo EIS foram utilizadas lâminas de silício tipo N com orientação cristalográfica (100) e com resistividade de 1 a 10  $\Omega/\text{cm}$ . Sobre o óxido de alumínio foi depositado um polímero isolante SU8-25 a base de acetato de metoxi propanol, um fotorresiste negativo formado por oito grupos epoxi reticulados, através do método de fotografação formando uma estrutura no formato de um poço com parede, como ilustrado na figura (3), permitindo que a solução entre em contato com o óxido e assim possibilitando que a medida seja realizada somente naquela região. Para formar o eletrodo na base inferior do dispositivo foi depositado uma fina

camada de alumínio por pulverização catódica (sputtering).

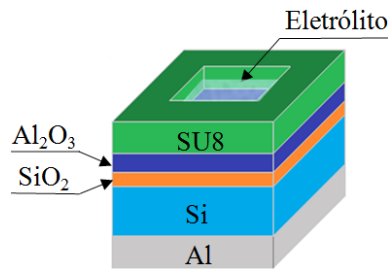


Figura-3: Representação de um dispositivo EIS.

## 2.2 fabricação do isfet

Na confecção do ISFET serão utilizadas lâminas de Si tipo N com orientação cristalográfica (100). A seguir é apresentada a sequência das etapas de fabricação do ISFET.

- a) Caracterização, medida da espessura e da resistividade da lâmina através da técnica de quatro pontas e limpeza RCA completa da lâmina.



- b) Oxidação úmida criando uma camada de dióxido de silício na superfície superior da lâmina.



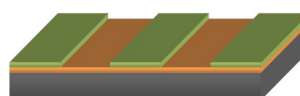
- c) Aplicação de uma camada fina de fotorresiste sobre a camada de dióxido de silício para fotogração de fonte e dreno.



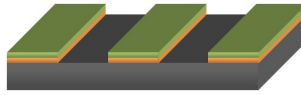
- d) Usando uma máscara de litografia (1ª máscara), é jogada luz ultravioleta apenas em algumas áreas da superfície. A máscara tem um padrão diferente para cada área do transistor, de acordo com o desenho que se pretende obter.



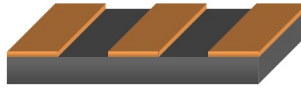
- e) Remoção da parte do fotorresiste que ficou exposto a luz ultra violeta.



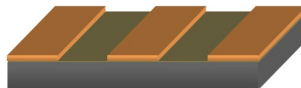
- f) A lâmina passa por um novo banho químico a base de ácido fluorídrico, que remove as partes do dióxido de silício que não estão protegidas pela camada de fotorresiste.



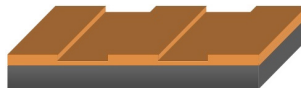
g) Remoção da camada restante de fotorresiste.



h) Implantação iônica com boro, fonte e dreno. Nesse processo íons de boro são implantados no substrato de silício nas áreas onde não possuem dióxido de silício, e implantação de fósforo nas costas da lâmina.



i) Recozimento e oxidação úmida.



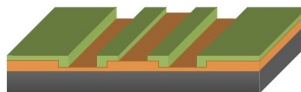
j) Uma nova camada de fotorresiste é aplicada sobre a camada de dióxido de silício.



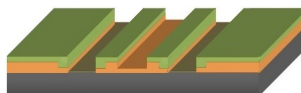
k) Fotogração de canal e contatos (2ª máscara). A lâmina passa novamente pelo processo de litografia, usando mais uma vez uma máscara diferente.



l) As partes do fotorresiste expostas à luz ultravioleta são removidas, expondo partes das camadas inferiores, que são removidas em seguida por corrosão.



m) Corrosão da área de óxido de silício que não ficou protegida pelo fotorresiste.

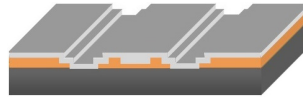


n) Remoção da camada restante de fotorresiste e limpeza *RCA* completa.

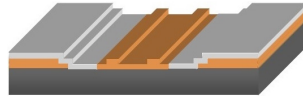


o) Fotogração dos contatos, (3ª máscara). Uma fina camada de alumínio é aplicada sobre a estrutura anterior por evaporação.

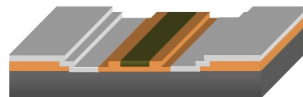




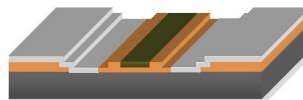
p) O processo de aplicação da camada de fotorresiste e de remoção das camadas (4ª máscara) é aplicado mais uma vez, com o objetivo de remover as partes indesejadas da camada de alumínio.



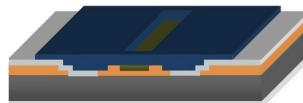
q) Deposição de óxido de alumínio sobre a porta do transistor e retirando o excesso pelo processo de litografia tipo lift-off (4ª máscara).



r) Deposição de alumínio nas costas da lâmina e posterior recozimento.



s) Deposição do polímero isolante e protetor SU8, e retirada do excesso para abertura da porta e dos contatos pelo processo litográfico (5ª máscara).



### 3 | CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Os filmes finos de óxido de alumínio depositados sobre as estruturas de  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  foram caracterizados estruturalmente pelas técnicas de elipsometria, espectroscopia Raman, difração de raios-X.

#### 3.1 Elipsimetria

Nesta análise foi utilizado o equipamento Rudolph modelo Auto-EL Technologies, Inc. O elipsômetro fornece dois parâmetros  $\Psi$  e  $\Delta$ , com estes dois parâmetros e com auxílio do software DAFIBM é possível determinar a espessura da camada de óxido e o índice de refração do filme fino obtido. Essa medida foi realizada em vários pontos da lâmina, dessa maneira foi possível estimar os valores médios da espessura e do índice de refração das amostras. A tabela (1) mostra os resultados da elipsimetria tanto para o  $\text{Al}_2\text{O}_3$  quanto para o  $\text{SiO}_2$  do dispositivo EIS.

| Oxide                          | $\Delta$<br>(°) | $\Psi$<br>(°) | Thickness<br>(nm) | Refractive<br>Index |
|--------------------------------|-----------------|---------------|-------------------|---------------------|
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 111,76          | 16,52         | 27,8              | 1,616               |
| SiO <sub>2</sub>               | 141,32          | 12,20         | 14,6              | 1,453               |

Tabela-1: Resultados da elipsimetria dos filmes de óxidos do dispositivo EIS.

### 3.2. Espectroscopia Raman

Nesse experimento as análises foram feitas utilizando a espectroscopia Raman do óxido de alumínio no substrato de silício em dois comprimentos de onda, 325 e 514 nm. Como pode ser visto tanto na figura (4) como na figura (5), o pico nos deslocamentos refere-se ao silício (520 cm<sup>-1</sup>), evidenciando que o óxido de alumínio está na forma amorfa.

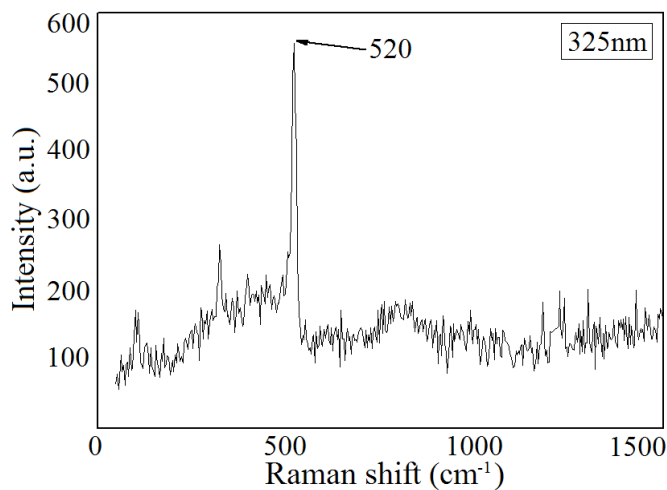


Figura-4: Resultado da espectroscopia Raman da camada de óxido de alumínio no substrato de silício usando um comprimento de onda de 325 nm.

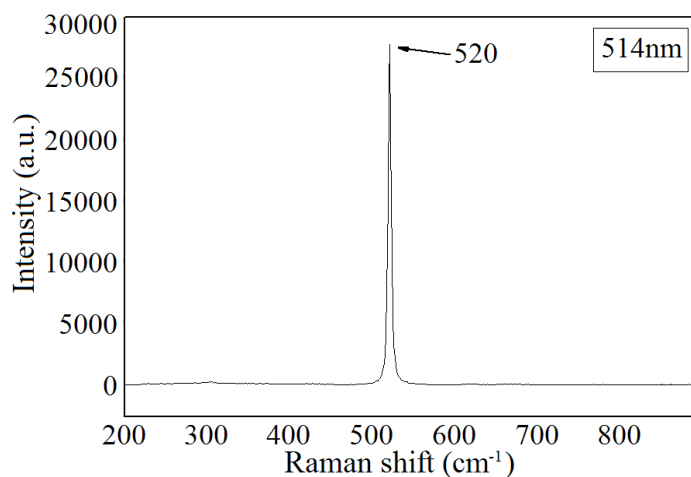


Figura-5: Resultado da espectroscopia Raman da camada de óxido de alumínio no substrato de silício usando um comprimento de onda de 514 nm.

### 3.3. Difração de Raios-X

Nessa análise percebemos que aparece um pico de intensidade relacionado com

o óxido de alumínio sobre o substrato de silício, enfatizando que não existe nenhum alumínio remanecente do processo de sputtering reativo, figura (6).

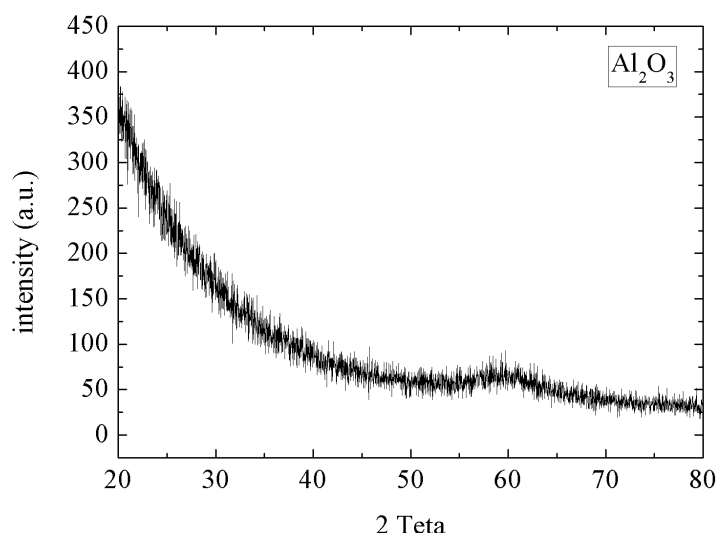


Figura-6: Resultado do difratograma de raios-X do filme de óxido de alumínio.

## 4 | CARACTERIZAÇÃO ELÉTRICA

Para a caracterização elétrica do dispositivo EIS, foram realizadas medidas capacitância por tensão utilizando o analisador de parâmetros semicondutor modelo keithley 4200-SCS da Tecktronix Company, como representa a figura (7).

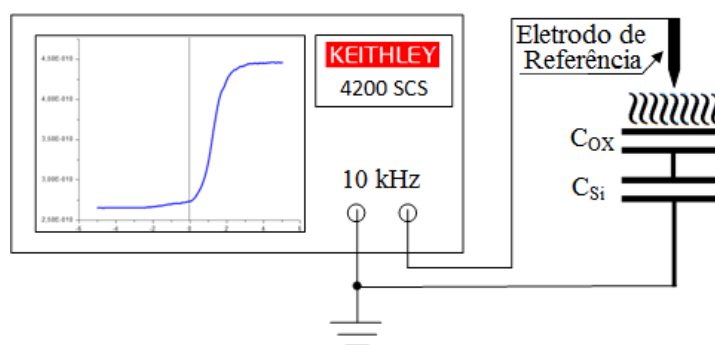


Figura-7: Equipamento para caracterização elétrica do dispositivo EIS.

### 4.1 Caracterização Elétrica do Dispositivo EIS

Para a caracterização elétrica do dispositivo EIS, foram realizadas medidas capacitância por tensão utilizando soluções com diferentes valores de pH e soluções com diferentes concentrações de íon fosfato para se determinar a sensibilidade do dispositivo.

#### 4.1.1 Medidas de PH

Para as medidas de pH foram realizadas medidas capacitância por tensão utilizando frequência de 10 kHz, o dispositivo EIS foi colocado em uma estação de

testes, onde utilizou-se um eletrodo de referência de tungstênio banhado a ouro que entra em contato com o eletrólito, e tendo o eletrodo inferior do dispositivo EIS em contato com o suporte da estação de testes. A área de contato do dispositivo EIS com a solução a ser analisada é determinada pelas dimensões do poço formado pelo polímero SU8-25. Para utilização do dispositivo EIS para medida de pH, foram utilizadas soluções tampão para calibração de pHmeters comerciais, e as medidas foram realizadas em sala escura à temperatura de 20°C. A figura (8) mostra a curva capacitância normalizada por tensão em função do pH. Com a medida da capacitância por tensão em função do pH, pode-se extrair os valores de  $V_{FB}$  para cada um dos valores de pH, e com isso obtendo-se a curva  $V_{FB}$  em função do pH, como mostra a figura (9), e obtendo o valor da sensibilidade de aproximadamente 107 mV/pH.

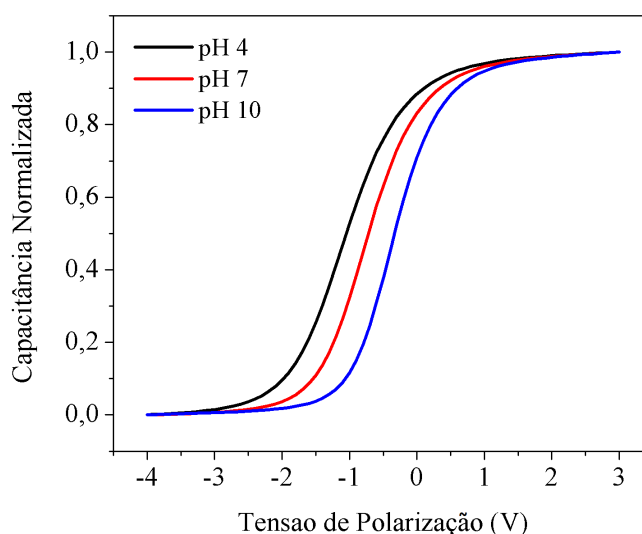


Figura-8: Curva capacitância normalizada por tensão em função do pH das medidas realizadas no dispositivo EIS.

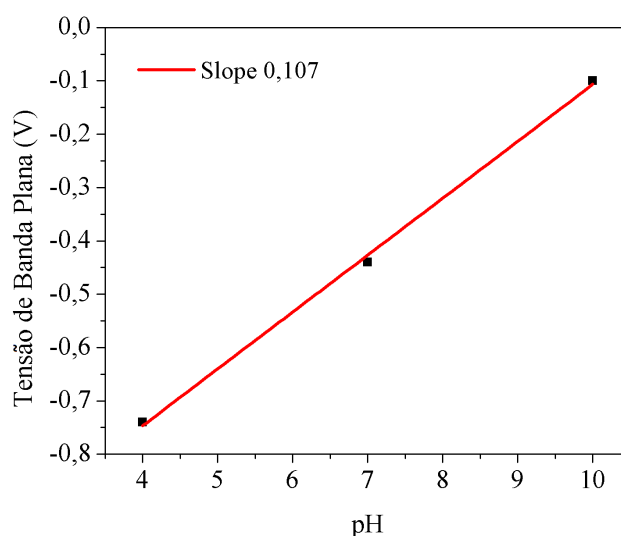


Figura-9: Curva  $V_{FB}$  em função do pH utilizada para o cálculo da sensibilidade do dispositivo EIS para as medidas de pH.

#### 4.1.2 Medidas da Concentração de Fosfato

Para as medidas da concentração de fosfato foram realizadas medidas

capacitância por tensão utilizando frequência de 10 kHz. Foram testadas diferentes concentrações de sal de fosfato dissolvidos em água. A figura (10) mostra a curva capacitância por tensão em função da concentração do fosfato. As medidas foram realizadas em sala escura à temperatura de 20°C. Com a medida da capacitância por tensão em função da concentração de fosfato, pode-se extrair os valores de  $V_{FB}$  para cada um dos valores da concentração de fosfato, e com isso obtendo-se a curva  $V_{FB}$  em função da concentração de fosfato, como mostra a figura (11), e obtendo o valor da sensibilidade de 347 mV/mg/dl.

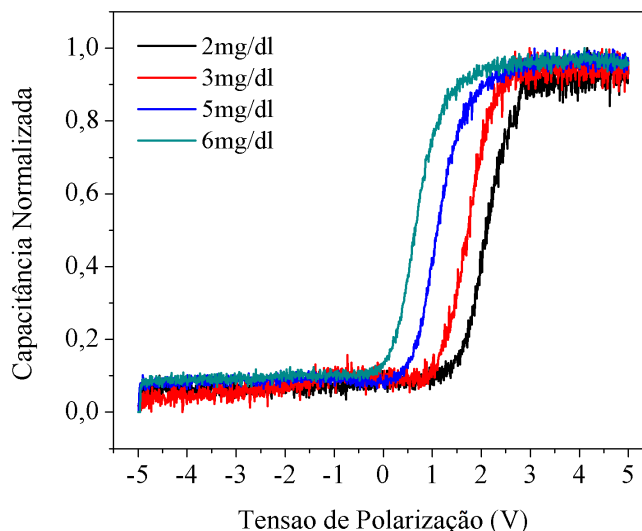


Figura-10: Curva capacitância normalizada por tensão em função da concentração de fosfato em solução das medidas realizadas no dispositivo EIS.

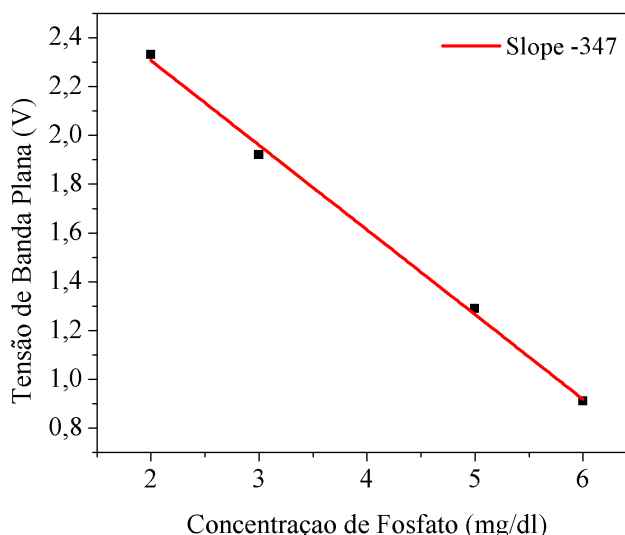


Figura-11: Curva  $V_{FB}$  em função da concentração de fosfato utilizada para o cálculo da sensibilidade do dispositivo EIS para as medidas da concentração de fosfato em solução.

## 5 | SIMULAÇÃO DO TRANSISTOR DE EFEITO DE CAMPO

Foram realizadas simulações estruturais e elétricas em relação ao processo de fabricação do transistor, como descrito anteriormente no item (2.2). Para a simulação



das etapas do processo de fabricação foi utilizado o programa ATHENA. A figura (12) apresenta a estrutura final simulada do transistor PMOS.

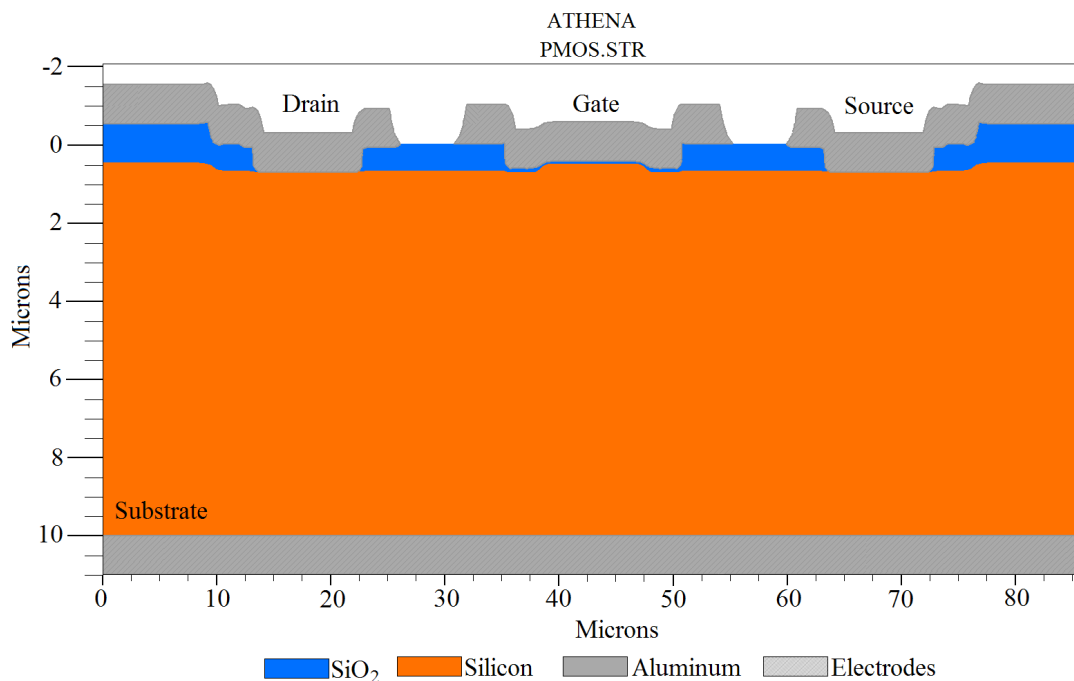


Figura-12: Representação da estrutura final do transistor PMOS simulada pelo programa ATHENA em relação ao processo de fabricação.

A figura (13) apresenta o resultado da simulação elétrica do transistor PMOS em relação a estrutura anterior. Para a simulação elétrica foi utilizado o programa ATLAS.

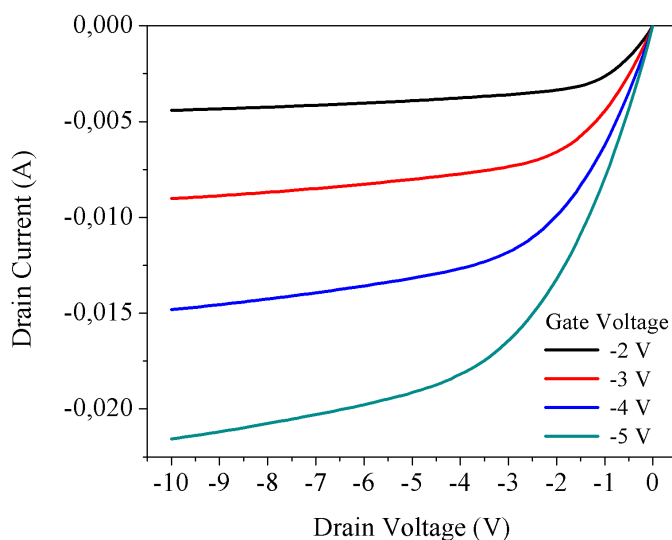


Figura-13: Resultado da simulação elétrica do transistor PMOS feita pelo programa ATLAS em relação a estrutura final.

## 6 | CALIBRAÇÃO E TESTES DO ISFET

Primeiramente o ISFET será calibrado através das medidas potenciométricas em função da concentração do íon fosfato em solução e do pH. Serão utilizados amostras de

solução com concentrações diferentes de íon fosfato e soluções tampão de diferentes pH. A saída do ISFET será ligada a um circuito de um amplificador operacional e de um circuito micro-controlador para que se possa fazer a interface e aquisição de dados em um computador. Após essa etapa os testes serão realizados com o dispositivo final onde o ISFET possuirá um encapsulamento com entrada e saída para o fluxo do líquido pós-hemodiálise (dialisato total final), permitindo que o ISFET possa fazer medidas contínuas da concentração do íon fosfato. Isso será possível conectando a entrada do dispositivo a saída de uma bomba de infusão volumétrica que pode controlar e medir o fluxo de solução, como ilustra a figura (14).



Figura-14: Bomba de infusão volumétrica para medida e controle do fluxo de solução.

A entrada da bomba de infusão será conectada a saída (drenagem) da máquina de hemodiálise. As conexões entre a máquina de hemodiálise, a bomba de infusão volumétrica, o dispositivo final contendo o ISFET e a drenagem definitiva, são hidráulicas, e sendo elétrica a conexão entre o dispositivo final e o computador para aquisição de dados, como ilustra a figura (15).

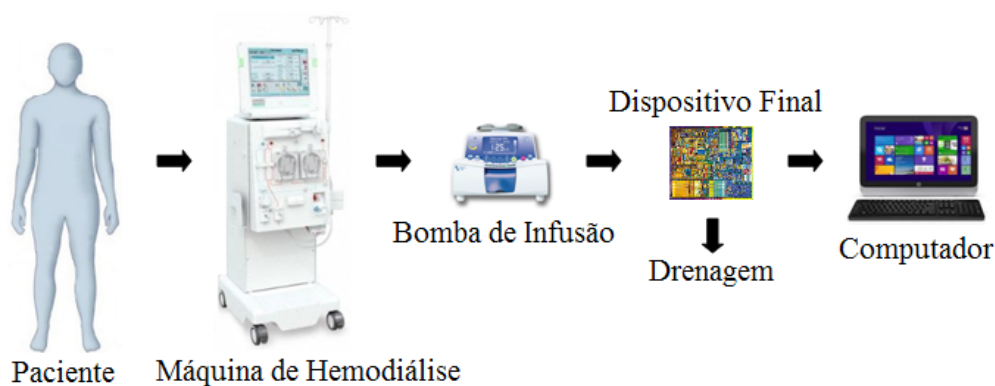


Figura-15: Ilustração da implementação da bomba de infusão volumétrica e do dispositivo final no processo de hemodiálise.

Os testes com o ISFET serão realizados com as medidas da concentração de fosfato em amostras do dialisato total final fornecidas pelo Departamento de Clínica Médica (Nefrologia) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, e os resultados das medidas serão comparados com os obtidos das análises químicas feitas em laboratório.

## 7 | CONCLUSÕES

O trabalho mostrou os resultados na obtenção do dispositivo EIS formado pela estrutura ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2/\text{Si}$ ) para as medidas de pH e da concentração de fosfato. A camada de intermediária de  $\text{SiO}_2$  se fez necessário para evitar fuga de cargas da solução depositada na camada de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  para o substrato de Si. Para as medidas de pH, o dispositivo EIS construído apresentou uma sensibilidade (107mV/pH), que de acordo com a literatura, está bem acima do limite de Nernst. Isto pode ser atribuído a maior capacidade de adsorção da área de superfície do  $\text{Al}_2\text{O}_3$  amorfo, como observado na análise de espectroscopia Raman e de raios-X. E o resultado obtido da sensibilidade extraída da curva  $V_{\text{FB}}$  em função da concentração de fosfato (347mV/mg/dl), mostrou a alta sensibilidade do dispositivo na detecção do íon fosfato em solução. Todos os processos desenvolvidos no EIS serão aplicados ao ISFET para medidas da concentração do fosfato no dialisato total final e conseqüentemente quantizar a massa de fósforo extraída do renal crônico durante a sessão de hemodiálise.

## REFERÊNCIAS

ALBALATE M, PIEDRA C, FERNANDEZ C, LEFORT M, SANTANA H, HERNANDO P, HERNANDEZ J, CAMELO C. **Association between phosphate removal and markers of bone turnover in hemodialysis patients.** Nephrol Dial Transplant. 2006; 21:1626- 1632.

**BERGVELD, P.** Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. **IEEE Trans. Biomed. Eng., 1970a. p. 70-71.**

BERGVELD, P. **ISFET, theory and practice.** Toronto, Canada: IEEE Sensor Conference Toronto, 2003b.

BLOCK GA, KLASSEN PS, LAZARUS JM, OFSTHUN N, LOWRIE EG, CHERTOW GM. **Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis.** J Am Soc Nephrol. 2004; 15:2208-2218.

BOUSSE, L.; VAN DER VLEKKERT, H. H.; DE ROOIJ, N. F. **Hysteresis in  $\text{Al}_2\text{O}_3$ - gate ISFETs.** Sensors and Actuators, 1990. p. 103-110.

**BOUSSE, L.; MOSTARSHED, S.** Comparison of the hysteresis of  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  and  $\text{Si}_3\text{N}_4$  pH-sensing insulator. **Sensors and Actuators, 1994. p. 157-164.**

CASTELLARNAU, M.; ZINE, N.; BAUSELLS, J.; MADRID, C.; JUAREZ, A.; SAMITIER, J.; ERRACHID, A. **Integrated cell positioning and cell-based ISFET biosensors.** Sensors and Actuators, 2007. p. 615-620.

GALLAR P, ORTIZ M, ORTEGA O, RODRIGUEZ I, SEIJAS V, CARRAÑO A, OLIET A, VIGIL A. **Factores en la eliminación de P en hemodialysis.** Nefrología. 2007; 27:46-52.

GUTZWILLER JP, SCHNEDITZ D, HUBER AR, SCHINDLER C, GUTZWILLER F, ZEHNDER CE. **Estimating phosphate removal in hemodialysis: an additional tool to quantify dialysis dose.** Nephrol Dial Transplant. 2002; 17:1037-1044.

HOU SH, ZHAO J, ELLMAN CF, HU J, GRIFFIN Z, SPIEGEL DM, BORDEAU JE. **Calcium and**

**phosphorus fluxes during hemodialysis with low calcium dialysate.** Am J Kidney Dis. 1991; 18:217-224.

**ISHIJI, T.; TAKAHASHI, K.** Selective detection of acetylene gas extracted from isolation oil by an electrochemical sensor using a gold electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, 1993. p. 771-774.

JIMENEZ, C.; DOMINGUEZ, C.; FUENTES, O. A.; LASTRES, A.; VALDES, E. **Sensores y Microsistemas: Microsensores de estado solido tipo ISFET.** Cyted, 2006.

KATES DM, SHERRARD DJ, ANDRESS DL. **Evidence that serum phosphate is independently associated with serum PTH in patients with chronic renal failure.** Am J Kidney Dis. 1997; 30:809-813.

LEE, C. H.; SEO, H.; LEE, Y. C.; CHO, B. W.; JEONG, H.; SOHN, B. K. **All solid type ISFET glucose sensor with fast response and high sensitivity characteristics.** Sensors and Actuators, 2000. p. 37-41.

MARTINOIA, S.; MASSOBRIO, G.; LORENZELLI, L. **Modeling ISFET microsensor and ISFET-based microsystems: a review.** Sensors and Actuators, 2005. p. 14-27.

MATSO, T.; ESASHI, M. **Method of ISFET fabrication.** Sensors and Actuators, 1981. p. 77-96.

MIDDELHAEK, S.; AUDET, S. A.; PAN, T. M.; LIAO, K. M. **Comparision of structural and sensing characteristics of Pr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PrTiO sensing membrane for pH-ISFET application.** Sensors and Actuators, 2008.

MINUTOLO R, BELLIZZI V, CIOFFI M, IODICE C, GIANNATTASIO P, ANDREUCCI M, TERRACCIANO V, DI IORIO BR, CONTE G, DE NICOLA L. **Postdialytic rebound of serum phosphorus: Pathogenetic and clinical insights.** J Am Soc Nephrol. 2002; 13:1046- 1054.

RIZZOLI R, BONJOUR JP. **Physiology of calcium and phosphate homeostases.** Dinamics of Bone and Cartilage Metabolism. 2 nd. Edition. Burlington-USA; Elsevier inc. 2006. p. 345- 357.

SANT, W.; POURCIEL, M.L.; LAUNAY, J.; DO CONTO, T.; MARTINEZ, A.; TEMPLE-BOYER, P. **Development of chemical field effect transistors for the detection of urea.** Sensors and Actuators, 2003. p. 309-314.

SCHUCK O, KASLIKOVA J. **Kinetics of phosphorus during hemodialysis and the calculation of its effective dialysis clearance.** Clin Nephrol. 1997; 47:379-383.

SIGRIST M, MCINTYRE CW. **Calcium exposure and removal in chronic hemodialysis patients.** J Renal Nutr. 2006; 16:41-46.

SPALDING EM, CHAMNEY PW, FARRINGTON K. **Phosphate kinetics during hemodialysis: Evidence for biphasic regulation.** Kidney Int. 2002; 61:655-667.

WOHLTJEN, H. **Chemical microsensors and microinstrumentation.** Anal. Chem., 1984. p. 87A-103A.

YOUNG EW, ALBERT JM, SATAYATHUM S, GOODKIN DA, PISONI RL, AKIBA T, AKIZAWA T, KUROKAWA K, BOMMER J, PIERA L, PORT FK. **Predictors and consequences of altered mineral metabolism:the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study.** Kidney Int. 2005; 67:1179-1187.

## COMPLEXIDADE DE LEMPEL-ZIV NA ANÁLISE DO TRANSPORTE DO POLIETILENOGLICOL ATRAVÉS DO NANOPORO DE ALFA-HEMOLISINA

### **Gesilda Florenço das Neves**

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA). Recife-Pernambuco.

### **Dijanah Cota Machado**

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Biofísica e Radiobiologia (DBR). Recife-Pernambuco.

### **Carlos Manuel Machado Carneiro**

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Biofísica e Radiobiologia (DBR). Recife-Pernambuco.

### **Luiz Hamiel Almeida Consoni**

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Biofísica e Radiobiologia (DBR). Recife-Pernambuco.

### **Cláudio Gabriel Rodrigues**

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Biofísica e Radiobiologia (DBR). Recife-Pernambuco.

### **Romildo Albuquerque Nogueira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA). Recife-Pernambuco.

**RESUMO:** A complexidade de Lempel-Ziv foi desenvolvida com o objetivo de determinar a complexidade de sequências finitas. Neste trabalho, este método estatístico foi aplicado na análise do particionamento do polietilenoglicol no nanoporo unitário de alfa-hemolisina

inserido em uma bicamada lipídica plana. O objetivo foi investigar o processo de chegada e permanência da molécula polimérica (analito) no nanoporo (biossensor). Nossos resultados mostram que, sob as condições estudadas, o biossensor baseado no nanoporo de alfa-hemolisina comportou-se como um processo estocástico tanto para o tempo de chegada do analito na boca do nanoporo quanto para seu tempo de permanência no lúmen do poro.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biossensor. Alfa-hemolisina. CLZ. Nanoporo. Aleatoriedade.

**ABSTRACT:** The complexity of Lempel-Ziv developed with the purpose of determining the complexity of finite sequences was applied in this work to analyze the partitioning of polyethylene glycol in a single nanopore of alpha-hemolysin inserted in a planar lipid bilayer. The objective of this study was to investigate the process arrival and permanence of the polymer molecule (analyte) in the nanopore (biosensor). Our results show that under the conditions studied the biosensing with alpha-hemolysin nanopore behaved as a stochastic process both for the time of arrival of the analyte at the mouth of the nanopore and for its permanence time inside the pore.

**KEYWORDS:** Biosensor. Alpha hemolysin. CLZ. Nanopore. Randomness.

## 1 | INTRODUÇÃO

Métodos estatísticos baseados em dinâmica não linear são amplamente empregados na análise e descrição adequada de processos nas áreas de química, física e biologia. O aumento na capacidade de processamento computacional, juntamente com o desenvolvimento de linguagens de programação e algoritmos possibilitaram a disponibilização de programas de simulação e previsão em processos que há alguns anos seriam inexecutáveis. O método da complexidade de Lempel Ziv (CLZ) permite calcular a complexidade de uma série temporal sem a necessidade de longos segmentos de dados.

Uma série temporal corresponde a um conjunto de dados coletados em diferentes intervalos de tempo. O valor da CLZ correlaciona-se com a estocasticidade ou determinismo de uma série temporal. Séries temporais com o CLZ próximo de 1 são consideradas aleatórias; CLZs próximos a zero representam séries determinísticas (ABOY et al., 2006). Este método foi empregado em vários estudos para análise e inferência da complexidade em: segmentos de DNA (NUNES, 2014), ritmicidade elétrica pancreática *in silico* (NEVES et al., 2014), déficits cognitivos em pacientes esquizofrênicos (IBÁÑEZ-MOLINA et al., 2017).

Séries temporais podem ser obtidas por meio da aquisição de registros de corrente iônica gerada devido ao fluxo de íons através de nanoporos proteicos (HILLE, 2001). O poro proteico formado pela alfa-hemolisina ( $\alpha$ HL) de *Staphylococcus aureus* é o principal nanoporos empregado no biossensoriamento estocástico (REINER et al., 2012). O biossensoriamento estocástico é uma abordagem que se baseia na observação de eventos de ligação entre as moléculas individuais de analitos e um único receptor (AGUIAR et al., 2015).

O nanoporos de  $\alpha$ HL tem sido empregado na detecção de fármacos (KANG et al., 2006), polímeros (RODRIGUES et al., 2008, 2011) e até no sequenciamento de DNA (DING et al., 2010; FENG et al., 2015). O mecanismo de detecção ocorre com a entrada ou translocação do analito através do lúmen aquoso do nanoporos. Cada molécula entrante ou translocante produz uma variação discretizada (bloqueio) na corrente iônica. O bloqueio é caracterizado por uma amplitude e um intervalo temporal, que representa o tempo de permanência (TP) do analito no nanoporos. Outro parâmetro importante no biossensoriamento estocástico é o intervalo temporal que o analito não está presente no lúmen do nanoporos, ou seja, é o tempo de ausência (TA) (Figura 1). Neste contexto empregamos o método da CLZ na análise das séries temporais TP ou TA visando inferir se o processo de particionamento do polímero polietilenoglicol (PEG) no sistema solução / nanoporos é um processo estocástico ou determinístico.



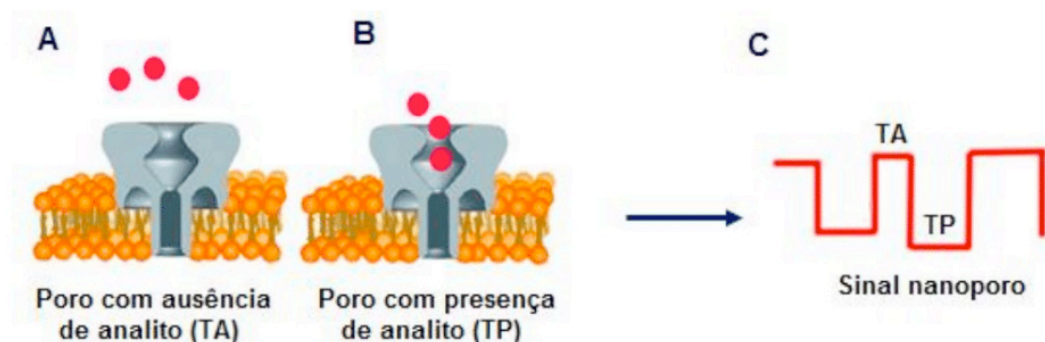


Figura 1. Nanoporo unitário de  $\alpha$ HL inserido em uma bicamada lipídica plana. (A) Moléculas do analito (círculo vermelho) aproximando-se da entrada do nanoporo. Na ausência de analito no interior do nanoporo a corrente iônica tem valor máximo. (B) Moléculas do analito translocando-se pelo interior do nanoporo causando um bloqueio na corrente iônica que flui pelo nanoporo. (C) Representação da série temporal de flutuações da corrente iônica do nanoporo. TA (tempo de ausência) representa o tempo que a corrente iônica do nanoporo é máxima, ou seja, ausência de analito no seu lúmen. TP (tempo de permanência) representa o tempo que o nanoporo permanece bloqueado pelo analito caracterizado por um decréscimo na corrente iônica.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Experimental

Todas as bicamadas lipídicas planas livres de solvente foram confeccionadas conforme as técnicas convencionais de construção de membranas (MONTAL & MUELLER, 1972). Esta técnica consiste basicamente na formação de uma bicamada lipídica por aposição de dois filmes monomoleculares de lipídeo sintético, num orifício de uma partição de Teflon® (Politetrafluoretileno) que separa dois compartimentos de uma câmara experimental também de Teflon®, contendo soluções aquosas.

Foram adicionados em cada hemicâmara aproximadamente 10  $\mu$ l de uma solução de diftanoil glicerofosfocolina 2% (p/v) em hexano. Decorridos aproximadamente 10 minutos, com a evaporação do hexano, ocorreu a formação espontânea dos filmes lipídicos monomoleculares na superfície da solução aquosa de cada compartimento. Posteriormente o menisco do líquido de um dos compartimentos foi elevado por adição de mais solução, formando a primeira monocamada. Este mesmo procedimento foi realizado no compartimento oposto para a formação da bicamada. A formação da membrana foi monitorada usando lupa binocular e principalmente pelo aumento da corrente capacitiva basal.

Após a construção da bicamada lipídica realizou-se a incorporação de um único nanoporo pela adição de uma alíquota de  $\alpha$ -hemolisina na solução de uma das hemicâmaras. Posteriormente, adicionou-se o polietilenoglicol monodisperso de peso molecular 1294 (PEG 1294) ao compartimento oposto da câmara experimental e registrou-se a corrente iônica fluente através do nanoporo. Todos os experimentos foram realizados em condições de fixação de voltagem (20 a 100 mV,  $\Delta=20$  mV), solução

banhante composta por KCl 4 M, Tris 5 mM, pH 7,5 e em temperatura controlada  $23 \pm 2$  °C. Um condutivímetro (Radiometer Analytical, CDM230) foi utilizado na determinação da condutividade de todas as soluções utilizadas nos experimentos.

Com a finalidade de minimizar a interferência de perturbações mecânicas e eletromagnéticas, toda a montagem do sistema experimental foi mantida sobre uma mesa de amortecimento de alta performance (TMC 63-500, USA) e blindada por uma gaiola de Faraday. Em todos os experimentos o sistema utilizado para estimulação, monitoração e aquisição dos registros era constituído por um gerador de onda triangular, um amplificador de patch clamp Axopatch 200B (Molecular devices, Foster City, CA), uma placa conversora analógico-digital (PCI 6024E da National Instruments Corporation ou DIGIDATA 1440 da Molecular Devices) acoplada a um microcomputador IBM PC compatível. Os registros de corrente iônica através dos nanoporos foram processados a 15 kHz e aquisitados a 100 ou 250 kHz. A conexão das soluções da câmara ao sistema de medidas elétricas se deu através de pontes salinas do tipo Ágar-KCl (3% em peso de Ágar em KCl 3 M) e eletrodos de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl). A alfa-hemolisina foi adquirida da Calbiochem (USA) e o lipídeo diftanoil glicerofosfocolina da Avanti Polar Lipids (USA) (Figura 2).

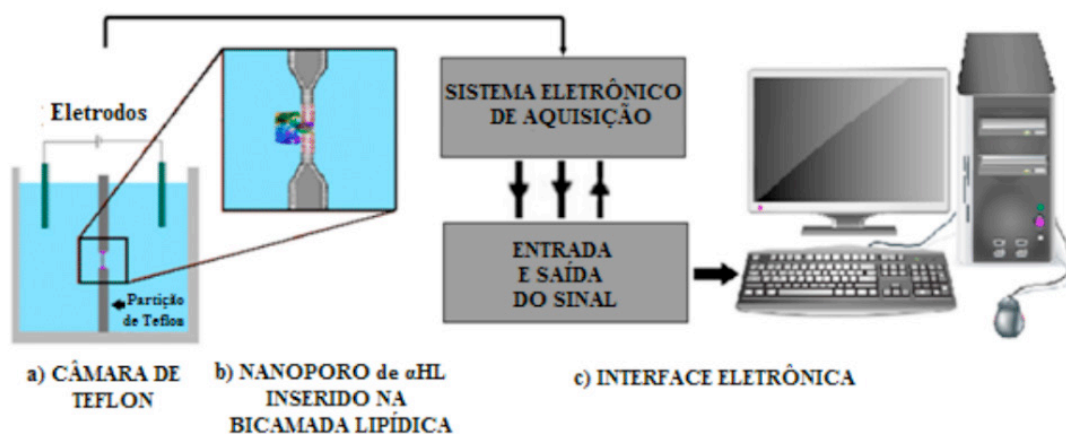


Figura 2. Representação esquemática da montagem experimental. (A) Câmara de Teflon. (B) Formação da bicamada lipídica e inserção de um poro nanométrico no orifício de um filme de Teflon o qual separa dois compartimentos contendo solução eletrolítica. (C) Diagrama da interface eletrônica para monitoramento e registro da corrente iônica.

## 2.2 Teórico

### 2.2.1 QUB

Os registros de corrente iônica foram segmentados em séries temporais de TP's e TA's através do Software QuB ([www.qub.buffalo.edu](http://www.qub.buffalo.edu)) e analisado pelo método do CLZ.

### 2.2.2 Lempel-Ziv

O Lempel-Ziv é um método de cálculo de complexidade e avaliação da aleatoriedade em um sinal unidimensional ou sequências finitas. É considerada uma

medida não paramétrica de complexidade que reflete o padrão da série (LEMPEL; ZIV, 1976; ABÁSOLO et al., 2006; GÓMEZ et al., 2016). Para calcular a CLZ é necessário transformar a série temporal em uma sequência binária que é gerada a partir da comparação de cada ponto de tempo da série com uma média de todos os pontos na série.

Se o valor do ponto é maior do que a média, passa a ser representado por 1, se é menor do que a média será representado por 0. Deste modo obtém-se uma sequência formada por 1 e 0 (ABÁSOLO et al., 2006).

A complexidade de uma série pode ser medida da seguinte forma:

Seja uma série  $X = x(1), x(2), \dots, x(N)$  que é convertida numa sequência 0-1 gerando um  $P = s(1), s(2), \dots, s(N)$ , com  $s(i)$  definida por:

$$s_{(i)} = \begin{cases} 0, & \text{se } s_{(i)} < \text{média} \\ 1, & \text{se } s_{(i)} \geq \text{média} \end{cases}$$

Depois, esta cadeia de caracteres (P) é escaneada da esquerda para a direita e um contador de complexidade  $C(n)$  é aumentado em uma unidade cada vez que uma nova subsequência de caracteres consecutivos é encontrada no processo de escaneamento. Finalmente,  $c(n)$  é normalizado de modo a obter uma medida de complexidade independente do comprimento da sequência. Para uma conversão binária, o limite superior de  $c(n)$  é dado por  $b(n) = n/\log_2(n)$ , e  $c(n)$  pode ser normalizado via  $b(n)$ :

$$CLZ = \frac{c(n)}{b(n)}$$

O resultado do cálculo da CLZ é entre 0 e 1. Quanto mais próximo de 1 for o resultado maior a CLZ e mais aleatório será o comportamento do sinal, quanto mais próximo o resultado for de 0 menor será a CLZ, indicando que a série tem maior auto-similaridade (ABOY et al., 2006; NEVES et al., 2014; GÓMEZ et al., 2016). Os resultados foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis e post hoc de Dunn.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 3 representa o registro típico da corrente iônica através do nanoporo da  $\alpha$ HL na presença de PEG1294 na concentração de 2 mM. Nota-se que os bloqueios (variações discretizadas) correspondem a presença de uma molécula do PEG no lúmen do nanoporo. Similarmente a outros relatos (ROBERTSON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008) a amplitude dos bloqueios é praticamente constante e se deve a monodispersidade do polímero.

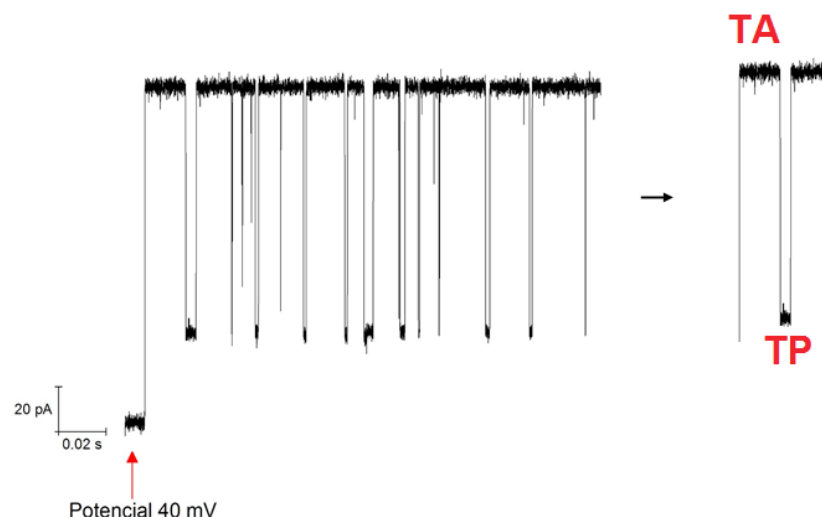


Figura 3. Registro da corrente iônica do nanoporo de  $\alpha$ HL na presença de PEG. A entrada de uma molécula do PEG provoca o bloqueio temporário da corrente iônica (TP) e a saída da molécula resulta no retorno da corrente iônica do nanoporo ao seu valor máximo (TA). Voltagem aplicada: 40 mV.-

Pela escassez de trabalhos que inferem matematicamente as propriedades estocásticas do bloqueio e desbloqueio em biossensores baseados em nanoporos proteicos (Movileanu et al. 2005), utilizamos a CLZ para ajudar a esclarecer o perfil da translocação de moléculas em nanoporos. O Lempel-Ziv é uma medida bastante usada para caracterizar a complexidade em sinais biológicos (HU; GAO; PRINCIPE, 2006; HUDETZ et al., 2016). O CLZ é um método de cálculo de complexidade e avaliação da aleatoriedade em um sinal unidimensional ou sequências finitas.

Os altos valores de CLZ (aproximadamente igual a 1) obtidos para sequência dos tempos de permanência nos estados abertos e bloqueados podem sugerir, matematicamente, que os nanoporos de  $\alpha$ HL, nas condições estudadas neste trabalho, se comportam como um biossensor estocástico. As análises com a CLZ mostraram uma alta complexidade nas duas concentrações de PEG testadas e em todas as voltagens aplicadas. Não houve diferenças significativas nos valores de CLZ nas diferentes voltagens e concentrações para um  $p < 0.05$  através do teste de Kruskal-Wallis (Tabela 1).

| CONCENT.<br>VOLTAGEM | 1mM           |               | 2mM           |               |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                      | TP            | TA            | TP            | TA            |
| <b>20mV</b>          | 0.9662±0.0051 | 0.8459±0.0516 | 0.9760±0.0104 | 0.8965±0.0174 |
| <b>40mV</b>          | 0.9704±0.0007 | 0.8717±0.0167 | 0.9762±0.0177 | 0.8937±0.0091 |
| <b>60mV</b>          | 0.948±0.02720 | 0.9095±0.0101 | 0.9669±0.0088 | 0.9114±0.0051 |
| <b>80mV</b>          | 0.9211±0.0715 | 0.9075±0.0597 | 0.9656±0.0012 | 0.9290±0.0125 |
| <b>100mV</b>         | 0.9500±0.0143 | 0.9354±0.0315 | 0.9557±0.0166 | 0.9546±0.0114 |

Tabela 1. Resultado obtido a partir do algoritmo da CLZ nas análises das séries temporais da corrente iônica do nanoporo de  $\alpha$ HL na presença de PEG 1294, nas concentrações de 1 e 2mM, e aplicação de voltagens de 20 a 100mV (média±desvio padrão),  $p < 0.05$ .

## 4 | CONCLUSÕES

O particionamento do polietilenoglicol monodisperso 1294 no sistema solução/nanoporo da  $\alpha$ HL é modelado adequadamente por um processo estocástico de alta complexidade.

## REFERÊNCIAS

ABÁSULO, D. et al. Analysis of EEG background activity in Alzheimer's disease patients with Lempel-Ziv complexity and central tendency measure. **Medical Engineering and Physics**, v.28, n. 4, p. 315–322, 2006.

ABOY, M. et al. Interpretation of the Lempel-Ziv complexity measure in the context of biomedical signal analysis. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 53, n. 11, p. 2282–2288, 2006.

AGUIAR, J. P. et al. Biossensoriamento estocástico via nanoporo proteico individual no desenvolvimento de ferramentas analíticas. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 817–827, 2015.

NUNES, Ciro Alves Justino. Algoritmo de Lempel-Ziv aplicado à classificação quantitativa de autômatos celulares. 2014. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) -Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

DING, K.J. et al. Progress of Research on Nanopore-macromolecule Detection. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 280–285, 2010.

FENG, Y. et al. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n.1, p. 4–16, 2015.

GÓMEZ, C. et al. Characterization of EEG patterns in brain-injured subjects and controls after a Snoezelen® intervention. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 136, p. 1–9, 2016.

HILLE, B. Ion Channels of excitable Membranes. SINAUER ASSOCIATES, 3ª ed., 2001.

HU, J.; GAO, J.; PRINCIPE, J. C. Analysis of biomedical signals by the Lempel-Ziv complexity: The effect of finite data size. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 53, n. 12, p. 2606–2609, 2006.

HUDETZ, A. G. et al. Propofol anesthesia reduces Lempel-Ziv complexity of spontaneous brain activity in rats. **Neuroscience Letters**, v. 628, p. 132–135, 2016.

IBAÑEZ-MOLINA, A. J. et al. P383 Multiscale Lempel-Ziv complexity in schizophrenia at rest and while performing a naming task. **Clinical Neurophysiology**, v. 128, n. 9, p. e302–e302, 2017.

KANG, X. F. et al. Stochastic detection of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 33, p. 10684–10685, 2006.

LEMPEL, A.; ZIV, J. On the complexity of finite sequences. **IEEE Transactions Information Theory**, v. 22, p. 75–81, 1976.

MONTAL, M.; MUELLER, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 12, p. 3561–3566, 1972.

MOVILEANU, L. et al. Interactions of peptides with a protein pore. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 2, p. 1030–45, 2005.

NEVES, G. F. et al. 60 Hz Electric Field Changes the Membrane Potential During Burst Phase in Pancreatic  $\beta$ -Cells: *In Silico* Analysis. **Acta Biotheoretica**, v. 62, n. 2, p. 133–143, 2014.

REINER, J. E. et al. Disease detection and management via single nanopore-based sensors. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 12, p. 6431–6451, 2012.

RODRIGUES, C. G. et al. Mechanism of KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 11, p. 5186–5192, 2008.

RODRIGUES, C. G. et al. Hofmeister effect in confined spaces: Halogen ions and single molecule detection. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 12, p. 2929–2935, 2011.

ROBERTSON, J. W. F. et al. Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 20, p. 8207–11, 2007.

RODRIGUES, C. G. et al. Mechanism of KCl enhancement in detection of nonionic polymers by nanopore sensors. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 11, p. 5186–5192, 2008.



## METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE ESPECTROFOTÔMETROS: ANÁLISE DA DISPERSÃO DAS MEDIDAS

**Cleonilde Maria do Nascimento**

Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz, Recife-PE

**Carla Luiza Barros Bernardes Borja**

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

**Bruno Edberg Alves de Lira**

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

**Jabson Herber Profiro de Oliveira**

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

**Dijanah Cota Machado**

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

**Milton Marcelino Filho**

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

**RESUMO:** A espectrofotometria é um método biofísico que se baseia na relação existente entre a absorção de luz e a concentração de uma substância em solução amplamente utilizado em laboratórios de análises clínicas e laboratórios de pesquisa, pois permite determinar as concentrações de espécimes químicas diversas. Diante da ampla aplicabilidade do espectrofotômetro, é importante haver uma boa capacitação teórico-prática dos usuários, bem como métodos adequados para avaliar os indicadores de qualidade do equipamento, garantindo assim, a obtenção de resultados experimentais ou clínicos satisfatórios. Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem, entre outros, Especificidade, Sensibilidade, Exatidão e Precisão. Dessa

forma, o objetivo do presente estudo foi fomentar a experiência de alunos com a prática de biofísica, apresentando técnicas de estatística e os métodos de obtenção de indicadores de qualidade, por meio da realização de experimentos laboratoriais utilizando espectrofotômetros. Foram avaliados quatro espectrofotômetros da marca Kasuaki®, modelo IL-226, que são rotineiramente empregados nas aulas práticas da disciplina Física e Biofísica 1 da Universidade Federal de Pernambuco, com a realização de 35 leituras em cada um deles. Os resultados obtidos demonstraram existir uma diferença na exatidão dos equipamentos. Dessa forma sugere-se, como desdobramento deste estudo, a análise dos conceitos de exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** Indicadores de qualidade. Medidas de dispersão. Métodos analíticos. Métodos biofísicos.

**ABSTRACT:** Spectrophotometry is a biophysical method based on the relationship between the light absorption and the concentration of substance in solution. It is widely used in clinical laboratories and research laboratories, because it allows the determination of the concentration of several chemical specimens. Due to the wide applicability of the spectrophotometer, it is important to have a good theoretical and practical training of the users, as well as

adequate methods to evaluate the quality indicators of the equipment, thus guaranteeing satisfactory experimental or clinical results. The validation parameters of analytical methods involve, among others, Specificity, Sensitivity, Accuracy and Precision. The goal of the present study was to encourage the experience of students with the biophysical methods, presenting statistical techniques and methods of obtaining quality indicators, through laboratory experiments using spectrophotometers. Four spectrophotometers of the Kasuaki®, model IL-226, that are routinely used in the practical classes of the discipline of biophysics of the Federal University of Pernambuco, with 35 readings in each one. The results obtained showed a difference in the accuracy of the equipment. In this way, the analysis of the concepts of accuracy, sensitivity and reproducibility is suggested as the outcome of this study.

**KEYWORDS:** Quality Indicators. Measures of dispersion. Analytical methods. Biophysical methods.

## 1 | INTRODUÇÃO

A investigação científica na área das ciências da vida, associada aos conhecimentos da química e da física, permitiu o desenvolvimento de inúmeras técnicas e metodologias analíticas (CISTERNAS; VARGAS; MONTE, 2005). A espectrofotometria está entre estas técnicas e é amplamente utilizada em laboratórios de análises clínicas e laboratórios de pesquisa, principalmente nas investigações bioquímicas, físicas, químicas e farmacológicas (CERRI *et al.*, 2017).

A espectrofotometria, juntamente com a fotolorimetria, é um método biofísico que se baseia na relação existente entre a absorção de luz e a concentração de uma substância em solução, permitindo determinar as concentrações de espécimes químicas diversas, como carboidratos, proteínas, lipídios, colesterol entre outras (HIRANO *et al.*, 2001). No âmbito clínico, a análise quantitativa de biomoléculas presentes nos fluidos biológicos (urina, plasma ou soro) é essencial para a compreensão de disfunções metabólicas desencadeadas por alguma patologia.

Por meio da espectrofotometria, aplicada às análises clínicas, e por outras tecnologias, diretrizes da área médica foram sendo estabelecidas para a condução de um diagnóstico mais consistente e assertivo, possibilitando assim um encaminhamento terapêutico eficaz (CERRI *et al.*, 2017).

Além das inúmeras aplicações nas análises clínicas e na pesquisa científica, a espectrofotometria pode ser também aplicada na área odontológica. O espectrofotômetro está entre os instrumentos mais precisos, úteis e de fácil utilização para mensuração de cor, sendo capaz de fornecer o espectro de emissão de luz dos dentes vitais ou extraídos e dos materiais restauradores (DIESEL, 2011).

A espectrofotometria também é utilizada em diversos setores da indústria, principalmente têxtil, alimentício, químico e farmacêutico, que utilizam em seus produtos e processos os mais variados tipos de corantes. Alguns corantes sintéticos

utilizados em alimentos, como também em medicamentos e cosméticos, apresentam potencial toxicológico e por conta disto se faz necessária a realização de medidas espectrofotométricas para o controle de qualidade de tais compostos (SANTOS *et al.*, 2010). No Brasil, a utilização destes corantes é normatizada pela ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 1977).

Diante da ampla aplicabilidade do espectrofotômetro, é importante se ter uma boa capacitação teórico-prática dos usuários, bem como métodos para avaliar os indicadores de qualidade do equipamento, garantindo assim, a obtenção de resultados experimentais ou clínicos satisfatórios.

Alguns parâmetros utilizados na validação de métodos analíticos são: 1) Especificidade, que pode ser definida como a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes; 2) Sensibilidade, entendida como a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas; 3) Exatidão, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico; e 4) Precisão, que é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra, normalmente expressa como o desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV) de diversas medidas (BRITO, 2003).

Esses parâmetros são de extrema importância para a validação de qualquer método analítico desenvolvido, possibilitando o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises. Os parâmetros a serem avaliados irão depender do propósito do método. No entanto, a exatidão e a precisão do método constituem parâmetros sempre estudados, independente do seu propósito, exceto para métodos com objetivo apenas qualitativo. Os instrumentos utilizados na medição de volume, temperatura, massa, entre outros, devem apresentar o máximo possível de exatidão e precisão (BRITO, 2003; MUNDO EDUCAÇÃO, 2018).

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi fomentar a experiência de alunos com a prática de biofísica, com as técnicas de estatística e com os métodos de obtenção de indicadores de qualidade, por meio da realização de experimentos laboratoriais utilizando espectrofotômetros, mais especificamente, analisando a dispersão das medidas de absorbância apresentadas por estes equipamentos.

## 2 | METODOLOGIA

Foram avaliados quatro espectrofotômetros da marca Kasuaki®, modelo IL-226 (Figura 1), rotineiramente empregados nas aulas práticas da disciplina Física e Biofísica 1, ministrada para os cursos das áreas de saúde e biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Os números de série de cada equipamento são: 20152166 (equipamento 1); 20152167 (equipamento 2); 20152168 (equipamento 3); e 20152169 (equipamento 4).

Para as medidas de absorvência, foram utilizadas cubetas de vidro e uma solução aquosa do corante vermelho neutro a 0,00125% (p/v). Para calibrar o “zero” de absorvência utilizou-se como “branco” uma cubeta contendo água destilada. Todos os equipamentos foram ligados dez minutos antes de iniciar os testes, tempo requerido para estabilizá-los. Após este tempo, foi selecionado o comprimento de onda de 520 nm nos espectrofotômetros, o qual corresponde ao fotopico da substância utilizada, motivo para sua escolha.



**Figura 1:** Vista externa do espectrofotômetro, marca Kasuaki®, modelo IL-226.

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

Na tentativa de diminuir o erro das medidas experimentais foi utilizada uma única cubeta para todas as medidas. Em cada medida, adicionava-se 3 mL de vermelho neutro a 0,00125% (p/v) à cubeta e em seguida a colocava no primeiro compartimento do porta-cubeta do primeiro equipamento. Após a leitura, retirava-se a cubeta e a colocava no segundo equipamento, este procedimento se repetia até chegar-se ao quarto equipamento.

Como foi observado que a localização lateral da cubeta no porta-cubeta altera de modo significativo os valores medidos para a absorvência, padronizou-se a posição de inserção da cubeta neste suporte, sendo todas as medidas realizadas com a cubeta posicionada na porção mais à esquerda do porta-cubeta, como pode ser observado na figura 2.

Ao final desta rodada de medidas, desprezava-se a amostra e adicionava-se uma nova amostra à cubeta, repetindo-se o procedimento descrito acima. Para realização de uma adequada análise estatística, foram feitas trinta e cinco medidas de

absorbância em cada um dos equipamentos. Na leitura dos valores de absorbância foram consideradas três casas decimais.



**Figura 2:** Posicionamento da cubeta no porta-cubeta do equipamento.

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

Os dados obtidos foram inicialmente analisados quanto à normalidade de sua distribuição, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk (nível de significância de  $\alpha=0,05$ ), e estatística descritiva incluindo mediana, intervalo interquartil (IIQ) e intervalo de confiança da média para as amostras com distribuição normal. Na análise estatística foi utilizado o programa R CRAN v.3.4.2.

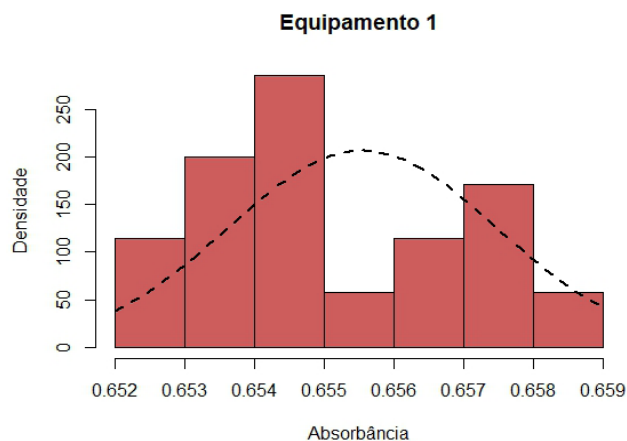
### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o espalhamento dos dados obtidos foi utilizada a medida de dispersão da absorbância. Destaca-se que dispersão dos dados é um conceito que diz respeito a como e o quanto os dados estão próximos ou distantes entre si.

Nos resultados obtidos foram encontrados quatro *outliers* (medidas atípicas), dois nas medidas realizadas com o equipamento 2 e dois nas medidas com o equipamento 3. Estes foram excluídos do conjunto de dados. Em sequência foram obtidos os resultados de cada equipamento, que serão descritos nos próximos parágrafos.

As medidas obtidas no equipamento 1 tiveram uma mediana de 0,6910. Como evidenciado na figura 3, os dados **não** apresentaram distribuição normal. Fato confirmado através do teste estatístico de Shapiro-Wilk ( $p\text{-valor}<0,05$ ).

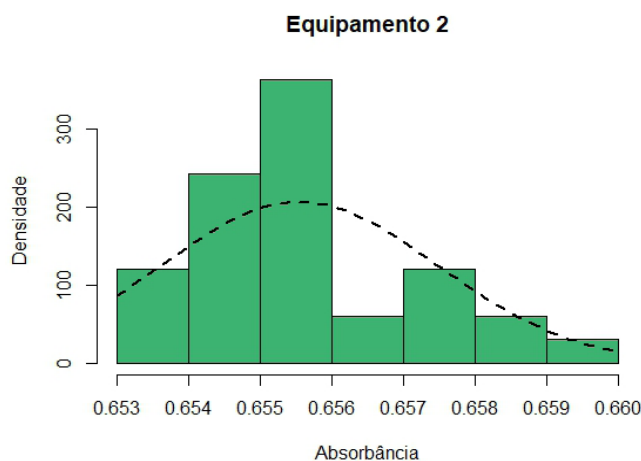




**Figura 3:** Distribuição de frequência das medidas obtidas com o equipamento 1 (n=35).

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

As medidas obtidas no equipamento 2 tiveram uma mediana de 0,6560. Como evidenciado na figura 4 e comprovado estatisticamente, os dados **não** apresentaram distribuição normal ( $p\text{-valor} < 0,05$ ).

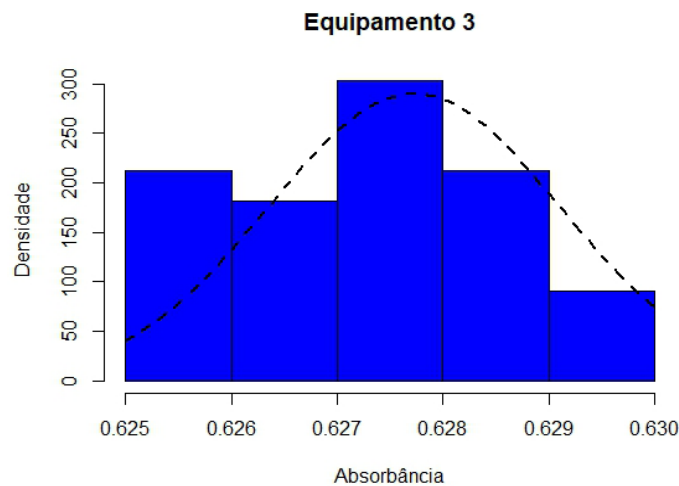


**Figura 4:** Distribuição de frequência das medidas obtidas com o equipamento 2 (n=33).

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

As medidas obtidas no equipamento 3 tiveram uma mediana de 0,6280. Como evidenciado na figura 5 e comprovado estatisticamente, os dados **apresentaram** distribuição normal ( $p\text{-valor} > 0,05$ ). Com 95% de confiança pode-se afirmar que a média da população de medidas do equipamento 3 encontra-se entre 0,62725 e 0,62819. O valor da média obtido no equipamento 3 foi de 0,627727.

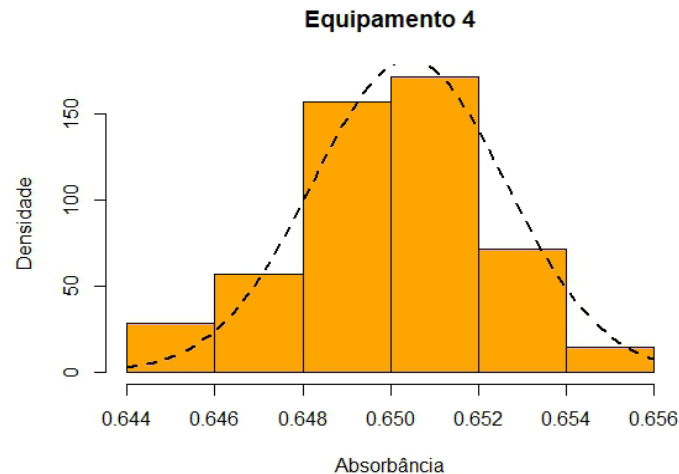




**Figura 5:** Distribuição de frequência das medidas obtidas com o equipamento 3 (n=33).

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

As medidas obtidas no equipamento 4 tiveram uma mediana de 0,6510. Como evidenciado na figura 6 e comprovado estatisticamente, os dados **apresentaram** distribuição normal ( $p\text{-valor} > 0,05$ ). Com 95% de confiança pode-se afirmar que a média da população de medidas do equipamento 4 encontra-se entre 0,64969 e 0,65115. O valor da média obtido no equipamento 4 foi de 0,650428.



**Figura 6:** Distribuição de frequência das medidas obtidas com o equipamento 4 (n=35).

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

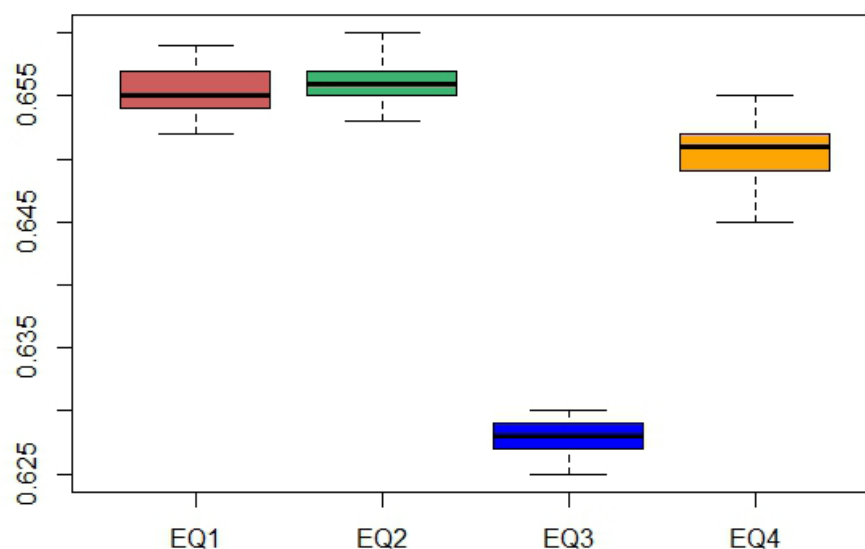
O quadro 1 mostra um resumo da análise estatística dos dados. Pode-se observar que o intervalo interquartil (IIQ) apresentou uma pequena amplitude, isto aconteceu como consequência da pouca dispersão das medidas.

| Equipamentos | <i>n</i> | Mediana | Distribuição normal ? | IIQ   |
|--------------|----------|---------|-----------------------|-------|
| EQ1          | 35       | 0,6550  | Não                   | 0,003 |
| EQ2          | 33       | 0,6560  | Não                   | 0,002 |

|     |    |        |     |       |
|-----|----|--------|-----|-------|
| EQ3 | 33 | 0,6280 | Sim | 0,002 |
| EQ4 | 35 | 0,6510 | Sim | 0,003 |

**Quadro 1:** Análise estatística obtida para cada um dos quatro equipamentos.

Na figura 7 pode-se observar de outra forma o comportamento da dispersão dos dados e suas respectivas medianas, representadas pelas linhas mais escuras nas caixas do gráfico. Com destaque para a semelhança das medianas do equipamento 1 e do equipamento 2 e para uma discrepância da mediana do equipamento 3, em relação aos demais. Ressalta-se também o pequeno grau de dispersão das medidas realizadas pelos quatro equipamentos, como pode ser observado pelos intervalos interquartis.



**Figura 7:** Boxplots comparativos dos dados obtidos com os equipamentos.

Fonte: Elaboração dos autores, 2018.

A literatura em estatística aponta o uso de *boxplot* como uma das alternativas para identificar valores discrepantes (*outliers*) (BARNETT; LEWIS, 1994; SCHWERTMANA; OWENSA; ADNANB, 2004; CARTER; SCHWERTMAN; KISER, 2009; LI *et al.*, 2016), que muito provavelmente são frutos de erros esporádicos nas medições. Na análise dos *boxplots*, as caixas com amplo “corpo” demonstram valores espalhados para as medidas. Estes, quando não controlados, podem vir a influenciar no resultado final de testes estatísticos e consequentemente na conclusão da pesquisa.

Uma técnica que pode ser aplicada com o objetivo de complementar a avaliação dos dados é a análise de variância (ANOVA), ou ainda, seu equivalente para quando os dados não possuírem distribuição normal, o teste Kruskal-Wallis. Em caso de constatação de diferença estatística em pelo menos um grupo (amostra), deve-se aplicar um pós-teste para identificação do grupo ou dos grupos que diferem dos demais. O ANOVA é uma ferramenta estatística aplicável para comparação de médias quando se há pelo menos três grupos de dados com distribuição normal. Entretanto,

quando há somente medidas de dois grupos e estas possuírem distribuição normal, o teste  $t$  para amostras independentes é o indicado para a comparação das médias.

No presente estudo estes testes não foram aplicados pelo fato de existir um considerável número de medidas de mesmo valor (empates), carecendo de outros testes que fogem de seu escopo. Contudo, todas estas ferramentas são recursos úteis para o conhecimento do funcionamento de equipamentos utilizados em pesquisa acadêmica. O contato de alunos de graduação com estes conceitos favorece a familiaridade com estas metodologias.

Entretanto, há necessidade de uma ampliação na análise das medidas realizadas por estes equipamentos, avaliando-se outras características, igualmente importantes, dos equipamentos como a exatidão, a sensibilidade e a reprodutibilidade. Os dados obtidos sugerem existir uma diferença na exatidão dos equipamentos. Assim sugerimos, como desdobramento deste estudo, a análise dos conceitos de exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade. Cabe ressaltar que este não consistiu em um objetivo do presente trabalho.

## 4 | CONCLUSÕES

O presente trabalho representa uma iniciativa positiva no sentido de promover a capacitação dos alunos de graduação da disciplina de Biofísica da UFPE, proporcionando uma avaliação crítica na obtenção de medidas com equipamentos de laboratório.

Os alunos tiveram a oportunidade de constatar, na prática, que os equipamentos apresentaram medidas com pequena dispersão. Entretanto, observou-se a necessidade de investigação da exatidão destes equipamentos.

## REFERÊNCIAS

ALVES, J.K.G.; AUED, N.; SOARES, F.Z.M.; JACQUES, L.B.; KAIZER, M.R.; MALLMANN, A. **Avaliação de cor em compósitos com o espectrofotômetro Easyshade**. RFO, Passo Fundo, v. 19, n. 1, p. 101-106, 2014.

BARNETT V.; LEWIS, T. **Outliers in statistical data**. John Wiley, 1994.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos**. Resolução - CNNPA nº 44, 1977.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. **Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão**. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, jan./dez. 2003

CARTER, N.J.; SCHWERTMAN, N.C.; KISER, T.L. **A comparison of two boxplot methods for detecting univariate outliers which adjust for sample size and asymmetry**. Statistical Methodology, v. 6, p. 604–621, 2009.

CERRI, G.G.; JATENE, F.B.; NOBRE, M.R.; CUCE, BERNARDO, W.M. **Projeto Diretrizes**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Disponível em <[http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto\\_diretrizes/texto\\_introdutorio.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/texto_introdutorio.pdf)> Acesso em 19 de maio de 2017.

CISTERNAS, J.R.; VARGAS, J.; MONTE, O. **Fundamentos de Bioquímica Experimental**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

DIESEL, P.G. **Avaliação da cor de resinas compostas em meios e tempos de armazenamentos distintos usando dois espectrofotômetros**. 07 de fevereiro de 2011, 61 folhas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. RS, Brasil, 2011.

HIRANO, Z.M.B.; SILVA FILHO, H.H.; MULLER, G.C.K.; SCHMIDT, S.R. **Bioquímica – manual prático**. Blumenau: EDIFURB, 2001.

LI, A.; FENG, M.; LI, Y.; LIU, Z. **Application of Outlier Mining in Insider Identification Based on Boxplot Method**. Procedia Computer Science, v. 91, p. 245-251, 2016.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para Laboratório – princípios e interpretações**. 5ª edição. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

MUNDO EDUCAÇÃO. **Exatidão e Precisão das Medidas**. Disponível em:<<https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/exatidao-precisao-das-medidas.htm>>. Acesso em 16 de novembro de 2018.

SANTOS, M.E.D.; DEMIATE, I.M.; NAGATA, N. **Determinação simultânea de amarelo tartrazina e amarelo crepúsculo em alimentos via espectrofotometria UV-VIS e métodos de calibração multivariada**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, p. 903-909, 2010.

SCHWERTMANA, N.C.; OWENSA, M.A.; ADNANB, R. **A simple more general boxplot method for identifying outliers**. Computational Statistics & Data Analysis, v. 47, p. 165-174, 2004.

## APÊNDICE

Tabela com os valores de absorbância medidos nos quatro equipamentos utilizados neste estudo:

|    | EQ1   | EQ2   | EQ3   | EQ4   |
|----|-------|-------|-------|-------|
| 1  | 0,654 | 0,653 | 0,626 | 0,645 |
| 2  | 0,657 | 0,656 | 0,627 | 0,648 |
| 3  | 0,658 | 0,657 | 0,629 | 0,648 |
| 4  | 0,659 | 0,658 | 0,629 | 0,649 |
| 5  | 0,658 | 0,658 | 0,628 | 0,649 |
| 6  | 0,657 | 0,657 | 0,629 | 0,651 |
| 7  | 0,654 | 0,655 | 0,626 | 0,649 |
| 8  | 0,655 | 0,655 | 0,627 | 0,648 |
| 9  | 0,654 | 0,654 | 0,627 | 0,649 |
| 10 | 0,652 | 0,653 | 0,625 | 0,646 |
| 11 | 0,656 | 0,656 | 0,629 | 0,65  |
| 12 | 0,654 | 0,655 | 0,627 | 0,649 |
| 13 | 0,654 | 0,655 | 0,627 | 0,65  |
| 14 | 0,654 | 0,655 | 0,626 | 0,65  |
| 15 | 0,655 | 0,656 | 0,626 | 0,65  |

|    |       |       |       |       |
|----|-------|-------|-------|-------|
| 16 | 0,655 | 0,655 | 0,628 | 0,651 |
| 17 | 0,654 | 0,655 | 0,628 | 0,651 |
| 18 | 0,655 | 0,656 | 0,628 | 0,652 |
| 19 | 0,655 | 0,656 | 0,627 | 0,652 |
| 20 | 0,655 | 0,656 | 0,629 | 0,651 |
| 21 | 0,655 | 0,656 | 0,628 | 0,65  |
| 22 | 0,655 | 0,656 | 0,628 | 0,651 |
| 23 | 0,655 | 0,656 | 0,629 | 0,651 |
| 24 | 0,655 | 0,656 | 0,629 | 0,651 |
| 25 | 0,656 | 0,656 | 0,63  | 0,652 |
| 26 | 0,658 | 0,659 | 0,628 | 0,655 |
| 27 | 0,658 | 0,659 | 0,626 | 0,654 |
| 28 | 0,653 | 0,656 | 0,625 | 0,651 |
| 29 | 0,652 | 0,654 | 0,63  | 0,649 |
| 30 | 0,653 | 0,655 | 0,628 | 0,648 |
| 31 | 0,658 | 0,66  | 0,628 | 0,653 |
| 32 | 0,657 | 0,658 | 0,628 | 0,652 |
| 33 | 0,657 | 0,658 | 0,63  | 0,653 |
| 34 | 0,658 | -     | -     | 0,653 |
| 35 | 0,659 | -     | -     | 0,654 |

## MOVIMENTO OCULOMOTOR E ALGUMAS PATOLOGIAS

**Humberto Dória Silva**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Recife – Pernambuco

**Eduardo Dória Silva**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Recife – Pernambuco

**Maria Tamires Dória Silva**

Profissional liberal  
Recife – Pernambuco

**Cristiana Pereira Dória**

Professor do Estado de Pernambuco  
Recife – Pernambuco

**Cristiane Pereira Dória**

Professor do Estado de Pernambuco  
Recife – Pernambuco

**RESUMO:** Neste capítulo é mostrado como a falha da transferência de massa intraocular, por convecção forçada, pode afetar o movimento oculomotor e provoca diversas enfermidades, tais como: erro de refração, ceratocone, glaucoma de ângulo aberto ou fechado. Em adição, sugere a necessidade do SUS incluir, em seus procedimentos, a cirurgia corretiva de elevação de sobrancelhas, assim como a ANS regulamentar esta cirurgia em todos os planos de saúde.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cirurgia corretiva; Glaucoma; Ceratocone; Convecção forçada; Transferência de massa intraocular

**ABSTRACT:** It is shown, in this chapter, how the failure of intraocular mass transfer, by forced convection, can affect oculomotor movement and causes several diseases, such as refractive error, open or closed angle glaucoma, keratoconus. In addition, it suggests the necessity of the SUS to include, in its procedures, corrective surgery of elevation of eyebrows, as well as the ANS to regulate this surgery in all the health plans.

**KEYWORDS:** Corrective surgery; Glaucoma; Keratoconus; Forced convection; Mass transfer

### 1 | INTRODUÇÃO

Para facilitar as exposições, deste capítulo, o primeiro autor será mencionado como paciente. Em 1996 o paciente apresentava os primeiros sintomas de presbiopia, então, para suprir suas necessidades, o paciente iniciou as pesquisas, usando exercícios oculares. Os exercícios foram logo interrompidos devido a recorrência de uveíte anterior, de causa desconhecida, no olho esquerdo. Esta inflamação sempre é acompanhada de dor discreta na região superior nasal da esclera esquerda, então, o paciente descobriu o instante anterior ao início da inflamação. O paciente percebe um incômodo ocular e a dor só é percebida ao pressionar a



região superior nasal da esclera esquerda, através da pálpebra. Os trabalhos foram retomados no ano 2000, após a prática da técnica de relaxamento ocular.

Em uma pesquisa, com longa duração, como esta, é impossível a condução solitária, então, é necessária a manutenção de uma equipe, para discutir as hipóteses e comparar com os resultados obtidos pelo paciente.

## 2 | FUDAMENTO TEÒRICO

Na visualização binocular, a curvatura de cada córnea varia conforme a direção de seu eixo visual.

Para justificar a afirmativa é analisado a seguinte situação: Na visualização binocular, um olho é colocado frontal a um círculo, em um plano perpendicular ao seu eixo visual. Neste caso, o círculo é projetado na retina do olho frontal como um círculo, e esta imagem é enviada ao cérebro. Existem duas hipóteses:

I. A córnea **não muda a curvatura** com a direção do eixo visual

O círculo é projetado na retina do olho contralateral como uma elipse, e esta imagem é enviada ao cérebro. O cérebro superporá a imagem do círculo, originário do olho frontal, e com a imagem da elipse, originária do olho contralateral, para interpretar uma imagem superposta, com formato geométrico indefinido. Esta superposição tem a mesma precisão matemática que a visualização monocular, porque as imagens, que estão superpostas, não têm a mesma forma geométrica. Esta hipótese contraria a percepção humana, em que **“dois olhos enxergam melhor que um só olho”**.

II. A córnea **muda a curvatura** com a direção do eixo visual

O círculo é projetado na retina do olho contralateral como um círculo, e esta imagem é enviada ao cérebro. O cérebro superporá a imagem do círculo, originário do olho frontal, e com a imagem do círculo de mesmo diâmetro, originário do olho contralateral, para interpretar uma imagem superposta, com formato geométrico de um círculo. Este círculo superposto tem o dobro da precisão matemática que a visualização monocular, porque as imagens, que estão superpostas têm a mesma dimensão e forma geométrica, e ainda possibilita ter as projeções ajustadas. Esta hipótese combina com a percepção humana, em que **“dois olhos enxergam melhor que um só olho”**.

## 3 | ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

O movimento ocular é realizado através de doze músculos, oito músculos retos, e quatro músculos oblíquos. O sistema oculomotor é controlado por três pares de nervos cranianos, dois pares ipsilaterais, o oculomotor (III-NC) e o abducente (VI-NC),

e um par contralateral, o troclear (IV-NC). O terceiro nervo craniano regula o esfíncter da pupila, controla a motricidade dos músculos, reto medial, reto superior, reto inferior, oblíquo inferior, elevador da pálpebra superior, ciliar e inerva os músculos intrínsecos do bulbo ocular. O quarto nervo craniano controla a motricidade do músculo oblíquo superior. O sexto nervo craniano controla a motricidade do músculo reto lateral. (Bicas – 2003). O movimento ocular recebe grande influência dos movimentos ciliares, pupilares e das pálpebras superiores.

Existem três rotações monoculares, (duções) (1) adução e abdução em torno do eixo vertical (súpero-inferior), (2) sursundução (elevação) e deorsundução (abaixamento) em torno do eixo transversal (lâtero-medial), e (3) exciclodução (exciclotorção) e inciclodução (inciclotorção) em torno do eixo longitudinal (ântero-posterior). (Bicas – 2003).

Em 1619, Scheiner, (apud Werner L, et al. – 2000), um astrônomo e jesuíta alemão, observou, pela primeira vez que a visualização monocular, através de um pequeno orifício em uma cartolina, consegue perceber o mesmo alvo em diferentes distâncias para diferentes ângulos de visualização.

Silva H. D., et al. 2012, mostra, através de simulação, como os resíduos metabólicos aglutinados e desidratados formam lentes intraoculares que produzem os efeitos descritos em 1619, Scheiner, (apud Werner L, et al. – 2000), e como a miopia, hipermetropia, presbiopia e astigmatismos, produzem seus respectivos sintomas, conforme a disposição das aglutinações dos resíduos intraoculares.

A principal função dos músculos retos é fixar a projeção do alvo na fóvea, (Silva H. D., et al. 2018), e, na visão binocular, em conjunto com o cristalino, é manter os eixos visuais em mesmo plano. A principal função do músculo oblíquo superior é mudar a curvatura da córnea para fazer a fusão da imagem projetada na retina nasal, com a imagem projetada na retina temporal contralateral. (Silva H. D., et al. 2018).

## 4 | ANÁLISE E RESULTADOS

Os movimentos de exciclodução (exciclotorção) e inciclodução (inciclotorção) em torno do eixo longitudinal (ântero-posterior), descrito por Bicas – 2003, são patológicos. Estes movimentos existem por causa da dificuldade do músculo oblíquo superior variar a curvatura da córnea. Este movimento ocular provoca a percepção de movimento em figuras estáticas, compostas de curvas e a visão de relevo usada na estereoscopia. A variação da curvatura da córnea provoca sua flexão e faz variar a pressão intraocular, (Silva H. D., et al. 2013). A flexão da córnea é o mecanismo de convecção forçada que age no epitélio e no estroma. Os resíduos metabólicos formados no epitélio são eliminados, juntamente com o excesso de lágrima através dos canais lacrimais. Estes resíduos podem desidratar e acumular nas narinas, e o excesso líquido pode ser eliminados através da via oral ou digestiva. A eliminação do excesso líquido

pode causar ardência na garganta e rouquidão. Os resíduos metabólicos formados no estroma são eliminados na corrente sanguínea através da malha trabecular. A eliminação de resíduos metabólicos aglutinados pode obstruir a malha trabecular e aumentar a resistência de saída do humor aquoso aumentando a pressão intraocular. Nesta situação pode causar glaucoma de ângulo aberto. Quando o mecanismo de convecção forçada falha, causa acúmulo de resíduos metabólicos intraoculares, e em consequência, causa erro de refração e as mudanças das curvaturas das córneas não produzem uma perfeita fusão de imagens oculares que pode progredir para ceratocone ou glaucoma de ângulo fechado. (Silva H. D., et al. 2018).

Movimento sacádico é uma reação dos músculos retos, para manter a projeção do alvo na fóvea, quando a ação do músculo oblíquo superior provoca mudança descontínua da projeção do alvo, para uma região fora da fóvea, conforme observado em 1619 por Scheiner, (apud Werner L, et al. – 2000). Portanto, o movimento sacádico é patológico e o movimento vergencial só é observado se existir o movimento sacádico. Quando uma fonte luminosa (TV, monitor de vídeo games) projeta uma imagem na retina munida com muitos efeitos luminosos em diferentes pontos do monitor, a percepção humana adiciona a variação da distância conforme a direção angular do estímulo luminoso, por causa dos depósitos de resíduos metabólicos intraoculares aglutinados, provocando o entendimento neural de movimento onde não há. Em consequência, o cérebro pode comandar, os músculos retos, em movimentos opostos, em curtos períodos, para corrigir a projeção do alvo na fóvea. Uma sequência recorrente pode tornar ressonante o sistema de comandos do cérebro por produzir correntes neurais insuportáveis e causar epilepsia fotossensível, como causa provável de um padrão descrito por Martins da Silva A. e Leal B. em 2017. O músculo oblíquo superior pode realizar movimentos repetitivos e desencadear um processo inflamatório em uma região da esclera. Este processo pode progredir para uveíte anterior de causa desconhecida, como ocorreu, de forma recorrente, no paciente mencionado neste trabalho. Então, o paciente quando percebe a dor característica do início do processo inflamatório intraocular ele usa uma gota do colírio que trata a sua uveíte, e as vezes mais uma gota no dia seguinte, para evitar o início da uveíte. O paciente jamais teve contato com algum médico que considerasse este sintoma inicial para tratar, então, para evitar um mal maior, o paciente adota o procedimento. O movimento sacádico pode provocar um extraordinário desenvolvimento dos músculos retos, devido ao excesso de atividades, para manter na fóvea a projeção do alvo. Para o extraordinário desenvolvimento é necessário um extraordinário aumento do suprimento e drenagem sanguínea, para satisfazer esta extraordinária necessidade dos músculos retos. Esta extraordinária região pode ser diagnosticada como pterígio. A fonte luminosa, mais forte, projeta, na retina, a imagem com maior energia, devido a seu poder de penetração, através das secreções metabólicas acumuladas na córnea e no cristalino, que absorvem energia luminosa. Quanto maior for a intensidade da energia luminosa incidente na retina, mais intensa é a atividade sacádica dos músculos retos, logo, quem mora em locais

com luminosidade solar mais intensa está mais exposto a esta patologia. (Schellini – 2005).

A íris é a parte colorida do olho. Sua principal função é controlar a abertura da pupila, através de comandos neurais. A pupila é o orifício por onde passa a imagem que é projetada na retina. O diâmetro menor da pupila passa menor quantidade de luz. A luz difusa do ambiente pode incidir na retina e prejudicar a nitidez da imagem projetada, então, a íris é comanda para reduz o diâmetro da pupila, enquanto for necessário, para aumentar a nitidez da imagem projetada na retina, sem ultrapassar o seu diâmetro mínimo. O acúmulo de resíduo metabólico pode provocar a difusão intraocular da luz, prejudicar a nitidez da imagem projetada na retina, então, a íris é comanda para reduz o diâmetro da pupila, enquanto for necessário, para aumentar a nitidez da imagem projetada na retina, sem ultrapassar o seu diâmetro mínimo. Então, o passar do tempo, o indivíduo aumenta o armazenamento das aglutinações de resíduos metabólico intraoculares, aumenta a refração difusa intraocular e a pupila reduz seu diâmetro. Quando o diâmetro da pupila atinge seu valor mínimo, o paciente passa a reduzir a abertura palpebral, através do movimento da pálpebra superior. O hábito de controlar a entrada da luz no olho, usando a pálpebra superior, reduz a sua atividade física e o paciente pode adquirir a ptose palpebral. Quando esgota este último recurso o paciente recorre ao levantamento da pálpebra inferior que pode adquirir rugas próximas aos olhos. O hábito em manter os olhos entre abertos, para redução da entrada de luz nos olhos, reduz a atividade física das pálpebras, que pode acumular gorduras nas pálpebras e pode provocar o decaimento das sobrancelhas. A Figura 1 mostra na foto, as sobrancelhas de um paciente abaixo da cavidade óssea ocular e decaídas sobre as suas pálpebras, 2,5 anos após a cirurgia de ptose palpebral. É fácil observar, na Figura – 1, que as sobrancelhas estão no campo visual ocular do paciente, ou seja, elas projetam sombras nas retinas do paciente.



Figura – 1 Cirurgia de ptose palpebral após 2,5 anos

## 5 | CONCLUSÃO

Neste capítulo foi mostrado como a falha da transferência de massa intraocular pode causar:

- I. Movimento patológico monocular de exciclodução (exciclotorção) e inciclodução (inciclotorção) em torno do eixo longitudinal (ântero-posterior).

II. Movimento patológico binocular sacádico, e possível progressão para epilepsia fotossensível, uveíte ou pterígio.

III. Aumento da pressão intraocular e causar glaucoma de ângulo aberto.

IV. Erro de refração e possível progressão para ceratocone ou glaucoma de ângulo fechado.

V. Ptose palpebral e sobrancelhas decaída e dentro da órbita óssea ocular.

É mostrado ser necessário maior atenção às dores na região da esclera, sintomatizada através da apalpação, para evitar o início da uveíte.

Aprofundar estudo para evitar o acúmulo de resíduos metabólicos intraocular desde a infância, pois, o acúmulo é cauda da maioria dos problemas oculares.

Para o SUS incluir, em seus procedimentos, a cirurgia corretiva de elevação de sobrancelhas, porque a redução do campo visual colabora para o acúmulo de resíduos metabólicos intraocular que é a causa das enfermidades oculares.

Para ANS regulamentar a cirurgia corretiva de elevação de sobrancelhas, em todos os planos de saúde.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por ter ajudado o primeiro autor nos longos anos de sofrimentos, causados pelo médico, que recomendou a viagem de avião sua mãe, 15 dias antes do nascimento do paciente, que o levou a ser um analítico observador dos eventos em seu próprio corpo. Em adição, por ajudar a todos coexistir, durante os danos causados pelas decisões políticas e econômicas do país. Ao Marcos, irmão dos dois primeiros autores, que, em 1999, mostrou a importância do relaxamento oculomotor para o tratamento da vista, em um livro de auto ajuda. Aos colegas, dos dois primeiros autores, membros do ANDES-SN Sindicato Nacional e, também, aos colegas membros da Seção Sindical ADUFEPE, que, durante os intervalos dos encontros sindicais, proveu importantes ajudas científicas para a pesquisa. A todos os amigos, colegas e membros da família entrevistados que contribuíram direta ou indiretamente para pesquisa. Nenhuma instituição pública ou privada participou com ajuda financeira, para a publicação deste trabalho. Todos os autores concordam com os agradecimentos.

## REFERÊNCIAS

Bicas, Harley E. A. **Oculomotricidade e seus fundamentos**, ArqBrasOftalmol, 2003;66:687-700.

Martins da Silva A., Leal B., **Photosensitivity and epilepsy: Current concepts and perspectives—A narrative review**, Seizure, 2017,50:209-218.

Schellini S. A. **Características de portadores de pterígio na região de Botucatu**, ArqBrasOftalmol, 2005;68(3):291-294

Silva H. D., et al., **Simulation of the Errors of Refraction in the Human Eye**, Capítulo 15, Öchsner, A., da Silva, L. F. M., Altenbach, H., Livro **Analysis and Design of Biological Materials and Structures**, Springer Berlin Heidelberg, 2012,14:187-200.

Silva H. D., et al., **Simulation of Variation of Intraocular Pressure**, Journal Defect and Diffusion Forum VIII, 2013, 235-253

Silva H. D., et al., **Analysis of the Disturbances Caused by Intraocular Forced Convection Mechanism Failure**, Capítulo 3, Zilfyan A., Livro, **Difficulties in Cataract Surgery**, IntechOpen, Londres, 2018,3:45-64.

Werner L, et al., **Physiology of accommodation and presbyopia**, Arq Bras Oftalmol, 2000,63:503-506.



## ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE ESTADOS AGREGADOS DE CORANTES

**Adrianne Marlise Mendes Brito**

**Hebert Freitas dos Santos**

**Iseli Lourenço Nantes-Cardoso**

Universidade Federal do ABC, CCMH, Laboratório de Nanociências e Materiais Avançados

Santo André – SP

**RESUMO:** Os corantes são utilizados pelo homem desde os tempos pré-históricos e suas aplicações se diversificaram com o avanço científico-tecnológico da humanidade. Atualmente os corantes possuem aplicações tradicionais como na indústria têxtil e avançadas como as aplicações em células solares sensibilizadas por corantes (DSSC, do Inglês, dye sensitized solar cells). Ao mesmo tempo, a larga aplicação dos corantes principalmente na indústria têxtil incluiu essas substâncias entre os agentes poluidores, especialmente das águas dos rios que recebem efluentes. As inúmeras aplicações dos corantes e o problema ambiental a eles associado, torna muito relevante o domínio de suas propriedades espectrais, particularmente na espectrometria UV-visível que é uma técnica relativamente simples e de largo uso tanto na pesquisa científica quanto na indústria. Os avanços tecnológicos atuais requerem que as Universidades preparem os estudantes para níveis mais altos de aprendizagem nos Programas de Pós-

Graduação e para a atuação no setor produtivo. No último caso, a formação interdisciplinar é altamente desejável. Nesse sentido, desenvolvemos estratégias experimentais que permitem aos estudantes dominarem o uso da técnica de espectroscopia UV-visível para análises qualitativas e quantitativas com uso de um corante altamente conhecido e de larga aplicação como é o azul de metileno. Nesse capítulo, mostramos o desenvolvimento dessas estratégias, principalmente aquelas que permitem modular os estados agregados do corante com uso de detergentes. A etapa experimental do estudo foi associada com um objeto de aprendizagem (OA) para melhor domínio dos conteúdos. Adicionalmente, mostramos a análise do núcleo do azul de metileno cujo comportamento fotoquímico é bastante diferenciado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ensino, Pesquisa, Corantes, Azul de metileno, Espectroscopia UV-visível.

**ABSTRACT:** Man has used colorants since prehistoric times, and their applications have diversified with the scientific-technological advancement of humankind. Today dyestuffs have traditional usages such as in the textile industry and advanced applications such as dye-sensitized solar cells (DSS). At the same time, the widespread use of the dyes mainly in

the textile industry has included these substances among the pollutants, especially the waters of rivers receiving effluents. The numerous applications of dyes and the environmental problem associated with them make the domain of their spectral properties very relevant, particularly in UV-visible spectrometry, which is a relatively simple and widely used technique in both scientific research and industry. Current technological advances require universities to prepare students for higher levels of learning in graduate programs and for their performance in the productive sector. In the latter case, interdisciplinary training is highly desirable. In this sense, we developed experimental strategies that allow students to master the use of the UV-visible spectroscopy technique for qualitative and quantitative analyzes using a highly known and widely used dye such as methylene blue. In this chapter, we show the development of these strategies, especially those that allow modulating the aggregate states of the dye with the use of detergents. The experimental stage of the study was associated with an object of learning (OA) for a better mastery of contents. Additionally, we show the analysis of the methylene blue core whose photochemical behavior is entirely different.

**KEYWORDS:** Teaching, Research, Dyes, Methylene Blue, UV-Visible Spectroscopy

## 1 | INTRODUÇÃO

O fenômeno de absorção de luz diretamente por macromoléculas ou por cromóforos formados em reações secundárias é usado para a caracterização espectral e/ou quantificação dessas substâncias por espectrofotometria (SKOOG, 2006). Assim, a espectrometria de absorção eletrônica na faixa de espectro eletromagnético UV-Vis tem sido uma ferramenta muito útil para estudos de Química, Bioquímica e Biofísica.

Por meio de uma análise dos conteúdos das aulas práticas de espectroscopia UV-visível oferecidas em diferentes cursos de Graduação tradicionais verificamos que essas aulas contemplam somente o uso da técnica para análises quantitativas, frequentemente dosagens colorimétricas com aplicação da Lei de Lambert-Beer. Na nossa experiência didática na Universidade Federal do ABC (UFABC) (Brito e Araujo-Chaves, Juliana Casares, Nantes, 2016) ficou evidente que o ensino da espectroscopia UV-Vis aplicada à análise qualitativa constitui um fator motivador da aprendizagem, particularmente para estudantes de áreas distintas àquelas das ciências da vida, pois permite a aplicação em análise de materiais, de corantes sintéticos, de interações e degradações moleculares diversas (BRITO e Nantes, 2017) .

Além disso, a abordagem com análise qualitativa por meio da estratégia como a que será discutida nesse capítulo permite apresentar, reforçar e correlacionar conteúdos tais como relação estrutura/propriedades da água, formação de agregados supramoleculares de surfactantes em meio aquoso, estado de agregação de moléculas hidrofóbicas (determinadas por concentração e interação com micelas) com suas propriedades ópticas além de noções de fotoquímica, usando o corante azul de

metileno (MB+, do inglês, *Methylene Blue*) como modelo. Desse modo são fornecidas as bases para o entendimento desses conceitos para uma diversidade de biomoléculas e seus miméticos com potencial aplicação em diferentes áreas do conhecimento e no desenvolvimento de novos materiais e tecnologias. Os corantes são um bom exemplo de como o estado de agregação afeta as características espectrais dos cromóforos, sendo, portanto, adequado para o estudo desse tema, além de estar relacionado a questões de desenvolvimento tecnológico em várias áreas e à questão ambiental.

Indubitavelmente, a abrangência e diversidade de aplicação dessa técnica a torna indicada como tópico teórico e prático para estudantes de Bacharelados Interdisciplinares (BIs) e de Bacharelados e Licenciaturas tradicionais bem como para pesquisadores nas ciências biológicas e da saúde, ciências agrárias e multidisciplinar além das ciências exatas e da terra e engenharias. E o presente capítulo tem como proposta apresentar de maneira rápida e objetiva a teoria da técnica de espectrometria de absorção eletrônica na faixa de espectro eletromagnético UV-vis e oferecer estratégias experimentais para o estudo espectroscópico utilizando medidas qualitativas por meio da observação da relação monômero/dímero em agregados supramoleculares do corante azul de metileno. Também será discutido a caracterização espectral de fenotiazinas, um composto orgânico que ocorre em várias drogas antipsicóticas, como a clorpromazina, tioridazina e a trifluoperazina, e em drogas anti-histamínicas.

## 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Corantes

As cores são resultado da absorção seletiva de radiação eletromagnética na região espectral da luz visível (400 a 780 nm). A absorção de radiação nessa região se deve à presença de grupos cromóforos – principalmente ligações duplas conjugadas - na estrutura dos compostos (GÜRSES et al., 2016). Corantes e pigmentos são as substâncias mais importantes usadas para adicionar cor ou mudar a cor da matéria. Os corantes são definidos como substâncias que, quando aplicadas a um substrato, fornecem cor por um processo que altera, pelo menos temporariamente, a estrutura cristalina das substâncias coloridas. Os corantes sintéticos possuem diversas aplicações tradicionais e tecnológicas, como por exemplo, em vários tipos de têxteis, papel, curtimento de couro, processamento de alimentos, plásticos, cosméticos, indústrias de fabricação de borracha, impressão e tintas (GÜRSES et al., 2016) e células solares sensibilizadas por corantes (FREITAG et al., 2017). Já os pigmentos são sólidos particulados, orgânicos ou inorgânicos, finamente divididos, podem ser coloridos, incolores ou fluorescentes, geralmente insolúveis no veículo ou meio em que são incorporados e, essencialmente, inertes. Antagonicamente aos corantes, alteram apenas a aparência da superfície por absorção seletiva ou espalhamento de luz e podem ser usados para qualquer substrato polimérico (DRUMOND CHEQUER

et al., 2013).

Os corantes comerciais podem ser classificados em relação à estrutura, cor, métodos de aplicação ou carga das partículas após a dissolução em meio aquoso. Estruturalmente, um aspecto comum a praticamente todos os corantes sintéticos é a presença de ligações duplas e simples alternadas. Em relação à carga das partículas podem ser catiônicos (corantes básicos), aniônicos (corantes diretos, ácidos e reativos) e não-iônicos (corantes dispersos). São conhecidos mais de 100.000 corantes que correspondem a produção anual de mais de  $7 \times 10^5$  toneladas/ano (DRUMOND CHEQUER et al., 2013). Apenas na indústria têxtil mundial há o consumo superior a 10.000 toneladas/ano de corantes com descarte de aproximadamente 100 toneladas nos sistemas de água. Os dados exatos sobre a quantidade descarregada proveniente de vários processos industriais no meio ambiente são desconhecidos, todavia já são bem conhecidos diversos de seus efeitos tóxicos (YAGUB et al., 2014).

O lançamento não controlado de efluentes industriais com corantes em maior ou menor nível de concentração na hidrosfera representa fonte significativa de poluição devido à sua natureza recalcitrante e à cor indesejável na água. Em consequência, ocorre interferência na absorção da luz pela população vegetal e animal do ambiente aquático além de possível ação carcinogênica, mutagênica ou teratogênica sobre a vida microbológica e várias espécies de peixes decorrente da presença de metais e hidrocarbonetos aromáticos. Além disso, essas substâncias podem ser transportadas para os mananciais ou para a estação de tratamento de água (principalmente os corantes com alta solubilidade) contribuindo para a contaminação da água distribuída à população. Para a saúde humana os riscos toxicológicos estão relacionados a disfunção no rim, sistema reprodutivo, fígado, cérebro e sistema nervoso central (YAGUB et al., 2014).

Diversos métodos físicos, químicos e biológicos para tratamento de efluentes com corantes têm sido estudados nos últimos anos (KATHERESAN et al, 2018). As principais técnicas disponíveis na literatura envolvem processos de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica e fotoquímica, biodegradação e outros. Contudo, cada um desses métodos tem limitações, vantagens e desvantagens. A busca por corantes com maior poder de fixação e menos poluente assim como por métodos e tecnologias específicos para remover corantes de diferentes tipos de águas residuais apresenta-se muito relevante e está correlacionada, dentre outros fatores, com o estudo dos fatores físico-químicos que influenciam a fase aquosa do corante.

Com frequência, a efetividade da remoção da cor das águas de rejeitos industriais pode ser avaliada por espectroscopia UV-vis por meio da comparação com um padrão de valores já conhecidos na literatura. Assim, através da comparação direta entre absorbância da amostra de um efluente industrial e o padrão aceitável para aquele sistema aquático que o recebe, é possível avaliar o grau de contaminação e controlar a diluição do corante nas águas receptoras (COOPER, 1995). Entretanto, corantes geralmente são moléculas complexas e alguns fatores tais como concentração, pH e

presença de outras moléculas (surfactantes, por exemplo) influenciam no seu estado de agregação e afetam as características dos espectros (JUNQUEIRA et al., 2002), o que pode interferir nos resultados da avaliação espectrofotométrica em relação ao padrão analítico. Como um exemplo, se a determinação da concentração do corante no efluente for feita por meio da medida de absorbância em um comprimento de onda fixo, caso o meio promova um deslocamento batocrômico ou hipsocrômico no espectro (SKOOG, 2006), a medida em comprimento de onda fixo resulta em grandes erros de dosagem. Um outro exemplo é o erro de dosagem decorrente de não considerar que diferentes meios podem ter efeito hipercrômico ou hipocrômico, sem alteração do comprimento de onda máximo de absorção. Isso evidencia a importância de se conhecer as propriedades óticas dos corantes e sua avaliação por espectroscopia de absorção eletrônica.

O azul de metileno é um corante tiazínico com aplicações variadas. Foi sintetizado pela primeira vez para ser usado como corante de tecidos durante o período de grande expansão da indústria têxtil europeia e, atualmente, a água residual do processo textil representa um problema ambiental mundial. É largamente utilizado como um indicador redox em química analítica: soluções desta substância são azuis quando em ambiente oxidante, mas tornam-se incolores quando expostas a um agente redutor. O MB<sup>+</sup> também desempenha papéis importantes na microbiologia e farmacologia há tempos, como coloração temporária para análise por microscopia em RNA ou DNA; para o tratamento da metahemoglobinemia (conversão de Fe<sup>3+</sup>+Hb a Fe<sup>2+</sup>+Hb) por meio de sua forma leuco que é reduzida com dois elétrons ; como bactericida e fungicida. Uma inovação terapêutica tem tido sucesso na medicina, odontologia e na veterinária: o MB<sup>+</sup> como agente fotossensibilizador para a terapia fotodinâmica (TFD) de tumores, infecções e parasitoses (TARDIVO et al., 2005). Essa terapia utiliza a aplicação de um corante na área a ser tratada, seguida de irradiação com luz do comprimento de onda que penetre melhor no tecido. A luz promove excitação eletrônica do corante que transfere sua energia ao oxigênio molecular do meio e o converte em uma espécie altamente oxidante, o oxigênio singlete, que leva à morte o tecido tumoral ou o agente infeccioso.

É conhecido que, em solução aquosa o corante azul de metileno encontra-se em equilíbrio entre as formas monômero e dímero. O equilíbrio encontra-se deslocado para a forma monomérica e dimérica, respectivamente em baixas e altas concentrações do corante. Em solução, o estado fundamental do MB<sup>+</sup> forma dímeros com uma constante de associação de  $4 \pm 1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  e que podem ser favorecidos pelo aumento da força iônica e presença de micelas em determinadas razões de corante/surfactante (JUNQUEIRA et al., 2002). Soluções de diferentes concentrações de MB<sup>+</sup>, associado ou não a surfactantes, apresentam diferentes tonalidade de azul, relacionada a predominância de dímeros ou monômeros. A interação corante-surfactante representa uma estratégia experimental para estudos de estados agregados de corante por meio de espectroscopia UV-vis e tem sido estudada devido a sua grande relevância para a

indústria de tingimento e fotografia.

## 2.1 Espectroscopia

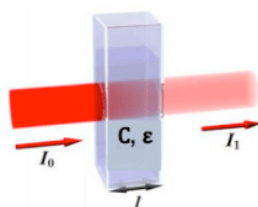
A espectrofotometria é um dos métodos ópticos de análises mais usados nas investigações bioquímicas. O espectrofotômetro é um instrumento que permite comparar a intensidade de luz absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto em relação a quantidade conhecida da mesma substância em solução. A absorção das radiações ultravioleta e visível depende da estrutura molecular e é característica para cada substância. Quando a luz atravessa uma solução de determinado composto, parte da energia é absorvida. A cor enxergada pelos nossos olhos se deve a transmitância (T) de certos comprimentos de ondas da luz branca não absorvidos, conforme indicado na equação 1, onde  $I_0$  é a intensidade da radiação incidente e I corresponde à intensidade do feixe de radiação transmitido. Esse fenômeno pode ser usado para quantificação de substâncias por meio da intensidade de absorbância em um comprimento de onda específico, com base em uma curva padrão, utilizando-se da Lei de Lambert-Beer (SKOOG, 2006). À medida que aumentamos a concentração da solução, a transmitância varia em relação inversa ao logaritmo da concentração. Em consequência, pode-se definir um novo termo, absorbância (A), que será diretamente proporcional à concentração. Portanto,

$$T = I/I_0 \quad (1)$$

$$A = -\log I/I_0 = -\log T \quad (2)$$

$$A = \log 1/T \quad (3)$$

Dessa forma, a absorbância é direta e linearmente proporcional à concentração. Esta varia também de forma direta com o caminho óptico (diâmetro interno) da cubeta, ou seja, se dobrarmos o caminho óptico mantendo a concentração constante, teremos um valor de absorbância duas vezes maior. Essa relação é referida como *Lei de Lambert-Beer*.



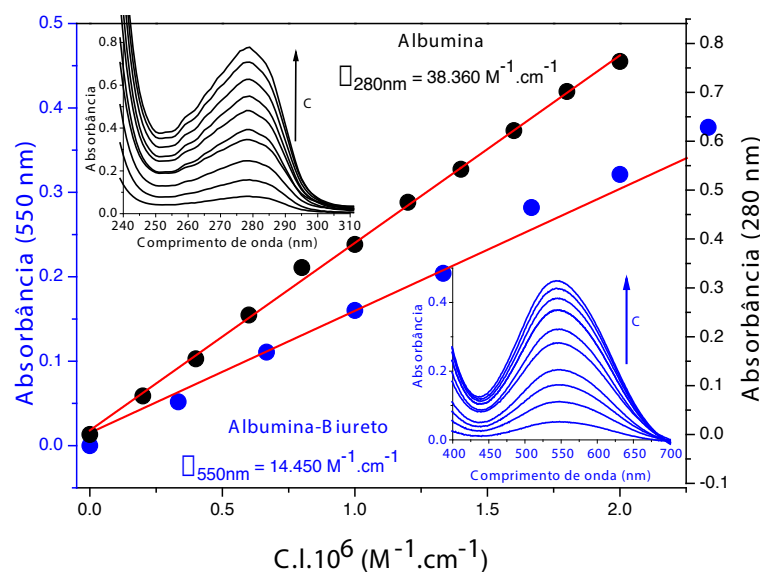
$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

(4)

Onde A = absorbância,  $\epsilon$  = constante de proporcionalidade (absortividade ou coeficiente de extinção), l = caminho óptico (em centímetros) e C = concentração (em mol/L). Como os valores de A são adimensionais, a unidade de  $\epsilon$  são as recíprocas daquelas para l e C. Quando (geralmente é) e C é expresso em mol/L ou mol.L<sup>-1</sup>, a constante  $\epsilon$  pode ser chamada de absortividade ou coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ , epsilon) e é constante para dado **comprimento de onda**, temperatura, pH, solvente, etc.



Assim, a proporcionalidade direta entre absorvância e concentração representa uma estratégia a ser usada para a determinação da absorvidade de uma dada substância em determinada condição experimental por meio de realização de uma curva padrão construída com concentrações conhecidas do cromóforo. A aplicação da Lei de Lambert-Beer permite a determinação do  $\epsilon$  no meio de análise, o qual será usado para determinar a concentração desconhecida do cromóforo no mesmo meio. A Figura 1 mostra curvas padrão de concentração de albumina feitas com uso dos aminoácidos aromáticos como cromóforos endógenos da proteína e com uso do cromóforo formado pela complexação com cobre presente no reagente Biureto (ZAIA, 1998).

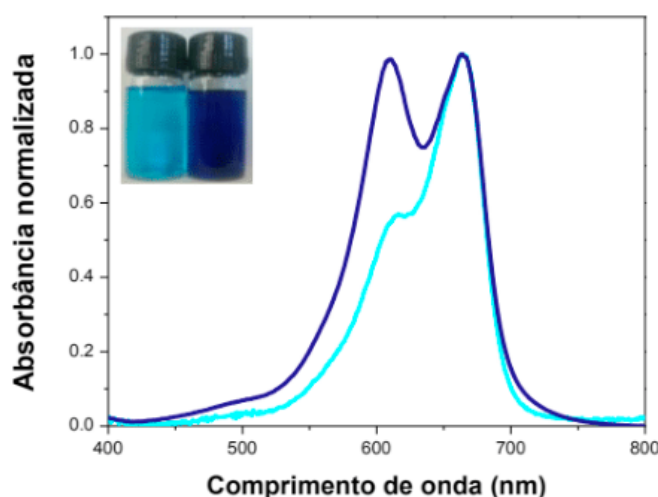


**Figura 1** . Curva padrão de albumina determinada pelo método direto (em preto) e pelo método com Biureto (em azul). O inserto mostra os espectros do cromóforo, os quais forneceram os valores de absorvância usados na construção da curva padrão.

A espectroscopia UV-visível também pode ser usada para análise qualitativa de substâncias, como será discutido a seguir utilizando o corante azul de metileno. A cor característica do  $\text{MB}^+$  é causada pela forte banda de absorção na região espectral de 550-700 nm, sendo seu espectro de absorção dependente da concentração (MORGOUNOVA *et al.*, 2013). Monômeros e dímeros tem espectros de absorvância distintos: monômeros tem intensidade máxima em 665 nm ( $\epsilon = 85.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) e dímeros em 610 nm e agregados maiores do tipo H em 590 nm (Figura 2). A diferença na absorção entre monômeros e dímeros facilita o cálculo da concentração de cada espécie presente em solução. A intensidade relativa dos picos indica em qual direção o equilíbrio está deslocado. A razão entre a absorvância a 580 e 665 nm ( $A_{580}/A_{665}$ ) dá uma estimativa qualitativa da concentração relativa de dímeros para monômeros, o que representa uma indicação de qual forma do corante prevalece no meio.

É interessante observar que a forma agregada de azul de metileno possui peculiares propriedades fotoquímicas (JUNQUEIRA *et al.*, 2002). Quando os dímeros ou agregados maiores são expostos à luz branca ou vermelha observa-se a separação

de carga dos pares, pois o tripleto é oxidante e oxida seu par com formação do par radicalar formado pelo corante reduzido com um elétron ( $MB^{\cdot-}$ ) e o corante oxidado com menos um elétron ( $MB^{\cdot 2+}$ ). Dessa forma, o rendimento quântico de produção de oxigênio singleto cai bastante para as formas agregadas. A forma reduzida com um elétron absorve luz em 420 nm e possui  $pK_a = 9,0$ . Essa espécie pode transferir o elétron ao oxigênio do meio e gerar íon superóxido ou prontamente dismutar para a forma reduzida com dois elétrons, ou seja, a forma leuco ( $MBH$ ) e o estado fundamental  $MB^+$ . O cátion radical do azul de metileno ( $MB^{\cdot 2+}$ ) absorve em 520 nm.



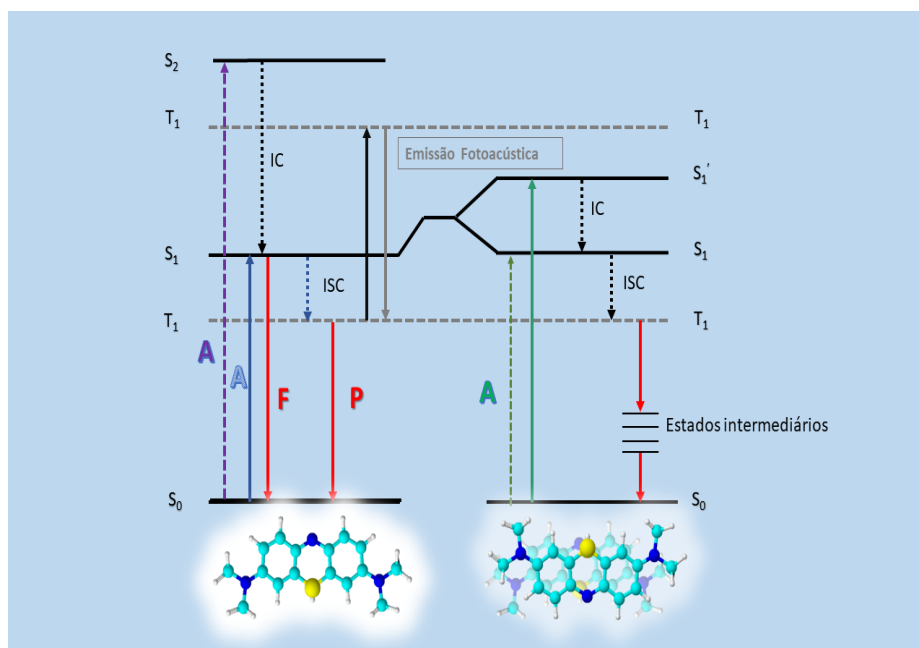
**Figura 2.** Espectro UV-visível de  $MB^+$  em água obtido com 25 (azul claro) e 250 (azul escuro)  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do corante. O inserto mostra a coloração diferenciada das soluções com elevada porcentagem de dímero (azul royal) e de monômero (azul turquesa).

O princípio que faz a fotoquímica interessante é o uso da luz como uma fonte de energia para promover reações químicas. Em comprimentos de onda de luz ( $\lambda$ ) específicos, a energia pode ser absorvida por determinadas moléculas, levando-as a um estado molecular excitado no qual, devido à conformação menos estável ficam propensas a reagirem com outras moléculas (MORGOUNOVA *et al.*, 2013). A maior parte das reações química realizadas em laboratório utiliza a faixa espectral visível ao olho humano (vis), ultravioleta (UV) e infravermelho (IV) próximo. Moléculas excitadas podem perder sua energia através das propriedades físicas ou por participar de reações químicas.

O processo fotoquímico (TURRO *et al* 2012) se inicia com a absorção de um fóton por uma molécula com a qual encontra condição de ressonância. A energia do fóton absorvida pela molécula no estado fundamental ( $S_0$ ) leva ao deslocamento de um elétron de seu orbital ligante para um orbital anti-ligante desocupado de mais alta energia, o que leva a molécula ao estado eletronicamente excitado singleto  $S_1$ ,  $S_2$ , ...  $S_n$ , dependendo da energia de excitação ou do solvente. Uma molécula também pode atingir o estado eletronicamente excitado, na ausência de luz por um processo conhecido como Fotoquímica no Escuro, tal como acontece na clivagem do dioxetano (NANTES *et al* 1996; GREEN *et al.*, 2017) e na reação luciferina/luciferase (Viviani *et*

*al.*, 2018). A molécula no estado eletronicamente excitado pode ter diferentes rotas de decaimento para o estado fundamental (processos fotofísicos) que são mostradas na Figura 3. A conversão interna ( $S_n \rightarrow S_1 + \text{calor}$ ) ocorre quando a molécula encontra-se em estado excitado  $S_n$  acima de  $S_1$ . A fluorescência é a desativação radiativa de  $S_1 \rightarrow S_0$ , sendo que  $S_1$  pode ter sido atingido por excitação a partir de  $S_0$  ou por conversão interna. O cruzamento intersistemas ocorre de  $S_1 \rightarrow T_1$  ou  $S_2 \rightarrow T_2$  e  $T_2 \rightarrow T_1$ , por meio de conversão interna. O estado eletronicamente excitado tripleto possui tempo de vida relativamente longo e pode reagir com outras moléculas dando origem a fotoprodutos. As transições sem a emissão de fótons ou não radiativas são aquelas em que a desativação se dá por meio de liberação de calor para o ambiente. (MORGOUNOVA *et al.*, 2013).

A fim de compreender o comportamento fotoquímico quando interage com biomoléculas, em particular com membranas, as propriedades do MB<sup>+</sup> foram estudados em soluções de SDS (dodecil sulfato de sódio) e CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) em vários trabalhos (Junqueira *et al.*, 2002). O uso de micelas de SDS em diferentes razões micela/corante permite modular o estado de agregação do MB<sup>+</sup>. Assim, em presença de excesso de micelas em relação ao corante temos a predominância da forma monomérica e em presença de excesso de corante em relação às micelas obtêm-se a predominância dos dímeros.



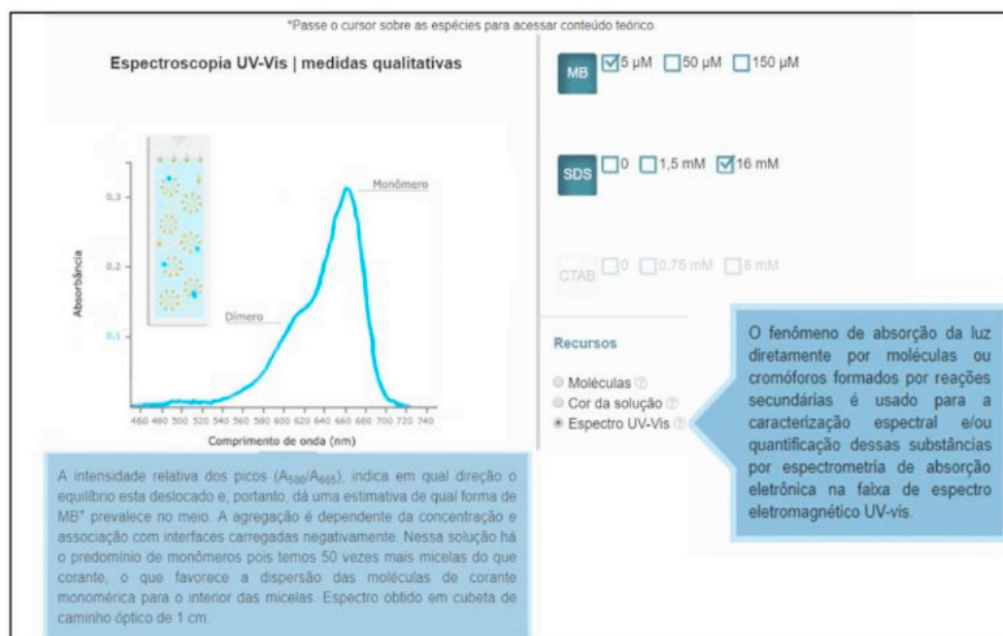
**Figura 3 .** Diagrama de Jablonski: à esquerda, para uma forma monomérica do MB<sup>+</sup> após interagir com um fóton em condições de ressonância; à direita, especificamente para a forma dimérica. A, absorção; F, fluorescência; P, fosforescência; IC, conversão interna, ISC, cruzamento intersistemas, S, estado singlete, T, tripleto. S<sub>0</sub>, estado fundamental. Adaptado de (MORGOUNOVA *et al.*, 2013).

### 3 | ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para a fundamentação da estratégia experimental aqui discutida foi realizado ensaio com soluções do corante azul de metileno (MB<sup>+</sup>) em três diferentes concentrações

(5, 50 e 150  $\mu\text{M}$ ) que interferem em seu estado de agregação, sendo que a forma monomérica é predominante até 20  $\mu\text{M}$ . A essas soluções foram adicionados os detergentes SDS (aniônico) e CTAB (catiônico) em duas concentrações diferentes, sendo uma abaixo e uma acima da CMC (concentração micelar crítica). Para SDS, usamos 1,5 e 16 mM e para CTAB usamos 0,75 e 8 mM. Em seguida foi realizada a aquisição do espectro de absorção no visível (região espectral de 350 a 750 nm) de cada solução utilizando cubetas de vidro de caminho óptico 1 cm ou 0,1 cm (dependendo da concentração de MB<sup>+</sup> usada). Foram plotados os gráficos absorvância X comprimento de onda e analisada a razão entre os picos de absorção das formas monomérica e dimerica em cada condição. Essa estratégia experimental permite, dessa forma, trabalhar com os alunos a aplicação da Lei de Lambert-Beer no que concerne à influência da concentração dos cromóforos, do seu estado de agregação e do caminho óptico de aquisição espectral.

Como recurso pedagógico para o estudo da espectroscopia UV-vis considerando medidas qualitativas e utilizando como modelo o MB<sup>+</sup>, desenvolvemos o objeto de aprendizagem (OA) “Propriedades Fotofísicas do Azul de Metileno Aplicadas para o Ensino de Espectroscopia UV-Visível como Ferramenta para Análise Qualitativa em Bioquímica” disponível no link <http://nte.ufabc.edu.br/bioquimica/oa/index.html>, objeto este agraciado em 2017 no 1º Prêmio Nacional de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular “Bayardo BaptistaTorres” na categoria Materiais Didáticos ou Prática de Ensino, promovido pela Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) (BRITO e NANTES, 2017). Por meio da interação com esse OA é possível fazer a simulação de condições que modulam a agregação do corante azul de metileno e o entendimento de como isso interfere qualitativamente nos espectros de absorção. As condições moduladoras dos estados de agregação são concentração e uso de surfactantes. Para tal, é apresentada a possibilidade de preparar virtualmente soluções a partir de três diferentes concentrações de azul de metileno combinadas com três diferentes concentrações de surfactante aniônico ou catiônico (na ausência, abaixo da concentração micelar crítica, e acima dessa). As representações dessas condições são: espécies moleculares presentes na solução, cor da solução e os correspondentes espectros de absorção no visível. A figura de uma cubeta com a solução tem a representação dos estados de agregação do corante e dos surfactantes. Ao clicar nas diversas representações são abertas caixas de texto com explicações sobre os conceitos e interações envolvidas conforme Figura 4:



Página Inicial

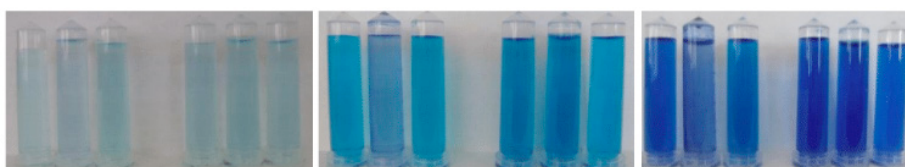
Experimento

Agregados supramoleculares

**Figura 4.** Exemplo de uma das telas do objeto de aprendizagem, com indicação de algumas das opções disponíveis para simulação.

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

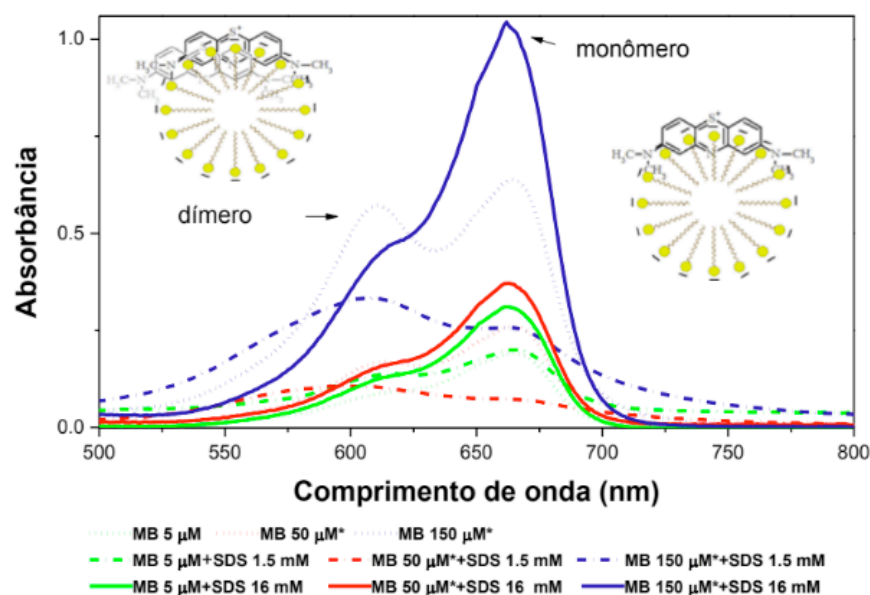
Na Figura 5 são apresentadas fotos de todas as soluções de MB<sup>+</sup> em diferentes condições de concentração e da presença de micelas. A predominância de agregados já é evidenciada pela cor da solução, uma vez que as formadas de monômeros apresentam a cor azul *cyan*, enquanto que as de formadas por dímeros de MB<sup>+</sup> apresentam a cor azul *royal* (tonalidade mais escura). A mudança de cor conforme o estado de agregação decorre do fato de que a agregação afeta a estrutura molecular, que por sua vez, afeta os níveis de energia dos orbitais moleculares e assim, os comprimentos de onda de luz que são absorvidos e transmitidos (vide Figura 3)



**Figura 5.** Fotos das soluções referentes aos espectros apresentados. Em cada foto, os tubos Eppendorfs da esquerda contém 0; 1,5 e 16 mM de SDS e os da direita contém 0; 0,75 e 8 mM de CTAB. Nas fotos da esquerda, centro e direita, as concentrações de azul de metileno são respectivamente, 5, 50 e 150  $\mu\text{M}$ . Observar as diferenças de tonalidade de azul. A tonalidade *royal* indica predominância de dímeros do corante e a tonalidade *cyan* indica predominância de monômero do corante.

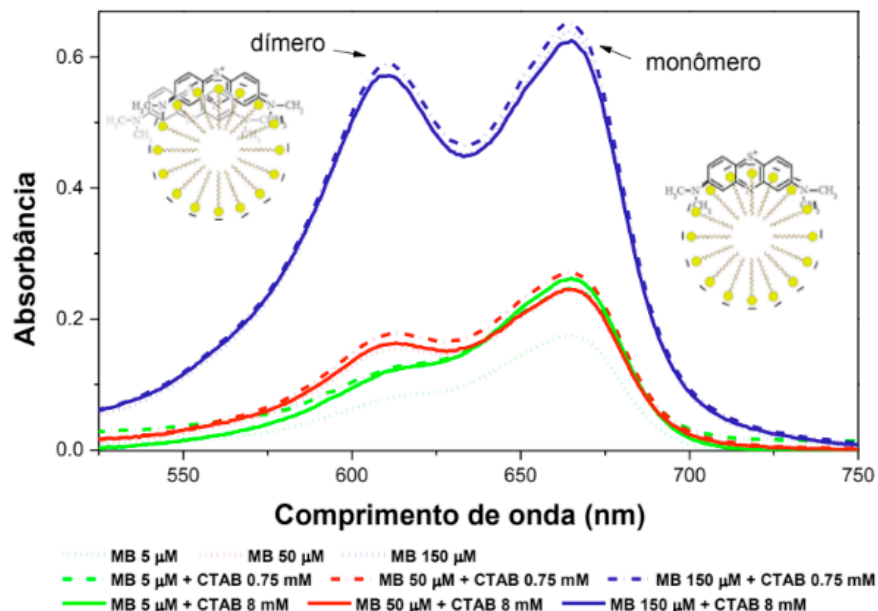
O estado de agregação pode ser determinado espectrofotometricamente. As Figuras 6 e 7 mostram os espectros correspondentes aos dados obtidos de todas as

soluções manipuladas indicadas na Figura 5. É possível relacionar cor da solução, estado de agregação e aspecto do espectro apresentado. Além disso, foi observado que mesmo em condições onde predomina a forma monomérica, pode-se deslocar o equilíbrio para a forma dimérica com o uso de detergentes como o SDS. Na presença do detergente SDS a razão entre a concentração de micelas e concentração do corante irá determinar se as moléculas do corante permanecerão distribuídas isoladamente ou em pares no interior das micelas e isso pode ser monitorado por espectroscopia UV-visível (JUNQUEIRA *et al.*, 2002). Portanto, em presença de SDS, a predominância de dímero será dependente da concentração relativa de MB<sup>+</sup> e SDS. Conforme mostrado na Figura 6, mantendo fixa a concentração do corante, em concentração de SDS relativamente baixa o espectro observado com pico em 580 nm, é referente a forma dimérica, enquanto que, em concentrações relativamente altas de detergente, o espectro observado com pico em 665 nm é relativo a forma monomérica do corante (MORGOUNOVA *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Espectros de absorvância das soluções de azul de metileno (MB<sup>+</sup>) e do surfactante SDS em diversas concentrações. No inserto representação do MB<sup>+</sup> em micela de SDS na razão 1:1 (forma monomérica do corante) à direita, e 2:1 (forma dimérica do corante) à esquerda.





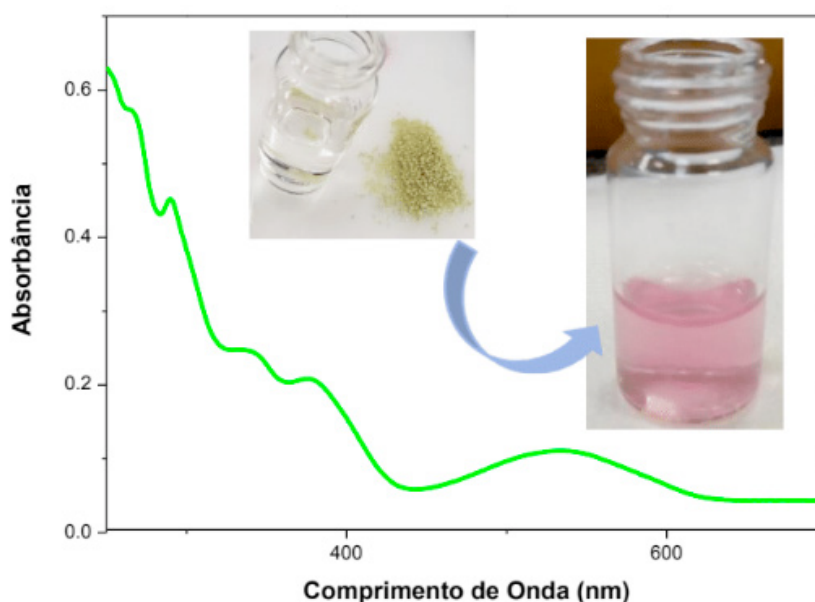
**Figura 7.** Espectros de absorvância das soluções de azul de metileno ( $\text{MB}^+$ ) e do surfactante CTAB nas diversas concentrações. No inserto representação  $\text{MB}^+$  em micela de CTAB na razão 1:1 (forma monomérica do corante) à direita, e 2:1 (forma dimérica do corante) à esquerda.

Para analisar espectros de corantes associados às micelas é importante entender seu comportamento e como alteram o estado de agregação do corante. A estrutura micelar está em equilíbrio com os monômeros da solução e com a monocamada de surfactante na interface ar/água. A presença de um sal na solução diminui a repulsão eletrostática entre os monômeros na interface e consequentemente diminui a CMC (efeito da força iônica sobre a CMC de um detergente). Esse efeito é observado apenas com altas concentrações do soluto (mM) (MANIASSO, 2001). Em uma solução de surfactante e corante  $\text{MB}^+$ , dependendo da carga do surfactante, e consequentemente das interações eletrostáticas, bem como da razão molar entre esses, pode ocorrer ou não formação de complexos que mudam as propriedades de ambos e o equilíbrio da solução. O  $\text{MB}^+$ , sendo positivamente carregado tem uma forte atração pelo SDS e tem sido sugerido que essa interação muda o equilíbrio da solução de SDS e os complexos formados têm uma grande tendência a permanecerem na interface (menor repulsão entre monômeros e menor solubilidade em água). Em solução de SDS e  $\text{MB}^+$ , a CMC é alcançada com menores concentrações de SDS, em relação ao surfactante puro. Já foi observado (JUNQUEIRA *et al.*, 2002) que quando a concentração do  $\text{MB}^+$  é aumentada de 0 para  $45 \mu\text{M}$ , a CMC de SDS diminui de 7 mM para  $70 \mu\text{M}$ . Assim, concentrações em micromolar de  $\text{MB}^+$  são suficientes para mudar a CMC em duas ordens de magnitude, o que indica que o  $\text{MB}^+$  facilita a formação das micelas. O uso de surfactantes catiônicos e aniônicos possibilita obter informações sobre a influência da carga da interface das micelas na associação com outras moléculas.

Para modular o equilíbrio monômero/dímero deve-se atentar ao fato de que o cálculo de concentração do detergente deve levar em conta que o corante se associa às micelas e não ao monômero do detergente. Portanto, acima da CMC, a concentração

de detergente deve ser dividida pelo número de agregação do detergente nas micelas de modo que se calcule corretamente a razão corante/micela.

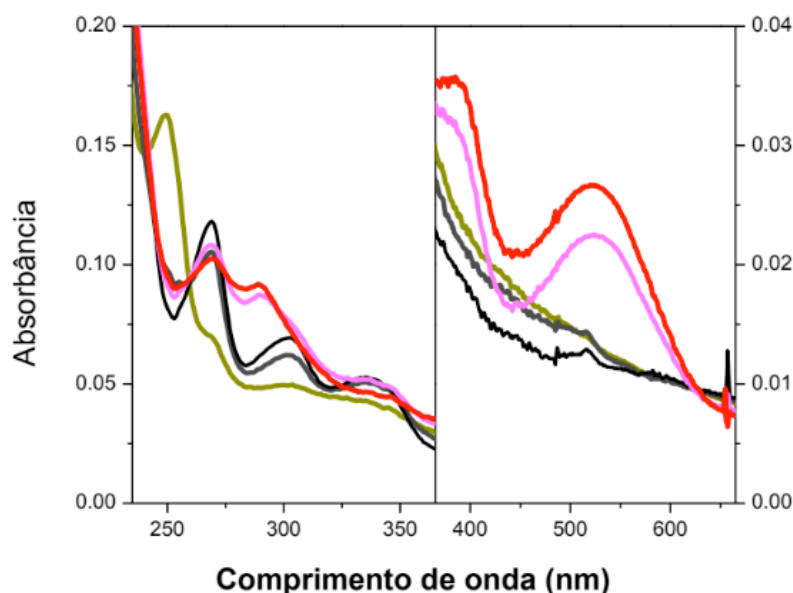
Além do azul de metileno, outros corantes tiazínicos, como o núcleo das fenotiazinas (PHT) quando excitados ao estado triplete podem reagir com um par no estado fundamental e assim gerar duas espécies, a forma reduzida com um elétron e o cátion radical. Em baixas concentrações do corante nas quais as formas agregadas não predominam, o cátion radical não fica estabilizado e pode reagir com o oxigênio molecular e dar origem ao derivado sulfóxido. (RODRIGUES *et al.*, 2006 ; SANTOS, 2009) O cátion radical das fenotiazinas são estáveis quando esses compostos estão na forma agregada de tal modo que é possível medir o espectro UV-vis no estado estacionário. Os espectros do cátion radical de fenotiazinas monoméricas podem ser obtidos somente na forma transiente com uso de laser de nano a fentosegundos (SOARES *et al.*, 2007 the regeneration of native horseradish peroxidase (HRP; MOHAN e MITTAL, 1995). Em geral, o cátion radical das fenotiazinas apresenta uma banda de absorção com pico em torno de 520 nm, conforme Figura 8, a qual mostra o espectro atribuído ao cátion radical da PHT após irradiação de 3h em lâmpada UV de 80 W ( $\lambda = 254$  nm):



**Figura 8.** Espectro de absorção do cátion radical de PHT após irradiação de 3h em lâmpada UV de 80W ( $\lambda = 254$  nm) a distância de 2 cm. O inserto à esquerda mostra a PHT no estado sólido antes da dissolução em  $H_2O$ , enquanto o inserto à direita mostra a solução obtida após irradiação e formação do cátion radical, o qual apresenta coloração rosa. A medida espectral foi realizada em cubeta de quartzo de caminho óptico 1 cm.

Nessas condições, a formação do cátion radical é corroborada por medidas de ressonância paramagnética do elétron (não mostrado). O uso da espectroscopia UV-visível para análise qualitativa permite analisar a interconversão temporal entre duas espécies moleculares e caracterizar a cinética de uma reação. A Figura 9 mostra as mudanças espectrais que ocorrem com PHT durante sua irradiação com luz UV. O espectro em amarelo escuro mostra o estado inicial antes da irradiação. As linhas

pretas fina e grossa mostram as mudanças espectrais que precedem o aparecimento do cátion radical e que são atribuídas à formação de sulfóxido. As linhas rosa e vermelha correspondem aos espectros do cátion radical obtidos nas regiões espectrais do UV (esquerda) e visível (direita).



**Figura 9.** Mudanças espectrais que ocorrem com PHT (solução aquosa 100  $\mu$ M) durante irradiação com luz UV a distância de 2 cm. As linhas pretas fina e grossa mostram as mudanças espectrais que precedem o aparecimento do cátion radical de PHT e que são atribuídas à formação de sulfóxido. As linhas rosa e vermelha correspondem aos espectros do cátion radical obtidos nas regiões espectrais do UV (esquerda) e visível (direita). A medida UV-vis foi realizada em cubeta de quartzo de caminho óptico 1 cm.

## 5 | CONCLUSÕES

As estratégias experimentais para analisar os estados agregados dos corantes aqui descritas são de utilidade para aplicação didática em cursos disciplinares e interdisciplinares que requerem a aquisição de competência na área de espectroscopia UV-visível, físico-química de sistemas heterogêneos e fotoquímica de corantes tiazínicos. Por tratar da análise de corantes, tem utilidade para os técnicos especializados que trabalhem em vários aspectos de pesquisa e desenvolvimento de corantes. A associação das estratégias experimentais com o objeto de aprendizagem permite melhor entendimento e assimilação do conteúdo.

## REFERÊNCIAS

BRITO, A. M. M.; ARAUJO-CHAVES, JULIANA CASARES, NANTES, I. L. **Apostila de aulas práticas de bioquímica: estrutura, propriedades e funções de biomoléculas para o BC&T.** Santo André-SP: UFABC, 2016.

BRITO, A. M. M.; NANTES, I. L. **Propriedades Fotofísicas do Azul de Metileno Aplicadas para o Ensino de Espectroscopia UV-Visível como Ferramenta para Análise Qualitativa em Bioquímica.** Revista de Ensino de Bioquímica, v. 15, p. 21, 2017.

COOPER, P. **Removing colour from dyehouse waste waters**. Asian Textile Journal, v. 3, n. 4, p. 52–56, 1995.

DRUMOND CHEQUER, F. M.; OLIVEIRA, G. A. R. DE; ANASTACIO FERRAZ, E. R.; CARVALHO, J.; BOLDRIN ZANONI, M. V.; OLIVEIR, D. P. DE. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. *In: Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*. [s.l.] InTech, 2013.

DRUMOND CHEQUER, F. M.; OLIVEIRA, G. A. R. DE; ANASTACIO FERRAZ, E. R.; CARVALHO, J.; BOLDRIN ZANONI, M. V.; OLIVEIR, D. P. DE. Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. *In: Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*. [s.l.] InTech, 2013.

FREITAG, M.; TEUSCHER, J.; SAYGILI, Y.; ZHANG, X.; GIORDANO, F.; LISKA, P.; HUA, J.; ZAKEERUDDIN, S. M.; MOSER, J.-E.; GRÄTZEL, M.; HAGFELDT, A. **Dye-sensitized solar cells for efficient power generation under ambient lighting**. Nature Photonics, v. 11, n. 6, p. 372–378, 2017.

GREEN, O.; EILON, T.; HANANYA, N.; GUTKIN, S.; BAUER, C. R.; SHABAT, D. **Opening a Gateway for Chemiluminescence Cell Imaging: Distinctive Methodology for Design of Bright Chemiluminescent Dioxetane Probes**. ACS Central Science, v. 3, n. 4, p. 349–358, 2017.

GURSES, A.; AÇIKYILDIZ, M.; GÜNEŞ, K.; GÜRSSES, M. S. **Dyes and Pigments**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. **Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces**. Physical Chemistry Chemical Physics, v. 4, n. 11, p. 2320–2328, 2002.

KATHERESAN, V.; KANSEDO, J.; LAU, S. Y. **Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: A review**. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 6, n. 4, p. 4676–4697, 2018.

MANIASSO, N. **Ambientes micelares em química analítica**. Química Nova, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001.

MOHAN, H.; MITTAL, J. P. **Formation and Reactivity of the Radical Cation of Bromobenzene in Aqueous Solution: A Pulse Radiolysis Study**. The Journal of Physical Chemistry, v. 99, n. 17, p. 6519–6524, 1995.

MORGOUNOVA, E.; SHAO, Q.; HACKEL, B. J.; THOMAS, D. D.; ASHKENAZI, S. **Photoacoustic lifetime contrast between methylene blue monomers and self-quenched dimers as a model for dual-labeled activatable probes**. Journal of Biomedical Optics, v. 18, n. 5, p. 056004, 2013.

NANTES, LSEL L.; BECHARAT, E. J. H.; CILENTO, G. **Horseradish Peroxidase-Catalyzed Generation of Acetophenone and Benzophenone in the Triplet State**. Photochemistry and Photobiology, v. 63, n. 6, p. 702–708, 1996.

RODRIGUES, T.; SANTOS, C. G. DOS; RIPOSATI, A.; BARBOSA, L. R. S.; MASCIO, P. DI; ITIRI, R.; BAPTISTA, M. S.; NASCIMENTO, O. R.; NANTES, I. L. **Photochemically Generated Stable Cation Radical of Phenothiazine Aggregates in Mildly Acid Buffered Solutions**. The Journal of Physical Chemistry B, v. 110, n. 25, p. 12257–12265, 2006.

SANTOS, C. G. DOS. **Caracterização Fotoquímica Do Núcleo Fenotiazínico Fotoexcitado Livre E Associado a Polietileno Glicol**. [s.l.] Universidade de Mogi das Cruzes, 2009.

SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. JAMES; CROUCH, S. **Principles of Instrumental Analysis**. 6. ed. Belmont: Cengage Learning, 2006, 2006.

SOARES, V. A.; SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H. C.; TERSARIOL, I. L. S.; SHIDA, C. S.; BAPTISTA,

M. S.; NASCIMENTO, O. R.; NANTES, I. L. **Light-Driven Horseradish Peroxidase Cycle by Using Photo-activated Methylene Blue as the Reducing Agent**. *Photochemistry and Photobiology*, v. 83, n. 5, p. 1254–1262, 2007.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. DEL; OLIVEIRA, C. S. DE; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; FÁTIMA TURCHIELLO, R. DE; BAPTISTA, M. S. **Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005.

TURRO, N. J.; RAMAMURTHY, V.; SCAIANO, J. C. **Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules**. [s.l: s.n.]. v. 88

VIVIANI, V. R.; AMARAL, D. T.; BEVILAQUA, V. R.; FALASCHI, R. L. **Orfelia -type luciferin and its associated storage protein in the non-luminescent cave worm *Neoditomyia* sp. (Diptera: Keroplatidae) from the Atlantic rainforest: biological and evolutionary implications**. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 17, n. 10, p. 1282–1288, 2018.

YAGUB, M. T.; SEN, T. K.; AFROZE, S.; ANG, H. M. **Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review**. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 209, p. 172–184, 2014.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes**. *Química Nova*, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

## POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E POSSÍVEIS EFEITOS À POPULAÇÃO DE RECIFE

**Cleonilde Maria do Nascimento**

Instituto Aggeu Magalhes - Fiocruz, Recife-PE

**Nicolas Nunes Ferreira**

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

**Helotônio Carvalho**

Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

**Sheilla Andrade de Oliveira**

Instituto Aggeu Magalhes - Fiocruz, Recife-PE

**RESUMO:** A poluição atmosférica é comprovadamente um agente causador e de piora do quadro de diversas doenças, entre elas doenças respiratórias, câncer de pulmão, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. A Organização Mundial de Saúde estima que 3 milhões de pessoas morrem anualmente devido a doenças causadas pela poluição atmosférica ambiental. Recife, apesar de ser uma metrópole com mais de 1,6 milhão de habitantes, não possui sistema de monitoramento de qualidade do ar. Ao longo dos anos, tem havido um aumento considerável no número de veículos da cidade, o que deve ter aumentado os níveis de poluição atmosférica e se refletido em um aumento na incidência de doenças com relação com a poluição atmosférica. Os resultados mostrados indicam um aumento considerável no número de internações devidas a infarto agudo do miocárdio e câncer de pulmão em Recife entre 2000 e 2016.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer de Pulmão. Doenças respiratórias. Infarto agudo do miocárdio. Qualidade do ar. Saúde Pública.

**ABSTRACT:** Air pollution is a known trigger of several diseases such as respiratory diseases, lung cancer, stroke and ischemic heart disease. World Health Organization (WHO) estimates 3 million people die every year from diseases associated to environmental air pollution. Recife, despite being a big city with 1.6 million people, does not have an air quality monitoring system. Along the years there has been a high increase in the number of vehicles in the city, what may have increased air pollution levels and may have led to increased incidence of diseases associated to air pollution. Results from this study show a significant increase in the number of hospitalizations due to ischemic heart disease and lung cancer between 2000 and 2016.

**KEYWORDS:** Lung cancer. Respiratory diseases. Ischemic heart disease. Air quality. Public health.

### 1 | INTRODUÇÃO

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que a poluição atmosférica seja responsável pela morte de



aproximadamente três milhões de pessoas anualmente (3). A poluição atmosférica está diretamente relacionada ao aumento considerável nos casos de infecções respiratórias, sendo também associada ao desencadeamento ou agravamento de doenças graves como edema pulmonar, câncer de pulmão e doenças cardiovasculares (1,3,4,7,12,14).

Há várias classes de poluentes atmosféricos e entre os principais encontra-se o material particulado. Seus riscos à saúde são determinados pelo tamanho, área superficial e composição das partículas, que são geradas normalmente pela queima de combustíveis fósseis em veículos automotores, indústrias e centrais termelétricas. Essas partículas são formadas por um núcleo de carbono com diferentes materiais adsorvidos à sua superfície, como metais pesados, hidrocarbonetos, nitratos e sulfatos (9).

O material particulado, é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) quando inalado (5,6). Estas espécies altamente reativas podem causar danos ao DNA, proteínas e membranas celulares, que podem culminar na morte da célula, a qual pode se manifestar na forma de apoptose (5,6,8,11). Além disso, o material particulado também pode induzir respostas inflamatórias, com aumento na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$ , sugerindo que o processo inflamatório gerado por material particulado possa estar relacionado aos efeitos nocivos destas partículas nos pulmões e no sistema respiratório como um todo (10,13).

Recife possui uma população aproximada de 1,6 milhão de habitantes e uma frota de quase 700 mil veículos. Dados obtidos através do DATASUS indicam um aumento no número de internações hospitalares por doenças associadas à poluição atmosférica na cidade de Recife no período analisado, entre 2000 e 2016, que pode estar relacionado ao grande aumento da frota de veículos da cidade nesse mesmo período (2).

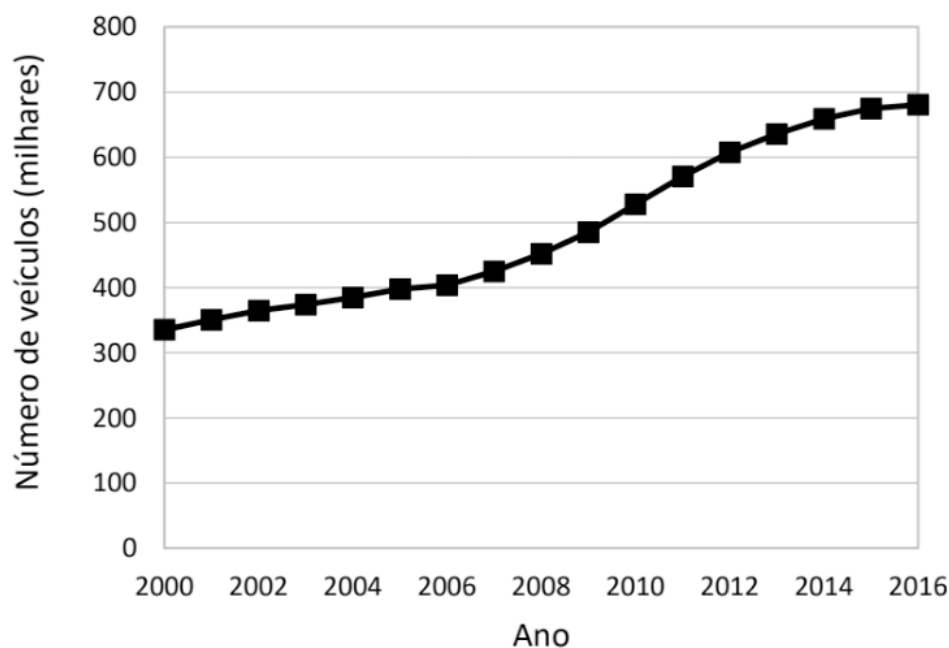
## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Os dados da evolução da frota de veículos de Recife foram obtidos através do site do Detran de Pernambuco (<http://www.detran.pe.gov.br/>). Os dados de internações hospitalares devidas doenças respiratórias, câncer de pulmão, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC) foram obtidos através do site do DATASUS (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/niuf.def>).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de avanços ocorridos nas últimas décadas, que resultaram na redução dos níveis de emissões de veículos novos, o grande aumento da frota em cidades como São Paulo, Rio de Janeiro e Recife nos últimos anos é responsável por elevados níveis de poluição, além de levar caos ao trânsito das grandes cidades brasileiras (2).

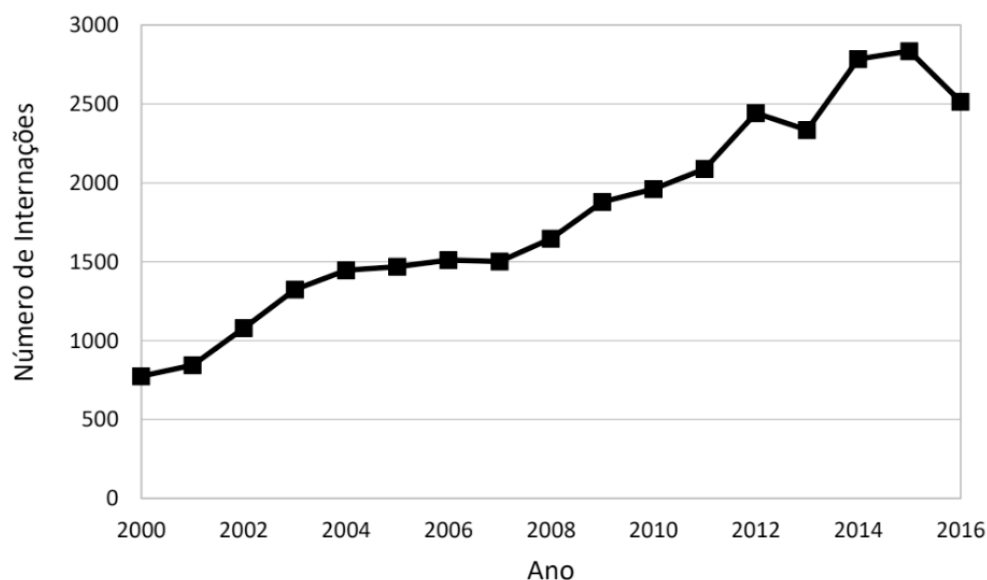
Segundo dados do DETRAN-PE durante o período de 2000 a 2016 a frota de veículos de Recife mais do que duplicou, como pode ser observado na Figura 1.



**Figura 1:** Crescimento da frota de veículos de Recife no período de 2000 a 2016.

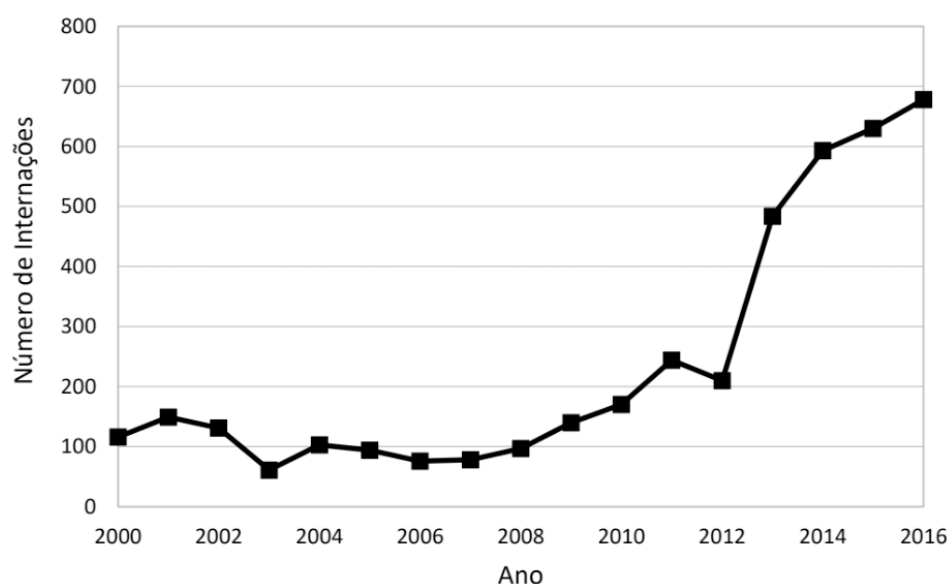
O grande aumento da frota de veículos, que se repete na região metropolitana de Recife como um todo, é um fator que deve ter contribuído para o aumento nos níveis de poluição atmosférica em Recife e na região metropolitana. Recife, assim como outras metrópoles brasileiras, infelizmente, ainda não possui um sistema de monitoramento de poluentes atmosféricos (2).

Dados do DATASUS indicam um aumento no número de internações hospitalares e mortes atribuídas a doenças relacionadas à poluição atmosférica em Recife e região metropolitana nos últimos anos. Tanto bronquite aguda quanto bronquite crônica, enfisema e outras doenças respiratórias crônicas vêm apresentando um aumento ao longo do período analisado (dados não mostrados), o que coincide com o aumento da frota de veículos de Recife nesse mesmo período. O mesmo se observa para o número de mortes relacionadas a doenças respiratórias (dados não mostrados). No caso de infarto do miocárdio, tem havido um aumento consistente de mais de 3 vezes no número de internações no período analisado (Figura 2). O número de mortes causadas por infarto do miocárdio não apresentou, no entanto, alterações importantes no período (dados não mostrados).



**Figura 2:** Número de internações hospitalares devida a infarto agudo do miocárdio, na cidade de Recife, no período entre 2000 e 2016.

De todos os dados analisados, os dados mais contundentes são as internações devida a câncer de pulmão que apresentaram aumento de sete vezes no período analisado, de 2000 a 2016 (Figura 3). Apesar do aumento vertiginoso nas internações por câncer de pulmão, o número de mortes cresceu em menor grau, mas ainda mostra valores de até 90 % de aumento em relação às mínimas do período analisado (dados não mostrados).



**Figura 3:** Número de internações hospitalares devida a câncer de pulmão, na cidade de Recife, no período entre 2000 e 2016.

#### 4 | PERSPECTIVAS

Estão em andamento estudos para aprofundar o tema e verificar se há de fato

uma relação de causa e efeito entre o aumento do número de veículos em Recife e o aumento no número de internações devidas a doenças relacionadas à poluição atmosférica. Espera-se que os resultados obtidos possam convencer as autoridades competentes da importância do monitoramento da qualidade do ar, em especial em grandes metrópoles como Recife e que em um futuro próximo seja instalada uma rede de monitoramento de qualidade do ar na cidade.

Espera-se também que esses dados sirvam de subsídios para a adoção de políticas públicas que visem restringir ainda mais a emissão de poluentes por veículos automotores, e com isso reduzir os níveis de poluição atmosférica. Uma medida de política pública que teria grande efeito na diminuição dos níveis de poluição atmosférica seria o investimento maciço em transporte de massa (metrô e trens). Infelizmente, o governo de Pernambuco e a prefeitura de Recife não têm feito investimentos importantes nessa área.

Os resultados aqui mostrados podem, ainda, ajudar as autoridades competentes a realmente assumir os transportes de massa como prioridade, visto que apenas a melhoria e o aumento da capacidade do transporte público devem incentivar as pessoas a deixarem seus carros em casa, contribuindo tanto para uma redução dos níveis de poluição como para uma melhoria no caótico trânsito da cidade.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, J.O.; THUNDIYIL, J.G.; STOLBACH, A. **Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health.** J Med Toxicol. 8:166-75, 2012.

CARVALHO, H. **The air we breathe: differentials in global air quality monitoring.** Lancet Respir Med. 4(8):603-605, 2016.

COHEN, A.J.; BRAUER, M.; BURNETT, R. et al. **Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015.** Lancet, 389:1907-1918, 2017.

FAJERSZTA, J.N.L.; VERAS, M.; BARROZO, L.V.; SALDIVA, P. **Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer.** Nat Rev Cancer. 13:674-8, 2013.

GONZALEZ-FLECHA B. **Oxidant mechanisms in response to ambient air particles.** Mol Aspects Med. 25:169-82, 2004.

GHIO, A.J.; CARRAWAY, M.S.; MADDEN, M.C. **Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems.** J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 15:1-21, 2012.

GUARNIERI, M.; BALMES, J.R. **Outdoor air pollution and asthma.** Lancet. 383:1581-1592, 2014.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford University Press, 4th ed., 2007.

KATSOUYANNI, K. **Ambient air pollution and health.** Brit Med Bull. 68: 143–156, 2003.

KIM, J.A.; CHO, J.H.; PARK, I.H.; SHIN, J.M.; LEE, S.A.; LEE, H.M. **Diesel Exhaust Particles Upregulate Interleukins IL-6 and IL-8 in Nasal Fibroblasts.** PLoS ONE 11(6): e0157058. doi:10.1371/journal.pone.0157058, 2016.

18. MATÉS, J.M.; SEGURA, J.A.; ALONSO, F.J.; MÁRQUEZ, J. **Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update.** Arch Toxicol. 86:1649-65, 2012.

SHAH, A.S.; LANGRISH, J.P.; NAIR, H.; MCALLISTER, D.A.; HUNTER, A.L.; DONALDSON, K.; NEWBY, D.E.; MILLS, N.L. **Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis.** Lancet. 382:1039-1048, 2013.

ORONA, N.S.; ASTORT, F.; MAGLIONE, G.A.; SALDIVA, P.H.N.; YAKISICH, J.S.; TASAT, D.R. **Direct and indirect air particle cytotoxicity in human alveolar epithelial cells.** Toxicology in Vitro. 28: 796–802, 2014.

YANG, Y.; LI, R.; LI, W.; WANG, M.; CAO, Y.; WU, Z.; XU, Q. **The association between ambient air pollution and daily mortality in Beijing after the 2008 olympics: a time series study.** PLoS One. 8(10):e76759, 2013.

## UTILIZAÇÃO DO ENSAIO COMETA PARA DETECTAR EFEITO GENOTÓXICO DO METANOSULFONATO DE METILA EM CÉLULAS DE *Biomphalaria glabrata*

### Dewson Rocha Pereira

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,  
Recife, Pernambuco - PE.

### Maíra de Vasconcelos Lima

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,  
Recife, Pernambuco - PE.

### Williams Nascimento de Siqueira

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,  
Recife, Pernambuco - PE.

### Gabrielly Christynne Nascimento Sales

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,  
Recife, Pernambuco - PE.

### Hianna Arely Milca Fagundes Silva

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,  
Recife, Pernambuco - PE.

### José Luis Ferreira Sá

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,  
Recife, Pernambuco - PE.

### Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Departamento de Biofísica e Radiobiologia,  
Recife, Pernambuco - PE.

de água doce *Biomphalaria glabrata*, para a detecção de possíveis danos no DNA após a exposição ao MMS e para avaliar a potencial aplicação para monitoramento da genotoxicidade do ambiente de água doce. O *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*) é um bioindicador ambiental utilizado, de forma eficaz e sensível, para identificação de agentes genotóxicos, enquanto que o metanosulfonato de metila (MMS) é reconhecido como agente genotóxico utilizado no ensaio cometa como controle positivo em células de mamíferos, mas nunca foi testado em *B. glabrata*. Neste estudo moluscos *B. glabrata* foram expostos ao MMS (0,3 mM) e avaliados por meio do ensaio cometa. Foi observado efeito genotóxico do MMS sobre *B. glabrata*, onde 90 % dos nucleóides do grupo tratado apresentaram dano ao DNA, verificado pela migração de DNA cromossomal e consequente formação de cauda. O ensaio cometa com *B. glabrata* pode, assim, proporcionar o estudo da ação de agentes químicos sobre o meio aquático de forma sensível e preventiva e o MMS pode ser utilizado como controle positivo dos experimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ensaio cometa, *Biomphalaria glabrata*, MMS

**RESUMO:** O objetivo deste estudo foi usar o ensaio cometa em hemócitos do moluscos

**ABSTRACT:** The aim of the study was to use the comet assay on haemocytes of freshwater



snail *Biomphalaria glabrata*, for detection of possible DNA damage after exposure to MMS and to evaluate the potential application for genotoxicity monitoring of freshwater environment. *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*) is an environmental bioindicator used in an effective and sensitive way to identify genotoxic agents, whereas methyl methanesulfonate (MMS) is recognized as a genotoxic agent used in the comet assay as a positive control in mammals, but has never been tested on snails. In this study *B. glabrata* mollusks were exposed to MMS (0.3 mM) and evaluated by the comet assay. A genotoxic effect of MMS was observed on *B. glabrata*, where 90% of nucleotides from the treated group showed damage to the DNA, verified by chromosomal DNA migration and consequent tail formation. This study confirmed that the comet assay applied on *Biomphalaria glabrata* haemocytes may be a useful tool in determining the potential genotoxicity of water pollutants and MMS can be used as a positive control of the experiment. **KEYWORDS:** Comet assay, *Biomphalaria glabrata*, MMS.

## 1 | INTRODUÇÃO

Devido as diversas atividades humanas, milhares de substâncias nocivas são liberadas diariamente no meio ambiente podendo causar impactos danosos aos organismos vivos (AMORIM et al., 2003). Dentre os diferentes ecossistemas, o meio aquático é um dos principais locais para descartes de resíduos industriais, esgotos domésticos e outros. Estas substâncias podem acarretar prejuízos para a sobrevivência das espécies e consequentemente um impacto ambiental que deve ser avaliado (CAJARAVILLE et al., 2000).

As consequências da ação das substâncias poluidoras podem ser percebidas por meio de alterações fisiológicas, comportamentais, malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução ou até mesmo a morte de toda a comunidade, impactando diretamente a estrutura do ecossistema (RESH, DAVID & VH, 1993; CLEMENTS, 2000). As malformações causadas por alterações da molécula de DNA, podem ser um risco também para a saúde humana, por ser repassada por meio da cadeia alimentar (JHA, 1998). Estas alterações podem estar relacionada com o surgimento de doenças congênitas, doenças genéticas (mutagênese) e degenerativas, envelhecimento celular, câncer, entre outras (ERDTMANN, 2003).

Para o monitoramento e identificação do grau de dano sofrido nos seres vivos de um ecossistema impactado, se faz necessário a utilização de técnicas que avaliem os parâmetros físico-químicos relacionados com os danos surgidos nos organismos expostos a estes agentes teratogênicos. O Ensaio Cometa (teste de células individualizadas em gel de agarose) vem sendo utilizado em diversas áreas de conhecimento, incluindo biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processos de reparo de DNA e ecotoxicologia genética (GONTIJO & TICE, 2003 VERÇOSA et al., 2017; FOWLER et al., 2017). É uma técnica desenvolvida para detectar quebras no DNA de forma preventiva (pré-mutagênese) (KAMMANN

et al., 2001; DE LAPUENTE et al., 2015). As células, avaliadas por esta técnica, que possuem elevado grau de dano no DNA apresentam uma forma semelhante a de um cometa, pois ocorre aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo (SPEIT & HARTMANN, 1999; SIDDIQUI, KHANVILKAR & VINEETA, 2017).

O molusco *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*), considerado um bioindicador ambiental (CLAXTON, HOUK & HOUGHES, 1998; DE FREITAS TALLARICO et al., 2014; ARAÚJO et al., 2018; SILVA et al., 2018) foi utilizado recentemente para avaliar alterações ao DNA através do ensaio cometa (GRAZEFFE et al., 2008). A hemolinfa deste animal contém hemócitos (células de defesa) que irão estar em contato direto com os contaminantes. Portanto, este tecido é apropriado para o teste do cometa (VILLELA et al., 2006). Neste estudo, moluscos *B. glabrata* foram expostos à substância genotóxica metanosulfonato de metila (MMS), com a finalidade de observar dano à molécula de DNA, por meio do ensaio cometa, estabelecendo um controle positivo para futuro experimentos envolvendo moluscos e agentes químicos na área da biofísica ambiental.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Animais

Foram utilizados moluscos adultos da espécie *B. glabrata* pigmentados, apresentando 10-14 mm de diâmetro de concha, oriundos do Moluscário do Laboratório de Radiobiologia localizado no Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE. Os animais foram mantidos em recipientes de polietileno com capacidade para 20 L de água filtrada e decolorada (pH 7,0 e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e alimentados diariamente com alfaces (*Lactuca sativa*) frescos e livres de agrotóxicos.

### 2.2 Exposição ao metanosulfonato de metila (MMS)

Para realização dos experimentos foram formados dois grupos com cinco espécimes cada. Os moluscos do grupo um foi exposto ao MMS (0,3 mM) da Acros organics por 24 horas. Enquanto que os espécimes do grupo dois (controle) foram exposto a água filtrada e decolorada. Após o período de exposição os moluscos foram submetidos ao ensaio cometa.

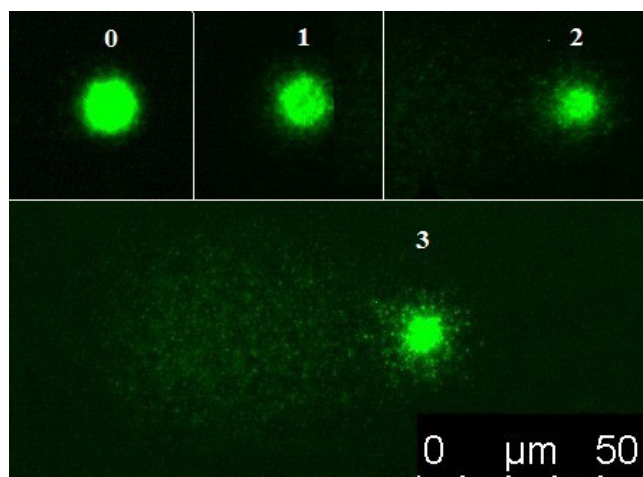
### 2.3 Ensaio cometa

O ensaio alcalino do Cometa foi realizado como descrito por Singh e col. (1988), com algumas adaptações. Para cada animal duas lâminas de microscópio foram cobertas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% (Sigma-aldrich) dissolvida em PBS (livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ). Foi coletado 100  $\mu\text{L}$  de hemolinfa de cada animal, através de estímulo sucessivo da região podal, que culmina na liberação de hemolinfa pelo

animal. Este volume de hemolinfa foi homogeneizado em 100  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão, e colocado sobre a lâmina coberta com a agarose de ponto de fusão normal. Após solidificação a 4°C (5-10 min), as lâminas foram incubadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Triton-X 100 1% e DMSO 10 %, pH 10,0) por 12 h a 4°C. Após lise, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese horizontal (10 cm x 28 cm) e imersas em tampão alcalino, pH 13,0 (EDTA 1 mM e NaOH 300 mM) por 20 min e submetidas a eletroforese (0,74 V/cm, 150 mA) por 20 min a 4°C. As lâminas foram então neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 por 15 min, fixadas com álcool absoluto por 10 min e coradas com SYBR safe (Invitrogen). Foram analisadas 100 células por animal em microscópio de fluorescência (Nikon H550L) em aumento de 400x, com um filtro de excitação de 450-490 nm, filtro de emissão de 500-550 nm e um filtro de barreira de 495 nm. A análise visual dos danos nos hemócitos foi realizada de acordo com Jaloszynski e col. (1997), que consistiu na classificação dos cometas em categorias (0 a 3). Cada uma dessas categorias representa, de forma crescente, a extensão do dano ao DNA. Por exemplo, na categoria 0 os cometas não apresentam cauda, na categoria 3 os cometas apresentam cabeça pequena e cauda longa contendo a maior parte do conteúdo de DNA (dano máximo).

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito genotóxico do MMS foi avaliado sobre hemócitos de *B. glabrata* por meio do Ensaio Cometa. No ensaio foi observada a presença de cauda e diminuição da cabeça dos nucleóides do grupo exposto ao MMS em comparação ao grupo controle (Figura 1). A análise visual dos cometas demonstrou que 90% dos nucleóides do grupo exposto ao MMS (0,3 mM) apresentaram dano ao DNA entre as categorias 2 e 3, indicando migração do DNA cromossomal danificado comparado ao grupo controle. Portanto, a concentração de 0,3 mM de MMS foi capaz de induzir dano ao material genético do *B. glabrata*.



**Figura 1.** Imagens de cometas, a partir de hemócitos expostos ao MMS de *Biomphalaria glabrata*, corados com SYBR safe. Categoria zero (0) representa a ausência de dano genético, e as categoria de 1-3 indicam dano ao DNA de forma crescente. (Fonte: Autor).

Estudos recentes utilizaram o MMS em ensaio cometa com diferentes sistemas biológicos, desde células de mamíferos (COLLIN, DUŠINSKÁ & HORSKÁ, 2001), peixes (LEMONS et al., 2005) e moluscos (*Corbicula fluminea*) (RIGONATO, MANTOVANI & JORDÃO, 2005). Este agente genotóxico demonstrou eficácia na indução de danos ao DNA avaliados por meio do ensaio cometa em *B. glabrata*. O MMS é um agente alquilante que atua sobre os centros nucleofílicos do DNA formando monoadutos (tipo de ligação química), por meio de uma reação de substituição (JENKINS et al., 2005). Diferentes resposta celulares são ocasionadas pela formação de monoadutos, como: parada na replicação, inibição da transcrição, parada no ciclo celular, reparo do DNA e morte celular (WANG & LIPPARD, 2005).

#### 4 | CONCLUSÕES

A utilização do Ensaio Cometa com *B. glabrata* possibilita a obtenção de informações a nível molecular, o que permite estudar a ação de agentes químicos de forma sensível e preventiva. O MMS, nas condições descritas neste trabalho pode ser utilizado como controle positivo nos experimentos de genotoxicidade com hemócitos de *B. glabrata* expostos a agentes químicos. Reforçando a utilização destes animais como bioindicadores de ambientes aquáticos.

#### REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. C. A. **Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais.** Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 6, p. 158-170. 2003.
- ARAÚJO, H. D. A.; SILVA, L. R. S.; SIQUEIRA, W. N.; FONSECA, C. S.; SILVA, N. H., MELO, A. M., MARTINS, M. C. B. & LIMA, V. L.. **Toxicity of Usnic Acid from *Cladonia substellata* (Lichen) to embryos and adults of *Biomphalaria glabrata*.** Acta tropica, v. 179, p. 39-43, 2018.
- BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S. & SPEIT, G. **The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing.** Mutagenesis, v. 20, n. 4, p 245-254. 2005.
- BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P; HONMAH, M; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMAJ, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD V; UNO, Y.; VASQUEZ, M. & HARTMANN, A. Fourth International Workgroup **on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup.** Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 627, n. 1, p. 31-35. 2007.
- CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, J. M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. **The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach.** Science of the Total Environment, v. 247, n. 2, p. 295-311, 2000.
- CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S. & HUGHES, T. J. **Genotoxicity of industrial wastes and effluents,** Mutation Research, v. 410, n. 3, p. 237-243, 1998.
- CLEMENTS, W. H. **Integrating effects of contaminants across levels of biological organization.** Journal Ecosystem Stress and Research, v. 7, n. 2, p. 113-116, 2000.

- COLLINS, A. R.; AI-GUO, M. & DUTHIE, S. J. **The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells.** Mutation Research/DNA Repair, v. 336, n. 1, p. 69-77, 1995.
- COLLINS, A. R.; DUŠINSKÁ, M. & HORSKÁ, A. **Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay.** Acta Biochimica Polonica, V. 48, N. 3, p. 611-614 2001.
- DE FREITAS TALLARICO, L.; BORRELY, S. I., HAMADA, N., GRAZEFFE, V. S., OHLWEILER, F. P., OKAZAKI, K., Granatelli, A. T. Pereira, I. W.; Pereira, C. A. DE B. & Nakano, E. **Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples.** Ecotoxicology and environmental safety, v. 110, p. 208-215, 2014.
- DE LAPUENTE, J; LOURENÇO, J., MENDO, S. A., BORRÀS, M., MARTINS, M. G., COSTA, P. M. & PACHECO, M. **The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives.** Frontiers in genetics, v. 6, p. 180, 2015.
- ERDTMANN, B. **A genotoxicidade nossa de todos os dias.** In: Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. Genética Toxicológica. Porto Alegre: **Ed. Alcance**, p. 21-48 2003.
- FOWLER, T. L; FISHER, M. M., BAILEY, A. M., BEDNARZ, B. P., & KIMPLE, R. J.. **Biological characterization of a novel in vitro cell irradiator.** PloS one, v. 12, n. 12, p. e0189494, 2017.
- GONTIJO, A. M. M. C. & TICE, R. **Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas.** Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003.
- GRAZEFFE, V. S.; DE FREITAS TALLARICO, L.; DE SA PINHEIRO, A.; KAWANO, T.; SUZUKI, M. F.; OKAZAKI, K.; PEREIRA, C. A. de B. & NAKANO, E. **Establishment of the comet assay in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).** Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 654, n. 1, p. 58-63, 2008.
- JAŁOSZYŃSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-ŚWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J. & SZYFTER, K. **Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay.** Mutation Research/ DNA Repair, v. 385, n. 3, p. 223-233, 1997.
- JENKINS, G. J. S.; DOAK, S. H.; JOHNSON, G. E.; QUICK, E.; WATERS, E. M. & PARRY, J. M. **Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?** Mutagenesis, v. 20, n. 6, p. 389-398, 2005.
- JHA, A.N. **Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies.** Mutation Research, v. 399, n. 1, p. 1-2, 1998.
- KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. **A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay.** Mutation Research, Amsterdam. v. 498, p. 61-77, 2001.
- LEMOS, N. G.; DIAS, A. L.; SILVA-SOUZA, A. T. & MANTOVANI, M. S. **Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 19, n. 2, p. 197-201, 2005.
- RESH, V. H. & ROSENBERG, D. M. **Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates.** New York : Chapman & Hall,. ix, 488 1993.
- RIGONATO, J.; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B. Q. **Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity.** Genetics and Molecular Biology, v. 28, n. 3, p. 464-468, 2005.

SABATIER, L.; LEBEAU, J.; DUTRILLAUX, B. **Radiation-induced carcinogenesis: individual sensitivity and genomic instability.** Radiation and Environmental Biophysics, v. 34, n.4, p.293-232, 1995.

SIDDIQUI, S; KHANVILKAR, V. V. & JAGDALE, D. **In-vitro methods of screening of anti-cancer agent.** World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, V 6, Issue 9. 2017.

SILVA, H. A. M. F.; SIQUEIRA, W. N., SÁ, J. L. F., SILVA, L. R. S., MARTINS, M. C. B., AIRES, A. L., AMÂNCIO, F. F.; Pereira, E. C.; ALBUQUERQUE, M. C. P.; MELO, A. M. M. A. & SILVA, N. H. **Data set of the toxic effects of divaricatic acid depside on Biomphalaria glabrata and Schistosoma mansoni cercariae.** Data in Brief, 2018.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. & SCHNEIDER, E. L., **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells,** Experimental cell research. v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SPEIT, G. & HARTMANN, A. **The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair.** DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems, v. 113, p. 203-212, 1999.

TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y; ROJAS, E; RYU, J. C. & SASAKI, Y. F. **Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.** Environmental and molecular mutagenesis, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

VERÇOSA, C. J.; DE MORAES FILHO, A. V., DE ARAÚJO CASTRO, Í. F., DOS SANTOS, R. G., CUNHA, K. S.; SILVA, D. D. M.; GARCIA, A. C. L.; NAVONI, J. A.; DO AMARAL, V. S. & ROHDE, C. **Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of Drosophila melanogaster exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region.** Ecotoxicology and environmental safety, v. 141, p. 148-153, 2017.

VILLELA, I. V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P. **DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants;** Mutation Research, v. 605, p. 78–86, 2006.

WANG, D. & LIPPARD, S. J. **Cellular processing of platinum anticancer drugs.** Nature reviews Drug discovery, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005.



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO OBTIDO DO *Allium sativum* L

**Gleyka Daisa de Melo Santos**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e Embriologia  
Recife – Pernambuco

**Erwelly Barros de Oliveira**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e Embriologia  
Recife – Pernambuco

**Paloma Lys de Medeiros**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e Embriologia  
Recife – Pernambuco

**Eliete Cavalcanti da Silva**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e Embriologia  
Recife – Pernambuco

**João Soares Brito da Luz**

Universidade Federal de Pernambuco,  
Departamento de Histologia e Embriologia  
Recife – Pernambuco

**RESUMO:** Leishmanioses estão entre as doenças infecciosas parasitárias de maior incidência no mundo, refletindo um grave problema de saúde pública. Considerando as dificuldades com relação à terapêutica e a ausência de vacinas, há urgência pela busca de novas drogas, dentre as quais se incluem os fitoterápicos. O alho (*Allium sativum* L.) apresenta vários compostos químicos que

potencializam as suas diversas atividades biológicas. O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do extrato etanólico do *Allium sativum* L. frente às formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ( $2 \times 10^6$  parasitas/mL) foram testadas nas concentrações de 0,6 a 6 mg/mL para a obtenção da  $IC_{50}$  pelo método colorimétrico do MTT. Anfotericina B representou o controle positivo e como controle negativo, o meio de cultura. Foram, também, realizados testes para determinação de metabólitos secundários (alcalóides e taninos) presentes no extrato etanólico de *Allium sativum* L. (EEAsL). Com 72 h de incubação, observou-se que o EEAsL não apresentou atividade leishmanicida *in vitro* para as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O EEAsL apresentou pequena quantidade de alcalóides e considerável quantidade de taninos. Neste contexto, faz-se necessário ampliarmos a investigação da atividade *in vitro* do EEAsL frente as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, em função de serem realizadas modificações no processo de extração do mesmo; visto que, conforme alguns achados da literatura, tem-se referido que o extrato de alho obtido por diferentes metodologias foi capaz de apresentar atividade contra outras espécies de *Leishmania*.

**ABSTRACT:** Leishmaniasis is among the most prevalent infectious parasitic diseases in the world, reflecting a serious public health problem. Considering the difficulties with therapeutics and the absence of vaccines, there is an urgent need for the search for new drugs, among which phytotherapies are included. Garlic (*Allium sativum* L.) presents several chemical compounds that potentiate its various biological activities. The main objective of the present study was to evaluate the *in vitro* leishmanicidal activity of the *Allium sativum* L. ethanolic extract against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes. The promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* ( $2 \times 10^6$  parasites/mL) were tested at concentrations of 0.6 to 6 mg/mL to obtain the  $IC_{50}$  by the MTT colorimetric method. Amphotericin B represented the positive control and as the negative control, the culture medium. Tests were also carried out for the determination of secondary metabolites (alkaloids and tannins) present in the *Allium sativum* L. ethanolic extract (EEAsL). At 72 h incubation, it was observed that the EEAsL showed no leishmanicidal activity *in vitro* for the promastigote forms of *L. (L.) amazonensis*. The EEAsL presented small amounts of alkaloids and considerable amount of tannins. In this context, it is necessary to expand the investigation of the *in vitro* activity of the EEAsL against the promastigotes forms of *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, due to changes in the extraction process; since, according to some literature findings, it has been reported that the garlic extract obtained by different methodologies was able to present activity against other species of *Leishmania*.

**KEYWORDS:** *Allium sativum* L. Leishmaniasis. Leishmanicidal activity

## 1 | INTRODUÇÃO

Leishmanioses representam um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que acometem o homem e outras espécies de mamíferos, numa considerável extensão dos trópicos e subtrópicos (NUNES *et al.*, 2008; WHO, 2012). Estão entre as doenças infecciosas parasitárias de maior incidência no mundo, endêmica em 98 países com mais de 350 milhões de pessoas em risco, e dois milhões de novos casos por ano, com uma mortalidade anual de aproximadamente 60.000 casos por ano, um número somente superado pela malária dentre as doenças parasitárias (HOTEZ, 2007; WHO, 2012). Na América Latina, o Brasil é o país que registra o maior número de casos dessa doença, cerca de 90% do total notificado (WHO, 2012).

De acordo com a espécie, a doença pode apresentar-se sob três formas clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral; abrangendo uma ampla variedade de sinais, sintomas e graus variados de severidade. As leishmanias podem causar desde infecções inaparentes, oligossitomáticas até lesões destrutivas e desfigurantes, constituindo-se em um importante problema de saúde pública (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Considerando as dificuldades em relação à terapêutica e a ausência de vacinas,

há urgência pela busca de novas drogas, dentre as quais se incluem os fitoterápicos. Pesquisas têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento de leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas. Muitos produtos naturais apresentam em sua composição substâncias descritas na literatura como eficazes na atividade leishmanicida (SOARES-BEZERRA et al., 2006).

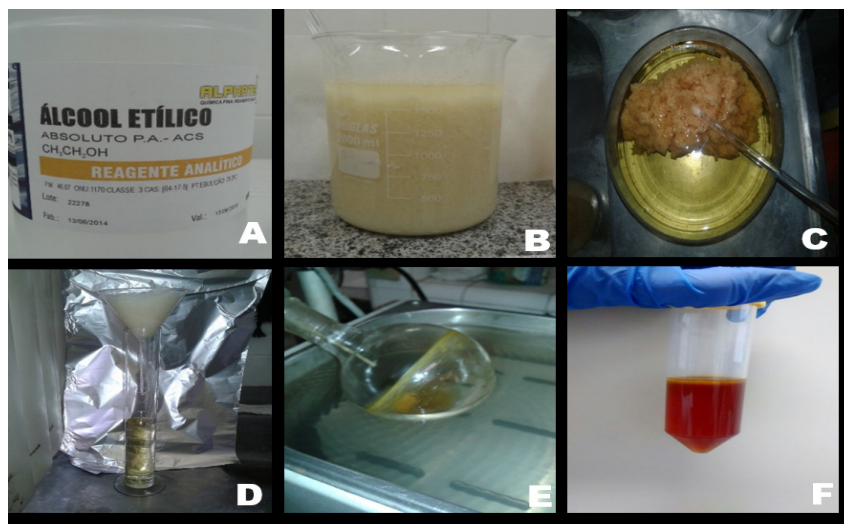
Segundo a literatura, o alho (*Allium sativum* L.) da família *Lilaceae*, apresenta diversas atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antiparasitária, gastroprotetora, antidislipidêmica, anti-hipertensiva, anticancerígena e antimicrobiana, entre outras (WABWOBA et al., 2010). O alho é conhecido por vários nomes populares, sendo muito utilizado na culinária e atualmente seu poder terapêutico tem sido reconhecido pelo Ministério da Saúde e assim como pelo FDA (WABWOBA et al., 2010).

## 2 | METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia (**LCT-DHE**) - Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Em colaboração com o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica - CB/UFPE, foi realizado o processo de concentração em rotaevaporador do extrato etanólico de *Allium sativum* L.

### 2.1 Obtenção Do Extrato Etanólico De *Allium Sativum* L.

Para a preparação do extrato etanólico de *Allium sativum* L. utilizou-se um quilograma de alho da casca branca comprado em mercado popular, juntamente com três litros de álcool etílico absoluto (solvente). Inicialmente descascou-se todos os alhos e em seguida realizou-se a trituração do material em um liquidificador com o auxílio do solvente; após o término da trituração o produto final ficou em contato com o solvente durante uma semana, em recipientes de vidro e hermeticamente fechados, para que não houvesse contaminação. Após esse período foi realizada uma filtração, com a utilização de gazes limpas em um funil de vidro, para evitar a passagem de nenhum fragmento de alho para o extrato. Após o processo de filtração, procedeu-se a rotaevaporação do extrato para eliminação do solvente até atingir massa constante, restando apenas o extrato puro (**Figura 1**).



**Figura 1.** Etapas para a obtenção do extrato etanólico de *Allium sativum* L. (EEAsL) **A)** Solvente (álcool etílico absoluto, PA) utilizado na etapa da extração. **B)** material triturado (alhos) em contato com o solvente. **C)** produto final em contato com o solvente (após uma semana). **D)** processo de filtração do EEAsL utilizando-se um funil de vidro com gazes colocado numa proveta. **E)** etapa da rotaevaporação do EEAsL para evaporação do solvente. **F)** obtenção do extrato puro.

## 2.2 Avaliação da Atividade Leishmanicida *In Vitro*

Os parasitas utilizados foram cedidos pelo Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) da FIOCRUZ-PE. Foi utilizada cepa de formas promastigotas de *Leishmania L. amazonensis* em fase exponencial de crescimento, para os ensaios de atividade antiparasitária *in vitro*. Os parasitas foram mantidos em meio LIT (liver infusion tryptose), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotechnology Ltda.), inativado a 56°C por 1 hora em banho-maria, 0,1 % de antibióticos (estreptomicina e penicilina) e 0,2% de hemina, em estufa de BOD a 26°C.

Para a determinação da IC<sub>50</sub>, os ensaios foram realizados pelo método colorimétrico MTT (MOSMANN, 1983), onde foi analisada capacidade dos parasitas viáveis reduzirem o sal [3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difenil tetrazólio] (MTT), através da ação da desidrogenase mitocondrial, no produto Formazan (GUIMARÃES et al., 2010). As formas promastigotas dos parasitas (*L. (L.) amazonensis*) foram distribuídas em placas de 96 poços, na concentração de 2x10<sup>6</sup> células/mL de meio LIT. Em seguida foi realizada uma diluição seriada com o meio LIT a 20% em diferentes concentrações (0,6 - 6 mg/mL) do extrato etanólico de *Allium sativum* L., tendo a anfotericina B como controle positivo e como controle negativo, o meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa de BOD à 26°C por 72 horas. Após este período, foi adicionado o MTT (Sigma) a 5 mg/mL em cada poço e foi realizada nova incubação durante três horas. A reação foi interrompida pela adição de DMSO e a placa lida em um espectrofotômetro a 570 nm.

## 2.3 Identificação dos Metabólitos Secundários

Foram realizados testes para a identificação dos metabólitos secundários no extrato obtido. Todavia, levou-se em consideração que os efeitos dessas substâncias bioativas podem variar devido a vários fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura e disponibilidade hídrica (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

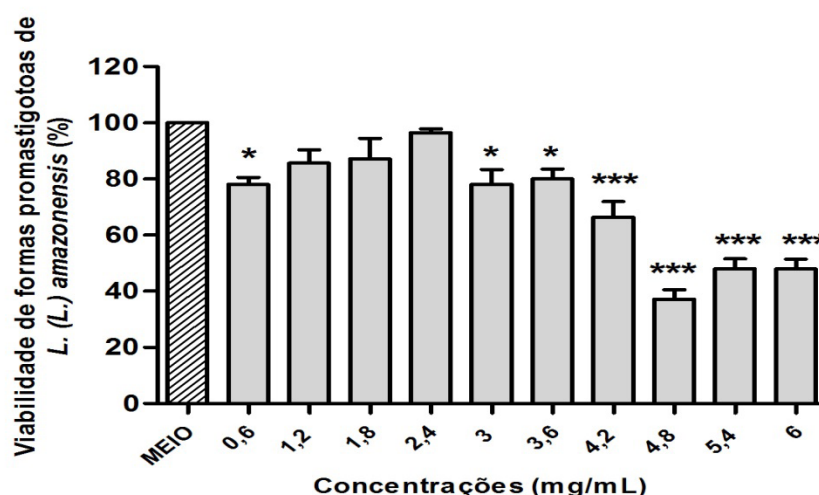
## 2.4 Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelo método de ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade leishmanicida do *Allium sativum* L tem sido estudada por outros pesquisadores, que relacionam a influência do processo de extração do mesmo. Wabwoba et al. (2010) referiram atividade leishmanicida *in vitro* do extrato do *Allium sativum* L. frente formas promastigotas de *L. major* e *L. donovani*, com valores de  $IC_{50}$  de 34,22  $\mu\text{g/mL}$  e 37,41  $\mu\text{g/mL}$  (respectivamente).

Na **figura 2**, observou-se que após 72 horas de incubação, o extrato do *Allium sativum* L. (EEAsL) não apresentou uma efetiva atividade leishmanicida *in vitro* ( $IC_{50} \sim 4,8 \text{ mg/mL}$ ) para as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

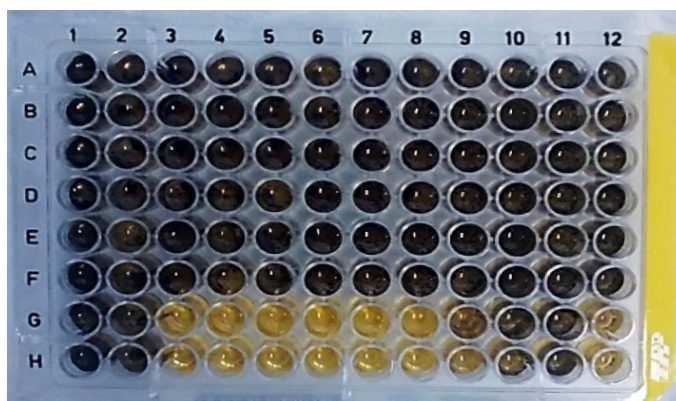


**Figura 3.** Efeito de extrato etanólico de *Allium sativum* L. frente às promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. As formas promastigotas foram tratadas com diferentes concentrações (6,0 a 0,6 mg/mL) por 72 horas. Os valores foram apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão da média. \*, representa diminuição significativa da viabilidade do parasito *versus* controle (meio) ( $p < 0,05$ ). \*\*\*, representa diminuição significativa da viabilidade do parasito *versus* controle (meio) ( $p < 0,0001$ ).

Notou-se uma uniformidade da cor (roxo escuro) em quase todos os poços da placa de cultura, revelando que o extrato não apresentou atividade leishmanicida, mesmo nas maiores concentrações (**Figura 3**). Segundo Guimarães et al. (2010)

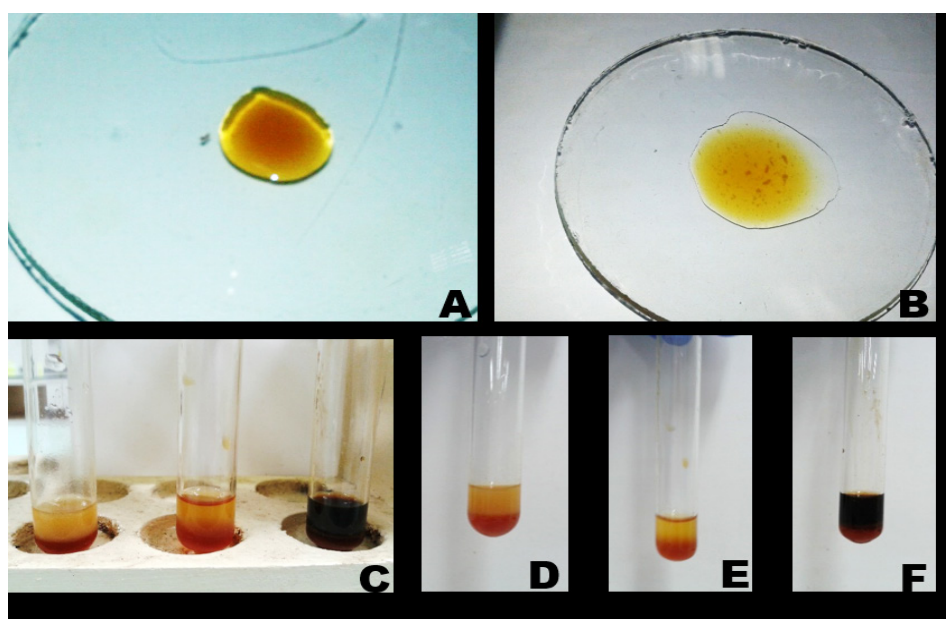


a atividade de um extrato natural pode ser observada através de uma mudança da coloração nos poços de uma placa de cultura, devido a formação dos cristais de Formazan que estão diretamente relacionados a quantidade de parasitas ou células viáveis.



**Figura 3.** Representação de uma placa de cultura com 96 poços após três horas de incubação com o MTT, contendo as formas promastigotas de *Leishmania L. amazonensis* sob ação do extrato etanólico de *Allium sativum* L. (EEAsL).

O extrato do *Allium sativum* L. (EEAsL) apresentou pequena quantidade de alcalóides e considerável quantidade de taninos (**Figura 4**). Alguns estudos referem os alcalóides, como metabólito secundário, com potente atividade leishmanicida e os taninos como importante agente antimicrobiano (RHODES et al. 2006).



**Figura 4.** Teste para reconhecimento de metabólitos secundários (alcalóides e taninos) presentes no Extrato Etanólico de *Allium sativum* L. (EEAsL) **A)** Na presença do reagente de Mayer, notou-se fraca precipitação do EEAsL. **B)** Na presença do reagente Bourchardat (Wagner), observou-se precipitação moderada, em comparação ao ensaio anterior (fraca reação para alcalóides). **C)** tubos de ensaio demonstrando uma visão geral da reação do EEAsL com as soluções reagentes. **D)** Reação do EEAsL com solução de acetato de chumbo (10%), notou-se precipitação mais intensa. **E)** Reação do EEAsL com solução de ácido clorídrico (HCl) a 10%, notou-se precipitação mais intensa. **F)** Reação do EEAsL com a solução de cloreto férrico (2%), observou-se total precipitação. **D, E, e F)** mostram que o EEAsL apresentou maior quantidade de taninos do que alcalóides.



O tanino classifica-se como um composto fenólico e foi identificado por Bianchi et al. (1997) no extrato aquoso de *Allium sativum*, que apresentou atividade antimicrobiana contra *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium solani*, causando alterações morfológicas nas hifas.

Segundo Garba (2014), na avaliação fitoquímica preliminar do extrato de alho através de solventes aquosos e alcóolicos, foi possível constatar a presença de taninos e saponinas; todavia a detecção de alcalóides e flavonóides só foi possível quando se utilizou apenas um dos solventes (alcóolico e aquoso, respectivamente).

O extrato do *Allium sativum* L. (EEAsL) foi obtido apenas com um solvente (etanólico) e em função dessa extração, não foram identificados outros metabólitos secundários, com relatados na literatura. Neste contexto, devem-se levar em consideração que os metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais podem variar de acordo com diversos fatores, tais como sazonalidade, irrigação, modo de cultivo, entre outros (NCUBE et al., 2010).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos realizados anteriormente por outros pesquisadores, demonstraram a atividade leishmanicida do extrato de *Allium sativum* L. frente diferentes espécies de *Leishmania* como a *Leishmania major* e a *Leishmania donovani* (WABWOBA et al., 2010).

Entretanto, o extrato utilizado neste estudo não apresentou atividade leishmanicida *in vitro* e estes resultados podem ter relação com a forma de cultivo do material vegetal (alho), sendo de extrema importância a questão do solo, das condições climáticas, do tempo de cultivo; os quais podem influenciar consideravelmente na produção dos metabólitos secundários (NCUBE et al., 2010)

O solvente utilizado no processo de extração pode ter limitado a identificação dos principais metabólitos secundários responsáveis por diferentes atividades biológicas, inclusive pela própria atividade leishmanicida.

Neste contexto, faz-se necessário ampliarmos a investigação da atividade *in vitro* do extrato de *Allium sativum* L. frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L). *amazonensis*, em função de serem realizadas modificações no processo de extração do mesmo; visto que, o extrato de alho obtido por diferentes metodologias foi capaz de apresentar atividade contra outras espécies de *Leishmania*.

#### REFERÊNCIAS

BARRET, M. P; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Bristich Medical Bulletin**, v. 104, p. 175-196, 2012.

BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; D'AULERIO, A. Z.; BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. **Plant Disease**, v.81, n.11, p.1241-1246, 1997.

- CAPASSO A. Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum* L. **Molecules**, 18: 690-700, 2013.
- CHAN JY, YUEN AC, CHAN RY, CHAN SW. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phytother Res*. 27: 637-646. 2013.
- GARBA, I; UMAR, A. I.; ABDULRAHMAN, A. B.; TIJJANI, M. B.; ALIYU, M. S.; ZANGO, U. U.; MUHAMMAD, A. Phytochemical and antibacterial properties of garlic extracts. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, v.6, n.2, p.45-48, 2014.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova.**, v. 30, n. 2, pp. 374-381. ISSN 0100-4042. 2007.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Belo Horizonte- Mg, v. 1, n. 36, p.71-80, fev. 2003.
- GUIMARÃES, RODRIGUES. L. *et al.* Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Parasitology Research**. V. 107, n.5, p.1075-1081, 2010.
- HATAM, G. R.; BAHRAMI, S.; RAZAVI, S. M.; ORYAN, AHMAD. Isoenzyme and ultrastructural characterization of *Leishmania tropica* axenic amastigotes and promastigotes. **Parasitology Research**, v. 112, p. 643-648, 2013.
- HOTEZ N. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 357: 1018–27, 2007.
- MASMOUDI, A.; HARIZ, W.; MARREKCHI, S.; AMOURI, M.; TURKI, H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**. v. 7, n. 2, p.31-41, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NCUBE, B.; FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. **South African Journal of Botany**. v. 79, 2010.
- NEVES, F.P. *et al.* **Parasitologia Humana**, 12º ed. São Paulo. Editora Atheneu. Cap. 8, p. 49-65, 2011.
- NUNES, R.K. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora matogrossense. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Ciências Biológicas – CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.
- RHODES, P.L.; MITCHELL, J.W.; WILSON, M.W.; MELTON, L.D. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.281- 286, 2006.
- SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2; 139-149, 2004.
- TEIXEIRA, D. E.; BECHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P.H.; PIMENTA, P. F. P., DE SOUZA, W. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. **Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ**, Rio de Janeiro, 1 ed., 2013.

WABWOBA, Byrum W. et al. Experimental chemotherapy with *Allium sativum* (Liliaceae) methanolic extract in rodents infected with *Leishmania major* and *Leishmania donovani*. **J Vector Borne**. Nairobi, Kenya, p. 160-167. set. 2010.

WANG, J.Y; GUI, G.; CHEN, H. T., ZHOU, X. N.; *et al.* Current epidemiological profile and features of visceral leishmaniasis in People's Republic of China. **Parasites & Vectors**, v. 5, n.31, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv\\_coinfection/burden\\_hiv\\_coinfection/en /index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en /index.html)>.2012.

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE ALTO PESO MOLECULAR - TRIPOLIFOSFATO PARA CARREAMENTO DE PROTEÍNA

### **Caroline Dutra Lacerda**

Laboratório de Biocalorimetria, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

### **Patrícia Severino**

Laboratório de Nanotecnologia e Nanomedicina (LNMED), Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

### **Maria Lucia Bianconi**

Laboratório de Biocalorimetria, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

**RESUMO:** Proteínas têm sido utilizadas e estudadas para o tratamento de inúmeras doenças, devido à sua alta especificidade e ação potente. Várias formulações estão sendo desenvolvidas para melhorar a biodisponibilidade e atividade de proteínas. As nanopartículas foram estudadas para aplicações biotecnológicas, tais como para liberação controlada de drogas. O polímero de quitosana (CS), devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade, é uma boa escolha para essa finalidade. Entre os métodos de obtenção de nanopartículas, a gelificação ionotrópica é vantajosa por sua simplicidade e não utilizar solventes orgânicos e altas temperaturas. A L-asparaginase é uma importante enzima

amplamente utilizada no tratamento da leucemia, entretanto, alguns fatores limitam seu uso na clínica, como o desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase, reações de hipersensibilidade e outros efeitos adversos. Tendo em vista a importância de seu uso, são necessárias alternativas para reduzir seus efeitos adversos e aumentar sua estabilidade. Objetivou-se obter nanopartículas de quitosana de alto peso molecular sem e com  $\text{ZnCl}_2$ , além da incorporação de asparaginase como proteína modelo, por gelificação ionotrópica com razão CS/tripolifosfato de 3. A alta concentração de quitosana permite maior incorporação de fármaco, mas aumenta o tamanho da partícula, o que não é interessante para a liberação intravenosa de fármaco. A adição de  $\text{ZnCl}_2$  na formulação leva ao decréscimo de tamanho com o aumento da capacidade de carga. Todas as formulações apresentaram valores satisfatórios de potencial zeta indicando boa estabilidade físico-química e a asparaginase dentro das nanopartículas apresentou maior velocidade de catálise, em comparação com a enzima livre.

**ABSTRACT:** Proteins have been used and studied for the treatment of numerous diseases because of their high selectivity and potent action. Several formulations are being developed to improve the bioavailability and activity of proteins. Nanoparticles have been

studied for biotechnological applications, such as drug delivery for controlled release. The chitosan (CS) polymer, due to its biodegradability, biocompatibility and low toxicity, is a good choice for this purpose. Among the methods of obtaining nanoparticles ionotropic gelation is advantageous for its simplicity and does not use organic solvents and high temperatures. L-asparaginase is an important enzyme widely used in leukemia treatment, however, some factors limit its use in the clinic, such as the development of antibodies anti-asparaginase, hypersensitivity reactions and other adverse effects. In view of the importance of its use, alternatives are needed to reduce its adverse effects and increase its stability. This work aimed to obtain high molecular weight chitosan nanoparticles without and with  $\text{ZnCl}_2$ , in addition to incorporation of asparaginase like a model protein, by ionotropic gelation using CS/tripolyphosphate ratio of 3. High concentration of chitosan allows larger drug incorporation, but increases the size of the particle, which is not interesting for intravenous drug delivery. The addition of  $\text{ZnCl}_2$  in the formulation leads to size decrease with increased load capacity, good zeta potential, indicating good physico-chemical stability and the asparaginase inside the nanoparticle show higher enzymatic velocity compared to free form.

## 1 | INTRODUÇÃO

As proteínas têm sido muito estudadas e empregadas na terapia de diversas patologias humanas, mas a sua utilização acaba sendo limitada devido à vulnerabilidade da sua estrutura, o que é muito crítico, uma vez que a sua atividade é altamente dependente da conformação. Além disso, estão susceptíveis à degradação enzimática por proteases endógenas e à imunogenicidade. A nanotecnologia tem sido muito explorada no desenvolvimento de sistemas que possam contornar essas limitações e permitir o aproveitamento do potencial terapêutico dessas moléculas. (Yu *et al.*, 2016)

A nanotecnologia vem sendo empregada em diversas áreas, com a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas através do controle da matéria em escala de tamanho nanométrico. Especificamente na área da saúde, tem se tornado cada vez mais comum a sua aplicação, já que a entrega eficiente de fármacos é um dos grandes desafios da indústria farmacêutica e biotecnológica. Muitos fármacos apresentam uso limitado devido à baixa solubilidade, alta toxicidade, agregação, entrega não específica, degradação *in vivo* e meia-vida curta. Nesse contexto, a nanotecnologia vem sendo empregada no desenvolvimento de novos sistemas para a entrega de princípios ativos a fim diminuir os efeitos colaterais e aumentar sua estabilidade, além de possibilitar maior biodisponibilidade. (Parveen, Misra e Sahoo, 2012; Zhang *et al.*, 2008)

### Polímeros biocompatíveis

O desenvolvimento e a obtenção de polímeros biocompatíveis representam uma revolução na medicina, proporcionando significativos avanços biotecnológicos na

entrega de medicamentos, biomateriais, engenharia de tecidos e desenvolvimento de dispositivos médicos. A degradabilidade e biocompatibilidade desses materiais são de suma importância, pois seus subprodutos, em meio biológico não são tóxicos. Embora grande parte dos trabalhos pioneiros no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos tenham sido conduzidos com polímeros não-degradáveis, polímeros degradáveis e biodegradáveis são os preferíveis para tal aplicação. (Kamaly *et al.*, 2016)

Os polímeros degradáveis de ocorrência natural têm sido extensivamente aplicados em sistemas de direcionamento específico de princípios ativos, devido à abundância na natureza e biocompatibilidade, incluindo polímeros proteicos, tais como, colágeno, albumina, gelatina e os polissacarídeos, como agarose, alginato, carragenina, ácido hialurônico, dextrano, quitosana e as ciclodextrinas. (Pillai e Panchagnula, 2001)

Os polissacarídeos naturais, em especial, têm sido amplamente utilizados em projetos de engenharia de tecidos e fabricação de nanopartículas para entrega de ativos. Apesar da grande vantagem de serem biodegradáveis, apresentam a limitação de variabilidade lote a lote e ampla distribuição de peso molecular, quando comparados com os polímeros sintéticos. A quitosana e o ácido hialurônico são dois dos polímeros naturais mais utilizados para carregamento de fármacos. (Kamaly *et al.*, 2016)

A quitosana é um polímero natural, hidrofílico, biodegradável, biocompatível, com baixa toxicidade, e tem sido muito utilizada para a produção de nanopartículas para direcionamento específico de fármacos (Nagpal, Singh e Mishra, 2010). Este biopolímero é um mucopolissacarídeo estreitamente semelhante à celulose, obtido pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos, entre outros, composto pelas unidades monoméricas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose, como exemplificado na Figura 1. Propriedades importantes podem influenciar na sua solubilidade e capacidade de reticulação, como o grau de desacetilação, a distribuição de peso molecular e o conteúdo de impurezas, os quais dependem das fontes naturais da matéria-prima e dos métodos de preparação. (Kumar, 2000)

Quando o grau de desacetilação da quitina atinge aproximadamente 50%, esta se torna solúvel em meio aquoso ácido, passando a ser denominada de quitosana. A solubilização ocorre pela protonação do grupo funcional  $-NH_2$  na posição C-2 da unidade D-glucosamina e, com isso, o polissacarídeo é convertido em um polieletrólito catiônico quando em meios ácidos. Este polímero catiônico pseudonatural apresenta muitas aplicações, como: tratamento de águas, produção de cosméticos e medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e desenvolvimento de biomateriais. (Rinaudo, 2006)



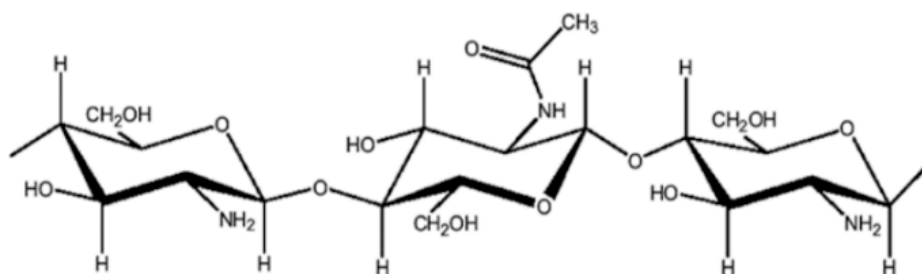


Figura 1. Estrutura da molécula de quitosana

Dentre as técnicas mais utilizadas para a obtenção de nanopartículas, a gelificação iônica se destaca devido a não utilização de solventes orgânicos e alta temperatura, o que é uma vantagem para encapsulação de bioativos. Esta técnica consiste, basicamente, na reticulação de compostos com cargas opostas, como ocorre com os grupos amino da quitosana que apresentam característica catiônica, com os grupos fosfato das moléculas aniônicas do tripolifosfato de sódio (TPP) ou alginato de sódio (Nagpal, Singh e Mishra, 2010).

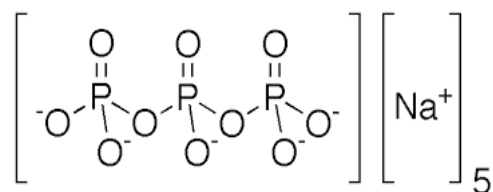


Figura 2. Estrutura da molécula de tripolifosfato de sódio

Além de ter se mostrado útil para a encapsulação de fármacos de molécula pequena, o biopolímero quitosana, devido às suas propriedades já citadas anteriormente, é um candidato promissor também para a produção de formulações contendo proteínas com aplicação terapêutica. As proteínas representam uma parte significativa dos novos produtos farmacêuticos em uso e ainda sendo estudados. Apesar do seu mecanismo de ação muito eficiente, a sua aplicação ainda apresenta uma grande desvantagem, uma vez que, devido às suas propriedades físico-químicas, muitas delas apresentam baixa estabilidade, permeabilidade e biodistribuição, após administração no paciente. O sucesso desse tipo de formulação depende não apenas da estabilidade do sistema de entrega, mas, também, da sua capacidade de manter a estrutura nativa e a atividade da proteína, durante a preparação, período de armazenamento e da entrega ao local de ação do fármaco. Os sistemas à base de quitosana estão sendo propostos como estratégias válidas para atender tais condições. (Andrade *et al.*, 2011)

### L-asparaginase

A L-asparaginase II é muito utilizada em protocolos clínicos para tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente a leucemia linfoblástica aguda em crianças, mas apresenta limitações de uso inerente de qualquer proteína exógena, além de

efeitos secundários indesejados que podem resultar desde a inativação da enzima após a administração até graves reações alérgicas e neurotóxicas (Hill *et al.*, 1967; Narta, Kanwar e Azmi, 2007). Neste contexto, é um desafio desenvolver formulações que superem essas limitações e possibilitem o uso do potencial terapêutico desse bioativo com mais segurança para o paciente.

O uso de L-asparaginase no tratamento de neoplasmas malignos é o primeiro exemplo claro de uma terapia baseada em uma diferença nutricional específica entre certas células normais e malignas. A ação terapêutica da L-asparaginase consiste na depleção da L-asparagina circulante no soro (Figura 3). A L-asparagina é um aminoácido não essencial sintetizado pela enzima asparagina sintase, através da transaminação do ácido aspártico, e é fundamental para o crescimento celular. As células leucêmicas e outras células tumorais são deficientes ou apresentam baixa expressão de asparagina sintase, sendo dependentes de fonte externa de L-asparagina para síntese proteica e sobrevivência. Após administração da L-asparaginase, a L-asparagina circulante é clivada em aspartato e amônia, o que mata seletivamente as células leucêmicas e impede sua proliferação. (Hill *et al.*, 1967)

A incorporação da L-asparaginase em nanopartículas de polímeros biocompatíveis é uma alternativa promissora para aumentar a estabilidade dessa enzima no plasma e permitir a liberação sustentada da enzima e, com isso, aumentar o intervalo entre as administrações, além de diminuir os efeitos adversos.

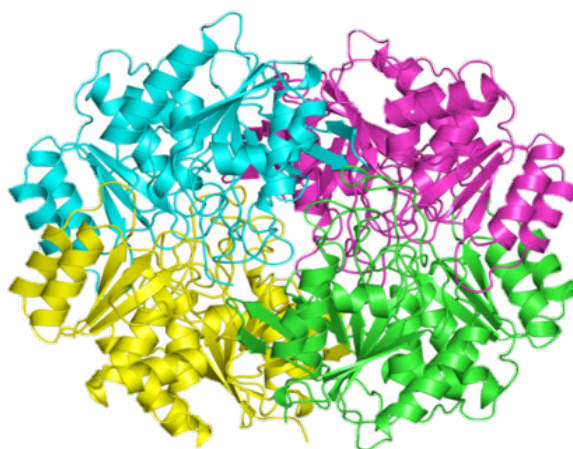


Figura 3 Estrutura na enzima L-asparaginase, PDB: 3ECA

Neste trabalho o objetivo foi obter nanopartículas de quitosana de alto peso molecular sem e com  $\text{ZnCl}_2$ , além da incorporação de L-asparaginase como proteína modelo, por gelificação ionotrópica com razão CS/tripolifosfato de 3. As partículas obtidas foram caracterizadas utilizando-se espalhamento dinâmico de luz para determinar o tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta e a capacidade de carregamento das nanopartículas, além da atividade enzimática.

## Caracterização de nanopartículas

### *Espalhamento de luz dinâmico (DLS)*

Duas características das nanopartículas comumente estudadas são a distribuição do tamanho e a carga superficial das partículas. Quando iluminadas com um laser, as partículas em suspensão espalham a radiação, sendo que a intensidade do espalhamento é proporcional ao tamanho das partículas. A variação da intensidade de espalhamento é devida ao movimento Browniano das partículas, relacionado ao tamanho e a forma das partículas, podendo ser avaliada pela relação de Stokes-Einstein. A velocidade do movimento Browniano é definida pelo coeficiente de difusão translacional ( $D$ ) e é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula (quanto maior o diâmetro da partícula, menor o movimento), podendo ser influenciada também pela temperatura e viscosidade do meio. Esse coeficiente ( $D$ ) é medido pela curva de correlação da intensidade. (Xu, 2008)

A biodistribuição das partículas depende das suas propriedades físico-químicas, especialmente o tamanho. Uma das principais técnicas utilizadas para determinar o tamanho de partículas em suspensão é o espalhamento dinâmico de luz (DLS), que avalia o movimento browniano das partículas e relaciona com a velocidade, ou seja, o coeficiente de difusão translacional, sendo, assim, possível determinar o tamanho das partículas de acordo com a equação de Stokes-Einstein (Pecora, 2000). O tamanho de partícula é definido como o tamanho de uma esfera hipotética rígida que difunde da mesma forma que as partículas que estão sendo avaliadas. O resultado é relatado como um tamanho médio e a homogeneidade da distribuição de tamanho é expressa como índice de polidispersidade (PDI), um parâmetro adimensional da função de autocorrelação; valores entre 0,1 a 0,25 indicam uma estreita distribuição de tamanho. O DLS fornece uma estimativa simples e rápida do tamanho das partículas, mas apresenta limitações, principalmente em amostras com distribuição de tamanho multimodal. Uma alternativa é a microscopia que fornece uma avaliação precisa do tamanho e da forma das partículas. No entanto, muitas vezes requer etapas complicadas de preparação de amostra, específicas para cada tipo de microscopia que pode alterar a amostra e criar artefatos. (Cho et al., 2013; Gaumet et al., 2008; Xu, 2008)

A carga superficial é um importante parâmetro para o estudo da estabilidade de coloides ou nanopartículas em suspensão. Não existe uma tecnologia satisfatória para determinar a carga superficial de partículas pequenas em líquido. Assim, a prática mais comum é determinar o potencial elétrico da partícula em um local afastado da sua superfície, ou seja, na camada difusa. Este local que se relaciona ao movimento das partículas no líquido é chamado de plano de deslizamento ou cisalhamento. O potencial medido neste plano é chamado de potencial zeta, sendo esse um parâmetro muito importante para a suspensão de nanopartículas, uma vez que está intimamente relacionado à sua estabilidade. A carga líquida na superfície da partícula afeta

a distribuição de íons ao seu redor, aumentando a concentração de contraíons na superfície, sendo formada uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Na camada mais interna estão localizados os íons fortemente ligados à superfície e na camada externa, a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e o movimento térmico. Assim, o potencial nesse local diminui com o aumento da distância da superfície até, a uma distância suficientemente grande, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionado como potencial zero. A microeletroforese é utilizada para determinar esse potencial, pois, em um campo elétrico, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade. O potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é denominado de potencial zeta. Como este potencial é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface e da natureza e composição do meio que a circunda, ele reflete a carga efetiva nas partículas, se correlacionando com a repulsão eletrostática e com a estabilidade da suspensão. (Xu, 2008)

Em geral, partículas com potencial zeta mais positivo do que +30 mV ou mais negativo do que -30 mV têm estabilidade coloidal mantida devido à repulsão eletrostática. Uma limitação desse tipo de determinação é que em amostras multimodais o valor do potencial zeta de partículas maiores domina em relação a partículas menores. (Cho et al., 2013; Xu, 2008)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para determinar o diâmetro médio e o índice de polidispersão das nanopartículas. As aquisições foram realizadas a 25 °C, sendo 100 aquisições de cada amostra. O equipamento utilizado foi o Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) acoplado a um sistema de aquisição de dados e o software DTS (Malvern Instruments) foi empregado para coleta e análise dos dados. O mesmo equipamento e software também foram utilizados para determinar o potencial zeta das partículas por meio da avaliação da mobilidade eletroforética das partículas em suspensão.

### *Capacidade de carregamento*

A capacidade de carregamento do princípio ativo, ou seja, a quantidade de fármaco que é possível veicular em uma determinada quantidade do sistema nanoparticulado, é importante, pois, quanto mais alta, menos matriz deverá ser administrada. O carregamento pode ocorrer pela incorporação no interior da matriz polimérica ou pela absorção na superfície das nanopartículas. Outro fator importante nesses sistemas é a liberação do fármaco que, em geral, depende da solubilidade do mesmo, da dessorção da superfície, da difusão através da matriz, da erosão/degradação da matriz, bem como da combinação desses fatores. (Cho et al., 2013; Mohanraj, Chen e Chen, 2006)

A fim de determinar a quantidade de L-asparaginase incorporada nas nanopartículas, estas foram centrifugadas a 27000 × g durante 30 minutos e a

concentração de proteína no sobrenadante foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) de acordo com Smith et al. (1985).

### *Atividade enzimática por Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)*

As técnicas calorimétricas têm contribuído muito para a compreensão dos mecanismos de interação a nível molecular. O calorímetro de titulação isotérmica (ITC) possibilita medidas energéticas de fenômenos de ligação, interação e reação entre componentes em temperatura constante. O calor associado com a reação ou interação é medido diretamente, permitindo obter os parâmetros termodinâmicos, como a entalpia, além de determinar a extensão da reação. (Freire, Mayorga e Straume, 1990)

Um instrumento de ITC consiste em duas células idênticas compostas de um material condutor térmico altamente eficiente (Hasteloy ou ouro) rodeado por uma câmara adiabática. Os circuitos de termopar detectam diferenças de temperatura entre as duas células e entre as células e a câmara. O sistema trabalha para manter idênticas as temperaturas entre todos os componentes. Em um experimento de ITC, a solução de macromolécula é colocada na célula de amostra e a célula de referência contém tampão ou água. Antes da injeção do titulante, uma potência constante é aplicada à célula de referência. Este sinal direciona o circuito de feedback para ativar o aquecedor localizado na célula de amostra. Isso representa o sinal de linha de base. O sinal medido em um ITC é a energia necessária para manter a temperatura igual em ambas as células, de amostra e de referência. Durante a injeção do titulante na célula de amostra, o calor é absorvido ou liberado, dependendo se a reação é endotérmica ou exotérmica, respectivamente. Para uma reação exotérmica, a temperatura na célula de amostra aumenta, então o sistema de aquecimento é desativado para manter as temperaturas iguais entre as duas células e um pico negativo é observado. Para reações endotérmicas, o inverso ocorrerá, ou seja, o sistema irá aumentar a potência para a célula de amostra para manter a temperatura e um será observado um pico positivo. (Pierce, Raman e Nall, 1999)

A maioria dos substratos e/ou produtos de reações enzimáticas não possuem as propriedades necessárias para quantificação direta por técnicas espectrofotométricas. Assim, frequentemente, para estudar essas reações são utilizados substratos modificados ou uma reação acoplada, que reage com o produto de interesse formando um segundo produto quantificável. Porém, essas estratégias podem introduzir muitos erros experimentais, principalmente, na determinação  $K_m$  e  $k_{cat}$ . Uma vez que durante as reações químicas ocorre liberação ou absorção de calor, as técnicas calorimétricas são úteis para estudar essas reações. Assim a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma ferramenta muito interessante para estudo de reações enzimáticas, pois permite a determinação direta da velocidade de reação, sem modificação de substrato e sem necessidade de utilizar uma reação acoplada. Além disso, esse equipamento

tem um controle muito preciso de temperatura, além de permitir a determinação direta do calor de reação utilizando uma concentração muito baixa de proteína, de modo que possibilita a determinação dos parâmetros cinéticos da reação. (Bianconi, 2007)

Comumente, a atividade enzimática da L-asparaginase é caracterizada pela reação de Nessler. Para isso, é preparada uma solução de enzima em tampão e a reação é iniciada com a adição de asparagina nessa solução. Após 30 minutos a reação é interrompida com a adição de ácido tricloroacético. Após centrifugação, a amostra é diluída em água e, então, adicionado o reagente de Nessler (tetraiodomercurato(II) de potássio), o qual reage com nitrogênio amoniacal, formando um precipitado amarelo-castanho e após 15 minutos a quantidade amônia produzida é determinada a partir da absorbância em 500 nm. Para isso, é necessário fazer uma curva padrão de sulfato de amônio (Whelan e Wriston, 1969). Porém, essa reação é de baixa sensibilidade. Por ser uma reação acoplada e ocorrer a formação de precipitado, pode apresentar incerteza quantitativa.

A calorimetria de titulação isotérmica foi utilizada para caracterizar a atividade enzimática da L-asparaginase livre e da solução de nanopartículas carregadas com L-asparaginase em um VP-ITC, MicroCal (Malvern, USA). As taxas de reação enzimática foram determinadas medindo-se a alteração de calor na cela de amostra, contendo substrato, após a injeção da enzima. Todas as aquisições foram feitas a 37 °C e sob agitação de 300 rpm. Para alcançar o estado estacionário da reação, foram injetados 20  $\mu\text{L}$  de L-asparaginase livre ou nanopartículas carregadas com L-asparaginase ( $8,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de proteína) na cela de amostra (1,45 mL) contendo 10 mM de L-asparagina em tampão PBS pH 7,4. As constantes das taxas enzimáticas foram determinadas de acordo com Morin e Freire, (1991).

## RESULTADOS

O cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) foi utilizado para estabilizar nanopartículas de quitosana reticulada com ácido hialurônico em condições fisiológicas (Wu e Delair, 2015). Dessa forma, então foi avaliado o efeitos da adição de  $\text{ZnCl}_2$ , quando a reticulação é realizada utilizando o tripolifosfato (TPP). Os valores de tamanho médio e polidispersão das partículas obtidas podem ser observados na Tabela 1.

| $\text{ZnCl}_2$<br>(mM) | Dm<br>(nm)       | PDI             |
|-------------------------|------------------|-----------------|
| 0                       | $133,7 \pm 0,7$  | $0,2 \pm 0,01$  |
| 1,0                     | $103,5 \pm 3,19$ | $0,41 \pm 0,11$ |
| 1,5                     | $87,92 \pm 0,45$ | $0,45 \pm 0,01$ |
| 2                       | $73,26 \pm 0,50$ | $0,46 \pm 0,01$ |



Tabela 1. Diâmetro médio (Dm) e índice de polidispersão (PDI) de nanopartículas obtidas a partir de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> de quitosana e TPP/QT 0,3 com adição de cloreto de zinco

A alta concentração de quitosana permite maior incorporação de fármaco, mas aumenta o tamanho da partícula, o que não é interessante para a liberação intravenosa de fármaco. A adição de ZnCl<sub>2</sub> na formulação leva ao decréscimo de tamanho com o aumento da capacidade de carga. Utilizando 0,25 mg/mL de CS, foram obtidas nanopartículas de 133,7 nm de diâmetro e com ZnCl<sub>2</sub> 2 mM, o tamanho diminuiu para 73,26 nm, enquanto as nanopartículas de 169,8 nm obtidas com 0,5 mg/mL CS diminuíram para 102,5 nm com ZnCl<sub>2</sub>.

Obter partículas menores é muito interessante, uma vez que o aumento da concentração de polímero utilizado resulta em aumento do tamanho da partícula obtida, assim, na presença de ZnCl<sub>2</sub>, foi possível aumentar a concentração de quitosana com a vantagem de aumentar a capacidade carregamento de proteína e ainda ter partículas com tamanho adequado para a aplicação.

Todas as formulações apresentaram alto valor do potencial zeta (faixa de 25 a 30 mV), indicando boa estabilidade físico-química.

Na presença de ZnCl<sub>2</sub>, a capacidade de carregamento da L-asparaginase aumentou de 14 µg de proteína/mg de quitosana para 32 µg de proteína/mg de quitosana. A incorporação de L-asparaginase não alterou significativamente o tamanho das nanopartículas.

Como pode ser observado na Figura 4, a enzima L-asparaginase apresentou maior taxa de hidrólise da asparagina quando no interior das nanopartículas ( -4,45 µcal/s), em comparação com sua forma livre ( -2,74 µcal/s), o que representa uma aumento de 60% na velocidade de catálise. Além disso, a adição de ZnCl<sub>2</sub> não alterou a taxa de hidrólise da asparagina pela L-asparaginase.

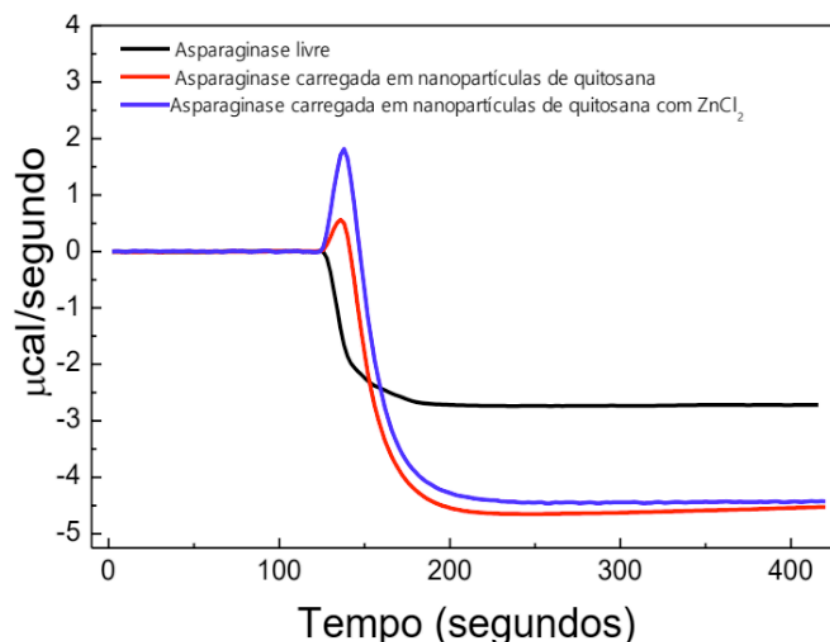


Figura 4. Medida da velocidade de catálise enzimática, em estado estacionário, da enzima L-asparaginase em 37 °C, pH 7,4, na presença de 10 mM de asparagina.

O uso de  $\text{ZnCl}_2$  na formulação foi interessante para permitir o uso de alta concentração de quitosana, o que consequentemente possibilita aumento da quantidade de proteína que pode ser carregada nas nanopartículas, além da diminuição do tamanho médio dessas partículas.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F. *et al.* Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. **Current drug discovery technologies**, v. 8, n. 3, p. 157–72, 2011.
- BIANCONI, M. L. Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. **Biophysical chemistry**, v. 126, n. 1–3, p. 59–64, mar. 2007.
- CHO, E. J. *et al.* Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093–2110, 2013.
- FREIRE, E.; MAYORGA, O. L.; STRAUME, M. Isothermal Titration. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 950A–959A, 1990.
- GAUMET, M. *et al.* Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008.
- HILL, J. M. *et al.* L-Asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. **Journal of the American Medical Association**, v. 202, n. 9, p. 882–888, 1967.
- KAMALY, N. *et al.* Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.
- KUMAR, M. N. . R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

- MOHANRAJ, V.; CHEN, Y.; CHEN, M. &. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research Trop J Pharm Res**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006.
- MORIN, P. E.; FREIRE, E. Direct calorimetric analysis of the enzymatic activity of yeast cytochrome c oxidase. **Biochemistry**, v. 30, p. 8494–8500, 1991.
- NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423–1430, 2010.
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, v. 61, p. 208–221, 2007.
- PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147–166, 2012.
- PECORA, R. Dynamic light scattering measurements of nanometer particles in liquids. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 2, p. 123–131, 2000.
- PIERCE, M. M.; RAMAN, C. S.; NALL, B. T. Isothermal Titration Calorimetry of Protein–Protein Interactions. **Methods**, v. 19, n. 2, p. 213–221, 1999.
- PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in Drug Delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 447–451, 2001.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 85, p. 76–85, 1985.
- WHELAN, H. A.; WRISTON, J. C. Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 8, p. 2386–2393, 1969.
- WU, D.; DELAIR, T. Stabilization of chitosan/hyaluronan colloidal polyelectrolyte complexes in physiological conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 149–158, 2015.
- XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.
- YU, M. *et al.* Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 24–37, 2016.
- ZHANG, L. *et al.* Nanoparticles in Medicine: Therapeutic applications and developments. **Clinical Pharmacology e Therapeutics**, v. 83, p. 761–769, 2008.

## SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA-TRIPOLIFOSFATO PARA APLICAÇÃO TÓPICA DE FÁRMACOS

### **Aryane Alves Vigato**

Centro de Ciências Naturais e Humanas,  
Universidade Federal do ABC, Av. dos Estados,  
n° 5001, Bloco A, Santo André, 09210-580, SP,  
Brasil. E-mail: daniele.araujo@ufabc.edu.br/  
aryane.vigato@ufabc.edu.br

### **Renato Grillo**

Departamento de Física e Química, Faculdade de  
Engenharia da Universidade Estadual Paulista –  
Campus Ilha Solteira, Avenida Brasil, 56, Centro  
Ilha Solteira, 15385-000, SP, Brasil.

### **Leonardo Fernandes Fraceto**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Filho - Campus Sorocaba, Avenida Três de Março,  
511, Alto da Boa Vista, Sorocaba, 18087180, SP -  
Brasil

### **Daniele Ribeiro de Araújo**

Centro de Ciências Naturais e Humanas,  
Universidade Federal do ABC, Av. dos Estados,  
n° 5001, Bloco A, Santo André, 09210-580, SP,  
Brasil. E-mail: daniele.araujo@ufabc.edu.br/  
aryane.vigato@ufabc.edu.br

**RESUMO:** A administração oral de medicamentos está constantemente associada a efeitos adversos sistêmicos, como toxicidade para o trato gastrointestinal. Por isso, diversos tipos de formulações têm sido propostas com o objetivo de estabelecer novas opções de vias de administração de fármacos de modo a diminuir estes possíveis efeitos. Uma destas vias alternativas é a transdérmica, onde a eficácia

clínica de administração depende principalmente das propriedades farmacológicas do fármaco e de sua biodisponibilidade no local de ação, que é limitada pela baixa permeabilidade do estrato córneo. Neste trabalho, nanopartículas de quitosana-tripolifosfato (QT-TPP) associadas ao fármaco sumatriptano (SMT), utilizado na terapia de enxaqueca, foram preparadas e caracterizadas. Os parâmetros de síntese das nanopartículas de QT-TPP-SMT foram estudados para obtenção de formulações otimizadas: tamanho médio de  $139,2 \pm 11,9$  nm, PDI  $0,22 \pm 0,04$ , potencial zeta de  $19,3 \pm 2,7$  mV, e eficiência de encapsulação de  $30,7 \pm 6,9$  %. Os resultados de permeação utilizando a membrana artificial Strat-M®, que mimetiza a pele humana, mostraram-se promissores para as nanopartículas QT-SMT-TPP como um nanocarreador para liberação sustentada de fármacos hidrofílicos por via tópica.

**PALAVRAS-CHAVE:** nanotecnologia, nanopartículas, quitosana e pele.

**ABSTRACT:** Oral administration of drugs is often associated with systemic adverse effects, such as toxicity to the gastrointestinal tract. Several types of formulations have been thus proposed to establish new possibilities for drug delivery routes in order to reduce these side effects. One alternative is the transdermal route, where the clinical efficacy depends primarily

on pharmacological properties of the drug and its bioavailability at the site of action. That bioavailability is limited due to the low permeability of the stratum corneum. The association of drugs with nanostructured systems exhibiting lipophilic characteristics sufficient to diffuse in the stratum corneum can thus evade this limitation. Therefore, this work presents the preparation of chitosan-tripolyphosphate (QT-TPP) nanoparticles and its association with sumatriptan (SMT), a drug used in migraine therapy. The synthesis parameters QT-TPP-SMT nanoparticles were studied to obtain optimized formulations: mean size  $139.2 \pm 11.9$  nm, POI  $0.22 \pm 0.04$ , zeta potential of  $19.3 \pm 2.7$  mV, and encapsulation efficiency of  $30,7 \pm 6.9\%$ . Permeation results using Strat-M® artificial membrane, which mimics human skin, showed that QT-TPP-SMT nanoparticles are promising nanocarriers for sustained release of hydrophilic drugs through the skin.

## 1 | INTRODUÇÃO

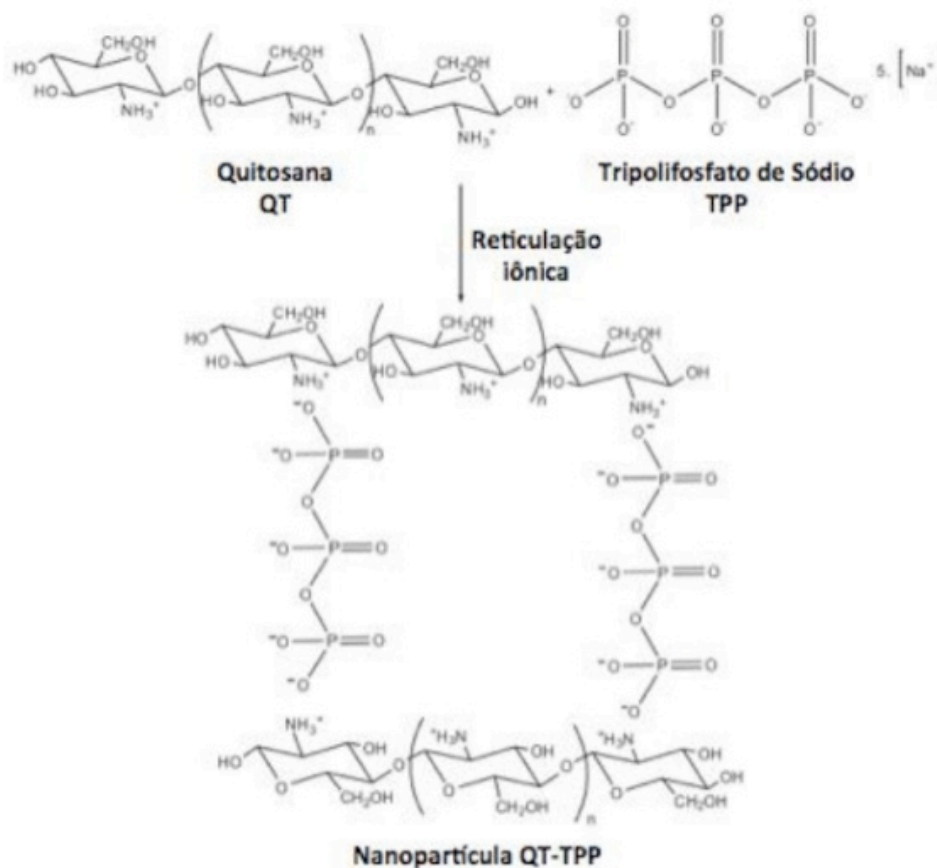
A administração de fármacos por via tópica tem sido estudada como uma importante estratégia por oferecer vantagens como o uso de formulações auto-administráveis, aumentar a adesão dos pacientes aos tratamentos prolongados e evitar a biotransformação de primeira passagem hepática, sistema responsável por reduzir a biodisponibilidade, por inativação de diferentes moléculas, após administração oral. Além disso, efeitos colaterais, como incômodos gastrointestinais, que podem ocorrer na administração por via oral, são evitados pelas vias tópicas e transdérmica (PRAUSNIT e LANGER, 2008). Quando comparadas às vias intravenosa e intramuscular, ambas as vias mostram-se vantajosas por serem indolores e não invasivas, aumentando a adesão do paciente à terapia (SILVA et al., 2010).

A pele é composta de duas camadas principais, a epiderme e a derme, e uma terceira camada variável, chamada de hipoderme. A absorção de fármacos pela pele é afetada por vários fatores, tais como espessura, temperatura, grau de hidratação, fluxo sanguíneo, concentração de lipídios, mas principalmente é influenciada pela presença de do estrato córneo, que possui em sua estrutura células diferenciadas (corneócitos) compactadas e queratinosas, inseridas em uma matriz lipídica composta por ceramidas, ácidos graxos livres e fosfolipídeos (GODIN e TOUITOU, 2007). A baixa permeabilidade do estrato córneo limita a biodisponibilidade de fármacos no local de ação, fato que pode ser contornado por formulações com constituintes (denominados promotores de absorção) que favoreçam a passagem de moléculas através desta camada (BOUWSTRA et al., 2003). Moléculas com elevada hidrofobicidade tendem a permanecer retidas, enquanto as de elevada hidrofiliabilidade tendem a apresentar baixa permeabilidade ao estrato córneo (CHORILLI et al., 2007; SILVA et al., 2010). Nesse contexto, o desenvolvimento de formulações tópicas é uma importante estratégia para o transporte de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos através da pele.

As nanopartículas (NPs) poliméricas, são consideradas potenciais dispositivos para liberação sustentada de fármacos e moléculas bioativas, pois apresentam

estabilidade coloidal, aumentam a estabilidade de agentes ativos que sofrem hidrólise, oxidação e decomposição fotoquímica, e podem ser incorporadas em formas farmacêuticas semi-sólidas (JENNING e GOHLA, 2001; SOPPIMATH et al., 2001). A quitosana (QT), um polissacarídeo catiônico, biodegradável e não tóxico proveniente da quitina, um composto natural encontrado no exoesqueleto de artrópodes (COELHO et al., 2010). Este polímero é insolúvel em água e em solventes orgânicos, mas pode ser solubilizada em soluções ácidas devido a protonação dos grupamentos amino, que conferem carga positiva à molécula (SINHA et al., 2004). Seu uso em formulações nanoestruturadas tem sido amplamente investigado para formulações contendo fármacos, genes, proteínas e outros agentes (GAN et al., 2005).

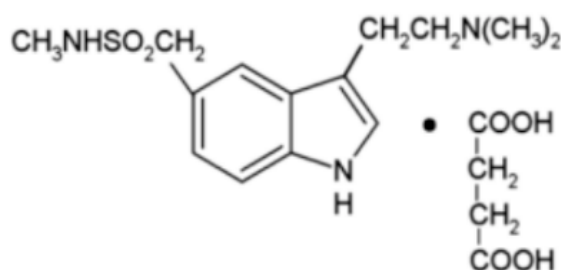
Dentre a grande variedade de métodos para preparação de NPs de quitosana, a reticulação iônica (figura 1) mostra-se vantajosa por ser um processo livre de solventes orgânicos, o que diminui a toxicidade (AMGOTH et al., 2010). Este método baseia-se nas interações iônicas entre os grupos amino carregados da quitosana e os grupos carregados negativamente do ânion, tais como o tripolifosfato de sódio (TPP), que é o agente de reticulação de íons mais amplamente utilizado por não ser considerado tóxico. Este processo físico de reticulação exclui o uso de agentes emulsionantes que são muitas vezes tóxicos para os organismos, e também evita danos ao fármaco a ser associado a NPs (FAN et al., 2012).



**Figura 1.** Representação esquemática da reticulação iônica entre a quitosana e o poliânion tripolifosfato formando NPs. Adaptado de (COELHO et al., 2010).



Para análise da promoção de permeação tópica de fármacos por estes materiais, foi utilizado o sumatriptano (SMT) como fármaco modelo. O SMT (figura 2), é um agonista de serotonina usado no tratamento da migrânea, mais conhecida como enxaqueca (GULATI et al., 2013). Neste trabalho foi utilizado o sal succinato de sumatriptano, cuja molécula apresenta três valores de pKas:  $pK_{a1}$  do ácido succínico entre 4,21 e 5,67,  $pK_{a2}$  da amina terciária de 9,63 e  $pK_{a3}$  do grupo sulfonamida, que é maior que 12 (OSHIRO et al., 2014). Como as NPs apresentam pH próximo de 5, para manter a solubilidade da quitonasa, neste pH o SMT apresenta-se ionizado e totalmente solubilizado, condição essencial para o sucesso da incorporação deste fármaco no sistema de NPs proposto.



**Figura 2.** Estrutura química do succinato de sumatriptano.

Neste trabalho, foi desenvolvido um método otimizado de preparo de nanopartículas de QT-TPP, visando obter melhores características físico-químicas, estabilidade coloidal e reprodutibilidade de síntese, para a incorporação do fármaco sumatriptano, utilizado como modelo para avaliação da permeação da NPs através de membranas artificiais que mimetizam a pele, sendo aplicáveis aos estágios iniciais do desenvolvimento de formulações tópicas.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

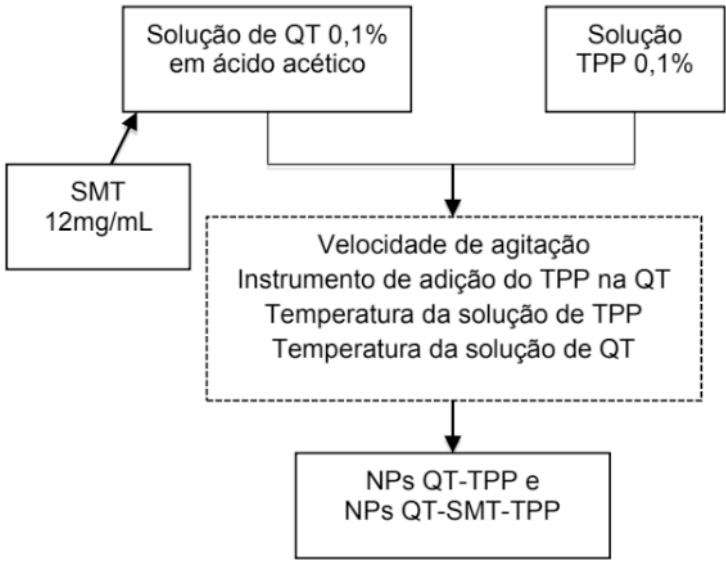
Quitosana de baixo peso molecular (27 kDa e grau de desacetilação de 75% - 85) e Tripolifosfato de sódio foram adquiridos da Sigma–Aldrich, MO, USA. Succinato de Sumatriptano foi doado pela Libbs Pharm, São Paulo, Brasil. Os demais reagentes químicos e solventes utilizados apresentaram grau analítico.

### 2.2 Síntese das nanopartículas de quitosana-tripolifosfato

Inicialmente, foi preparada uma solução de QT 0,1% m/v em ácido acético 0,2% v/v, cujo pH foi ajustado para 5, para completa solubilização da QT. Essa solução foi mantida sob agitação magnética por 24 h e logo após foi filtrada em membrana de 0,45  $\mu$ m para remover agregados. Separadamente, uma solução de TPP a 0,1 % m/v foi preparada e mantida em geladeira. Para formação das NPs, 5 mL da solução

de TPP foram adicionados a 20 mL da solução de QT sob agitação magnética, esta formulação permaneceu sob agitação por mais 10 minutos. Após isso, as NPs de QT-TPP foram armazenadas a 4 °C. Para a associação de SMT, 12 mg/mL do fármaco foram solubilizados na solução de QT e as NPs foram sintetizadas conforme o procedimento descrito anteriormente, resultando nas formulações identificadas como QT-SMT-TPP contendo cerca de 1,15 % (m/v) de SMT.

O método geral descrito foi executado variando-se parâmetros que resultaram em diferentes métodos de preparação, detalhados na tabela 3. O fluxograma apresentado na figura 3, esquematiza o método de síntese e os parâmetros variados em cada etapa.



**Figura 3.** Representação esquemática do método de síntese com parâmetros variados em cada etapa.

|          | Velocidade de agitação (rpm) | Instrumento de adição do TPP na QT | Temperatura da solução de TPP (°C) | Temperatura da solução de QT (°C) |
|----------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Método 1 | 850                          | Micropipeta (adição direta)        | 4                                  | 25                                |
| Método 2 | 450                          | Micropipeta (gotejamento)          | 4                                  | 25                                |
| Método 3 | 700                          | Micropipeta (adição direta)        | 4                                  | 60                                |
| Método 4 | 900                          | Pipeta de pasteur (adição direta)  | 0                                  | 60                                |
| Método 5 | 2500                         | Pipeta de pasteur (adição direta)  | 0                                  | 60                                |

**Tabela 1.** Descrição de parâmetros dos diferentes métodos de síntese de nanopartículas.

2.3 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do SMT às NPs, foi determinada utilizando o

método de ultrafiltração/centrifugação. Este método consiste na centrifugação da suspensão de NPs em dispositivos de ultrafiltração que possuem um filtro de celulose regenerada de 10 kDa (Microcon-Millipore), e posterior quantificação do fármaco presente no filtrado. Assim, por diferença entre a concentração total de SMT e aquela não associada aos carreadores, determinou-se a taxa de fármaco encapsulado nas NPs. A concentração de fármaco foi determinada utilizando espectrofotometria UV-Vis em 282 nm (GULATI et al., 2013), com equação da reta  $y = 0,05152 + 0,01162x$ ,  $r^2 = 0,99966$  e limite de quantificação de 0,0353 µg/mL.

### **2.3 Caracterização físico-química das nanopartículas – diâmetro hidrodinâmico das partículas e potencial zeta**

A fim de caracterizar as NPs, quanto ao diâmetro hidrodinâmico (Dh), também conhecido como tamanho de partícula e quanto ao índice de polidispersão (PDI), foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para todas as formulações. A formulação que apresentou melhor resultado por DLS, foi submetida a análise por Rastreamento de Partículas, NanoParticle Tracking Analysis (NTA), que permite o rastreamento do movimento browniano de nanopartículas em suspensão em meio líquido, partícula por partícula, individualmente (AZONANO, 2009).

Para a determinação do potencial zeta ( $\zeta$ ), foi utilizada a técnica de Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS) que avalia a mobilidade eletroforética de partículas em suspensão. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### **2.4 Ensaios de permeação in vitro**

Para avaliar a permeabilidade das formulações foram realizados ensaios utilizando células de difusão vertical do tipo Franz (sistema automatizado Microette Plus, Hanson Research®), onde os compartimentos doador e receptor foram separados por uma membrana sintética que simula as diferentes camadas presentes na pele, Strat-M® (MERCK; UCHIDA et al., 2015; KAUR et al., 2018) modelo útil para avaliar o perfil de permeação de formulações farmacêuticas durante os estágio iniciais do desenvolvimento (GRILLO et al., 2019). No compartimento doador foi aplicado 0,6 mL das formulações, enquanto no compartimento receptor adicionou-se água ultrapura (7 mL). O ensaio apresentou duração total de 24 horas, onde alíquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas, para posterior quantificação dos fármacos contido nas alíquotas por espectrofotometria UV-Vis.

### **2.5 Análise Estatística**

Todos os dados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão (DP) de três experimentos independentes ( $n = 3$ ) em triplicata. Os dados foram analisados utilizando análise de variância unidimensional (ANOVA) para comparações entre grupos, seguido de um pós-teste de Tukey para comparações múltiplas, com significância padrão de

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

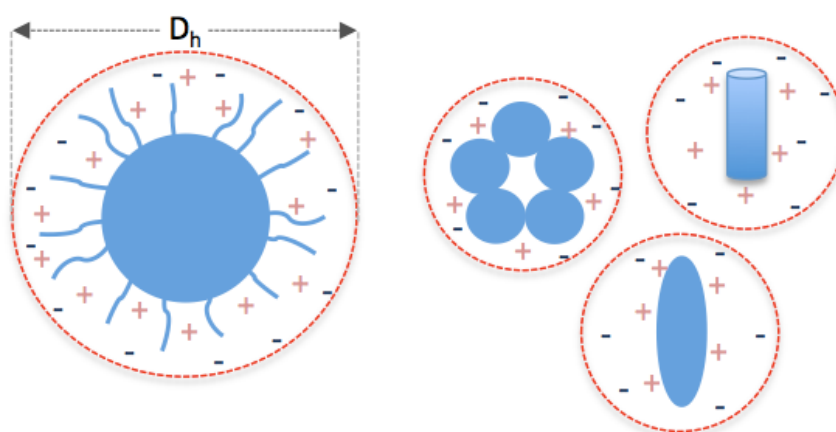
#### 3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas pelas técnicas de DLS e NTA

Para determinar qual dos métodos apresentados na tabela 1 seria utilizado para preparar partículas contendo SMT, foi utilizada a técnica de DLS. Esta técnica é uma das mais populares para determinação do diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) (figura 4), também conhecido como tamanho de partículas em suspensão, pois diferente do tamanho sólido de partícula, considera a esfera de solvatação na determinação do tamanho (SARTOR, M, 2003). Os resultados obtidos encontram-se na figura 10.

Nesta técnica, um feixe de luz monocromático, incide sobre uma suspensão de partículas em movimento browniano, sendo espalhado. O espalhamento está relacionado ao tamanho da partícula, que por meio da equação de Stokes-Einstein (eq.1), é aproximada a forma esférica em todos os casos, incluindo agregados e partículas de outros formatos, o que consiste em uma limitação da técnica (figura 4). Desta forma, obtêm-se um gráfico de intensidade de luz (%) por tamanho de partícula (nm) (SARTOR, M, 2003).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi \eta r} \quad (1)$$

Onde D é a constante de difusão,  $k_B$  a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta,  $\eta$  a viscosidade e r o raio da partícula esférica.

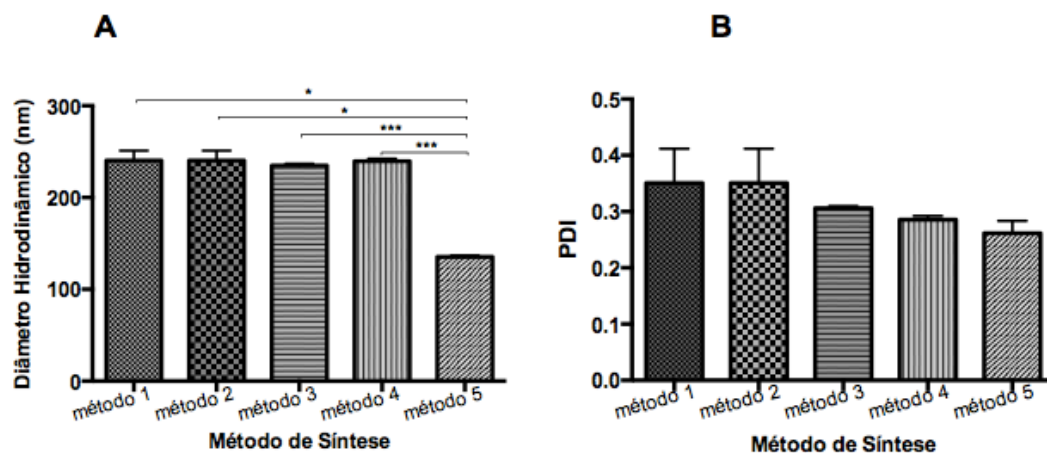


**Figura 4.** Representação esquemática do diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) de nanopartículas.

A análise dos gráficos (figura 5) apontam o método 5 como o método que resulta em partículas com menor valor médio de  $D_h$ ,  $135,3 \pm 1,721$ , apresentando significância estatística em relação a todos os outros métodos ( $p < 0,05$ ).

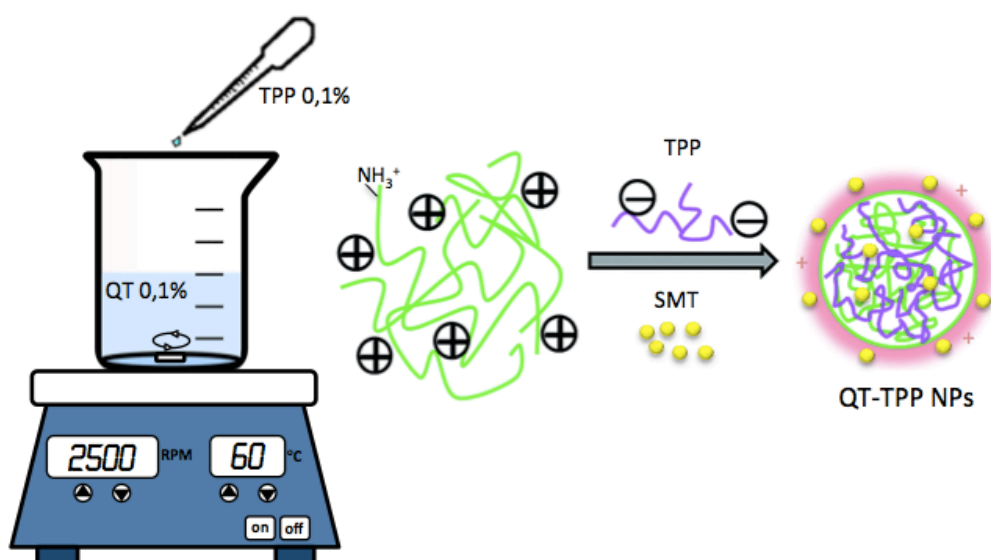
Na literatura é descrito que partículas de QT-TPP com tamanho médio de até

500 nm apresentam permeabilidade cutânea, porém partículas de tamanhos menores difundem-se mais rapidamente (HASANOVIC et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2009). Em relação à PDI, o método 5 foi o único a apresentar valor absoluto menor que 0,3, valor descrito na literatura como o limite para se considerar um conjunto de partículas como monodisperso, um parâmetro importante para a aplicação tópica (HASANOVIC et al., 2009).



**Figura 5.** (A) Diâmetro hidrodinâmico para cinco diferentes métodos de síntese de NPs QT-TPP. (B) PDI para cinco diferentes métodos de síntese de NPs QT-TPP. Os dados são apresentados como valores médios  $\pm$  DP ( $n = 3$ ) e a significância foi avaliada pelo teste ANOVA de uma via: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

No método 5, o TPP (0,1%) a 0 °C foi adicionado à QT (0,1%) a 60 °C sob agitação de 2500 rpm, o que resultou em um Dh médio 43,8% menor que o do método 4, onde a agitação no momento da adição de TPP é de 900 rpm, sendo a significância estatística entre estes métodos de  $p < 0,001$  (figura 6). Observa-se também a reprodutibilidade nos valores de Dh entre os métodos 1, 2, 3 e 4, confirmando que o conjunto de parâmetros de síntese resultou no Dh e o PDI apresentados pela formulação resultante do método 5 e não apenas a variação isolada de um destes parâmetros (FAN et al., 2012).

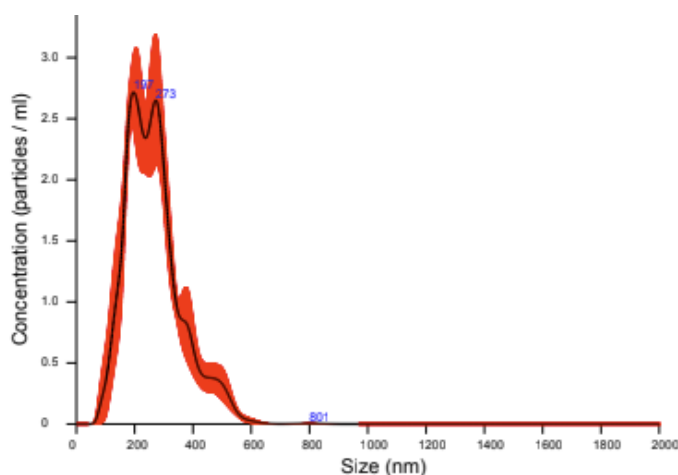


**Figura 6.** Representação esquemática do método de síntese das nanopartículas de QT-TPP resultantes do método 5.

A análise por Rastreamento de Partículas (NanoParticle Tracking Analysis ou NTA) também permite o rastreamento por meio do movimento browniano de nanopartículas em suspensão, porém pelo método “partícula por partícula”. A aplicação da equação de Stokes-Einstein (eq. 1) permite a derivação do tamanho de partícula e da concentração destas no meio. Um feixe de laser é passado através do porta amostra, onde as partículas em suspensão no caminho do feixe espalham a luz de modo que essa intensidade possa ser detectada (AZONANO, 2009).

A técnica de DLS é capaz de avaliar pequenas variações de frequências do espalhamento de luz da amostra, resultante dos movimentos brownianos relativos do conjunto de partículas dispersas, resultando em valores médios de tamanho de partículas (AZONANO, 2009). Desta forma, o DLS é mais suscetível a interferência de agregados, que acabam por deslocar o tamanho médio e o PDI, mesmo em porcentagem baixas na amostra, pois espalham a luz de forma diferente das nanopartículas isoladas. Já o NTA, realiza a análise de tamanho através de imagem, onde a luz espalhada pelas partículas é capturada por uma câmera, que acompanha o movimento das partículas individualmente, assim, as populações de diferentes tamanhos podem ser diferenciadas (AZONANO, 2009). Além disso o NTA é capaz de fornecer a concentração de partículas em solução.

A formulação resultante do método 5 foi submetida a análise por NTA, onde foi determinada a concentração de  $5,70 \times 10^9 \pm 0,28 \times 10^9$  nanopartículas/mL de formulação e a distribuição de tamanho em relação a concentração de partículas (figura 7), que apresentou picos em 197 nm e 273 nm.



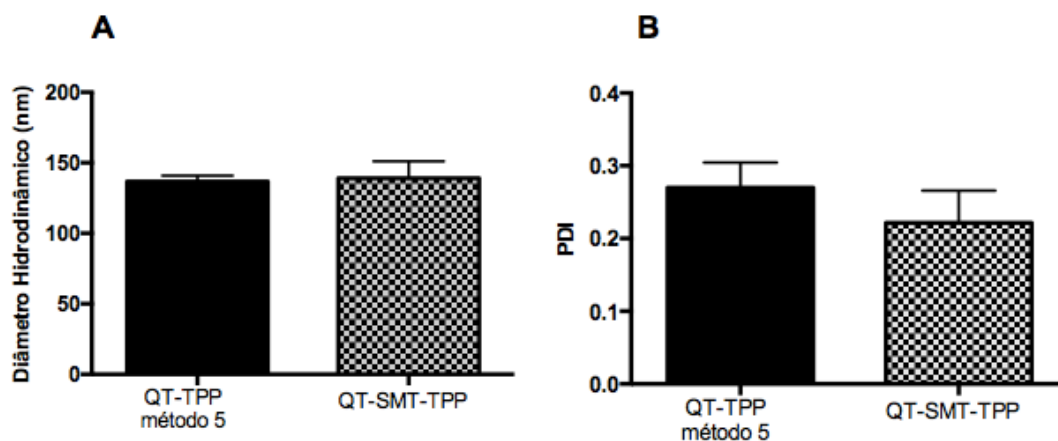
**Figura 7.** (A) Distribuição de tamanho das nanopartículas de QT-TPP em relação a concentração de nanopartículas em solução. (B) Distribuição das nanopartículas de QT-TPP em relação a intensidade de luz espalhada pelas nanopartículas em solução.

Devido as particularidades das técnicas, observa-se diferença nos valores de diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) fornecidos via DLS e NTA, que apresentam-se como técnicas complementares. Para o método 5, a análise por DLS resultou em uma distribuição monodispersa (unimodal) com  $D_h$  médio de 134,7 nm. Já na análise via NTA observa-se que maior parte da população partículas encontra-se entre 190 e 300



nm e que a distribuição tem caráter bimodal. Foi detectado também, via NTA, uma população partículas acima de 600 nm, que pode indicar a formação de agregados (FAN et al., 2012).

Devido a discussão anterior, o método 5 foi utilizado para a síntese de NPs contendo SMT, onde a comparação entre os valores de Dh e PDI médio encontram-se na figura 8.



**Figura 8.** (A) Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas QT-TPP e QT-SMT-TPP. B) PDI (índice de polidispersão) das formulações de QT-TPP e QT-SMT-TPP. Os dados são apresentados como valores médios  $\pm$  DP ( $n = 3$ ) e a significância foi medida através do teste-t:  $**p < 0,05$ .

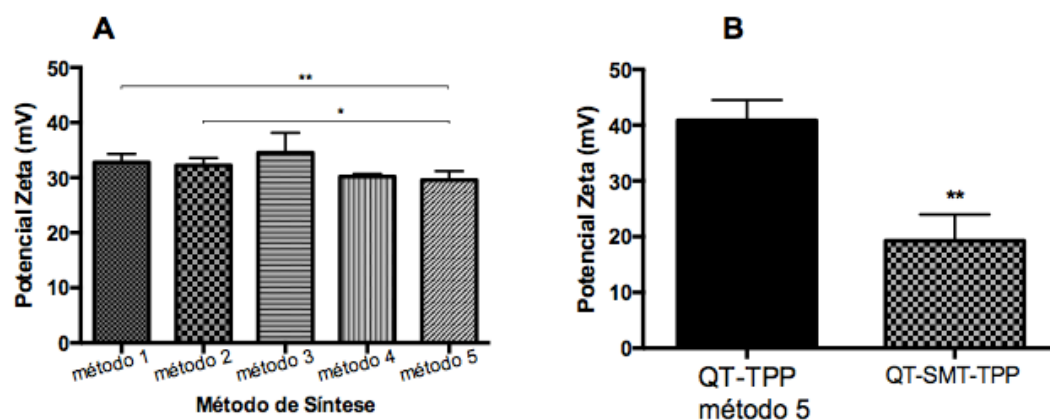
As NPs QT-SMT-TPP, não apresentaram variação significativas de Dh ( $139,2 \pm 11,9$  nm) e PDI ( $0,22 \pm 0,04$ ) em relação as NPs sem o fármaco ( $136,7 \pm 4,2$  e  $0,27 \pm 0,3$ ). Este resultado indica que as moléculas de SMT não interferem nas interações entre a QT e o TPP a ponto de desestabilizar as NPs previamente formadas.

### 3.2 Avaliação do Potencial Zeta e da Eficiência de Encapsulação

O Potencial Zeta ( $\zeta$ ), diferente do potencial de superfície da partícula, é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, devido a dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de espécies iônicas presentes no meio (AMGOTH et al., 2010). Enquanto o  $\zeta$  pode ser quantificado medindo-se a velocidade das partículas coloidais submetidas a um campo elétrico, o potencial superficial não pode ser medido. Os valores de  $\zeta$  estão relacionados a estabilidade das partículas em suspensão, quanto maior em módulo, maior será a repulsão eletrostática e assim, menor será a tendência de agregação. Partículas com  $\zeta$  entre 0 e 5 mV são consideradas instáveis, enquanto entre 40 e 60 mV as partículas são muito estáveis em suspensão (AMGOTH et al., 2010).

Os valores de  $\zeta$  estão relacionados com a mobilidade eletroforética e é através dessa propriedade que é possível determiná-los (MALVERN). Quando um campo elétrico é aplicado a uma suspensão de partículas, estas movem-se com uma velocidade identificada pelo equipamento. Assim, obtém-se a mobilidade eletroforética e, a partir desta, o potencial zeta (AMGOTH et al., 2010). As análises de  $\zeta$  foram realizadas e os

resultados obtidos encontram-se na figura 9.



**Figura 9.** (A) Potencial Zeta para cinco diferentes métodos de síntese de NPs QT-TPP. (B) Potencial zeta das formulações de QT-TPP e QT-SMT-TPP. Os dados são apresentados como valores médios  $\pm$  DP ( $n = 3$ ) e a significância foi medida pelo teste ANOVA de uma via: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao método indicado pelas barras horizontais.

Não foi observada uma relação clara entre os métodos de síntese e o  $\zeta$  das NPs, diferente do que ocorreu nas análises de tamanho, onde um método apresentou melhor resultado que os demais. Em relação ao  $\zeta$ , todos os métodos resultam em formulações que podem ser consideradas moderadamente estáveis.

As NPs associadas ao SMT, apresentaram valores de potencial zeta significativamente mais baixos ( $40,9 \pm 3,6$  mV para as NPs sem SMT e  $19,3 \pm 2,7$  mV com SMT), resultante da anulação de cargas superficiais positivas, provenientes dos grupamentos amino protonados da QT, indicando a interação do fármaco com a superfície da partícula por adsorção. Apesar de menor em módulo, o potencial zeta das partículas com fármaco permanece positivo, o que é vantajoso para aplicação tópica, devido a presença de sulfato de colesterol carregado negativamente na camada do estrato córneo, onde é necessário que haja perturbação por parte da formulação, para que esta atinja camadas mais profundas da pele (PROW et al., 2011).

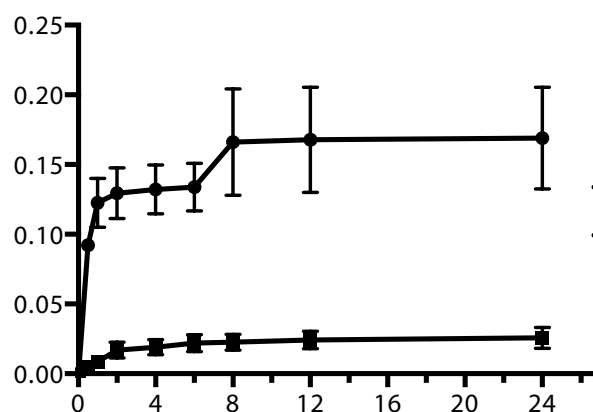
A eficiência de encapsulação de SMT pelas NPs de QT-TPP foi determinada pelo ensaio de ultrafiltração. As análises foram realizadas em triplicata e o resultado foi calculado por meio da equação (2) abaixo (GULATI et al., 2013), obtendo-se  $30,7 \pm 6,9$  % de fármaco encapsulado nas formulações de QT-SMT-TPP. Esta porcentagem encontra-se dentro da faixa relatada na literatura, entre 27 e 76% de porcentagem de encapsulação de SMT neste tipo de NPs (GULATI et al., 2013).

$$\% \text{ encapsulação} = \frac{\text{quantidade de fármaco no filtrado}}{\text{quantidade total de fármaco na formulação}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.3 Avaliação do Perfil de Permeação das NPs através de membranas artificiais STRAT-M®

Para os ensaios de permeação, foram utilizadas membranas artificiais Strat-M®.

Esta membrana é construída de duas camadas de polietersulfona (PES, mais resistente à difusão, devido ao menor tamanho de poros) sobre uma camada de poliolefina (mais aberta e difusiva) (MERCK). A estrutura porosa é impregnada com uma mistura de lipídios sintéticos, proporcionando propriedades adicionais semelhantes à da pele para a membrana (MERCK). A literatura relata que a membrana Strat-M® tem ampla compatibilidade química e é um modelo apropriado para rastrear compostos com diversas propriedades físico-químicas com elevado coeficiente de correlação em relação a pele humana (SIMON et al., 2016; UCHIDA et al., 2015). A figura 10 apresenta os resultados obtidos.



**Fig. 10.** Perfil de permeação in vitro de SMT obtido a partir de estudos em células de Franz utilizando a membrana Strat-M. Os dados são apresentados como valores médios  $\pm$  DP (n = 3).

Os perfis de permeação observados na figura diferem-se para o SMT em solução e o SMT associado a NPs de QT-TPP. No tempo experimental de 24 h cerca de 0,20 mg/cm<sup>2</sup> do SMT disponível na formulação de NPs permeou para o meio receptor, comparado a cerca de 0,025 mg/cm<sup>2</sup> do SMT em solução (12 mg/mL). Os lipídeos sintéticos impregnados na membrana atuam como materiais semelhantes aos lipídios da pele, simulando a barreira do estrato córneo. Sendo assim, é possível que pela baixa permeabilidade da formulação, a perturbação causada nesta barreira hidrofóbica não é suficiente para uma permeação nas camadas mais profundas. A liberação lenta do SMT sugere também um possível aprisionamento do fármaco no interior do sistema nanoparticulado (GULATI et al., 2013).

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, nanopartículas de quitosana-tripolifosfato foram sintetizadas utilizando a técnica de gelificação iônica, sendo o método de preparação otimizado para a obtenção de partículas de menores diâmetros hidrodinâmicos e índices de polidispersão (FAN et al., 2012). Dentre estes métodos apresentados, o método 5 foi o que resultou em nanopartículas com as melhores características físico-químicas

para aplicação tópica. Este, envolve a adição de uma solução 0,1% de TPP, a 0 °C à uma solução 0,1% de QT a 60 °C sob agitação de 2500 rpm, onde as nanopartículas resultantes apresentaram tamanho médio de  $134,7 \pm 1,7$  nm e PDI de  $0,262 \pm 0,022$  via análise de DLS, caracterizando uma população monodispersa e potencial zeta de  $29,6 \pm 2,1$  mV. A análise por NTA determinou a concentração de  $5,70 \times 10^9 \pm 0,28 \times 10^9$  nanopartículas/mL e o perfil de distribuição de tamanho das partículas entre 197 nm e 273 nm. As análises de DLS e NTA, mostraram-se complementares e permitiram melhor delineamento estrutural das NP. As NPs associadas ao fármaco modelo, succinato de sumatriptano, apresentaram um perfil de permeação sustentado em 24 horas. Este perfil pode estar associado com a baixa hidrofobicidade deste tipo de formulação, o que limita sua eficiência em ultrapassar a barreira do estrato córneo. A associação das NPs de QT-TPP com outros sistemas de liberação, como hidrogéis e organogéis podem aprimorar a capacidade de permeação destas NPs e precisam ser investigados.

## 5 | AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro das agências: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2018/04036-3), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Pelo apoio institucional e estrutural da Universidade Federal do ABC e da Central Experimental Multiusuário da UFABC.

## REFERÊNCIAS

AMGOTH, C., et al. **Polymeric Nanocapsules for Drug Delivery**. Nanotechnology for Animal Health and Production, 99-123, 2010.

AZONANO. **NanoParticle Tracking Analysis (NTA) and Dynamic Light Scattering (DLS) - Comparison between NTA and DLS**, 2009.

BOUWSTRA, J. A., et al. **Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels**. Journal of Investigative Dermatology 120, 750–758, 2003.

CHORILLI, M., et al. **Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos**. Rev. Bras. Cien. Farm. 88, 7–13, 2007.

COELHO, J.F., et al. **Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments**. The EPMA Journal, 1–46, 2010.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. **Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 90, 21–27, 2012.

GAN, Q.; WANG, T.; COCHRANE, C.; MCCARRON, P. **Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery**. Colloids

and Surfaces B: Biointerfaces 44, 65–73, 2005.

GODN, B.; TOUITOU, E. **Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models.** Advanced Drug Delivery Reviews 59, 1152–1161, 2007.

GRILLO, R., et al. **Influence of hybrid polymeric nanoparticle/thermosensitive hydrogels systems on formulation tracking and in vitro artificial membrane permeation: A promising system for skin drug-delivery.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 174, 56-62, 2019.

GULATI, N.; NAGAICH, U.; SARAF, S. A. **Intranasal delivery of chitosan nanoparticles for migraine therapy.** Scientia Pharmaceutica 81, 843–854, 2013.

HASANOVIC, A.; ZEHL, M.; REZNICEK, G.; VALENTA, C. **Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability.** The Journal of pharmacy and pharmacology 61, 1609–1616, 2009.

JENNING, V.; GOHLA, S. H. **Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN).** Journal of microencapsulation 18, 149–158, 2001.

KAUR, L., et al. **A Mechanistic Study to Determine the Structural Similarities Between Artificial Membrane Strat-M™ and Biological Membranes and Its Application to Carry Out Skin Permeation Study of Amphotericin B Nanoformulations.** AAPS PharmSciTech, 2018.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. **Macromolecular and modeling aspects of swelling-controlled systems.** Controlled release delivery systems, p. 70–90, 1981.

MALVERN. **Espalhamento de Luz Eletroforético.** Disponível em: <[www.malvernpanalytical.com](http://www.malvernpanalytical.com)>.

PRAUSNIT, M.; LANGER, R. **Transdermal drug delivery.** Nature biotechnology 26, 1261–1268, 2008.

MERCK. **Strat-M Membrane.** Disponível em : <[www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)>.

OSHIRO, A., et al. **Pluronic F - 127/L-81 Binary Hydrogels as Drug-Delivery Systems: Influence of Physicochemical Aspects on Release Kinetics and Cytotoxicity.** Langmuir 30, 13689–13698, 2014.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; et al. **Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery.** Advanced Drug Delivery Reviews 63, 470–491, 2011.

SCHNEIDER, M.; STRACKE, F.; HANSEN, S.; SCHAEFER, U. F. **Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier.** Dermato-endocrinology 1, 197–206, 2009.

SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. **Administração cutânea de fármacos: Desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas.** Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada 31, 125–131, 2010.

SIMON, A.; AMARO, M. I.; HEALY, A. M.; CABRAL, L. M.; SOUSA, V. P. **Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation.** International Journal of Pharmaceutics 512, 234–241, 2016.

SARTOR, M. **Dynamic light scattering.** University of California San Diego, 2003.

SINHA, V. R., et al. **Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs.** International Journal of Pharmaceutics 274, 1–33, 2004.

SOPPIMATH, K.; AMINABHAVI, T.; KULKARNI, A.; RUDZINSKI, W. **Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices**. *Journal of Controlled Release* 70, 1–20, 2001.

UCHIDA, T., et al. **Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 67, 113–118, 2015.



## AÇÃO RADIOPROTETORA DO EXTRATO BRUTO DA CASCA DE *Anadenanthera colubrina* SOBRE OS EMBRIÕES DE *Biomphalaria glabrata*

**José Luís Ferreira Sá**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Bioquímica e Biofísica, Recife-PE

**Williams Nascimento Siqueira**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Biofísica, Recife-PE

**Hianna Arely Milca Fagundes Silva.**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Bioquímica e Biofísica, Recife-PE

**Isabelle Cristinne Ferraz Bezerra**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Farmácia, Recife-PE

**Dewson Rocha Pereira**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Biofísica, Recife-PE

**Larissa Silva de Azevedo Melo**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Biofísica, Recife-PE

**Maíra de Vasconcelos Lima**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Biofísica, Recife-PE

**Luiz Alberto Lira Soares**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Farmácia, Recife-PE

**Márcia Vanusa Silva**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Bioquímica e Biofísica, Recife-PE

**Maria Tereza Santos Correia**

Universidade Federal de Pernambuco;

Departamento de Bioquímica e Biofísica, Recife-PE

**Ana Maria Mendonça Albuquerque Melo**

Universidade Federal de Pernambuco;  
Departamento de Biofísica, Recife-PE

**RESUMO:** As radiações podem ser classificadas em ionizantes e não ionizantes. Propaga-se a partir de uma fonte emissora através de meio material ou vácuo. As radiações ionizantes, quando em contato com o sistema biológico podem ocasionar danos ao DNA, modificar a fita de DNA gerando erros na divisão celular, podendo ocasionar mutações e até mesmo morte do organismo. Desta forma, pesquisas têm sido desenvolvidas em busca de radioprotetores de origem sintética ou natural com o objetivo de reduzir os danos ocasionados pelo efeito da radiação. No presente trabalho investigamos ação radioprotetora do extrato bruto da casca de *Anadenanthera colubrina* sobre os embriões de *Biomphalaria glabrata*. Foram utilizados embriões de *Biomphalaria glabrata*, divididos em grupos de aproximadamente 100 espécimes. Os embriões dos grupos experimentais foram expostos ao extrato na concentração de 125 ppm e em seguida, irradiados. Para a irradiação, foi utilizada uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (gammacell da Radionics Labs.  $X = 4,0 \text{ Gy/h}$ ). A viabilidade dos embriões foi analisada utilizando um

microscópio estereoscópico. Os resultados obtidos mostraram que o extrato da casca de *A. colubrina* apresentou uma discreta atividade radioprotetora.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Biomphalaria glabrata*, embriotoxicidade, irradiação radioproteção.

**ABSTRACT:** Radiation can be classified in to ionizing and non-ionizing radiation. It propagates from a source emitting through material medium or vacuum. The ionizing radiation, when in contact with the biological system can cause damages to the DNA, modify the DNA tape generating errors in the cellular division, can cause mutations and even death of the organism. In this way, researches have been developed in search of radioprotectors of synthetic or natural origin with the objective of reducing the damages caused by the radiation effect. In the present work we investigated the radioprotective action of the crude extract of the bark of *Anadenanthera colubrina* on the embryos of *Biomphalaria glabrata*. Embryos from the experimental groups were exposed to the extract at 125 ppm concentration and then irradiated. For irradiation, a  $^{60}\text{Co}$  source (Gammacell of Radionics Labs X = 4.0 Gy / hr) was used. The viability of the embryos was analyzed using a stereoscopic microscope. The results obtained showed that the extract of *A. colubrina* peel presented a mild radioprotective activity.

## 1 | INTRODUÇÃO

Radiação é energia que se propaga a partir de uma fonte emissora através de meio material ou vácuo, podendo ser classificada como radiação ionizante e não ionizantes (Santos et al., 2013; Okuno, 2013; Siqueira et al., 2014). A radiação ionizante é caracterizada por apresentar energia suficiente para remover elétrons de um átomo, ocasionando a ionização do mesmo. As radiações não ionizantes, por sua vez, interagem com os elétrons dos átomos ocasionando excitação dos mesmos. As radiações ionizantes são representadas pelas partículas alfa( $\alpha$ ), beta( $\beta$ ), prótons, nêutrons, raios gama( $\gamma$ ) e raios X. São exemplos de radiações não ionizantes os raios ultravioletas, infravermelho, as ondas de radiofrequência, o laser e a luz visível (Bitelli, 2006; Siqueira et al., 2014).

As radiações ionizantes, quando em contato com o sistema biológico podem ocasionar danos ao DNA. Estes tipos de energias possuem a capacidade de modificar a fita de DNA gerando erros na divisão celular, podendo ocasionar mutações e até mesmo morte do organismo (Dowd; Tilson, 1999; Santos et al., 2013; Siqueira et al., 2014). Essa interação pode ocorrer de forma direta, quando a radiação age diretamente sobre a biomolécula ou indireta quando a radiação interage com a molécula de água, produzindo radicais livres que podem interagir com as biomoléculas alvo (Santos et al., 2013; Siqueira et al., 2014).

Na literatura há vários relatos de estudos sobre os modelos experimentais para dimensionar os efeitos danosos ocasionados pela radiação nos sistemas biológicos.

Como exemplo podem ser citados, bactérias, cultura de células, peixes, concha de moluscos, embriões de *Biomphalaria glabrata*, fantasmas de hemácias e cultura de linfócitos (Siqueira et al., 2014). De acordo com os estudos, o modelo experimental, utilizando os moluscos de *B. glabrata* e suas proles (embriões) tem fornecido resultados excelentes na avaliação dos efeitos da radiação nos sistemas biológicos, por terem os seguintes aspectos: curto ciclo de vida, fácil manutenção em laboratório, baixo custo de manutenção, boa reprodutibilidade e resposta rápida e precisa (Mello et al., 1996; Siqueira et al., 2014).

A aplicação da radiação em diferentes áreas de atuação humana tais como: na medicina, agricultura, indústria tem levantado a necessidade de desenvolver substâncias capazes de proteger o sistema biológico de trabalhadores da área. Estas substâncias são denominadas de radioprotetores, compostos que possuem a propriedade de proteger o tecido vivo, diminuindo os danos a ele causados pela radiação. Sua ação é resultado da interação química entre esses compostos e as espécies reativas do oxigênio geradas pela radiação, impossibilitando os efeitos danosos. Os radioprotetores podem ser classificados como sintéticos e naturais (Santos et al., 2013; Siqueira et al., 2014). Segundos os estudos realizados, os sintéticos têm mostrados ação protetora contra os efeitos nocivos causados pela radiação, porém, esses radioprotetores possuem efeitos colaterais como náusea, vômito e hipotensão (Listet al., 1996; Santos et al., 2013). Desta forma o interesse em pesquisar radioprotetores de origem natural tem aumentado consideravelmente. (Tung-kwanget al., 2010).

Dentre os diferentes vegetais podemos citar a *Anadenanthera colubrina*, planta da caatinga pertence à família Fabaceae, popularmente conhecida por angico, sendo utilizada no combate a diferentes enfermidades como: gonorreia, leucorreia, no tratamento de febres, úlcera, asma e diarreia (Rodrigues et al., 2005; Lima et al., 2014). De acordo com estudos fitoquímicos descrito na literatura, o extrato de *A. colubrina* apresenta propriedades químicas indicativas de ser bom radioprotetor frente aos efeitos nocivos ocasionados pela radiação.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar ação radioprotetor da casca de *Anadenanthera colubrina* sobre os embriões de *Biomphalaria glabrata*.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e armazenamento da planta *Anadenanthera Colubrina*:

Amostras de *A. colubrina* casca, foram coletadas em fragmento de caatinga dentro da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). A área está localizada na cidade de Caruaru, região Agreste do estado de Pernambuco, Brasil (08°14'18.2"S e 35°54'57.1"W). Um espécime foi depositado no herbário professor Vasconcelos Sobrinho da Universidade Federal Rural de Pernambuco, número de registro 48663.

## 2.2 Obtenção do extrato da planta *Anadenanthera Colubrina*:

Após a coleta, as amostras foram submetidas à secagem em sombra e ambiente ventilado, em seguida foram trituradas em moinhos de faca e peneiradas em uma peneira de malha de 2,0 x 2,0 mm. O extrato bruto da casca de *A. colubrina* (angico) foi obtido pelo método de maceração a partir de 5 g de massa vegetal em 100 ml de metanol a 80%. A solução foi mantida por 72 horas protegida da luz. O extrato foi seco em rota–evaporador (Fisaton modelo 803) à pressão reduzida para retirada total do solvente metanol e a água.

## 2.3 Prospecções fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários de *Anadenanthera Colubrina*:

Para as análises por CCD foram utilizadas placas de alumínio de sílica gel 60 F254 Merck® de tamanho de tamanho 20 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorção. O método empregado na identificação das principais classes de metabólitos secundários (taninos, flavonoides, açúcares, saponinas, esteroides e terpenoides) foi estabelecido por Wagner e Bladt (1996).

## 2.4 Embriotoxicidade

Os embriões da espécie *B. glabrata*-pigmentados foram obtidos do moluscário do departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco, por meio do método de KAWANO et al.(1992). Os embriões coletados foram analisados quanto à viabilidade, separados em grupos e exposto por 24 horas ao extrato bruto da casca de *A. colubrina* nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 ppm. Controle negativo (água e DMSO a 0,5%) e controle positivo Niclosamida (Bayluscide, Bayer), 1 µg/mL. Cada grupo foi composto por aproximadamente 100 embriões e os parâmetros analisados foram: frequência de viabilidade (eclosão) e inviabilidade (mortos e malformados). O experimento foi realizado em triplicata. Este teste foi realizado com o objetivo de escolher a concentração com menor toxicidade a ser utilizada no ensaio do efeito radioprotetor.

## 2.5 Ensaio da ação radioprotetora do extrato bruto da casca de *A. colubrina*

Foram utilizados aproximadamente 1144 embriões da espécie *B. glabrata*-pigmentados separados em grupos com aproximadamente 100 espécimes cada: grupo controle negativo com água filtrada, grupo controle com água e submetidos à irradiação, grupo controle com extrato de angico não irradiado na concentração de 125 ppm (concentração escolhida de acordo com o item 2.4) e grupo exposto ao extrato de angico e irradiados com 4,0 Gy. Para a exposição a radiação foi utilizado o irradiador gammacell de <sup>60</sup>Co (modelo 220-Excel MDS Nordion) do Departamento de Energia Nuclear (DEN-CTG) da Universidade Federal de Pernambuco.

A avaliação dos efeitos foi realizada por oito dias consecutivos com auxílio de um microscópio estereoscópico (Tecnival-SQZ) segundo a metodologia de Okazaki et al.,

## 2.6 Análises estatístico

Os resultados foram avaliados com auxílio do programa prisma 5.0 por meio do teste estatístico de ANOVA e o pós-teste de Tukey com  $p < 0,05$ .

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil fitoquímico do extrato bruto da casca de *A. colubrina* pode ser observado na (Tabela 1). Na avaliação fitoquímica, as placas cromatográficas indicaram a presença dos seguintes metabolitos: Taninos, açúcares e fenóis. Estes resultados corroboram com os apresentados por Lorenzi; Matos (2002); Colacite (2015). Segundo a literatura os flavonóides e compostos fenólicos são responsáveis pela atividade antioxidante (Leite et al., 2001; Haslam, 1996).

|            | Metabolitos secundários |         |          |             |        |
|------------|-------------------------|---------|----------|-------------|--------|
| Esteróides | Flavonóides             | Taninos | Açúcares | Terpenóides | Fenóis |
| -          | -                       | +       | +        | -           | +      |

**Tabela 1.** Perfil fitoquímico do extrato bruto da casca de *A. colubrina* pelo método de CCD.

Na tabela 2, pode-se observar os resultados dos embriões expostos ao extrato bruto da casca de *A. colubrina* por 24 horas e observados por oito dias. Este teste foi realizado com o objetivo de avaliar previamente, a toxicidades do extrato da casca de angico em diferentes concentrações (125, 250, 500 e 1000) e também para facilitar a escolha da concentração menos tóxica e que posteriormente, foi utilizada para realizar o teste radioprotetor da casca de angico. Na avaliação do teste com embriões, as concentrações de 125, 250 e 500, foram menos tóxico aos embriões de *B. glabrata* exibindo uma frequência de mortalidade de 1,7; 2 e 10,4%. Porém, a concentração de 1000 ppm apresentou uma frequência de mortalidades dos embriões de 100%. Portanto, a concentração de 125 ppm foi escolhida para realizar o teste radioprotetor por exibir menos toxicidade aos embriões de *B. glabrata* em relação aos restantes das concentrações utilizadas no teste.

| [ ]<br>ppm | Total de<br>Embriões | Inviáveis<br>Total | %    | Viáveis<br>total | %    |
|------------|----------------------|--------------------|------|------------------|------|
| 0          | 294                  | 13                 | 4.5  | 281              | 95.6 |
| NCL        | 300                  | 300                | 100  | 0                | 0    |
| 125        | 292                  | 5                  | 1.7  | 287              | 98.3 |
| 250        | 295                  | 6                  | 2    | 289              | 98.0 |
| 500        | 300                  | 31                 | 10.4 | 269              | 89.6 |

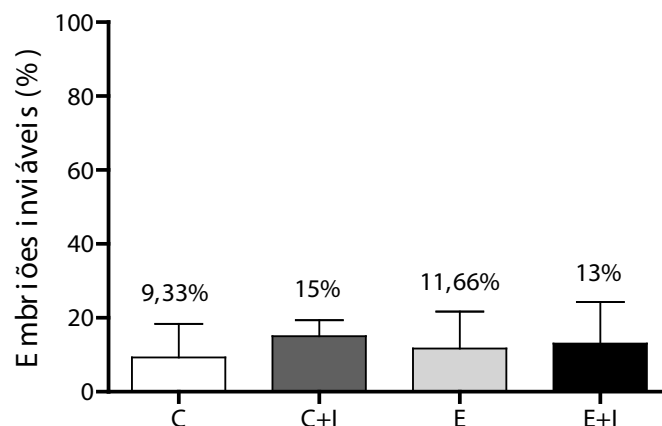
**Tabela 2.** Resultados dos embriões de *B. glabrata* expostos ao extrato bruto da casca de *A. colubrina* por 24 horas.

Os dados em que  $p < 0,05$  demonstram diferenças significativas entre os grupos, \* vs. C. Onde, C - controle e NCL - niclosamida.

A figura 1, ilustra os resultados dos embriões de *B. glabrata* expostos a radiação de gama de  $^{60}\text{Co}$  utilizando a dose de 4,0 Gy, na presença dos extratos bruto da casca do *A. colubrina* na concentração de 125 ppm. Os grupo irradiados na presença de extrato bruto de angico na concentração de 125 ppm apresentou uma diminuição no números de embriões inviáveis (13%) quando comparados apenas com o grupo controle irradiado na dose de 4,0 Gy (15%) (Figura 1). Essa diminuição na taxa de inviabilidade pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos e de taninos no extrato bruto da casca de angico.

Estudos realizado com o extrato metanólico da casca da *Caesalpinia pyramidalis* sobre os embriões de *B. glabrata* mostrou que grupos irradiados com doses de 2,5 e 4,0 Gy, na presença do extrato na concentração de 250 ppm, não apresentaram diferenças significativas no número de embriões inviáveis quando comparados a seu controle não irradiado, respectivamente (Santos et al., 2013). Este estudo corrobora com os resultados encontrados no nosso trabalho.

Siqueira et al.,(2014), analisou o efeito radioprotetor do extrato aquoso da casca e folha de *Ziziphus joazeiro* irradiados com 2,5 e 5,0 Gy e demonstrou que todos os grupos apresentaram um baixo percentual de embriões malformados ou mortos. E que o grupo irradiado com 5,0 Gy na presença de extrato aquoso da folha exibiu um menor número de embriões inviáveis quando comparados com o grupo controle irradiado também com 5,0 Gy. E o grupo irradiado com 5,0 Gy na presença do extrato aquoso da casca, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle irradiado (5,0 Gy). E que a ação radioprotetor do extrato da folha de *Z. joazeiro* podem estar relacionada a presença dos metabolitos secundários com potencial antioxidante.



**Figura 1:** Ensaio realizado com embriões de *Biomphalaria glabrata* em presença do extrato bruto da casca de *A. colubrina*, na concentração de 125 ppm, submetidos às radiações de



4,0. As letras presentes no eixo x representam os grupos: controle (C), controle irradiado na presença da água (C+I), extrato bruto na concentração de 125 ppm (E), extrato bruto da casca irradiado a 4,0 Gy (E+I). Os dados foram expressos  $\pm$  E.P.M. (Erro padrão da média), p (Nível de significância)  $< 0,05$ , nos quais os embriões submetidos ao extrato da casca da catigueira não mostraram \* (Diferença significativa) em relação ao controle.

## 4 | CONCLUSÕES

A análise fitoquímica do extrato bruto da casca de angico mostrou a presença de taninos, açúcares e fenóis. E os resultados obtidos da exposição dos embriões de *B. glabrata* a radiação na presença do extrato da casca de *A. colubrina* na concentração de 125 ppm apresentou uma discreta atividade radioprotetora. Sugere-se estudo mais detalhado sobre fitoquímica da planta para promover um enriquecimento do extrato da casca de *A. colubrina* e conseqüentemente dos metabolitos responsáveis pela atividade antioxidante, que promovem a potencialização da ação radioprotetora.

## REFERÊNCIAS

BITELLI T. **Física e dosimetria das radiações**, São Paulo: Atheneu; c. 442 p. 5, 2006.

COLACITE, J. **Triagem Fitoquímica, Análise Antimicrobiana e Citotóxica e dos Extratos das Plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellanedae*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.** *Saúde e Pesquisa*, 8(3), 509-516, 2015.

DOWD S. B., TILSON E. R. **Practical radiation protection and applied radiobiology**, Philadelphia: Saunders Company, c1999.

Haslam E. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action.** *Journal Natural Products*. 59(2):205-215, 1996.

LEITE J. P., RASTRELLI L., ROMUSSI G. **Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(8):3796-3801, 2001.

LIST, A. F.; HESTON, R.; GLINSMANN-GIBSON, B.; CAPIZZI, R. L. **Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors cytotoxicity.** *Seminars in Oncology*, v. 23, n. 4, p. 58-63, 1996.

LORENZI, H.; MATOS, J. F. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MELO A. M. M. A.; OKAZAKI K., KAWANO T. **Study of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) embryos.** *Journal of Medical and Applied Malacology*. 8:140-141, 1996.

OKAZAKI K., ANDRADE HF, KAWANO T. **Effect of  $^{60}\text{Co}$  gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.; 29:1057-1067, 1996.

OLIVEIRA S. M. L., SIQUEIRA, W. N., SÁ, J. L. F., SILVA, L. R. S., DE VASCONCELOS C., D. L., AMÂNCIO, F. F., ALBUQUERQUE M., A. M. M. **Estudo do efeito radioprotetor do extrato metanólico de *Caesalpinia pyramidalis* sobre células embrionárias de *Biomphalaria glabrata*.** *Scientia Plena*, 9(9), 2013.

SIQUEIRA, W. N., SILVA, L. R. S., OLIVEIRA S., M. L., SANTOS, F. T. J., SILVA, H. A. M. F., LACERDA, L. B. N., ...ALBUQUERQUE M. A. M. M. **Efeito radioprotetor do extrato de *Ziziphus joazeiro* sobre embriões de *Biomphalaria glabrata* submetidos à radiação ionizante.** *Scientia Plena*, 10(9), 2014.

TUNG-KWANG L., O'BRIEN K. F., WANG W., JOHNKE R. M., SHENG C, BENHABIB S. M., WANG T., ALLISON R. R. **Radioprotective Effect of American Ginseng on Human Lymphocytes at 90 Minutes Post irradiation: A Study of 40 Cases.** *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 16(5):561-567, 2010.

RODRIGUES, A. C. DA C.; OSUNA, J. T. A. **Mudanças morfológica em sementes na espécie *Angico* (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan Var. *cebil* [Griseb] Altschul) em diferentes condições ambientais.** Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia 2005.

## MÉTODOS MATEMÁTICOS DE ANÁLISE DA ATIVIDADE ELÉTRICA CEREBRAL DE RATOS EXPOSTOS A RADIAÇÃO IONIZANTE

**Camilla de Andrade Tenorio Cavalcanti**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife, Pernambuco

**Isvânia Maria Serafim da Silva Lopes**

Universidade Federal de Pernambuco  
Recife, Pernambuco

**Leandro Álvaro de Alcântara Aguiar**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife, Pernambuco

**Alexandre Parísio Barbosa de Oliveira**

Instituto de Radioterapia Waldemir Miranda  
Recife, Pernambuco

**Jonas Sérgio de Oliveira Filho**

Universidade Federal de Pernambuco  
Recife, Pernambuco

**Romildo de Albuquerque Nogueira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife, Pernambuco

**RESUMO:** A radiação ionizante (RI) é utilizada em tratamentos contra tumores cerebrais, contudo, estudos demonstram que a RI pode causar efeitos adversos no Sistema Nervoso Central (SNC). Com o intuito de fornecer mais dados sobre os efeitos da RI no SNC, o objetivo da pesquisa foi avaliar a atividade elétrica cerebral de ratos expostos à RI. Para o procedimento experimental foram utilizados doze animais, todos machos com 60 dias,

que foram separados em dois grupos ( $n = 6$ ): controle e irradiado. Inicialmente, os animais passaram por um procedimento cirúrgico para implante dos eletrodos, pois, através do eletrocorticograma (ECoG), é possível avaliar com mais precisão a atividade elétrica cerebral. Após esse procedimento, os animais do grupo irradiado foram expostos a uma dose única de 18 Gy de raios-X. Os registros de ambos os grupos experimentais foram obtidos com 24 horas e 30 dias, onde pode-se observar alterações nas ondas cerebrais através do uso de dois métodos matemáticos: a Transformada de Fourier (TF) e a Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ). A partir da CLZ foi identificado uma diminuição da complexidade do sinal cerebral, passando de 0,5552 (controle) para 0,4314 (irradiados com 30 dias) e através da TF pode-se observar aumento da atividade das ondas cerebrais beta e delta juntamente com a diminuição de alfa e teta no grupo irradiado em relação ao controle. Dessa forma, pode-se concluir que RI interfere no SNC, causando alterações eletrofisiológicas, que incluem diminuição da complexidade e modificações nas ondas cerebrais.

**PALAVRAS-CHAVE:** eletrofisiologia; raios-X; complexidade de Lempel-Ziv; Transformada de Fourier.

## 1 | INTRODUÇÃO

Com a descoberta no final do século XIX dos raios-X, a radiação passou a ser empregada pela medicina (SEGRETO e SEGRETO, 2000). Sendo utilizada ainda hoje em diversos aspectos, desde a esterilização de produtos farmacêuticos, médicos e cirúrgicos (PINO e GIOVEDI, 2005)pr\u00f3tons, elétrons, n\u00eautrons, até a utilização em terapias, como é o caso da radioterapia. Do ponto de vista físico, a radiação pode ser não ionizante e ionizante. Sendo a radiação ionizante (RI) aquela que pode, durante a sua interação com a matéria, remover elétrons da sua orbital, podendo citar os raios-X e gama (YOSHIMURA, 2009).

A exposição do indivíduo à RI pode causar efeitos diretos e indiretos em suas estruturas. Os efeitos indiretos resultam em radicais livres, que são bastante reativos, podendo interferir com o metabolismo de proteínas, dos lipídios e carboidratos. Já os efeitos diretos ocorrem quando a radiação é absorvida diretamente por moléculas importantes no metabolismo celular, como enzimas e o DNA (GARGIA, 2015).

As alterações biológicas causadas pela exposição à RI só surgem após um período de latência, podendo variar entre minutos, semanas ou até anos, dependendo do sistema biológico e da dose aplicada (MOREIRA, 2011). Outros fatores, como a taxa de dose, condições ambientais na altura da radiação, sensibilidade radiológica e transferência linear de energia (LET) podem influencia no efeito da RI (SEGRETO e SEGRETO, 2000; MOREIRA, 2011).

A RI tem sido utilizada na prevenção do avanço do câncer cerebral a partir da radioterapia, e apesar de aumentar a sobrevivência dos pacientes, também aumentou o número de pacientes com sequelas neurocognitivas graves (PARIHAR e LIMOLI, 2013), incluindo, déficits progressivos na memória de curto prazo, nas relações espaciais, no processamento visual e motor, em habilidades quantitativas e na atenção (MOREIRA, 2011). Os pacientes que passaram por uma radioterapia necessitam de avaliações cognitivas anuais, tendo em vista, que esses danos cognitivos podem ser progressivos, principalmente em pacientes jovens (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Mesmo em pequenas doses, a RI pode afetar vias neurais envolvidas no envelhecimento normal, ocasionar mudanças no perfil de expressão do gene e causar respostas neuroinflamatórias (LOGANOVSKY, 2009).

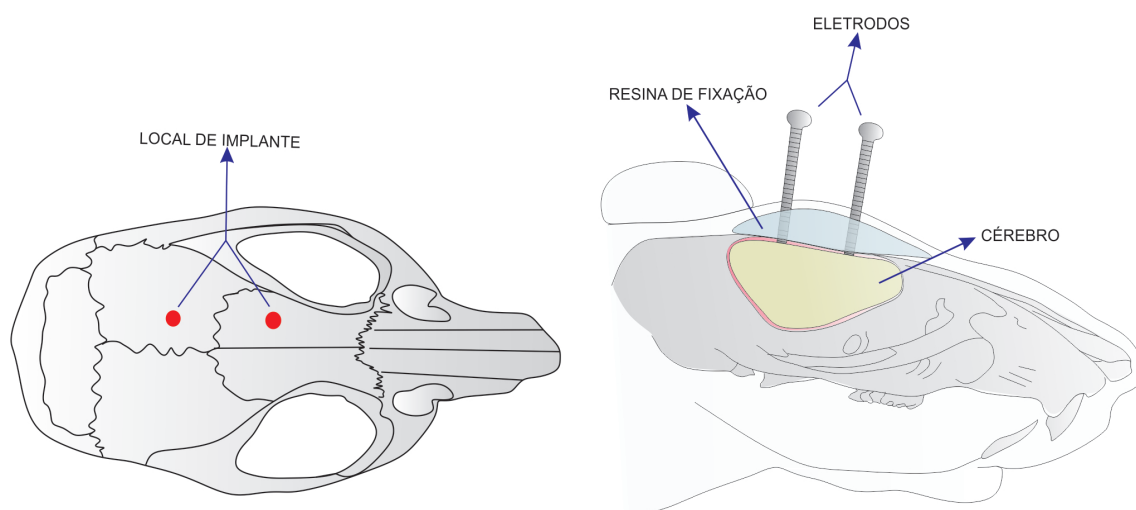
Apesar do aumento do número de pesquisas realizadas na área, ainda faltam informações acerca dos efeitos da RI no sistema nervoso. E uma metodologia eficiente na investigação desses possíveis efeitos é o registro de sinais da atividade elétrica cortical através do eletrocorticograma (ECoG). Essa forma de análise é de grande importante para a medicina e para a biologia, pois, busca compreender fenômenos fisiológicos associados à codificação neural (CARDOSO, 2005). O ECoG consiste em uma técnica onde um eletrodo é posicionado diretamente na superfície do córtex cerebral, oferecendo uma maior resolução espacial e precisão (DILORENZO *et al.*, 2014).

Com base em tudo que foi exposto, o presente trabalho buscou analisar, através de métodos matemáticos, possíveis alterações na atividade elétrica cerebral em ratos expostos a RI, procurando compreender os possíveis efeitos da radiação ionizante em humanos que passaram por uma radioterapia.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados doze ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), machos e com 60 dias de idade. Os doze ratos foram divididos em dois grupos com seis animais cada. O Grupo 1 (controle), com animais não expostos a RI e o Grupo 2 (irradiado), com animais expostos a RI. Ambos os grupos foram analisados com 24 horas e 30 dias.

Aos 60 dias de idade, os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (75 mg/kg) por via intraperitoneal (IP). Com o animal já anestesiado é realizado uma tricotomia e assepsia do campo cirúrgico. Os animais tiveram suas cabeças fixadas à base de um aparelho estereotáxico (Figura 1) e em seguida foi realizada uma incisão longitudinal da pele, na linha média do crânio.



**Figura 1.** Desenho esquemático do procedimento cirúrgico para implante dos eletrodos (Fonte: Arquivo Pessoal).

Com auxílio de um micromotor foram feitas duas craniotomias, uma na região parietal e outro na região nasal. Nessas craniotomias foram fixados dois micros parafusos (MP) de aço inox, utilizados posteriormente como eletrodos para realização do registro. Para fixação dos parafusos foi utilizada resina acrílica e em seguida a pele foi suturada, expondo apenas os MP (Figura 2).



**Figura 2.** Animais com suas cabeças fixadas no estereotático no *término* da cirurgia (Fonte: Arquivo Pessoal).

Os animais foram irradiados no Instituto de Radioterapia Waldemir Miranda (IRWAM), Recife-PE, Brasil. Para tal, os mesmos, foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (75 mg/kg) por via IP, e em seguida foram posicionados na mesa de um acelerador linear Varian, modelo Clinac 600C (Figura 3).



**Figura 3.** Acelerador linear Varian, modelo Clinac 600C (Fonte: Arquivo Pessoal).

A dose utilizada foi de 18 Gy de raios-X, de forma que os raios foram colimados para que somente a região de cabeça/pescoço fossem irradiadas (Figura 4), sendo metade aplicados na parte superior (9 Gy) e a outra na parte inferior da cabeça (9 Gy). A taxa de dose utilizada foi de 2,4 Gy/min a 1,5 cm de profundidade, sendo o tempo total de exposição de 15 minutos.





**Figura 4.** Animais posicionados na mesa do Acelerador linear Varian com os raios colimados para região da cabeça/pescoço (Fonte: Arquivo Pessoal).

Todos os animais do Grupo 1 e do Grupo 2, tiveram as suas atividades elétricas cerebrais registradas durante 20 minutos através de um aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) utilizando uma taxa de amostragem de 750 Hz. Os registros foram realizados em três momentos: antes da exposição à RI, com 24 horas e 30 dias após a exposição.

Os registros foram segmentados em janelas de dois minutos através do Windaq Waveform Browser. E esses segmentos foram importados para o programa Matlab 7.8 (Mathworks, Natick, MA, USA), no qual foram implementados algoritmos para análises das ondas cerebrais do ECoG, por meio da Transformada Fourier (TF) e Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ).

A TF é uma análise direta da série temporal que permite passar a informação no domínio do tempo para o domínio da frequência, desta forma, torna possível o conhecimento da contribuição de cada componente de frequência presente numa série temporal (WEISSTEIN, 2004). Através do método de Welch foi possível calcular a potência média para as diferentes frequências (WELCH, 1967).

Já a análise da CLZ baseou-se na definição descrita por Lempel-Ziv (1976), posteriormente discutida por Kaspar e Schuster (1987). Através da CLZ é possível identificar a recorrências de padrões em uma série. Assim uma série que apresenta padrões com regularidades, ou seja, séries auto similares possui valor de CLZ próximo a 0. Por sua vez uma série que possui um comportamento semelhante a uma caminhada aleatória terá um valor de CLZ próximo a 1.

A CLZ é uma medida de complexidade que tem sido usada para analisar os sinais de EEG em pacientes com a Doença de Alzheimer, Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH), medir o aprofundamento de anestesia, epilepsia dentre outras condições (LEE *et al.*, 2014; SIMONS *et al.*, 2015; IBÁÑEZ-MOLINA *et al.*, 2015).

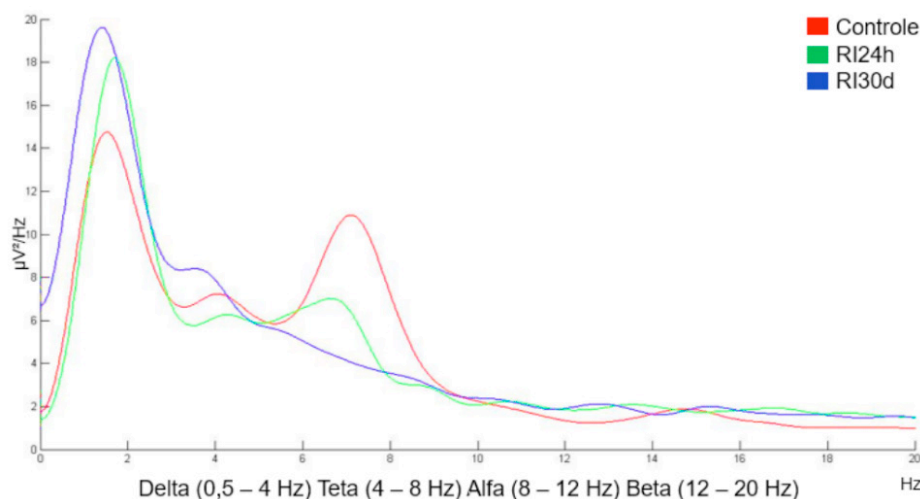
Por fim, o teste estatístico foi realizado através do GraphPad Prism utilizando

o teste de Kruskal-Wallis com o post-hoc de Dunn, sendo considerado um valor de p menor que 0,05 para indicar significância.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

As ondas cerebrais representam o resultado de vários tipos de fenômenos eletrofisiológicos que, por sua vez, refletem numerosos processos neurais (TIMO-IARIA e PEREIRA, 1971), estando envolvidas com os estados de humor, as emoções e o nível de tensão muscular (PERNAMBUCO *et al.*, 2003). Nessa perspectiva, alterações nas ondas cerebrais podem acarretar em diversos efeitos colaterais.

Através da Transformada de Fourier (TF) foi obtida a densidade espectral da atividade elétrica dos grupos experimentais (controle e irradiado). Onde foi possível identificar as variações entre as ondas delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 8 Hz), alfa (8 – 16 Hz) e beta (16 – 32 Hz) cerebrais dos animais do grupo 1 e 2, analisados 24 horas e 30 dias, após a exposição à RI (Figura 5).



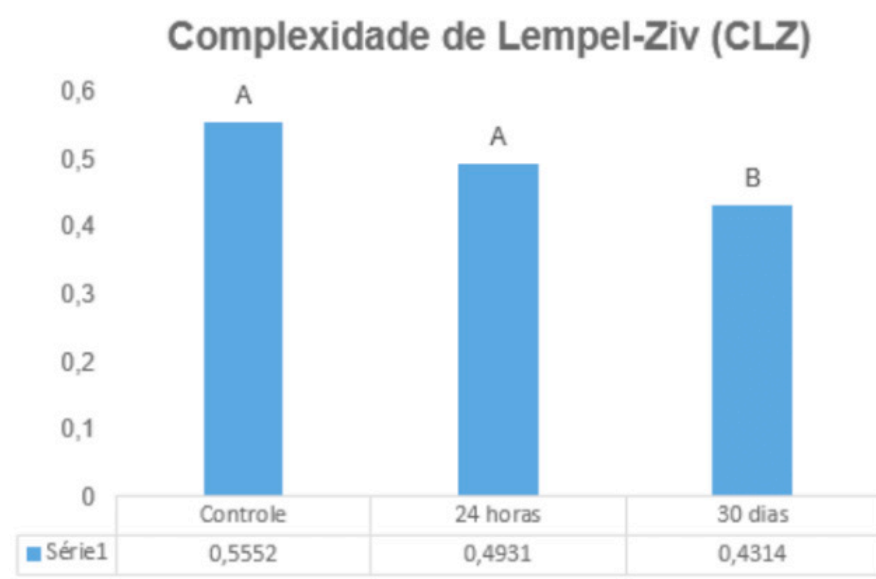
**Figura 5.** Espectro de Potência das ondas cerebrais (delta, teta, alfa e beta).

As ondas cerebrais delta e beta sofreram um aumento em relação ao grupo controle em ambos os períodos de avaliação (24 horas e 30 dias). Passando de 9,95  $\mu V^2/Hz$  para 11,86  $\mu V^2/Hz$  e de 1,23  $\mu V^2/Hz$  para 1,70  $\mu V^2/Hz$ , nas ondas delta e beta, respectivamente. Por outro lado, as ondas teta e alfa diminuíram. A onda teta passou de 7,65  $\mu V^2/Hz$  para 5,74  $\mu V^2/Hz$  com 24 horas e 4,03  $\mu V^2/Hz$  com 30 dias. O mesmo pode ser observado com a onda alfa, passando de 2,68  $\mu V^2/Hz$  no grupo controle para 1,88  $\mu V^2/Hz$  nos animais avaliados com 30 dias. Sendo observado através do teste de Kruskal-Wallis que houve uma diferença significativa do grupo controle em comparação ao grupo irradiado ( $p < 0,05$ ).

Estudos já comprovaram que o padrão do eletroencefalograma (EEG) em humanos exposto a radiação ionizante são bastantes distintos se comparado com o padrão dos indivíduos normais, podendo observar o aumento da atividade das ondas

cerebrais beta e delta juntamente com a diminuição de alfa e teta (LOGANOVSKY e YURYEV, 2001), corroborando com os dados obtidos na análise realizada nos animais tanto com 24 horas, quanto com 30 dias (Figura 5).

A utilização da Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) permitiu analisar o grau de complexidade do sinal cerebral dos animais do grupo controle e irradiado (Figura 5). Obtendo uma diminuição da complexidade do sinal cerebral do grupo irradiado em relação ao grupo controle. Passando de 0,5552 no grupo controle, para 0,4931 já nas primeiras vinte e quatro horas pós irradiação e 0,4314 na análise feita com 30 dias, obtendo um nível de significância de  $p < 0,036$  através do teste de Kruskal-Wallis com o post-hoc de Dunn, sendo significativamente distinto do controle.



**Figura 6.** Complexidade de Lempel-Ziv dos animais do grupo controle e irradiados, analisados com 24 horas e 30 dias. A, sem diferença significativa; B, com diferença significativa.

Essas alterações encontradas nas ondas cerebrais, tanto referentes a TF, quanto a CLZ, podem estar correlacionado aos danos cognitivos observados após as radioterapias, justamente pela atuação fisiológica dessas ondas cerebrais (WONG e KOGEL, 2004; BALENTOVA e ADAMKOV, 2015).

Apesar da falta de compreensão dos mecanismos que causam as lesões nos tecidos induzidas pela exposição a RI, acredita-se que seja consequência de uma cascata de reações, cuja formação final são espécies reativas de oxigênio (SENER *et al.*, 2006; BARBOSA, 2010), cujo cérebro é bastante susceptível a esse tipo de dano, principalmente devido a sua alta utilização de oxigênio (DORNAS *et al.*, 2007), sendo portanto uma justificativa para os danos encontrados na atividade elétrica cerebral.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises feitas nos animais expostos a radiação ionizante pode-se concluir que os efeitos surgem logo após 24 horas, com a ocorrência de mudanças

significativas nos padrões do ECoG em relação aos animais do grupo controle, tendo alterações nos padrões de todas as ondas cerebrais (delta, alfa, teta e beta). Após 30 dias de irradiação foram realizados novos registros do ECoG e pôde ser observado que as alterações no padrão da atividade elétrica cerebral ainda estavam presentes, demonstrando que esses danos podem ser irreversíveis.

A partir da Complexidade de Lempel-Ziv (CLZ) observou-se que a atividade elétrica do cérebro nos animais irradiados diferiu do controle somente após 30 dias da exposição à radiação, portanto, as alterações no grau de complexidade do sinal cerebral pode ser considerado um efeito tardio da irradiação, contudo, se faz necessário mais estudos para entender melhor o mecanismo da radiação ionizante no sistema nervoso central.

## REFERÊNCIAS

BALENTOVA, S.; ADAMKOV, M. **Molecular, Celular and Functional Effects of Radiation-Induced Brain Injury: A Review**. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 27796 – 27815, 2015.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O. MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. **Oxidative stress: concept, implications and modulating factors**. *Rev. Nutri*, v. 23, n. 4, 2010.

CARDOSO, R. R. **Uma estratégia de modelagem tridimensional para mapeamento do EEG de superfície**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

CUPERSCHMID, E. M.; CAMPOS, T. P. R. **Os Primórdios Das Radiações Na Medicina No Brasil**. INAC, São Paulo; 2005.

DIORENZO, D. J.; MANGUBAT, E. Z.; ROSSI, M. A. BYNE, R. W. **Chronic recording electrocorticography guided resective epilepsy surgery: overview and future directions**. *Molecular & Celular Epilepsy*, n. 1, v. 208, p 1 – 6; 2014.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. **Flavonoides: potencial terapêutica no estresse oxidativo**. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n. 3, p. 241 – 249, 2007.

GARCIA, E. A. C. *Biofísica*. São Paulo: Editora Sarvier, 505 f. 2015.

IBÁÑEZ-MOLINA, A. J. ET AL. **Multiscale Lempel–Ziv complexity for EEG measures**. *Clinical Neurophysiology*, v. 126, n. 3, p. 541-548, 2015.

KASPAR F. AND SCHUSTER H.G., **Easily calculable measure for the complexity of spatiotemporal patterns**. *Physics Review A*, v. 36, no. 2, pp. 842-848, 1987.

LEE, CHUN SIONG ET AL. **Integrating EEG Modality in Serious Games for Rehabilitation of Mental Patients**. In: *Simulations, Serious Games and Their Applications*. Abstract... Springer Singapore. 2014. p. 51-68.

LOGANOVSKY, K. N; YURYEV, K. L. **EEG patterns in persons exposed to ionizing radiation as a result to the Chernobyl accident: part 1: conventional EEG analysis**. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, v. 13, n. 4, p. 441 – 458; 2001.

LOGANOVSKY, K. N. **Do low doses of ionizing radiation affect the human brain?** Advance Publication, Data Science Journal; jun. 2009.

LEMPEL A. AND ZIV J., **On the complexity of finite sequences.** IEEE Trans. Inform. Theory, Jan. IT22, 75–81, 1976.

MONJE, M. L; PALMER, T. **Radiation injury and neurogenesis.** Current opinion in neurology, v. 16, n. 2, p. 129 – 134, abr. 2003.

MOREIRA, J. V. A. **Radiobiologia – efeitos das radiações ionizantes na célula – e formas de proteção das radiações ionizantes.** Dissertação Programa de Pós-Graduação em Radiobiologia e Radioproteção da Universidade da Beira Interior, 2011.

OLIVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, J. X. D. E.; OLIVEIRA, J. X. **Estimativa de Risco das Radiações Ionizantes no Cérebro, Sistema Nervoso e Cristalino em Pacientes Odontopediátricos.** J Bras Odontopediatr Odontol Bebê, v. 6, n. 33, p. 428 - 433, 2010.

PARIHAR, V. K. LIMOLI, C. L. **Cranial irradiation compromises neuronal architecture in the hippocampus.** PNAS, v. 110, n. 31, p – 12822 – 12837, 2013.

PERNAMBUCO, C.S.; PIRES, V.N.L.; MAULAZ, M.B.; MESQUITA, M.G.; CAETANO, L.F.; NOVAES, J.S.; DANTAS, E.H.M. **A inferência do shiatsu na distribuição de potência das ondas alfas no córtex cerebral em mulheres adultas.** Fitness & Performance Journal, v.2, n.3, p. 178-182, 2003.

PINO, E. S.; GIOVEDI, C. **Radiação Ionizante E Suas Aplicações Na Indústria.** Revista UNILUS Ensino e Pesquisa, n. 2, p. 47–51, 2005.

SEGRETO, H. R. C.; SEGRETO, R. A. **Revisão e atualização em radiobiologia.** Aspectos celulares, moleculares e clínicos. A folha Médica, v. 119, n. 4, p. 9 –27; 2000.

SENER, G.; KABASAKAL, L.; ATASOY, B. M.; ERZIK, C.; VELIOGLU-OGUNÇ, A.; CETINEL, S.; GEDIK, N.; YEGEN, B. Ç. **Ginkgo biloba extract protects against ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats,** Pharmacological Research, v. 53, p. 241 – 252, 2006.

SIMONS, S.; ABASOLO, D.; HUGHES, M.. **Investigation of Alzheimer’s Disease EEG Frequency Components with Lempel-Ziv Complexity.** In: 6th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering. 2015. Abstract... Springer International Publishing, 2015. p. 46-49.

TIMO-IARIA, C.; PEREIRA, W. C. **Mecanismos das ondas elétricas cerebrais,** Arq. Neuro-Psiquiatr, v. 29, n. 2, 1971.

WEISSTEIN, E. W. **Fourier Transform.** MathWorld, A Wolfram Web Resource, 2004.

WELCH, P. **The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms.** IEEE Trans Audio Electroacoust. 1967 Jun;15(2):70–3.

WONG, C. S.; KOGEL, V. D. **Mechanisms of Radiation Injury to the Central Nervous System: Implications for Neuroprotection.** Molecular Interventions, v. 4, n. 5, p. 273 – 284, 2004.

YOSHIMURA, E. M. **Física das Radiações: interação da radiação com a matéria.** Revista Brasileira de Física Medica, v. 3, n. 1, p. 57 – 67; 2009

**Sabrina Passoni Maravieski** - Possui graduação em Licenciatura em Física e Mestrado em Ciências/ Física, ambos pela Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atualmente é doutoranda na área de Ensino de Ciências nas Engenharias e Tecnologias pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná. É também professora adjunta do Centro de Ensino Superior de Campos Gerais na cidade de Ponta Grossa. Ministra as disciplinas de: Mecânica dos Fluidos, Fenômenos de Transporte, Mecânica Aplicada, Eletricidade e Magnetismo, Física Atômica e Nuclear, Física da Ressonância Magnética Nuclear, Física das Radiações Ionizantes e Não Ionizantes e Física e Instrumentação Aplicada a Engenharia Biomédica; nos cursos de Engenharia Elétrica, Engenharia Civil, Tecnologia em Radiologia, Pós -Graduação em Segurança do Trabalho e Imagenologia. Já atuou como professora de Ensino Médio em escolas pública e particular ministrando aulas de Física e Robótica.



Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-189-3

