

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENGENHARIA
CAMPUS SÃO PAULO**

ROSIMARI MARIANO DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA RAZÃO DÍMERO/MONÔMERO NAS
FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE AZUL DE METILENO
EMPREGADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

**ASSESSMENT OF THE DIMER-TO-MONOMER RATIO IN
COMMERCIAL METHYLENE BLUE FORMULATIONS FOR
ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY**

São Paulo – SP

2024

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENGENHARIA

ROSIMARI MARIANO DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA RAZÃO DÍMERO/MONÔMERO NAS
FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE AZUL DE METILENO
EMPREGADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Profa. Dra. Silvia Cristina Nunez
Orientador(a)

São Paulo – SP
2024



Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

C217a CAMPOS, Rosimari Mariano de.

Avaliação da razão dímero/monômero nas formulações comerciais de Azul de Metileno empregados na terapia fotodinâmica antimicrobiana / Rosimari Mariano de Campos -- São Paulo: Universidade Brasil, 2025.
34 f. il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Bioengenharia da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Silvia Cristina Nunez.

1. Fotossensibilizador. 2. Terapias antimicrobianas. 3. Infecção oral. 4. Resistência microbiana. I. Nunez, Silvia Cristina. II. Título.

CDD 620.82



TERMO DE APROVAÇÃO

ROSIMARI MARIANO DE CAMPOS

“AVALIAÇÃO DA RAZÃO DÍMERO/MONÔMERO NAS FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE AZUL DE METILENO EMPREGADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA.”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Membros da banca:

Orientador(a): Silvia Cristina Nunez

Membro interno: Waleska Gardesani


Membro externo: Aguinaldo Silva Garcez Segundo

Orientador(a): Silvia Cristina Nunez



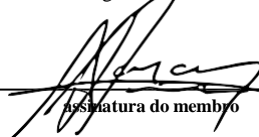
assinatura do membro

Membro interno: Waleska Gardesani
Documento assinado digitalmente

 WALESKA KERLLEN MARTINS GARDESANI
Data: 16/12/2024 16:50:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

assinatura do membro

Membro externo: Aguinaldo Silva Garcez Segundo



assinatura do membro

Houve alteração do título da dissertação?

() Sim

(x) Não

São Paulo, 16 de dezembro de 2024

Presidente da Banca: Silvia Cristina Nunez

ATA DA APRESENTAÇÃO PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO

Ata 913

Aos 16 de dezembro de 2024, às 14:00 horas, reuniram-se os membros da Banca Examinadora, composta por: Silvia Cristina Nunez (presidente-orientador(a)), Waleska Gardesani (membro interno), Aguinaldo Silva Garcez Segundo (membro externo), banca aprovada pelo Coordenador do curso de Mestrado Profissional em Bioengenharia, a fim de arguirm o(a) mestrando(a) ROSIMARI MARIANO DE CAMPOS, Matrícula: 1812806-6, sobre sua dissertação, intitulada **AVALIAÇÃO DA RAZÃO DÍMERO/MONÔMERO NAS FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE AZUL DE METILENO EMPREGADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA.**

Aberta a sessão pelo presidente, coube ao(à) candidato(a), na forma regimental, expor o tema de sua dissertação, dentro do tempo regulamentar, sendo em seguida questionado(a) pelos membros da Banca Examinadora, apresentando as explicações necessárias.

Desta forma, os conceitos atribuídos pelos membros da Banca Examinadora são os que seguem: Silvia Cristina Nunez (presidente-orientador(a)): “_Aprovada_”; Waleska Gardesani (membro interno): “_Aprovada_”; Aguinaldo Silva Garcez Segundo (membro externo): “_Aprovada_”.

Sendo o conceito final “_Aprovada_”.

Com base no resultado do exame, o(a) aluno(a) fará jus ao título de **MESTRE em Bioengenharia** após efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e a correspondente homologação.

Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão às 16_h_20_min, e foi lavrada a presente ata, sendo assinada pelos membros da Banca Examinadora e, por mim, Nayara de Souza Barreto.

Banca Examinadora

Orientador(a): Silvia Cristina Nunez

assinatura do membro

Membro interno: Waleska Gardesani

Documento assinado digitalmente
 WALESKA KERLLEN MARTINS GARDESANI
Data: 16/12/2024 16:51:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

assinatura do membro



UNIVERSIDADE
BRASIL

Membro externo: Aginaldo Silva Garcez Segundo



Assinatura do membro



TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

INTITULADO: AVALIAÇÃO DA RAZÃO DÍMERO/MONÔMERO NAS FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE AZUL DE METILENO EMPREGADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA

Houve alteração do título da dissertação?

- Sim
 Não

Autores

Discente: Rosimari Mariano de Campos

Orientador(a): Sílvia Cristina Nunez

assinatura do membro



RESUMO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem sido amplamente investigada na odontologia como uma abordagem eficaz para o tratamento de infecções localizadas, incluindo infecções periodontais e endodônticas. Dentre os fotossensibilizadores (FS) disponíveis, o azul de metileno (AM) destaca-se como uma opção amplamente reconhecida na literatura científica devido à sua eficiência fotodinâmica. Essa eficiência, no entanto, está diretamente relacionada à proporção entre as formas dímera e monomérica do AM, cuja dinâmica é significativamente influenciada pelas interações iônicas presentes na solução, impactando o desempenho do FS em aplicações fotodinâmicas. Este estudo utilizou métodos espectroscópicos para avaliar diferentes formulações comerciais de AM destinadas à aPDT em odontologia, comparando-as com o AM de grau analítico. Foram analisadas formulações em diversas apresentações comerciais, como solução líquida, gel, pirulito e solução aquosa preparada em laboratório. As concentrações investigadas variaram de 0,005% (p/v) a 0,01% (m/v), correspondendo a 156,3 μM e 312,5 μM , respectivamente. Os resultados revelaram variações espectroscópicas significativas em relação à formulação padrão de AM de grau analítico, com uma tendência marcante de predominância da forma dímera em quase todas as formulações comerciais avaliadas. Essa predominância da forma dimérica sugere um favorecimento das reações fotoquímicas do tipo I, que podem ser especialmente relevantes para a eficácia antimicrobiana. Assim, o estudo enfatiza a importância de otimizar as formulações comerciais de AM para maximizar sua eficiência clínica em aPDT, especialmente em cenários onde a resistência a antibióticos apresenta desafios significativos. Além disso, os resultados contribuem para o avanço na identificação de formulações mais eficazes, com o potencial de ampliar o arsenal terapêutico disponível para o manejo de infecções odontológicas, destacando-se como uma alternativa promissora no contexto de tratamentos antimicrobianos.

Palavras-chave: Fotossensibilizador. Terapias antimicrobianas. Infecção oral. Resistência microbiana.



ABSTRACT

Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) has been extensively studied in dentistry as an effective approach for treating localized infections, including periodontal and endodontic infections. Among the available photosensitizers (PS), methylene blue (MB) stands out as a widely recognized option in scientific literature due to its photodynamic efficiency. This efficiency, however, is directly influenced by the proportion of dimeric and monomeric forms of MB, which are significantly affected by the ionic interactions present in the solution, thereby impacting the PS's performance in photodynamic applications. This study employed spectroscopic methods to evaluate different commercial formulations of MB intended for aPDT in dentistry, comparing them with analytical-grade MB. The analyzed formulations included various commercial presentations, such as liquid solution, gel, lollipop, and laboratory-prepared aqueous solution. The investigated concentrations ranged from 0.005% (w/v) to 0.01% (w/v), corresponding to 156.3 μM and 312.5 μM , respectively. The results revealed significant spectroscopic variations compared to the analytical-grade MB standard, with a marked trend toward the predominance of the dimeric form in almost all evaluated commercial formulations. This predominance of the dimeric form suggests a favoring of Type I photochemical reactions, which may be particularly relevant for antimicrobial efficacy. The study highlights the importance of optimizing commercial MB formulations to maximize their clinical efficiency in aPDT, especially in scenarios where antibiotic resistance poses significant challenges. Furthermore, the findings contribute to the advancement of identifying more effective formulations, offering a promising alternative for managing dental infections and expanding the therapeutic arsenal available for antimicrobial treatments.

Keywords: Photosensitizer. Antimicrobial therapies. Oral infection. Microbial resistance.



DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

O estudo avaliou diferentes produtos comerciais de azul de metileno, um corante usado em tratamentos que combinam luz e substâncias químicas para combater infecções causadas por bactérias. Testamos produtos como soluções líquidas, géis e outras formas, comparando-os a uma fórmula de referência feita em laboratório. Os resultados indicaram que, na maioria dos produtos comerciais, o azul de metileno tende a formar grupos de partículas, conhecidos como dímeros. Essa formação pode alterar o efeito fotoquímico no tratamento e, portanto, testes devem ser realizados com bactérias e fungos para avaliar se os produtos comerciais são tão eficientes quanto os de referência. A pesquisa contribui para a escolha de produtos mais adequados para tratamentos em áreas como a odontologia, especialmente em situações em que os antibióticos tradicionais podem não funcionar bem. Uma vez que o impacto dessas formulações na prática clínica é significativo, pois formulações inadequadas podem comprometer a eficiência do tratamento ou gerar efeitos colaterais indesejados. Assim, este estudo reforça a necessidade de padronização e desenvolvimento de formulações comerciais otimizadas para aPDT, promovendo tratamentos antimicrobianos mais eficazes e seguros, especialmente diante do crescente problema da resistência a antibióticos. A identificação de formulações comerciais que favoreçam o equilíbrio adequado entre dímeros e monômeros pode representar um avanço importante na aplicação clínica da aPDT.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das reações Tipo I e Tipo II.	14
Figura 2 – Diagrama de Jablonski modificado. S_0 : estado fundamental singleto, S_1 : primeiro estado excitado singleto, F: fluorescência, CIS: cruzamento intersistemas, T_1 : primeiro estado excitado tripleto, Fos: fosforescência, Fs: fotossensibilizador, sub: substrato.....	15
Figura 3 – Produtos comerciais à base de azul de metileno (AM) para aPDT.....	17
Figura 4 – Dissolução do produto Doctive em formato de pirulito contendo azul de metileno (AM).....	18
Figura 5 – Espectros de absorção de azul de metileno puro (0,01%) e diluído (0,005%).....	20
Figura 6 – Espectros de absorção das formulações Chimiolux 0,005% (líquido) e Chimiolux gel 0,01%.....	21
Figura 7 – Espectros de absorção das formulações Evilux 0,005% (líquido) e Evilux gel 0,005%.....	21
Figura 8 – Espectros de absorção das formulações Lenza Farm gel 0,005% e Lenza Farm 0,005% (líquido).....	22
Figura 9 – Espectros de absorção de azul de metileno nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M.....	22
Figura 10 – Espectro de absorção do azul de metileno na formulação em pirulito (Pirulito AM).....	23
Figura 11 – Comparação dos espectros de absorção das formulações Metileno Puro 0,01%, Chimiolux gel 0,01% e Pirulito AM.....	24
Figura 12 – Espectros de absorção das formulações Azul de metileno 0,005%, Chimiolux 0,005%, Lenza Farm gel 0,005%, Evilux 0,005%, Evilux gel 0,005% e Lenza Farm 0,005%.....	26



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Equivalência de concentrações utilizadas no estudo.....	18
Tabela 2 – Cálculo da razão Dímero/monômero.....	27



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5 CONCLUSÃO.	30
REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem se estabelecido como uma alternativa eficaz e promissora no combate a infecções microbianas, sobretudo em um contexto de crescente resistência aos antibióticos convencionais (NUÑEZ et al., 2016; BOURBOUR et al., 2024; CARDOZO et al., 2024).

Essa modalidade terapêutica combina a interação entre um fotossensibilizador, luz de comprimento de onda específico e oxigênio molecular, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), capazes de induzir danos oxidativos e morte celular em microrganismos (KLAUSEN et al., 2020).

As reações fotodinâmicas podem ser classificadas como do Tipo I ou Tipo II, dependendo da interação do fotossensibilizador com o meio. A Figura 1 apresenta o esquema clássico dos tipos de reação envolvidos com a PDT (NUÑEZ et al., 2016).

Figura 1 – Representação esquemática das reações Tipo I e II

Reações Fotodinâmicas - Tipo I	Reações Fotodinâmicas - Tipo II
1. Fotoexcitação do Fotossensibilizador (FS): $FS + Luz \rightarrow FS^*$ (Estado Excitado)	1. Fotoexcitação do Fotossensibilizador (FS): $FS + Luz \rightarrow FS^*$ (Estado Excitado)
2. Interação com Biomoléculas: $FS^* + Biomolécula \rightarrow FS^{\bullet-} + Biomolécula^{\bullet+}$	2. Transferência de Energia para o Oxigênio Molecular: $FS^* + O_2 \text{ (Triplete)} \rightarrow FS + O_2 \text{ (Singlete)}$
3. Produção de Radicais Livres: $Biomolécula^{\bullet+} \text{ ou } FS^{\bullet-} + O_2 \rightarrow ROS \text{ (Radicais Livres)}$	3. Produção de Oxigênio Singlete: $O_2 \text{ (Singlete)} \rightarrow \text{Dano Oxidativo às Biomoléculas}$
4. Danos Celulares: $ROS \rightarrow \text{Dano Oxidativo às Biomoléculas (lipídios, proteínas, DNA)}$	

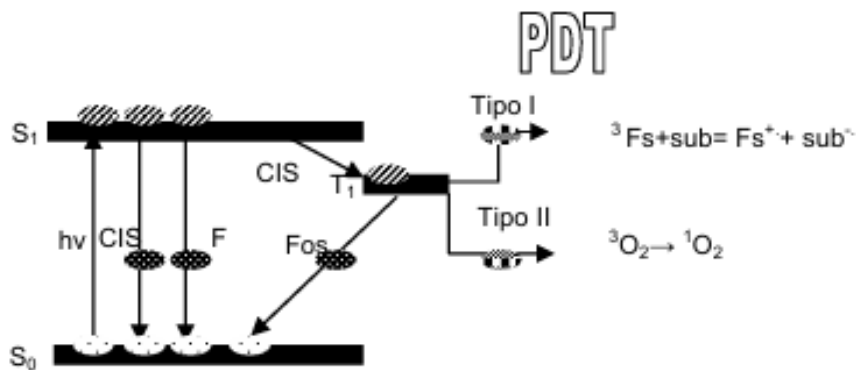
Resumo Comparativo:

- Tipo I: Produção de radicais livres (ex.: superóxido e hidroxila).
- Tipo II: Produção de oxigênio singlete.

Fonte: Próprio autor

Essas reações também podem ser ilustradas de forma clara por meio do diagrama de Jablonski, que descreve as transições eletrônicas envolvidas na geração de ROS, conforme mencionado por Nuñez et al. (2016).

Figura 2 – Diagrama de Jablonski modificado. S_0 : estado fundamental singleto, S_1 : primeiro estado excitado singleto, F: fluorescência, CIS: cruzamento intersistemas, T_1 : primeiro estado excitado tripleto, Fos: fosforescência, F_s : fotossensibilizador, sub: substrato.



Fonte. Nuñez et al. 2016

Entre os fotossensibilizadores utilizados, o azul de metileno (AM) destaca-se devido à sua elevada eficiência fotodinâmica, baixa toxicidade sistêmica e custo acessível, sendo amplamente investigado tanto em estudos laboratoriais quanto clínicos (NUÑEZ et al., 2016; BOLTES CECATTO et al., 2020).

Assim, o desempenho antimicrobiano do AM na aPDT é significativamente influenciado por suas propriedades físico-químicas, como o estado de agregação molecular e a composição da formulação. Posto que em soluções de alta força iônica, a forma dimérica do AM tende a predominar, redirecionando a reação para mecanismos fotodinâmicos do Tipo I, menos eficientes na geração de oxigênio singleto em comparação aos mecanismos do Tipo II, predominantes na forma monomérica (NUÑEZ et al., 2015).

Nesse contexto, estudos clínicos e laboratoriais têm evidenciado que a dimerização do AM pode ser influenciada por variáveis como pH, força iônica e presença de excipientes (KNORST et al., 2019). Posto que esses fatores alteram o balanço entre monômeros e dímeros, modulando a eficiência da geração de ROS (NUÑEZ et al., 2016).

Estudos recentes indicam que formulações comerciais de AM, como géis, soluções líquidas e pirulitos, apresentam diferenças espectroscópicas significativas que podem impactar sua aplicação clínica. Assim, é necessário ainda explorar o registro dessas formulações junto à ANVISA e seu impacto na farmacoeconomia, pois a escolha adequada do produto é fundamental para o sucesso terapêutico (VALKOV et al., 2021).

Além disso, é importante destacar que o AM pode existir em diferentes formas moleculares, principalmente como monômeros e dímeros. Na forma monomérica, o AM apresenta uma banda de absorção em torno de 664 nm, enquanto na forma dimérica, essa banda desloca-se para cerca de 590 nm. Já a concentração do AM influencia diretamente esse estado, com concentrações mais altas favorecendo a forma dimérica, o que pode comprometer a eficiência fotodinâmica (KNORST et al., 2019). Dentro dessa premissa, estudos comparativos entre monômeros e dímeros são essenciais para compreender a geração de oxigênio singlete e sua relevância clínica ((FILIPINI et al., 2019; FRANCO; PERALTA-VIDEA; GASPARI, 2020; LIM, 2021).

Assim, a otimização das formulações comerciais de AM é crucial para potencializar sua aplicação em aPDT. A incorporação de ureia ou outros aditivos pode reduzir a agregação molecular, aumentando a geração de oxigênio singlete (NUÑEZ et al., 2015; KLAUSEN et al., 2020). Ademais, há oportunidades para integrações tecnológicas, como o uso de matrizes nanoestruturadas, que permitem maior controle sobre a liberação do fotossensibilizador (FILIPINI et al., 2019; FRANCO; PERALTA-VIDEA; GASPARI, 2020; LIM, 2021).

Por fim, é imperativo que estudos futuros investiguem não apenas a estabilidade molecular, mas também a eficácia microbiológica das formulações de AM, considerando a relação dímero/monômero e seu impacto na geração de ROS e nos desfechos clínicos (KNORST et al., 2019; BOURBOUR et al., 202;).

2 OBJETIVOS

Avaliar as características espectroscópicas das soluções comerciais de azul de metileno empregados na terapia fotodinâmica antimicrobiana

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a concentração de azul de metileno nas formulações comerciais ofertadas para emprego em Odontologia;
- Realizar a verificação da razão dímero/monômero para cada formulação avaliada e para as soluções padrão utilizadas como padrão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo realizou uma análise espectroscópica de diferentes formulações comerciais de azul de metileno (AM), amplamente utilizadas em aplicações odontológicas e na aPDT (Fig.3) e aprovados pela ANVISA. As formulações avaliadas incluíram:

- Evilux gel 0,005% (p/v) (Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil);
- Evilux líquido 0,005% (Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil);
- Chimiolux gel 0,01% (DMC, São Carlos, Brasil);
- Chimiolux líquido 0,005% (DMC, São Carlos, Brasil);
- Azul de metileno 0,005% líquido (Lenzafarm, Belo Horizonte, Brasil);
- Azul de metileno 0,005% gel (Lenzafarm, Belo Horizonte, Brasil);
- Azul de metileno em pirulito 0,01% (Doctive, Taubaté, Brasil).

Figura 3 – Produtos comerciais a base de AM para aPDT



Fonte: Próprio autor

Adicionalmente, foram preparadas soluções de AM em água destilada, nas concentrações de 0,005% e 0,01% (m/v), e soluções padrão nas concentrações molares de 50 μM e 100 μM que representam as mais utilizadas em estudos *in vitro* de aPDT. Para as soluções padrão, utilizou-se azul de metileno analítico (Sigma-Aldrich, Brasil) como referência para análise comparativa.

Para facilitar a comparação entre as soluções a Tabela 1 apresenta a equivalência entre as concentrações de % e molares.

Tabela 1 – Equivalência de concentrações utilizadas no estudo

Concentração % (m/v)	Concentração mola (μM)	Quantidade e AM (mg/mL)
0,001	31,26	0,01
0,0025	78,16	0,025
0,005	156,3	0,05
0,01	312,26	0,1

Peso molecular do AM: 319,85 g/mol

Fonte: Próprio autor

Procedimentos Experimentais

O pirulito contendo azul de metileno (0,01%) foi dissolvido em 25 mL de saliva artificial Kin Hidrat (Kin, Brasil), mantido em contato por 30 minutos para simular as condições de utilização clínica. Após esse período, a solução resultante foi analisada espectroscopicamente (Fig.4).

Figura 4 – Dissolução do produto Doctive como pirulito de AM



Fonte: Próprio autor

As análises espectroscópicas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro Jasco V-730 (Jasco, Japão), configurado para realizar varredura espectral no intervalo de 400 a 900 nm. Para garantir a precisão e a reprodutibilidade das medições, as leituras foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm.

Análise dos Espectros

Os espectros de absorção obtidos para cada formulação e solução padrão foram processados e analisados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA). Foram calculadas as razões entre as bandas de absorção associadas à forma dímera e monomérica do azul de metileno de acordo com a fórmula:

$$R \frac{D}{M} = \text{abs } 610\text{nm} \div \text{abs } 660\text{nm}$$

Legenda: R=Razão; D=dímero; M=monômero

A relação dímero/monômero foi utilizada como parâmetro para avaliar a agregação molecular nas diferentes formulações, considerando que essa característica pode influenciar a eficiência fotodinâmica do azul de metileno (NUÑEZ et al., 2015; KLAUSEN et al., 2020).

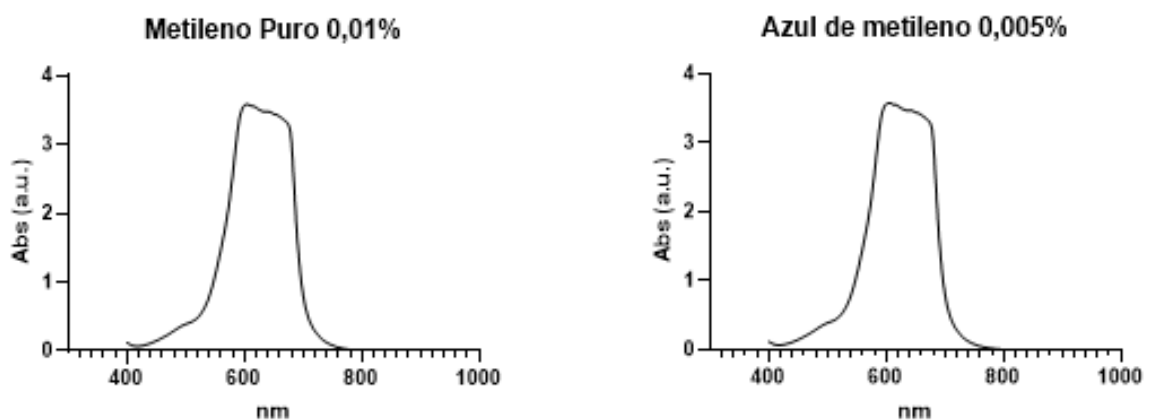
Preparação e Controle de Qualidade das Amostras

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes das análises, utilizando técnicas assépticas e reagentes de grau analítico. As concentrações foram rigorosamente calculadas para garantir a reprodutibilidade dos resultados. A saliva artificial utilizada para a dissolução do pirulito foi preparada conforme as recomendações do fabricante, garantindo o pH e a composição iônica adequados para simular condições bucais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

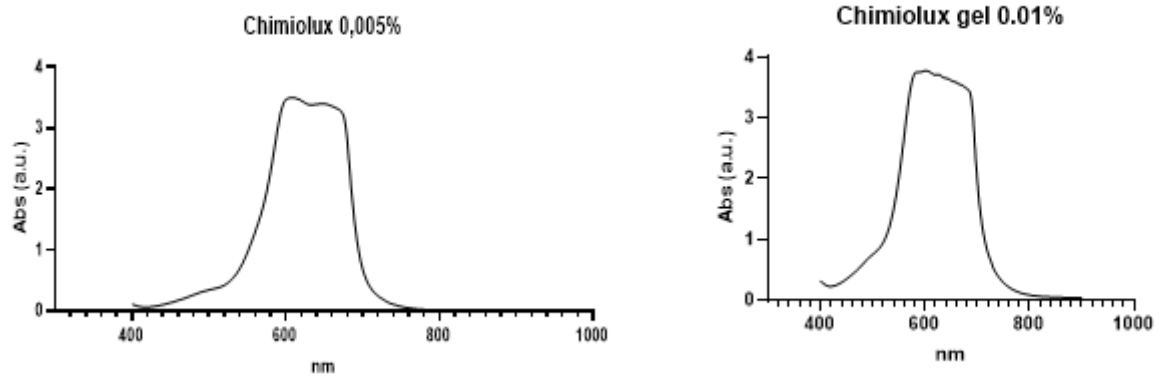
Os espectros de absorção das soluções de AM (0,01%) e diluído (0,005%) indicam um perfil consistente em ambos os casos, com um pico de absorção em torno de 664 nm, correspondente à configuração monomérica da molécula (Figura 5). No entanto, a intensidade relativa sugere que a concentração mais alta (0,01%) apresenta maior absorbância, o que pode favorecer a eficiência fotodinâmica em protocolos clínicos específicos. Em relação ao perfil do espectro do AM (0,005%), é verificado um deslocamento do pico para o azul, indicando dimerização em 590 nm.

Figura 5. Espectros de absorção de azul de metileno puro (0,01%) e diluído (0,005%). O pico em 664 nm representa a configuração monomérica, com variações na intensidade conforme a concentração.



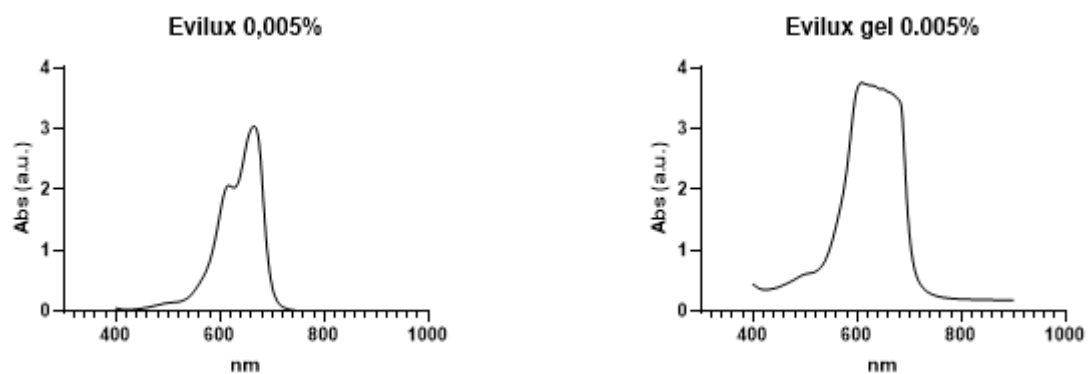
Os espectros das formulações Chimiolux 0,005% e Chimiolux gel 0,01% (Figura 6) mostram diferenças na intensidade de absorção, indicando a predominância de monômeros em ambas as concentrações. Também é observado que o perfil do espectro é distinto, com maior deslocamento para o azul, iniciando maior dimerização do AM (590 nm) para o chimiolux gel a 0,01%, em relação ao líquido (0,005%).

Figura 6. Espectros de absorção das formulações Chimiolux 0,005% (líquido) e Chimiolux gel 0,01%. O pico indica predominância de monômeros.



Os espectros de absorção das formulações Evilux 0,005% (líquido) e Evilux gel 0,005% apresentam um perfil monomérico predominante, O Evilux líquido apresenta um deslocamento do pico indicando maior quantidade de monômeros. Ao contrário do gel (Figura 7).

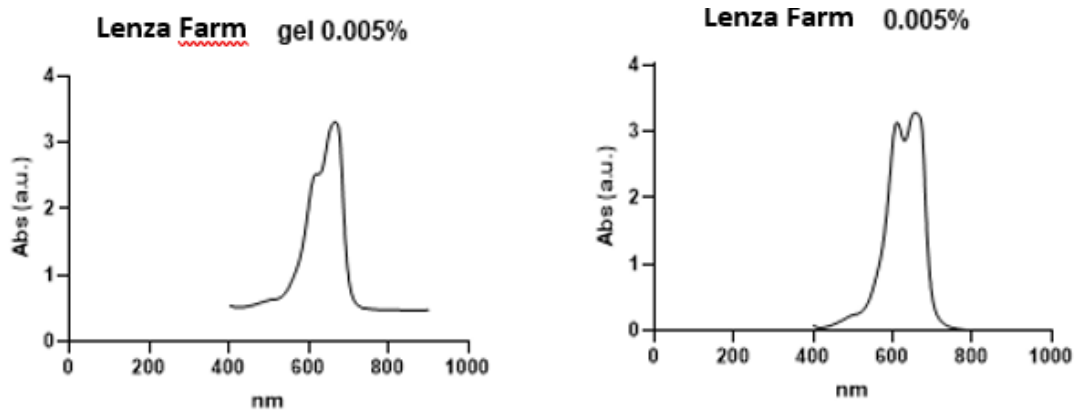
Figura 7. Espectros de absorção das formulações Evilux 0,005% (líquido) e Evilux gel 0,005%.



Os espectros de absorção das formulações Lenza Farm gel 0,005% e Lenza Farm 0,005% (líquido) evidenciam um comportamento distinto em relação às outras formulações analisadas. Ambos os espectros apresentam picos, confirmando

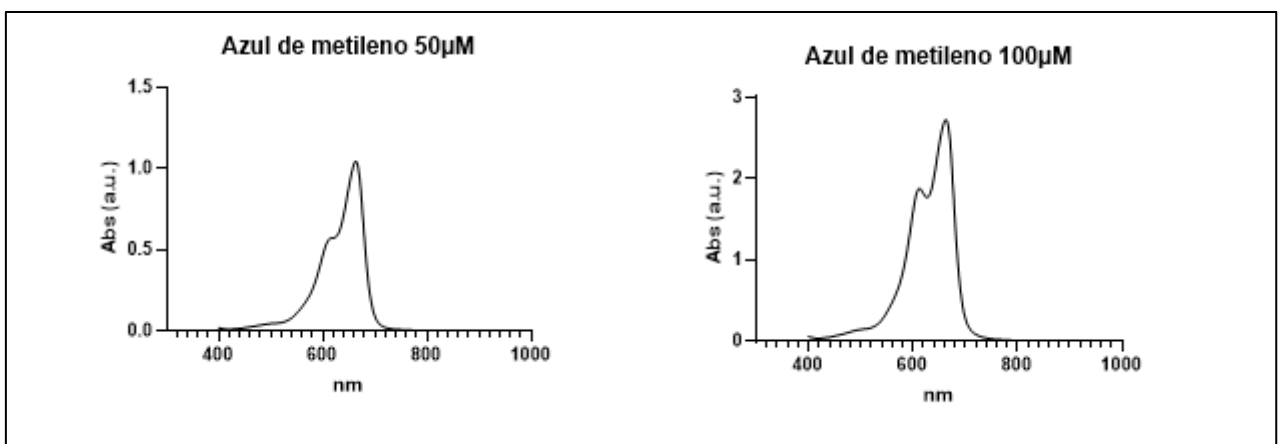
a predominância de monômeros, mas com diferenças na intensidade de absorção (Figura 8).

Figura 8. Espectros de absorção das formulações Lenza Farm gel 0,005% e Lenza Farm 0,005% (líquido).



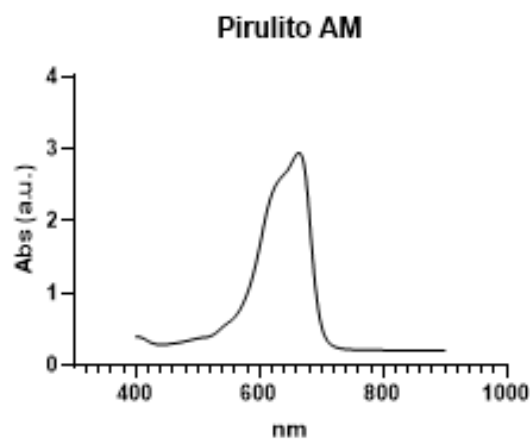
Os espectros de absorção das soluções de azul de metileno nas concentrações de 50 μM e 100 μM indicam um comportamento similar em relação à predominância de monômeros, com picos centrados em torno de 664 nm. No entanto, a intensidade de absorção na concentração de 100 μM é significativamente maior (Figura 9).

Figura 9. Espectros de absorção de azul de metileno nas concentrações de 50 μM e 100 μM . O pico evidencia a predominância de monômeros, com maior intensidade na concentração de 100 μM .



O espectro de absorção da formulação em formato de pirulito contendo azul de metileno (Pirulito AM -0,01%) apresentou um pico bem definido, característico da predominância de monômeros. A intensidade de absorção foi relativamente elevada (Figura 10).

Figura 10. Espectro de absorção do azul de metileno na formulação em pirulito (Pirulito AM 0,01% - Doctive).



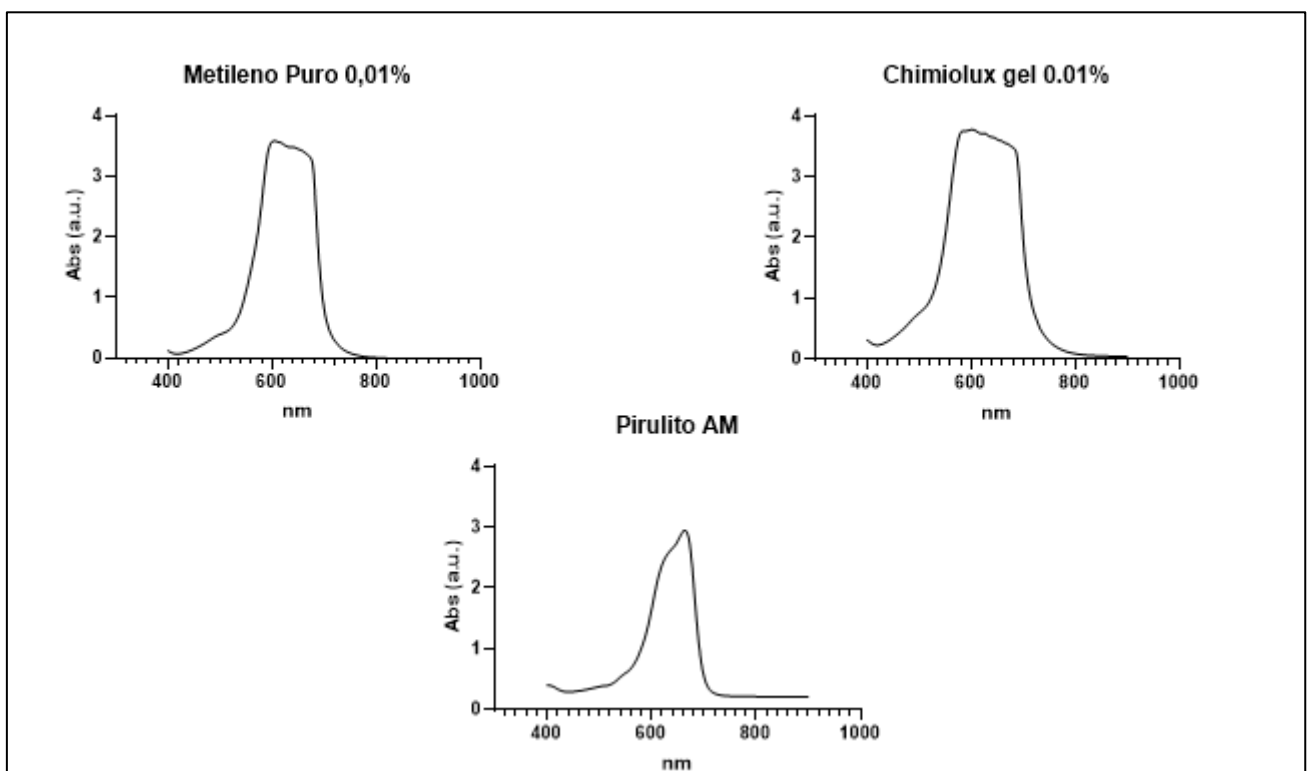
A comparação dos espectros de absorção das formulações Metileno Puro 0,01%, Chimiolux gel 0,01% e Pirulito AM (0,01%) evidencia diferenças significativas na densidade óptica, embora todas apresentem o pico característico em torno de 664 nm, indicando predominância de monômeros em todas as formulações (Figura 11)

1. **Metileno Puro 0,01%:** Apresenta o maior pico de absorção, refletindo alta densidade monomérica e estabilidade molecular. Isso confirma sua eficiência potencial na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

2. **Chimiolux gel 0,01%:** Demonstrou uma densidade óptica ligeiramente inferior ao metileno puro, mas ainda considerável. A base em gel pode contribuir para uma maior estabilidade molecular em comparação com formulações líquidas.

3. **Pirulito AM:** Apresenta uma intensidade de absorção menor que as outras formulações analisadas. Apesar disso, mantém a predominância de monômeros, mostrando-se promissora, especialmente em aplicações diferenciadas como formulações pediátricas ou odontológicas.

Figura 11. Comparação dos espectros de absorção das formulações Metileno Puro 0,01%, Chimiolux gel 0,01% e Pirulito AM (0,01%). Os espectros deslocam para azul, indicando dímero para ambos AM e Chomolux. Já o pirulito há uma tendência maior para 660 nm.

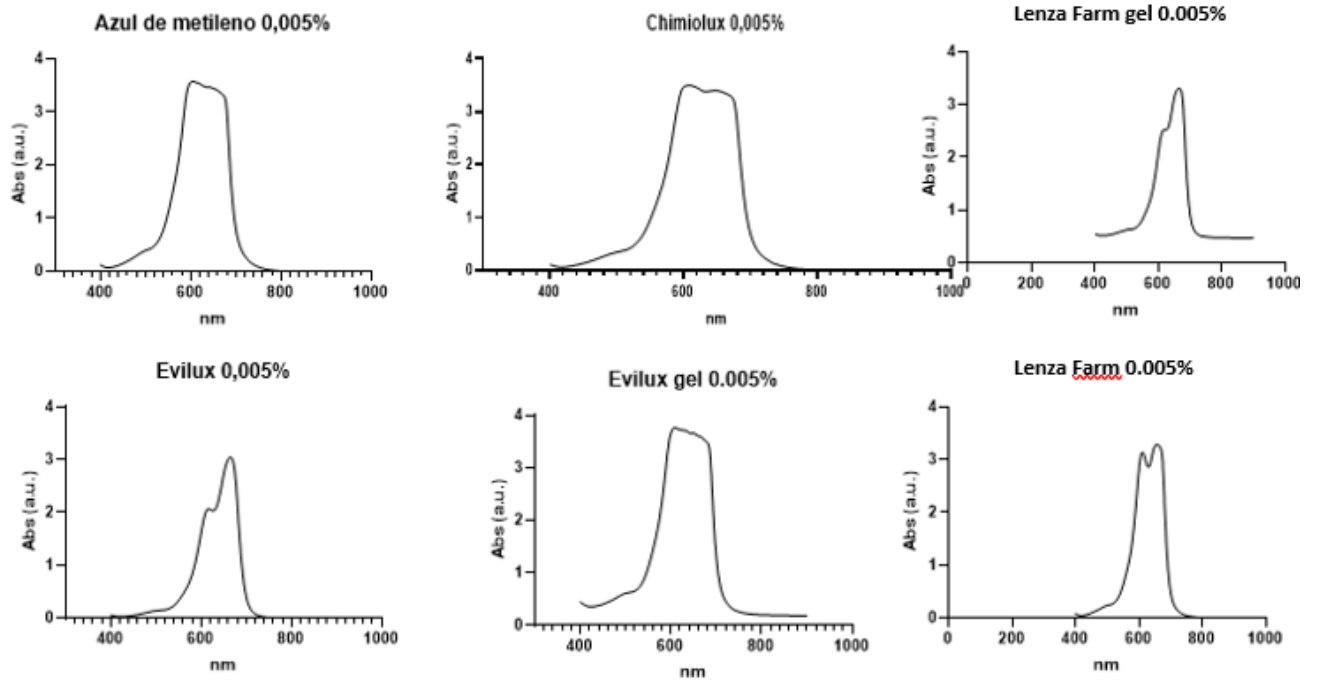


A análise comparativa dos espectros de absorção das diferentes formulações de azul de metileno na concentração de 0,005% mostra uma clara variação na densidade óptica e no perfil espectral entre as amostras. Todas as formulações apresentam o pico característico em torno de 664 nm, indicando predominância de monômeros, mas com intensidades variadas (Figura 12).

1. **Azul de metileno 0,005%:** Apresenta um perfil espectral típico, com absorvância moderada no pico de 664 nm, refletindo boa estabilidade molecular.

2. **Chimiolux 0,005%:** Apresenta intensidade ligeiramente inferior no pico de 664 nm, indicando uma menor densidade monomérica, o que pode impactar sua eficiência fotodinâmica.
3. **Lenza Farm gel 0,005%:** Demonstra maior absorvância entre as formulações analisadas, destacando-se pela estabilidade molecular e alto potencial fotodinâmico na concentração testada.
4. **Evilux 0,005%:** Exibe um perfil estável, com um pico bem definido em 664 nm, mas com absorvância menor que o Lenza Farm gel, o que pode indicar uma menor eficiência.
5. **Evilux gel 0,005%:** Apresenta maior intensidade no pico em relação à formulação líquida (Evilux 0,005%), sugerindo que a base gel confere maior estabilidade molecular e melhor desempenho.
6. **Lenza Farm 0,005% (líquido):** Possui menor intensidade de absorvância em comparação à sua versão em gel, mas mantém o pico característico em 664 nm.

Figura 12. Espectros de absorção das formulações Azul de metileno 0,005%, Chimiolux 0,005%, Lenza Farm gel 0,005%, Evilux 0,005%, Evilux gel 0,005% e Lenza Farm 0,005%. O pico em 664 nm reflete a predominância de monômeros, com maior absorvância observada no Lenza Farm gel.



O cálculo da razão dímero monômero para cada solução é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Cálculo da razão Dímero/monômero

Produto	Razão calculada	Tendência	concentração
AM LenzaFarm 0,005% líquido	0,95	<i>indefinida</i>	-
AM LenzaFarm 0,005% gel	0,77	<i>m</i>	↑ diluição
Chimiolux líquido 0,005%	1,02	<i>d</i>	↑ []
Chimiolux gel 0,01%	1,03	<i>d</i>	↑ []
Evilux líquido 0,005%	0,68	<i>m</i>	↑ diluição
Evilux gel 0,005%	1,02	<i>d</i>	↑ []
Doctive pirulito 0.01%	0,81	<i>m</i>	↑ diluição
AM referencia 0,005%	1,05	<i>d</i>	↑ []
AM referencia 0,01%	1,05	<i>d</i>	↑ []
AM 50µM (0,005%)	0,52	<i>d</i>	↑ []
AM 100µM (0,01%)	0,68	<i>d</i>	↑ []

Fonte: Próprio autor

Legenda: m=Monômero; d= dímero; []=concentração.

DISCUSSÃO

O estudo apresentado investigou as propriedades espectroscópicas de diferentes formulações de azul de metileno (AM), incluindo formulações comerciais (Evilux, Chimiolux e Doctive em formato de pirulito) e magistral (gel e solução líquida), em concentrações de 0,005% e 0,01%.

Essa análise permitiu identificar variáveis críticas que influenciam a eficiência do AM na Terapia Fotodinâmica (TFD), considerando fatores como matriz, concentração e formato. Os resultados obtidos fornecem um panorama abrangente sobre o desempenho dessas formulações e sua aplicabilidade clínica.

As formulações avaliadas apresentaram espectros de absorção com picos bem definidos em 664 nm, correspondentes à predominância de monômeros, confirmando a adequação do AM como fotossensibilizador. A configuração monomérica é essencial para a geração eficiente de oxigênio singlete, que desempenha papel central na inativação de patógenos, como destacado por Severino et al. (2003) e Redmond (1999). Nesse contexto, a formação e a estabilidade dos monômeros tornam-se fatores determinantes para a eficácia fotodinâmica do AM.

Entre as formulações avaliadas, as matrizes em gel, como Lenza Farm e Evilux, apresentaram superioridade em termos de estabilidade molecular e absorção monomérica quando comparadas às soluções líquidas.

Assim, a maior intensidade de absorção observada nas formulações em gel pode ser atribuída à maior viscosidade da matriz, que minimiza a formação de dímeros e agregados moleculares, conforme apontado por Severino et al. (2003) e Núñez (2007). Esses resultados destacam que a escolha da matriz é crucial para otimizar o desempenho do AM na TFD.

As concentrações de 0,005% e 0,01% demonstraram, com a maior concentração apresentando superioridade em termos de densidade óptica. No entanto, como discutido por Tardivo et al. (2004), concentrações mais elevadas podem induzir agregação molecular, reduzindo a eficácia fotodinâmica.

No presente estudo, as formulações em gel se mostraram mais resilientes a esse efeito, sugerindo que a matriz em gel pode atuar como uma solução para

equilibrar alta densidade óptica e estabilidade molecular, como também discutido por Lima et al. (2004).

Entre as formulações comerciais, Evilux demonstrou maior consistência nos resultados, enquanto Chimiolux apresentou maior razão dímero/monômero, refletindo variações na composição. Esses achados estão alinhados com os estudos de Valkov et al. (2021), que ressaltam a relevância dos solventes e aditivos na manutenção da estabilidade do AM.

Além disso, a formulação magistral Lenza Farm destacou-se pelo desempenho competitivo, superando até mesmo formulações comerciais em alguns aspectos, o que reforça a viabilidade de formulações manipuladas, desde que sejam seguidos critérios rigorosos de controle de qualidade.

A análise do formato pirulito (Doctive) revelou uma abordagem inovadora, especialmente para aplicações pediátricas. Embora apresente dimerização monomérica, seu perfil espectroscópico estável e sua apresentação diferenciada podem melhorar a adesão ao tratamento em populações específicas, como crianças e pacientes odontológicos.

Valkov et al. (2021) destacam que a adaptação do formato do medicamento é um fator crucial para a aceitação do paciente, ampliando o escopo de aplicação da TFD.

Na perspectiva de avanços clínicos, Lim (2021) enfatiza que a integração de matrizes nanoestruturadas pode potencializar ainda mais a eficácia do AM, permitindo maior controle sobre a liberação do fotossensibilizador e reduzindo sua propensão à fotodegradação. Embora este estudo tenha focado em formulações convencionais, as propriedades apresentadas pelo gel da Lenza Farm sugerem que ele pode servir como base para o desenvolvimento de formulações nanoestruturadas, aumentando seu potencial clínico.

O presente estudo fornece evidências sólidas de que as formulações de AM em gel, especialmente Lenza Farm e Evilux, especialmente a em gel que apresenta maior dimerização, possuem desempenho superior em termos de estabilidade molecular e eficácia fotodinâmica. A formulação em pirulito, apesar de menos eficiente em densidade monomérica, oferece uma alternativa viável para populações pediátricas e contextos odontológicos. Estudos futuros devem se concentrar na avaliação clínica dessas formulações, na integração de nanomateriais

para aprimorar sua eficácia e na adaptação de formatos para ampliar o alcance da TFD em diferentes populações.

Essa análise integrada demonstra que o sucesso da TFD depende não apenas da escolha do fotossensibilizador, mas também do refinamento das matrizes e das estratégias de aplicação, oferecendo perspectivas promissoras para o avanço terapêutico da tecnologia.

Testes microbiológicos seguidos a estes resultados poderão fornecer maiores informações sobre a importância das formulações e razões dímero/monômero sobre o efeito antimicrobiano das soluções comerciais.

5 CONCLUSÃO.

A análise das formulações comerciais de azul de metileno (AM) utilizadas na terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) demonstrou que a razão dímero/monômero é um parâmetro crítico para determinar a eficácia fotodinâmica. O estudo revelou que formulações como Lenza Farm gel (razão 0,77) e Evilux líquido (razão 0,68) apresentaram uma tendência para predominância monomérica após diluição, favorecendo reações fotodinâmicas mais eficientes. Em contrapartida, formulações como Chimiolux gel (razão 1,03) e Evilux gel (razão 1,02) indicaram predominância dimérica em concentrações mais altas, o que pode limitar a geração de oxigênio singlete e comprometer o desempenho clínico.

Entre as formulações testadas, o pirulito Doctive (razão 0,81) destacou-se como uma solução inovadora para aplicações específicas, embora sua eficiência monomérica fosse menor em comparação a outras formulações. Esses achados ressaltam que a matriz e a concentração do AM têm impacto significativo na estabilidade molecular e no potencial fotodinâmico.

A predominância da forma monomérica, observada em algumas formulações após diluição, sugere que essas preparações são mais adequadas para aplicações clínicas, especialmente onde a geração de espécies reativas de oxigênio desempenha um papel crucial na inativação microbiana. No entanto, formulações com maior tendência à dimerização podem ser otimizadas por meio da incorporação de aditivos ou ajustes na matriz, como sugerido na literatura.

Por fim, os resultados reforçam a importância de uma padronização rigorosa nas formulações comerciais de AM para garantir eficácia e segurança na aPDT, com vistas à ampliação das opções terapêuticas contra infecções resistentes. Estudos futuros devem avaliar a correlação direta entre a razão dímero/monômero e a eficácia antimicrobiana em modelos biológicos, consolidando a aplicabilidade clínica dessas formulações.

REFERÊNCIAS

BOURBOUR, M. et al. Advances in antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 224, p. 112347, 2024.

FRANCO, R.; PERALTA-VIDEA, J. R.; GASPARI, L. Antioxidant systems in microorganisms: Mechanisms against oxidative stress. *Environmental Microbiology Reports*, v. 12, p. 345-358, 2020.

KLAUSEN, M. et al. Mechanisms of microbial defense against reactive oxygen species. *Trends in Microbiology*, v. 28, n. 10, p. 873-885, 2020.

KNORST, S. et al. Strategies for photodynamic therapy enhancement: Targeting oxygen availability. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 123, 2019.

LIMA, A. et al. Efeito do solvente sobre as propriedades espectroscópicas do azul de metileno. XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

LIM, D.-J. Methylene Blue-Based Nano and Microparticles: Fabrication and Applications in Photodynamic Therapy. *Polymers*, v. 13, n. 3955, p. 1-15, 2021.

NUÑEZ, S. C. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NUÑEZ, S. C.; RIBEIRO, M. Photodynamic therapy: Mechanisms and clinical potential. *Brazilian Journal of Dental Research*, v. 30, n. 1, p. 15-20, 2016.

SEVERINO, D. et al. Agregação do azul de metileno em mitocôndrias. In: *Workshop em terapia fotodinâmica: Complexo de moléculas fotoativas e suas aplicações. Aspectos físicos, químicos, biológicos e médicos*. São Pedro, SP: Anais de Resumo, 2003. p. 117-118.

TARDIVO, J. P. et al. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 4, p. 345-346, 2004.

VALKOV, A.; ZINIGRAD, M.; NISNEVITCH, M. Photodynamic Eradication of *Trichophyton rubrum* and *Candida albicans*. *Pathogens*, v. 10, n. 263, p. 1-13, 2021.

WAINWRIGHT, M. et al. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2004.