

Título em Português: Estudo da Interação da Melanina com o Ultrassom de Baixa Intensidade

Título em Inglês: Study of the Interaction of Melanin with Low-Intensity Ultrasound

Autor: Murilo de Oliveira Souza

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Sebastião Pratavieira

Área de Pesquisa / SubÁrea: Física Geral

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

Estudo da interação da Melanina com o Ultrassom de Baixa Intensidade

Autor: Murilo de Oliveira Souza

murilodeoliveira8@usp.br

Colaborador: Erika Toneth Ponce Ayala

eriponce@usp.br

Orientador: Sebastião Pratavieira

prata@ifsc.usp.br

Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo

Objetivo

O objetivo desse projeto é estudar as alterações das propriedades ópticas da melanina e a sonoquímica presente durante a interação com o ultrassom terapêutico (com frequência de ressonância de 1 a 3 MHz, intensidade máxima de 3 W/cm^2 e modo de emissão do ultrassom ajustável em contínuo ou em pulsado), podendo ao final desta pesquisa, relacionar essas alterações com a mudança da concentração da melanina e dos parâmetros do ultrassom. Esta pesquisa tem o intuito de ajudar na compreensão dos efeitos sonodinâmicos sobre tumores pigmentados durante a terapia sonodinâmica, alvo de recentes estudos. (1)

Métodos e Procedimentos

Utilizando melanina sintética em pó dissolvida em hidróxido de sódio (NaOH, pH = 13,0), são preparadas diversas soluções. Em seguida, cada solução é colocada em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e levada para análise óptica em um espectrofotômetro (Varian Cary 50), para que sua curva de absorbância seja analisada. Posteriormente cada solução passa por um processo de sonicação com um ultrassom (SONOPULSE III, Ibramed, Brasil), por aproximadamente dois minutos, e é novamente medida sua curva, o processo se repete até que o tratamento complete 10 minutos. Todas as soluções estudadas são diluídas com diferentes concentrações e sonificada com diferentes intensidades. Desse modo é possível uma análise quantitativa mais precisa dos resultados e da influência de cada parâmetro usado. Ademais, para a investigação da geração de espécies reativas, mais especificamente o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), serão uti-

lizados químicos, como 1,3 - difenilisobenzofurano (DPBF) que atua como um agente sequestrador do $^1\text{O}_2$. Por fim, serão analisados diversos gráficos de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR), afim de se diminuir a interferência do solvente nos dados coletados e tornar a análise mais precisa e sensível, além de corroborar os resultados, e para isso será utilizado um *spin-trap*, o 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidino (TEMP), com a função de prolongar a meia-vida do $^1\text{O}_2$ para que sua análise seja estudada.

Resultados

Inicialmente com medições espaçadas de 2 minutos podemos ver o seguinte comportamento para a solução de melanina em NaOH, mantendo a intensidade de tratamento fixa em $1,5 \text{ W/cm}^2$ e variando a concentração de nossa solução. (Figura 1)

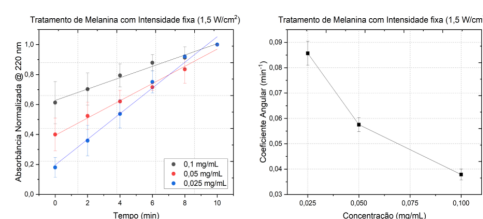


Figura 1: Espectro de Absorção com intensidade constante

Podemos notar então que quanto maior a concentração de nossa solução, menor é a mudança óptica causada pelo ultrassom. Prossequindo, foram realizados novos experimentos mas dessa vez mantendo a concentração da solução constante em $0,05 \text{ mg/mL}$ e variando a intensidade do tratamento. (Figura 2)

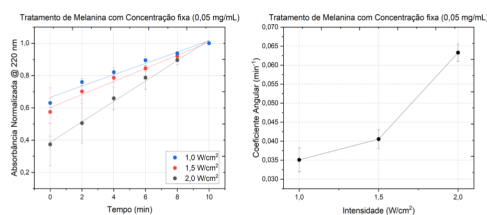


Figura 2: Espectro de Absorção com concentração constante

Nota-se que a intensidade do ultrassom interfere nas mudanças ópticas da solução de modo que, quanto maior a intensidade, maior é a mudança. Buscando compreender o que ocorre quimicamente durante a mudança, foram realizados experimentos utilizando sequestradores de 1O_2 . (Figura 3)

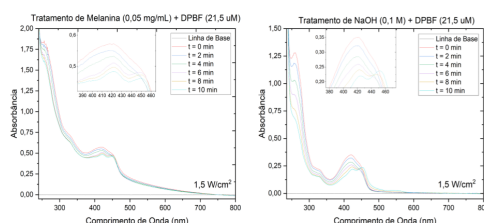


Figura 3: Espectro de absorção de melanina e NaOH com DPBF

Por meio de análise aos gráficos, vemos que a curva de absorção da solução diminui conforme o tratamento evolui temporalmente, o que indica que nosso composto (DPBF) está reagindo com 1O_2 gerado no meio, entretanto um mesmo comportamento foi observado somente com o solvente sendo tratado. (Figura 4)

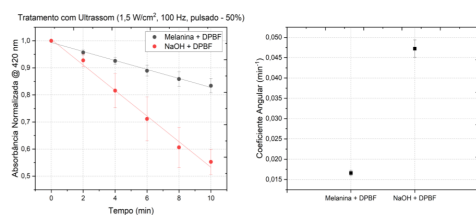


Figura 4: Relação na mudança do perfil de onda de cada solução

Para contar isso, podemos utilizar outras técnicas de medidas de espécies reativas, como a EPR, com o auxílio de um *spin-trap*, o TEMP que medirá a presença do 1O_2 isoladamente.

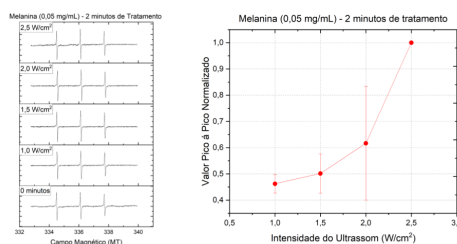


Figura 5: Análise da geração de Oxigênio Singlete por EPR

Desse modo, corroborando com o resultado anterior vemos que há a geração de 1O_2 durante a sonicação de melanina sintética, e a mesma é dependente da intensidade de ultrassom utilizada durante o tratamento. (Figura 5)

Conclusões

A partir dos resultados até então alcançados, é possível inferir algumas discussões. A solução apresentou uma aumento em sua curva de absorbância o que pode significar que houve uma formação de produtos (sonoprodutos), outra evidência para tal afirmação é de que durante todo o tratamento não houve alteração no formato da curva de absorbância, apenas seu deslocamento ascendente. Ademais, notou-se que quanto menor a concentração de melanina, maior é seu aumento de absorção de luz, e para a intensidade, quanto menor for, menor é a mudança aparente. Uma das possibilidades de sonoprodutos são as espécies reativas, alvos de interesse em protocolos de TSD, e por meio de análises espectroscópicas auxiliadas por sequestradores de 1O_2 , observamos que realmente há a formação de tal espécie durante o tratamento empregado.

Referências

- [1] ROSENTHAL, I.; SOSTARIC, J. Z.; RIESZ, P. Sonodynamic therapy: a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, n. 6, p. 349-363, Sept. 2004. DOI 10.1016/j.ultsonch.2004.03.004.

Study of the interaction of Melanin with Low Intensity Ultrasound

Author: Murilo de Oliveira Souza

murilodeoliveira8@usp.br

Collaborator: Erika Toneth Ponce Ayala

eriponce@usp.br

Advisor: Sebastião Prata Vieira

prata@ifsc.usp.br

Institute of Physics of São Carlos / University of São Paulo

Objective

The objective of this project is to study the changes in the optical properties of melanin and the sonochemistry present during the interaction with therapeutic ultrasound (with resonance frequency of 1 to 3 MHz, maximum intensity of 3 W/cm^2 and emission mode of the ultrasound adjustable in continuous or in pulsed), being able at the end of this research, to relate these alterations with the change of the concentration of the melanin and of the parameters of the ultrasound. This research aims to help understand the sonodynamic effects on pigmented tumors during sonodynamic therapy, the subject of recent studies. (1)

Methods and Procedures

Using powdered synthetic melanin dissolved in sodium hydroxide (NaOH, pH = 13.0), various solutions are prepared. Then, each solution is placed in a quartz cuvette with an optical path of 1 cm and taken for optical analysis in a spectrophotometer (Varian Cary 50), so that its absorbance curve is analyzed. Subsequently, each solution undergoes a process of sonication with an ultrasound (SONOPULSE III, Ibramed, Brazil), for approximately two minutes, and its curve is measured again, the process is repeated until the treatment completes 10 minutes. All solutions studied are diluted with different intensities, in this way a more precise quantitative analysis of the results and the influence of each parameter used is possible. Furthermore, to investigate the generation of reactive species, more specifically singlet oxygen (1O_2), chemicals will be used, such as 1,3 - diphenylisobenzofuran (DPBF) that acts

as a sequestering agent for 1O_2 . Finally, several Paramagnetic Resonance Spectroscopy (ERP) graphs will be analyzed, in order to reduce the solvent interference in the collected data and make the analysis more accurate and sensitive, in addition to corroborating the results, and for that a will be used spin-trap, 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol (TEMP), with the function of prolonging the half-life of 1O_2 so that its analysis can be studied .

Results

Initially with measurements spaced 2 minutes apart we can see the following behavior for the solution of melanin in NaOH, keeping the treatment intensity fixed at 1.5 W/cm^2 and varying the concentration of our solution. (Figure 1)

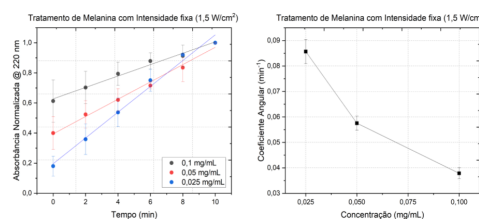


Figure 1: Absorption spectrum with constant intensity

We can then notice that the higher the concentration of our solution, the smaller the optical change caused by the ultrasound. Continuing, new experiments were carried out but this time keeping the solution concentration constant at 0.05 mg/mL and varying the intensity of the treatment. (Figure 2)

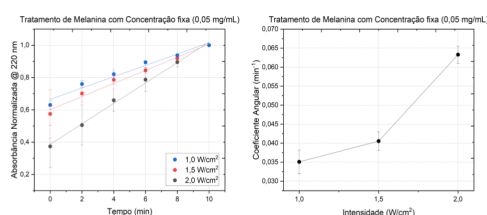


Figure 2: Absorption spectrum with constant concentration

Note that the intensity of the ultrasound interferes with the optical changes of the solution, so that the greater the intensity, the greater the change. Seeking to understand what happens chemically during the change, experiments were carried out using 1O_2 hijackers. (Figure 3)

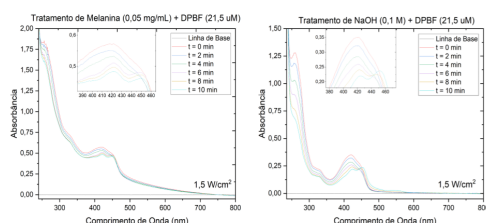


Figure 3: Melanin and NaOH absorption spectrum with DPBF

By analyzing the graphs, we see that the absorption curve of the solution decreases as the treatment evolves over time, which indicates that our compound (DPBF) is reacting with 1O_2 generated in the middle, however a same behavior was observed only with the solvent being treated. (Figure 4)

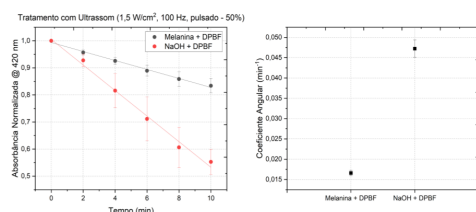


Figure 4: Relationship in changing the wave profile of each solution

To get around this, we can use other techniques for measuring reactive species, such as EPR, with the help of a *spin-trap*, the TEMP that will measure the presence of 1O_2 .

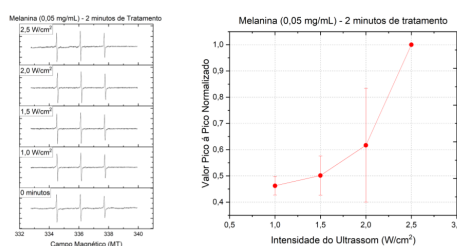


Figure 5: Analysis of Singlet Oxygen Generation by EPR

Thus, corroborating the previous result, we see that there is a generation of 1O_2 during the sonication of synthetic melanin, and it is dependent on the ultrasound intensity used during the treatment. (Figure 5)

Conclusions

From the results achieved so far, it is possible to infer some discussions. The solution showed an increase in its absorbance curve, which may mean that there was a formation of products (sound products), another evidence for this statement is that during the entire treatment there was no change in the shape of the absorbance curve, only its upward shift. Furthermore, it was noted that the lower the melanin concentration, the greater the increase in light absorption, and for the intensity, the lower it is, the smaller the apparent change. One of the possibilities of sonoproducts is the reactive species, targets of interest in Sonodynamic therapy protocols, and through spectroscopic analysis aided by 1O_2 kidnappers, we observed that there is indeed the formation of such a species during the treatment employed.

References

- [1] ROSENTHAL, I.; SOSTARIC, J. Z.; RIESZ, P. Sonodynamic therapy: a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, n. 6, p. 349-363, Sept. 2004. DOI 10.1016/j.ultsonch.2004.03.004.