UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

LUCAS LUCCHIARI RIBEIRO VONO

Estudo da imobilização de
fotossensibilizadores em
nanomateriais magnéticos

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
21/10/2010

LUCAS LUCCHIARI RIBEIRO VONO

Estudo da imobilização de
fotossensibilizadores em nanomateriais
magnéticos

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Química (Química Inorgânica)*

Orientadora: Prof^a Dr^a. Liane Marcia Rossi

São Paulo
2010

Lucas Lucchiari Ribeiro Vono

Estudo da imobilização de fotossensibilizadores em nanomateriais magnéticos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Química (Química Inorgânica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À minha mãe e irmã por todo apoio
consciente e inconsciente

Agradecimentos

À professora Liane Marcia Rossi por suportar o meu mestrado com “emoção” e por acreditar quando eu dizia que no final tudo ia dar certo, mas principalmente pela orientação acadêmica e puxões de orelha.

Ao professor Mauricio da Silva Baptista pelo apoio e grande colaboração com este trabalho e ao professor Breno Pannia Espósito por sempre estar disposto a me ajudar com as minhas perguntas “exotéricas”.

A todos os professores e seus técnicos e alunos que cederem equipamentos e tempo.

A todas as “crianças” do laboratório por fazerem essa jornada pela “pré-escola” junto comigo.

Aos alunos e ex-alunos do professor Mauricio da Silva Baptista pelos conselhos e ajuda nos experimentos. Em especial o Dr. Adjaci U. Fernandez, sem o qual eu não teria realizado grande parte desse trabalho, e a Dr^a Dayane B. Tada pela orientação durante a iniciação científica.

À FAPESP pelo financiamento à pesquisa (Projeto Temático Terapia Fotodinâmica: Aspectos Físicos, Bioquímicos e Clínicos (2005/51598-7)) e ao CNPQ pela bolsa concedida.

Às músicas de Norah Jones, Ray Charles, Raul Seixas, Stevie Vai, Morrissey, Dire Straits, entre outros tantos que estiveram comigo durante a confecção deste texto.

*“Atrás de uma esquina pode estar à
espera um novo caminho ou uma porta
secreta”*

J. R. R. Tolkien

Resumo

Vono, L.L.R. **Estudo da imobilização de fotossensibilizadores em nanomateriais magnéticos**. 2010. (114p). Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A imobilização de fotossensibilizadores (FS) em materiais nanométricos tem se mostrado uma excelente alternativa ao seu emprego na forma molecular para terapia fotodinâmica (PDT). O presente trabalho descreve uma série de estratégias sintéticas desenvolvidas para a imobilização de FS em nanoesferas de sílica contendo núcleos magnéticos, bem como o estudo das propriedades foto-químicas, foto-físicas e morfológicas dos nanomateriais obtidos. Os FS utilizados foram o azul de metileno, tionina, azure A, protoporfirina IX, hematoporfirina IX e clorofilina. As metodologias de imobilização empregadas envolveram a adição do FS durante o crescimento da camada de sílica ou a ligação do FS na superfície do nanomaterial já formado. Em alguns casos foi necessário modificar previamente o FS com organossilanos. Os núcleos magnéticos foram preparados por co-precipitação de sais de ferro(II) e ferro(III) em meio básico e o revestimento com sílica foi realizado utilizando-se tetraetilortossilicato em uma microemulsão. Os núcleos magnéticos revestidos com uma camada de sílica mantiveram o comportamento superparamagnético. Para a tionina e o azul de metileno não foi detectada geração de oxigênio singlete após a imobilização. Para o azure A, protoporfirina IX e clorofilina imobilizados, a geração de oxigênio singlete foi detectada e caracterizada por métodos químicos e físicos. O material contendo clorofilina mostrou-se bastante promissor e foi empregado em estudos preliminares com células HeLa, levando à morte celular após irradiação, o que comprova o potencial para PDT. O comportamento do fotossensibilizador imobilizado e a possível proteção extra fornecida pela camada de sílica foram estudados pela supressão de fluorescência com íons brometo e supressão da geração de oxigênio singlete com albumina de soro bovino. Hematoporfirina IX é mais afetada na forma livre do que imobilizada em nanoesferas de sílica, o que indica que o FS imobilizado é capaz de gerar oxigênio singlete e está mais protegido de interferentes.

Palavras – chave: Nanopartículas, Terapia fotodinâmica, Fotossensibilizadores, Sílica, Nanopartículas magnéticas.

Abstract

Vono, L.L.R. **Studies on the immobilization of photosensitizers in magnetic nanomaterials**. 2010. (114p) Master Thesis – Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

The immobilization of photosensitizers (PS) in nanometric materials is an excellent alternative to their use in molecular forms for photodynamic therapy (PDT). The present work describes a series of synthetic strategies for the immobilization of PS on silica nanospheres containing magnetic nucleus, as well as the studies of the photochemical, photophysical and morphological properties of the obtained materials. The studied PS were methylene blue, thionin, azure A, protoporphyrin IX, hematoporphyrin IX and chlorophyllin. The immobilization methodologies involve the addition of PS during the growth of the silica shell or the attachment of PS to the material surface. Often, a previous modification of the PS with organosilanes was necessary. The magnetic cores were prepared by co-precipitation of iron(II) and iron(III) salts in basic media and the coating with silica was performed by a microemulsion using TEOS. After coating with silica, the magnetic nanomaterial maintained the superparamagnetic behavior. The generation of singlet oxygen by thionin and methylene blue was not detect after immobilization. The generation of singlet oxygen by immobilized azure A, protoporphyrin IX and chlorophyllin was detected and characterized by chemical and physical methods. The material containing chlorophyllin is promising for PDT and was applied in preliminary studies with HeLa cells, causing cell death after irradiation. The behavior of the immobilized PS and the possible extra protection given by the silica shell were investigated by fluorescence quenching with bromide ions and by suppression of singlet oxygen generation with bovine serum albumin. Hematoporphyrin IX was more affected in the free form than immobilized in silica nanospheres, which indicates that the immobilized FS still generates singlet oxygen and is more protected against interfering species.

Keywords: Nanoparticles, Photodynamic Therapy, photosensitizers, sílica, magnetic nanoparticles.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALA: ácido 5-aminolevunílico.

AM: azul de metileno.

AOT: sulfosuccinato dioctílico sódico.

APTES: 3-aminopropiltrietoxissilano.

AzA: azure A.

AzA Sil: azure A sililado.

BSA: Albumina de soro bovino.

Calceína-AM: acetometóxicaleína.

Clf: clorofilina.

Clf Sil: clorofilina sililada.

CIS: cruzamento intersistemas.

CPTES: 3-cloropropiltrietoxissilano.

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio.

DMF: N,N-dimetilformamida.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DPBF: 1,3-difenilisobenzofurano.

ERO: espécies reativas de oxigênio.

FS: fotossensibilizador.

FT-IR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

Hp IX: hematoporfirina IX.

IGEPAL CO-520: nonilfenoxipolietoxi etanol.

Mag: nanopartículas de magnetita sintetizadas por co-precipitação e estabilizadas em ciclohexano com ácido oléico.

MagAM: compósito de magnetita revestida com sílica contendo azul de metileno.

MagSil: nanopartículas de magnetita (Mag) revestidas com sílica via micro-emulsão.

MagSilAM: nanopartículas de magnetita revestida com sílica contendo azul de metileno.

MagSilAMad: nanopartículas de magnetita revestidas com sílica (MagSil) contendo azul de metileno adsorvido.

MagSilAzA: nanopartículas de magnetita revestida com sílica contendo azure A.

MagSilClf: nanopartículas de magnetita revestida com sílica contendo clorofilina.

MagSilNH₂: nanopartículas de magnetita revestida com sílica (MagSil) funcionalizadas com grupos amina.

MagSilPpIX: nanopartículas de magnetita revestida com sílica contendo protoporfirina IX imobilizada durante o crescimento da camada de sílica.

MagSilPpIX_pós: nanopartículas de magnetita revestida com sílica (MagSil) contendo protoporfirina IX imobilizada após crescimento da camada de sílica.

MagSilTio: nanopartículas de magnetita revestida com sílica (MagSil) contendo tionina.

Mag_{termo}: nanopartículas de magnetita sintetizadas por decomposição térmica.

MET: microscopia eletrônica de transmissão.

MRI: imagem por ressonância magnética.

mTHPC: tetrakis(m-hidroxifenil) clorina, princípio ativo do Foscan.

ORMOSIL: sílica do tipo modificada organicamente (do inglês, organically modified silica).

PDT: terapia fotodinâmica.

PHPP: 2,7,12,18-tetrametil-3,8-di(1-propoxietil)-13,17-bis-(3-hidroxipropil) porfirina.

PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico).

Pp IX: protoporfirina IX.

Pp IX Sil: protoporfirina IX sililada (modificada com APTES).

RNO: N,N-dimetil-4-nitrosoanilina, sonda química para detectar oxigênio singlete.

SilHp: nanoesferas de sílica contendo hematoporfirina IX.

SQUID: superconducting quantum interference device.

Tb: temperatura de bloqueio.

TEOS: tetraetilortossilicato.

TEVS: trietoxivinilssilano.

Tio: tionina.

ZnPc: ftalocianina de zinco(II).

Lista de Símbolos

$^1\text{O}_2$: oxigênio singlete.

$^3\text{O}_2$: oxigênio triplete.

S_0 : estado singlete fundamental do fotossensibilizador.

S_1 : estado singlete excitado do fotossensibilizador.

T_1 : estado triplete excitado do fotossensibilizador.

η : eficiência de geração de oxigênio singlete.

F : intensidade de fluorescência.

Q : concentração de supressor (íons brometo).

K_{sv} : constante de Stern-Volmer.

I : intensidade de emissão do oxigênio singlete em 1270 nm após foto-excitação de uma amostra.

t : tempo de decaimento da sonda química 1,3-difenilisobenzofurando (DPBF)

σ : polidispersão.

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Representação das etapas da PDT. Retirado da referência (Chatterjee, Fong <i>e col.</i> , 2008).....	20
Figura 1.2 – Diagrama de Jablonski simplificado.....	22
Figura 1.3 – Modelos de imobilização de FS internamente e na superfície de matrizes cerâmicas.	28
Figura 1.4 – MET das nanopartículas de magnetita revestida com sílica contendo AM (Tada, Vono <i>e col.</i> , 2007).	32
Figura 3.1 – Sistema de detecção de $^1\text{O}_2$	49
Figura 3.2 – Reação de 1,3-Difenilisobenzofurano com $^1\text{O}_2$	51
Figura 4.1 – Micrografia obtida por MET das nanopartículas de magnetita e histograma de distribuição de tamanhos ajustado a uma função lognormal.....	54
Figura 4.2 – Curva de magnetização da Mag com temperatura em 300 K.	55
Figura 4.3 – Micrografia obtida por MET do $\text{Mag}_{\text{termo}}$ e distribuição de tamanho ajustada a uma função gaussiana.....	56
Figura 4.4 – Curvas de magnetização do $\text{Mag}_{\text{termo}}$ em 300 K.	57
Figura 4.5 – Micrografia obtida por MET da tentativa de revestimento de $\text{Mag}_{\text{termo}}$ com sílica por microemulsão.	58
Figura 4.6 – Troca do ligante no revestimento de Mag com sílica.	59
Figura 4.7 – Micrografia obtida por MET de magnetita revestida com sílica por modificação do método de Stöber.....	60
Figura 4.8 – Esquema da síntese de magnetita revestida com sílica via microemulsão.	61
Figura 4.9 – Micrografia obtida por MET de magnetita revestida com sílica via microemulsão.	62
Figura 4.10 – Curva de magnetização de MagSil.	63
Figura 4.11 – Micrografia obtida por MET de MagSil preparadas em n-hexano.....	64
Figura 4.12 – Micrografia obtida por MET de MagSil com tempo de reação de 12 horas e um histograma de distribuição de tamanho ajustado a uma função gaussiana.....	65
Figura 4.13 – Curva de magnetização de MagSil preparado em 12 horas de reação.....	66

Figura 4.14 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) solução de AM em acetonitrila, e suspensões de (B) MagSilAM e de (C) MagAM, ambos em acetonitrila.	68
Figura 4.15 – Mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio por azul de metileno. Imagem retirada da referência Junqueira e col. 2002.....	69
Figura 4.16 – Espectros eletrônicos de absorção de uma suspensão de MagSilAMad (A) água (2 mL), e após adição de (B) 200 de μL e (C) 400 μL de acetonitrila.	71
Figura 4.17 – Estrutura do azul de metileno.	72
Figura 4.18 – Estrutura do FS tionina.	73
Figura 4.19 – Etapas de síntese do MagSilTio.....	74
Figura 4.20 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) uma suspensão aquosa de MagSilTio e de (B) uma solução aquosa de tionina.	75
Figura 4.21 – Estrutura do FS Azure A.....	76
Figura 4.22 – Síntese e estrutura esperada para o AzA Sil.	77
Figura 4.23 – Espectros eletrônicos de absorção de soluções metanólicas de (A) AzA e (B) AzA Sil.	77
Figura 4.24 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) uma suspensão aquosa de MagSilAzA e de (B) uma solução aquosa de AzA.	78
Figura 4.25 – Espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ após foto-excitação de uma suspensão de MagSilAzA ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$) em acetonitrila. No Detalhe o transiente de emissão em 1270 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$).	79
Figura 4.26 – Comparativo da geração de $^1\text{O}_2$ por MagSilAzA e AM ambos em acetonitrila ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$).	80
Figura 4.27 – Síntese da Pp IX Sil.	81
Figura 4.28 – Micrografia obtida por MET das nanopartículas de (A) MagSilPpIX_pós e detalhes das camadas de sílica de (B) MagSilPpIX_pós e (C) MagSil. Figuras (B) e (C) sem escala.	82
Figura 4.29 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) uma suspensão metanólica de MagSilPpIX_pós e de (B) uma solução metanólica de Pp IX.....	83
Figura 4.30 – Espectro eletrônico de absorção de (A) uma suspensão metanólica de MagSilPpIX e de (B) uma solução metanólica de Pp IX.	84
Figura 4.31 – Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ obtido após foto-excitação em 532 nm de suspensão metanólica de MagSilPpIX.	85

Figura 4.32 – Transiente de emissão em 1270 nm de $^1\text{O}_2$ gerado após foto-excitação em 532 nm de uma suspensão metanólica de MagSilPpIX. No detalhe de uma solução metanólica padrão de AM ($\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm).	85
Figura 4.33 – Decaimento da absorbância da sonda DPBF em 411 nm após foto-excitação em 532 nm (A, ■) de uma suspensão metanólica de MagSilPpIX e (B, □) de uma solução da sonda DPBF em metanol. Em (C, ▲) suspensão de MagSilPpIX em metanol contendo a sonda DPBF sem irradiação.	87
Figura 4.34 – Micrografia obtida por MET de MagSilPpIX e histograma de distribuição de tamanho ajusta a uma função gaussiana.	88
Figura 4.35 – Preparação da Clf Sil.	89
Figura 4.36 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) uma suspensão aquosa de MagSilClf e de (B) uma solução de Clf em DMSO.	91
Figura 4.37 – Espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ gerado após foto-excitação em 650 nm de uma suspensão de MagSilClf em acetonitrila (3 mg mL^{-1}).	92
Figura 4.38 – Comparativo da geração de $^1\text{O}_2$ de uma suspensão de MagSilClf e de uma solução padrão de AM ambos em acetonitrila ($\lambda_{\text{exc}} = 650$ nm).	93
Figura 4.39 – Micrografia obtida por MET da MagSilClf e histograma de distribuição de tamanho ajustado a uma função lognormal.	94
Figura 4.40 – Imagens de microscopia de fluorescência de células Hela (marcadas com AM-calceína) em meio de cultura contendo MagSilClf obtidas após 0, 10 e 25 min da irradiação com 645 - 685 nm (5 min).	95
Figura 4.41 – % de geração de $^1\text{O}_2$ antes e após a adição de BSA ($\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm).	97
Figura 4.42 – Curvas de Stern-Volmer para solução aquosa de Hp IX e para uma suspensão aquosa de SilHp na presença de diferentes concentrações de brometo de sódio.	98

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 – Otimização da massa adicionada de AM para imobilização por sol-gel.	69
--	----

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Terapia fotodinâmica	18
1.2. Fotossensibilizadores.....	21
1.3. Imobilização de FS em materiais nanométricos	25
1.4. Nanopartículas multifuncionais	29
1.4.1. Nanopartículas magnéticas.....	30
2. Objetivos.....	35
2.1. Geral.....	35
2.2. Específicos	35
3. Materiais e Métodos	36
3.1. Materiais	36
3.1.1. Reagentes	36
3.1.2. Equipamentos.....	37
3.2. Métodos	38
3.2.1. Síntese de nanopartículas magnéticas	38
3.2.2. Revestimento com sílica	40
3.2.3. Imobilização dos fotossensibilizadores.....	41
3.2.4. Estudos da interação do FS imobilizado	45
3.3. Técnicas de análise.....	48
3.3.1. Microscopia Eletrônica	48
3.3.2. Caracterização da geração de Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)	49
3.3.3. Medidas Magnéticas	52
4. Resultados e Discussão	53
4.1. Síntese dos núcleos magnéticos	53
4.1.1. Método da co-precipitação.....	53
4.1.2. Método da decomposição térmica.....	55
4.2. Revestimento com sílica.....	60
4.2.1. Revestimento por meio de microemulsão reversa.....	60

4.3. Imobilização dos fotossensibilizadores	67
4.3.1. Imobilização de fenotiazínicos.....	67
4.3.2. Imobilização de porfirinas.....	80
4.4. Estudos da interação do FS imobilizado	96
4.4.1. Supressão da geração de $^1\text{O}_2$ com albumina de soro bovino (BSA).....	96
4.4.2. Supressão de fluorescência com íons brometo	97
5. Conclusões	100
6. Referências	104
Anexo A – Súmula Curricular.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) é um tratamento alternativo para a destruição de células e tecidos patogênicos (Allison, Downie *e col.*, 2004; Mang, 2004), por exemplo, o câncer. A PDT baseia-se na administração de um fotossensibilizador (FS) e na consequente geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), em especial o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), pela irradiação do FS com uma fonte de luz adequada. As ERO causam a oxidação de compostos biológicos, levando à morte celular e destruição do tecido doente. A PDT apresenta três mecanismos principais que levam à morte do tecido tumoral (Dolmans, Fukumura *e col.*, 2003). No primeiro, as ERO levam diretamente à morte celular. No segundo, o dano causado aos vasos sanguíneos impede a chegada de nutrientes ao tecido tumoral. No terceiro, ocorre a ativação de uma resposta do sistema imunológico contra as células tumorais. Alguns estudos indicam que a PDT pode levar a um aumento da imunidade contra o câncer (Gollnick e Brackett, 2010), embora, outros trabalhos sugerem a supressão da imunidade (Matthews e Damian, 2010). Esse efeito depende de muitos fatores, como o FS administrado, o tipo de câncer tratado, o tempo de irradiação, o número de tratamentos realizados, o próprio paciente, entre outros. Sendo assim, a PDT pode levar ao aumento da imunidade em um caso e à supressão em outro.

Nos tratamentos tradicionais para o câncer como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, além de apresentarem eficiência limitada, os pacientes que são submetidos a esses procedimentos sofrem com severos efeitos colaterais, como dano a tecidos saudáveis e

debilitação estética ou mesmo funcional (Simplicio, Maionchi *e col.*, 2002; Master, Rodriguez *e col.*, 2010). A debilitação funcional pode ser vista, por exemplo, no tratamento com cirurgia de câncer de células escamosas ocorridas no pescoço ou na cabeça. Nesse tratamento é necessária a retirada de uma grande quantidade de tecido saudável da área em volta do tecido doente. Assim, como o pescoço e cabeça apresentam área de pele limitada os danos causados a tecidos adjacentes podem levar a problemas na fala, na mobilidade da língua, na mastigação e para engolir (Nyst, Tan *e col.*, 2009), sem levar em consideração a estética.

A PDT é um tratamento indicado para doenças que envolvam o crescimento anômalo de tecidos, fungos ou bactérias. Entre as doenças que vêm sendo estudadas para a aplicação da PDT, ou que já têm tratamento por PDT aprovado por agências de saúde de diferentes países, temos a degeneração macular da retina (Schmidt-Erfurth e Hasan, 2000), psoríase (Smits, Van Laarhoven *e col.*, 2009), osteomelite (Tardivo e Baptista, 2009), artrite reumatóide (Trauner e Hasan, 1996; Torikai, Kageyama *e col.*, 2008), micoses fungóides (Piraccini, Rech *e col.*, 2008), infecções bacterianas (Dai, Huang *e col.*, 2009), reestenose, arteriosclerose (Waksman, Mcewan *e col.*, 2008), entre outros.

O tratamento com PDT consiste de quatro etapas (figura 1.1): aplicação, acumulação, ativação e morte celular (Chatterjee, Fong *e col.*, 2008).

Figura 1.1 – Representação das etapas da PDT. Retirado da referência (Chatterjee, Fong *e col.*, 2008).

A aplicação pode ser realizada injetando-se o FS na corrente sanguínea (Schmidt-Erfurth e Hasan, 2000) ou diretamente no tecido doente (Tardivo, Del Giglio *e col.*, 2006). A injeção do FS na corrente sanguínea pode levar a um espalhamento da droga pelo organismo do paciente, ao passo que a injeção direta permite um maior acúmulo do FS no tumor e menor espalhamento pelo organismo. A administração do FS diretamente no tecido não é possível em alguns casos, por exemplo, no tratamento de degeneração macular da retina. Assim, a forma como o FS será aplicado é dependente, principalmente, da natureza da doença que está sendo tratada e de sua localização.

A etapa de acumulação consiste no tempo de espera antes de iniciar a irradiação, para que o FS seja localizado no tecido doente.

A etapa de ativação consiste na irradiação do FS com luz. A fonte de irradiação usualmente utilizada é o laser, devido a diversas vantagens, como, emissão monocromática (permitindo a excitação no máximo de absorção do FS) com intensidade relativamente alta, poder ser focado em um ponto pequeno e ser transmitido por fibra óptica (Schmidt-Erfurth e Hasan, 2000). Tardivo e colaboradores utilizam uma fonte luminosa composta por filtros e

uma lâmpada de halogênio obtendo bons resultados (Tardivo, Del Giglio *e col.*, 2004; Tardivo, Del Giglio *e col.*, 2006). A escolha da energia da radiação de excitação depende do FS administrado. A excitação do FS na chamada janela terapêutica (650 - 800 nm) (Konan, Gurny *e col.*, 2002) é preferencial, pois a pele apresenta menor coeficiente de absorção e, assim, a luz penetra mais fundo no tecido irradiado. Desta forma, fotossensibilizadores com absorção na região da janela terapêutica apresentam grande potencial para PDT.

A última etapa é a morte celular e consiste na destruição de todo ou parte do tecido doente pelos mecanismos citados anteriormente.

O tratamento pode ser repetido diversas vezes quando necessário, já que a PDT não apresenta efeitos tóxicos acumulativos (Tardivo, Del Giglio *e col.*, 2005). Outra vantagem da PDT, devido ao seu baixo risco, é a possibilidade de aplicação em idosos e pessoas com saúde muito debilitada, para os quais a cirurgia não é indicada (Tardivo, Del Giglio *e col.*, 2005).

1.2. Fotossensibilizadores

FS são compostos capazes de gerar ERO após excitação com luz de energia adequada. O mecanismo de geração de ERO pelo FS (figura 1.2) ocorre inicialmente com a promoção do FS de seu estado fundamental (singlete, S_0) a um estado singlete excitado (S_1). O retorno ao estado fundamental pode ocorrer pela emissão de um fóton (fluorescência) e/ou por processos não-radiativos. Para a geração de 1O_2 , a etapa importante envolve um cruzamento intersistema (CIS), onde o S_1 é convertido a um estado triplete excitado (T_1). O T_1 transfere energia para o oxigênio molecular (tripleto, 3O_2) levando à formação de 1O_2 . Esse mecanismo é conhecido como tipo II. No caso da transferência de energia ocorrer diretamente do T_1 para

um substrato por meio de um processo radicalar, que leva à geração de outras ERO que não $^1\text{O}_2$, o mecanismo é conhecido como tipo I (Dolmans, Fukumura *e col.*, 2003; O'connor, Gallagher *e col.*, 2009).

Figura 1.2 – Diagrama de Jablonski simplificado.

O primeiro FS aprovado para uso em PDT é um derivado da hematoporfirina conhecido por Photofrin, sendo o Canadá, em 1993, o primeiro país a autorizar esse FS para tratamento profilático de câncer na bexiga (Dolmans, Fukumura *e col.*, 2003). O Photofrin é composto por oligômeros de hematoporfirina sem composição definida, sendo possível determinar mais de 60 componentes diferentes (determinados por eletroforese capilar). É muito improvável, porém, que exista apenas um composto ativo (O'connor, Gallagher *e col.*, 2009). O Photofrin apresenta baixa seletividade por tecido tumoral que, aliada à baixa absortividade molar na janela terapêutica, leva à necessidade de administrar altas dosagens do FS (Dolmans, Fukumura *e col.*, 2003). O Photofrin demora para ser eliminado do corpo, levando o paciente a ter que evitar luz solar pelo período de 4 a 6 semanas após o tratamento

(Dolmans, Fukumura *e col.*, 2003). Apesar desses problemas, o Photofrin ainda é o FS mais utilizado e com maior número de procedimentos aprovados pelas agências de saúde de diferentes países (Dolmans, Fukumura *e col.*, 2003; O'connor, Gallagher *e col.*, 2009).

Uma segunda geração de FS vem sendo desenvolvida, buscando respeitar as características ideais de um FS, contemplando maior pureza, baixa toxicidade no escuro, absorção na janela terapêutica, alto rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$ (Φ), custo acessível, disponibilidade comercial, seletividade por tecidos tumorais e não ser mutagênico nem carcinogênico (O'connor, Gallagher *e col.*, 2009). Dentre os FS de segunda geração aprovados em diferentes países para PDT encontram-se o Foscan, o Levulan e o Metvix (Dolmans, Fukumura *e col.*, 2003).

O Foscan, tetrakis(m-hidroxifenil) clorina (mTHPC), diferentemente do Photofrin, tem composição definida, apresenta absorção na janela terapêutica ($\lambda_{\text{máx}} = 652 \text{ nm}$, $\epsilon = 3 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e tendência a acumular em tecido tumoral. Essas duas características possibilitam dosagens até 100 vezes menores que as necessárias para o Photofrin, com resultados comparáveis. Devido à acumulação no sistema vascular, porém, a permanência no plasma sanguíneo é longa, e igualmente ao Photofrin, o Foscan leva à foto-sensibilidade da pele por um período de algumas semanas (O'connor, Gallagher *e col.*, 2009). Ainda assim, esses contratempos apresentados tanto pelo Foscan quanto pelo Photofrin são menos penosos que os observados para tratamentos convencionais do câncer (Simplicio, Maionchi *e col.*, 2002).

O Levulan, ácido 5-aminolevunílico (ALA), ao contrário dos outros compostos apresentados, não é o FS propriamente dito, mas sim um precursor de protoporfirina IX (Pp IX) envolvido na biossíntese do grupo heme. O Metvix, ácido metil aminolevunílico, atua da mesma forma, pois a desmetilação provocada por esterases da célula leva à formação de ALA. O Levulan e o Metvix são aplicados, por exemplo, no tratamento de lesões pré-câncer de pele, na face e escalpo (*Keratosis actínica*) (Simplicio, Maionchi *e col.*, 2002). A Pp IX

gerada após administração de Levulan e Metvix é eliminada entre 24 e 48 horas (Juzeniene, Peng *e col.*, 2007). Tanto o Levulan quanto o Metvix apresentam seletividade por tecido tumoral, porém o Metvix apresenta como vantagens, devido à maior lipofilicidade, uma maior e mais profunda penetração no tecido tumoral (Juzeniene, Peng *e col.*, 2007). Durante o tratamento de *Keratosis actínica* os pacientes tratados com Metvix reportaram menor sensação de dor que pacientes tratados com Levulan (Moloney e Collins, 2007).

Os FS apresentados são todos da classe das porfirinas, porém outra classe de FS que tem recebido bastante atenção, embora ainda não tenha sido aprovada por nenhuma agência de saúde para PDT, são os fenotiazínicos, como por exemplo, o azul de metileno (AM). O AM pode ser ativado dentro da janela terapêutica e diversos estudos comprovaram sua eficiência em PDT (Konig, Bockhorn *e col.*, 1987; Orth, Ruck *e col.*, 1995; Tardivo, Del Giglio *e col.*, 2004; Tardivo, Del Giglio *e col.*, 2006; Tardivo e Baptista, 2009). Existem algumas desvantagens, como exemplo, a alta hidrofiliabilidade do AM leva a uma baixa afinidade por tecido tumoral quando aplicado na corrente sanguínea (Mellish, Cox *e col.*, 2002), a baixa toxicidade no claro e a possibilidade de ser reduzido por NADH e FADH₂ levando à formação do leuco AM, o qual não apresenta atividade por ser incolor (Mellish, Cox *e col.*, 2002; Tardivo, Del Giglio *e col.*, 2005; Tada, 2007).

Estudos de imobilização do AM resultam em materiais com maior eficiência que o AM livre (O'connor, Gallagher *e col.*, 2009).

1.3. Imobilização de FS em materiais nanométricos

A imobilização de FS em materiais nanométricos tem sido considerada como a terceira geração de FS (Juzeniene, Peng *e col.*, 2007; O'connor, Gallagher *e col.*, 2009). As principais desvantagens gerais do uso de FS livres são a baixa seletividade por tecidos doentes, o espalhamento da droga pelo organismo que torna necessária a proteção da luz solar, a interação com biomoléculas e a hidrofobicidade de alguns FS que leva à agregação em meio biológico. Os dois últimos podem levar à desativação ou à redução da atividade do FS. A imobilização de FS em materiais nanométricos mostra-se como uma excelente alternativa ao seu emprego na forma molecular (Konan, Gurny *e col.*, 2002; Roy, Ohulchanskyy *e col.*, 2003; Wang, Gao *e col.*, 2004; O'connor, Gallagher *e col.*, 2009), pois facilita a localização e a especificidade do FS, além de permitir a dispersão de FS hidrofóbicos em meio biológico. Entre os materiais nanométricos mais aplicados como carregadores de moléculas (sejam fármacos ou FS) encontram-se as nanopartículas poliméricas, dendrímeros, lipossomos e nanopartículas cerâmicas (Sahoo e Labhasetwar, 2003).

Lipossomos podem ser formados por fosfolipídios e colesterol, compostos não tóxicos e naturais, e consistem em pequenas vesículas de morfologia esférica. Devido às suas características de tamanho, hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, além da biocompatibilidade, os lipossomos são promissores como carregadores de drogas para PDT. Vesículas com diferentes tamanhos e cargas podem ser obtidas por meio da utilização de diferentes composições de lipídeos e metodologias de síntese. Gabizon e colaboradores (Gabizon, Goren *e col.*, 1998) demonstraram que lipossomos contendo doxorrubicina apresentam maior eficácia terapêutica e maior tempo de circulação, quando comparado com o fármaco livre. No caso da PDT, uma formulação de lipossomos contendo o FS verteporfin (Visudyne) é utilizada para tratamento de degeneração macular da retina (Konan, Gurny *e col.*, 2002). Recentemente, Kuntsche e

colaboradores reportaram a imobilização de mTHPC (princípio ativo do Foscan) em diferentes formulações de lipossomos (Kuntsche, Freisleben *e col.*, 2010). O uso de lipossomos apresenta diversas vantagens frente ao uso do FS na forma livre, porém também existem desvantagens, como o aumento da agregação do FS no lipossomo e a maior disponibilidade para ser capturado pelo sistema de defesa do organismo (Roy, Ohulchanskyy *e col.*, 2003), além da dificuldade em obter lipossomos com características desejadas de forma reprodutível e em manter a estabilidade dos produtos durante a manufatura (Tada, 2007).

Nanopartículas poliméricas biodegradáveis são outros materiais interessantes para a imobilização de FS. Suas principais vantagens são a possibilidade de controle da liberação do FS e a existência de uma grande variedade de síntese. A composição química da matriz polimérica pode ser facilmente adaptada de forma a controlar a degradação e assim controlar a liberação do FS (Chatterjee, Fong *e col.*, 2008). Fadel e colaboradores (Fadel, Kassab *e col.*, 2010) imobilizaram ftalocianina de zinco(II) (ZnPc), um FS de segunda geração muito utilizado pela seletividade tumoral e alta eficiência (Chatterjee, Fong *e col.*, 2008), em partículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) com tamanho médio de 347 ± 56 nm. Os autores realizaram estudos *in vivo* utilizando ratos com tumor transplantado. Os animais foram separados em quatro grupos: controle, irradiação, ZnPc imobilizada e ZnPc livre. Os grupos de controle e de irradiação não receberam o FS. Os grupos ZnPc imobilizada e ZnPc livre foram tratados com a mesma quantidade de ZnPc. Após 8 dias, o tumor transplantado tinha um volume de $0,15 \pm 0,02$ cm³ em todos os grupos, sendo então realizado o procedimento de PDT, por meio de irradiação com luz vermelha em todos os grupos, exceto no controle. O tumor nos grupos de controle e de irradiação atingiu 2 cm³ por volta de 18 dias após o transplante do tumor. O mesmo volume só foi observado no grupo tratado com ZnPc livre após 27 dias e no grupo tratado com ZnPc imobilizada somente 56 dias após o transplante do tumor. Os dois grupos que não receberam o FS morreram na segunda semana

após o tratamento. Os animais tratados com a ZnPc imobilizada foram sacrificados oito semanas após a morte do grupo tratado com o FS livre. Assim, os autores comprovaram a eficiência superior do FS quando imobilizado.

A imobilização de ZnPc em PLGA também foi apresentada por Ricci-Junior e colaboradores (Ricci-Junior e Marchetti, 2006), que comprovaram a eficiência do FS imobilizado para aplicação em PDT em estudos *in vitro* com células P388-D1. Os autores também reportaram a preservação das propriedades foto-químicas e foto-físicas do FS quando imobilizado.

Os sistemas carregadores de drogas apresentados acima têm uma desvantagem comum. Os lipossomos ou partículas poliméricas biodegradáveis permitem a liberação do FS e, igualmente ao uso do FS livre, podem levar ocorrer acúmulo do FS na pele e olhos (Roy, Ohulchanskyy *e col.*, 2003). Nesse sentido, uma alternativa é a imobilização de FS em matrizes cerâmicas compatíveis com sistemas biológicos, entre elas a sílica, alumina e titânia (Sahoo e Labhasetwar, 2003), pois essas matrizes não permitem a liberação do FS. Vale ressaltar que para a PDT não é necessária a liberação do FS, pois os agentes terapêuticos efetivos são as ERO geradas pela irradiação do FS com luz. Para que se obtenha uma resposta terapêutica satisfatória deve-se garantir que a matriz na qual o FS está imobilizado seja permeável as ERO. No caso do $^1\text{O}_2$, o carregador deve permitir a entrada de $^3\text{O}_2$ e a saída de $^1\text{O}_2$ de seu interior (Chatterjee, Fong *e col.*, 2008). A figura 1.3 apresenta as possibilidades de imobilização dos FS internamente na matriz cerâmica ou na superfície da partícula por meio de ligações covalentes. A imobilização dentro da matriz de sílica pode ser realizada com ou sem modificação química do FS (Tada, Vono *e col.*, 2007; Rossi, Silva *e col.*, 2008), sendo a modificação química necessária para possibilitar a imobilização por ligações covalentes.

Figura 1.3 – Modelos de imobilização de FS internamente e na superfície de matrizes cerâmicas.

As vantagens da imobilização dos FS em matrizes cerâmicas são os processos de síntese similares aos bem estudados processos sol-gel, a síntese ocorrer em temperatura ambiente, o tamanho, forma e porosidade controlados e a elevada estabilidade química e térmica (Roy, Ohulchanskyy *e col.*, 2003; Sahoo e Labhasetwar, 2003). Esses materiais também podem ser facilmente modificados com grupos funcionais de forma a possibilitar a incorporação de biomoléculas, por exemplo, anticorpos, que direcionem o FS ao tecido tumoral (Chatterjee, Fong *e col.*, 2008).

Nanopartículas de sílica são muito empregadas para a imobilização de FS, pois além das vantagens apresentadas acima, a matriz de sílica também é transparente na janela terapêutica, ou seja, não apresenta absorção de luz, embora provoque espalhamento. Roy e colaboradores (Roy, Ohulchanskyy *e col.*, 2003) reportaram a imobilização do FS hidrofóbico HPPH em nanopartículas de sílica de 30 nm. Os precursores de sílica utilizados foram o 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) e trietoxivinilssilano (TEVS) para obtenção de sílica do tipo modificada organicamente (ORMOSIL do inglês, organically modified silica). Testes *in*

vitro realizados com células HeLa e UCI-107 comprovaram a presença das nanopartículas no citoplasma das células. Esse material apresenta baixa toxicidade no escuro, sendo a morte celular observada após a irradiação em 650 nm. Simon e colaboradores (Simon, Devaux *e col.*, 2010) reportaram a imobilização de Pp IX em nanopartículas de sílica ORMOSIL, preparadas com TEVS, de tamanho controlado (10, 25 e 60 nm). Os autores reportam que frente a células HCT 116 não houve diferenciação significativa na quantidade de partículas internalizadas pelo tempo de incubação. Para testes *in vivo* foi imobilizado juntamente com a Pp IX um marcador fluorescente. Através de imagens de fluorescência foi demonstrado que as nanopartículas tendem a acumular em tecido tumoral, diferentemente do marcador livre, embora haja uma grande concentração no fígado.

1.4. Nanopartículas multifuncionais

Materiais multifuncionais são materiais que apresentam mais de uma propriedade, por exemplo, o material apresentado por Simon e colaboradores (Simon, Devaux *e col.*, 2010) gera ERO após foto-excitação, devido ao FS, e permite o acompanhamento da localização do material por imagens de fluorescência, devido à presença do marcador. Outro exemplo de nanomateriais multifuncionais para PDT apresenta o FS imobilizado, que gera $^1\text{O}_2$ quando irradiado, e núcleos magnéticos, que podem ser utilizados como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética (MRI) (Taupitz, Schnorr *e col.*, 2000; Gupta e Gupta, 2005).

1.4.1. Nanopartículas magnéticas

Nanopartículas de óxidos de ferro, em especial a magnetita (Fe_3O_4), têm sido muito empregadas nas mais diversas aplicações por apresentarem baixa toxicidade e comportamento superparamagnético (Schwertmann e Cornell, 1996). O superparamagnetismo é uma propriedade dependente do tamanho e caracterizada por uma elevada magnetização de saturação em presença de um campo magnético aplicado e ausência de magnetização residual quando cessada aplicação do campo (Lu, Salabas *e col.*, 2007). Materiais magnéticos apresentam uma estrutura de multidomínios, ou seja, regiões de magnetização uniforme separadas por paredes de domínio. Quando o tamanho da amostra é reduzido abaixo de um dado diâmetro crítico, o qual depende do tipo de material, a energia necessária para que seja criada uma parede de domínio é superior à necessária para suportar a energia magnetostática externa do estado de monodomínio. A ausência de magnetização residual é decorrente da facilidade de mudança da orientação magnética das partículas, pois quando a temperatura excede a temperatura de bloqueio (T_b) a energia térmica é maior que a energia de barreira, assim permitindo a inversão da magnetização (Lu, Salabas *e col.*, 2007). Em temperaturas acima da T_b , o sistema apresenta-se em um estado superparamagnético (ausência de histerese na curva de magnetização $M \times H$) e abaixo de T_b o sistema encontra-se bloqueado.

As aplicações de nanopartículas magnéticas são as mais variadas, entre elas agentes de contraste para imagem por ressonância magnética (Taupitz, Schnorr *e col.*, 2000; Gupta e Gupta, 2005), imobilização de enzimas (Chen e Liao, 2002; Huang, Liao *e col.*, 2003; Rossi, Quach *e col.*, 2004), separação de células específicas (Hancock e Kemshead, 1993; Dyal, Loos *e col.*, 2003), vetorização de drogas (Lubbe, Bergemann *e col.*, 1996; Pankhurst, Connolly *e col.*, 2003), suporte para catalisadores (Rossi, Vono *e col.*, 2007), entre outras.

Nanopartículas de magnetita podem ser obtidas por diversos métodos, como co-precipitação, decomposição térmica, microemulsão e síntese hidrotérmica (Lu, Salabas *e col.*, 2007). As metodologias utilizadas nesse trabalho para a síntese dos núcleos magnético foram a co-precipitação e a decomposição térmica. A co-precipitação consiste na mistura de sais de ferro(II) e ferro(III) em solução básica e a decomposição térmica, no aquecimento de um precursor adequado de ferro na presença de estabilizantes.

1.4.1.1 Nanopartículas magnéticas contendo FS

A imobilização de drogas e biomoléculas covalentemente á superfície da magnetita pode ser realizada via funcionalização das nanopartículas magnéticas com organossilanos, como demonstrado por Rossi e colaboradores (Rossi, Quach *e col.*, 2004) para a imobilização de glicose oxidase utilizando 3-aminopropiltrietoxissilano. Xu e colaboradores (Xu, Xu *e col.*, 2004) também demonstraram a imobilização, na superfície de nanopartículas de óxidos de ferro, de moléculas utilizando dopamina.

Embora a imobilização dos FS diretamente na superfície das nanopartículas magnéticas seja possível, essa metodologia deve levar à imobilização de pouca quantidade de FS, sendo que a quantidade de FS imobilizado pode ser ampliada pelo revestimento das nanopartículas magnéticas com uma matriz polimérica ou cerâmica capaz de conter o FS.

A estratégia de revestimento de nanopartículas magnéticas foi empregada, por exemplo, na imobilização de pontos quânticos levando à obtenção de um material nanométrico com propriedades magnéticas e luminescentes (Yi, Selvan *e col.*, 2005). O revestimento de nanopartículas magnéticas com sílica pode ser realizado pela hidrólise básica de precursores como tetraetilortossilicato (TEOS) em etanol, como reportado por Philipse e

colaboradores (Philipse, Vanbruggen *e col.*, 1994), bem como por meio de microemulsão, como reportado por Yi e colaboradores (Yi, Lee *e col.*, 2006). De acordo com Tang e colaboradores (Tang, Xu *e col.*, 2005), a sílica apresenta uma alta capacidade de imobilização de azul de metileno (AM), maior que poliacrilamida e ORMOSIL (preparada com os precursores feniltrimetoxissilano e metiltrimetoxissilano), comparadas no estudo. Tada e colaboradores (Tada, Vono *e col.*, 2007) imobilizaram o FS AM em sílica contendo núcleos magnéticos, através do crescimento de uma camada de sílica e concomitante imobilização do FS. Esse material não apresenta uma morfologia bem definida, sendo observada a formação de aglomerados na forma de anéis (figura 1.4). A geração de $^1\text{O}_2$ foi caracterizada pelo espectro de emissão com máximo em 1270 nm e pelo tempo de vida, característicos do $^1\text{O}_2$, obtidos após irradiação, em 532 nm, de uma suspensão do material em acetonitrila. A eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ foi determinada como $0,03 \pm 0,02$, o que representa apenas 5 % do rendimento quântico do AM livre ($\Phi=0,6$ em acetonitrila (Rossi, Silva *e col.*, 2008)). Essa redução deve estar associada à formação de dímeros de AM comprovado pelo deslocamento do máximo de absorção de 654 nm para 590 nm.

Figura 1.4 – MET das nanopartículas de magnetita revestida com sílica contendo AM (Tada, Vono *e col.*, 2007).

Outros trabalhos envolvendo a imobilização de FS em sílica contendo núcleos magnéticos foram publicados. Liu e colaboradores (Liu, Zhou *e col.*, 2008) reportaram a imobilização do FS purpurin-18 em nanopartículas de sílica contendo núcleos magnéticos de tamanho entre 20 e 30 nm. A imobilização foi realizada adicionando-se o FS durante o crescimento da camada de sílica. A imobilização do FS foi comprovada pelo espectro eletrônico de absorção no UV-Vis e pelo espectro vibracional no infravermelho obtido por FT-IR. O FS imobilizado apresentou geração de $^1\text{O}_2$, determinada utilizando-se a sonda química N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO). Embora a geração de $^1\text{O}_2$ do FS livre seja maior, os autores afirmam que o material apresenta potencial para PDT.

Chen e colaboradores (Chen, Sun *e col.*, 2009) reportaram a imobilização do FS 2,7,12,18-tetrametil-3,8-di(1-propoxietil)-13,17-bis-(3-hidroxipropil) porfirina (PHPP) em sílica contendo núcleos magnéticos. O revestimento com sílica e a imobilização do FS foram realizados por meio de uma microemulsão, resultando em um nanomaterial com diâmetro na faixa de 20 a 30 nm. A imobilização foi comprovada pelo espectro de fluorescência e por FT-IR. A geração de $^1\text{O}_2$ foi comprovada com a sonda RNO. Imagens de fluorescência demonstraram a presença das nanopartículas no citoplasma de células SW480. O material apresentou toxicidade insignificante no escuro e, quando irradiado, levou à morte de 40 % das células. Liu e colaboradores (Liu, Zhou *e col.*, 2009) também reportaram a imobilização de PHPP em sílica contendo núcleos magnéticos de tamanho médio na faixa de 30 a 50 nm. Da mesma forma que no trabalho anterior, a imobilização foi comprovada por espectroscopia no UV-Vis e FT-IR. A geração de $^1\text{O}_2$, caracterizada com a sonda RNO, foi menor no FS imobilizado que no FS livre, porém segundo os autores o material ainda apresenta potencial para PDT. Os autores também demonstraram que os núcleos magnéticos e a camada de sílica não afetam a produção de $^1\text{O}_2$, nem sua liberação.

Kim e colaboradores (Kim, Shin *e col.*, 2009) reportaram a imobilização de ZnPc em sílica mesoporosa contendo núcleos magnéticos. A imobilização e o revestimento com sílica foram realizados em uma etapa, sendo utilizado brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como molde para os poros e TEOS como precursor de sílica. A remoção do CTAB foi realizada mantendo o material a 300 °C por 6 horas. O método resultou em nanopartículas de tamanho na faixa de 60 a 120 nm e um diâmetro de poro de aproximadamente 4 nm. Segundo os autores, o espectro eletrônico de absorção no UV-Vis comprova a imobilização do FS em sua forma monomérica. O material apresenta um comportamento superparamagnético e uma magnetização de saturação de 1,8 emu g⁻¹ a 1,0 T, o que é suficiente para MRI. A capacidade de gerar ¹O₂ ou outras ERO não foi estudada pelos autores, porém a PDT é citada como possível aplicação do material. Nesse trabalho, também foi demonstrada a possibilidade de entrega controlada de drogas utilizando como modelo o Ibuprofeno.

O presente trabalho descreve o revestimento de nanopartículas magnéticas com sílica, bem como uma série de estratégias sintéticas desenvolvidas para a imobilização de FS da classe das porfirinas e dos fenotiazínicos e o estudo de suas propriedades foto-químicas, foto-físicas e morfológicas visando à aplicação em PDT.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Este trabalho apresenta como objetivo geral o desenvolvimento de metodologias para a síntese de nanomateriais multifuncionais contendo fotossensibilizadores e núcleos magnéticos para aplicação em terapia fotodinâmica.

2.2. Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

Preparar núcleos magnéticos com a propriedade superparamagnéticas;

Realizar o revestimento desses núcleos com uma camada de sílica obtendo um material com morfologia e tamanho controlados;

Imobilizar fotossensibilizadores de interesse na camada de sílica preservando suas propriedades fotoquímicas;

Estudar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos nanomateriais preparados, que caracterizem uma possível aplicação em PDT.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

Cloreto de ferro(II), cloreto de ferro(III), acetilacetato de ferro(III) ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) e tetraetilortossilicato (TEOS) foram obtidos da Alfa-Aesar.

Solução de amônia (29%), ciclo-hexano, n-hexano, metanol, tolueno e diclorometano foram obtidos da JT Baker. O tolueno foi seco, destilado e armazenado com fio de sódio.

Ácido oléico, 1,2-octanodiol, oleilamina, difenil éter, nonilfenoxipoliétoxi etanol (IGEPAL CO-520), 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES), 3-cloropropiltrietoxissilano (CPTES), hidreto de sódio, sulfosuccinato dioctílico sódico (AOT), 1-butanol, albumina de soro bovino (BSA), cloreto de oxalila e cloreto de tionila foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) foram obtidos da Acros Organics.

Ácido clorídrico, etanol, acetona, N,N-dimetilformamida (DMF) e brometo de sódio foram obtidos da Synth Lab. O DMF foi destilado e seco antes do uso.

Dulbeco MEM alta glicose foi obtido da Cultilab.

Acetometoxicalceína (calceína-AM) foi obtida da Invitrogen.

Os fotossensibilizadores azul de metileno, hematoporfirina IX, protoporfirina IX, Azure A, tionina e clorofilina foram fornecidos pelo Prof. Maurício S. Baptista (Departamento de Bioquímica, IQ-USP).

3.1.2. Equipamentos

Espectrofotômetro UV-1700 e UV-2401PC (Prof. Maurício S. Baptista, IQ-USP), ambos da Shimadzu.

Fluorímetro/fosforímetro com resolução temporal montado pela Edinburg Analytical Instruments equipado com um laser Nd:YAG da Corinum Surelite III e com uma NIR-Fotomultiplicadora da Hamatsu. (Prof. Maurício S. Baptista, IQ-USP).

Microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 200 com filamento de tungstênio e tensão de aceleração de 200 kV (Prof. Pedro Kiyohara, IF-USP).

Leitor de microplacas FLUOstar OPTIMA da BMG Labtech. (Prof. Breno P. Espósito, IQ-USP).

Microscópio óptico de fluorescência Axiovert 200 da Carl Zeiss equipado com uma câmera CCD PowerShot G10 da Canon.

Magnetômetro SQUID (do inglês, superconducting quantum interference device) MPMS da Qauntum Design (Prof. Renato F. Jardim, IF-USP).

Analizador elementar Perkin-Elmer CHN 2400 (Central analítica, IQ-USP).

3.2. Métodos

3.2.1. Síntese de nanopartículas magnéticas

3.2.1.1. Método da co-precipitação e estabilização em solventes apolares

A metodologia de síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 conhecida por co-precipitação consiste na adição de uma mistura de soluções de ferro(II) e ferro(III) em solução de amônia (Philipse, Vanbruggen *e col.*, 1994; Shen, Laibinis *e col.*, 1999; Rossi, Vono *e col.*, 2007). Neste caso uma mistura de soluções aquosas de cloreto de ferro(III) (10 mL, $1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e de cloreto de ferro(II) (2,5 mL, 2 mol L^{-1} , em ácido clorídrico 2 mol L^{-1}) foi adicionada, sob atmosfera de N_2 e agitação mecânica (10000 rpm, Ultra-Turrax T18 Homogenizer, IKA Works), em 250 mL de solução aquosa de amônia ($0,7 \text{ mol L}^{-1}$). Após a total adição, a mistura reacional foi mantida sob agitação e atmosfera inerte por 30 min. O material obtido foi separado magneticamente e lavado com três porções de 250 mL de água destilada.

A estabilização das nanopartículas de magnetita em solventes orgânicos apolares, como tolueno e ciclo-hexano, foi obtida pela coordenação de ácido oléico à superfície do material (Shen, Laibinis *e col.*, 1999; Rossi, Vono *e col.*, 2007). Esse procedimento consiste na dispersão da magnetita preparada acima em 250 mL de água destilada, seguida da adição lenta de ácido oléico (7 mmol, 2 mL) diluído em 10 mL de acetona, sob agitação mecânica (10000 rpm, Ultra-Turrax T18 Homogenizer, Ika Works). O material obtido foi então separado magneticamente e lavado três vezes com porções de 25 mL de acetona. Após o procedimento de lavagem, o material foi disperso em 50 mL de ciclo-hexano e centrifugado

por 30 min a 2000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5804), para a remoção de agregados. A solução sobrenadante foi aproveitada e contém tipicamente de 20 a 25 mg mL⁻¹ de magnetita estabilizada com ácido oléico. Esse material foi denominado Mag.

3.2.1.3. Método da decomposição térmica

A síntese de magnetita por decomposição térmica consiste no aquecimento de um precursor de ferro adequado na presença de agentes redutores e estabilizantes. Neste trabalho a síntese foi realizada, em um balão de fundo redondo munido de um condensador, pela adição de 2,65 g de Fe(acac)₃ (7,5 mmol), 7,5 mL de ácido oléico (24 mmol), 5,45 g de 1,2-octanodiol (37 mmol), 7,5 mL de oleilamina (23 mmol) e 75 mL de difenil éter, sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio. Após a mistura dos reagentes, o sistema foi aquecido diretamente em um manta de aquecimento com agitação (Fisaton) e mantido sob refluxo por duas horas (Wang, Luo *e col.*, 2005; Barbeta, Jardim *e col.*, 2010). A separação dos núcleos magnéticos sintetizados foi realizada por centrifugação. Alíquotas de 10 mL da solução final da reação foram tratadas separadamente com 40 mL de etanol (em tubos de centrífuga de 50 mL) e centrifugadas (7000 rpm, 10 min). Os sólidos foram recolhidos e lavados com três porções de 50 mL de etanol para remover o excesso de estabilizantes e de solvente. O material foi então redispersado em 50 mL ciclo-hexano. Esse material foi denominado Mag_{termo}.

3.2.2. Revestimento com sílica

O revestimento dos núcleos de magnetita foi realizado utilizando-se uma microemulsão reversa, como reportada por Yi e colaboradores (Yi, Lee *e col.*, 2006). Em um balão de fundo redondo (250 mL) uma mistura de 100 mL de ciclo-hexano e 5,88 g de IGEPAL CO-520 (13 mmol) foi sonicada por 3 min, seguido da adição de 5,7 mg de Mag (7,13 mL, 0,8 mg mL⁻¹ em ciclo-hexano) e de 0,83 mL de solução de amônia (29 %, 21 mmol). A mistura foi agitada vigorosamente até tornar-se translúcida. Então foram adicionados 476 µL de TEOS (2 mmol) e a mistura foi mantida sob agitação mecânica. Após 48 h de reação, os núcleos revestidos com sílica foram então extraídos com 50 mL de metanol e centrifugados (6500 rpm por 20 min). O material obtido foi lavado três vezes com porções de 50 mL de etanol e deixado secar ao ar. Rendimento: 140 mg de magnetita revestida com sílica. O material obtido foi denominado MagSil.

A espessura da camada de sílica pode ser controlada alterando-se o tempo de reação e o solvente de ciclo-hexano para n-hexano. Os materiais obtidos foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão.

3.2.3. Imobilização dos fotossensibilizadores

3.2.3.1. Imobilização de azul de metileno (AM)

A imobilização de AM na camada de sílica foi realizada por meio de duas metodologias. A primeira consiste na adição do FS durante o crescimento da camada de sílica. O mesmo procedimento descrito em 3.2.2 foi empregado, com as seguintes quantidades adicionadas nessa ordem: 100 mL ciclo-hexano, 5,88 g IGEPAL CO-520 (13 mmol), 5,7 mg de Mag (7,13 mL, 0,8 mg mL⁻¹ em ciclo-hexano), 3,3 mg de AM (1×10^{-5} mol) dissolvidos em 0,83 mL de solução de amônia (29 %, 21 mmol) e 476 µL TEOS (2 mmol). O procedimento de lavagem foi realizado até total remoção do excesso de AM detectável por UV-Vis. O material obtido foi denominado com MagSilAM.

A segunda estratégia baseia-se na adição de 2 mL de uma solução aquosa de AM ($1,2 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) para cada 1 mg de MagSil, seguida de agitação magnética por 24 h. O excesso de AM foi removido por diálise contra água destilada durante três dias com troca diária da água. O material obtido pela adsorção de azul de metileno foi denominado MagSilAMad.

3.2.3.2. Imobilização de tionina (Tio)

A imobilização de Tio foi realizada por meio da funcionalização prévia da MagSil com grupos -NH₂ utilizando APTES. A funcionalização foi realizada pela dispersão de 140 mg de MagSil em 20 mL de uma solução 1 % (v/v) de APTES em tolueno seco sob atmosfera

de N₂ e agitação magnética por 2 h. O sólido foi isolado magneticamente e lavado com 15 mL de tolueno. O material foi então mantido em estufa a 100 °C por 20 h, para que as ligações Si-O fossem totalmente formadas (Vrancken, Decoster *e col.*, 1995). O material obtido foi denominado MagSilNH₂.

A tionina foi imobilizada na superfície da partícula através de ligações covalentes. Esse procedimento foi realizado em DMSO seco e utilizando-se glutaraldeído como ligante ponte entre os grupos amina da tionina e da superfície da MagSilNH₂. Inicialmente reagiu-se o glutaraldeído (50 µL, 5x10⁻⁴ mol) e o MagSilNH₂ (90 mg) em 20 mL de DMSO seco sob agitação magnética e aquecimento 40 °C por 40 min. Em seguida, a tionina (4 mg, 1,4x10⁻⁵ mol) foi adicionada ao meio reacional, para ocorrer, sob as mesmas condições, a formação de ligações imina entre o grupo aldeído restante do glutaraldeído ligado ao MagSilNH₂ e os grupos amina da tionina. O material obtido foi lavado com 20 mL de metanol seco, sendo a separação realizada por centrifugação (6500 rpm, 20 min). A redução das ligações imina à amina secundária foi realizada com a adição de NaBH₄ em metanol seco. Após a redução foi adicionado metanol para remover o excesso de NaBH₄. As partículas foram lavadas com etanol até total remoção do excesso de FS detectável por UV-Vis. O material obtido foi denominado MagSilTio.

3.2.3.3. Imobilização de Azure A (AzA)

Para a imobilização de AzA, o FS foi inicialmente sililado através da reação com CPTES. Em um frasco Schlenk foram adicionados 50 mg de AzA (0,2 mmol) e DMF seco suficiente para solubilizar o FS, sendo então adicionados 5 mg de hidreto de sódio (0,2 mmol)

dissolvido em DMF seco. O sistema foi mantido sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio até a mudança da coloração da solução de azul para rosa. Então adicionou-se 1 mL de CPTES (5 mmol) e a mistura foi aquecida a 100 °C sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio, e mantida nessas condições por 24 horas. O solvente e o máximo possível de excesso de CPTES foram removidos por destilação a vácuo. O FS modificado foi denominado AzA Sil.

A metodologia empregada para a imobilização do FS consiste na adição de AzA Sil durante o crescimento da camada de sílica. O mesmo procedimento descrito em 3.2.2 foi empregado, com as seguintes quantidades adicionadas nessa ordem: 10 mL ciclo-hexano, 588 mg IGEPAL CO-520 (1,3 mmol), 0,6 mg de Mag (713 μL , 0,8 mg mL⁻¹ em ciclo-hexano), 83 μL de solução de amônia (29 %, 2 mmol), 48 μL TEOS (0,2 mmol) e 10 μL de AzA Sil recém preparado. O procedimento de lavagem foi realizado até total remoção do excesso de AzA detectável por UV-Vis. O material obtido foi denominado MagSilAzA.

3.2.3.4. Imobilização de protoporfirina IX (Pp IX)

A imobilização de Pp IX foi realizada por meio de três metodologias. A primeira consiste na adição de 2 mg de Pp IX durante o crescimento da camada de sílica adicionando-se o FS ao meio reacional descrito em 3.2.2. O processo de lavagem foi realizado até total remoção do excesso de Pp IX detectável por UV-Vis. Para a segunda e terceira metodologias empregadas foi realizada uma modificação prévia da Pp IX com APTES (Rossi, Silva *e col.*, 2008; Silva, 2008). Para tanto, 100 mg de Pp IX (0,2 mmol) e 2 mL de cloreto de oxalila (23 mmol) foram refluxados sob atmosfera de nitrogênio por 30 min, resultando assim em uma

solução de cor roxo escuro. O excesso adicionado de cloreto de oxalila foi removido por destilação a vácuo. Desta forma foi obtida a dicloro Pp IX, a qual foi adicionado excesso de APTES (1 mL, 4 mmol) e a mistura foi mantida por 2 horas sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio. O FS modificado foi denominado Pp IX Sil.

A segunda metodologia empregada para a imobilização da Pp IX foi realizada por meio da adição de 100 μ L de Pp IX Sil em 100 mL de etanol contendo uma suspensão de MagSil (130 mg) sob agitação magnética. Após 24 h, o material obtido foi separado por centrifugação e lavado com etanol até total remoção do excesso de FS detectável por UV-Vis. O material obtido com essa metodologia foi denominado MagSilPpIX_pós.

A terceira metodologia empregada consiste na adição da Pp IX Sil durante o crescimento da camada de sílica. O mesmo procedimento descrito em 3.2.2 foi empregado, com as seguintes quantidades adicionadas nessa ordem: 10 mL ciclo-hexano, 588 mg IGEPAL CO-520 (1,3 mmol), 0,6 mg de Mag (713 μ L, 0,8 mg mL⁻¹ em ciclo-hexano), 83 μ L de solução de amônia (29 %, 2 mmol), 48 μ L TEOS (0,2 mmol) e 10 μ L de Pp IX Sil recém preparada. O procedimento de lavagem foi realizado até total remoção do excesso de Pp IX detectável por UV-Vis. O material obtido foi denominado MagSilPpIX.

3.2.3.5. Imobilização de clorofilina (Clf)

A imobilização de Clf foi realizada por meio de duas metodologias. A primeira consiste na adição de Clf durante o crescimento da camada de sílica adicionando-se o FS ao meio reacional descrito em 3.2.2, até obter uma absorbância de 0,9 em 650 nm (determinado por espectroscopia no UV-Vis em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm). Para a

segunda metodologia empregada foi realizado uma modificação prévia da Clf, como a realizada para a Pp IX. A modificação realizada consiste na funcionalização da Clf com APTES. Para tanto, 10 mg de Clf ($1,7 \times 10^{-5}$ mol), 0,5 mL de cloreto de tionila (7 mmol) e uma gota de DMF seco foram mantidos sob agitação magnética em um banho de gelo e sob atmosfera de nitrogênio por 2 h. O excesso de cloreto de tionila e DMF foram removidos por destilação a vácuo. Desta forma foi obtida a tricloro Clf. Ao sólido obtido foi então adicionado excesso de APTES (1 mL, 4 mmol) e a mistura foi mantida sob agitação magnética e atmosfera de nitrogênio por 2 horas. O máximo possível de excesso de APTES foi removido por destilação a vácuo. O FS modificado foi denominado Clf Sil.

A segunda metodologia empregada consiste na adição da Clf Sil durante o crescimento da camada de sílica. Inicialmente, 10 μ L de Clf Sil recém preparada foram adicionados a mistura de 10 mL de ciclo-hexano e 588 mg de IGEPAL CO-520 (1,3 mmol). Neste caso, a quantidade de FS adicionada não foi totalmente solúvel e o excesso foi removido por centrifugação. Seguindo o procedimento descrito em 3.2.2 foram adicionados 0,6 mg de Mag (713 μ L, 0,8 mg mL⁻¹ em ciclo-hexano), 83 μ L de solução de amônia (29 %, 2 mmol), 48 μ L TEOS (0,2 mmol). O procedimento de lavagem foi realizado como descrito em 3.2.2, sendo que não foi possível detectar por UV-Vis a presença de FS na solução de lavagem. O material obtido foi denominado MagSilClf.

3.2.4. Estudos da interação do FS imobilizado

Para estudar o comportamento dos FS após a imobilização na camada de sílica foram realizados dois testes, a supressão da fluorescência com íons brometo e a supressão da

geração de oxigênio singlete com albumina de soro bovino (BSA). Nanoesferas de sílica contendo hematoporfirina IX (Hp IX), um material sintetizado e caracterizado em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Silva, 2008), foram utilizadas por apresentarem elevada eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ (η) ($\eta_{\Delta} = 0.60 \pm 0.04$). O procedimento de síntese empregado é uma adaptação da metodologia descrita por Roy e colaboradores (Roy, Ohulchanskyy *e col.*, 2003) para a imobilização de HPPH empregando uma microemulsão com AOT e os precursores de sílica APTES e TEVS. Tipicamente, 0,44 g de AOT (1 mmol) e 800 μL de 1-butanol (9 mmol) foram adicionados a 20 mL de água deionizada sob agitação magnética. Após alguns minutos, 30 μL de TEVS (0,1 mmol) e 30 μL de solução de Hp IX em DMF (15 mmol L^{-1}) foram adicionados. Após uma hora de agitação, foram adicionados 10 μL de APTES (4×10^{-2} mmol) e a microemulsão foi mantida sob agitação magnética por mais 20 horas. A purificação do sólido obtido foi realizada por diálise contra água destilada durante 4 dias com troca diária da água. O material obtido foi denominado SilHp.

3.2.4.1. Supressão da geração de $^1\text{O}_2$ com albumina de soro bovino (BSA)

O efeito da adição de BSA na geração de $^1\text{O}_2$ pelo FS imobilizado em sílica pode ser observado comparando-se os espectros de emissão característico do $^1\text{O}_2$ obtidos após fotoexcitação em 405 nm de uma suspensão de SilHp e uma solução de Hp IX com os espectros obtidos após a adição de BSA. As amostras foram preparadas em uma mistura contendo óxido de deutério (70%) e água destilada (30%), sendo a concentração de Hp IX determinada em 2 μM , em ambas as soluções, por UV-Vis. Foram obtidos os espectros de emissão de $^1\text{O}_2$ para as amostras sem a presença de BSA. Então, adicionou-se uma quantidade suficiente de BSA

para obter soluções com concentração de 100 μM de BSA e, novamente, foi registrado o espectro de emissão de cada amostra.

3.2.4.2. Supressão de fluorescência com íons brometo

O efeito da presença de íons brometo na fluorescência de amostras contendo uma solução aquosa de Hp IX e uma suspensão aquosa da SilHp foi investigado. Leituras de intensidade de fluorescências das amostras de Hp IX livre e imobilizada, na ausência e na presença de diferentes concentrações de íons brometo, foram obtidas em um leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech). Os experimentos foram realizados em uma microplaca de 96 poços, onde as amostras de Hp IX e SilHp foram tratadas com brometo de sódio em concentração variando de 1 a 0,016 mol L^{-1} .

Com os valores de intensidade de emissão obtidos foi construído um gráfico da razão de intensidade de fluorescência na ausência de supressor pela intensidade de fluorescência na presença de supressor em função da concentração do supressor, de acordo com a equação 3.1, onde F é a intensidade de fluorescência, Q é a concentração de íons brometo e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer. A partir do coeficiente linear pode-se determinar a constante de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência. A facilidade com que o supressor interage com o FS está diretamente correlacionada com essa constante.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv} [Q] \quad \text{Equação 3.1}$$

3.3. Técnicas de análise

3.3.1. Microscopia Eletrônica

3.3.1.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A técnica de MET consiste em um feixe elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, localizados em uma coluna com uma pressão de 10^{-5} mmHg. Os elétrons que atravessam a amostra são recebidos por uma lente objetiva, que irá formar a imagem. As próximas lentes servem para ampliar a imagem formada. O feixe de elétrons pode ser acelerado de 50 a 1000 kV e quanto maior a aceleração do feixe maior é a profundidade capaz de ser transpassada. Os equipamentos utilizados para observação de materiais metálicos, cerâmicos e poliméricos comumente dispõem de aceleração de 200 kV e a observação de materiais biológicos utiliza-se uma tensão de 60 a 80 kV.

As imagens de MET foram obtidas em um microscópio Philips CM 200 operando com uma voltagem de aceleração de 200 kV (IF-USP). As amostras foram preparadas colocando-se uma gota de amostra suspensa em solvente adequado, em uma grade de cobre revestido com carbono, aguardando que a amostra secasse em contato com o ar.

O tamanho médio das nanopartículas foi estimado por meio da medida de duas dimensões de maior número possível de nanopartículas, com o auxílio do programa Image Tool for Windows 3.0, e pela construção de histogramas de distribuição de tamanho. O tamanho médio e a dispersão de tamanhos foram obtidos pelo ajuste dos histogramas a funções Gaussiana ou Lognormal.

3.3.2. Caracterização da geração de Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$)

3.3.2.1. Método direto

A geração de oxigênio singlete por um FS foto-excitado pode ser caracterizada pelo espectro de emissão característico na faixa do infravermelho próximo com máximo em 1270 nm e pelo tempo de vida estimado a partir do transiente de emissão em 1270 nm. O transiente de emissão e o espectro de emissão foram obtidos com um sistema de detecção de fluorescência no infravermelho próximo montado pela Edinburg Analytical Instruments. O equipamento é composto por um laser Nd:YAG (Corinum Surelite III) para excitação em 532 nm ou um laser para excitação em 650 nm (Morgotron) e uma fotomultiplicadora (NIR-Hamatsu Co. R5509). A radiação emitida pela amostra foto-excitada, antes de ser detectada pela fotomultiplicadora, passou por um filtro de interferência e um monocromador, como representado na figura 3.1 (Junqueira, Severino *e col.*, 2002; Severino, Junqueira *e col.*, 2003).

Figura 3.1 – Sistema de detecção de $^1\text{O}_2$.

A eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ de um FS imobilizado pode ser determinada pelo método direto, empregando-se uma solução do FS imobilizado e um padrão contendo um FS livre, ambos com mesma absorbância no comprimento de onda de excitação. Para tanto, são registradas as intensidades de emissão em 1270 nm após foto-excitação das duas amostras. A eficiência de geração de $^1\text{O}_2$, que é diretamente proporcional à intensidade de emissão, pode ser calculada pela equação 3.2.

$$\eta_{\Delta\text{Partícula}} = \Phi_{\text{Padrão}} \times \frac{I_{\text{Partícula}}}{I_{\text{Padrão}}} \quad \text{Equação 3.2}$$

Onde $I_{\text{Padrão}}$ e $I_{\text{Partícula}}$ são as intensidades de emissão de $^1\text{O}_2$ em 1270 nm, $\Phi_{\text{Padrão}}$ é o rendimento quântico do padrão e $\eta_{\Delta\text{Partícula}}$ é a eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ do FS imobilizado.

3.3.2.2. Método Indireto

A geração de oxigênio singlete por um FS foto-excitado pode ser caracterizada por um método indireto empregando-se uma sonda química. Spiller e colaboradores (Spiller, Kliesch e col., 1998) empregaram a sonda química 1,3-Difenilisobenzofurano (DPBF) para determinar o rendimento quântico e caracterizar a geração de $^1\text{O}_2$ para uma série de FS. A sonda química DPBF reage irreversivelmente com o $^1\text{O}_2$, gerado pela foto-excitação do FS, formando um endoperóxido (figura 3.2). Essa reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pelo desaparecimento da banda de absorção característica, em torno de 400 nm, da sonda DPBF, uma vez que a espécie formada não absorve nessa região.

Figura 3.2 – Reação de 1,3-Difenilisobenzofurano com $^1\text{O}_2$.

A eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ pode ser determinada por esse método utilizando-se soluções do FS imobilizado e de um FS padrão de mesma absorção no comprimento de onda de excitação. Um laser deve ser adaptado para irradiar a solução contendo o FS por um determinado tempo. O decaimento da absorbância da sonda deve ser acompanhado com o tempo de irradiação, o que permite construir um gráfico de absorbância versus tempo, representando o consumo de DPBF pelo $^1\text{O}_2$. A curva pode ser aproximada a um decaimento exponencial de primeira ordem, assim obtendo-se o tempo de decaimento (t). Como as duas soluções apresentam a mesma absorção, pode-se aplicar a equação 3.3, que correlaciona os tempos de decaimento do padrão e do FS imobilizado (Tada, Vono *e col.*, 2007). Na equação temos que: $\Phi_{\text{padrão}}$ é o rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$ do padrão, $\eta_{\Delta\text{partícula}}$ é a eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ determinado e t os tempos de decaimento.

$$\eta_{\Delta\text{partícula}} = \phi_{\text{padrão}} \times \frac{t_{\text{padrão}}}{t_{\text{partícula}}} \quad \text{Equação 3.3}$$

3.3.3. Medidas Magnéticas

O princípio de funcionamento do magnetômetro SQUID é o efeito Josephson e a quantização de fluxo magnético em um circuito fechado. O efeito Josephson se caracteriza pela condição supercondutora de uma barreira de potencial, ou junção, quando abaixo de uma corrente crítica. Quando o circuito se encontra em estado supercondutor a resistência é nula, desta forma a tensão medida nos terminais é nula mesmo quando polarizado por corrente elétrica. Dado um valor de corrente superior à crítica, a junção transita para o estado normal levando a detecção de tensão não nula. O valor de corrente crítica do magnetômetro é dado em função do fluxo magnético aplicado, demonstrando uma periodicidade equivalente ao quantum de fluxo $h/2e$, onde e é a carga do elétron e h é a constante de Plank. Desta forma a medida da variação da corrente crítica permite a determinação da variação de fluxo que atravessa o dispositivo.

As análises foram realizadas em um SQUID da Quantum Design (Prof. Renato F. Jardim IF-USP). Curvas de magnetização para amostras selecionadas de nanomateriais magnéticos foram obtidas com campos magnéticos aplicados de -70 a 70 kOe e com temperatura de 300K.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese dos núcleos magnéticos

4.1.1. Método da co-precipitação

O método de síntese de nanopartículas de magnetita por co-precipitação (Mag) é simples e rápido. A reação ocorre logo que uma mistura de cloretos de ferro(II) e ferro(III) é adicionada à solução de amônia formando um precipitado preto, o qual pode ser facilmente separado do meio com o auxílio de um ímã. Cuidados com a manipulação da solução de cloreto de ferro(II) são necessários para evitar a oxidação a ferro(III). O tratamento desse material com o estabilizante ácido oléico é igualmente simples e torna as nanopartículas de magnetita hidrofóbicas. Após a remoção do excesso de estabilizante, o material foi disperso em solventes orgânicos apolares, como ciclo-hexano e tolueno. O revestimento com ácido oléico impede a agregação das nanopartículas devido ao impedimento estérico causado pelas cadeias carbônicas dos ácidos, que se encontram coordenados pelo grupo carboxilato aos átomos de Fe^{3+} superficiais.

A figura 4.1 apresenta uma micrografia obtida por MET da amostra Mag e o histograma de distribuição de tamanho, ajustado a uma função lognormal, que demonstra uma distribuição monomodal e um tamanho médio de 10 nm ($\sigma = 0,36$). Pode-se observar na micrografia que as partículas apresentam morfologia esférica, porém não bem definida.

Figura 4.1 – Micrografia obtida por MET das nanopartículas de magnetita e histograma de distribuição de tamanhos ajustado a uma função lognormal.

A figura 4.2 apresenta a curva de magnetização de uma amostra de Fe_3O_4 preparada pelo método da co-precipitação. O material apresenta comportamento superparamagnético e magnetização de saturação de 62 emu g^{-1} , o que corresponde a 67 % do valor para magnetita “bulk” (Schwertmann e Cornell, 1996). A redução da magnetização de saturação observada pode estar relacionada à possível oxidação de sítios de ferro(II). Apesar dos cuidados despendidos durante a síntese, como uso de atmosfera de N_2 e solução ácida de cloreto de ferro(II), o procedimento pode propiciar a oxidação da magnetita. Efeitos como a desordem de spin na superfície das nanopartículas podem reduzir a magnetização de saturação em nanopartículas (Martinez, Obradors *e col.*, 1998). No caso da magnetita, coordenação incompleta e/ou vacâncias de oxigênio são atribuídas como causa na desordem de spin na superfície (Berkowitz, Kodama *e col.*, 1999). Assim, a magnetização de saturação assume valores menores quando aumentada a relação área superficial por volume (Caizer, 2005).

A presença do ácido oléico na superfície do material também deve induzir a uma redução da magnetização de saturação, pois a magnetização apresentada é relativa à massa total da amostra. O percentual em massa de ácido oléico na amostra é de 13,5 %, determinado por análise elementar de CHN. A magnetização de saturação corrigida de massa da amostra para massa magnética é 72 emu g^{-1} . Esse valor representa 78 % da magnetização de saturação da magnetita “bulk”. Segundo Barbeta e colaboradores (Barbeta, Jardim *e col.*, 2010), o revestimento de nanopartículas com ácido oléico resulta em valores maiores de magnetização de saturação devido à redução da desordem de spin da superfície.

Figura 4.2 – Curva de magnetização da Mag com temperatura em 300 K.

4.1.2. Método da decomposição térmica

A síntese de nanopartículas de magnetita pelo método da decomposição térmica ($\text{Mag}_{\text{termo}}$) é bem mais trabalhosa que pelo método da co-precipitação. O procedimento de

lavagem e separação do material obtido do meio reacional é mais complexo e dispendioso, sendo necessária adição de grande quantidade de etanol e longas etapas de centrifugação. O material obtido, porém, apresenta morfologia e dispersão de tamanho mais uniformes que o material Mag. O Mag_{termo} após todos os procedimentos de síntese, separação e lavagem pode ser prontamente disperso em solventes orgânicos apolares, como ciclo-hexano e tolueno, uma vez que os estabilizantes ácido oléico e oleilamina são adicionados durante a etapa de síntese.

A figura 4.3 apresenta uma micrografia obtida por MET da amostra Mag_{termo} exibindo morfologia esférica bem definida. O histograma de distribuição de tamanho, ajustado a uma função gaussiana, resulta em uma distribuição monomodal com diâmetro médio de $7,4 \pm 1,2$ nm.

Figura 4.3 – Micrografia obtida por MET do Mag_{termo} e distribuição de tamanho ajustada a uma função gaussiana.

A curva de magnetização da amostra Mag_{termo} obtida em 300 K evidencia um comportamento superparamagnético caracterizado pela ausência de histerese (figura 4.4). O material Mag_{termo} apresenta um percentual de material orgânico de 24 %, determinado por

análise elementar de CHN. A magnetização de saturação a 300 K, já corrigida por massa de material magnético, é 80 emu g^{-1} , correspondendo a, aproximadamente, 87% da magnetização de saturação da magnetita “bulk” (Schwertmann e Cornell, 1996).

Figura 4.4 – Curvas de magnetização do $\text{Mag}_{\text{termino}}$ em 300 K.

Embora seja esperado que o aumento da razão área/volume leve à redução da magnetização de saturação (Caizer, 2005), esse fato não pode ser observado para os materiais preparados. De fato, foi observado um aumento de 6 emu g^{-1} para o material com menor diâmetro. O fato da magnetização de saturação não ter sido reduzida devido ao menor diâmetro do $\text{Mag}_{\text{termino}}$ pode estar relacionado à morfologia mais definida e, principalmente, à menor suscetibilidade à oxidação do $\text{Mag}_{\text{termino}}$ durante as etapas de síntese e lavagem. No procedimento de síntese usado, a superfície do nanomaterial já fica protegida pelo estabilizante na primeira etapa, o que promove uma maior estabilidade química às nanopartículas de magnetita frente à oxidação. As soluções em ciclo-hexano de Mag e $\text{Mag}_{\text{termino}}$ podem ser estocadas por alguns meses sem apresentar oxidação aparente. Já um

material magnético preparado por co-precipitação e estabilizado em água com hidróxido de tetraetilamônio (Tada, Vono *e col.*, 2007) em algumas semanas apresenta uma coloração castanha, que indica a oxidação da magnetita.

O $\text{Mag}_{\text{termo}}$ não pode ser utilizado como o núcleo magnético empregado nesse trabalho, pois, embora apresente morfologia mais uniforme, não foi possível revestir esse material com sílica utilizando a metodologia da microemulsão reversa, como descrita em 3.2.2. A figura 4.5 apresenta uma micrografia obtida por MET para a tentativa de revestimento de $\text{Mag}_{\text{termo}}$ com sílica. Nessa micrografia pode-se observar que o procedimento de microemulsão resultou em uma mistura de nanopartículas de sílica sem núcleo magnético e nanopartículas de $\text{Mag}_{\text{termo}}$ por fora das esferas de sílica.

Figura 4.5 – Micrografia obtida por MET da tentativa de revestimento de $\text{Mag}_{\text{termo}}$ com sílica por microemulsão.

A dificuldade encontrada no revestimento do $\text{Mag}_{\text{termo}}$ com sílica pode estar associada ao estabilizante. Segundo Vogt e colaboradores (Vogt, Toprak *e col.*, 2010), o revestimento ocorre inicialmente com a formação de núcleos magnéticos hidrofílicos, por meio da troca do estabilizante por TEOS parcialmente hidrolisado, como esquematizado na figura 4.6. A

substituição do estabilizante por TEOS parcialmente hidrolisado é essencial para o revestimento com sílica, pois de outro modo os núcleos não permeiam a micela reversa, local onde ocorre a condensação da camada de sílica. O método de síntese do $\text{Mag}_{\text{termo}}$ promove a coordenação de uma grande quantidade de estabilizante à superfície da magnetita quando comparado com o método da co-precipitação, o que pode dificultar a etapa de troca do estabilizante.

Figura 4.6 – Troca do ligante no revestimento de Mag com sílica.

Barbeta e colaboradores estudaram a influência dos estabilizantes nas propriedades magnéticas de nanopartículas de magnetita sintetizadas por decomposição térmica usando a mesma metodologia apresentada em 3.2.1.3 (Barbeta, Jardim *e col.*, 2010). Nesse trabalho, a remoção de parte do estabilizante foi realizada através de refluxo em acetona por 2 horas, porém o percentual de estabilizante determinado nas amostras preparadas caiu de 24 % na amostra original para 22 % na amostra refluxada em acetona. Isso evidencia a dificuldade encontrada para a remoção do excesso de estabilizante.

As nanopartículas magnéticas preparadas por co-precipitação, que apresentam 13,5 % de ácido oléico, foram selecionadas para a continuidade deste trabalho. Essa escolha deve-se ao fato dos materiais apresentarem propriedades magnéticas semelhantes, pela simplicidade da síntese e pela possibilidade de revestimento com sílica.

4.2. Revestimento com sílica

4.2.1. Revestimento por meio de microemulsão reversa

O método de revestimento de Mag com sílica por meio de microemulsão reversa foi escolhido de forma a obter um material com morfologia esférica bem definida. O revestimento com sílica realizado anteriormente em nosso grupo (Rossi, Silva *e col.*, 2007; Tada, Vono *e col.*, 2007) ocorria por meio de uma modificação do método de Stöber apresentada por Philipse e colaboradores (Philipse, Vanbruggen *e col.*, 1994). Essa metodologia resultava em um revestimento com tendência a formação de esferas, porém com um alto grau de aglomeração, como pode ser observado na figura 4.7.

Figura 4.7 – Micrografia obtida por MET de magnetita revestida com sílica por modificação do método de Stöber.

As etapas seguidas para o revestimento de Mag com sílica por microemulsão reversa (MagSil) são apresentadas na figura 4.8. Inicialmente o surfactante IGEPAL CO-520 é dissolvido no solvente ciclo-hexano até formar uma solução transparente. Os núcleos magnéticos dispersos em ciclo-hexano são adicionados sem perturbar a solução. Em seguida, TEOS e finalmente uma solução de amônia são adicionados ao meio reacional. Após 48 horas, o nanomaterial magnético obtido foi separado com metanol e lavado com etanol.

Figura 4.8 – Esquema da síntese de magnetita revestida com sílica via microemulsão.

A figura 4.9 apresenta a micrografia obtida por MET para a amostra MagSil juntamente com o histograma de distribuição de tamanho ajustado a uma função gaussiana. O procedimento de revestimento de Mag com sílica por microemulsão reversa resultou em um material de alta qualidade, pois apresenta morfologia definida e, diferentemente do material

da figura 4.7, não há a formação de aglomerados. As esferas sintetizadas apresentam um diâmetro médio de 66 ± 6 nm, contando com uma camada de sílica de aproximadamente 25 nm e núcleos magnéticos de aproximadamente 10 nm.

Figura 4.9 – Micrografia obtida por MET de magnetita revestida com sílica via microemulsão.

A curva de magnetização da amostra MagSil obtida em 300 K (figura 4.10) comprova que o material apresenta comportamento superparamagnético e uma magnetização de saturação de 6 emu g^{-1} , o que representa aproximadamente 6 % do valor tabelado para a magnetita “bulk” (Schwertmann e Cornell, 1996) e 10 % do valor medido para os núcleos magnéticos (Mag). A redução da magnetização de saturação observada para o MagSil refere-se ao ganho de massa diamagnética após o revestimento com sílica.

Figura 4.10 – Curva de magnetização de MagSil.

4.2.1.1. Controle do tamanho de camada

Para o emprego desses nanomateriais em PDT, o diâmetro é um parâmetro importante, pois para um tratamento eficaz é indicado o uso de nanopartículas com tamanho inferior a 100 nm, sendo ideal diâmetro inferior a 50 nm. Nanopartículas nessas dimensões são eficazes, pois apresentam um volume de distribuição comparável ao FS empregado na forma livre (Chatterjee, Fong *et al.*, 2008).

O controle da camada pode ser realizado pela mudança de diferentes fatores, como tempo de reação, precursor de sílica (quantidade e estrutura), proporção solvente/surfactante/água, temperatura, etc. Com exceção do tempo de reação e do precursor de sílica utilizado, todos os outros fatores citados que afetam o tamanho das esferas de sílica estão relacionados à formação e tamanho das micelas. A formação de micelas é uma condição específica, onde a simples mudança no solvente, no surfactante ou nas proporções dos

reagentes pode levar à formação de micelas menores ou maiores, ou mesmo levar à formação de outras estruturas entre o solvente e o surfactante (Winsor, 1948).

A mudança do solvente foi realizada utilizando-se as mesmas proporções descritas em 3.2.2, havendo apenas a mudança de 100 mL de ciclo-hexano por 100 mL de n-hexano. A figura 4.11 apresenta uma micrografia obtida por MET da MagSil preparada em n-hexano e um histograma de distribuição de tamanho ajustado a uma função gaussiana. O tamanho médio das esferas obtidas foi de 47 ± 8 nm, com uma camada de sílica de 17 nm, o que significa uma redução de 8 nm da camada de sílica pela troca do solvente.

Figura 4.11 – Micrografia obtida por MET de MagSil preparadas em n-hexano

Uma forma de reduzir ainda mais o tamanho da camada de sílica foi a diminuição do tempo de reação. A figura 4.12 apresenta uma micrografia obtida por MET do MagSil preparado em 12 horas juntamente com um histograma de distribuição de tamanho, ajustado a uma função gaussiana, demonstrando que o material resultante apresenta morfologia esférica definida e tamanho médio de 35 ± 6 nm. Igualmente ao material sintetizado em 48 horas, esse

material apresenta uma distribuição monomodal e não apresenta formação de aglomerados. A camada de sílica no MagSil preparado em 12 horas tem aproximadamente 10 nm, correspondendo a uma redução de 15 nm quando comparado com o material preparado em 48 horas.

Figura 4.12 – Micrografia obtida por MET de MagSil com tempo de reação de 12 horas e um histograma de distribuição de tamanho ajustado a uma função gaussiana.

As propriedades magnéticas do material obtido com 12 horas de reação não apresentaram um aumento muito significativo da magnetização de saturação por massa total de material, mesmo tendo a camada de sílica sido reduzida em aproximadamente 15 nm. A magnetização de saturação em 300 K passou de 6 emu g⁻¹ no MagSil preparado em 48 horas (figura 4.10) para 9 emu g⁻¹ no MagSil preparado em 12 horas (figura 4.13).

Figura 4.13 – Curva de magnetização de MagSil preparado em 12 horas de reação.

Os estudos realizados de controle de camada de sílica servem para demonstrar a versatilidade do método de revestimento de núcleos magnéticos e a possibilidade do controle do tamanho das esferas de sílica formadas. Para realizar a imobilização dos FS foi selecionado o material preparado utilizando-se como solvente ciclo-hexano e tempo de reação de 48 horas, pois esse material apresenta a maior camada de sílica, o que deve aumentar a quantidade de FS que pode ser imobilizado.

4.3. Imobilização dos fotossensibilizadores

4.3.1. Imobilização de fenotiazínicos

4.3.1.1. Azul de metileno

A imobilização do FS azul de metileno via microemulsão foi realizada durante o processo de crescimento da camada de sílica. O foto-fármaco AM foi dissolvido na solução de amônia antes de ser adicionada ao meio reacional, realizando uma adaptação da metodologia de microemulsão reversa descrita em 3.2.2. A figura 4.14 apresenta o espectro eletrônico de absorção obtido para uma suspensão do sólido, denominado MagSilAM, em acetonitrila (curva B). O espectro eletrônico de absorção do FS imobilizado é dominado por uma banda de absorção abaixo de 600 nm, característica de dímeros de AM (Junqueira, Severino *e col.*, 2002; Zhang, Li *e col.*, 2004; Tada, Vono *e col.*, 2007). O monômero do AM livre em acetonitrila apresenta máximo de absorção em 650 nm (curva A). O procedimento de lavagem do material foi realizado até o FS não ser detectável no sobrenadante por UV-Vis. Assim, a obtenção de um espectro eletrônico de absorção característico de espécies de AM em uma suspensão do sólido, e ausência de sinal no sobrenadante, são fortes indícios da imobilização do FS na camada de sílica.

Figura 4.14 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) solução de AM em acetonitrila, e suspensões de (B) MagSilAM e de (C) MagAM, ambos em acetonitrila.

A geração de $^1\text{O}_2$ pelo FS imobilizado foi investigada tanto pelo método indireto, utilizando-se a sonda 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) e irradiação em 532 nm, quanto pelo método físico direto, pela determinação do espectro de emissão característico do $^1\text{O}_2$ com máximo em 1270 nm. Infelizmente, nenhuma geração de $^1\text{O}_2$ pode ser detectada. A baixa ou nula geração de $^1\text{O}_2$ pelo material sintetizado pode estar associada ao estado de agregação do AM, como observado para o material reportado por Tada e colaboradores (Tada, Vono *et al.*, 2007), aqui denominado MagAM. A curva C da figura 4.14 apresenta o espectro eletrônico de absorção de uma suspensão de MagAM em acetonitrila. Pode-se observar que os materiais MagSilAM e MagAM apresentam espectros muito semelhantes e característicos de dímeros de AM.

O estado de agregação do AM leva a uma redução da geração de $^1\text{O}_2$ pelo mecanismo apresentado na figura 4.15. Uma molécula de AM (AM^+) absorve energia passando ao estado excitado singlete ($^1\text{AM}^+$). O processo de relaxamento pode ocorrer via fluorescência (ϕ_f) ou ocorrer um cruzamento intersistemas gerando o estado excitado tripleto ($^3\text{AM}^+$), que transfere

energia ao oxigênio molecular gerando o $^1\text{O}_2$ (mecanismo Tipo II). Por outro lado, a molécula dimerizada ($(\text{AM})_2^{2+}$) quando excitada decai através de um mecanismo radicalar, não gerando $^1\text{O}_2$ (mecanismo Tipo I) (Junqueira, Severino *e col.*, 2002).

Figura 4.15 – Mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio por azul de metileno. Imagem retirada da referência Junqueira e col. 2002.

A primeira hipótese levantada é que as metodologias de imobilização de azul de metileno utilizadas (métodos de preparo de MagSilAM e MagAM) não propiciavam a imobilização do FS em sua forma monomérica, pois foram realizadas adições de grande quantidade de AM no meio reacional. No caso do MagAM, porém, foi realizado um estudo empregando-se diferentes massas de AM, como mostra a tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Otimização da massa adicionada de AM para imobilização por sol-gel.

Entrada	Etanol /mL	Solução de amônia /mL	TEOS /μL	Azul de metileno /mg
A	75,0	3,4	80	0,5
B				1,0
C*				2,5
D				5,0

* A entrada C corresponde ao material MagAM.

As quantidades de AM usados nas entradas A e B também levaram à imobilização do AM na forma dimérica, com espectros eletrônicos de absorção similares ao da amostra C, apenas com bandas de menor intensidade. Desta forma, a entrada C foi escolhida mesmo apresentando a imobilização de dímeros, pois não parecia haver uma dependência com a concentração inicial, mas sim do modo como as moléculas de AM se organizavam ao serem imobilizadas no sólido. A entrada D foi descartada, pois a quantidade de AM presente na reação levou a um processo de lavagem muito dispendioso, tanto em gasto com tempo, como com solvente.

A adição de diferentes massas de AM na microemulsão também não resultou em imobilização do FS em sua forma monomérica. Segundo Spencer e colaboradores (Spencer e Sutter, 1979) a formação do dímero de AM apresenta uma entalpia de $-19,9 \pm 2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, sendo então o processo de dimerização espontâneo. A imobilização do AM na camada de sílica pode levar a um aumento da estabilidade do dímero, pois a mobilidade do FS fica limitada e as cargas positivas das moléculas de AM são contrapostas pela carga negativa da sílica.

Uma tentativa de imobilizar o AM na forma monomérica consistiu na impregnação de AM, a partir de uma solução diluída, em esferas de sílica MagSil previamente sintetizadas. Inicialmente foi preparada uma solução aquosa de AM com concentração de $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, o que leva a uma solução com equilíbrio direcionado à forma monomérica (Zhang, Li *e col.*, 2004). Após o procedimento de impregnação o material obtido (MagSilAMad) foi lavado com água até total remoção do excesso de AM detectável por UV-Vis. O material foi denominado MagSilAMad.

A figura 4.16 apresenta o espectro eletrônico de absorção obtido para uma suspensão aquosa de MagSilAMad (curva A) caracterizado por máximos em 610 e 664 nm, que podem ser atribuídos, respectivamente, ao dímero e ao monômero de AM. Esse resultado indica que a

sílica induz a imobilização do azul de metileno na forma de dímeros, o que vai de acordo com as observações realizadas para MagAM, onde mesmo com a menor massa adicionada de AM, o espectro eletrônico de absorção obtido indicava imobilização de dímeros. Adotando-se os coeficientes de absortividade molar em 664 nm para o monômero de AM em água como $7,57 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zhang, Li *e col.*, 2004) e em 610 nm para o dímero de AM em água como $9,06 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Spencer e Sutter, 1979), um grau de dimerização de aproximadamente 60 % foi provocado pelo efeito da imobilização em sílica por adsorção. Esse resultado corrobora a imobilização de dímeros de AM, independentemente da quantidade de FS adicionada em todas as tentativas nas quais foi possível registrar o espectro eletrônico de absorção de uma suspensão dos materiais contendo o FS imobilizado.

Figura 4.16 – Espectros eletrônicos de absorção de uma suspensão de MagSilAMad (A) água (2 mL), e após adição de (B) 200 de μL e (C) 400 μL de acetonitrila.

A adição de acetonitrila leva ao aumento da banda característica do monômero (figura 4.16 curvas B e C), porém isso é devido à liberação do FS da camada de sílica. Após a adição de acetonitrila, o material foi centrifugado e o sobrenadante apresentava coloração azulada,

causada pela presença de AM em solução, comprovada pelo espectro eletrônico de absorção registrado para o sobrenadante. A liberação do FS pode ser observada também quando o material foi disperso em meio de cultura Dulbecco's MEM alta glicose incolor. Sendo assim, o material não tem potencial para aplicação em PDT, pois a liberação do FS ocorre imediatamente após a adição de meio de cultura. Caso fosse possível medir a liberação em função do tempo, o material poderia ser utilizado como uma nanoplataforma de entrega de AM, porém a liberação do FS é imediata.

A imobilização de FS por ligações covalentes à camada de sílica é uma metodologia promissora para evitar a liberação da droga da camada de sílica (Hulchanskyy, Roy *e col.*, 2007; Rossi, Silva *e col.*, 2008; Silva, 2008; Zhang, Wu *e col.*, 2009). Infelizmente, o AM não apresenta grupos que permitam modificação simples de sua molécula (figura 4.17). Desta forma, outros compostos fenotiazínicos, por exemplo, tionina e Azure A, são mais promissores para imobilização por ligação covalente.

Figura 4.17 – Estrutura do azul de metileno.

4.3.1.2. Tionina

A molécula de tionina apresenta os grupos amina desmetilados (Figura 4.18), sendo possível sua imobilização ligações covalentes utilizando-se glutaraldeído como molécula de ligação.

Figura 4.18 – Estrutura do FS tionina.

A imobilização da tionina para preparação do MagSilTio foi realizada em três etapas, conforme o esquema da figura 4.19. O material MagSilNH₂, que contém grupos amina na superfície, foi submetido a excesso de glutaraldeído, para evitar que os dois grupos carbonílicos do glutaraldeído reagissem com os grupos amina da MagSilNH₂, ficando um grupo aldeído disponível para a ligação da tionina. As amins primárias da tionina reagem com os grupos aldeído formando novas ligações imina (C=N), que são reduzidas para aumentar a estabilidade das ligações formadas.

Figura 4.19 – Etapas de síntese do MagSilTio.

O espectro eletrônico de absorção de uma suspensão aquosa de MagSilTio (figura 4.20 curva A) não apresenta a banda de absorção característica da tionina (curva B).

Figura 4.20 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) uma suspensão aquosa de MagSilTio e de (B) uma solução aquosa de tionina.

Os estudos de detecção de $^1\text{O}_2$, realizados pelos métodos direto e indireto, não permitiram caracterizar a geração de $^1\text{O}_2$ pelo MagSilTio. O procedimento para a imobilização da tionina seguiu o reportado por Tada (Tada, 2007) que emprega sílica Cab-O-Sil L-90 da Cabot Corporation e preparou um material com Tio imobilizada com eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ de $0,05 \pm 0,01$ (método direto) e 0,08 (método indireto). Esses valores são condizentes com os observados para o material MagAM e na imobilização da Tio em sílica Cab-O-Sil L-90 também foi observada a formação de dímeros.

É provável que uma quantidade muito pequena de Tio tenha sido imobilizada no sólido MagSilTio, em comparação com a sílica Cab-O-Sil L-90, apesar dos dois procedimentos serem semelhantes. Essa diferença na imobilização do FS pode ser explicada pela menor disponibilidade dos grupos $-\text{NH}_2$ da superfície do MagSilNH₂ em comparação com a sílica Cab-O-Sil L-90. Esta apresenta uma superfície com grande quantidade de grupos hidroxila (Tada, 2007), o que facilita a funcionalização com APTES.

Como não houve sucesso na imobilização de Tio em MagSil pela metodologia passo a passo apresentada na figura 4.19, optou-se por realizar a modificação prévia do FS com um organossilano para obter um FS sililado. A opção de modificar o FS previamente à imobilização em sílica deve facilitar a imobilização de maiores quantidades de FS. Essa modificação foi realizada no FS Azure A.

4.3.1.3. Azure A

O Azure A é um FS pertencente à classe dos fenotiazínicos com estrutura semelhante ao AM e a Tio, pois apresenta em uma extremidade da molécula um grupo amina terciária e na outra um grupo amina primária, que propicia a modificação do FS. A figura 4.21 apresenta a estrutura do AzA.

Figura 4.21 – Estrutura do FS Azure A

O Aza foi selecionado para ser previamente sililado pela reação com CTPES, conforme apresentado na figura 4.22, de forma a possibilitar a imobilização do FS por meio de ligações covalentes à camada de sílica do MagSil.

Figura 4.22 – Síntese e estrutura esperada para o AzA Sil.

Após a adição de hidreto de sódio houve uma mudança da coloração do FS de azul para rosa, indicando uma desprotonação do grupo amina do FS. Com a adição do CPTES e aquecimento, a coloração do FS tornou-se novamente azul, o que indica que houve uma reação entre o CTPES e o grupo amina reduzida formando uma amina secundária. Os espectros eletrônicos de absorção de soluções metanólicas de AzA e AzA Sil (figura 4.23) mostram um leve alargamento da banda com máximo em torno de 620 nm do AzA Sil, em comparação com o AzA.

Figura 4.23 – Espectros eletrônicos de absorção de soluções metanólicas de (A) AzA e (B) AzA Sil.

Uma evidência muito forte da sililação do AzA foi a mudança da solubilidade do FS após a reação com CTPES. O FS modificado pode ser solubilizado diretamente na mistura de IGEPAL CO-520 e ciclo-hexano, enquanto que a solubilização do FS AzA somente ocorre após a adição da solução de amônia à mistura de ciclo-hexano e IGEPAL CO-520. Outra evidência foi obtida na etapa de lavagem do material com AzA Sil imobilizado (MagSilAzA). O sobrenadante já nas primeiras etapas de lavagem encontra-se límpido, ao passo que materiais preparados com AM tiveram muitas etapas de lavagem até remoção do excesso do FS.

No espectro eletrônico de absorção obtido para uma suspensão aquosa de MagSilAzA, apresentado na figura 4.24 (curva A), pode-se observar a banda característica de absorção do AzA em torno de 622 nm, o que indica a imobilização do FS na sílica.

Figura 4.24 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) uma suspensão aquosa de MagSilAzA e de (B) uma solução aquosa de AzA.

O espalhamento de luz provocado pelas partículas suspensas impede que a quantidade de FS imobilizado seja determinada por UV-Vis. Sendo assim, não foi possível determinar a

eficiência de geração de $^1\text{O}_2$, tendo sido apenas comparada com uma solução padrão de AM. A figura 4.25 apresenta o espectro de emissão característico do $^1\text{O}_2$, obtido após foto-excitação em 532 nm de uma suspensão de 1,5 mg mL⁻¹ de MagSilAzA em acetonitrila. O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado após foto-excitação em 532 nm da mesma solução de MagSilAzA em acetonitrila foi determinado como 56 μs (figura 4.25 detalhe), o que está de acordo com o observado para uma solução padrão de AM em acetonitrila.

Figura 4.25 – Espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ após foto-excitação de uma suspensão de MagSilAzA (1,5 mg mL⁻¹) em acetonitrila. No Detalhe o transiente de emissão em 1270 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm).

A figura 4.26 apresenta a comparação da intensidade de emissão em 1270 nm correspondente ao $^1\text{O}_2$ gerado após foto-excitação em 532 nm de uma suspensão de MagSilAzA em acetonitrila (1,5 mg mL⁻¹, 2 mL) e de uma solução padrão de AM em acetonitrila (3×10^{-3} mol L⁻¹, 2 mL). Esse resultado demonstra que as duas amostras tem capacidade similar de gerar $^1\text{O}_2$ nas condições estudadas.

Figura 4.26 – Comparativo da geração de $^1\text{O}_2$ por MagSilAzA e AM ambos em acetonitrila ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$).

4.3.2. Imobilização de porfirinas

4.3.2.1. Protoporfirina IX

A primeira metodologia empregada para a imobilização da Pp IX foi a adição do FS sem modificação química ao meio reacional preparado para o revestimento dos núcleos magnéticos com sílica. A imobilização da Pp IX efetiva, pois todo o FS adicionado foi removido após as etapas de lavagem. O espectro eletrônico de absorção de uma suspensão aquosa do sólido obtido não forneceu indícios da imobilização do FS. A geração de $^1\text{O}_2$ também não pode ser detectada pelo método direto. A baixa afinidade da Pp IX pela sílica levou à modificação química do FS, tal como reportada e caracterizada em trabalhos prévios do grupo (Rossi, Silva *e col.*, 2008; Silva, 2008). A figura 4.27 apresenta a síntese da Pp IX sililada (Pp IX Sil).

Figura 4.27 – Síntese da Pp IX Sil.

Desta forma, a segunda metodologia empregada foi a imobilização da PP IX Sil na superfície do sólido magnético já formado (MagSil). A figura 4.28 apresenta uma micrografia obtida por MET do sólido MagSilPpIX_pós.

Na figura 4.28 (B) pode-se observar em detalhe que ocorreu a formação de uma camada de sílica mais rugosa na superfície da esfera de sílica. Essa característica não foi observada anteriormente, por exemplo, nas diversas análises realizadas com amostras de MagSil (figura 4.28 C), podendo, desta forma, ser associada à imobilização do FS sililado.

Figura 4.28 – Micrografia obtida por MET das nanopartículas de (A) MagSilPpIX_pós e detalhes das camadas de sílica de (B) MagSilPpIX_pós e (C) MagSil. Figuras (B) e (C) sem escala.

Embora seja possível observar a formação de uma segunda camada de sílica após a imobilização da Pp IX Sil, não foi possível identificar a imobilização da Pp IX pelo espectro eletrônico de absorção no UV-Vis. A figura 4.29 apresenta o espectro eletrônico de absorção obtido para uma suspensão metanólica de MagSilPpIX_pós e para uma solução metanólica de Pp IX. Como a Pp IX não foi detectada pelo espectro eletrônico de absorção no UV-Vis é provável que a quantidade imobilizada seja muito pequena.

Figura 4.29 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) uma suspensão metanólica de MagSilPpIX_pós e de (B) uma solução metanólica de Pp IX.

A geração de $^1\text{O}_2$ pela amostra MagSilPpIX_pós não foi detectável, tanto pelo método direto, quanto pelo método indireto.

A terceira metodologia para imobilização da Pp IX consistiu na adição da Pp IX Sil durante o crescimento da camada de sílica.

A figura 4.30 apresenta o espectro eletrônico de absorção de uma suspensão metanólica de MagSilPpIX comparando com o de uma solução metanólica de Pp IX. Pode-se observar que houve a imobilização do FS, pela presença da banda Soret e bandas Q características da Pp IX. O alargamento da banda Soret e o deslocamento de 401 nm para 384 nm são indícios de agregação da porfirina (Ten Wolde, Markies *e col.*, 1996). Apesar da agregação vemos que a metodologia de adição durante o crescimento da camada de sílica possibilita, como esperado, a imobilização de maior quantidade do FS.

Figura 4.30 – Espectro eletrônico de absorção de (A) uma suspensão metanólica de MagSilPpIX e de (B) uma solução metanólica de Pp IX.

A geração de $^1\text{O}_2$ foi comprovada pelo espectro de emissão na faixa de 1230 a 1360 nm, com máximo característico em 1270 nm, obtido após foto-excitação de uma suspensão de MagSilPpIX em metanol (figura 4.31). O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em metanol obtido pelo decaimento da emissão em 1270 nm após foto-excitação em 532 nm de MagSilPpIX (figura 4.32) resultou em 8 μs e encontra-se de acordo com o obtido para AM (figura 4.32 detalhe) e com o reportado pela literatura (Wilkinson, Helman *e col.*, 1995).

Figura 4.31 – Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ obtido após foto-excitação em 532 nm de suspensão metanólica de MagSilPpIX.

Figura 4.32 – Transiente de emissão em 1270 nm de $^1\text{O}_2$ gerado após foto-excitação em 532 nm de uma suspensão metanólica de MagSilPpIX. No detalhe de uma solução metanólica padrão de AM ($\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm).

A determinação da eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ pelo método direto foi realizada utilizando-se como padrão uma solução de AM em metanol de mesma absorbância em 532 nm que uma suspensão de MagSilPpIX. As intensidades de emissão obtidas em 1270 nm para

a amostra MagSilPpIX e para o padrão AM foram, respectivamente, 947 e 696. Considerando o Φ_{AM} em metanol como sendo 0,5 (Redmond e Gamlin, 1999) e aplicando-se a equação 3.2 temos que a eficiência de geração de 1O_2 pela MagSilPpIX é 0,68. Esse valor encontra-se de acordo com o rendimento quântico de geração de 1O_2 observado para soluções contendo a PpIX livre em diferentes solventes ($\Phi_{PpIX} = 0,77$ em CCl_4 e $\Phi_{PpIX} = 0,60$ em solução água/TX100) (Redmond e Gamlin, 1999). A eficiência de geração de 1O_2 em metanol observada para esse material também é comparável ao Φ da Hp IX em metanol ($\Phi_{Hp IX} = 0,65$) (Fernandez, Bilgin *e col.*, 1997).

A geração de 1O_2 pelo FS imobilizado foi também detectada pelo uso da sonda DPBF. A figura 4.33 apresenta o decaimento da banda de absorção da sonda DPBF em 411 nm, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 532$ nm) de uma suspensão metanólica de MagSilPpIX. O decaimento observado na curva A é característico da oxidação da sonda DPBF causada pela reação com 1O_2 , sendo possível o ajuste a uma função de decaimento exponencial de primeira ordem. Na mesma figura é apresentado o comportamento da sonda pura ao ser irradiada (curva B) e na presença do FS no escuro (curva C), que demonstra a foto-estabilidade da sonda DPBF e que a oxidação da sonda somente ocorre com a presença de FS e irradiação.

Figura 4.33 – Decaimento da absorbância da sonda DPBF em 411 nm após foto-excitação em 532 nm (A, ■) de uma suspensão metanólica de MagSilPpIX e (B, □) de uma solução da sonda DPBF em metanol. Em (C, ▲) suspensão de MagSilPpIX em metanol contendo a sonda DPBF sem irradiação.

A figura 4.34 apresenta uma micrografia obtida por MET de MagSilPpIX juntamente com um histograma de distribuição de tamanho, ajustado a uma função gaussiana, que indica tamanho médio de 28 ± 4 nm. Observa-se a predominância de nanoesferas de sílica contendo nanopartículas magnéticas em seu interior, porém pode-se observar também algumas partículas sem os núcleos magnéticos. Apesar disso, esse material não perde a potencialidade para aplicação em PDT, uma vez que apresenta capacidade de gerar e liberar $^1\text{O}_2$ a partir de uma matriz sólida, uma distribuição de tamanho adequada para PDT (inferior a 50 nm (Chatterjee, Fong *e col.*, 2008)) e a presença de partículas contendo núcleos magnéticos para uso como agentes de contraste para MRI (Gupta e Gupta, 2005).

Figura 4.34 – Micrografia obtida por MET de MagSilPpIX e histograma de distribuição de tamanho ajusta a uma função gaussiana.

4.3.2.2. Clorofilina

Após o sucesso na imobilização da Pp IX, iniciamos o trabalho com a clorofilina (Clf). Esse FS apresenta uma banda de absorção intensa com máximo em 650 nm, sendo possível a excitação do FS, assim como o AM, na janela terapêutica. Conforme discutido anteriormente, existem vantagens em trabalhar nessa faixa de energia de irradiação que levam a um aumento no potencial para aplicação em PDT.

A primeira metodologia empregada para a imobilização da Clf foi a adição do FS sem modificação prévia ao meio reacional preparado para o revestimento dos núcleos magnéticos por sílica. A imobilização do FS não foi efetiva, pois durante o procedimento de lavagem todo

o FS foi removido, não sendo possível detectar imobilização por UV-Vis nem a geração de $^1\text{O}_2$ pelo método direto. A baixa afinidade da Clf pela sílica exigiu a uma modificação química do FS para que o mesmo se ligue à sílica. A síntese da Clf sililada foi realizada de forma semelhante à síntese da Pp IX Sil, exceto pelo uso de cloreto de tionila no lugar de cloreto de oxalila. Uma modificação da clorofilina com 3-dimetilamino-1-propilamina foi realizada por meio de um procedimento semelhante (Fernandes, 2007). A figura 4.35 apresenta a rota de síntese e a estrutura esperada para a Clf Sil, com substituição nos três grupos carboxila, porém espécies mono e di-substituídas também podem estar presentes, o que dificulta a caracterização. De fato, apenas uma substituição já seria suficiente para promover a imobilização do FS na camada de sílica.

Figura 4.35 – Preparação da Clf Sil.

A segunda metodologia empregada para a imobilização do FS consiste na adição da Clf Sil durante o crescimento da camada de sílica. A metodologia de imobilizar o FS na superfície da camada de sílica não foi empregada, pois os resultados com a Pp IX Sil não foram satisfatórios.

A Clf Sil foi solubilizada na mistura ciclo-hexano e IGEPAL CO-520 previamente à adição dos demais reagentes da microemulsão. A solubilidade da Clf Sil nesse meio é um indício de que houve alguma modificação química do FS, pois, como o AzA, a Clf não é solúvel na mistura ciclo-hexano e IGEPAL CO-520. O procedimento de lavagem forneceu outro forte indício de que houve modificação química do FS, pois mesmo o sobrenadante da primeira lavagem não apresentava FS solubilizado que pudesse ser detectado por UV-Vis, ao contrário da Clf não modificada que continuava se desprendendo do material nas sucessivas lavagens. A Clf Sil foi o único FS totalmente imobilizado na MagSil, ou seja, não ocorreu liberação de FS durante o procedimento de lavagem do sólido detectável por UV-Vis. A figura 4.36 apresenta os espectros eletrônicos de absorção obtidos para uma suspensão aquosa de MagSilClf (curva A) e para uma solução de Clf em DMSO (curva B). Pode-se observar a banda característica da Clf em 650 nm no espectro correspondente a MagSilClf, o que caracteriza a imobilização do FS. A banda observada no espectro da MagSilClf apresenta-se encoberta pelo espalhamento de luz provocado pelas partículas em suspensão, tornando difícil determinar a quantidade de FS imobilizado. Sendo assim, não foi possível determinar a eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ da Clf imobilizada, tendo sido apenas realizada a comparação com uma solução padrão de AM.

Figura 4.36 – Espectros eletrônicos de absorção de (A) uma suspensão aquosa de MagSilClf e de (B) uma solução de Clf em DMSO.

A figura 4.37 apresenta o espectro de emissão característico de $^1\text{O}_2$ obtido após foto-excitação em 650 nm de uma suspensão de MagSilClf em acetonitrila. Por limitações instrumentais não foi determinado o tempo de vida de $^1\text{O}_2$ após foto-excitação de MagSilClf em 650 nm.

Figura 4.37 – Espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ gerado após foto-excitação em 650 nm de uma suspensão de MagSilClf em acetonitrila (3 mg mL^{-1}).

A figura 4.38 apresenta a comparação da intensidade de emissão em 1270 nm correspondente ao $^1\text{O}_2$ gerado após foto-excitação em 650 nm de uma suspensão de MagSilClf em acetonitrila (3 mg mL^{-1} , 2 mL) e de uma solução padrão de AM em acetonitrila ($3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, 2 mL). Esse resultado demonstra capacidade de gerar $^1\text{O}_2$ similar das duas amostras nas condições estudadas.

Figura 4.38 – Comparativo da geração de $^1\text{O}_2$ de uma suspensão de MagSilClf e de uma solução padrão de AM ambos em acetonitrila ($\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$).

A figura 4.39 apresenta uma micrografia obtida por MET da MagSilClf juntamente com um histograma de distribuição de tamanho, ajustado a uma função lognormal, que indica um diâmetro médio de 32 nm para as esferas de sílica. Pode-se observar na figura que houve a formação de um material de morfologia esférica não uniforme e em alguns casos, infelizmente, sem a presença de núcleos magnéticos.

Figura 4.39 – Micrografia obtida por MET da MagSilClf e histograma de distribuição de tamanho ajustado a uma função lognormal.

Apesar da presença de partículas com e sem núcleo magnético esse material apresenta potencial para a aplicação em terapia fotodinâmica, pois além de gerar $^1\text{O}_2$, apresenta tamanho inferior a 100 nm (mais indicado para uso em PDT (Chatterjee, Fong *e col.*, 2008)) e partículas contendo núcleos magnéticos que podem atuar como contraste para imagem por ressonância magnética (Gupta e Gupta, 2005).

O potencial para aplicação em PDT foi também investigado por meio da viabilidade celular utilizando-se células HeLa. O estudo foi realizado apenas para constatar a eficiência das partículas, não tendo sido realizada nenhuma otimização de tempo de irradiação ou de dosagem adequada de MagSilClf. Células HeLa aderidas ao fundo de placa de Petri, adaptadas para serem utilizadas em um microscópio de fluorescência, foram tratadas com uma suspensão de MagSilClf. Após o tempo de incubação (3 horas), o marcador celular calceína-

AM foi adicionado e após 5 minutos na incubadora as células vivas foram visualizadas em um microscópio de fluorescência. Após irradiação por 5 min na faixa de 645 a 685 nm, utilizando fonte de excitação do próprio microscópio, foram registradas imagens no intervalo de 0, 10 e 25 minutos após irradiação. A figura 4.40 mostra o processo indicativo de morte celular provocada pela irradiação na presença de MagSilClf. Na célula (A) é observada a liberação de vesículas e na segunda célula (B) observa-se a mudança da forma (encolhimento) da célula. A célula (C) compreende o controle sem adição de MagSilClf. Tanto o processo de formação de vesículas quanto o encolhimento da célula são indicativos de morte celular. É importante ressaltar que no experimento controle com ausência das partículas ou ausência de irradiação nenhuma alteração da morfologia das células foi observada. Esse resultado comprova o potencial da MagSilClf para aplicação em PDT.

Figura 4.40 – Imagens de microscopia de fluorescência de células Hela (marcadas com AM-calceína) em meio de cultura contendo MagSilClf obtidas após 0, 10 e 25 min da irradiação com 645 - 685 nm (5 min).

4.4. Estudos da interação do FS imobilizado

A matriz de sílica deve desenvolver um papel importante na proteção do FS imobilizado de possíveis interações com moléculas presentes no meio biológico que podem reduzir ou mesmo suprimir totalmente a geração de $^1\text{O}_2$. Buscando entender um pouco mais o papel da matriz de sílica nesses processos, foi estudada a influência da adição de uma biomolécula (BSA) e de íons brometo a dispersões de SilHp. A SilHp consiste em Hp IX imobilizada em nanoesferas de sílica de tamanho médio em torno de 30 nm, reportadas por Silva (Silva, 2008), que apresentam excelente eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ ($\eta = 0,6$, determinada utilizando a sonda DPBF).

4.4.1. Supressão da geração de $^1\text{O}_2$ com albumina de soro bovino (BSA)

A interação do FS com biomoléculas pode ser um fator limitante para a PDT, como exemplo a interação de AM com NADH e FADH₂ que leva a redução do AM a leuco AM, que não apresenta atividade para PDT (Tada, 2007). Nesse trabalho foi abordada a interação de BSA com Hp IX. Apesar de a interação da Hp IX com BSA levar a um aumento do estado triplete excitado do FS quando comparado com o FS livre, a geração de $^1\text{O}_2$ é suprimida (Borissevitch, Tominaga *et al.*, 1998). Essa supressão ocorre devido à menor disponibilidade da Hp IX ligada à BSA ao oxigênio molecular do que a Hp IX livre. O efeito de supressão causado pela interação com BSA pode ser observado pela comparação do espectro de emissão do FS livre e imobilizado antes e depois da adição de BSA. A intensidade de emissão em 1270 nm é diretamente relacionada à geração de oxigênio singlete, então qualquer redução na

intensidade de emissão implica em uma redução da geração de $^1\text{O}_2$. A figura 4.41 mostra a comparação entre amostras na presença e na ausência de BSA. A adição de BSA à solução de SilHp não resultou na supressão da geração de oxigênio singlete, enquanto que na solução de Hp IX livre houve uma supressão em torno de 20 % da geração de oxigênio singlete quando adicionado BSA. Esse resultado mostra a proteção oferecida pela camada de sílica, pois moléculas grandes não interagem com o FS imobilizado, por não passarem pelos poros da sílica, evitando efeito deletério na geração de $^1\text{O}_2$.

Figura 4.41 – % de geração de $^1\text{O}_2$ antes e após a adição de BSA ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$).

4.4.2. Supressão de fluorescência com íons brometo

A disponibilidade do FS para interagir com o supressor pode ser determinada pela constante de Stern-Volmer. Quanto maior a constante observada maior a disponibilidade do FS para interagir com íons brometo levando à supressão da fluorescência. Com os valores de intensidade de fluorescência obtidos foi construído o gráfico da razão da intensidade de

fluorescência (F_0/F) em função da concentração de supressor (íons brometo) e as constantes de Stern-Volmer foram obtidas de acordo com a equação 3.1 (figura 4.42).

Figura 4.42 – Curvas de Stern-Volmer para solução aquosa de Hp IX e para uma suspensão aquosa de SilHp na presença de diferentes concentrações de brometo de sódio.

As constantes de Stern-Volmer obtidas para Hp IX livre e SilHp foram, respectivamente, 1,63 e 0,03 L mol⁻¹. Assim, a constante observada para o FS livre é aproximadamente 54 vezes maior, o que evidencia uma proteção adicional fornecida pela camada de sílica ao FS.

A possibilidade de interação da matriz de sílica com ¹O₂ pode ser uma preocupação nos sistemas de carregadores apresentados. Desta forma, foi estudada a geração de ¹O₂ por uma solução de Hp IX em acetonitrila antes e após a adição de duas porções de nanoesferas de sílica. As intensidades de emissão em 1270 nm obtidas após foto-excitação em 532 nm das amostras não sofreram alteração, tanto para a amostra contendo Hp IX ($I_{1270\text{nm}} = 569 \pm 4$) como para as amostras após a primeira e segunda adições de nanoesferas de sílica ($I_{1270\text{nm}} = 568 \pm 5$ e 574 ± 8 , respectivamente) (Rossi, Silva *e col.*, 2008). Esses experimentos

comprovaram que a matriz de sílica não interage com o $^1\text{O}_2$ gerado pela foto-excitação do FS, o que a torna um excelente material para imobilização de FS.

5. CONCLUSÕES

Os objetivos deste trabalho foram cumpridos através da síntese bem sucedida de nanopartículas de sílica contendo núcleos magnéticos de tamanho e morfologia controlados e a imobilização de fotossensibilizadores na camada de sílica com a capacidade de gerar oxigênio singlete.

A síntese dos núcleos magnéticos foi realizada com sucesso pelos dois métodos apresentados e ambos resultaram em nanopartículas superparamagnéticas, comprovada pelas medidas magnéticas. Embora o material sintetizado pela metodologia da decomposição térmica tenha resultado em um material com propriedades melhores, quando comparado com o material obtido pela metodologia da co-precipitação, não foi possível realizar o revestimento desse material com sílica. Devido a esse fato e à dificuldade para adaptar essa metodologia de forma a possibilitar o revestimento com sílica, os núcleos magnéticos adotados foram os preparados por co-precipitação.

A metodologia de revestimento dos núcleos magnéticos com sílica através de uma modificação do método de Stöber resulta na formação de aglomerados, porém a metodologia de microemulsão reversa empregada resultou em um material de alta qualidade. O revestimento com sílica resultou em nanopartículas com diâmetro em torno de 66 nm. As propriedades magnéticas desse material apresentam um comportamento superparamagnético, porém devido à presença da camada de sílica, a magnetização de saturação observada foi drasticamente reduzida. Essa redução era esperada devido ao aumento da massa diamagnética. Foi possível reduzir o tamanho da camada de sílica pela variação do tempo de reação e pela mudança do solvente utilizado. A mudança do solvente não alterou a qualidade do material,

porém resultou em um material com diâmetro médio inferior, em torno de 47 nm. A variação do tempo de reação, como esperado, também resultou em materiais com diâmetros menores (em torno de 35nm), uma vez que nem todo o precursor de sílica adicionado sofre hidrólise. A redução do tamanho da camada de sílica não trouxe um ganho muito grande na magnetização de saturação. Assim, o material selecionado para realizar a imobilização dos FS foi o material com diâmetro médio em torno de 66 nm. Essa escolha foi realizada para que a imobilização de FS fosse máxima, facilitando a caracterização dos FS imobilizados. Foram utilizados FS da classe dos fenotiazínicos e das porfirinas.

O primeiro FS imobilizado com sucesso foi o azul de metileno, porém a imobilização causou a dimerização do AM, comprovada pelo espectro eletrônico de absorção característico, em todas as tentativas mesmo em baixa concentração de AM. A formação de agregados de AM impossibilitou a detecção da geração de $^1\text{O}_2$ pelos métodos empregados. A busca pela imobilização do AM na forma monomérica resultou em um material que liberava o FS para o meio quando utilizado acetonitrila ou meio de cultura. Esse método demonstrou, porém, que a imobilização de AM em sílica leva à formação de dímeros, mesmo que a solução do AM original usada no procedimento de impregnação apresente o FS predominantemente na forma monomérica.

O FS tionina foi utilizado na tentativa de imobilizar o FS através de ligação covalente à camada de sílica. Para tanto foi realizada a funcionalização da camada de sílica com grupos amina e, utilizando glutaraldeído, a tionina se liga pelas suas aminas primárias. A imobilização do FS não pode ser comprovada por UV-Vis e não foi detectada a geração de $^1\text{O}_2$.

Outra estratégia empregada foi a sililação do FS azure A para posterior imobilização. Para promover a imobilização do AzA foi realizada uma modificação química do FS com CPTES, assim obtendo-se o AzA sililado (AzA Sil). A imobilização foi comprovada por UV-

Vis e a geração de $^1\text{O}_2$ foi caracterizada pelo método direto e correlacionada com um padrão. Uma suspensão de MagSilAzA em acetonitrila ($1,5 \text{ mg mL}^{-1}$, 2 mL) apresenta a mesma intensidade de emissão em 1270 nm (característico de $^1\text{O}_2$) que uma solução de AM em acetonitrila ($3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 2 mL) ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$).

A imobilização de porfirinas também só foi possível após sililação com APTES. Quando realizada a adição de Pp IX e Clf sem modificação todo o FS adicionado foi perdido para a solução após a etapa de lavagem. A imobilização da Pp IX Sil só pode ser confirmada por UV-Vis quando realizada durante o crescimento da camada de sílica e o η determinado foi de 0,68 (método indireto), sendo também capaz de liberar o $^1\text{O}_2$ para solução como comprovado pela oxidação da sonda química DPBF. A imobilização da Clf Sil também foi realizada adicionando-se o FS durante o crescimento da camada de sílica e a imobilização foi comprovada por UV-Vis. A eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ foi caracterizada pelo método direto e correlacionada com um padrão. Uma suspensão de MagSilClf em acetonitrila (3 mg mL^{-1} , 2 mL) apresenta a mesma intensidade de emissão em 1270 nm (característico de $^1\text{O}_2$) que uma solução de AM em acetonitrila ($3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, 2 mL) ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$). O material contendo Clf comprovou seu potencial para PDT por meio de ensaios com células HeLa, onde uma dispersão desse material levou à morte celular apenas após irradiação.

As micrografias dos materiais contendo Pp IX Sil e Clf Sil imobilizados durante o crescimento da camada de sílica apresentaram partículas com e sem núcleo magnético, porém com distribuição de tamanho dentro da faixa ideal para PDT, respectivamente, em torno de 28 e 32 nm.

Também foi possível comprovar a eficiência da camada de sílica em proteger o FS de interação com biomoléculas e íons. No caso da interação com BSA, o FS imobilizado não apresentou redução da geração de $^1\text{O}_2$, ao passo que a Hp IX livre sofre uma redução em torno de 20 %. A interação com íons brometo levou à supressão da fluorescência, sendo que o FS

livre está em torno de 54 vezes mais disponível para interagir com o supressor do que o FS imobilizado.

Assim foi possível estabelecer metodologias para imobilização de FS em sílica contendo núcleos magnéticos obtendo-se materiais com alto potencial para aplicação em PDT, além de demonstrar a possibilidade de controle do tamanho da camada de sílica. Também foi observado que o material MagSilClf induz a morte de células HeLa quando irradiado, o que caracteriza o potencial do material para PDT. Os testes de supressão também comprovaram as vantagens de imobilizar os FS em sílica, que por não sofrerem interações com biomoléculas, que podem levar a desativação da geração de $^1\text{O}_2$, tendem a apresentar uma maior eficiência no tratamento.

6. REFERÊNCIAS

ALLISON, R. R., DOWNIE, G. H., *e col.* Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.1, n.1, p.27-42. **2004**.

BARBETA, V. B., JARDIM, R. F., *e col.* Magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles coated with oleic and dodecanoic acids. *Journal of Applied Physics*, v.107, n.7. **2010**.

BERKOWITZ, A. E., KODAMA, R. H., *e col.* Anomalous properties of magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.196, p.591-594. **1999**.

BORISSEVITCH, I. E., TOMINAGA, T. T., *e col.* Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*. 114: 201-207 p. **1998**.

CAIZER, C. Deviations from Bloch law in the case of surfacted nanoparticles. *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, v.80, n.8, p.1745-1751. **2005**.

CHATTERJEE, D. K., FONG, L. S., *e col.* Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60: 1627-1637 p. **2008**.

CHEN, D. H. e LIAO, M. H. Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v.16, n.5-6, p.283-291. **2002**.

- CHEN, Z. L., SUN, Y., *e col.* Studies on Preparation of Photosensitizer Loaded Magnetic Silica Nanoparticles and Their Anti-Tumor Effects for Targeting Photodynamic Therapy. *Nanoscale Research Letters*, v.4, n.5, p.400-408. **2009**.
- DAI, T., HUANG, Y. Y., *e col.* Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.6, n.3-4, p.170-188. **2009**.
- DOLMANS, D., FUKUMURA, D., *e col.* Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, v.3, n.5, p.380-387. **2003**.
- DYAL, A., LOOS, K., *e col.* Activity of Candida rugosa lipase immobilized on gamma-Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 125: 1684-1685 p. **2003**.
- FADEL, M., KASSAB, K., *e col.* Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Lasers in Medical Science*, v.25, n.2, p.283-292. **2010**.
- FERNANDES, A. U. *Síntese, caracterização e fotoatividade de fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX e de clorofilina*. 222 p (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2007**.
- FERNANDEZ, J. M., BILGIN, M. D., *e col.* Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.37, n.1-2, p.131-140. **1997**.
- GABIZON, A., GOREN, D., *e col.* Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. *Journal of Controlled Release*, v.53, n.1-3, p.275-279. **1998**.

GOLLNICK, S. O. e BRACKETT, C. M. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunologic Research*, v.46, n.1-3, p.216-226. **2010**.

GUPTA, A. K. e GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 26: 3995-4021 p. **2005**.

HANCOCK, J. P. e KEMSHEAD, J. T. A rapid and highly selective approach to cell separations using an immunomagnetic colloid. *Journal of Immunological Methods*. 164: 51-60 p. **1993**.

HUANG, S. H., LIAO, M. H., e col. Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. *Biotechnology Progress*, v.19, n.3, p.1095-1100. **2003**.

HULCHANSKY, T. Y., ROY, I., e col. Organically modified silica nanoparticles with covalently incorporated photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *Nano Letters*, v.7, p.2835-2842. **2007**.

JUNQUEIRA, H. C., SEVERINO, D., e col. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 4: 2320-2328 p. **2002**.

JUZENIENE, A., PENG, Q., e col. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v.6, n.12, p.1234-1245. **2007**.

KIM, H. J., SHIN, K. J., e col. One-pot synthesis of multifunctional mesoporous silica nanoparticle incorporated with zinc(II) phthalocyanine and iron oxide. *Scripta Materialia*, v.61, n.12, p.1137-1140. **2009**.

KONAN, Y. N., GURNY, R., *e col.* State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 66: 89-106 p. **2002**.

KONIG, K., BOCKHORN, V., *e col.* Photochemotherapy of Animal Tumors with the Photosensitizer Methylene-Blue Using a Krypton Laser. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v.113, n.3, p.301-303. **1987**.

KUNTSCHE, J., FREISLEBEN, I., *e col.* Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.40, n.4, p.305-315. **2010**.

LIU, F. X., ZHOU, X. P., *e col.* Preparation of purpurin-18 loaded magnetic nanocarriers in cottonseed oil for photodynamic therapy. *Materials Letters*, v.62, n.17-18, p.2844-2847. **2008**.

_____. Preparation and Properties of Photosensitizer Loaded Magnetic Nanocarriers. *Current Nanoscience*, v.5, n.3, p.293-296. **2009**.

LU, A. H., SALABAS, E. L., *e col.* Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie-International Edition*, v.46, n.8, p.1222-1244. **2007**.

LUBBE, A. S., BERGEMANN, C., *e col.* Clinical experiences with magnetic drug targeting: A phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Research*. 56: 4686-4693 p. **1996**.

MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 1: 43-48 p. **2004**.

MARTINEZ, B., OBRADORS, X., *e col.* Low temperature surface spin-glass transition in gamma-Fe₂O₃ nanoparticles. *Physical Review Letters*, v.80, n.1, p.181-184. **1998**.

MASTER, A. M., RODRIGUEZ, M. E., *e col.* Delivery of the Photosensitizer Pc 4 in PEG-PCL Micelles for In Vitro PDT Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.99, n.5, p.2386-2398. **2010**.

MATTHEWS, Y. J. e DAMIAN, D. L. Topical photodynamic therapy is immunosuppressive in humans. *British Journal of Dermatology*, v.162, n.3, p.637-641. **2010**.

MELLISH, K. J., COX, R. D., *e col.* In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. *Photochemistry and Photobiology*, v.75, n.4, p.392-397. **2002**.

MOLONEY, F. J. e COLLINS, P. Randomized, double-blind, prospective study to compare topical 5-aminolaevulinic acid methylester with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratosis. *British Journal of Dermatology*, v.157, n.1, p.87-91. **2007**.

NYST, H. J., TAN, I. B., *e col.* Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.6, n.1, p.3-11. **2009**.

O'CONNOR, A. E., GALLAGHER, W. M., *e col.* Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, v.85, n.5, p.1053-1074. **2009**.

ORTH, K., RUCK, A., *e col.* Intraluminal Treatment of Inoperable Esophageal Tumors by Intralesional Photodynamic Therapy with Methylene-Blue. *Lancet*, v.345, n.8948, p.519-520. **1995**.

PANKHURST, Q. A., CONNOLLY, J., *e col.* Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*. 36: R167-R181 p. **2003**.

PHILIPSE, A. P., VANBRUGGEN, M. P. B., *e col.* Magnetic Silica Dispersions - Preparation and Stability of Surface-Modified Silica Particles with a Magnetic Core. *Langmuir*, v.10, n.1, p.92-99. **1994**.

PIRACCINI, B. M., RECH, G., *e col.* Photodynamic therapy of onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.59, n.5, p.S75-S76. **2008**.

REDMOND, R. W. e GAMLIN, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology*. 70: 391-475 p. **1999**.

RICCI-JUNIOR, E. e MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. *International Journal of Pharmaceutics*, v.310, n.1-2, p.187-195. **2006**.

ROSSI, L. A., SILVA, P. R., *e col.* Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. *Langmuir*. 24: 12534-12538 p. **2008**.

ROSSI, L. M., QUACH, A. D., *e col.* Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.380, n.4, p.606-613. **2004**.

ROSSI, L. M., SILVA, F. P., *e col.* Superparamagnetic nanoparticle-supported palladium: a highly stable magnetically recoverable and reusable catalyst for hydrogenation reactions. *Green Chemistry*, v.9, n.4, p.379-385. **2007**.

ROSSI, L. M., VONO, L. L. R., *e col.* Magnetically recoverable scavenger for palladium based on thiol-modified magnetite nanoparticles. *Applied Catalysis a-General*, v.330, p.139-144. **2007**.

ROY, I., OHULCHANSKY, T. Y., *e col.* Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, v.125, n.26, p.7860-7865. **2003**.

SAHOO, S. K. e LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to delivery and imaging drug. *Drug Discovery Today*. 8: 1112-1120 p. **2003**.

SCHMIDT-ERFURTH, U. e HASAN, T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, v.45, n.3, p.195-214. **2000**.

SCHWERTMANN, U. e CORNELL, R. M. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. 1. Wiley-VHC GmbH & Co KGaA, **1996**

SEVERINO, D., JUNQUEIRA, H. C., *e col.* Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochemistry and Photobiology*. 77: 459-468 p. **2003**.

SHEN, L. F., LAIBINIS, P. E., *e col.* Bilayer surfactant stabilized magnetic fluids: Synthesis and interactions at interfaces. *Langmuir*, v.15, n.2, p.447-453. **1999**.

SILVA, P. R. *Estudo da imobilização de porfirinas em sílica nanoparticulada e de sua interação com oxigênio e ferro: possíveis aplicações biomédicas e analíticas*. 82 p (Mestrado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2008**.

SIMON, V., DEVAUX, C., *e col.* Pp IX Silica Nanoparticles Demonstrate Differential Interactions with In Vitro Tumor Cell Lines and In Vivo Mouse Models of Human Cancers. *Photochemistry and Photobiology*, v.86, n.1, p.213-222. **2010**.

SIMPLICIO, F. I., MAIONCHI, F., *e col.* Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, v.25, n.5, p.7. **2002**.

SMITS, T., VAN LAARHOVEN, A. I. M., *e col.* Induction of protoporphyrin IX by aminolaevulinic acid in actinic keratosis, psoriasis and normal skin: preferential porphyrin enrichment in differentiated cells. *British Journal of Dermatology*, v.160, n.4, p.849-857. **2009**.

SPENCER, W. e SUTTER, J. R. Kinetic Study of the Monomer-Dimer Equilibrium of Methylene-Blue in Aqueous-Solution. *Journal of Physical Chemistry*, v.83, n.12, p.1573-1576. **1979**.

SPILLER, W., KLIESCH, H., *e col.* Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2: 145-158 p. **1998**.

TADA, D. B. *Desenvolvimento de nanopartículas fotossensibilizadoras*. 119 p (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2007**.

TADA, D. B., VONO, L. L. R., *e col.* Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: A potential magnetic carrier for photodynamic therapy. *Langmuir*, v.23, n.15, p.8194-8199. **2007**.

TANG, W., XU, H., *e col.* Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms. *Photochemistry and Photobiology*. 81: 242-249 p. **2005**.

TARDIVO, J. P. e BAPTISTA, M. S. Treatment of Osteomyelitis in the Feet of Diabetic Patients by Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, v.27, n.1, p.145-150. **2009**.

TARDIVO, J. P., DEL GIGLIO, A., e col. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v.2, n.3, p.175-191. **2005**.

_____. New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Photomedicine and Laser Surgery*. 24: 528-531 p. **2006**.

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

TAUPITZ, M., SCHNORR, J., e col. New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: Preclinical results in rats and rabbits. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 12: 905-911 p. **2000**.

TEN WOLDE, A., MARKIES, B. A., e col. Stability and scanning electron microscopy of Photofrin-II and Photosan-3. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.36, n.2, p.139-142. **1996**.

TORIKAI, E., KAGEYAMA, Y., e col. Photodynamic therapy using talaporfin sodium for synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats. *Clinical Rheumatology*, v.27, n.6, p.751-761. **2008**.

TRAUNER, K. B. e HASAN, T. Photodynamic treatment of rheumatoid and inflammatory arthritis. *Photochemistry and Photobiology*, v.64, n.5, p.740-750. **1996**.

VOGT, C., TOPRAK, M. S., *e col.* High quality and tuneable silica shell-magnetic core nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, v.12, n.4, p.1137-1147. **2010**.

VRANCKEN, K. C., DECOSTER, L., *e col.* The role of silanols in the modification of silica-gel with aminosilanes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 170: 71-77 p. **1995**.

WAKSMAN, R., MCEWAN, P. E., *e col.* PhotoPoint photodynamic therapy promotes stabilization of atherosclerotic plaques and inhibits plaque progression. *Journal of the American College of Cardiology*, v.52, n.12, p.1024-1032. **2008**.

WANG, L. Y., LUO, J., *e col.* Monodispersed core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, v.109, n.46, p.21593-21601. **2005**.

WANG, S. Z., GAO, R. M., *e col.* Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry*. 14: 487-493 p. **2004**.

WILKINSON, F., HELMAN, W. P., *e col.* Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular oxygen in solution - an expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 24: 663-1021 p. **1995**.

WINSOR, P. A. Hydrotropy, Solubilisation and Related Emulsification Processes .1. to .4. *Transactions of the Faraday Society*, v.44, n.6, p.376-398. **1948**.

XU, C. J., XU, K. M., *e col.* Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, v.126, n.32, p.9938-9939. **2004**.

YI, D. K., LEE, S. S., *e col.* Nanoparticle architectures templated by SiO₂/Fe₂O₃ nanocomposites. *Chemistry of Materials*, v.18, n.3, p.614-619. **2006**.

YI, D. K., SELVAN, S. T., *e col.* Silica-coated nanocomposites of magnetic nanoparticles and quantum dots. *Journal of the American Chemical Society*, v.127, n.14, p.4990-4991. **2005**.

ZHANG, L., LI, N., *e col.* Spectroscopic study on the interaction between methylen blue and chondroitin 4-sulfate and its analytical application. *Analytical Sciences*, v.20, n.3, p.445-450. **2004**.

ZHANG, R. R., WU, C. L., *e col.* Multifunctional Core-Shell Nanoparticles as Highly Efficient Imaging and Photosensitizing Agents. *Langmuir*, v.25, n.17, p.10153-10158. **2009**.

ANEXO A – SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais:

Nome: Lucas Lucchiari Ribeiro Vono

Nascimento: Barra Mansa, RJ em 21 de setembro de 1984

Educação

Escola Técnica Estadual São Paulo, São Paulo, 2002.

Curso: Ensino médio e técnico em informática.

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Graduação em Licenciatura em Química.

Ocupação

Bolsista de mestrado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Técnico e Científico, CNPq.

Publicações

Artigos completos publicados em periódicos:

Rossi, L. M.; Silva, P. R.; Vono, L. L. R.; Fernandes, A. U.; Tada, D. B.; Baptista, M. S. Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. *Langmuir*, v. 24, p. 12534-12538, **2008**.

Rossi, L. M.; Silva, F. P.; Vono, L. L. R.; Kiyohara, P. K.; Duarte, E. L.; Itri, R.; Landers, R.; Machado, G. Superparamagnetic nanoparticle-supported palladium: a highly

stable magnetically recoverable and reusable catalyst for hydrogenation reactions. *Green Chemistry*, v. 9, p. 379, **2007**.

Tada, D. B.; Vono, L. L. R.; Duarte, E. L.; Itri, R.; Kiyohara, P. K.; Baptista, M. S.; Rossi, L. M. Methylene Blue-Containing Silica-Coated Magnetic Particles: A Potential Magnetic Carrier for Photodynamic Therapy. *Langmuir*, v. 23, p. 8194-8199, **2007**.

Rossi, L. M.; Vono, L. L. R.; Silva, F. P.; Kiyohara, P. K.; Duarte, E. L.; Matos, J. R. A magnetically recoverable scavenger for palladium based on thiol-modified magnetite nanoparticles. *Applied Catalysis. A, General*, v. 330, p. 139-144, **2007**.

Resumos em congressos:

Vono, L. L. R.; Fernandes, A. U.; Baptista, M. S.; ROSSI, L. M. Preparação de um novo nanomaterial contendo núcleos magnéticos e um fotossensibilizador que pode ser excitado na janela terapêutica. *33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2010, Águas de Lindóia, SP. Livro de Resumos, **2010**.

Vono, L. L. R.; Silva, P. R.; Espósito, B. P.; Baptista, M. S.; Rossi, L. M. Hematoporphyrin IX entrapped in a silica matrix: oxygen access vs protection. *XV Brazilian meeting on inorganic chemistry*, 2010, Angra dos reis, RJ. Livro de resumos, **2010**.

Rossi, L. M.; Vono, L. L. R.; Tada, D. B.; Duarte, E. L.; Itri, R.; Kiyohara, P. K.; Baptista, M. S. Estratégia para imobilização do foto-fármaco azul de metileno em nanopartículas magnéticas. *II workshop de Terapia Fotodinâmica*, 2007, São Pedro, SP. Livro de resumos, **2007**.

Vono, L. L. R.; Rossi, L. M. Nanopartículas magnéticas tiol-modificadas: seqüestro de paládio e propriedades catalíticas. *30ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2007, Águas de Lindóia, SP. Livro de Resumos, **2007**.

Vono, L. L. R.; Kiyohara, P. K.; Matos, J. R.; Rossi, L. M. Estudo da ligação de MPA na superfície de nanopartículas magnéticas. *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2006, Águas de Lindóia, SP. Livro de Resumos, **2006**.

Silva, F. P.; Vono, L. L. R.; Machado, G.; Rossi, L. M. Esferas de sílica magnéticas tiol-modificadas: preparação e propriedades na ligação de metais. *29ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, 2006, Águas de Lindóia, SP. Livro de Resumos, **2006**.

Rossi, L. M.; Vono, L. L. R.; Kiyohara, P. K. Magnetically recoverable Pd nanocatalyst for hydrogenation reactions. *1st International IUPAC Conference on Green-Sustainable Chemistry*, 2006, Dresden. IUPAC ICGC-1, **2006**.

Vono, L. L. R.; Tada, D. B.; Rossi, L. M. Esferas magnéticas revestidas com sílica contendo azul de metileno: um transportador magnético para terapia fotodinâmica. *Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP*, 2006, São Paulo, SP. Cd de resumos, **2006**.

Vono, L. L. R.; Rossi, L. M.; Machado, G. Toward core-shell coating of magnetic nanoparticles. *IV Brazilian MRS Meeting*, 2005, Recife. Final Program IV SBPMat, **2005**.

Vono, L. L. R.; Rossi, L. M.; Machado, G. Preparação e estabilização de nanopartículas de magnetita em solução. *22ª Semana da Química: A Química do Século 21 - IQ-USP*, 2005, São Paulo. CD-Rom 22ª Semana da Química, **2005**.