

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

DAIANA KOTRA DEDA NOGUEIRA

**Derivados porfirínicos nanoencapsulados como
fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do depósito na SPG:
10/08/2011

DAIANA KOTRA DEDA NOGUEIRA

Derivados porfirínicos nanoencapsulados como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Química)*

Orientador: Prof. Dr. Koiti Araki

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

N778d Nogueira, Daiana Kotra Deda
Derivados porfirínicos nanoencapsulados como fotossensibilizadores
em terapia fotodinâmica / Daiana Kotra Deda Nogueira. -- São
Paulo, 2011.
186p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Araki, Koiti

Co-orientador: Baptista, Maurício da Silva

1. Química bioinorgânica 2. Nanotecnologia 3. Síntese : Química
Inorgânica I. T. II. Araki, Koiti, orientador, III. Baptista, Maurício
da Silva, co-orientador.

546.3 CDD



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA



40 ANOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

**“Derivados porfirínicos nanoencapsulados como
fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica”**

DAIANA KOTRA DEDA NOGUEIRA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa:
Química.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Koiti Araki
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Denise de Oliveira Silva
IQ - USP

Prof. Dr. Breno Pannia Espósito
IQ - USP

Profa. Dra. Tania Toyomi Tominaga
UNICENTRO - PR

Profa. Dra. Dayane Batista Tada
UNIFESP – São José dos Campos

SÃO PAULO
16 de setembro de 2011

*Aos meus pais Olívio e Maria pelo amor, carinho e
proteção. Por terem me apoiado e compreendido
que a distância era necessária para que eu
alcançasse meus ideais.*

*Ao meu esposo Thiago pelo amor, carinho, apoio e
incentivo em todos os momentos, e por tornar cada
segundo do meu dia especial.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que consegui e por cuidar sempre de mim e de todos que amo.

Ao meu irmão Maycon, pelo amor, apoio e incentivo.

Ao Prof. Koiti Araki, pela orientação, paciência, amizade e por contribuir para o meu crescimento científico.

Ao Prof. Maurício Baptista, pela amizade e por abrir as portas de seu laboratório e colaborar intensamente para o desenvolvimento desse trabalho.

Às “florzinhas” Aline, Michele e Rebeca pela amizade, festinhas e tricôs.

Aos amigos Paulo e Luix pelas conversas, discussões e boas risadas.

Àos amigos Adjaci, Christiane e Helena pela amizade, colaboração e pelas discussões que contribuíram muito para o desenvolvimento desse trabalho.

À amiga Thati Feher pelo treinamento e auxílio na sala de cultura.

À amiga Roberta pela ajuda e companhia nos longos experimentos no biotério.

Ao amigo Eduardo Caritá pelas discussões e grandes contribuições para a realização deste trabalho.

Ao prof. Henrique E. Toma e aos colegas do LQSN pela agradável convivência e troca de conhecimentos e experiências ao longo desses anos.

Aos colegas do LPFI pelos cafézinhos e momentos de descontração (dancinhas).

Aos amigos e funcionários da SPG, Cibele, Milton, Emiliano, Marcelo e Paulo pela atenção e inúmeros serviços prestados durante esses anos.

Às amigas Renata e Vanessa por estarem sempre presentes, pelo apoio, carinho e amizade.

Ao CNPq e a FAPESP, pela bolsa e pelos auxílios concedidos.

*“Cada pessoa deve trabalhar
para o seu aperfeiçoamento e,
ao mesmo tempo, participar da
responsabilidade coletiva por
toda a humanidade.”*

Marie Curie

RESUMO

NOGUEIRA, D. K. D. **Derivados Porfirínicos Nanoencapsulados como Fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica.** 2011. 186p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Uma série de oito derivados porfirínicos monocatiônicos, na forma de base-livre e metalados com Zn(II), e tendo grupos metila ou $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ ligados ao átomo de nitrogênio do substituinte piridil em uma das posições *meso* do anel, foram sintetizadas e caracterizadas, visando sua aplicação como fotossensibilizadores no tratamento de tumores de pele por TFD. Além de possuírem características anfífilas que favorecem a sua interação com membranas biológicas, os compostos apresentaram um elevado rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, principalmente os derivados metilados das porfirinas base-livre. A baixa solubilidade em meio aquoso, fator limitante da utilização como fotossensibilizadores, foi superada por meio do encapsulamento dos mesmos em micro e nanocápsulas poliméricas, pelo método de coacervação. Duas formulações, uma baseada em hidroxietilcelulose (HEC) e outra na mistura atelocolágeno marinho/goma xantana (ACM), foram preparadas e suas eficiências fotodinâmicas e citotoxicidade frente à células HeLa determinadas. As formulações de ACM mostraram ser não-tóxicas, enquanto os preparados com HEC apresentaram uma pequena, mas significativa citotoxicidade no escuro. Por outro lado, todas as formulações se tornaram tóxicas quando irradiadas com laser de 650 nm ou luz branca proveniente de lâmpada de mercúrio. Dentre as formulações preparadas, as mais ativas foram aquelas preparadas com os derivados porfirínicos base-livre metilados em ACM, provavelmente em virtude da maior eficiência de entrega do composto fotoativo em relação ao sistema polimérico de HEC, aliado aos elevados rendimentos quânticos de formação de oxigênio singlete em relação aos demais compostos. Além disso, o encapsulamento influenciou significativamente a interação e citolocalização dos fotossensibilizadores, e consequentemente a taxa e o mecanismo de morte celular. Os estudos por microscopia de fluorescência confocal, evidenciaram que as nanocápsulas de ACM são capazes de penetrar na membrana das células, alcançando o citoplasma e liberando gradativamente o composto fotoativo no seu interior. Quando não encapsulada, em solução de dmsa, a porfirina se acumula preferencialmente na membrana celular. Consequentemente, neste caso a irradiação levou ao comprometimento da integridade da mesma e o desencadeamento da necrose celular, indesejável na terapia por ocasionar inflamação nos tecidos. Em contrapartida, o tratamento

com formulações de fotossensibilizadores nanoencapsulados promoveram menos danos mas favoreceram a apoptose, um mecanismo de morte programada que geralmente leva a regeneração rápida e total dos tecidos, e ausência de processos inflamatórios.

Palavras-chave: Porfirinas monocatiônicas; Terapia Fotodinâmica; Nanocápsulas poliméricas; Fototoxicidade; Liberação controlada.

ABSTRACT

NOGUEIRA, D. K. D. **Nanoencapsulated Porphyrin Derivatives as Photosensitizers in Photodynamic Therapy**. 2011. 186p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A series of eight monocationic porphyrins derivatives as free-base and Zn(II) complexes, with methyl or $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ groups bond to the nitrogen atom of the meso-pyridyl substituent, were synthesized and characterized aiming their application as photosensitizers in the treatment of skin tumors by Photodynamic Therapy (PDT). Those compounds, especially the methylated derivatives of the free-base porphyrins, are potentially useful because showed higher quantum yields for the photoinduced formation of singlet oxygen and amphiphilic character, that enhanced their interaction with biological membranes. The low solubility in aqueous media, a limiting factor for use as photosensitizers, was overcome by encapsulating them in polymeric micro-and nanocapsules using the coacervation method. Two formulations, one based on hydroxyethyl cellulose (HEC) and another in the marine atelocollagen/xanthan gum (MAC) mixture were prepared and their photodynamic efficiencies and cytotoxicity against HeLa cells determined. The MAC formulations were shown to be non-toxic, while the HEC presented a small but significant cytotoxicity in the dark. On the other hand, all formulations become toxic when irradiated with 650 nm laser or white light from a mercury lamp source. The most actives, among all formulations, were those prepared using the methylated free-base porphyrin derivatives and MAC, probably due to the higher delivery efficiency of the photosensitizers in relation to the formulations prepared with HEC, associated with their higher quantum yields of photoinduced formation of singlet oxygen of those species as compared with the other compounds. In addition, the encapsulation influenced the interaction and cytolocalization of the photosensitizers, and consequently the rate and mechanism of cell death. The MAC nanocapsules were shown to penetrate the cell membrane by confocal fluorescence microscopy, reaching the cytoplasm where gradually released the photoactive compound. However, the porphyrin derivatives preferentially accumulated in the cell membrane when in DMSO solution. Consequently, the irradiation compromised the membrane integrity leading to necrosis, an undesirable process since cause tissue inflammation. In contrast, the treatment with encapsulated photosensitizer formulations promoted a much lower level of photoinduced damage and apoptosis, a more desirable death mechanism characterized by a complete and rapid regeneration of tissues and absence of

inflammatory processes.

Keywords: Monocationic porphyrins; Photodynamic Therapy; Polymeric nanocapsules; Phototoxicity; Drug delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da porfina.	27
Figura 2- Profundidade de penetração da luz na pele em função do comprimento de onda, reproduzido da referência [16].	31
Figura 3- Diagrama de Jablonski modificado mostrando os mecanismos de ação dos Fs. 1) Absorção de luz; 2) Fluorescência; 3) Conversão interna; 4) Cruzamento intersistema; 5) Fosforescência; 6) Produção de oxigênio singlete (mecanismo tipo II); 7) transferência de elétron ou prótons (mecanismo tipo I). (Adaptado de Ref. [14])	33
Figura 4- Estrutura de um dos componentes do Photofrin®, um dos fotossensibilizadores empregado em vários países para o tratamento utilizando a TFD. Reproduzido da ref. [19]. .	36
Figura 5- Estrutura do Visudyne®.	37
Figura 6- Estrutura das porfirinas sintetizadas por Grancho e colaboradores. (Reproduzido da Ref. [7])	38
Figura 7- Estruturas das <i>meso</i> -fenil(piridil)porfirinas coordenadas a grupos $[Ru(bipy)_2Cl]^+$ e metila. (Adaptado da referência [41]).....	39
Figura 8- Estruturas das porfirinas N-confusas (a) e duplamente N-confusas (b). (Adaptado da referência [52]).	42
Figura 9- Etapas do processo de coacervação: (A) Dispersão da fase oleosa na fase aquosa; (B) adição da fase polimérica; (C) separação gradual de microcoacervatos sobre a superfície das gotas do material do núcleo; e (D) coalescência dos microcoacervatos, constituindo uma membrana ao redor do material do núcleo. Adaptado da referência [61]	47
Figura 10- Estatística de artigos científicos publicados relacionados (a) a nanomateriais e (b) a sua toxicidade. Adaptado da Referência. [66]	50

Figura 11- Comparação de tamanho entre macrófagos de rato e nanopartículas na escala de 100 nm a 1 μ m. Adaptado da referência [75].	52
Figura 12- Mecanismos da morte celular por apoptose. Adaptado da referência [86].	57
Figura 13- Esquema de síntese do derivado porfirínico 3-mono-piridil substituído (3MPyTPP).	66
Figura 14- Estruturas dos oito derivados porfirínicos monossustituídos sintetizados.	68
Figura 15- Redução do MTT a formazan pela ação da enzima desidrogenase mitocondrial.	76
Figura 16- Monitoramento espectrofotométrico do andamento da reação de preparação da <i>meso</i> -3-mono-piridil(trifenil)porfirina em função do tempo. Espectros obtidos em ácido acético.	85
Figura 17- Espectros de ^1H RMN das porfirinas (a) 3-MPyTPP e (b) 4-MPyTPP em CDCl_3 , as respectivas estruturas, as atribuições e os valores integrados dos sinais.	87
Figura 18- Espectros no infravermelho da porfirina 3-MPyTPP (a) de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 2000 a 400 cm^{-1} , com indicação do número de onda das principais bandas, cuja atribuição tentativa é mostrada na tabela 4.	89
Figura 19- Monitoramento espectrofotométrico da reação de metalação da 4-MPyTPP com Zn(II) em função do tempo. Espectros obtidos em ácido acético glacial.	92
Figura 20- Diagrama de orbitais moleculares e os respectivos estados espectroscópicos de porfirinas apresentando simetria D_{4h} , com indicação para as transições eletrônicas correspondentes às bandas Soret e Q. (Adaptado da Ref. [107]).	92
Figura 21- Espectros eletrônicos em CH_2Cl_2 dos derivados porfirínicos metilados com piridina ligada pelo posição (a) 3 ou (b) 4 ao anel porfirínico.	95
Figura 22- Espectros de ^1H RMN das porfirinas (a) 3-MMe e (b) Zn-3MMe , as respectivas estruturas e atribuições e valores integrados dos sinais. Espectros obtidos em DMSO deuterado.	96

Figura 23- Espectros de infravermelho das porfirinas 3-MPyTPP, 3-MMe e Zn-3MMe na região espectral de 4000 a 2000 cm^{-1} . Destaque para a banda em torno de 3318 cm^{-1} , característica de porfirinas na forma de base livre.	97
Figura 24- Espectros eletrônicos dos derivados porfirínicos sintetizados contendo complexos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ ligados aos grupos (a) 3-piridil ou (b) 4-piridil do anel porfirínico. Espectros obtidos em CHCl_3	100
Figura 25- Espectro de ^1H RMN da porfirina 4MRu apresentando a respectiva estrutura molecular e atribuição de sinais. Abaixo do espectro, estão indicados os valores integrados dos sinais. Espectros obtidos em CDCl_3	101
Figura 26- Espectros infravermelho das porfirinas 4-MPyTPP, 4MRu e do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ na região espectral de 2000 a 400 cm^{-1} . Destaque para as principais bandas da porfirina coordenada ao complexo de rutênio.	102
Figura 27- Voltamogramas cíclicos de uma solução $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol.L}^{-1}$ de 3MRu em DMF, na faixa de (a) -1,7 e +1,5V e (b) +0,5 e +1,5V, utilizando eletrodo de platina. Eletrólito: TEAClO_4 0,1 mol.L^{-1}	103
Figura 28- Espectros de fluorescência das porfirinas base-livre sintetizadas em CH_2Cl_2 , obtidos excitando-se em $\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$	105
Figura 29- Curvas de decaimento radioativo do $^1\text{O}_2$ (em 1270 nm), registradas após incidência de pulsos de laser com intensidades na faixa de 1,04 a 7,40 mJ.cm^{-2} , utilizando soluções dos derivados porfirínicos monocatiônicos (a) 4MRu e (b) Zn-4MRu em clorofórmio. $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $\text{Abs}(532) \approx 0.02 \text{ a.u.}$	107
Figura 30- Formulação de ACM obtida através do processo de coacervação.	112
Figura 31- Histograma das microcápsulas de HEC obtidas através do método de coacervação simples.	114

Figura 32- Histogramas das cápsulas de HEC obtidas após (a) 0, (b) 10, (c) 15 e (d) 20 minutos de ultrassonicação. Potência = 100 kJ.s ⁻¹ .	115
Figura 33- Imagem de Microscopia Confocal, acoplada ao modo de fluorescência, de microcápsulas de HEC contendo a porfirina 3MMe na concentração de 1,0.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ ; λ_{exc} = 488 nm.	116
Figura 34- Imagens de microscopia óptica de uma emulsão de HEC contendo 3MMe (a) recém preparada e (b) após 7 dias sob refrigeração, indicando a formação de agregados....	117
Figura 35- Distribuição de tamanho das cápsulas de ACM, submetidas a 10 minutos de ultrassonicação, nas concentrações de tween 20 de (a) 0, (b) 0,4, (c) 0,8, (d) 1,0, (e) 1,2 e (f) 1,6%.	119
Figura 36- Microscopias óticas das cápsulas de ACM, submetidas a 10 minutos de ultrassonicação, nas concentrações de tween 20 de (a) 0, (b) 0,4, (c) 0,8, (d) 1,0, (e) 1,2 e (f) 1,6%.	120
Figura 37- Imagens de Microscopia Confocal de fluorescência, de microcápsulas de ACM (a) sem porfirina; (b) e (c) contendo 1,0.10 ⁻⁴ Mol.L ⁻¹ de 3MMe, λ_{exc} = 488 nm.	121
Figura 38- Espectros de emissão obtidos para uma emulsão contendo 1,2% de tween 20, antes e após ser submetida a processamento por ultrassonicação por 10 minutos (linha vermelha) e 20 minutos (linha azul); λ_{exc} = 417 nm.	122
Figura 39- (a) Estrutura da porfirina 3MMe e (b) seu espectro de absorção. No detalhe, o espectro expandido da região entre 500 e 700 nm, com indicação para as quatro bandas Q da porfirina.	126
Figura 40- Percentagem de células viáveis após 3 horas de incubação, na ausência (controle) e presença de cápsulas poliméricas de ACM sem o composto fotoativo (A e C) e contendo 1,0x10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹ de 3MMe (B e D); não irradiadas (A e B); e irradiadas (C e D).	127

Figura 41- Influência do tempo de incubação na citotoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em cápsulas de ACM.	128
Figura 42- Influência do tempo de incubação (A) e do tempo de irradiação (B) na fototoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em micro e nanocápsulas de ACM.....	128
Figura 43- Porcentagem de células viáveis após 3 horas de incubação, na ausência (controle) e presença de cápsulas poliméricas de HEC sem o composto fotoativo (A e C) e contendo $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de 3MMe (B e D); não irradiadas (A e B); e irradiadas (C e D).	130
Figura 44- Influência do tempo de incubação na citotoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em micro e nanocápsulas de HEC.	131
Figura 45- Influência do tempo de incubação (a) e do tempo de irradiação (b) na fototoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em micro e nanocápsulas de HEC.....	131
Figura 46- Viabilidade celular observada após 3 horas de incubação, na ausência (controle) e presença de cápsulas poliméricas de ACM (A e C) e de HEC (B e D). Experimentos A e B realizados no escuro; e experimentos C e D realizados na presença de radiação vermelha (650 nm). Tempo de incubação = 6 horas.	132
Figura 47- Histograma de distribuição de tamanho das partículas de lipossomas de FC.	134
Figura 48- Comparação da citotoxicidade (A e B) e fototoxicidade (C e D) das formulações poliméricas de (a) ACM e (b) HEC com a formulação lipídica de FC. Experimentos A e C realizados com as micro/nanocápsulas poliméricas; e experimentos B e D realizados com os lipossomas de FC.....	134
Figura 49- Intensidade de fluorescência em 655 nm (em contagem de fótons por segundo, cp.s^{-1}) em função da concentração de 3MMe, na faixa de $1,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, para as formulações poliméricas de (a) ACM e (b) HEC. $\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$. As amostras foram diluídas em meio de cultura DMEM incolor.....	136

Figura 50- Percentagem de incorporação da porfirina 3MMe em células HeLa, em função do tempo de incubação, para as formulações poliméricas de HEC e ACM e para a formulação lipídica de FC.	136
Figura 51- Percentagem de células viáveis após 6 horas de incubação, na ausência (controle) e presença de cápsulas poliméricas de ACM contendo os 8 compostos fotoativos na concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	138
Figura 52- Comparação da fototoxicidade das porfirinas base-livre encapsuladas em ACM, perante células HeLa. As células foram incubadas durante 6 horas e o tempo de irradiação, em 650 nm, foi de 10 minutos.	139
Figura 53- Espectro da lâmpada de Hg utilizada nos experimentos de fotoatividade.	140
Figura 54- Viabilidade celular após incubação das células HeLa com as (a) metaloporfirinas e (b) porfirinas base-livre encapsuladas em ACM. Irradiação com fonte de luz branca por 60 minutos.	141
Figura 55- Porcentagem de células viáveis após 3 horas de incubação, na ausência (controle) e presença de cápsulas poliméricas de ACM contendo a porfirina 3MMe (A e C) e da porfirina 3MMe não encapsulada (B e D); não irradiadas (A e B); e irradiadas (C e D).	145
Figura 56- Taxa de incorporação da porfirina 3MMe não encapsulada (pontos vermelhos) e incorporada em partículas poliméricas de ACM (pontos pretos).	145
Figura 57- Espectros de excitação (linha tracejada) e de emissão (linha contínua) dos marcadores Hoescht 33258 (azul), LysoTracker Green (verde) e MitoTracker Orange (vermelho). Espectros obtidos utilizando-se o Fluorescence SpectraViewer, um recurso da Molecular Probes® da Invitrogen. [103].....	151
Figura 58- Imagens de microscopia confocal de fluorescência de células Hela. (A) sem a visualização da fluorescência e (B) , (C) e (D) monitorando-se a emissão dos marcadores de lisossomos, núcleo celular e mitocôndrias, respectivamente.	152

Figura 59- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa incubadas com a porfirina 3MMe encapsulada em ACM. Imagens de fluorescência (A) da porfirina 3MMe encapsulada e (B) do marcador de mitocôndrias. Em (C) a sobreposição das duas imagens de fluorescência.....	153
Figura 60- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa, incubadas com a porfirina 3MMe encapsulada em ACM, durante 1, 3, 6 e 9 horas (colunas da esquerda para a direita, respectivamente); na presença de marcadores de núcleo, mitocôndrias e lisossomos (fluorescência azul, laranja e verde, respectivamente).....	155
Figura 61- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa, incubadas com a porfirina 3MMe não encapsulada, durante 3 horas, na presença do marcador de núcleo Hoescht (fluorescência azul). A barra equivale a 20 μm	157
Figura 62- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de cápsulas de ACM marcadas com fluorescamina, contendo a porfirina 3MMe. Em (a) é mostrada a imagem óptica convencional, sem a visualização da fluorescência. Em (b) e em (c) visualização da emissão da porfirina e da fluorescamina, respectivamente; em (d) a sobreposição da fluorescência da porfirina e da fluorescamina. A barra equivale a 20 μm	158
Figura 63- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa, incubadas com a formulação de ACM marcada com fluorescamina. Em (a) a imagem sem visualização da fluorescência; em (b) e (c) visualização da emissão da porfirina 3MMe e da fluorescamina, respectivamente; em (d) a sobreposição das imagens de fluorescência. A barra equivale a 20 μm	159
Figura 64- Marcação com azul de tripan em células mantidas como controle (a) e controle irradiado (b) ; incubadas com a formulação de ACM, mantidas no escuro (c) e irradiadas (e) ; e incubadas com a porfirina 3MMe não encapsulada, mantidas no escuro (d) e irradiadas (f)	162

Figura 65- Porcentagem de células marcadas com azul de tripan nos diferentes tratamentos realizados.....	163
Figura 66- Porcentagem de núcleos sub-diplóides (M1) em células HeLa. Células tratadas com a porfirina não encapsulada (3MMe) e incorporada à formulação polimérica (ACM), no escuro ou irradiadas. * indica irradiação.	165
Figura 67- Porcentagem de citocromo c mitocondrial em células HeLa. Células tratadas com a porfirina não encapsulada (3MMe) e incorporada à formulação polimérica (ACM), no escuro e irradiadas (*).	166
Figura 68- Perda do potencial de membrana mitocondrial de células HeLa tratadas com formulação polimérica de ACM no escuro (c) e após a irradiação (e), e com a porfirina 3MMe em solução no escuro (d) e quando irradiada (f). Os histogramas (a) e (b) referem-se ao grupo controle no escuro e quando irradiado, respectivamente.	169
Figura 69- Porcentagem de células HeLa com diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Células tratadas com a porfirina não encapsulada (3MMe) e incorporada à formulação polimérica (ACM), no escuro ou irradiadas (*).	170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Configuração eletrônica dos orbitais moleculares antiligantes dos estados eletrônicos fundamental e excitado do O ₂ .	35
Tabela 2- Concentração dos constituintes empregados nas formulações poliméricas de ACM e HEC.	73
Tabela 3- Resultados de análise elementar das porfirinas 3-MPyTPP e 4-MPyTPP.	86
Tabela 4- Atribuição tentativa dos principais sinais dos espectros no infravermelho apresentados na Figura 18, para as porfirinas 3-MPyTPP e 4-MPyTPP (cm ⁻¹).	90
Tabela 5- Bandas de absorção dos derivados porfirínicos metilados sintetizados e os respectivos valores de absortividade molar (log ε).	95
Tabela 6- Bandas de absorção dos derivados porfirínicos coordenados a complexos [Ru(bipy) ₂ Cl] ⁺ e os respectivos valores de absortividade molar (log ε).	100
Tabela 7- Rendimentos Quânticos de Fluorescência (φ _{fl}) dos compostos sintetizados e os respectivos desvios padrão (DP) em CH ₂ Cl ₂ , excitando-se em λ _{exc} = 417 nm.	105
Tabela 8- Rendimentos quânticos de formação de ¹ O ₂ , φ _Δ e tempos de vida τ (em CHCl ₃) dos oito derivados porfirínicos sintetizados. TPP foi utilizada como padrão.	107
Tabela 9- Rendimentos quânticos de formação de ¹ O ₂ , φ _Δ , tempos de vida τ (em CHCl ₃) e eficiências fotodinâmicas φ _{EF} perante células HeLa, dos oito derivados porfirínicos sintetizados. TPP utilizada como padrão.	142
Tabela 10- Concentração, comprimento de onda de excitação e região de emissão da porfirina 3MMe e dos marcadores de organelas utilizados nas imagens de Microscopia de Fluorescência Confocal.	151
Tabela 11- Percentagem de sobreposição da porfirina 3MMe encapsulada em ACM com os marcadores de mitocôndrias e lisossomos.	154

Tabela 12- Percentagem de sobreposição da porfirina 3MMe encapsulada em ACM com os marcadores de mitocôndrias, lisossomos e núcleo. Tempo de incubação variado de 1 a 9 horas. Entre parênteses, o desvio padrão (DP) das medidas. 156

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACM	Formulação de atelocolágeno marinho/goma xantana
Apaf1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i> (Fator 1 de ativação da protease apoptótica)
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (Linfoma de células B 2)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DP	Desvio padrão
EDL	Espalhamento Dinâmico de Luz
FC	Fosfatidilcolina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Órgão governamental que faz o controle de medicamentos e alimentos nos Estados Unidos)
Fs	Fotossensibilizador
HEC	Formulação de hidroxietilcelulose
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus humano da imunodeficiência)
LiTFMS	trifluorometanossulfonato de lítio
Log P_{OA}	Coeficiente de partição <i>n</i> -octanol/água
MTT	<i>(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> (Brometo de Metiltiazildifenil-tetrazólico)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão Fosfato-salino)
RBP	Receptor benzodiazepínico periférico
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEACIO₄	Perclorato de Tetraetil Amônio
TFD	Terapia Fotodinâmica

TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TPP	<i>meso</i> -tetrafenil-porfirina
ϕ_{Δ}	Rendimento Quântico de Formação de Oxigênio Singlete
ϕ_f	Rendimento Quântico de Fluorescência
[Ru(bipy)₂Cl₂]	cloro-bis-bipiridinarutênio(II)
¹H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
3-MPyTPP	<i>meso</i> -3-monopiridil(trifenil)porfirina
4-MPyTPP	<i>meso</i> -4-monopiridil(trifenil)porfirina
3MMe	Cloreto de mono(<i>N</i> -3-metilpiridínio)trifenilporfirina
4MMe	Cloreto de mono(<i>N</i> -4-metilpiridínio)trifenilporfirina
3MRu	μ -{(N-3-piridil)trifenilporfirina} - {bis(2,2'-bipiridil)clororutênio(II)}
4MRu	μ -{(N-4-piridil)trifenilporfirina} - {bis(2,2'-bipiridil)clororutênio(II)}
Zn-3MMe	Cloreto de mono(<i>N</i> -3-metilpiridínio)trifenilporfirina complexada com Zn(II)
Zn-4MMe	Cloreto de mono(<i>N</i> -4-metilpiridínio)trifenilporfirina complexada com Zn(II)
Zn-3MRu	μ -{(N-3-piridil)trifenilporfirina} - {bis(2,2'-bipiridil)clororutênio(II)} complexada com Zn(II)
Zn-4MRu	μ -{(N-4-piridil)trifenilporfirina} - {bis(2,2'-bipiridil)clororutênio(II)} complexada com Zn(II)

SUMÁRIO

1. Introdução	27
1.1 Porfirinas e Metaloporfirinas: dos Sistemas Biológicos ao Desenvolvimento da Química Supramolecular	27
1.1.1 Porfirinas em Química Supramolecular	28
1.2 Propriedades e Aplicações das Porfirinas	30
1.3 Terapia Fotodinâmica (TFD)	31
1.3.1 Porfirinas como Fotosensibilizadores	36
1.4 Encapsulamento: Uma Estratégia para o Emprego de Substâncias Hidrofóbicas como Agentes Terapêuticos	43
1.4.1 Técnicas de Encapsulamento	44
1.4.1.1 Coacervação	46
1.5 Interação com Sistemas Biológicos e Toxicidade de Nanomateriais	48
1.6 Mecanismos de Morte Celular	54
1.6.1 Terapia Fotodinâmica e Morte Celular	57
2. Justificativa do Projeto	61
3. Objetivos	63
3.1 Objetivos Gerais	63
3.2 Objetivos Específicos	63
4. Materiais e Métodos	65
4.1 Síntese dos Derivados Porfirínicos Monossustituídos	65
4.2 Caracterização das Porfirinas Sintetizadas	69
4.2.1 UV-Vis	69
4.2.2 Ressonância Magnética de Próton (^1H RMN)	69
4.2.3 Microanálise	69
4.2.4 Infravermelho	69
4.2.5 Voltametria Cíclica	70
4.2.6 Determinação do Rendimento Quântico de Fluorescência ϕ_{fl}	70
4.2.7 Determinação do Rendimento Quântico de Formação de Oxigênio Singlete ϕ_{Δ}	71
4.3 Encapsulamento dos Derivados Porfirínicos	72
4.4 Caracterização das Nanocápsulas	73
4.4.1 Espectroscopia de Fluorescência	73
4.4.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)	74

4.4.3	Microscopia Óptica	74
4.4.4	Microscopia de Fluorescência Confocal	74
4.5	Cultura de Células HeLa	75
4.6	Toxicidade das Porfirinas Nanoencapsuladas	75
4.7	Atividade Fotodinâmica das Porfirinas Nanoencapsuladas	76
4.8	Preparação de Lipossomas	77
4.9	Taxa de Incorporação	77
4.10	Microscopia de Fluorescência Confocal	79
4.11	Marcação de Células com Azul de Tripán	79
4.12	Fragmentação de DNA	80
4.13	Liberção de Citocromo C	81
4.14	Perda do Potencial de Membrana Mitocondrial Ψ	81
5.	Síntese e Caracterização dos Derivados Porfirínicos	84
5.1	Mono-piridil Porfirinas	84
5.2	Porfirinas Metaladas com Zn(II)	91
5.3	Derivados Porfirínicos Metilados	94
5.4	Derivados Porfirínicos Coordenados ao Complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$	98
5.5	Rendimento Quântico de Fluorescência ϕ_{fl}	104
5.6	Rendimento Quântico de Produção de Oxigênio Singlete (ϕ_{Δ})	106
5.7	Conclusões Parciais	108
6.	Encapsulamento dos Derivados Porfirínicos	111
6.1	Micro e Nano Cápsulas de Hidroxiethylcelulose (HEC)	114
6.2	Micro e Nanocápsulas de Atelocolágeno Marinho/Goma Xantana (ACM)	117
6.3	Conclusões Parciais	122
7.	Atividade Fotodinâmica	125
7.1	Cito e Fototoxicidade da Porfirina 3MMe Encapsulada em Micro e Nanocápsulas de ACM	126
7.2	Cito e Fototoxicidade da Porfirina 3MMe Encapsulada em Micro e Nanocápsulas de HEC	129
7.3	Nanocápsulas Poliméricas vs Lipossomas	133
7.4	Taxa de Incorporação Celular	135

7.5	Cito e Fototoxicidade dos Derivados Porfirínicos Sintetizados Encapsulados em ACM	137
7.6	Fotoatividade da Porfirina 3MMe Não Encapsulada e Incorporada no Sistema Polimérico de ACM	143
7.7	Conclusões Parciais	146
8.	<i>Citocalização e Mecanismo de Morte Celular</i>	149
8.1	Localização Intracelular da Porfirina 3MMe	150
8.2	Mecanismo de Morte Celular	160
8.2.1	Marcação com Azul de Tripan	161
8.2.2	Fragmentação de DNA	164
8.2.3	Liberação de Citocromo C	166
8.2.4	Perda do Potencial de Membrana Mitocondrial Ψ	167
8.3	Conclusões Parciais	173
9.	<i>Conclusões e Perspectivas</i>	175
10.	<i>Referências Bibliográficas</i>	178

Capítulo 1. Introdução

1. Introdução

1.1 Porfirinas e Metaloporfirinas: dos Sistemas Biológicos ao Desenvolvimento da Química Supramolecular

As porfirinas são compostos formados por um macrociclo denominado porfina, que apresentam vinte átomos de carbono e quatro átomos de nitrogênio, constituindo quatro anéis pirrólicos unidos entre si através de pontes metenil (Figura 1) . Geralmente, apresentam cor púrpura que, do grego *porphura*, deu origem ao nome *porphyrin* – porfirina. [1] A este macrociclo podem ser coordenados diferentes íons metálicos pela remoção dos íons H^+ dos grupos NH internos, dando origem às metaloporfirinas. [2]

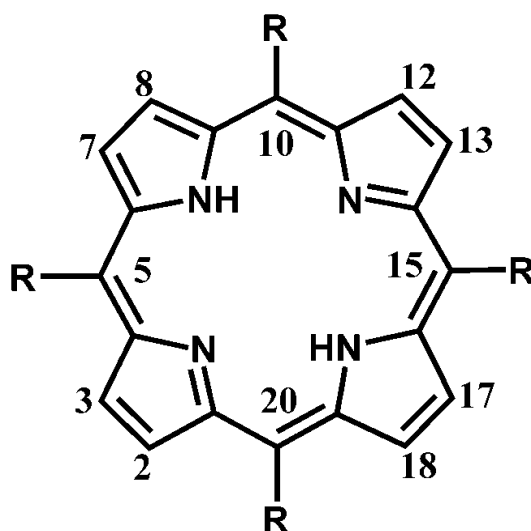


Figura 1- Estrutura da porfina.

Na natureza, as metaloporfirinas aparecem conjugadas às proteínas formando estruturas de grande importância biológica. Como exemplos, temos porfirinas complexadas

com Fe^{2+} , que estão presentes na hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio no sangue; na mioglobina responsável pelo armazenamento de oxigênio nos músculos; e em várias enzimas envolvidas em processos metabólicos como os citocromos. Outro exemplo de derivado porfirínico importante no sistema biológico é a Vitamina B12, que tem o cobalto como elemento metálico coordenado ao anel de uma corrina (porfirina sem uma das pontes metino). Sua importância biológica está associada, principalmente, a sua função como catalisador no organismo. Outro derivado de porfirina (mais exatamente uma clorina) de extrema relevância na natureza é a clorofila que contém o íon Mg^{2+} coordenado ao macrociclo reduzido e é o pigmento fotossintético presente nos cloroplastos das plantas. Estas porfirinas e derivados porfirínicos encontrados nos sistemas biológicos são compostos que apresentam várias cadeias laterais como grupos substituintes dos átomos de hidrogênio dos anéis pirrólicos (indicados pelos números 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 na Figura 1). [2, 3]

No sentido de reproduzir ou mimetizar as propriedades que estes compostos apresentam em sistemas bioquímicos, diversos derivados porfirínicos têm sido sintetizados em laboratório. Os derivados com substituintes R ligados nas posições 5, 10, 15 e 20 indicadas na Figura 1, são denominadas porfirinas *meso*-substituídas. Porfirinas com substituintes nessas posições encontram várias aplicações além da relativa facilidade com que podem ser sintetizadas. [4-7]

1.1.1 Porfirinas em Química Supramolecular

A química supramolecular é baseada na associação de espécies moleculares, de forma a obter entidades com maior grau de complexidade, novas propriedades e funcionalidades. As forças atuantes podem ser do tipo não covalentes, tais como ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, atrações eletrostáticas e doador-receptor do tipo ácido-base de Lewis. Esses

tipos de forças são essenciais na formação de sistemas do tipo “hóspede-hospedeiro” (comumente denominados “host-guest”) e nos processos de agregação, sendo que essa associação ocorre espontaneamente (self-assembly). [8, 9]

O avanço da química supramolecular teve como principais responsáveis os trabalhos realizados por Lehn e colaboradores, no final da década de 80, que tinham como principais objetivos estudar os fatores determinantes da organização molecular. [10, 11] Dentre esses fatores, encontram-se a estabilidade das espécies formadas; e a habilidade em reconhecer e definir, tanto o ambiente quanto os aspectos fundamentais no desenvolvimento de compostos que desempenhassem funções análogas às observadas nos sistemas biológicos.

Supermoléculas podem ser definidas como estruturas moleculares mais complexas nas quais o grau de acoplamento eletrônico entre as unidades constituintes é relativamente pequeno. Assim, as propriedades de cada um dos componentes são mais ou menos perturbadas nessas novas espécies, conferindo-lhes novas peculiaridades e funcionalidades não observadas nas espécies isoladas. Essas entidades supermoleculares possuem características próprias, que vão desde a auto-montagem coordenativa até propriedades de reconhecimento molecular, transformação, transporte e sinalização. Além disso, num sistema molecular altamente organizado, gera-se a possibilidade do surgimento de outras atribuições, como a transferência vetorial de elétrons (ou a separação de carga fotoinduzida) e de energia (ou efeito antena). [9]

Derivados porfirínicos apresentam estruturas planares relativamente rígidas e possuem uma simetria que favorece a formação de materiais cristalinos contendo cavidades relativamente grandes. Esse processo pode ser controlado por substituintes apropriados, capazes de se ligarem a outras moléculas por meio de ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo ou de van der Waals. [6]

A obtenção de supermoléculas e sistemas supramoleculares, contendo como uma das

unidades fundamentais moléculas de porfirinas, faz necessária a introdução de grupos coordenantes em posições estratégicas do macrociclo. O anel porfirínico possui três sítios possíveis para coordenação: as posições axiais do íon metálico das metaloporfirinas, as posições *meso*- do anel porfirínico e os anéis pirrólicos. A combinação dessas estruturas com outros complexos metálicos pode resultar na formação de dímeros ou até mesmo de arranjos supramoleculares cíclicos mais complexos. [12]

Assim, as porfirinas apresentam-se como interessantes unidades de construção de arranjos supramoleculares, pois apresentam diversas possibilidades de ligação para grupos coordenantes com orientação adequada. Além disso, a possibilidade de coordenar diferentes íons metálicos ao centro do macrociclo, bem como de grupos na periferia do anel permite a obtenção de compostos e materiais supramoleculares com as mais variadas propriedades, principalmente catalíticas e eletrocatalíticas.

1.2 Propriedades e Aplicações das Porfirinas

Derivados porfirínicos apresentam propriedades que possibilitam desde sua utilização em catálise até sua aplicação na medicina. A busca por novos catalisadores, mais eficientes e seletivos, está baseada principalmente na obtenção de compostos que sejam semelhantes aos dos sistemas biológicos. Nesse aspecto, complexos porfirínicos atendem as condições necessárias para mimetizar esses biosistemas. As porfirinas apresentam alta eficiência catalítica, são resistentes a meios oxidantes e apresentam boa seletividade em determinadas reações. Dentre os vários modelos miméticos desenvolvidos, merecem destaque aqueles que mimetizam o centro ativo do citocromo P-450, as monooxigenases e o sistema fotossintético. [13] Estes estudos permitem, além do desenvolvimento de compostos com propriedades interessantes do ponto de vista tecnológico, uma melhor compreensão de como esses

complicados sistemas funcionam.

Uma das mais importantes e interessantes aplicações das porfirinas e metaloporfirinas se dá na medicina. Derivados porfirínicos têm sido empregados como Fotossensibilizadores (Fs's) na Terapia Fotodinâmica (TFD), devido a propriedades tais como a alta afinidade por tecidos tumorais, alta eficiência de fotossensibilização, toxicidade relativamente baixa e o fato de absorverem luz na região da janela fotodinâmica (em torno de 600 a 900 nm). A luz, com comprimento de onda na região do vermelho e infravermelho próximo, apresenta maior capacidade de penetração nos tecidos biológicos [14] como mostrado na Figura 2. Fotossensibilizadores que absorvem na região do infravermelho próximo permitem o tratamento em tecidos mais profundos (até ~1 centímetro), possibilitando o tratamento de tumores maiores e mais internos. Entre os Fs's com estas características destacam-se derivados porfirínicos tais como as clorinas, bacterioclorinas e seus derivados, e as ftalocianinas. [15]

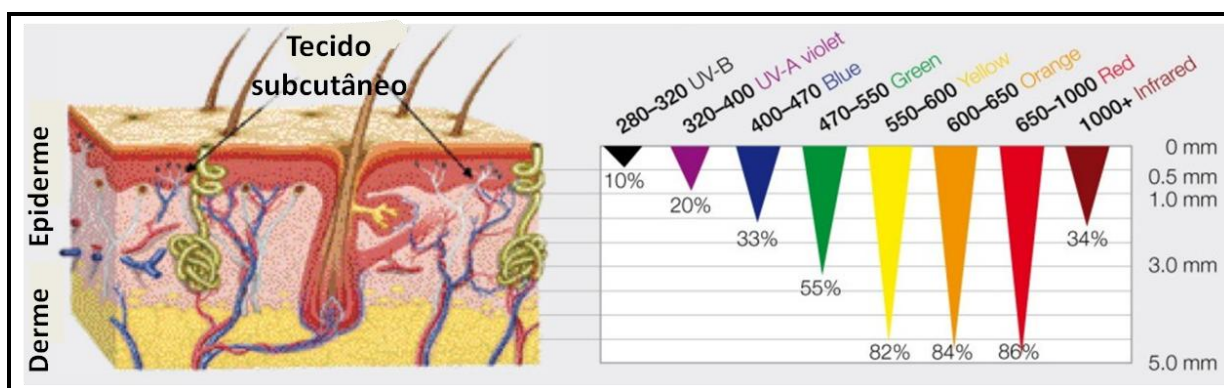


Figura 2- Profundidade de penetração da luz na pele em função do comprimento de onda, reproduzido da referência [16].

1.3 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A Terapia Fotodinâmica vem se consolidando como uma nova alternativa para o tratamento de câncer e algumas outras moléstias. Este tratamento, empregado na oncologia há

mais de 30 anos consiste, basicamente, na combinação de três fatores: um agente fotossensibilizador, luz (de comprimento de onda apropriado) e, na maioria dos casos, presença de oxigênio. [14, 17-19]

A fototerapia já era utilizada pelos antigos egípcios para o tratamento de tumores, mas pode-se dizer que os estudos modernos tiveram início em 1903, quando Tappeiner juntamente com o dermatologista Jesionek utilizaram a combinação de um corante denominado eosina e a luz do Sol para tratar um câncer de pele. [20] Em 1924, Policard relatou que porfirinas apresentavam a capacidade de se localizarem preferencialmente em tumores malignos, e relatou ainda que esses compostos só apresentavam toxicidade ao organismo na presença de oxigênio e quando irradiados com luz. [21] Então, em função dos promissores resultados obtidos por Schwartz e colaboradores com a hematoporfirina na década de 50, teve início a chamada primeira geração de drogas para TFD baseada em derivados da hematoporfirina. [14, 22] Posteriormente, a hematoporfirina foi tratada por Lipson com uma mistura de ácido acético:ácido sulfúrico, na proporção de 19:1 e o produto obtido, chamado de HpD, foi testado em camundongos e ratos onde o acúmulo preferencial do medicamento em células tumorais foi observado. Lipson relatou os resultados positivos obtidos no tratamento de um tumor no seio de uma paciente, utilizando o HpD e irradiação seletiva, marcando o início da TFD como uma alternativa bem sucedida no tratamento do câncer. [14] Verificou-se a regressão total da doença ao irradiar o tumor, o que possibilitou, no final da década de 60, a aprovação do novo procedimento para tratamento de seres humanos.

Todo o processo tem início quando o Fs é excitado pela incidência de radiação e em seguida, dois mecanismos principais de reação podem ocorrer: os mecanismos do tipo I e do tipo II, que estão ilustrados no diagrama de Jablonski apresentado na Figura 3. [14] O fotossensibilizador no estado fundamental S_0 absorve luz passando para o estado excitado S_n . Como os processos de relaxação vibracional (não radiativos) ocorrem mais rapidamente em

relação aos processos de decaimento radiativo, como fluorescência e fosforescência, as moléculas excitadas do Fs decaem por relaxações vibracionais (conversão interna) até atingirem o primeiro estado singlete excitado S_1 . Deste nível energético, as moléculas podem decair ao estado fundamental S_0 por emissão de fluorescência (processo 2 no diagrama da Figura 3), e por processos não radiativos de conversão interna (processo 3).

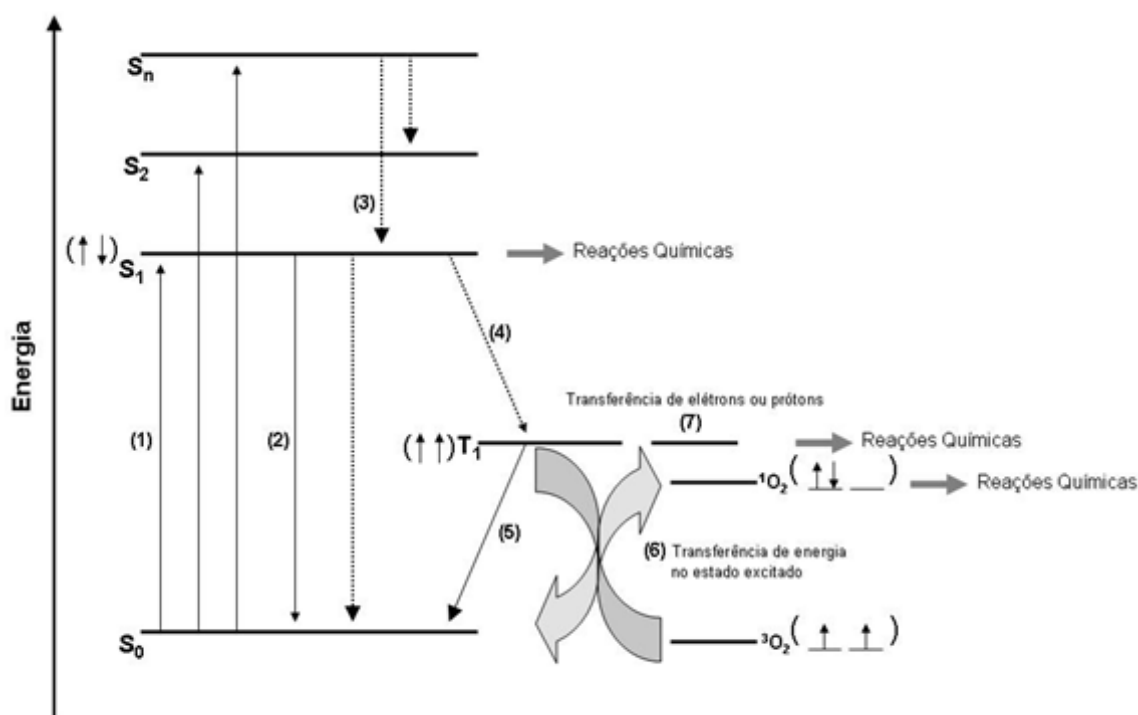


Figura 3- Diagrama de Jablonski modificado mostrando os mecanismos de ação dos Fs.

1) Absorção de luz; 2) Fluorescência; 3) Conversão interna; 4) Cruzamento intersistema; 5) Fosforescência; 6) Produção de oxigênio singlete (mecanismo tipo II); 7) transferência de elétron ou prótons (mecanismo tipo I). (Adaptado de Ref. [14])

Os Fs's podem sofrer também um processo de decaimento não radioativo para um estado tripleto excitado T_1 via cruzamento intersistema (processo 4). Deste nível de energia, as moléculas podem retornar ao estado fundamental com a emissão de fosforescência

(processo 5). O estado excitado triplete tem geralmente grande tendência a reagir com outras moléculas, por exemplo o substrato através do mecanismo do tipo I (processo 7). Nesse caso, o Fs no estado triplete reage por meio da transferência de prótons ou elétrons, gerando íons radicais ou radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental produzindo uma mistura de espécies de oxigênio altamente reativas capazes de oxidar biomoléculas. Já em relação ao mecanismo do tipo II (processo 6), o Fs no estado excitado triplete interage com o oxigênio no estado fundamental ($^3\Sigma_g$ ou 3O_2) por transferência de energia, ocorrendo a geração de oxigênio singlete, uma espécie altamente reativa e citotóxica. [14, 18, 23]

Em ambos os mecanismos, tipo I e tipo II, as espécies reativas geradas (espécies radicalares e oxigênio singlete) tendem a se difundir pelo tecido afetado, iniciando uma cadeia de reações bioquímicas que resultam em danos às células. Na maioria dos casos, os agentes fototerapêuticos podem não causar a destruição direta do tumor, mas podem comprometer o sistema vascular, ou seja, o sistema de irrigação tumoral (que transporta os nutrientes necessários para o crescimento do tumor), resultando em hipóxia e morte celular. [18, 19]

O termo oxigênio singlete se refere aos três micro-estados excitados do oxigênio molecular imediatamente superiores ao estado fundamental ($^3\Sigma_g$). A molécula de oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados π_x^* e π_y^* . Neste estado, os elétrons possuem o mesmo spin e a multiplicidade de spin máxima, correspondente ao estado de mais baixa energia (estado fundamental triplete). Na Tabela 1 estão apresentadas as formas de ocupação desses orbitais moleculares antiligantes, tanto para o oxigênio no estado fundamental quanto para os três micro-estados singletes excitados imediatamente superiores. Dentre os micro-estados excitados descritos, os dois degenerados de menor energia (estado excitado $^1\Delta$, 92,4 kJ.mol⁻¹) são responsáveis pela reatividade química do oxigênio singlete, pelo fato de apresentarem um tempo de vida relativamente mais longo quando comparado ao estado $^1\Sigma_g$ de maior energia. [18]

Tabela 1- Configuração eletrônica dos orbitais moleculares antiligantes dos estados eletrônicos fundamental e excitado do O₂.

Estado	Orbital molecular antiligante	Energia [†] / kJ.mol ⁻¹
³ Σ _g	[↑]π _x [*] [↑]π _y [*]	0
¹ Δ _x	[↑↓]π _x [*] []π _y [*]	92,4
¹ Δ _y	[]π _x [*] [↑↓]π _y [*]	92,4
¹ Σ _g	[↑]π _x [*] [↓]π _y [*]	159,6

[†] Energia relativa ao estado fundamental.

De uma forma geral, o procedimento adotado na Terapia Fotodinâmica consiste em administrar ao paciente (normalmente por via intravenosa) o composto Fs. Após determinado tempo, para que a droga atinja a concentração necessária nas células tumorais, as regiões afetadas são irradiadas com luz de comprimento de onda apropriado. O Fs, eletronicamente excitado, transfere energia para o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (mecanismo tipo II), provocando danos celulares que desencadeiam o processo de morte das mesmas. [19, 24]

A Terapia Fotodinâmica apresenta inúmeras vantagens quando comparada aos tratamentos convencionais. Com a TFD efeitos colaterais indesejáveis como enjôos e vômitos, causados pela radioterapia e quimioterapia, são eliminados ou minimizados. Além disso, inconvenientes causados por intervenções cirúrgicas onde, na maioria das vezes, os pacientes sofrem mutilações e/ou restam cicatrizes provenientes dos procedimentos cirúrgicos, além de um período prolongado de internação também são evitados. Tem-se verificado que após a eliminação natural dos tecidos tumorais tratados com a fototerapia, os tecidos tendem a ser regenerados não deixando cicatrizes, além de não provocar perda de cartilagem e tecido, que geralmente levam ao aparecimento de depressões no local tratado. [24]

1.3.1 Porfirinas como Fotossensibilizadores

No final da década de 80, foi desenvolvido o primeiro agente fototerapêutico para ser empregado em TFD com a autorização dos órgãos governamentais: o Photofrin®, desenvolvido pela QLT Photo-Therapeutics, cuja constituição química está baseada em oligômeros de hematoporfirina, constituídos de duas até nove unidades de porfirina unidas através de ligações éter, éster e carbono-carbono como mostrado na Figura 4. [14, 23, 25]

O Photofrin®, juntamente com o Levulan® Kerastick e o Visudyne®, são os três principais medicamentos utilizados em TFD, aprovados pelo FDA (Food and Drugs Administration), a agência responsável pelo controle de alimentos e fármacos nos Estados Unidos.

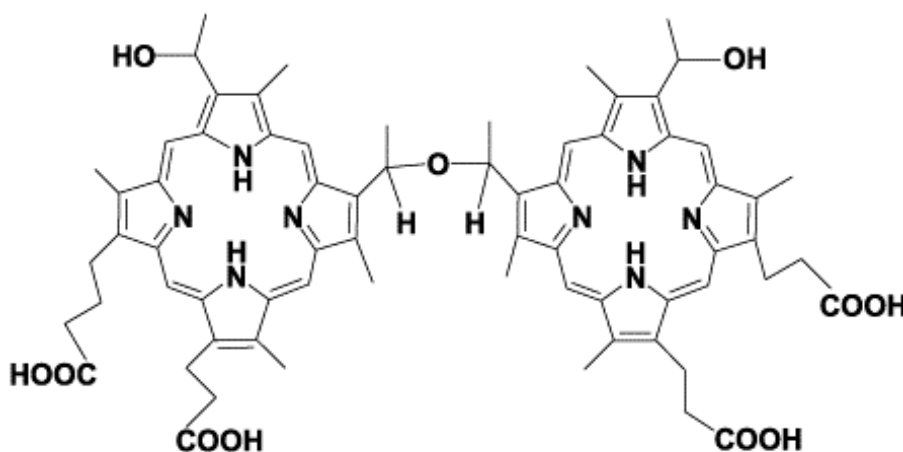


Figura 4- Estrutura de um dos componentes do Photofrin®, um dos fotossensibilizadores empregado em vários países para o tratamento utilizando a TFD. Reproduzido da ref. [19].

A verteporfirina, comercialmente conhecida como Visudyne®, foi o primeiro fármaco aprovado pela FDA para o tratamento fotodinâmico da degeneração macular da retina, uma doença que consiste no crescimento de vasos sanguíneos anormais sob o centro da retina (mácula). Estes vasos possuem defeitos nas suas paredes que provocam o extravasamento de

sangue, prejudicando a mácula, o que geralmente leva a perda total da visão. O Visudyne® consiste de uma benzoporfirina, cuja estrutura está apresentada na Figura 5. Esta droga é encapsulada em vesículas lipoprotéicas de baixa densidade e administrada nos pacientes através da corrente sangüínea. Após cerca de 15 minutos, a região a ser tratada é irradiada com um laser vermelho de comprimento de onda de 689 nm. [19]

Estudos também têm sido conduzidos no sentido de utilizar a Verteporfirina como Fs para tratamento de outros tipos de tumores. Têm-se verificado que esta benzoporfirina apresenta uma absorção 50% maior na região da janela fototerapêutica em relação ao Photofrin®, apresentando também uma rápida absorção pelo tumor e rápida eliminação do organismo. [26]

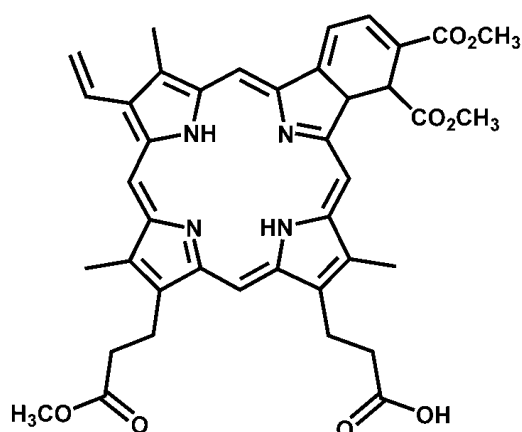


Figura 5- Estrutura do Visudyne®.

Nos últimos anos, tem-se buscado extensivamente novos compostos para serem aplicados como fotossensibilizadores em TFD. De uma forma geral, um Fs ideal deve apresentar as seguintes características: [19, 23, 24, 27]

- composição química constante e conhecida;
- toxicidade somente na presença de luz;
- retenção preferencial pelo tecido tumoral;
- rápida eliminação do organismo;

- alta reatividade fotoquímica, elevado rendimento quântico e tempo de vida no estado tripleto para reação com o substrato ou dioxigênio gerando oxigênio singleto;
- elevada absortividade molar em comprimentos de onda entre 600 e 900 nm.

Estudos vêm sendo realizados no sentido de desenvolver novos medicamentos para TFD, com propriedades fotofísicas e estruturais adequadas além de maior biocompatibilidade. [14, 23, 28-39] Isso se deve, em parte, às limitações apresentadas pelas drogas já aprovadas para uso terapêutico. No caso do Photofrin®, por exemplo, a absorção de luz na região da janela fotodinâmica é relativamente baixa, além de apresentar um elevado tempo de retenção no organismo, resultando em uma fotossensibilidade prolongada para a pele do paciente. [19, 40]

Granchi e colaboradores [7] realizaram a síntese e estudo das propriedades fotofísicas de uma série de perfluoro alquil e perfluoro aril porfirinas, cujas estruturas estão representadas na Figura 6. Os quatro compostos sintetizados apresentaram rendimento quântico de formação de oxigênio singleto superiores a 70% e elevado rendimento quântico de formação fotoinduzida do sensibilizador no estado excitado tripleto.

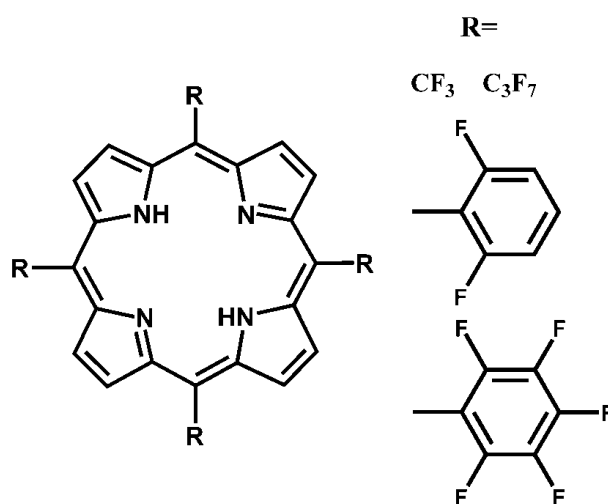


Figura 6- Estrutura das porfirinas sintetizadas por Granchi e colaboradores. (Reproduzido da Ref. [7])

Uma série de supermoléculas, obtidas pela coordenação de complexos de rutênio $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ e grupos metila aos grupos piridínicos de *meso*-fenil(piridil)porfirinas, foram preparadas e caracterizadas anteriormente em nosso grupo de pesquisa. [6] Os compostos sintetizados, contendo 1, 2, 3 e 4 grupos carregados na periferia do macrociclo porfirínico, estão apresentados na Figura 7.

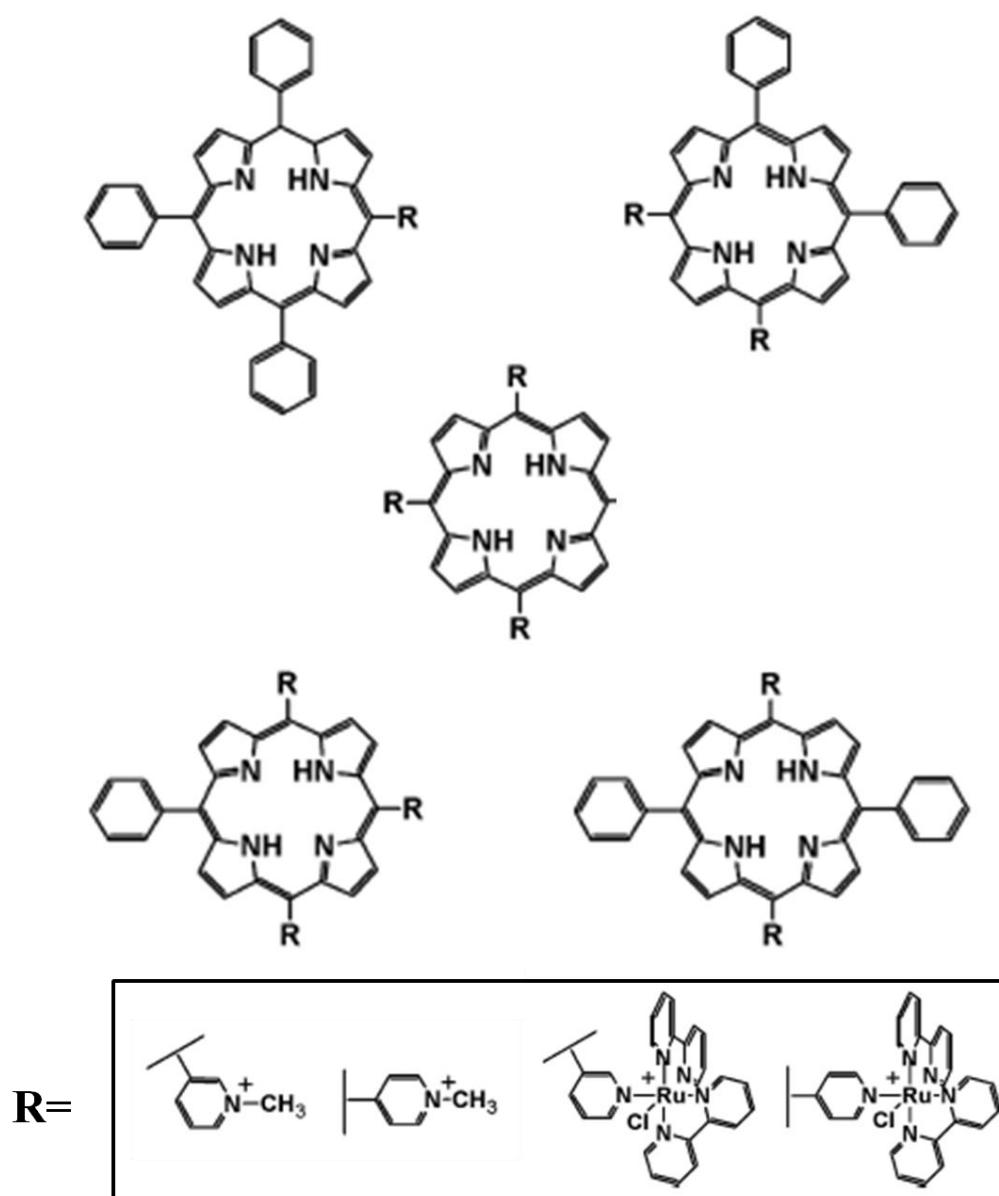


Figura 7- Estruturas das *meso*-fenil(piridil)porfirinas coordenadas a grupos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ e metila. (Adaptado da referência [41]).

A interação de drogas com sistemas biológicos pode ser avaliada através dos coeficientes de partição, ou seja, a razão da concentração no equilíbrio de um composto em um sistema bifásico, geralmente água/*n*-octanol. Nesse aspecto, um estudo foi realizado no sentido de determinar o coeficiente de partição *n*-octanol/água ($\log P_{OA}$) para a série de porfirinas catiônicas apresentadas na Figura 7. De uma forma geral, observa-se que o $\log P_{OA}$ aumenta em função da diminuição do número de grupos positivamente carregados ligados ao macrociclo porfirínico, sendo muito similares no caso dos isômeros *cis*- e *trans*-. Entretanto, quando vesículas foram utilizadas no sentido de mimetizar membranas biológicas e avaliar o grau de penetração dessas porfirinas na camada lipídica, a diferença entre os isômeros *cis*- e *trans*- foi apreciável. O isômero *cis*- apresenta uma constante de ligação muito maior do que a prevista pelo $\log P_{OA}$, apresentando um valor significativamente maior em relação ao isômero *trans*-. Essa diferença está relacionada à distribuição assimétrica de cargas no isômero *cis*-, que maximiza as interações hidrofóbicas e hidrofílicas e, conseqüentemente aumenta a constante de ligação. A natureza dos grupos periféricos também pode influenciar consideravelmente os coeficientes de partição. Os valores de $\log P_{OA}$ obtidos para a série de porfirinas contendo complexos de rutênio na periferia do anel são consideravelmente maiores que os apresentados pela série análoga tendo metilas como grupos periféricos. Isso se deve ao fato da metila ser um grupo pequeno comparado aos complexos de rutênio, tornando os primeiros muito mais polares que os segundos apesar de terem a mesma carga +1. [42]

Estudos de fototoxicidade e interação destes derivados porfirínicos com vesículas lipídicas e eritrócitos (glóbulos vermelhos) foram também realizados. Os resultados obtidos foram consistentes com os valores de $\log P_{OA}$, sendo que o isômero *cis* dos derivados dissustituídos apresentaram maior atividade fotodinâmica que os demais compostos da série, provavelmente em virtude do caráter anfifílico ser mais pronunciado nessas moléculas, propiciando uma maior interação com a membrana celular. Estes estudos não foram

realizados com os derivados monossubstituídos em virtude da sua baixa solubilidade em meio aquoso. [41, 43]

Estudos utilizando o derivado metalado com Zn(II) da tetra-piridil porfirina contendo como grupos periféricos quatro complexos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$, revelaram que este fotossensibilizador praticamente atua apenas pelo mecanismo do tipo II, gerando oxigênio singlete na presença de luz e causando danos ao DNA. A presença do íon Zn(II) promove uma forte associação da porfirina ao DNA, via interações eletrostáticas e coordenativas com os grupos fosfatos. [29]

Dentre os derivados porfirínicos que merecem destaque nessa busca por novos Fs's, vale destacar uma nova classe de compostos, considerados isômeros “verdadeiros” das porfirinas, que apresentam um ou dois anéis pirrólicos “confusos”: as porfirinas N-confusas e duplamente N-confusas, cujas estruturas estão apresentadas na Figura 8. As primeiras porfirinas N-confusas (contendo um anel pirrólico rotacionado de modo a ter o átomo de nitrogênio pirrólico voltado para fora do anel) foram sintetizadas em 1994, simultaneamente por Furuta e colaboradores [44] e Latos-Grazynski e colaboradores [45] em trabalhos independentes. Com isso surgiu a possibilidade de obtenção de outros isômeros contendo mais do que um anel pirrólico “confuso” e, seis anos após a descoberta do primeiro isômero, um segundo foi obtido por Furuta e colaboradores, contendo dois anéis pirrólicos adjacentes invertidos. [46]

Desde então, vários estudos têm sido conduzidos no sentido de compreender as propriedades desta nova classe de compostos. [47-51] A possibilidade de remoção dos prótons do interior do anel aliada à presença de um ou dois átomos de carbono doadores permite a coordenação de íons metálicos em estados de oxidação atípicos, como Ag(III) e Cu(III), formando complexos estáveis. [46, 48-50]

Em particular, o complexo de prata da porfirina duplamente N-confusa, mostrou-se

um promissor candidato a Fs para aplicações em TFD. Resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa [41, 47, 51] revelaram que este complexo é um excelente gerador de oxigênio singlete, apresentando um rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ de 0,92. Além disso, estudos cinéticos indicaram que este composto é quase totalmente decomposto em um período de 45 minutos, o que é extremamente favorável para a sua aplicação em TFD, pois acelera o processo de eliminação do composto do organismo, minimizando o período de fotossensibilidade ao qual o paciente fica submetido após o tratamento.

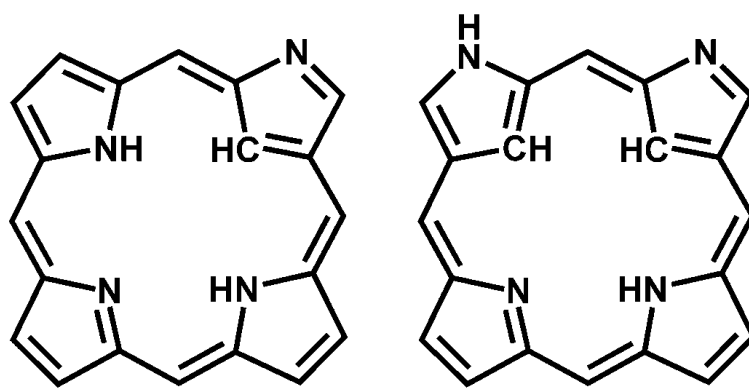


Figura 8- Estruturas das porfirinas N-confusas (a) e duplamente N-confusas (b). (Adaptado da referência [52]).

Uma das limitações de vários dos derivados porfirínicos citados anteriormente é que estes apresentam baixa ou nenhuma solubilidade em água. Isso representa uma limitação para o emprego destes compostos em TFD, visto que os Fs's são normalmente administrados por via intravenosa e uma alta solubilidade em meio aquoso é necessária para permitir a dispersão destes compostos no sangue, assim evitando o entupimento de veias e artérias. Contudo, as características de interação destes compostos com o meio biológico podem ser alteradas encapsulando-se os mesmos em vesículas, micro e nanocápsulas, micro e nanoesferas, micelas e outros sistemas que sejam biocompatíveis, possibilitando a dispersão daquelas drogas insolúveis no meio biológico. Uma descrição mais detalhada destes sistemas de

transporte e liberação de fármacos será apresentada no próximo item deste capítulo.

1.4 Encapsulamento: Uma Estratégia para o Emprego de Substâncias Hidrofóbicas como Agentes Terapêuticos

A fotossensibilidade, que afeta os pacientes submetidos à TFD por várias semanas após o tratamento e as altas intensidades de luz necessárias, são uma das poucas desvantagens deste tratamento. Pacientes tratados com porfirinas como Fs exibem por várias semanas uma fotossensibilidade da pele quando expostos à luz solar. Esse efeito é causado pelo elevado tempo de retenção da droga no organismo. Assim, para este tipo de terapia seria ideal um baixo acúmulo de droga na pele, bem como altas concentrações de droga no tumor em relação ao tecido saudável. [53] Com este objetivo, diversas estratégias vêm sendo adotadas a fim de direcionar estes agentes terapêuticos preferencialmente para as células doentes, minimizando seu acúmulo em células normais. Dentre estas merece destaque a utilização de sistemas de liberação e transporte de fármacos como lipossomas, micro- e nanocápsulas poliméricas, micro- e nano-esferas, micelas entre outros, geradas pela formação de ligações cruzadas na parte lipídica das estruturas anteriormente citadas. Deste modo produz-se um envoltório apresentando diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, de resistência mecânica e de permeabilidade. [53, 54]

Um sistema para liberação controlada de drogas ideal em TFD deve ser capaz de se acumular no tecido doente e permitir a liberação de concentrações terapêuticas do Fs de forma que este não atinja células saudáveis. O sistema utilizado deve ainda apresentar uma alta taxa de incorporação da droga e não alterar sua atividade, além de ser biodegradável. Cabe ressaltar também que, devido a sua estrutura química, os derivados porfirínicos tendem a formar agregados fotoquimicamente inativos ou pouco eficientes. Assim, outra razão para o emprego

de sistemas de liberação é fornecer um meio onde o Fs possa ser administrado preferencialmente na forma monomérica.

Sabe-se que sistemas de liberação de drogas apresentam uma tendência de se acumular em tumores. Isso ocorre devido a um fenômeno conhecido como “aumento da permeabilidade e efeito de retenção”. Isso se deve ao fato de que estes tecidos geralmente apresentam uma barreira endotelial semipermeável que permite que partículas alcancem as células alvo por simples difusão. [55]

Quando compostos são encapsulados, as propriedades de interação e solubilidade passam a ser definidas pelas propriedades da “cápsula”, ou seja, o tamanho e os grupos funcionais presentes na parte externa da mesma, que conferem as características de hidrofobicidade/hidrofilicidade e carga. Isso é interessante visto que a manipulação das propriedades da cápsula permite que processos como o de opsonização, isto é, a ligação de proteínas do plasma às partículas, tornando-as capazes de interagir com receptores situados na superfície das células fagocitárias, seja evitado ou minimizado. Sabe-se, por exemplo, que a utilização de polietileno glicol na superfície aumenta as interações repulsivas entre a cápsula e os componentes do plasma, minimizando assim a perda de droga pelo processo de opsonização. Assim pode-se garantir um maior acúmulo da droga no tecido alvo. [49, 50]

A seguir, será apresentada uma breve descrição de alguns sistemas utilizados para encapsulamento e transporte/liberação controlada de fármacos, bem como os principais métodos para a preparação dos mesmos.

1.4.1 Técnicas de Encapsulamento

Partículas e cápsulas biodegradáveis em escala nano e micrométrica são consideradas uma alternativa à utilização de lipossomas, pelo fato de permitirem que uma maior quantidade

de fármaco seja encapsulada e se tenha um maior controle do processo de liberação do mesmo. Tais vantagens são devidas, principalmente, à grande variedade de materiais disponíveis e os diferentes métodos para a preparação das mesmas. [55]

As micropartículas são pequenas partículas sólidas e esféricas com tamanho que varia entre 1 e 1000 μm . Já as nanopartículas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As cápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as esferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. [56]

O método ideal de micro e nanoencapsulação deve ser simples, reprodutível, rápido e fácil de transpor à escala industrial. Vários métodos para a preparação de micro e nanopartículas vêm sendo desenvolvidos, dentre estes pode-se citar a nebulização, processos de extrusão/solidificação, emulsificação/solidificação, polimerização e coacervação.

Na nebulização ou spray-drying, o fármaco é disperso ou dissolvido numa solução orgânica ou aquosa do polímero e o sistema é nebulizado numa corrente de ar quente. Após a evaporação do solvente, as partículas secas são recuperadas.

No método de extrusão, o material do núcleo na forma líquida, fundida ou em solução, é lançado através do orifício de um tubo fino ou seringa para formar microgotas, cujo tamanho será dependente do diâmetro do orifício e da velocidade de saída do material. A solidificação do material de revestimento pode ocorrer por evaporação do solvente, difusão do solvente ou reação química.

Partículas podem também ser preparadas através da formação prévia de uma emulsão, cuja fase interna, na forma de gotas, é solidificada para originar as partículas. Este é o método

de emulsificação/solidificação, sendo que a solidificação pode ocorrer através de diferentes processos.

Na técnica de polimerização *in situ*, o monômero é dissolvido na fase externa de uma emulsão, juntamente com o iniciador e um tensoativo. A polimerização ocorre no interior das micelas e resulta em partículas muito pequenas. Neste caso o fármaco pode estar presente durante a polimerização ou ser posteriormente adicionado para ser adsorvido à superfície polimérica. [57]

A seguir, será descrita em maiores detalhes a técnica de coacervação, método empregado nos processos de encapsulamento descritos nesta tese.

1.4.1.1 Coacervação

A palavra coacervação deriva do latim “co” (juntos) e “acerv” (vários). Quimicamente, “acerv” se refere aos compostos que sofrem uma separação de fases a partir de um meio aquoso durante a formação de uma segunda fase líquida. A coacervação é, portanto, um tipo de separação de fases que ocorre em soluções coloidais (Figura 9a) em determinadas condições, após a adição de uma fase polimérica (Figura 9b). A principal característica desses sistemas é que há duas fases líquidas em equilíbrio. A camada contendo pequenas quantidades de colóide chamadas de “microcoacervato” e a fase líquida pura (sem colóide), normalmente constituída apenas pelo solvente. Nesta situação, as duas camadas aquosas não se misturam livremente. Um coacervado é, por definição, imiscível com seu próprio solvente. [58, 59] Uma vez formado, o coacervato se deposita em torno de uma fase contendo o ingrediente a ser encapsulado (Figura 9c).

Existem dois métodos principais de coacervação: a simples e a complexa. No sistema simples, uma mudança de temperatura, pH ou o emprego da técnica de “salting-out” promove

a coacervação. Ou seja, essas alterações do meio causam a dessolvatação das moléculas do polímero promovendo as interações polímero-polímero em detrimento das interações polímero-solvente (Figura 9d). Nos sistemas complexos, duas espécies de cargas opostas estão envolvidas na separação de fases, que resulta da neutralização mútua entre os dois colóides em solução aquosa. [57, 58, 60]

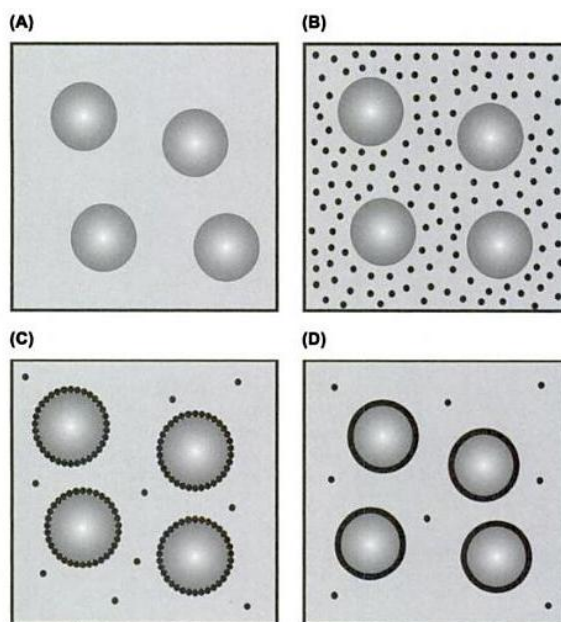


Figura 9- Etapas do processo de coacervação: **(A)** Dispersão da fase oleosa na fase aquosa; **(B)** adição da fase polimérica; **(C)** separação gradual de microcoacervatos sobre a superfície das gotas do material do núcleo; e **(D)** coalescência dos microcoacervatos, constituindo uma membrana ao redor do material do núcleo. Adaptado da referência [61]

Partículas obtidas pelo método de coacervação podem apresentar características que variam de acordo com a composição química do sistema, da velocidade de agitação, temperatura e pH. Todos esses fatores influenciam diretamente na morfologia, tamanho e, conseqüentemente, liberação do princípio ativo encapsulado [62]. Por exemplo, a agregação das partículas durante o processo de coacervação é um problema comumente encontrado durante os processos de coacervação simples e complexa. O rápido aumento da viscosidade

aparente da região rica em polímero causa o processo indesejável de agregação ou coalescência das partículas. Entretanto diversas alternativas podem ser empregadas para evitar ou diminuir esse processo. Dentre estas, a utilização de surfactantes catiônicos pode ser uma alternativa interessante quando se utiliza a coacervação complexa, visto que este é adsorvido na superfície do coacervado, diminuindo a tensão superficial e, conseqüentemente reduzindo a tendência das partículas de se agregarem [63].

A coacervação é empregada principalmente para encapsular compostos hidrofóbicos. Entretanto, o processo pode ser realizado em fase aquosa ou em meio orgânico, neste último caso possibilitando o encapsulamento de compostos hidrossolúveis. [57]

O método da coacervação apresenta algumas vantagens em relação aos outros métodos, principalmente quando se trata do encapsulamento de fármacos hidrossolúveis, onde ela apresenta elevados rendimentos de encapsulação. [57] Esse procedimento é empregado largamente também na indústria alimentícia, onde o processo é frequentemente empregado no encapsulamento de óleos vegetais e animais, vitaminas e nutrientes, prevenindo, por exemplo, a degradação e/ou oxidação destes componentes. [64]

1.5 Interação com Sistemas Biológicos e Toxicidade de Nanomateriais

As interessantes propriedades físico-químicas observadas nos nanomateriais são atribuídas a diversos fatores: ao seu pequeno tamanho aliado à sua elevada área superficial; à sua composição química que resulta nas suas características de pureza, cristalinidade e propriedades eletrônicas; à reatividade da sua superfície devido à presença de grupos funcionais reativos orgânicos e/ou inorgânicos; e à sua solubilidade, forma e agregação. Essas características podem influenciar na incorporação e interação desses novos materiais com

tecidos biológicos, de forma que essa combinação de efeitos pode resultar tanto em respostas biológicas positivas quanto adversas. Dentre os efeitos indesejáveis relatados na literatura, podemos destacar a ocorrência de inflamações, stress oxidativo, desnaturação de proteínas, danos a membranas e DNA, entre outros. [65]

Enquanto alguns nanomateriais são conhecidos por seus efeitos maléficos a saúde, como é o caso de nanopartículas produzidas em processos de combustão, devem ser considerados também os efeitos benéficos de muitos desses novos materiais. Vale destacar, por exemplo, os fulerenos funcionalizados que atuam como antioxidantes, assim como a utilização de diferentes nanopartículas no diagnóstico clínico, bem como no tratamento de inúmeras doenças. [66]

Os cosméticos modernos frequentemente apresentam em suas formulações componentes na escala nanométrica, como nanoemulsões e nanocápsulas. [67] Dentre esses produtos, pode-se incluir os desodorantes, shampoos, cremes, pós faciais, e perfumes dentre outros. [66]

Os nanomateriais desenvolvidos têm sido empregados na indústria de cosméticos por diversas razões:

- a) Devido a sua habilidade em penetrar nas camadas mais profundas da pele, de uma forma jamais conseguida por qualquer outro cosmético, liberando nutrientes que atuam na regeneração de células. Diversos estudos têm mostrado que nanopartículas são capazes de penetrar o estrato córneo, a principal barreira de proteção da pele, através dos folículos capilares e regiões flexíveis da pele, da mesma forma que estudos vêm mostrando que elas são facilmente incorporadas em células de pele. [68-71]
- b) Algumas nanopartículas têm propriedades antioxidantes, o que ajuda a manter a aparência jovem da pele. Como exemplo, tem-se os fulerenos funcionalizados, que agora são incorporados em diversos cosméticos como cremes. [72]

c) Devido ao seu pequeno tamanho e propriedades ópticas específicas, nanopartículas são usadas para reduzir rugas. Nesse aspecto, vale destacar o nanopó de alumina, usado para redução ótica de linhas finas.

Não são conhecidos ainda todos os efeitos que nanopartículas presentes em produtos de consumo podem causar à saúde. Sabe-se, por exemplo, que a prata, largamente utilizada como antibactericida, é tóxica a células humanas e animais quando se encontra na forma nanoparticulada. [73]

Através de uma simples busca na ISI Web of Knowledge database, Buzea C. e colaboradores [66] relataram que o número de publicações referentes a nanomateriais tem crescido exponencialmente desde o início da década de 90, atingindo cerca de 40.000 no ano de 2005 (Figura 10a). Nota-se também uma considerável ascensão no número de publicações discutindo a respeito da sua toxicidade, principalmente a partir de 2003.

Entretanto, o número de estudos relacionados aos efeitos tóxicos desses nanomateriais é consideravelmente inferior aos trabalhos relacionados ao desenvolvimento desses novos materiais, como pode ser observado na Figura 10b, com somente 500 publicações no ano de 2005.

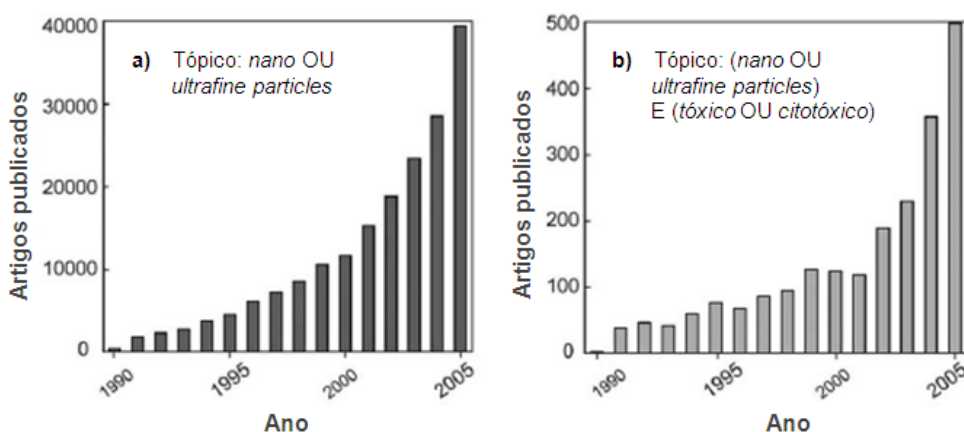


Figura 10- Estatística de artigos científicos publicados relacionados (a) a nanomateriais e (b) a sua toxicidade. Adaptado da Referência. [66]

Os nanomateriais sintetizados atualmente possuem dimensões comparáveis a de alguns vírus. Por exemplo, o vírus do HIV (sigla originada do inglês para vírus humano da imunodeficiência), possui dimensões em torno de 100 nm. Dessa forma, assim como os vírus, algumas nanopartículas podem penetrar nos pulmões ou na pele, atingindo facilmente os sistemas circulatório e linfático de humanos e animais, alcançando outros tecidos e órgãos e, potencialmente, interrompendo processos celulares que podem resultar em diferentes doenças. Essa habilidade em penetrar as barreiras biológicas se deve principalmente ao fato de que o sistema fagocitário é capaz de assimilar somente partículas de tamanho semelhante ao dos macrófagos (em torno de 10 e 20 μm). Partículas muito maiores ou menores não são facilmente incorporadas. Assim, nanopartículas com diâmetros inferiores a 200 nm são capazes de passar despercebidas pelo sistema fagocitário. [66]

Os impactos biológicos dos nanomateriais dependem do seu tamanho, forma, composição química, estrutura da superfície e estado de agregação. Estes parâmetros podem modificar a interação e incorporação celular, bem como sua ligação com proteínas. [74]

Algumas nanopartículas, dependendo da sua composição e tamanho, podem penetrar nas células, produzindo danos irreversíveis por stress oxidativo. A Figura 11 mostra o exemplo de uma célula e suas organelas comparadas a partículas de diferentes tamanhos. Pode-se compreender porque as nanopartículas são facilmente incorporadas em células e interagem com várias organelas (mitocôndrias, núcleo, entre outras). [75]

De fato, a primeira interação biológica de uma nanopartícula que é incorporada em um tecido é com a superfície da membrana celular. Essa interação pode resultar em danos a membrana de acordo com as características da partícula (hidrofobicidade, carga e atividade detergente) que governam a interação, penetração e rompimento da membrana da célula. A célula pode responder com a liberação do conteúdo intracelular, liberação intracelular de Ca^{2+} e indução de apoptose. A desnaturação ou degradação de proteínas podem resultar em

mudanças funcionais ou estruturais nas suas estruturas primária, secundária ou terciária, o que pode ocasionar uma interferência na atividade enzimática, por exemplo. Esses danos podem resultar do rompimento de ligações covalentes que são responsáveis pela estrutura da proteína como, por exemplo, as pontes dissulfeto. Existem também algumas evidências de que algumas nanopartículas, uma vez incorporadas na célula, podem atingir o núcleo, causando danos ao DNA. [65]

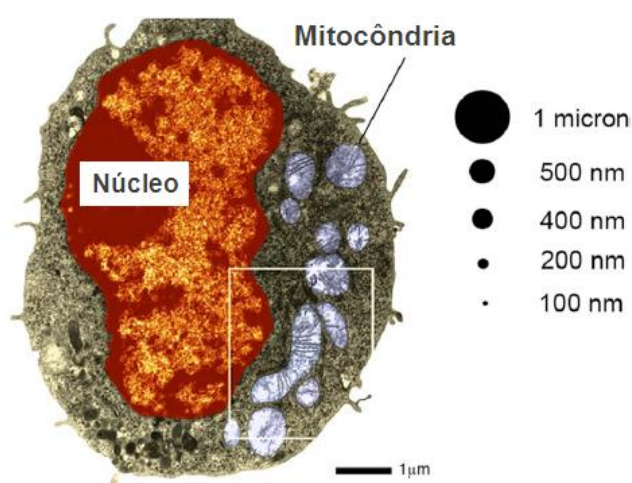


Figura 11- Comparação de tamanho entre macrófagos de rato e nanopartículas na escala de 100 nm a 1 µm. Adaptado da referência [75].

O mecanismo pelo qual as nanopartículas penetram as células sem nenhum ligante específico na sua superfície é assumido como sendo uma incorporação passiva. Essa incorporação pode ser iniciada por meio de forças de van der Waals, atração eletrostática, interações estéricas, ou efeitos de tensão interfacial, sendo que nenhum desses mecanismos de incorporação envolve a formação de vesículas. Assim, as nanopartículas têm livre movimento, o que as torna extremamente perigosas visto que podem se ligar a diferentes proteínas e organelas do citoplasma e até mesmo se localizarem no núcleo da célula. [66]

Nas últimas décadas, estudos utilizando diversas linhagens celulares bem como

modelos animais vêm demonstrando que partículas com tamanhos menores que 100 nm apresentam toxicidade. Hussain e colaboradores avaliaram a interação de partículas de prata de 15, 30 e 55 nm com macrófagos alveolares. Eles verificaram que, após 24 horas de exposição das células às nanopartículas, houve um decréscimo significativo da viabilidade celular quando as mesmas interagiram com as nanopartículas de 15 e 30 nm, enquanto o efeito tóxico das partículas de maior tamanho foi menos pronunciado. [76] Entretanto, outros estudos realizados com nanopartículas de prata, indicam que a sua toxicidade é bastante reduzida quando estas são recobertas com polissacarídeos, indicando que a modificação química da superfície de nanomateriais representa uma importante alternativa para minimizar, ou mesmo eliminar os possíveis efeitos tóxicos desses materiais. [77]

A estrutura cristalina também exerce grande influência na toxicidade dos nanomateriais. Sabe-se, por exemplo, que as duas formas cristalinas do TiO_2 (rutilo e anatase) apresentam diferentes níveis de toxicidade. Um estudo realizado com nanopartículas de TiO_2 de 200 nm, na forma de rutilo, mostrou que as mesmas são capazes de induzir danos oxidativos ao DNA, enquanto partículas do mesmo tamanho, mas na forma anatase não apresentam essa capacidade. [78] Braydich-Stolle e colaboradores, [79] verificaram mais tarde que, além da estrutura cristalina contribuir para a toxicidade, ela influencia também no mecanismo de morte celular. Verificou-se que a forma anatase do TiO_2 contribui para a morte celular por necrose, enquanto a forma rutilo inicia a morte por apoptose através da formação de espécies reativas de oxigênio. [29]

A alteração ou modificação da superfície de nanopartículas com alguns surfactantes em determinadas condições é uma alternativa para impedir a agregação das mesmas, bem como reduzir a toxicidade. Estudos mostraram que o recobrimento da superfície com dodecil sulfato de sódio (SDS) confere às nanopartículas um caráter tóxico, enquanto a utilização de tween 20 em concentrações menores que 0,1% não se mostrou tóxica. [79]

A incorporação de partículas em células também pode ser modulada através da modificação da superfície das mesmas, de forma que a utilização de albumina, lecitina, polietilenoglicol e peptídeos, por exemplo, pode ocasionar um aumento na taxa de incorporação de nanopartículas em células. [74]

Assim, estudos desses nanomateriais com células, fluídos corporais e proteínas se tornam de extrema importância no sentido de avaliar a toxicidade e prever o comportamento desses materiais no meio biológico.

1.6 Mecanismos de Morte Celular

O principal objetivo da Terapia Fotodinâmica é destruir células indesejáveis (infectantes, doentes ou cancerosas). Dois principais mecanismos de morte celular podem ocorrer: apoptose ou necrose. Na maioria dos casos a TFD é altamente eficiente em induzir apoptose, [80] mas somente necrose ou uma combinação dos dois mecanismos podem ocorrer.

A necrose celular em células animais ocorre em decorrência de uma injúria aguda, como um trauma ou a falta de suprimentos. Células necrosadas são caracterizadas por um aumento no volume celular, aliado a pequenas mudanças na cromatina. Ocorre uma desorganização das organelas no citoplasma e a mitocôndria começa a sofrer mudanças, incluindo a acumulação de partículas lipídicas no seu interior que provocam o seu inchaço. A cito arquitetura da célula é perdida, ocorrendo liberação de proteases, nucleases e do conteúdo lisossomal. A integridade da membrana plasmática é perdida, provocando a lise da célula e conseqüente desencadeamento do processo de inflamação do tecido. [81-83]

Apoptose é um processo de morte celular controlado por sinais intra e extracelulares, que resultam em uma sequência de mudanças morfológicas e bioquímicas para uma

destruição sistemática da célula e preparação dos resíduos dos componentes celulares, conhecidos como corpos apoptóticos, para serem capturados pelos macrófagos ou células vizinhas. Esse processo limita a liberação de material intracelular nas vizinhanças, prevenindo a inflamação do tecido [84], o que é desejável em TFD.

Células apoptóticas têm seu tamanho reduzido, a cromatina se condensa e se quebra em fragmentos dentro do núcleo. As organelas citoplasmáticas permanecem intactas, apresentando somente pequenas mudanças. A célula destaca-se das células vizinhas e começa a apresentar bolhas em sua superfície (processo chamado de zeiose) e, se a célula é grande, frequentemente quebra-se em fragmentos envolvidos por membrana chamados corpos apoptóticos. [82]

Células sofrendo apoptose não apenas possuem uma característica morfológica, mas também possuem modificações bioquímicas características, que podem ser usadas para identificar células apoptóticas. Durante a apoptose, uma endonuclease cliva o DNA cromossomal em fragmentos de diferentes tamanhos que podem ser analisados por técnicas como a eletroforese em gel.

Uma mudança especialmente importante também ocorre na membrana plasmática. A fosfatidilserina, um fosfolípídeo carregado negativamente e localizado na camada interna da bicamada lipídica da membrana, se desloca para a camada externa em células apoptóticas. Desta forma, permite a sua ligação com a proteína marcada Anexina V, permitindo a detecção dessa alteração na membrana. Células que entram em apoptose, com frequência perdem o potencial elétrico que existe através da membrana de suas mitocôndrias, e proteínas como citocromo c são liberadas do espaço intermembranas da mitocôndria para o citosol. [81, 84]

A maquinaria intracelular responsável pela apoptose depende de uma família de proteases que têm uma cisteína no seu sítio ativo: as caspases. Nem todas as caspases mediam a apoptose, como por exemplo as caspases 1, 4 e 5 que estão relacionadas à resposta

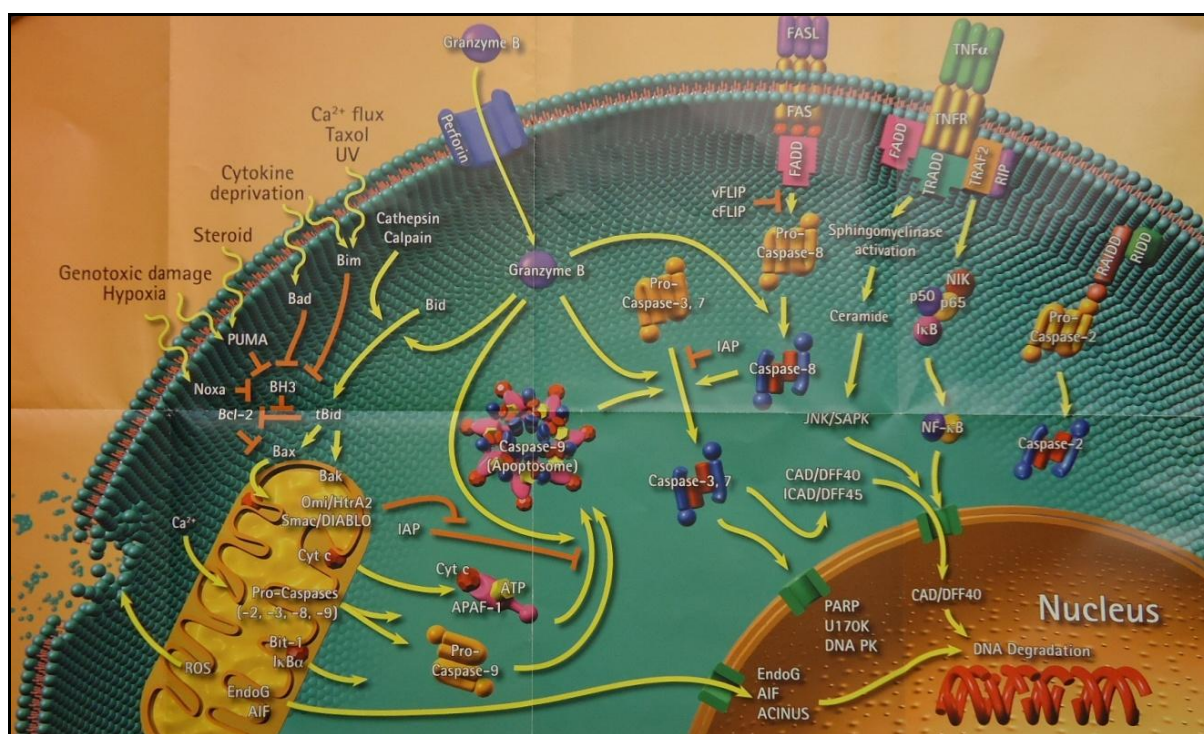
inflamatória. As caspases requeridas para a apoptose variam de acordo com o tipo celular e o estímulo. As duas principais vias de sinalização que podem ativar a cascata de caspases levando à apoptose são chamadas de *via extrínseca* e *via intrínseca*, que serão descritas a seguir e podem ser identificadas na Figura 12.

A via extrínseca da apoptose é disparada quando proteínas de sinalização extracelular ligam-se a receptores de morte na superfície celular. Os receptores de morte celular pertencem à família de receptores de *fator de necrose tumoral (TNF)*, a qual inclui um receptor para o próprio TNF e o receptor de morte celular *Fas*. Uma vez ativados, os receptores de morte celular recrutam procaspases iniciadoras (procaspase-8, procaspase-10, ou ambas), formando o *complexo de sinalização indutor de morte* que ativam as caspases iniciadoras. Estas, por sua vez, ativam procaspases executoras (procaspases 3 e 7, por exemplo) para induzirem a apoptose. [81, 85]

As células também podem ativar seus programas de apoptose de dentro da célula. Esta via, conhecida como via intrínseca, depende da liberação no citosol de proteínas mitocondriais, como citocromo c, por exemplo. O citocromo c liberado liga-se à proteína adaptadora de ativação da procaspase chamada de *Apaf1* (fator-1 de ativação da protease apoptótica), provocando a oligomerização de Apaf1 em um heptâmero de forma arredondada chamado de apoptossomo, que recrutam então proteínas procaspases iniciadoras (procaspase-9). Moléculas caspases-9 ativam então procaspases executoras para induzir a apoptose. [84]

Em algumas células, a via extrínseca deve recrutar a via intrínseca para amplificar a cascata de caspases com o objetivo de matar a célula, como também pode ser acompanhado pela Figura 12. Isso ocorre pela ativação de um membro da família de proteínas *Bcl2*, a principal classe de reguladores intracelulares da apoptose. Algumas proteínas *Bcl2* são pro-apoptóticas e promovem a apoptose pelo aumento da liberação de proteínas do espaço intermembrana das mitocôndrias; enquanto outras são anti-apoptóticas e inibem a apoptose

bloqueando essa liberação. Proteínas *Bcl2* proapoptóticas consistem em duas subfamílias: as proteínas *BH123* (sendo *Bax* e *Bak* as principais) e as proteínas *BH3- apenas*. A proteína *BH3- apenas Bid* é a conexão entre as vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Quando receptores de morte ativam a via extrínseca nas células, a caspase iniciadora (caspase 8) cliva *Bid*, produzindo uma forma truncada de *Bid* chamada *tBid*. A *tBid* se transloca para a mitocôndria, onde inibe proteínas *Bcl2* antiapoptóticas e causa a agregação de proteínas *BH123* proapoptóticas que liberam citocromo c e outras proteínas intermembranas, amplificando assim o sinal de morte. [81, 85]



doses de TFD ocasionam a morte celular predominantemente por apoptose, enquanto altas doses aumentam a taxa de necrose celular, como foi verificado por Nagata e colaboradores, [89] utilizando um Fs anfifílico e células de melanoma maligno. Tem sido relatado que uma combinação adequada da dose do Fs, de luz e de tempo de incubação pode resultar em uma elevada taxa de morte celular tanto *in vitro* quanto *in vivo*. [90]

Além da linhagem celular, a dose de Fs e intensidade de irradiação empregada, outros fatores podem influenciar a taxa e o mecanismo de morte celular, como as características físico-químicas da droga e a sua localização intracelular. [91] Drogas que se acumulam em lisossomos e na membrana citoplasmática tendem a desencadear o mecanismo de necrose celular, enquanto o acúmulo em mitocôndrias resulta em um processo de morte programada da célula. [92] A eficiência fotodinâmica está diretamente relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio, [29] como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ânion radical superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) que podem resultar em necrose ou apoptose de células anormais. O tempo de vida relativamente curto e a limitada faixa de difusão das espécies reativas de oxigênio, ROS (do inglês reactive oxygen species), que para o caso particular do $^1\text{O}_2$ é de cerca de 0,1 μm nos tecidos, caracterizam a TFD como uma terapia “*in situ*”, ou seja, os sítios afetados pela reação foto-induzida são os mesmos onde as ROS são geradas. Dessa forma, a eficiência do tratamento depende diretamente da localização intracelular do Fs. [93]

Tem sido relatado que fotossensibilizadores que se acumulam preferencialmente na mitocôndria são muito mais eficientes em causar a morte celular em relação a drogas que se acumulam em outros sítios celulares, [94-96] e induzem a apoptose celular principalmente pela via intrínseca. [85] Uma das estratégias para favorecer o acúmulo de Fs's na mitocôndria é a presença de grupos positivamente carregados na molécula que favorecem a interação com essa organela em virtude do seu elevado potencial de membrana (-180 mV). [97] Lei e colaboradores [93] sintetizaram uma série de quatro compostos anfifílicos contendo um grupo

trifenilfosfônio ou trietilamônio em uma das posições *meso* do macrociclo porfirínico e demonstraram que estes compostos se acumulam preferencialmente na mitocôndria de células MCF-7, apresentando baixa toxicidade no escuro e elevada fotoatividade quando irradiada. Certos Fs's como a protoporfirina IX e outras porfirinas exibem uma alta afinidade por um receptor chamado receptor benzodiazepínico periférico (RBP), localizado na membrana externa da mitocôndria, de maneira que este receptor tem sido proposto como um dos principais alvos para TFD. [98] Outro fator a ser considerado durante a aplicação do tratamento é uma possível redistribuição da droga após o processo de irradiação. Tal fato foi relatado por Kessel [99], que observou a redistribuição de porfirinas catiônicas da membrana citoplasmática para o citosol após a irradiação, o que pode resultar na fotoinativação da procaspase-9 e procaspase-3, promovendo uma mudança do mecanismo de morte celular e favorecendo a ativação e propagação da necrose celular.

Dessa forma, o desenvolvimento de novos Fs's depende de um trabalho de engenharia molecular, onde além do conhecimento químico uma boa compreensão dos sistemas e processos biológicos se torna fundamental. Assim, podem ser obtidos compostos com propriedades físico-químicas e estruturais adequadas para apresentarem uma boa eficiência fotodinâmica e maior seletividade.

Capítulo 2. Justificativa do Projeto

2. Justificativa do Projeto

Derivados porfirínicos catiônicos e anfifílicos têm se mostrado promissores como Fs's em TFD. [6, 100] O caráter hidrofóbico aliado a presença da carga positiva favorece a interação/penetração com a membrana das células, favorecendo seu acúmulo na membrana e/ou outras regiões intracelulares e, conseqüentemente, aumentando significativamente a eficiência fotodinâmica quando comparados com Fs's hidrofílicos. [43]

Embora apresentem excelentes propriedades como Fs's, compostos anfifílicos podem ser insolúveis em meio aquoso, de maneira que sua aplicação direta, por via intravenosa, por exemplo, provocaria a precipitação/agregação da droga nos sistemas biológicos. A formação de agregados tende a diminuir drasticamente a eficiência fotodinâmica dessa classe de compostos, além do fato de que podem ocasionar diversos problemas vasculares. Assim, tem-se uma constante busca por alternativas que possam viabilizar o emprego de compostos anfifílicos em TFD.

Essa foi a principal motivação para a realização do presente projeto que envolveu não somente a síntese de uma série de derivados porfirínicos anfifílicos, mas também a preparação de um sistema de carreamento que permitisse a distribuição dessas drogas nos sistemas biológicos. Polímeros biocompatíveis foram utilizados para a obtenção de cápsulas de tamanho nanométrico, que favorecem sua penetração até os tecidos mais profundos, além do fato de que podem passar despercebidas pelo sistema fagocitário, acumulando-se no tecido alvo em grande quantidade. [66]

Capítulo 3. Objetivos

3. Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Sintetizar uma série de derivados porfirínicos catiônicos e anfifílicos e gerar formulações capazes de serem dispersas em meio aquoso, por meio do encapsulamento dos mesmos em nanocápsulas poliméricas biocompatíveis, viabilizando dessa forma o seu emprego como fotossensibilizadores em TFD para o tratamento de tumores de pele.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar derivados porfirínicos anfifílicos;
- Desenvolver e caracterizar um sistema biocompatível e adequado para aplicações dermatológicas, baseado em nanocápsulas poliméricas capazes de carrear e dispersar as porfirinas em meio biológico (aquoso);
- Avaliar a eficiência fotodinâmica dos derivados porfirínicos quando em solução e quando encapsulados, utilizando cultura de células HeLa;
- Estudar a interação/incorporação das nanocápsulas em células HeLa;
- Monitorar alguns processos bioquímicos relacionados aos mecanismos de morte celular em células submetidas à TFD, utilizando as porfirinas nanoencapsuladas.

Capítulo 4. Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1 Síntese dos Derivados Porfirínicos Monossubstituídos

O macrociclo porfirínico *meso*-substituído foi preparado através do método de Fleischer, [101] baseado na reação de condensação/ciclização do pirrol, benzaldeído (Sigma-Aldrich) e o piridilcarboxaldeído correspondente (*meta* e *para*) na proporção de 3:1, utilizando refluxo em ácido acético glacial. Foram utilizados o 3-piridil-carboxaldeído e o 4-piridil-carboxaldeído (Sigma-Aldrich), de forma a se obter os compostos de partida de interesse: a *meso*-3-monopiridil(trifenil)porfirina (3-MPyTPP) e a *meso*-4-monopiridil(trifenil)porfirina (4-MPyTPP), respectivamente. A Figura 13 ilustra a reação no caso do macrociclo apresentando a piridina ligada pela posição 3. Após a síntese, o solvente foi removido no evaporador rotatório e o sólido no balão disperso em metanol, onde a porfirina é insolúvel mas a maioria das impurezas é solúvel, e filtrado a vácuo utilizando-se um funil de placa sinterizada.

Embora as relações estequiométricas utilizadas favoreçam a formação do derivado mono-substituído, também ocorre a formação de pequenas quantidades dos derivados di-substituídos e da tetrafenil-porfirina (TPP), além da formação de polipirróis. Assim, foi necessária uma separação por cromatografia em coluna de sílica-gel, utilizando diclorometano e misturas de polaridade variável, contendo diferentes proporções de metanol e acetonitrila como fase móvel. O mesmo procedimento foi utilizado para ambas as porfirinas.

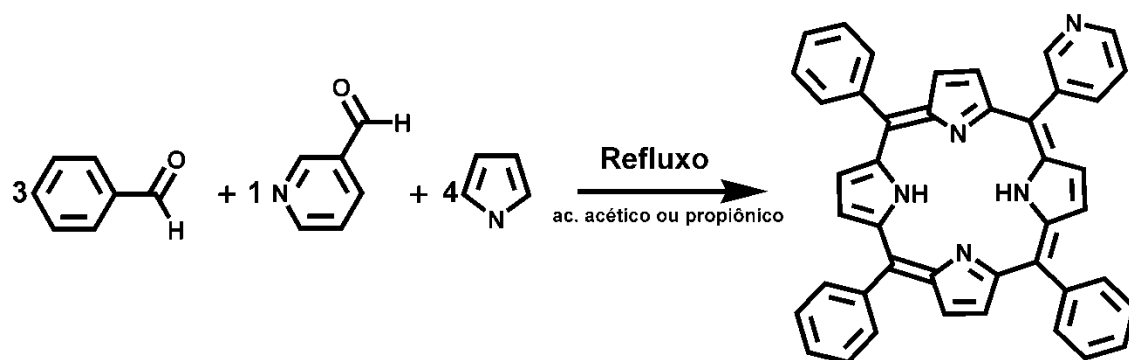


Figura 13- Esquema de síntese do derivado porfirínico 3-mono-piridil substituído (3MPyTPP).

Para a preparação dos compostos metilados, reagiu-se a *meso*-monopiridil(trifenil)porfirina com um grande excesso (cerca de 40 vezes) de tosilato de metila (Sigma-Aldrich), em dimetilformamida (DMF) em refluxo, por cerca de 4 horas. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada, para verificar o final da reação. Após resfriar, o solvente da mistura reacional foi removido no evaporador rotatório. O sólido foi dissolvido em um pequeno volume de DMF e a solução concentrada foi gotejada em uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio, onde a porfirina precipitou instantaneamente. Este procedimento foi realizado a fim de substituir o contra-íon do produto, ou seja, substituir o tosilato por cloreto. O sólido foi filtrado e lavado várias vezes com água para a remoção do excesso de NaCl.

Embora um grande excesso de tosilato de metila tenha sido utilizado, a reação não foi completa, ou seja, nem toda porfirina foi metilada. Assim, uma purificação em coluna de alumina neutra foi necessária a fim de separar o composto de interesse da porfirina não metilada de partida. Como fase móvel, utilizou-se inicialmente diclorometano o qual foi responsável pela remoção da porfirina não metilada, seguida da adição de metanol que possibilitou a eluição do composto desejado.

Também foram sintetizados compostos coordenados ao complexo cloro-bis-

bipiridinarutênio(II), reagindo-se as monopiridilporfirinas com $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$, previamente sintetizado por nosso grupo de pesquisa. Inicialmente, $3,911 \times 10^{-4}$ g do complexo foi refluxado por cerca de 15 minutos na presença de quantidade estequiométrica de nitrato de prata (0,0598 g), em uma mistura água:etanol 1:1, a fim de remover um dos íons cloreto e formar o respectivo aqua-complexo, conforme a reação descrita na Equação 1:



O cloreto de prata formado foi removido por filtração utilizando um funil de placa sinterizada recoberto com uma camada de cerca de 1 cm de celite. O filtrado, contendo essencialmente o aqua-complexo, foi concentrado no evaporador rotatório até a redução do volume de solvente para cerca de 5 mL. Adicionou-se ao balão uma mistura de CH_2Cl_2 :DMF na proporção 4:1 e a massa de porfirina calculada ($3,259 \times 10^{-4}$ g) de forma que se garantisse um pequeno excesso de cerca de 1% do complexo de rutênio. O sistema foi mantido em refluxo por cerca de 1 hora e a reação foi acompanhada através de espectroscopia no ultravioleta-visível. Após resfriar, o solvente foi removido e o sólido do balão redissolvido num pequeno volume de DMF. Essa solução concentrada foi gotejada sobre uma solução aquosa de trifluorometanossulfonato de lítio (LiTFMS), onde o contra-íon Cl^- do complexo de rutênio foi substituído pelo ânion TFMS^- . O sólido foi posteriormente centrifugado e lavado várias vezes com água.

Uma purificação em coluna de alumina neutra foi realizada a fim de separar o composto de interesse das frações de porfirina e complexo que não reagiram. Para tal procedimento, foi utilizada como fase móvel diclorometano:etanol, sendo a polaridade aumentada gradativamente.

Houve interesse também pela preparação dos derivados metalados com $\text{Zn}(\text{II})$. Dessa

forma, parte dos compostos monossustituídos foi metalada, utilizando o método do acetato, que envolve o refluxo da porfirina em ácido acético, na presença de um pequeno excesso de acetato de zinco, por cerca de 30 minutos. O solvente foi removido e a porfirina precipitada em metanol. A solução foi centrifugada, sendo o sólido lavado várias vezes com água e mistura água:metanol.

Dessa forma, foi obtida uma série de 8 compostos monossustituídos, cujas estruturas estão apresentadas na Figura 14. As abreviações apresentadas na figura serão utilizadas no texto a partir deste momento.

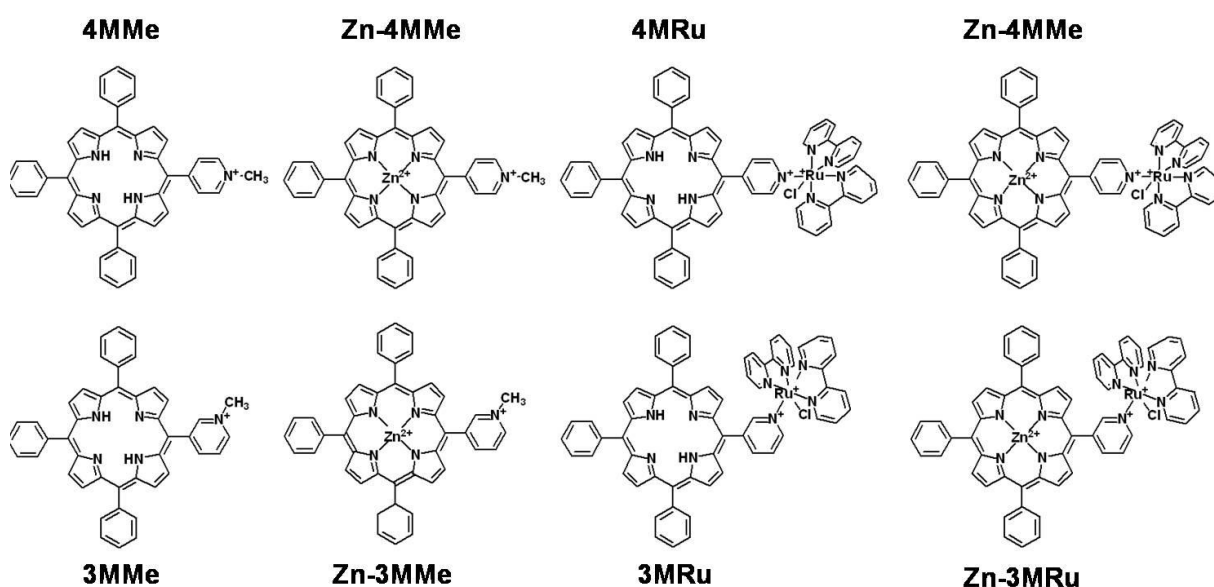


Figura 14- Estruturas dos oito derivados porfirínicos monossustituídos sintetizados.

4.2 Caracterização das Porfirinas Sintetizadas

4.2.1 UV-Vis

Os espectros eletrônicos foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro HP – 8453A, com detector de matriz de diodos e cubetas de quartzo, apresentando um caminho ótico de 1,0 cm.

4.2.2 Ressonância Magnética de Próton (^1H RMN)

Os espectros de ^1H RMN foram obtidos em um espectrômetro Varian 500 MHz, disponível na Central Analítica do IQ-USP.

4.2.3 Microanálise

As análises elementares de carbono, nitrogênio e hidrogênio foram realizadas pela Central Analítica do IQ-USP, em um equipamento Perkin-Elmer CHN 2400.

4.2.4 Infravermelho

Os espectros de infravermelho, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , para pastilhas de KBr contendo 1% do derivado porfirínico, foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300 acoplado a um microscópio AIM-8800.

4.2.5 Voltametria Cíclica

Voltamogramas cíclicos foram obtidos em um potenciostato/galvanostato AutoLab PGStat30, utilizando-se um eletrodo de trabalho de platina previamente polido, um fio de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de Ag/Ag^+ (0,01 M) em acetonitrila como referência. As soluções de porfirina foram preparadas em DMF, utilizando-se TEAClO_4 na concentração de 0,1M como eletrólito suporte.

4.2.6 Determinação do Rendimento Quântico de Fluorescência ϕ_{fl}

Espectros de emissão na faixa de 600 a 800 nm foram obtidos para os derivados porfirínicos dissolvidos em diclorometano, em um espectrofluorímetro Photon Technology Inc., modelo LS-100. O rendimento quântico de fluorescência foi obtido através da relação entre as absorbâncias e o valor resultante da integração do espectro de emissão de um padrão previamente escolhido, neste caso a tetrafenilporfirina (TPP), e da amostra, segundo a Equação 2:

$$\phi_{fl} = \phi_{TPP} \times \left(\frac{Abs_{TPP}}{Abs_X} \right) \left(\frac{A_X}{A_{TPP}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{TPP}^2} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

onde ϕ_{TPP} é o rendimento quântico de fluorescência do padrão (0,110), ϕ_{fl} é o rendimento quântico de fluorescência da amostra; A_X é o valor resultante da integração do espectro de emissão da amostra, A_{TPP} é o valor obtido da integração do espectro de emissão do padrão; Abs_{TPP} é a absorbância do padrão no comprimento de onda de excitação e Abs_X é a absorbância da amostra no comprimento de onda de excitação; η_X é o índice de refração do solvente utilizado para a preparação da amostra e η_{TPP} o índice de refração do solvente no

Daiana K. D. Nogueira

qual a solução do padrão foi preparada. Todos os experimentos foram realizados utilizando-se soluções das porfirinas em CH_2Cl_2 , com absorbância abaixo de 0,1 em 417 nm (comprimento de onda da excitação), utilizando-se uma cubeta com 10,0 mm de caminho óptico.

4.2.7 Determinação do Rendimento Quântico de Formação de Oxigênio Singlete ϕ_Δ

O rendimento quântico de produção de oxigênio singlete dos oito derivados porfirínicos foi determinado por um método fotofísico, baseado na eficiência de emissão do oxigênio singlete em 1270 nm. Soluções dos 8 derivados porfirínicos foram preparadas em clorofórmio, de maneira que a absorção em 532 nm (comprimento de onda do laser utilizado para a excitação) fosse de aproximadamente 0,2 u.a. Foram então realizadas medidas do decaimento da emissão do oxigênio singlete em 1270 nm em função do tempo. As intensidades de emissão foram medidas diretamente nas curvas cinéticas em um tempo definido (10 μs) após o pulso laser. Como padrão utilizou-se uma solução de tetrafenilporfirina (TPP), que possui rendimento quântico em clorofórmio conhecido ($\phi_{\text{TPP}} = 0,50$). Essa solução também foi preparada de forma a alcançar uma absorbância de 0,2 em 532 nm. O sistema utilizado é constituído de um laser Nd:YAG Continuum Surelite III em 532 nm, pulsado (10 Hz); uma fotomultiplicadora Hamamatsu modelo R5509 resfriada a -80°C ; um sistema de detecção da Edinburg Analytical Instruments com o software de aquisição LP900. Assim, de posse dos valores de emissão de oxigênio singlete e dos valores da absorção em 532 nm, o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete foi calculado através da Equação 3.

$$\phi_X = \phi_{\text{TPP}} \times \left(\frac{I_X}{A_X} \right) \left(\frac{A_{\text{TPP}}}{I_{\text{TPP}}} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

ϕ_X = Rendimento Quântico de formação de oxigênio singlete da amostra;

ϕ_{TPP} = Rendimento Quântico de formação de oxigênio singlete do padrão (TPP);

I_X = Intensidade de emissão fotoinduzida do oxigênio singlete pela amostra;

I_{TPP} = Intensidade de emissão fotoinduzida do oxigênio singlete pelo padrão;

A_X = Absorção da amostra em 532 nm;

A_{TPP} = Absorção do padrão em 532 nm.

4.3 Encapsulamento dos Derivados Porfirínicos

O encapsulamento dos derivados porfirínicos foi realizado através do método de coacervação. Primeiramente, a porfirina, dissolvida em clorofórmio, foi dispersa na fase oleosa, constituída de propileno glicol, tween 20, miristato de isopropila e óleo de amêndoas. Essa solução oleosa foi adicionada sobre a fase aquosa contendo os polímeros, sob agitação vigorosa em torno de 17.000 rpm (agitador Turrax, da Turratec). Após cerca de 5 minutos de agitação, adicionou-se sulfato de sódio ao sistema. Neste trabalho, foram preparadas duas formulações de materiais poliméricos distintos: uma delas constituída de atelocolágeno marinho e goma xantana (aqui denominada ACM), e a outra de hidroxietilcelulose (HEC). A Tabela 2 apresenta a porcentagem de cada constituinte nas formulações. A fase oleosa representa cerca de 20% da formulação, enquanto a fase aquosa, onde pequenas quantidades do polímero encontram-se dissolvidas, representa os 80% restantes. A concentração de tween 20 foi variada de 0 a 1,2%, pois observou-se grande influência deste constituinte na distribuição de tamanho das partículas.

Tabela 2- Concentração dos constituintes empregados nas formulações poliméricas de ACM e HEC.

Fase	Constituinte	Concentração / %
Fase Aquosa (~ 80%)	Atelocolágeno marinho	0,8
	Goma xantana	0,8
	Hidroxietilcelulose	2,0
	Água	76,8 (ACM) e 78,0 (HEC)
Fase Oleosa (~ 20%)	Propileno Glicol	2,0
	Tween 20	0 a 1,2
	Óleo de amêndoas	9,0
	Miristato de isopropila	9,0
	Porfirina	~ 0,004 ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$)

Nesta primeira etapa, o sistema é constituído principalmente por microcápsulas (partículas apresentando tamanhos superiores a 1000 nm). Entretanto, a formação de nanocápsulas também é desejada. Assim, a formulação foi reprocessada utilizando-se um ultrassonicador (Vibra Cell, da Sonics), visando à redução do tamanho das partículas.

4.4 Caracterização das Nanocápsulas

4.4.1 Espectroscopia de Fluorescência

Espectros de fluorescência das nanocápsulas dispersas em água (0,1 g da formulação polimérica em 10 mL de água desionizada) foram obtidos em um espectrofotômetro Photon Technology Inc., modelo LS-100. Os espectros foram obtidos, na faixa de 600 a 800 nm,

excitando-se a amostra em 417 nm, ou seja, no comprimento de onda de absorção máxima dos derivados porfirínicos sintetizados.

4.4.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)

A análise do tamanho das cápsulas foi realizada através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, (EDL), utilizando um equipamento NanoTrac 252 da MicroTrac Inc. O mesmo procedimento de diluição descrito no item anterior foi empregado na preparação das amostras.

4.4.3 Microscopia Óptica

Imagens de Microscopia Óptica das formulações de cápsulas foram obtidas utilizando-se o microscópio AIM-8800, acoplado ao espectrofotômetro Shimadzu FTIR-8300. Para essa análise foram utilizadas somente microcápsulas (não submetidas à ultrassonicação) para que essas pudessem ser facilmente observadas com o aumento máximo de 100 vezes do microscópio.

4.4.4 Microscopia de Fluorescência Confocal

Considerando que as porfirinas são compostos fluorescentes, as microcápsulas também foram caracterizadas através de microscopia confocal no modo fluorescência, utilizando-se um Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Zeiss LSM510), disponível na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A fluorescência foi

observada na região do vermelho, utilizando para excitação o laser de comprimento de onda de 488 nm e aumento de 100 vezes.

4.5 Cultura de Células HeLa

As células HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em meio de cultura DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/streptomicina), em uma estufa Thermo Eletron Corporation HEPA Class 100, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂.

4.6 Toxicidade das Porfirinas Nanoencapsuladas

Para a realização dos experimentos, as células cultivadas foram transferidas para placas de 12 poços, de diâmetro de 2,0 cm, na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/mL e incubadas por um período de 15 horas para aderência. Após o período de incubação, o meio de cultivo foi removido e adicionado outro contendo a formulação polimérica, diluída cerca de 100 vezes, de forma que a concentração final da porfirina fosse de 1×10^{-6} mol.L⁻¹. As placas foram novamente incubadas de acordo com o tempo investigado.

Após o tempo de incubação com o composto fotoativo nanoencapsulado, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com tampão fosfato salino, PBS (cloreto de sódio e fosfato de sódio), seguido da adição de 1 mL de meio de cultivo DMEM incolor. As placas foram então mantidas em estufa por 14 horas. Foi então determinada a toxicidade por comparação da viabilidade celular entre as placas incubadas com o fotossensibilizador encapsulado e a amostra controle, a qual foi submetida aos mesmos procedimentos, exceto pela adição do composto fotoativo. A taxa de morte celular foi avaliada pela incubação das células com solução de Brometo de Metiltiazildifenil-tetrazólico (MTT) a 2,0 mg/mL, preparada em tampão PBS por 2

horas. O método do MTT é um teste colorimétrico que mede a atividade enzimática da desidrogenase mitocondrial de células viáveis. Essa enzima reduz o MTT a formazan, conforme ilustrado na Figura 15, o qual é insolúvel em meio aquoso. [102] Dessa forma, a fase aquosa de coloração verde foi cuidadosamente removida, permanecendo os cristais de formazan. Esses cristais foram dissolvidos pela adição 1 mL de DMSO, resultando em uma solução de cor rosa, a qual foi quantificada pela leitura da absorbância em 550 nm, utilizando-se um Infinite M200 ELISA Reader (TECAN). Foram realizados dois experimentos independentes, em triplicata (n=6), dos quais foram obtidos o valor médio e o desvio padrão.

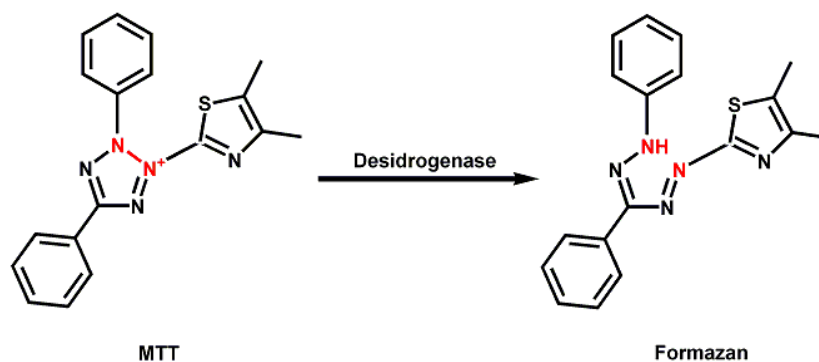


Figura 15- Redução do MTT a formazana pela ação da enzima desidrogenase mitocondrial.

4.7 Atividade Fotodinâmica das Porfirinas Nanoencapsuladas

Para avaliar a fototoxicidade dos compostos nanoencapsulados, decorrido o tempo de incubação, os poços foram lavados com tampão PBS, seguido da adição de 1,0 mL de meio DMEM incolor. Em seguida, os poços foram irradiados com um laser vermelho (LASERLine) de comprimento de onda de 650 nm e potência local de 70 mW/cm² durante 10 minutos, aplicado em pulsos de 1 minuto, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso. As placas foram então mantidas em estufa por 14 horas, período após o qual a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT descrito anteriormente.

4.8 Preparação de Lipossomas

Para fins de comparação, avaliou-se a toxicidade e fototoxicidade de um dos derivados porfirínicos (porfirina 3MMe) incorporado nos sistemas poliméricos descritos e em lipossomas do lipídio zwitteriônico fosfatidilcolina (FC). Todos os sistemas utilizados foram preparados de forma a apresentar a mesma concentração de 3MMe incorporada. Os lipossomas foram preparados pela dissolução da FC e da porfirina 3MMe em um pequeno volume de diclorometano, seguida da eliminação do solvente orgânico em fluxo de N₂. O filme lipídico formado foi disperso em meio DMEM incolor. Para a obtenção de lipossomas com dimensões próximas às das partículas poliméricas, foram submetidos à ultrassonicação por 10 minutos, nas mesmas condições aplicadas para o sistema polimérico. A análise do tamanho das partículas lipídicas foi realizada através de medidas de espalhamento dinâmico de luz, e a fluorescência da porfirina 3MMe foi analisada na região espectral entre 600 a 800 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$).

Para avaliar e comparar a toxicidade e fototoxicidade dos sistemas polimérico e lipídico, foram empregados o mesmos procedimentos descritos anteriormente (itens 4.6 e 4.7).

4.9 Taxa de Incorporação

Para avaliar a taxa de incorporação do composto fotoativo encapsulado em função do tempo de incubação, seguiu-se o mesmo protocolo descrito anteriormente para os experimentos de toxicidade até o momento da incubação das células com a formulação polimérica, exceto pelo fato de que o número de células utilizadas foi o dobro ($2,0 \times 10^5$ células/mL). Foram utilizados diferentes tempos de incubação (1; 2; 3; 4; 6; 7,5 e 9 horas), sendo que decorrido este período 500 μL da solução sobrenadante de cada poço foram

retirados e a estes adicionou-se 500 μL de uma solução $50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de dodecilssulfonato de sódio, SDS (USB Corporation), preparada em tampão PBS. O restante da solução dos poços foi descartada e, após lavagem dos mesmos com pequenas alíquotas de tampão PBS, adicionou-se às células aderidas 0,5 mL de solução de SDS $25 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, também preparada em PBS. Por se tratar de sistemas constituídos por partículas, a quantificação da porfirina incorporada não pode ser realizada por meio de medidas de absorção de luz, em virtude do elevado espalhamento de luz gerado pelo sistema. Assim, como alternativa, recorreu-se a espectroscopia de emissão já que o princípio ativo em questão apresenta uma elevada emissão de luz na região espectral entre 600 e 800 nm. Para tal procedimento, utilizou-se um fluorímetro Spex – Fluorolog 2, model FL-111 no modo Front Face (detecção a 45°), onde espectros de emissão das alíquotas (sobrenadante e solução dos poços) foram obtidos, utilizando-se uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm e $\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$. A taxa de incorporação da porfirina foi avaliada através da intensidade de emissão das alíquotas analisadas em 655 nm, de acordo com a Equação 4:

$$\text{Taxa de incorporação \%} = \frac{F_{\text{poço}}}{F_{\text{poço}} + 2 \times F_{\text{sobrenadante}}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

onde $F_{\text{poço}}$ é a emissão para a solução dos poços (em contagem de fótons. seg^{-1}) e F_{sob} é a emissão do sobrenadante (multiplicada por um fator de dois em virtude da diluição realizada com a solução de SDS $50 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

Considerando que a emissão de luz não é comumente utilizada como método de quantificação, construiu-se uma curva de calibração analisando-se a fluorescência em 655 nm utilizando-se amostras de emulsão diluída de forma a se obter concentrações de porfirina na faixa de $1,0 \times 10^{-12}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

4.10 Microscopia de Fluorescência Confocal

A incorporação dos fotossensibilizadores nas células também foi avaliada utilizando-se a Microscopia de Fluorescência Confocal. Células HeLa ($1,0 \times 10^5$ células/poço), aderidas sobre uma lamínula, foram incubadas com a porfirina 3MMe nanoencapsulada ou dissolvida diretamente em meio de cultura, na concentração de $5,0 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹. Hoechst 33258, LysoTracker green e MitoTracker Orange (Invitrogen) [103] foram utilizados, respectivamente, como marcadores para o núcleo, lisossomos e mitocôndria das células. Os comprimentos de onda utilizados para a excitação da 3MMe porfirina, Hoechst 33258, LysoTracker green e MitoTracker orange foram 488, 364, 488 e 543 nm, respectivamente. As células foram incubadas com o fotossensibilizador (não encapsulado e na formulação polimérica) por um período que variou de 1 a 9 horas, a 37°C. As lamínulas foram então cuidadosamente lavadas com tampão PBS gelado e fixadas sobre uma lâmina de microscópio. Imagens de fluorescência das células foram então obtidas utilizando-se um microscópio confocal Zeiss LSM510. Para a porfirina, a emissão foi observada na região do vermelho do espectro eletromagnético, na faixa de 600 a 800 nm. As imagens foram tratadas utilizando o software Metamorph 6.3r2 (Molecular Devices, 2005) por técnicas de deconvolução 2D.

4.11 Marcação de Células com Azul de Tripan

Células HeLa ($1,0 \times 10^5$ células/poço), aderidas sobre uma lamínula, foram incubadas durante três horas com a porfirina 3MMe nanoencapsulada ou dissolvida diretamente em meio de cultura, na concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹. Após a incubação, os poços foram lavados com tampão PBS e adicionou-se 1 mL de meio DMEM incolor. Foram mantidos alguns poços no escuro e outros foram irradiados com luz de $\lambda = 650$ nm, durante 10 minutos

(irradiação intermitente). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, período após o qual o meio de cultura foi descartado e 500 µL de uma solução de Azul de Trypan (Sigma-Aldrich) 10% em PBS foram adicionados, sendo logo em seguida removidos. Após serem lavadas com pequenas alíquotas de PBS, as lamínulas foram fixadas sobre uma lâmina de microscópio. Imagens das células não irradiadas e submetidas à irradiação foram então obtidas, utilizando-se um microscópio Zeiss Axiovert 200.

4.12 Fragmentação de DNA

Cerca de 48 horas após a irradiação, a solução sobrenadante e as células foram transferidas para tubos cuidadosamente identificados. As suspensões foram centrifugadas a 3200 rpm por 10 minutos em uma centrífuga Mini-spin plus. A solução sobrenadante foi descartada e 1 mL de tampão PBS foi adicionado a cada um dos tubos. Estes foram novamente centrifugados nas mesmas condições. A solução sobrenadante foi novamente descartada e 1 mL de meio de cultura e 3 mL de uma solução de etanol 70%, a -20°C foram adicionados. As suspensões foram mantidas a -20°C por duas horas. Após esse procedimento inicial, as suspensões foram centrifugadas, nas mesmas condições descritas anteriormente. A solução sobrenadante foi descartada e 400 µL de uma solução de RNase (Sigma-Aldrich) 200 µg.mL⁻¹ foram adicionados aos tubos, que foram mantidos a temperatura ambiente por 1 hora. Adicionou-se, então, 185 µL de uma solução de iodeto de propídeo 50 µg.mL⁻¹ a cada um dos tubos, os quais foram mantidos no escuro por 30 minutos, período após o qual procedeu-se com a leitura das amostras em um citômetro Cytomics FC 500, utilizando o filtro FL2 (550nm<λ<600nm). Os resultados foram analisados utilizando-se o software WinMDI 2.8.

4.13 Liberação de Citocromo C

24 horas após a irradiação, o sobrenadante dos poços foi descartado e as células lavadas com PBS. Adicionou-se 200 μL de tripsina aos poços a fim de remover as células e, em seguida, 1 mL de meio de cultura DMEM, transferindo, em seguida, para microtubos devidamente identificados. Os tubos foram então centrifugados a 14.000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de uma solução de permeabilização (digitonina 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em PBS com 100 mM KCl), sendo incubado durante 5 minutos em banho de gelo e, em seguida, centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as células fixadas com 100 μL de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos, à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas, lavadas 3 vezes com tampão PBS, incubadas com 100 μL de tampão de bloqueio (3% de albumina de soro bovino e 0.05% de saponina em PBS) durante 1 hora e, em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário (anticytochrome c monoclonal antibody - clone 6H2.B4) na concentração de 1:200 overnight. As células foram então centrifugadas e lavadas três vezes com PBS. Em seguida, foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti IgG1 marcado com *Phicoeritrina* - PE (BD Pharmingen) em tampão de bloqueio na concentração de 1:200. As células foram transferidas para tubos de citometria e as leituras foram efetuadas utilizando-se o filtro FL2 (550nm< λ <600nm).

4.14 Perda do Potencial de Membrana Mitochondrial Ψ

Duas horas após o término da irradiação, o sobrenadante foi retirado e transferido para microtubos devidamente identificados. As células dos poços foram tripsinizadas, transferidas para os respectivos tubos e centrifugadas a 14.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante foi

descartado e as células lavadas 2 vezes com tampão PBS. Ao término das lavagens, as células foram ressuspensas em 150 μ L de PBS e transferidas para os tubos de citometria. As células foram incubadas por 30 minutos no escuro após adição de 5 μ L de uma solução de Rhodamina 300 mg/L (Sigma-Aldrich) em DMSO. Finalmente, foram incubadas por 5 minutos, após adição de 30 μ L de uma solução de iodeto de propídeo. Procedeu-se com a leitura no citômetro, utilizando-se o filtro FL3 ($600\text{nm} < \lambda < 645\text{nm}$) para o iodeto de propídeo e o filtro FL1 ($\lambda < 550\text{nm}$) para a Rhodamina.

*Capítulo 5. Síntese e
Caracterização dos
Derivados Porfirínicos*

5. Síntese e Caracterização dos Derivados Porphirínicos

5.1 Mono-piridil Porphirinas

Os derivados porfirínicos de partida, a *meso*-3-mono-piridil(trifenil)porfirina (3-MPyTPP) e a *meso*-4-mono-piridil(trifenil)porfirina (4-MPyTPP), foram sintetizadas através do refluxo de pirrol e os piridilcarboxaldeídos correspondentes, em ácido acético glacial, por cerca de 2 horas. Inicialmente, a mistura reacional apresentava a cor amarela, tornando-se laranja, rapidamente vermelha escura e finalmente preta. A reação foi acompanhada espectrofotometricamente, como apresentado na Figura 16 para a síntese da 3-MPyTPP. Observou-se o desaparecimento da banda larga em torno de 800 nm e o crescimento de uma banda intensa em 417 nm (banda Soret) e quatro bandas de menor intensidade entre 500 e 700 nm (bandas Q).

Os espectros eletrônicos das duas porfirinas obtidas (3-MPyTPP e 4-MPyTPP) são muito semelhantes entre si, não apresentando deslocamentos consideráveis das bandas Soret e Q.

Embora a proporção estequiométrica entre os aldeídos tenha sido utilizada para favorecer a formação dos derivados monossustituídos, verificou-se através de cromatografia em camada delgada a formação da tetrafenilporfirina (TPP) e dos derivados *cis*- e *trans*-disubstituídos. Assim, foi necessária uma etapa de purificação em coluna de sílica gel para a separação do composto de interesse com o grau de pureza desejado. Inicialmente, utilizou-se diclorometano como fase móvel, que levou a eluição da TPP. Em seguida, a polaridade do

eluente foi aumentada por meio da adição de cerca de 5% de acetonitrila, levando a eluição do derivado monossustituído. Por fim, uma mistura de maior polaridade, contendo cerca de 20% de metanol em diclorometano, foi utilizada para a eluição das porfirinas dissustituídas. O mesmo procedimento foi realizado para ambas as porfirinas. O rendimento obtido para os dois derivados monossustituídos foi de cerca de 11%.

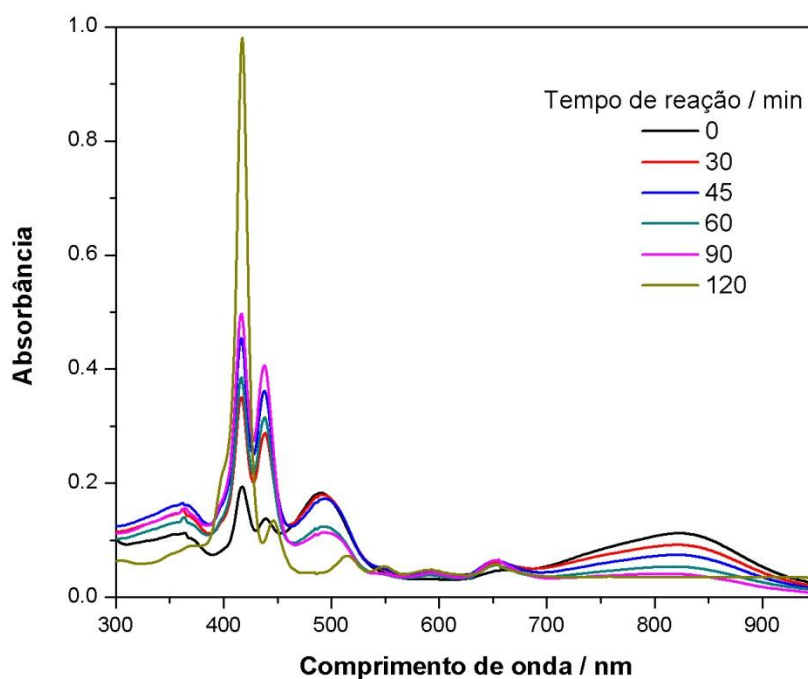


Figura 16- Monitoramento espectrofotométrico do andamento da reação de preparação da *meso*-3-mono-piridil(trifenil)porfirina em função do tempo. Espectros obtidos em ácido acético.

Estas duas porfirinas, consideradas os compostos de partida para a obtenção dos derivados de interesse, foram caracterizadas por análise elementar, sendo os resultados satisfatórios, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados de análise elementar das porfirinas 3-MPyTPP e 4-MPyTPP.

Porfirina	% C	% H	% N
	Exp (calc)	Exp (calc)	Exp (calc)
3-MPyTPP	81,5 (83,9)	4,5 (4,8)	10,8 (11,4)
4-MPyTPP	82,3 (83,9)	5,0 (4,8)	10,4 (11,4)

A caracterização destes compostos também foi realizada através de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H . Os espectros de ^1H RMN apresentados na Figura 17 são condizentes com as estruturas dos respectivos compostos de partida e grau de pureza. Observa-se que o derivado 3-monossustituído (Figura 17a) apresenta um número maior de sinais em relação ao composto 4-monossustituído (Figura 17b). Esse aumento no número de sinais ocorre em virtude de todos os prótons dos substituintes piridina, ligada pela posição 3 ao anel, apresentarem ambientes químicos diferentes, em contraste com o grupo piridil ligado pela posição 4 onde os átomos de hidrogênio 19 e 20 são quimicamente equivalentes em virtude da maior simetria molecular. Embora não estejam sendo mostrados, verificou-se também a presença de um singlete (2H) em torno de $-2,8$ ppm, correspondente aos dois prótons ligados aos átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos.

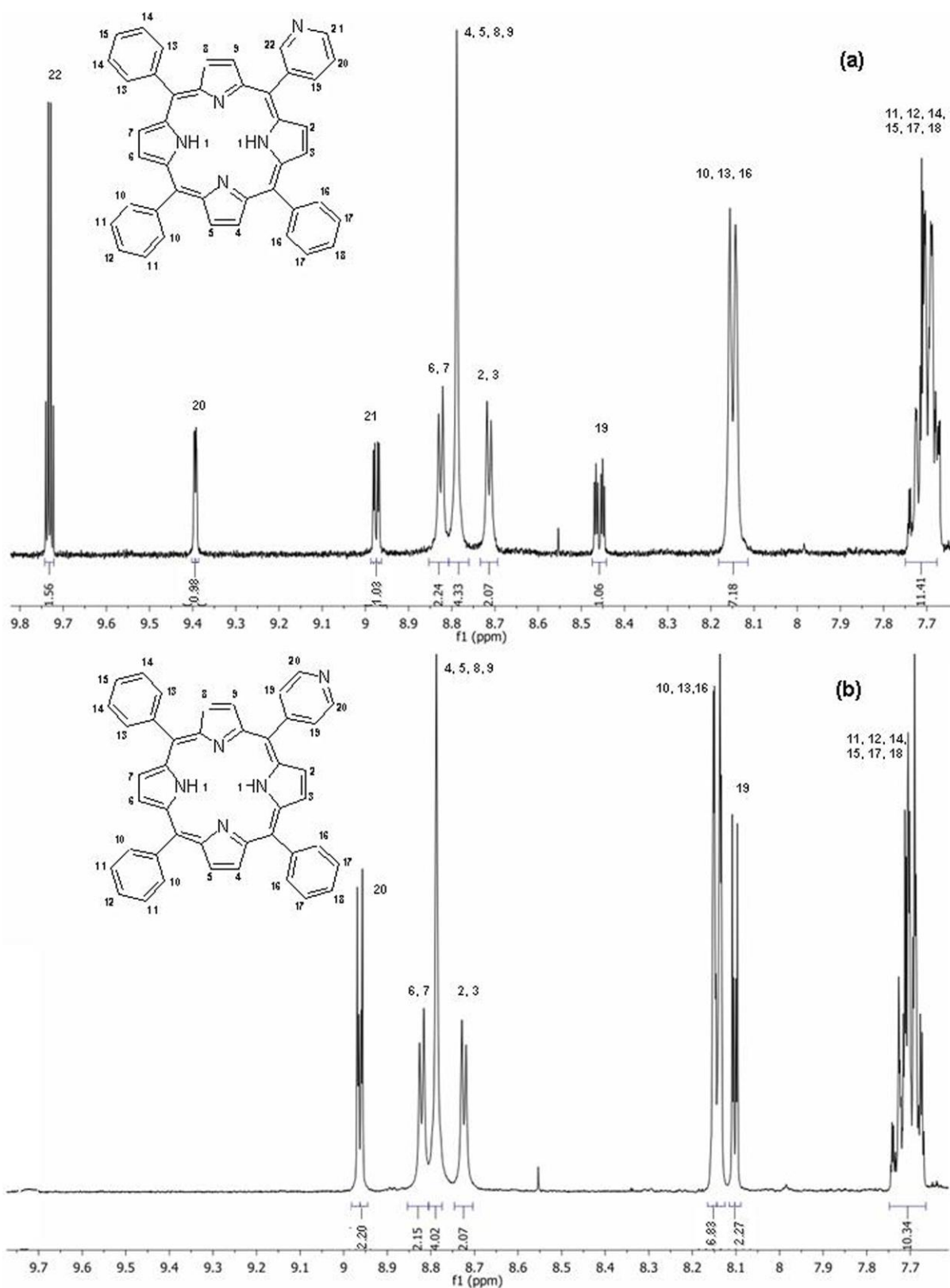


Figura 17- Espectros de ^1H RMN das porfirinas (a) 3-MPyTPP e (b) 4-MPyTPP em CDCl_3 , as respectivas estruturas, as atribuições e os valores integrados dos sinais.

Os dois derivados porfirínicos sintetizados também foram caracterizados por espectroscopia infravermelho, mas o grande número de sinais dificulta a atribuição completa das bandas, como pode ser verificado na Figura 18. Entretanto, uma atribuição tentativa dos principais sinais foi realizada (Tabela 4) com base em alguns dados disponíveis na literatura, [104, 105] com destaque para o banda em 3318 e 3315 cm^{-1} referentes ao estiramento NH dos anéis pirrólicos da 3-MPyTPP e 4-MPyTPP, respectivamente. Na Figura 18 foi mostrado somente o espectro da 3-MPyTPP e a respectiva atribuição tentativa dos principais sinais pois os espectros das MPyTPP são muito similares, como pode-se observar na Tabela 4.

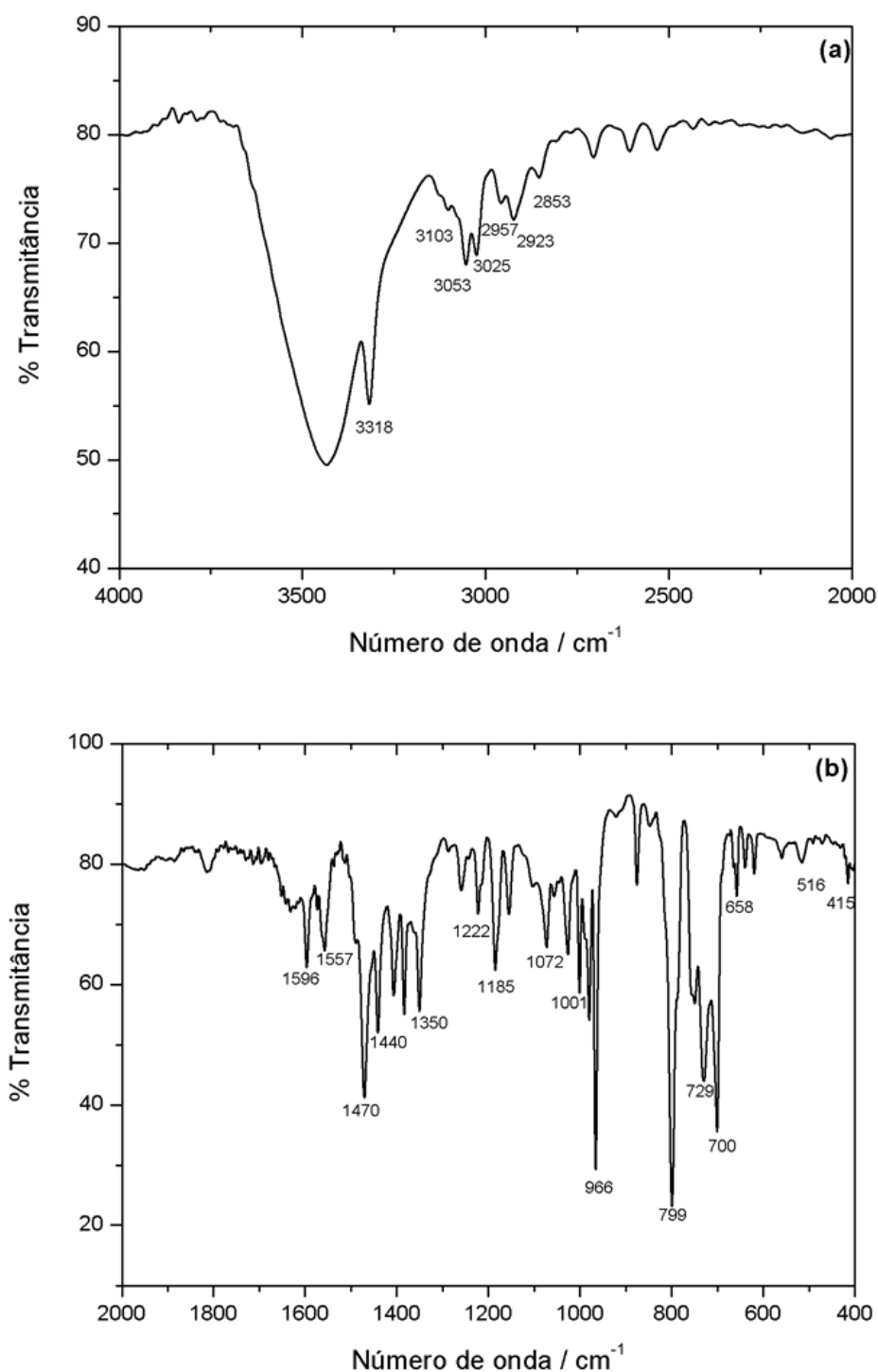


Figura 18- Espectroscopia no infravermelho da porfina 3-MPyTPP (a) de 4000 a 2000 cm^{-1} e (b) de 2000 a 400 cm^{-1} , com indicação do número de onda das principais bandas, cuja atribuição tentativa é mostrada na tabela 4.

Tabela 4- Atribuição tentativa dos principais sinais dos espectros no infravermelho apresentados na Figura 18, para as porfirinas 3-MPyTPP e 4-MPyTPP (cm^{-1}). [104, 105]

3-MPyTPP	4-MPyTPP	ATRIBUIÇÃO
415	417	Deformação angular fora do plano (CH das fenilas)
516	518	Deformação angular fora do plano (CH anel porfirínico)
658	657	Deformação angular no plano (CH das fenilas)
700	700	Deformação CH=CH <i>cis</i> CH fora do plano
729	724	Deformação CR'R''=CHR CH fora do plano
749	759	Deformação angular fora do plano (CH da piridina)
799	798	Deformação CH=CH <i>trans</i> fora do plano
876	877	Deformação fora do plano (CH do anel porfirínico)
966	966	Estiramento C=C
1001	1001	Estiramento C=C
1072	1072	Deformação CH no plano
1185	1178	Deformação CH no plano
1222	1222	Deformação CH no plano
1350	1350	Estiramento C-N do pirrol
1384	-	Estiramento C-N da piridina
1407	1403	Estiramento C=C da piridina
1470	1473	Estiramento (R'-CH-R'')
1557	1559	Estiramento C=C do pirrol
1596	1589	Estiramento C=C dos grupos fenila
2853	2854	Estiramento CH do pirrol
2923	2924	Estiramento CH do pirrol
2957	2956	Estiramento CH da piridina
3025	3022	Estiramento CH dos substituintes fenila
3053	3055	Estiramento CH dos substituintes fenila
3103	3105	Estiramento CH da piridina
3318	3315	Estiramento NH

5.2 Porfirinas Metaladas com Zn(II)

Os derivados metalados com Zn(II) foram preparados refluxando-se as respectivas porfirinas base livre com acetato de zinco, em ácido acético glacial. A reação de metalação foi acompanhada espectrofotometricamente, como no caso da metalação da 4-MPyTPP mostrado na Figura 19. Observou-se o deslocamento da banda Soret para comprimentos de onda maiores (428 nm) e a redução das quatro bandas Q da base livre para duas no derivado metalado. A metalação ocorreu rapidamente, de maneira que a reação se completou em cerca de 10 minutos.

Neste momento, cabe uma discussão mais detalhada a respeito dos espectros eletrônicos das porfirinas. Martin Gouterman [106] realizou um extenso estudo que culminou no modelo dos quatro orbitais de fronteira, ou seja, dos orbitais $a_{1u}(\pi)$ e $a_{2u}(\pi)$ (HOMO's) completamente preenchidos e dos orbitais vazios de menor energia de simetria $e_g(\pi)$ (LUMO's), para explicar o espectro. Os dois orbitais preenchidos apresentam energias muito próximas, podendo haver inversão da posição relativa dos mesmos dependendo do íon metálico central coordenado ao anel porfírico. Os estados excitados de menor energia são resultantes da promoção de um elétron dos orbitais HOMO's para o LUMO de simetria e_g , gerando dois estados de simetria E_u , com energias próximas. Entretanto, a interação entre estes dois estados excitados provoca o desdobramento dos mesmos, gerando um estado de menor e outro de maior energia. Os diagramas de orbitais moleculares mostrados na Figura 20 são válidos para complexos com simetria D_{4h} (derivados porfíricos metalados), nos quais se observa uma transição intensa na região de 400 nm (banda Soret, totalmente permitidas) e duas transições na região de 500 a 700 nm (bandas Q).

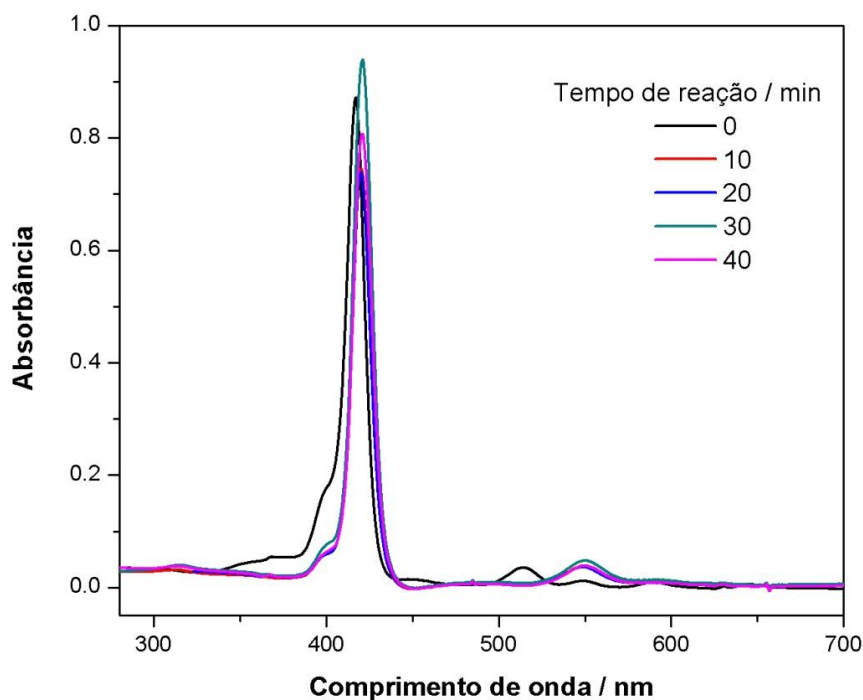


Figura 19- Monitoramento espectrofotométrico da reação de metalação da 4-MPyTPP com Zn(II) em função do tempo. Espectros obtidos em ácido acético glacial.

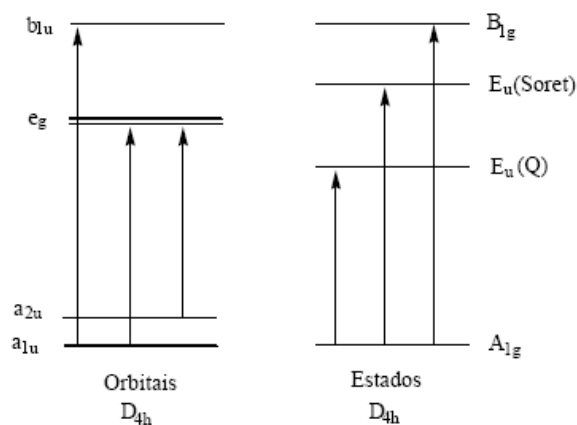


Figura 20- Diagrama de orbitais moleculares e os respectivos estados espectroscópicos de porfirinas metaladas apresentando simetria D_{4h} , com indicação para as transições eletrônicas correspondentes às bandas Soret e Q. (Adaptado da Ref. [107]).

No caso das porfirinas base-livre, a diminuição da simetria para D_{2h} provoca a quebra da degenerescência do estado E_u , desdobrando-o nas suas componentes nas direções x e y . Isso leva ao aparecimento de quatro bandas na região de 500 a 700 nm.

A posição das bandas Soret e Q variam muito pouco para os diferentes íons metálicos que podem estar coordenados ao anel porfirínico. Isto resulta do fato de que a interação entre os orbitais π do metal e os orbitais π da porfirina é muito fraca. Entretanto, tem-se como exceção as porfirinas complexadas com Mn(III). A geometria mais favorável, ocasionada pela localização do metal no plano da porfirina, contribui para o recobrimento dos orbitais $d\pi$ do manganês(III) e da porfirina, levando a uma forte interação σ entre o metal e os quatro nitrogênios pirrólicos da porfirina, que é a interação mais importante nas metaloporfirinas. Cálculos teóricos predizem que os orbitais d dos íons de metais da primeira série de transição, como o manganês(III) e o ferro(III), terão energia similar aos dos níveis π da porfirina. No caso das Mn(III) porfirinas, por exemplo, o orbital e_g (d_{xz} , d_{yz}) tem energia e simetria adequadas para interagir com o orbital $e_g^*(\pi)$ da porfirina. Assim podem surgir bandas no espectro eletrônico resultantes da transferência de carga (TC) ligante-metal, como ocorre com o derivado metalado com Mn^{3+} da *meso*-(tetrakis-*p*-sulfonatofenil)porfirina (Mn-TPPS₄). Neste caso, o aparecimento desta banda em menores comprimentos de onda vem acompanhado de uma diminuição na intensidade da banda Soret. [105, 108]

Com relação à geometria das metaloporfirinas sintetizadas, o fato do raio iônico do Zn(II) (para número de coordenação igual a 4), de cerca de 0,74 Å, ser um pouco maior que a cavidade do anel porfirínico (em torno de 70 Å), faz com que estes complexos apresentem preferencialmente a geometria piramidal, com o íon metálico posicionado fora do plano do anel porfirínico.[109]

5.3 Derivados Porphirínicos Metilados

Os derivados metilados foram obtidos refluxando-se as respectivas porfirinas com excesso de tosilato de metila em dimetilformamida, por cerca de 4 horas. O andamento da reação foi acompanhado através de cromatografia em camada delgada já que as mudanças nos espectros eletrônicos eram muito sutis para serem observadas. Após evaporação do solvente, o sólido obtido foi redissolvido em DMF e adicionado, gota a gota, a uma solução aquosa de cloreto de sódio para promover a troca do contra-íon tosilato pelo ânion Cl^- . A porfirina precipitou instantaneamente, sendo posteriormente filtrada e lavada com água para a remoção do excesso de NaCl .

Mesmo com um grande excesso de tosilato de metila (cerca de 40 vezes) e um tempo relativamente longo de reação, a conversão da porfirina no derivado metilado não foi quantitativa. Verificou-se através das análises por cromatografia em camada delgada que uma pequena parte da porfirina de partida permaneceu sem reagir. Assim, uma purificação em coluna de alumina neutra foi realizada a fim de separar o derivado metilado da porfirina de partida. Para isso, utilizou-se inicialmente diclorometano como fase móvel, a fim de separar a porfirina não metilada e de maior R_f . Em seguida, o composto de interesse foi facilmente removido da coluna utilizando-se metanol como eluente.

Os mesmos procedimentos, de metilação e purificação, foram empregados para a preparação dos quatro derivados metilados. Os espectros eletrônicos desta série de compostos estão apresentados na Figura 21, onde verifica-se que não há diferenças espectrais significativas, exceto pela largura de banda, entre os isômeros com piridina ligada ao anel pela posição 3 (Figura 21a) ou 4 (Figura 21b), tanto no caso das porfirinas base-livre (linha preta) como nos respectivos complexos de Zn(II) (linha vermelha). Os comprimentos de onda das bandas Soret e Q dos compostos metilados e os respectivos valores de absorvidade molar são mostrados na Tabela 5.

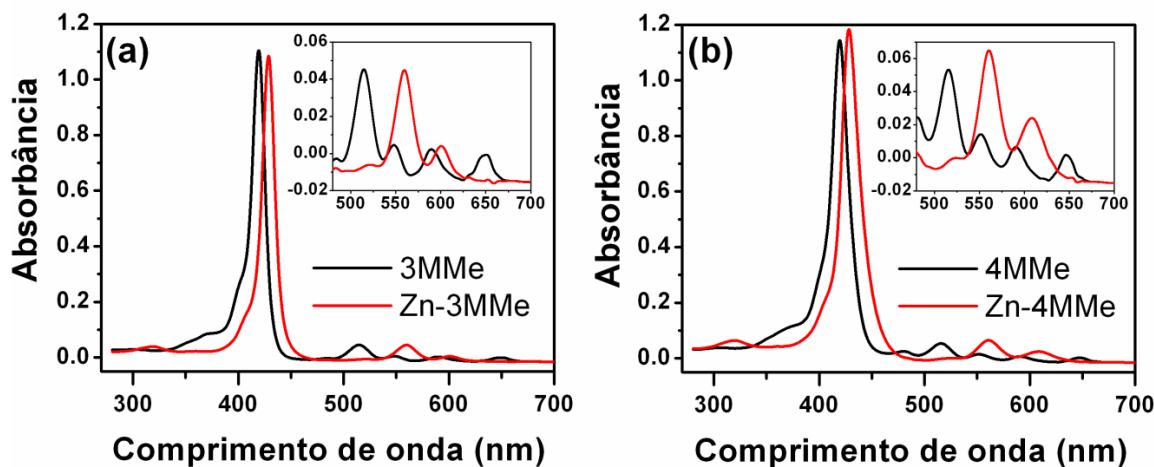


Figura 21- Espectros eletrônicos em CH_2Cl_2 dos derivados porfíricos metilados com piridina ligada pelo posição (a) 3 ou (b) 4 ao anel porfírico.

Tabela 5- Bandas de absorção dos derivados porfíricos metilados sintetizados e os respectivos valores de absorvidade molar ($\log \epsilon$).

Porfirina	Banda Soret, nm ($\log \epsilon$)	Bandas Q, nm ($\log \epsilon$)
3MMe	422 (5,06)	515 (3,95), 550 (3,59), 590 (3,55), 650 (3,45)
4MMe	422 (5,17)	515 (4,07), 550 (3,78), 590 (3,60), 650 (3,58)
Zn-3MMe	429 (5,07)	560 (3,84), 600 (3,40)
Zn-4MMe	428 (4,90)	560 (3,90), 610 (3,33)

A caracterização desta série de compostos através de ^1H RMN revelou algumas mudanças espectrais em relação aos espectros apresentados na Figura 17 para os compostos de partida. Observa-se a presença de um singlete forte em torno de 4,7 ppm referente aos três prótons do grupo metila para todas as porfirinas desta série, e a ausência do singlete dos prótons pirrólicos em torno de -3 ppm no caso dos dois derivados metalados com Zn(II). Os espectros de ^1H RMN dos derivados metilados 3MMe e Zn-3MMe são mostrados na Figura 22.

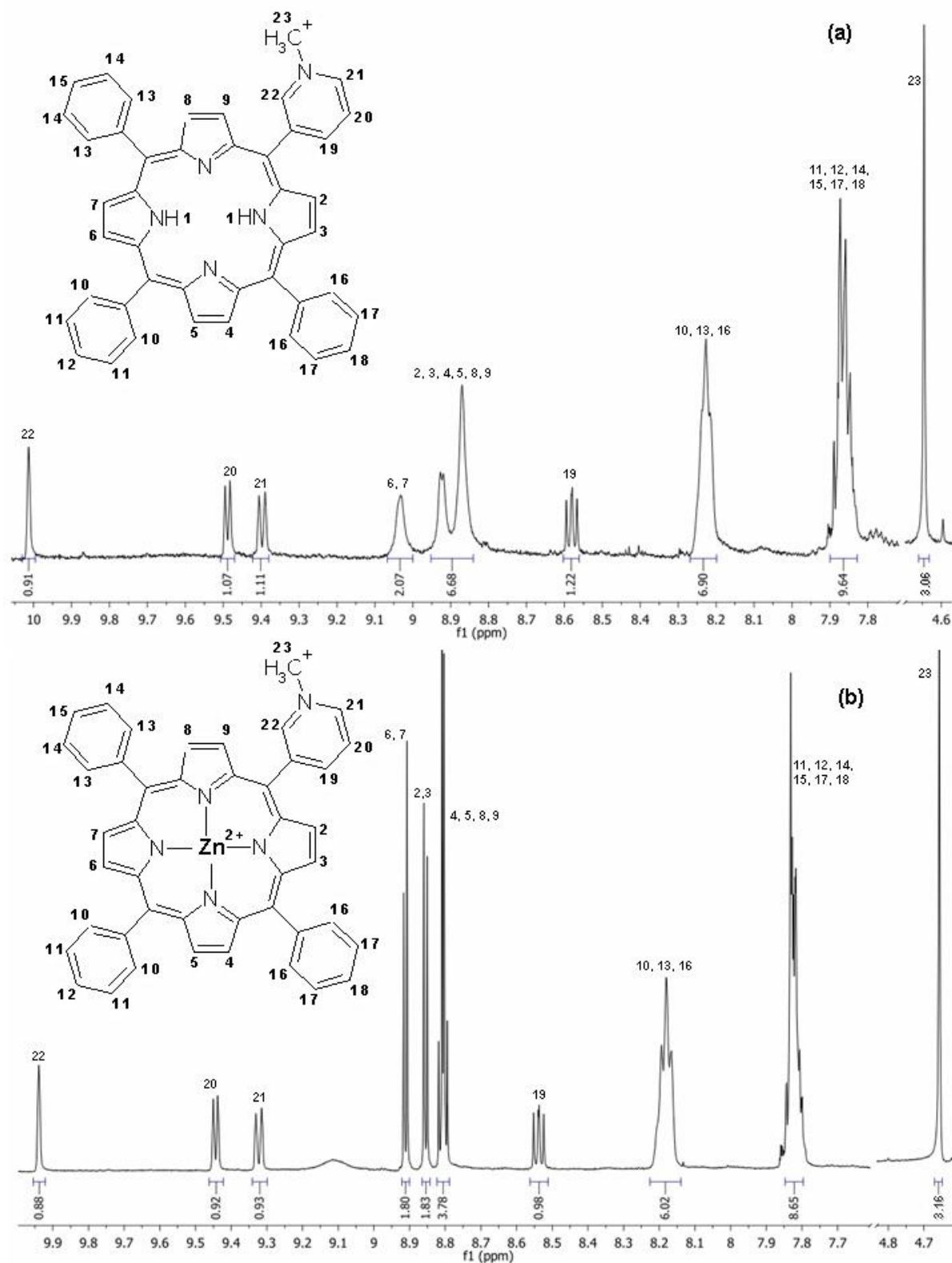


Figura 22- Espectros de ^1H RMN das porfirinas (a) 3-MMe e (b) Zn-3MMe, as respectivas estruturas e atribuições e valores integrados dos sinais. Espectros obtidos em DMSO deuterado.

A caracterização da série de porfirinas metiladas foi realizada também através de espectroscopia infravermelho, na janela de 4000 a 400 cm^{-1} . As principais diferenças a serem observadas estão na região espectral destacada na Figura 23, onde estão representados os espectros das espécies *meta*-substituídas 3-MPyTPP, 3-MMe e Zn-3MMe. Pode-se observar a presença de bandas características de deformação axial CH sp^3 entre 2800 e 2500 cm^{-1} para as espécies metiladas. Além disso, no caso do composto metalado (espectro de linha azul), verifica-se a ausência do banda em 3318 cm^{-1} característico do estiramento NH, que é observado nos derivados base-livre. Comportamento análogo foi observado no caso dos derivados *para*-substituídos.

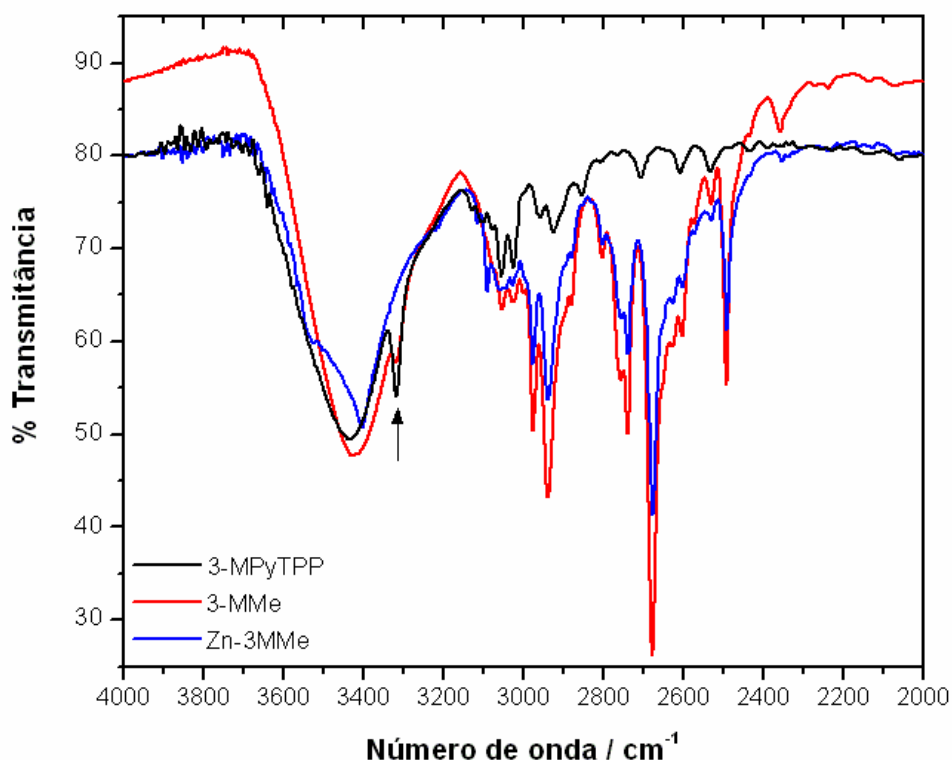


Figura 23- Espectroscopia no infravermelho das porfirinas 3-MPyTPP, 3-MMe e Zn-3MMe na região espectral de 4000 a 2000 cm^{-1} . Destaque para a banda em torno de 3318 cm^{-1} , característica de porfirinas na forma de base livre.

5.4 Derivados Porfirínicos Coordenados ao Complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$

Uma série de quatro compostos supramoleculares contendo complexos de rutênio ligados a uma das posições *meso*- do anel porfirínico também foram obtidos. Inicialmente o complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ foi submetido a um refluxo com AgNO_3 , em uma mistura água:etanol 1:1, por cerca de 20 minutos, onde o cloreto de prata formado foi removido por filtração. Este procedimento foi realizado a fim de substituir um dos íons Cl^- do complexo por uma molécula de H_2O , formando o aqua-complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ mais reativo.

Após a eliminação do solvente no evaporador rotatório, uma quantidade adequada de porfirina foi adicionada de forma a garantir um excesso de cerca de 1% do aqua-complexo. Em seguida, a mistura reacional foi mantida sob refluxo numa mistura de diclorometano/DMF 4:1, por cerca de 1 hora. O mesmo procedimento foi utilizado para a preparação de todos os compostos da série de derivados rutenados *m*- e *p*-piridil(trifenil)porfirinas substituídos.

Após o refluxo, o solvente foi removido no evaporador rotatório e o sólido dissolvido num volume mínimo de DMF. Essa solução concentrada foi gotejada sobre uma solução aquosa saturada de trifluorometanossulfonato de lítio (Li-TFMS), onde a porfirina precipitou instantaneamente. O sólido foi centrifugado e lavado várias vezes com água para a remoção do excesso de sal e da pequena fração do complexo que não reagiu.

Posteriormente, foi realizada uma purificação mais criteriosa em coluna de alumina neutra para assegurar a pureza do composto. Inicialmente foi utilizado diclorometano como fase móvel, de modo a eluir a pequena fração de porfirina que não reagiu. A polaridade da fase móvel foi então aumentada com a adição de uma pequena quantidade de etanol, que permitiu a eluição do composto de interesse da coluna.

Na Figura 24 são apresentados os espectros eletrônicos das quatro espécies rutenadas sintetizadas. Pode-se observar que embora os espectros sejam muito semelhantes entre si, os compostos que apresentam a piridina ligada pela posição 4 (Figura 24a) ao anel porfirínico apresentam uma largura de banda maior em relação aos derivados com piridina ligada pela posição 3 (Figura 24b). Isto indica um menor acoplamento eletrônico do anel porfirínico com os complexos periféricos quando este se encontra ligado pela posição meta do anel piridínico. Além das bandas Soret e Q, características do anel porfirínico, observa-se a presença de uma banda em torno de 295 nm que pode ser atribuída à transição interna $\pi \rightarrow \pi^*$ dos ligantes bipyridina coordenados ao íon Ru(II). A intensidade desta banda é proporcional ao número de complexos de rutênio coordenados ao macrociclo, sendo que no caso do anel substituído com quatro grupos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$, esta banda apresenta uma intensidade próxima à da banda Soret da porfirina. Outra banda larga, em torno de 470 nm atribuída à transição de transferência de carga $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{d}\pi) \rightarrow \text{bipy}(\text{p}\pi)$, pode também ser observada sob a banda Soret para essa classe de compostos. Sua intensidade também é proporcional ao número de grupos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ coordenados, sendo portanto de difícil visualização para os derivados monossustituídos. A Tabela 6 apresenta as bandas Soret e Q das porfirinas coordenadas a complexos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ e os respectivos valores de absorvidade molar.

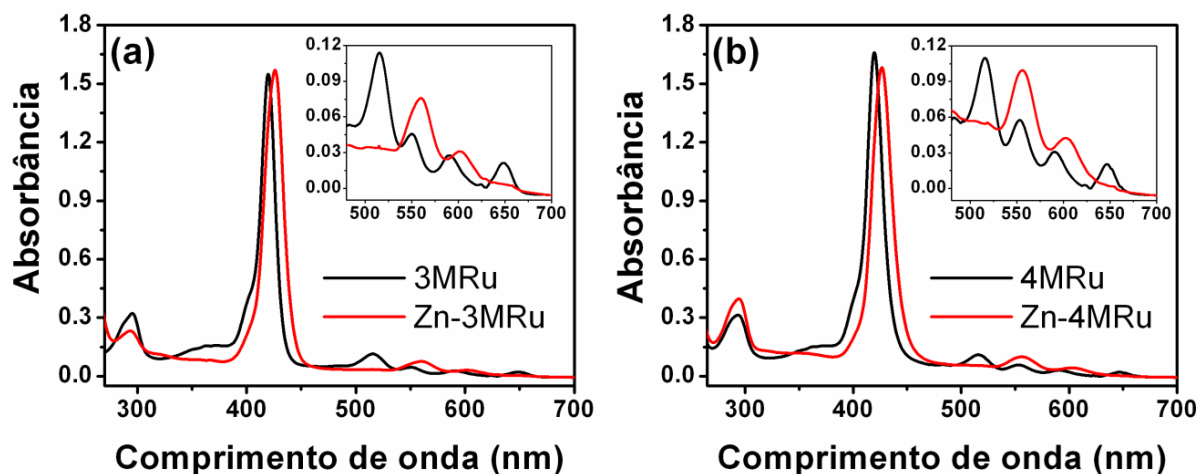


Figura 24- Espectros eletrônicos dos derivados porfirínicos sintetizados contendo complexos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ ligados aos grupos (a) 3-piridil ou (b) 4-piridil do anel porfirínico. Espectros obtidos em CHCl_3 .

Tabela 6- Bandas de absorção dos derivados porfirínicos coordenados a complexos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ e os respectivos valores de absorvidade molar ($\log \epsilon$).

Porfirina	$[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$, nm ($\log \epsilon$)	Banda Soret, nm ($\log \epsilon$)	Bandas Q, nm ($\log \epsilon$)
3MRu	294 (4,70)	417 (5,60)	520 (4,20), 550 (4,13), 588 (3,95), 650 (3,77)
4MRu	293 (4,80)	417 (5,70)	520 (4,30), 552 (4,16), 588 (3,88), 649 (3,70)
Zn-3MRu	295 (4,88)	427 (5,52)	560 (3,97), 600 (3,70)
Zn-4MRu	295 (4,76)	427 (5,45)	552 (3,02), 603 (2,92)

Esta série de compostos também foi caracterizada por ressonância magnética de próton, sendo que os espectros obtidos foram de difícil interpretação, principalmente no caso dos derivados *meta*-substituídos, onde o simples fato dos complexos de rutênio estarem dispostos para fora do plano do anel porfirínico resultou no alargamento dos sinais (envelopes de sinais) que dificultaram a interpretação dos espectros. No caso dos derivados *para*-

substituídos, a atribuição dos sinais foi realizada com relativa facilidade, [6] conforme apresentado na Figura 25 para o caso da 4MRu, onde pode-se observar que o número integrado de prótons apresenta uma concordância satisfatória com os valores esperados.

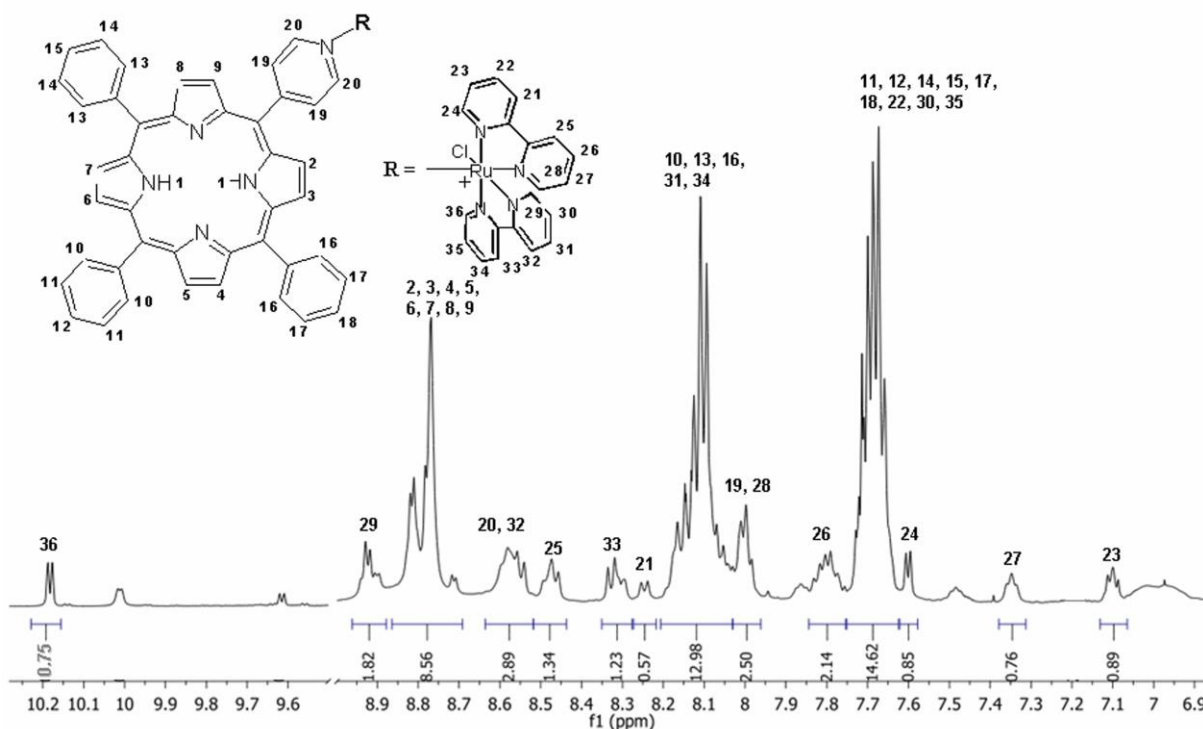


Figura 25- Espectro de ^1H RMN da porfirina 4MRu apresentando a respectiva estrutura molecular e atribuição de sinais. Abaixo do espectro, estão indicados os valores integrados dos sinais. Espectros obtidos em CDCl_3 .

Espectros na região do infravermelho também foram obtidos para estas espécies supramoleculares. O espectro da 4MRu é mostrado na Figura 26, juntamente com os espectro do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ (linha preta) e da porfirina de partida 4-MPyTPP (linha vermelha), de forma a facilitar a identificação das bandas relacionadas ao composto de rutênio. As principais diferenças se encontram na região espectral entre 2000 e 400 cm^{-1} , onde além das bandas características do anel porfirínico, já atribuídas na Tabela 4, observa-se o aparecimento de bandas em 1602 , 1460 , 1418 e 766 cm^{-1} , características do complexo de rutênio. As bandas de maior energia são atribuídas às deformações axiais $\text{C}=\text{C}$ do anel

Daiana K. D. Nogueira

piridínico dos ligantes bipy; a banda em 1418 cm^{-1} é resultante da deformação axial C=N da piridina do complexo; enquanto a banda de menor energia é atribuída à deformação angular fora do plano CH das piridinas do complexo metálico.

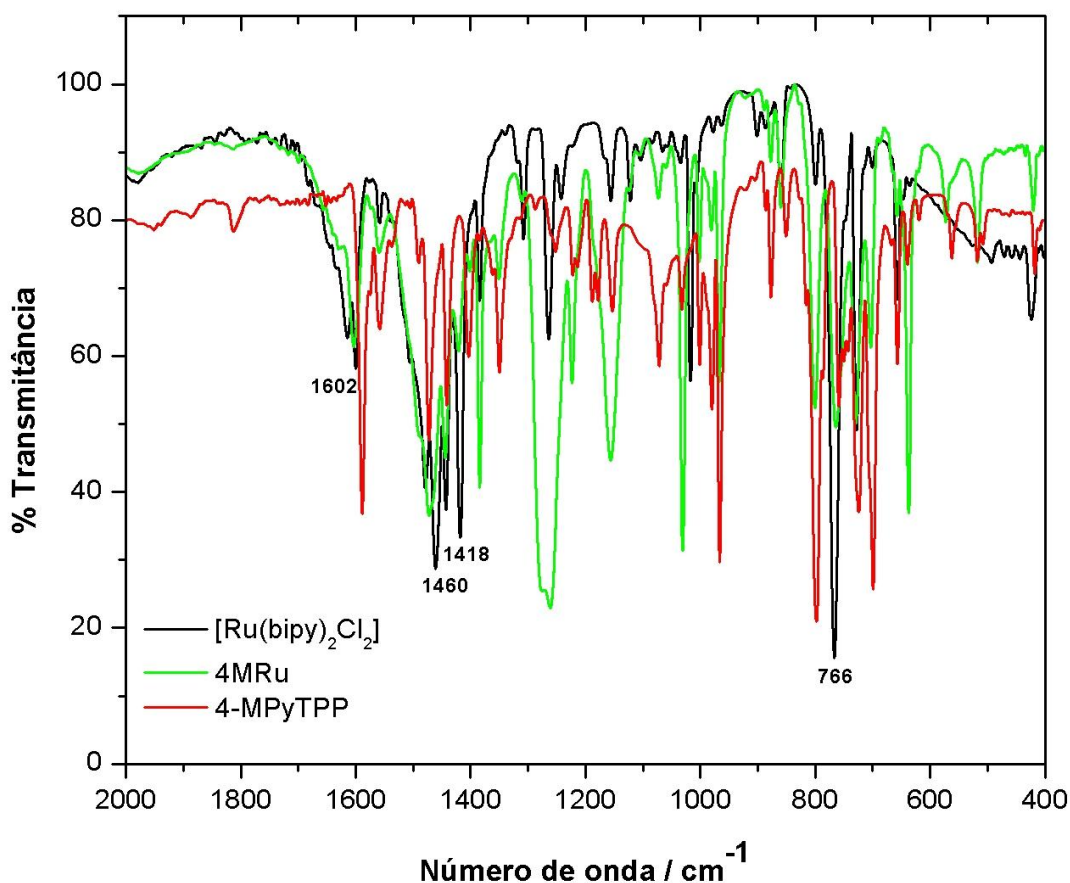


Figura 26- Espectroscopia no infravermelho das porfirinas 4-MPyTPP, 4MRu e do complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}_2]$ na região espectral de 2000 a 400 cm^{-1} . Destaque para as principais bandas da porfirina coordenada ao complexo de rutênio.

Estudos eletroquímicos por voltametria cíclica foram realizados com a série de derivados porfirínicos supermoleculares, contendo um complexo de rutênio na periferia do anel macrociclo, fornecendo importantes informações com relação à pureza do composto final. O par de ondas reversíveis, em torno de $0,9\text{ V}$ é atribuído ao par Ru(III)/Ru(II) da unidade $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ coordenada ao anel porfirínico. Os voltamogramas cíclicos obtidos

para a 3MRu nas regiões anódica e catódica são mostrados na Figura 27. A presença de um par reversível de ondas em torno de +0,5V, atribuído ao par Ru(III)/Ru(II), indica a presença do complexo de partida livre como impureza. Dessa maneira, outra coluna de alumina foi preparada visando uma nova purificação.

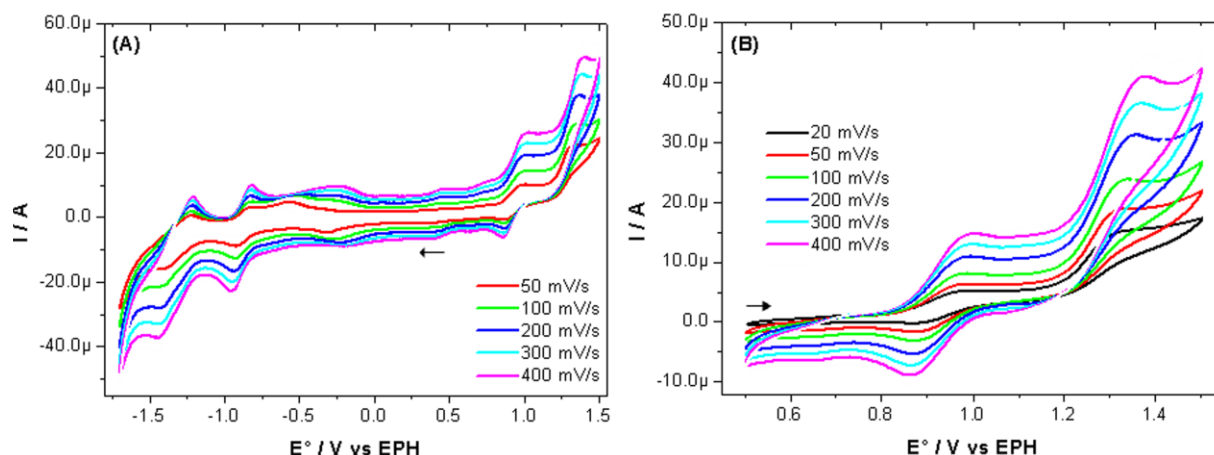


Figura 27- Voltamogramas cíclicos de uma solução $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ Mol.L}^{-1}$ de 3MRu em DMF, na faixa de (a) -1,7 e +1,5V e (b) +0,5 e +1,5V, utilizando eletrodo de platina. Eletrólito: TEAClO₄ 0,1 mol.L⁻¹.

Além de fornecer informações relacionadas à presença de complexo livre como impureza, a intensidade relativa das ondas voltamétricas são proporcionais ao número de grupos coordenados ao anel. Esta informação pode ser facilmente obtida pela análise das áreas sob os picos referentes ao processo Ru(III)/Ru(II) e à primeira redução do anel porfirínico em -0,89 V. Pôde-se constatar uma relação entre a área dos picos de 1:1, dentro do erro experimental, indicando a presença de um complexo de rutênio coordenado por anel porfirínico. As ondas observadas em -1,31 e +1,38V são referentes ao segundo processo de redução do anel porfirínico e à oxidação irreversível do anel porfirínico, respectivamente.

O processo correspondente ao par Ru(III)/Ru(II) é deslocado para potenciais mais positivos em cerca de 20 mV para os derivados substituídos na posição *para*, indicando que

no isômero *meta* o anel porfirínico comporta-se como um doador de elétrons mais fraco. O segundo processo de redução do anel porfirínico observado em -1,32 V na Figura 27a é deslocado cerca de 100 mV para potenciais mais negativos em relação ao derivado *p*-substituído, indicando uma maior densidade eletrônica sobre o anel porfirínico.

5.5 Rendimento Quântico de Fluorescência ϕ_f

Os espectros de emissão dos derivados porfirínicos dissolvidos em diclorometano, foram obtidos na faixa de 600 a 800 nm, excitando-se em 417 nm (banda Soret). O espectro de emissão das porfirinas apresenta duas bandas de fluorescência em torno de 650 e 720 nm, atribuídos às transições do estado vibracional 0, do estado excitado, para o estado vibracional 0 e 1, do estado fundamental. A Figura 28 apresenta os espectros de emissão das porfirinas base-livre sintetizadas. A coordenação do complexo de rutênio ao anel porfirínico não ocasiona mudanças no perfil dos espectros de emissão, indicando que o estado excitado das porfirinas 3MRu e 4MRu está localizado no anel porfirínico e não no complexo $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$. Entretanto, o rendimento quântico de fluorescência diminui em quase duas ordens de grandeza quando comparados com os compostos metilados, como pode ser observado na Tabela 7, sugerindo que outros caminhos de relaxação, como decaimento não radiativo e cruzamento intersistema, podem estar sendo favorecidos pela coordenação do complexo de rutênio. A Tabela 7 apresenta os valores de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) dos compostos sintetizados determinados por comparação com um padrão previamente escolhido, a tetrafenilporfirina (TPP), utilizando a Equação 2, descrita no item 4.2.6, e os respectivos desvios padrão (DP).

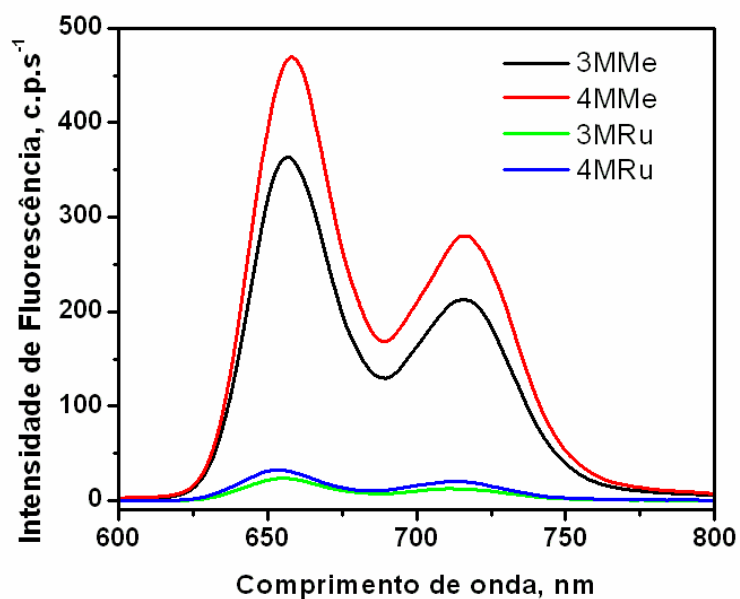


Figura 28- Espectros de fluorescência das porfirinas base-livre sintetizadas em CH_2Cl_2 , obtidos excitando-se em $\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$.

Tabela 7- Rendimentos Quânticos de Fluorescência (ϕ_f) dos compostos sintetizados e os respectivos desvios padrão (DP) em CH_2Cl_2 , excitando-se em $\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$.

Porfirina	ϕ_f (DP)
TPP	0,150
3MMe	0,343 (0,009)
4MMe	0,458 (0,003)
3MRu	0,021 (0,001)
4MRu	0,029 (0,001)
Zn-3MMe	0,012 (0,001)
Zn-4MMe	0,037 (0,002)
Zn-3MRu	0,015 (0,001)
Zn-4MRu	0,025 (0,001)

Como observado na Tabela 7, a presença do íon Zn(II) no centro do macrociclo porfírico reduz o rendimento quântico de fluorescência dos compostos, embora o perfil do

espectro de emissão permaneça inalterado. Esse fato tem sido relatado na literatura, de maneira que uma redução no ϕ_{fl} foi observada com a inserção de zinco na *meso*-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina [110] e em tetraaril porfirinas halogenadas. [111]

5.6 Rendimento Quântico de Produção de Oxigênio Singlete (ϕ_{Δ})

Um dos fatores que pode ser responsável por uma maior ou menor atividade fotodinâmica de um sensibilizador é a eficiência na geração de oxigênio singlete, uma espécie altamente reativa e diretamente responsável pela destruição de células tumorais. Nesse sentido, avaliou-se o rendimento quântico de formação do oxigênio singlete ϕ_{Δ} das oito porfirinas sintetizadas. Foram preparadas soluções dos derivados porfirínicos em clorofórmio, de maneira que a absorção em 532 nm (comprimento de onda utilizado para excitação da amostra) ficasse em torno de 0,2 u.a. O ϕ_{Δ} foi determinado através da obtenção de curvas de decaimento da emissão do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) em 1270 nm, como mostrado na Figura 29 para as porfirinas 4MRu e Zn-4MRu. Pode-se observar que no caso da 4MRu (Figura 29a) a intensidade máxima de emissão do $^1\text{O}_2$ é quase duas vezes maior que do seu derivado metalado com Zn(II) (Figura 29b), o que sugere uma maior eficiência das porfirinas base-livre em gerar $^1\text{O}_2$.

O rendimento quântico das porfirinas sintetizadas foi determinado medindo-se a intensidade de emissão do $^1\text{O}_2$ em 10 μs , os respectivos valores de absorção em 532 nm, a Equação 3 e também um padrão, a *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) de ϕ_{Δ} conhecido. Os valores obtidos de ϕ_{Δ} são apresentados na Tabela 8.

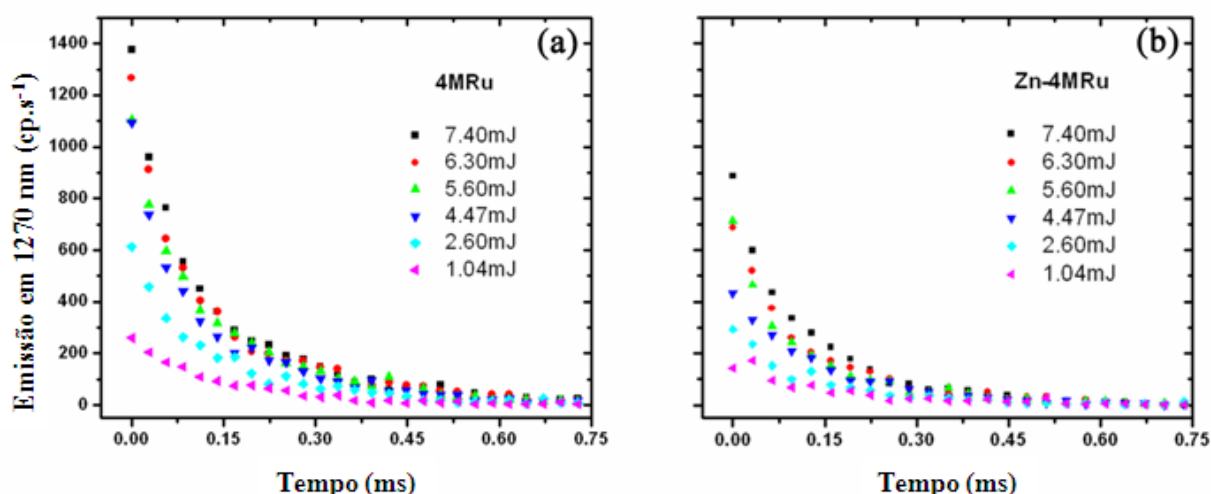


Figura 29- Curvas de decaimento radioativo do $^1\text{O}_2$ (em 1270 nm), registradas após incidência de pulsos de laser com intensidades na faixa de 1,04 a 7,40 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, utilizando soluções dos derivados porfirínicos monocatiônicos (a) 4MRu e (b) Zn-4MRu em clorofórmio. $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $\text{Abs}(532) \approx 0.02 \text{ a.u.}$

Tabela 8- Rendimentos quânticos de formação de $^1\text{O}_2$, ϕ_{Δ} e tempos de vida τ (em CHCl_3) dos oito derivados porfirínicos sintetizados. TPP foi utilizada como padrão.

Porfirina	$\phi_{\Delta}(\text{DP})$	$\tau (\mu\text{s}) (\text{DP})$
TPP	0,50	183 (4)
3MMe	0,79 (0,04)	163 (3)
4MMe	0,55 (0,02)	160 (3)
3MRu	0,50 (0,02)	161 (5)
4MRu	0,51 (0,03)	163 (1)
Zn-3MMe	0,40 (0,01)	141 (8)
Zn-4MMe	0,48 (0,03)	139 (5)
Zn-3MRu	0,40 (0,03)	139 (3)
Zn-4MRu	0,36 (0,02)	145 (3k)

Na Tabela 8 são apresentados também os tempos de vida (τ) do oxigênio singlete determinados a partir das curvas cinéticas de decaimento registradas para cada porfirina. O tempo de vida é também um limitante para o raio de ação dessa espécie reativa, de forma que tempos de vida menores resultam em uma menor eficiência como Fs. Em solventes orgânicos, esses valores podem alcançar até cerca de 200 μ s. Já em água, o tempo de vida é reduzido até aproximadamente 2-4 μ s. [112] Entretanto em sistemas celulares, devido aos processos colisionais com as inúmeras espécies citosólicas, este valor foi estimado em 10–50 ns, conferindo-lhe um perímetro de atuação de aproximadamente 0,1 μ m. Logo, seus efeitos lesivos possuem eficácia apenas nas proximidades da molécula do fotossensibilizador que está sendo excitado. Com relação aos Fs's investigados, os maiores valores de rendimento quântico e tempo de vida do $^1\text{O}_2$, correspondem às porfirinas base livre, contendo grupos metilpiridínio na posição *meso* do anel porfirínico.

5.7 Conclusões Parciais

Uma série de oito derivados porfirínicos anfifílicos, com potencial aplicação em Terapia Fotodinâmica, foi sintetizada e caracterizada por meio de técnicas espectroscópicas, análise elementar e voltametria cíclica. Em particular, a última foi fundamental no sentido de verificar o grau de pureza das porfirinas supermoleculares coordenadas ao complexo $\text{Ru}[(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$.

Diferenças significativas no rendimento quântico de fluorescência e de produção de oxigênio singlete foram observadas, de maneira que essas mudanças no comportamento das espécies no estado excitado podem influenciar diretamente na sua eficiência como Fs's, como será descrito adiante.

Embora os compostos sintetizados apresentem a desvantagem da baixa solubilidade, a

presença de um grupo periférico com carga positiva confere um caráter anfifílico à molécula tornando-os interessantes, pois podem alcançar um alto grau de penetração na membrana celular em comparação com os derivados substituídos por quatro grupos periféricos carregados. [42] Assim, a utilização de métodos que permitam dispersar esses compostos em meio aquoso é de extrema importância para assegurar as suas propriedades nos sistemas biológicos e propiciar o seu emprego como fotossensibilizadores.

Capítulo 6.
Encapsulamento dos
Derivados Porfirínicos

6. Encapsulamento dos Derivados Porphirínicos

A série de oito derivados porfirínicos, cuja síntese e caracterização foi descrita anteriormente, são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos de baixa polaridade. Essa característica limita a utilização direta destes compostos como Fs's para TFD, pois estes agentes são normalmente administrados através da corrente sanguínea e poderiam assim ocasionar diversos problemas vasculares e renais. Além disso, a agregação diminui drasticamente a atividade fotodinâmica impedindo a aplicação destas moléculas mesmo em situações que se possa proceder a administração local. Assim a utilização de veículos e sistemas que possibilitem a dispersão daqueles compostos na corrente sanguínea (meio aquoso), bem como liberá-los de forma controlada é de extrema importância. Tendo em vista o grande número de polímeros biocompatíveis disponíveis, optou-se pela incorporação dos Fs's em micro/nanocápsulas poliméricas, sistemas bastante estáveis até mesmo a mudanças de pH e temperatura.

Considerando que a escolha dos constituintes da cápsula depende principalmente da aplicação a qual será destinada, optou-se por materiais biocompatíveis e adequados para aplicações dermatológicas, visando a preparação de formulações para tratamento de câncer de pele. Foram preparadas duas formulações baseadas em dois diferentes sistemas poliméricos extensivamente empregados na indústria de cosméticos: a hidroxietilcelulose (HEC) e o atelocolágeno marinho/goma xantana (ACM). Essa etapa de encapsulamento foi realizada em colaboração com o Sr. Eduardo Caritá da empresa Funcional Mikron, que forneceu suporte/orientação e grande parte dos constituintes empregados na preparação das

formulações.

Assim, dentre as diversas estratégias disponíveis para o desenvolvimento de sistemas de armazenamento e liberação de fotossensibilizadores, optou-se pelo método de coacervação, que permite a obtenção de um material final com as características apropriadas para aplicações dermatológicas, como mostrado na imagem da Figura 30, referente a formulação de ACM.



Figura 30- Formulação de ACM obtida através do processo de coacervação.

Ambas as formulações foram preparadas através da adição de uma fase oleosa a uma fase aquosa contendo o material polimérico sob vigorosa agitação. Dentre os constituintes da fase oleosa, o propilenoglicol e o tween 20 foram utilizados com o objetivo de fornecer um meio no qual a porfirina pudesse permanecer dissolvida mesmo após a evaporação do solvente orgânico (clorofórmio). Entretanto, havia a possibilidade do propilenoglicol não ser encapsulado em virtude da sua alta afinidade também pelo meio aquoso. Assim, foi adicionado miristato de isopropila, um éster de cadeia longa (14 carbonos) à fase oleosa, de

forma a aumentar a afinidade do propilenoglicol pelo meio orgânico. Todo o processamento foi realizado sob agitação de cerca de 20000 rpm. Por fim, foi adicionado sulfato de sódio anidro para promover, por meio do processo de “salting-out”, a coacervação. Ou seja, essa alteração do meio resultou na dessolvatação das moléculas do polímero promovendo as interações polímero-polímero em detrimento das interações polímero-solvente. [57, 58] Vale ressaltar que o Fs utilizado para os estudos iniciais de encapsulamento foi a porfirina 3MMe.

As cápsulas formadas nessa etapa possuem diâmetros principalmente acima de 2 micrometros. Para se obter cápsulas com um alto grau de penetração na pele, optou-se pela diminuição do tamanho até a formação de nanocápsulas. Assim, foi introduzido o tensoativo tween-20 na formulação, que por meio da redução da tensão superficial ocasiona a formação de cápsulas de menores dimensões (um estudo mais detalhado a respeito do efeito do tensoativo no tamanho das cápsulas será apresentado posteriormente).

Além da diminuição do tamanho, a presença de pequenas quantidades de surfactante pode também aumentar consideravelmente a eficiência de encapsulamento como relatado por Mayya e colaboradores [113] para o sistema gelatina/goma acácia, comumente empregado no encapsulamento de compostos pelo método de coacervação. A velocidade de agitação é um dos fatores que também influenciam diretamente na forma e tamanho das cápsulas. Estudos mostram que o aumento da velocidade de agitação resulta na diminuição do tamanho das partículas. [114] Entretanto, neste caso a redução de tamanho foi realizada principalmente através de outro método físico: a ultrassonicação. A emulsão foi submetida à ultrassonicação por diferentes tempos e o tamanho foi analisado através de medidas de espalhamento dinâmico de luz.

6.1 Micro e Nano Cápsulas de Hidroxietilcelulose (HEC)

A fase oleosa, contendo o derivado porfirínico 3MMe, foi adicionada a fase aquosa contendo a HEC, sob vigorosa agitação. A mistura rapidamente adquiriu uma consistência cremosa, característica de formulações preparadas por este método. Após cerca de 5 minutos de agitação, adicionou-se o sulfato de sódio, seguido de resfriamento em banho de gelo. Nesta etapa, a constituição do sistema é principalmente de microcápsulas com diâmetros acima de 2 micrometros, como mostrado no histograma da Figura 31.

A formulação foi então submetida à ultrassonicação para promover a redução do tamanho das partículas para a escala nanométrica. Os histogramas da Figura 32 são consistentes com a redução do tamanho das cápsulas de acordo com o tempo de ultrassonicação empregado. Após cerca de 20 minutos (Figura 32d), tem-se a maior parte da formulação constituída de nanocápsulas com diâmetro médio em torno de 400 nm.

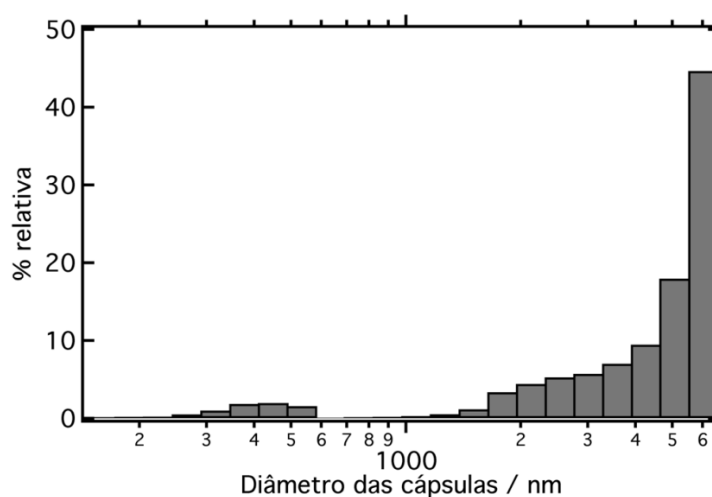


Figura 31- Histograma de distribuição de tamanho das microcápsulas de HEC obtidas através do método de coacervação simples.

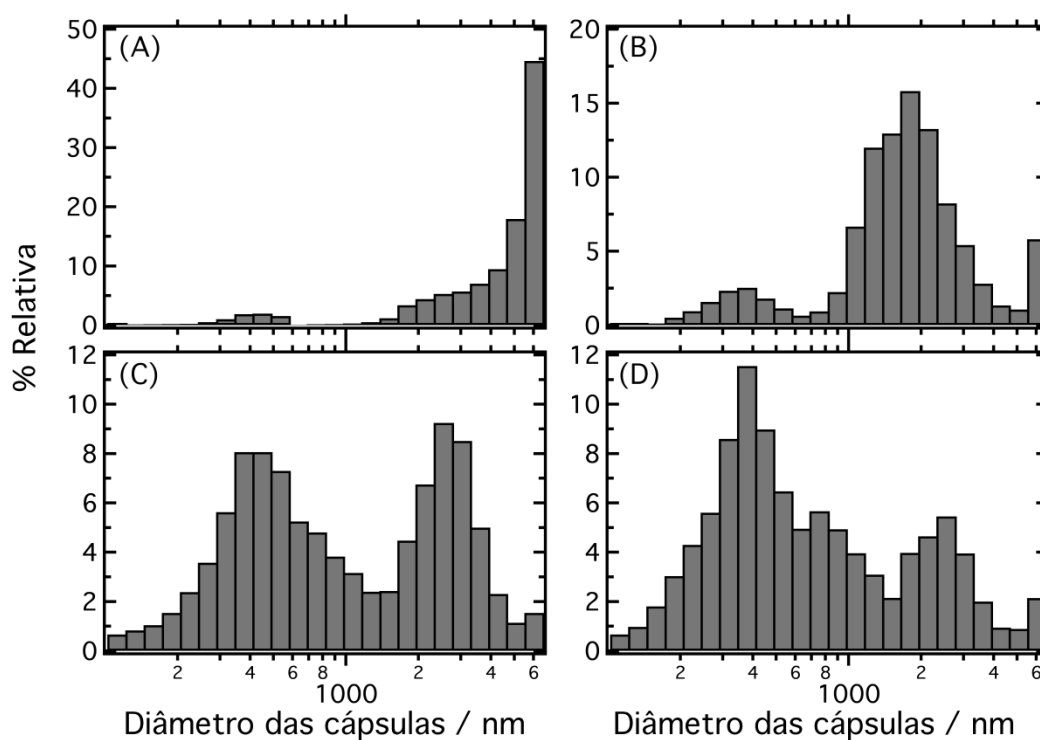


Figura 32- Histogramas de distribuição de tamanho das cápsulas de HEC obtidas após (a) 0, (b) 10, (c) 15 e (d) 20 minutos de ultrassonicação. Potência = 100 kJ.s^{-1} .

Imagens de Microscopia Confocal de fluorescência foram obtidas com a finalidade de se verificar a incorporação/localização da porfirimina 3MMe nas cápsulas de HEC. A lâmina foi preparada utilizando-se a formulação diluída e não submetida à ultrassonicação, a fim de permitir a obtenção de boas imagens com a objetiva com o aumento de 1000 vezes. As imagens foram obtidas excitando-se em $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ e monitorando-se a emissão da 3MMe na região do vermelho do espectro eletromagnético. Pode-se observar na Figura 33, a presença de porfirimina concentrada principalmente no interior das cápsulas, de acordo com a intensidade da fluorescência apresentada pelas mesmas. Optou-se por focalizar nas cápsulas maiores (indicadas pelas setas na Figura 33), a fim de garantir uma melhor visualização dos pontos de emissão. Note que a imagem mostra um número muito grande de cápsulas de tamanho mais ou menos homogêneo, mas em planos inferiores, além de algumas poucas cápsulas de tamanhos equivalentes aos maiores indicados por setas, demonstrando a boa

qualidade do material preparado. Somente é possível observar a emissão das cápsulas que se encontram próximas do foco do microscópio.

A emulsão se manteve estável pelo período analisado (sete dias), entretanto observou-se que após esse período havia a formação de agregados maiores de cápsulas na emulsão, como pode ser verificado através da microscopia óptica apresentada na Figura 34. Um ajuste de pH foi então realizado a fim de otimizar as características ácido-base do sistema, afastando-o do ponto isoelétrico do polímero. Assim, pode-se promover a formação de cargas na superfície das cápsulas, evitando a coalescência das mesmas por meio de repulsões eletrostáticas.

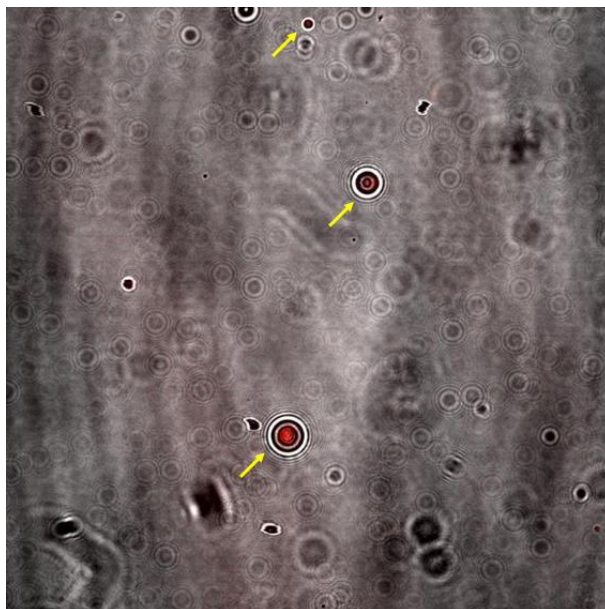


Figura 33- Imagem de Microscopia Confocal, acoplada ao modo de fluorescência, de microcápsulas de HEC contendo a porfirina 3MMe na concentração de $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$.

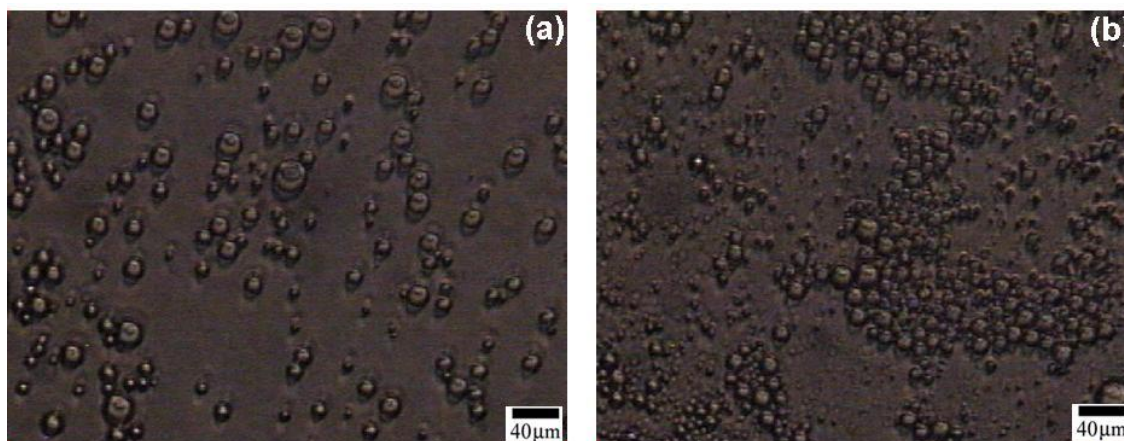


Figura 34- Imagens de microscopia óptica de uma emulsão de HEC contendo 3MMe (a) recém preparada e (b) após 7 dias sob refrigeração, indicando a formação de agregados.

6.2 Micro e Nanocápsulas de Atelocolágeno Marinho/Goma Xantana (ACM)

Como as partículas formadas devem apresentar um alto grau de penetração na pele e uma parede relativamente pouco resistente a fim de permitir a liberação do princípio ativo com relativa facilidade, também foram realizados estudos utilizando-se outro polímero, o atelocolágeno marinho, que possibilita a formação de cápsulas com essas características.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado para a obtenção das microcápsulas de atelocolágeno marinho como constituinte polimérico, exceto que a fase aquosa também continha uma pequena quantidade de goma xantana, que tem como principal objetivo aumentar a estabilidade das cápsulas e evitar a coalescência. A formulação foi processada no ultrassonicador por 10 minutos a fim de promover a formação de nanocápsulas, com diâmetro médio centrado em 400 nm.

Um dos aditivos utilizados para controlar o tamanho das partículas é o tween 20. Assim, um estudo detalhado da influência deste tensoativo no diâmetro das cápsulas foi realizado, variando-se sua concentração na emulsão de 0 a 1,6%. Os histogramas das

emulsões variando-se a concentração de tween 20 são mostrados na Figura 35. Pode-se notar que inicialmente há uma distribuição bastante larga de tamanhos, com um maior número de cápsulas de tamanhos superiores a cerca de 1500 nm (Figura 35a).

A adição do tensoativo, mesmo em baixas concentrações, altera significativamente a curva de distribuição de tamanhos, tornando-a menos dispersa e principalmente, aumentando a população de partículas na região de 500 nm em função da concentração de tween-20, até cerca de 1,0% (Figura 35b-d). Todavia, parece haver uma tendência de aumento do tamanho das partículas na formulação final contendo a maior concentração de tensoativo investigada (Figura 35f), além da formação de cápsulas com diâmetros inferiores a 100 nm. As emulsões preparadas com 1,0 e 1,2% de tween-20 apresentam o perfil desejado de distribuição de tamanho de partículas, visto que a população de cápsulas com diâmetro na faixa de 100 a 1000 nm aumenta consideravelmente, gerando uma distribuição bimodal com máximo em torno de 400 e 850 nm (1,2% tween 20).

Imagens de microscopia óptica também foram obtidas (Figura 36) para as emulsões preparadas com as várias concentrações de tween 20 investigadas. Pode-se acompanhar a redução do tamanho das partículas através da diminuição da população de microcápsulas com diâmetros passíveis de serem observados com o aumento de 900x da lente utilizada. Na ausência e na presença de pequenas quantidades de tween-20, observa-se uma grande população de cápsulas com diâmetros em torno de 15 e 20 μm (Figura 36a-c). Em concentrações maiores que 1,0% (Figura 36d-f), essa população diminui consideravelmente, sendo observadas basicamente cápsulas com tamanhos próximos a 5 μm como sendo as maiores partículas da emulsão.

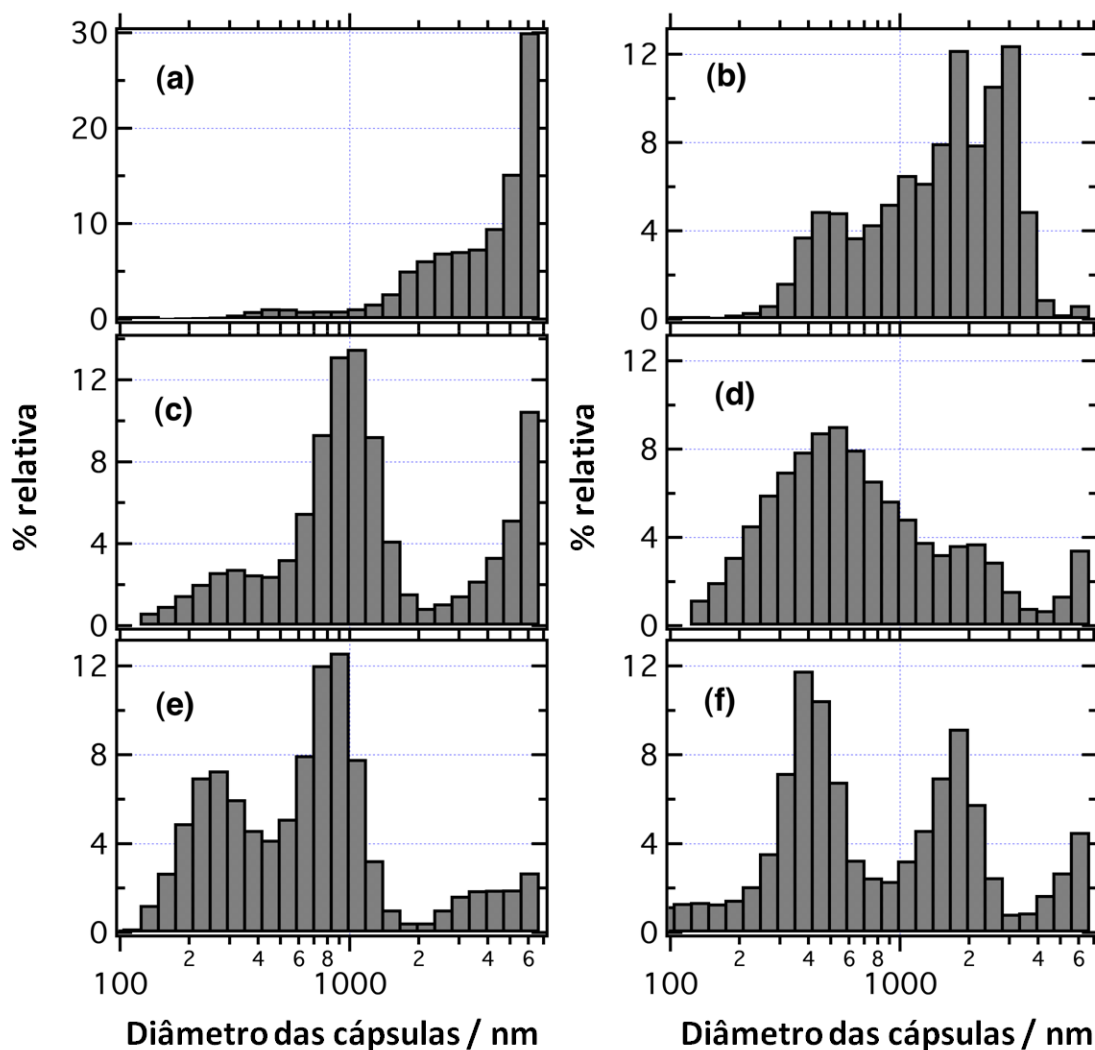


Figura 35- Distribuição de tamanho das cápsulas de ACM, submetidas a 10 minutos de ultrassonicação (Potência = 100 kJ.s^{-1}), nas concentrações de tween 20 de (a) 0, (b) 0,4, (c) 0,8, (d) 1,0, (e) 1,2 e (f) 1,6%.

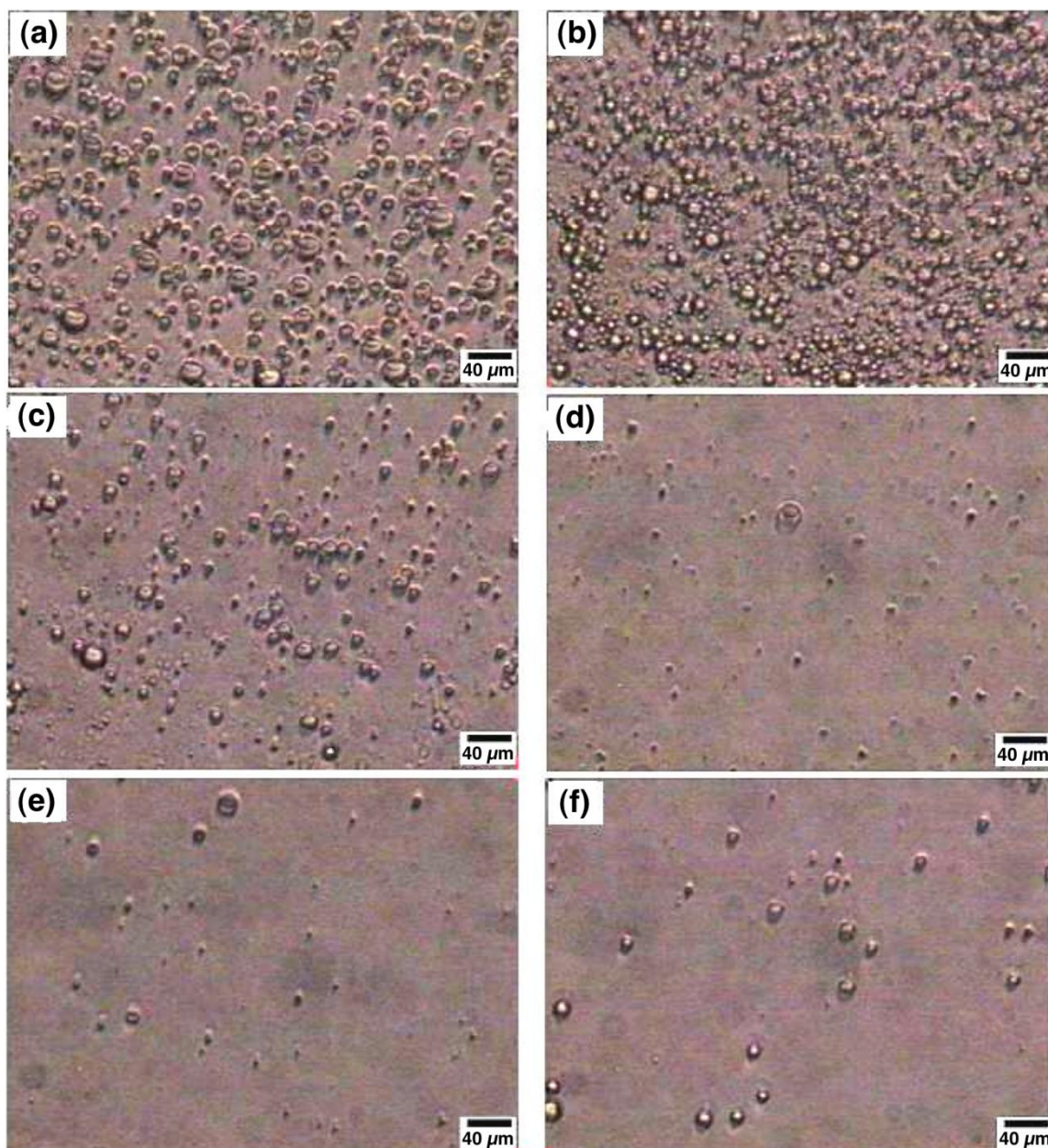


Figura 36- Microscopias óticas das cápsulas de ACM, submetidas a 10 minutos de ultrassonicação (Potência = 100 kJ.s^{-1}), nas concentrações de tween 20 de (a) 0, (b) 0,4, (c) 0,8, (d) 1,0, (e) 1,2 e (f) 1,6%.

A distribuição de tamanhos das cápsulas com diâmetros superiores a 100 nm, e maior população de partículas com tamanhos inferiores a 1000 nm foi tomada como padrão para a preparação das emulsões que serão posteriormente utilizadas nos estudos de interação com

estruturas biológicas e respectiva eficiência fotodinâmica. Dessa forma, a concentração de tween 20 tomada como padrão foi de 1,2% (Figura 36e).

Imagens de Microscopia Confocal, acoplada ao modo de fluorescência permitiram detectar a presença da porfirina 3MMe no interior das cápsulas como mostrado nas Figura 37b e 37c. Estas duas imagens foram obtidas para a mesma emulsão, apenas em dois diferentes modos de visualização. Da mesma maneira que realizado anteriormente, a imagem foi obtida focando-se nas partículas maiores para uma melhor visualização. Na Figura 37a tem-se uma imagem confocal obtida para uma formulação preparada nas mesmas condições, mas sem a presença do fotossensibilizador, e submetida à excitação no mesmo comprimento de onda de 488 nm, mostrando a ausência de emissão na emulsão preparada sem o corante. As lâminas foram preparadas utilizando-se o mesmo procedimento empregado para as cápsulas de HEC.

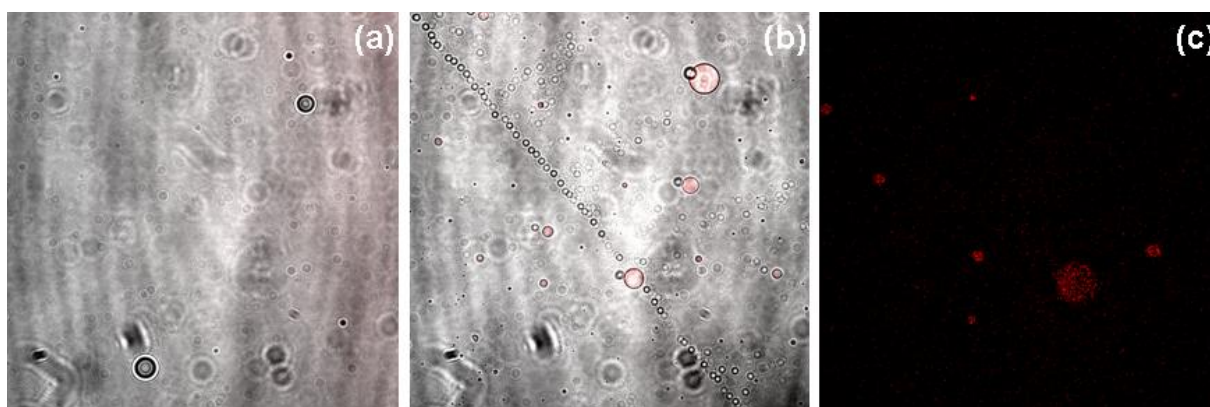


Figura 37- Imagens de Microscopia Confocal de fluorescência, de microcápsulas de ACM (a) sem porfirina; (b) e (c) contendo $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ Mol.L}^{-1}$ de 3MMe, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$.

Espectros de fluorescência também foram obtidos utilizando-se emulsões igualmente diluídas, onde se observou que a porfirina encontra-se predominantemente na forma monomérica, pois a intensidade de emissão aumenta consideravelmente após processamento

por ultrassonicação, como mostrado na Figura 38. Sabe-se que a presença de agregados, mesmo em pequena extensão pode resultar em uma diminuição da intensidade de emissão de derivados porfirínicos. Assim, estes resultados indicam, provavelmente, que a quebra de cápsulas maiores em partículas menores promove uma certa diluição pelo aumento da área superficial interna das cápsulas e a diminuição da concentração de pequenos clusters de associação (provavelmente de dímeros), resultando no aumento da fluorescência.

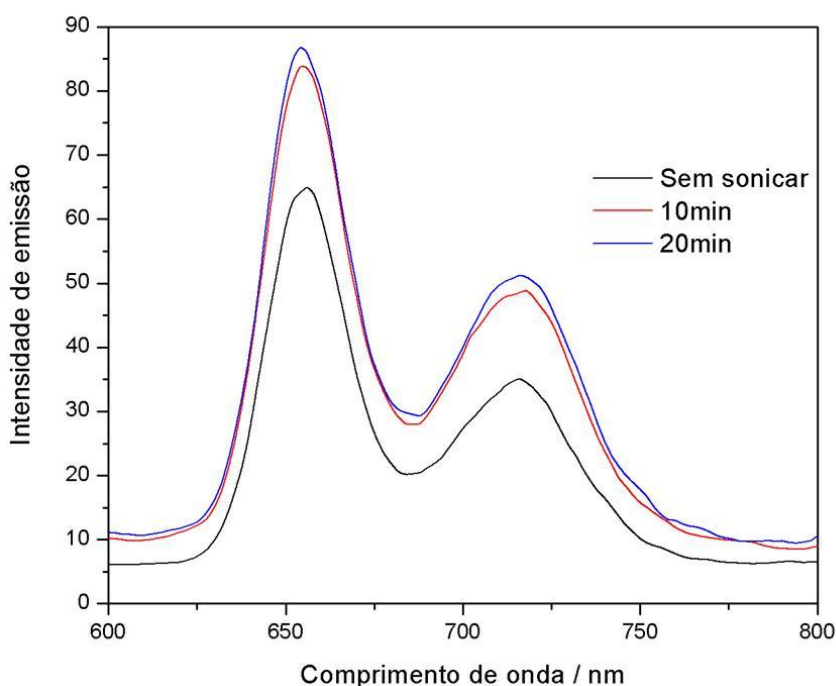


Figura 38- Espectros de emissão obtidos para uma emulsão contendo 1,2% de tween 20, antes e após ser submetida a processamento por ultrassonicação por 10 minutos (linha vermelha) e 20 minutos (linha azul); $\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$.

6.3 Conclusões Parciais

A porfirina 3MMe foi encapsulada em partículas poliméricas de hidroxietilcelulose e

atelocolágeno marinho/goma xantana, utilizando-se o método de coacervação, sendo que a presença do Fs no interior de ambas as cápsulas foi comprovada através de microscopia de fluorescência confocal. Foram obtidas, inicialmente, formulações apresentando basicamente partículas com diâmetros maiores que 1 μm , sendo que nanocápsulas também foram obtidas quando as emulsões foram submetidas à ultrassonicação.

Estudos sistemáticos da influência do tempo de ultrassonicação e da concentração de tensoativo também foram realizados, indicando que estes são dois fatores fundamentais para o controle de tamanho das cápsulas. Verificou-se, por meio de espalhamento dinâmico de luz e microscopia óptica, que o diâmetro das cápsulas preparadas tende a diminuir com o aumento da concentração de tween 20 na emulsão e o aumento do tempo de ultrassonicação.

Uma avaliação da eficiência fotodinâmica dos derivados porfirínicos nanoencapsulados nos dois sistemas poliméricos descritos foi realizada e os resultados desses estudos serão apresentados no próximo capítulo.

Capítulo 7. Atividade Fotodinâmica

7. Atividade Fotodinâmica

Neste capítulo serão apresentados resultados referentes aos estudos de atividade fotodinâmica dos derivados porfirínicos sintetizados, encapsulado em micro e nanocápsulas poliméricas de ACM e HEC. De uma forma mais detalhada, deu-se início aos estudos de fotoatividade com partículas poliméricas contendo a meso-(3-N-metil piridínio)(trifenil)porfirina, 3MMe, cuja estrutura e espectro de absorção são novamente apresentados na Figura 39.

Considerando-se que a primeira etapa a ser realizada no sentido de entender como uma determinada droga irá agir em um organismo vivo comumente envolve estudos em culturas celulares, a atividade fotodinâmica da porfirina 3MMe (a que apresentou o maior rendimento quântico de formação de oxigênio singlete) foi avaliada, através de experimentos utilizando-se culturas de células HeLa, uma linhagem celular proveniente de câncer cervical. Estes estudos *in vitro*, comparados aos estudos com animais, são mais baratos e mais fáceis de controlar e reproduzir, dando informações importantes sobre a atividade da droga em questão, que são de extrema importância para a realização de posteriores testes *in vivo*. [115] Estes estudos foram realizados no Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces, sob a orientação do prof. Dr. Maurício da Silva Baptista.

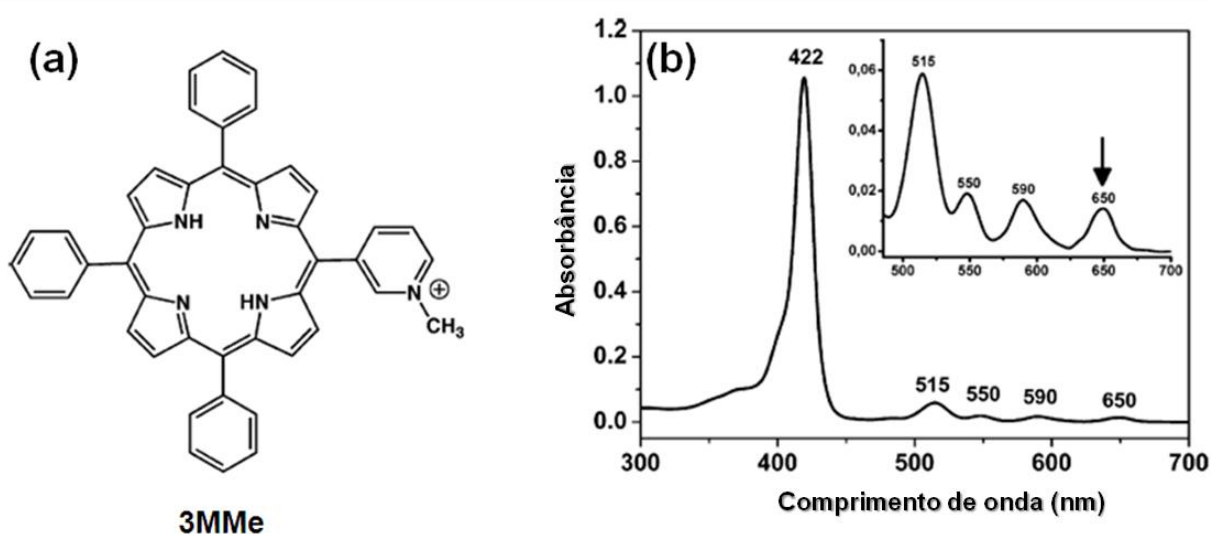


Figura 39- (a) Estrutura da porfirina 3MMe e (b) seu espectro de absorção. No detalhe, o espectro expandido da região entre 500 e 700 nm, com indicação para as quatro bandas Q da porfirina.

7.1 Cito e Fototoxicidade da Porfirina 3MMe Encapsulada em Micro e Nanocápsulas de ACM

Uma avaliação da toxicidade e fototoxicidade das cápsulas de ACM contendo a porfirina 3MMe incorporada, foi realizada através da incubação das células HeLa com a formulação, diluída cerca de 100 vezes em meio de cultura DMEM incolor ($[3MMe]_{\text{final}} = 1,0 \times 10^{-6} \text{ Mol.L}^{-1}$), durante três horas. Neste estudo inicial, avaliou-se também qual seria a toxicidade da formulação, preparada sem a porfirina, na ausência e na presença de luz. Como fonte de irradiação, utilizou-se um laser vermelho ($\lambda = 650 \text{ nm}$), comprimento de onda este coincidente com a banda Q de menor energia da porfirina, indicada pela seta no detalhe da Figura 39b. Como se observa na Figura 40, as micro e nanocápsulas preparadas sem a porfirina 3MMe e com o pigmento fotoativo não apresentaram toxicidade (no escuro) perante as células HeLa (experimentos A e B, respectivamente). Entretanto, quando irradiadas de

forma intermitente durante 10 minutos, as cápsulas preparadas sem a porfirina não apresentaram nenhuma fototoxicidade (experimento C). Entretanto a formulação polimérica contendo a porfirina encapsulada apresentou elevada fotoatividade, resultando em uma taxa de morte celular em torno de 60% (experimento D) quando comparada ao experimento controle.

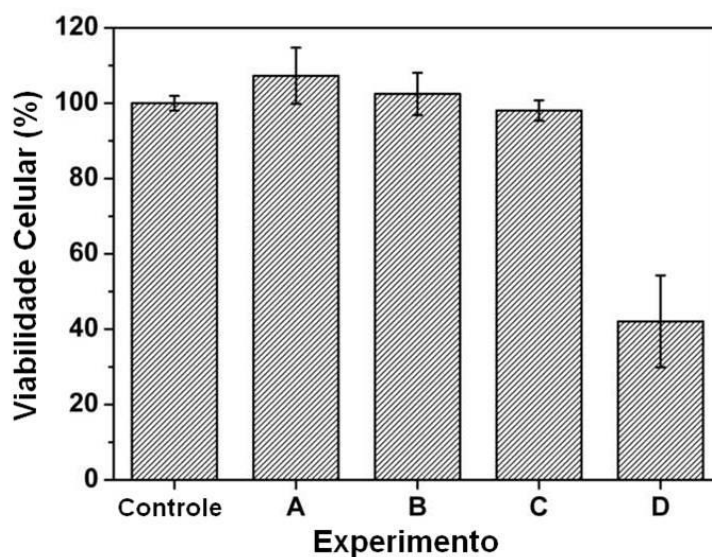


Figura 40- Percentagem de células viáveis após 3 horas de incubação, na ausência (**controle**) e presença de cápsulas poliméricas de ACM sem o composto fotoativo (**A** e **C**) e contendo $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de 3MMe (**B** e **D**); não irradiadas (**A** e **B**); e irradiadas em 650 nm (**C** e **D**).

Alguns fatores podem influenciar fortemente a ação de um agente terapêutico em linhagens celulares, como o tempo de incubação e de irradiação. Assim, realizou-se alguns experimentos, onde se analisou a influência do tempo de incubação e de irradiação na fototoxicidade da formulação polimérica, utilizando-se tempos fixos de irradiação (10 minutos) e de incubação (3 horas), respectivamente. Na Figura 41 são apresentados os resultados de cito e fototoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em tempos mais longos de

incubação. Como pode ser observado, a formulação polimérica não se mostrou tóxica, mesmo quando incubada durante 9 horas. Em contrapartida, a atividade fotodinâmica aumentou consideravelmente de acordo com o tempo de incubação, alcançando uma taxa de morte celular de cerca de 90% no tempo máximo investigado, como observado na Figura 42a.

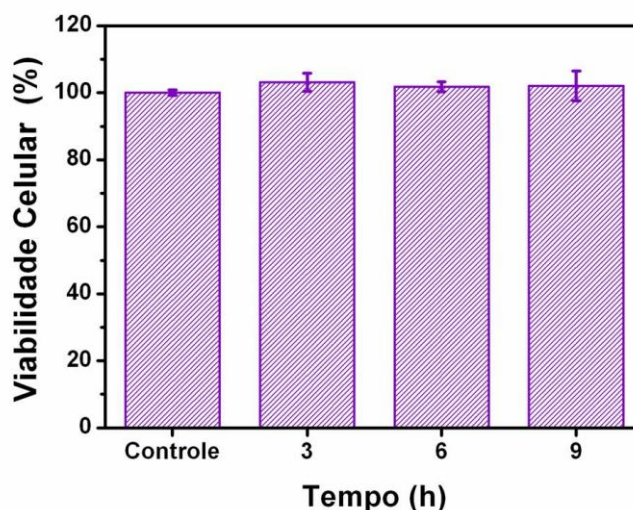


Figura 41- Influência do tempo de incubação na citotoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em ACM. $[3MMe] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

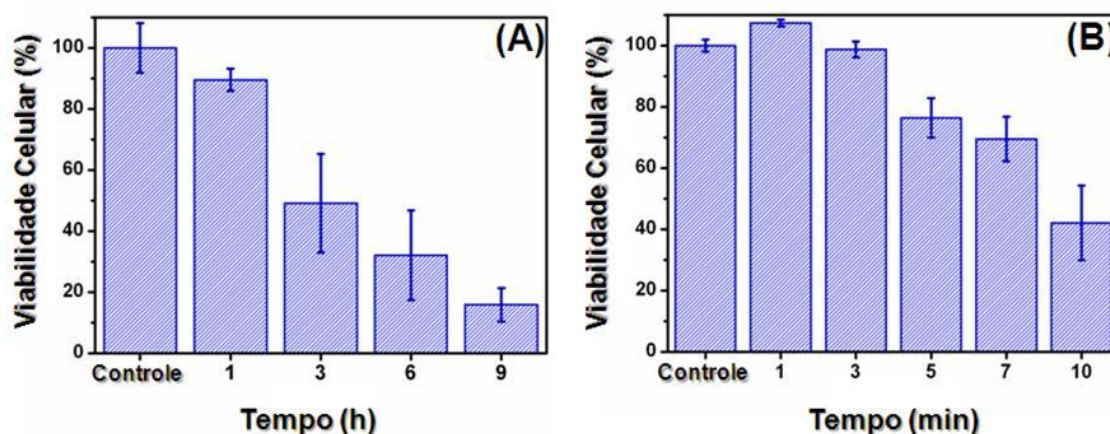


Figura 42- Influência do tempo de incubação (A) e do tempo de irradiação (B) na fototoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em ACM. $[3MMe] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Em (A) tempo de irradiação= 10 minutos ($\lambda = 650 \text{ nm}$); em (B) tempo de incubação= 3 horas.

Outro fator determinante da viabilidade celular foi o tempo de irradiação. Como apresentado na Figura 42b, uma taxa significativa de morte celular só é observada quando as células são irradiadas por mais de 5 minutos, de forma que no maior tempo investigado (10 minutos), a viabilidade celular é inferior a 50%.

7.2 Cito e Fototoxicidade da Porfirina 3MMe Encapsulada em Micro e Nanocápsulas de HEC

De forma análoga às micro e nanocápsulas de ACM, uma série de experimentos também foi realizada no sentido de avaliar a potencial aplicação da formulação polimérica de HEC, contendo a porfirina 3MMe encapsulada, em TFD. Os resultados apresentados na Figura 43 revelaram que essa formulação, assim como a anterior, não apresenta citotoxicidade (experimentos A e B), mesmo quando o composto fotoativo se encontra incorporado nas partículas. A irradiação dos poços de células incubadas com a porfirina encapsulada com um laser vermelho, resultou em uma diminuição da viabilidade celular em torno de 15% como pode ser observado no experimento D, cerca de 4 vezes menor que as cápsulas de ACM, indicando que nessa formulação polimérica a eficiência fotodinâmica da porfirina 3MMe é bastante reduzida. Nos poços de células incubadas com a formulação polimérica preparada sem a adição da 3MMe e irradiadas, não foi observada uma taxa de morte celular significativa (experimento C).

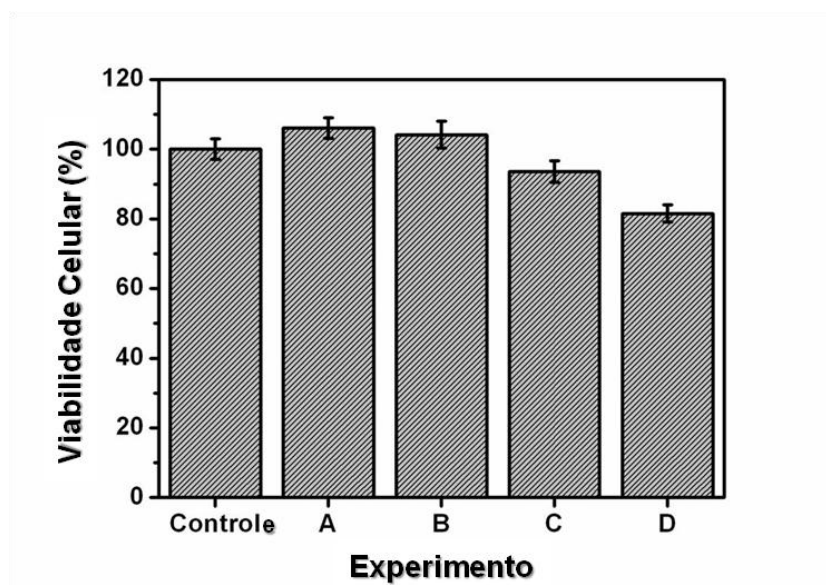


Figura 43- Porcentagem de células viáveis após 3 horas de incubação, na ausência (**controle**) e presença de cápsulas poliméricas de HEC sem o composto fotoativo (**A e C**) e contendo $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de 3MMe (**B e D**); não irradiadas (**A e B**); e irradiadas em 650 nm (**C e D**).

Ao contrário das micro e nanocápsulas de ACM que não apresentaram toxicidade mesmo quando tempos longos de incubação foram empregados (Figura 41), a formulação de HEC também apresentou uma citotoxicidade crescente com o aumento do tempo de incubação como mostrado na Figura 44. A viabilidade celular decresce até cerca de 70% quando as células são incubadas por 9 horas no escuro com as partículas de HEC contendo o pigmento fotoativo.

A fototoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em HEC aumenta significativamente em função do aumento do tempo de incubação, como pode ser observado na Figura 45a. Uma taxa de morte celular de cerca de 50% é atingida quando as células são incubadas com as partículas durante 9 horas. Entretanto, a fotoatividade observada é inferior à apresentada pela formulação de ACM, onde a viabilidade celular é reduzida em mais de 80% em 9 horas de incubação (Figura 42a). Quando investigou-se o tempo de irradiação na fotoatividade da 3MMe encapsulada em HEC (Figura 45b), observou-se que a taxa de morte celular aumenta

com o tempo de irradiação de forma semelhante ao observado para a formulação de ACM (Figura 42b), mas atingindo valores inferiores aos anteriormente observados para as cápsulas do outro material polimérico.

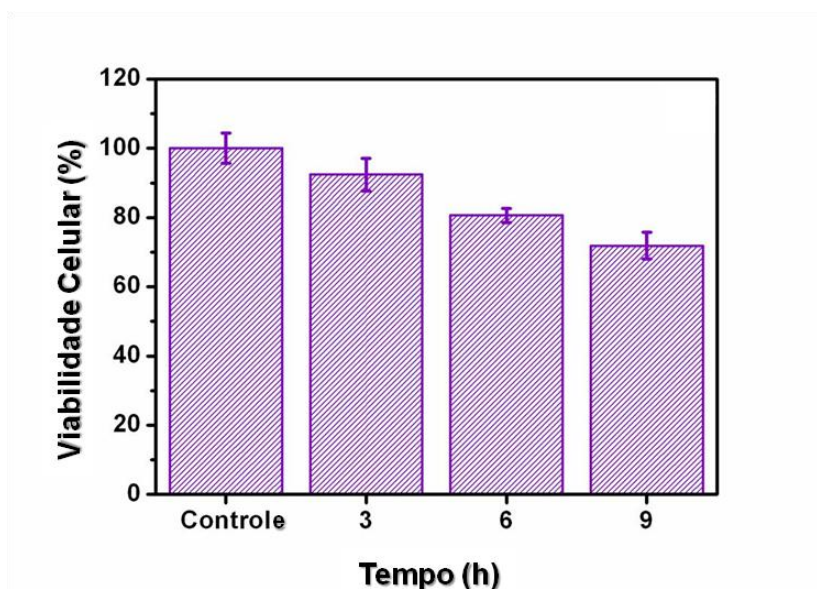


Figura 44- Influência do tempo de incubação na citotoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em micro e nanocápsulas de HEC. $[3MMe] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

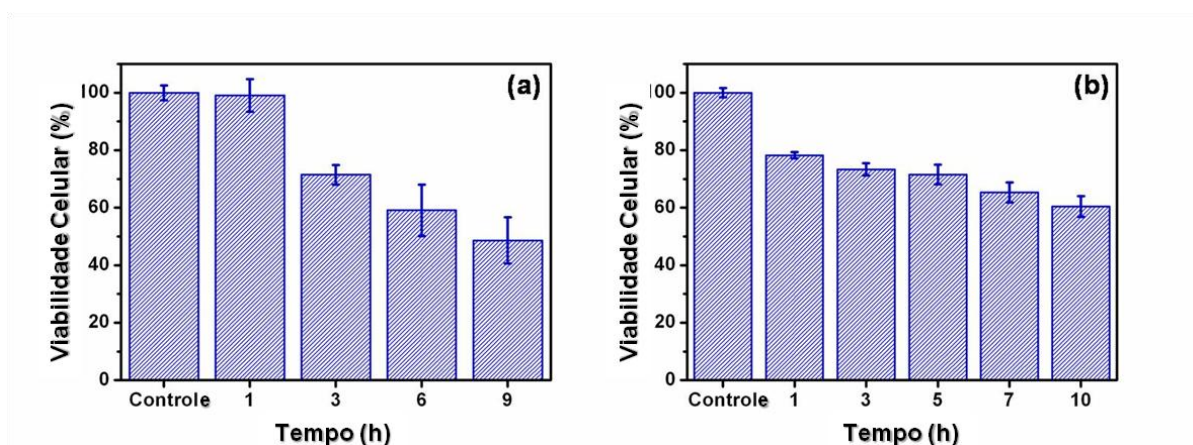


Figura 45- Influência do tempo de incubação (a) e do tempo de irradiação (b) na fototoxicidade da porfirina 3MMe encapsulada em micro e nanocápsulas de HEC. $[3MMe] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Em (a) tempo de irradiação= 10 minutos ($\lambda = 650 \text{ nm}$); em (b) tempo de incubação= 3 horas.

Os resultados de um experimento comparativo realizado com as duas formulações poliméricas desenvolvidas, contendo o composto fotoativo 3MMe encapsulado, são comparados na Figura 46. Neste caso, pode-se observar claramente que as micro/nanocápsulas de HEC apresentam uma citotoxicidade significativa, reduzindo em torno de 20% a viabilidade celular (experimento B), quando comparadas às partículas de ACM (experimento A). Os melhores resultados com relação à atividade fotodinâmica da porfirina 3MMe foram observados com a aplicação da formulação de ACM, onde a taxa de morte celular observada foi duas vezes maior (experimento C) em relação a aplicação das partículas de HEC (experimento D), levando-se em consideração os efeitos citotóxicos da formulação de HEC.

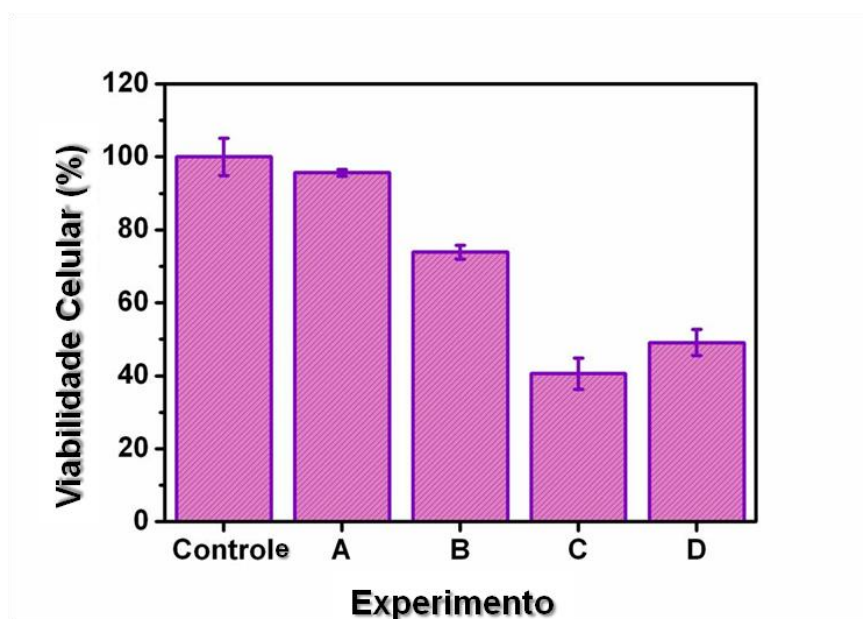


Figura 46- Viabilidade celular observada após 3 horas de incubação, na ausência (**controle**) e presença de cápsulas poliméricas de ACM (**A** e **C**) e de HEC (**B** e **D**). Experimentos **A** e **B** realizados no escuro; e experimentos **C** e **D** realizados na presença de radiação vermelha (650 nm). $[3MMe] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

7.3 Nanocápsulas Poliméricas vs Lipossomas

No sentido de comparar as nanocápsulas poliméricas desenvolvidas com outro sistema de carregamento de drogas, foram realizados alguns estudos com lipossomas. Os lipossomas são sistemas altamente versáteis, constituídos de vesículas uni- ou multilamelares que permitem a incorporação tanto de drogas hidrofílicas quanto hidrofóbicas. Os principais constituintes dos lipossomas são fosfolipídeos e colesterol, o que os torna biocompatíveis e de grande interesse na área farmacêutica.[55]

No caso particular da TFD, diversos estudos têm relatado a eficiência dessas partículas lipídicas como carreadoras de Fs's. O exemplo mais bem sucedido é o Visudyne®, que é uma formulação lipossomal contendo uma benzoporfirina incorporada. Ele foi desenvolvido pela empresa QLT do Canadá e aprovado pela FDA nos Estados Unidos e Suíça para ser utilizado no tratamento da degeneração macular da retina por TFD. [19]

Assim, uma formulação lipossomal de fosfatidilcolina (FC), contendo a porfirina 3MMe incorporada na mesma concentração utilizada nas nanocápsulas poliméricas, foi desenvolvida. Os lipossomas foram preparados através da dispersão do filme lipídico, formado após a evaporação do solvente orgânico (CHCl_3 , utilizado para solubilizar a FC e a porfirina), em meio de cultura DMEM incolor. O diâmetro médio dos lipossomas preparados nessa etapa foi de cerca de 1000 nm, de maneira que, a fim de se obter partículas com diâmetros semelhantes às nanocápsulas, a formulação lipídica foi submetida à ultrassonicação por 10 minutos, nas mesmas condições empregadas para as formulações poliméricas. Após a ultrassonicação, a dispersão se tornou mais translúcida indicando a presença de partículas menores. O histograma da formulação lipídica, obtido por EDL, é mostrado na Figura 47, onde pode-se observar a presença de partículas com diâmetro médio em torno de 100 nm.

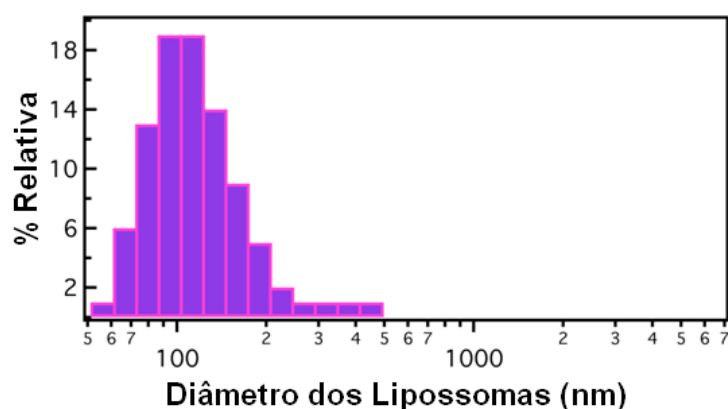


Figura 47- Histograma de distribuição de tamanho das partículas de lipossomas de FC.

Os resultados de cito e fototoxicidade da porfirina 3MMe quando encapsulada em partículas poliméricas de ACM e HEC e em lipossomas é apresentado na Figura 48. Pode-se observar que as partículas lipídicas não apresentam uma citotoxicidade significativa (experimentos B). Entretanto, a ação fotodinâmica do derivado porfirínico na formulação polimérica de ACM e HEC foi, respectivamente, 4 e 2,5 vezes maior do que a mesma porfirina incorporada na formulação lipossomal.

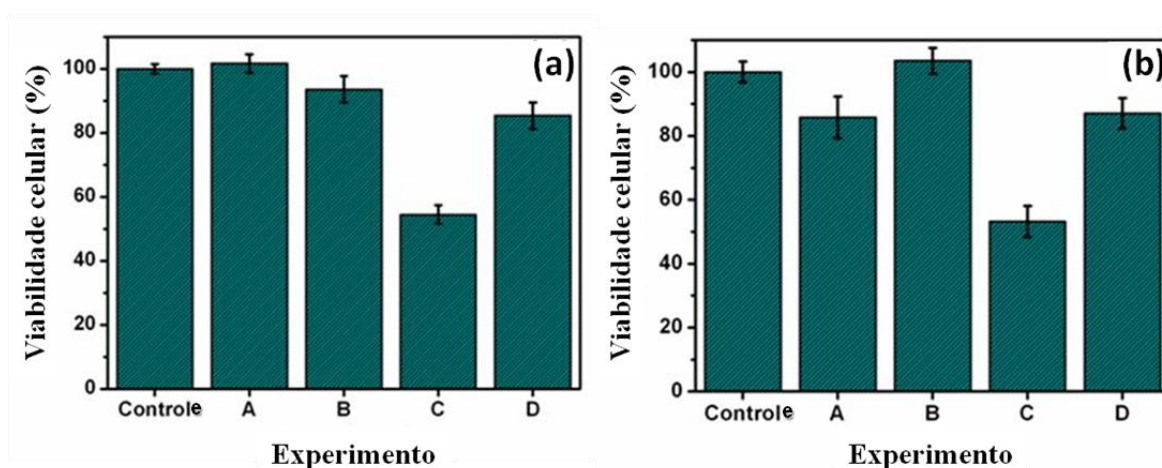


Figura 48- Comparação da citotoxicidade (A e B) e fototoxicidade (C e D) das formulações poliméricas de (a) ACM e (b) HEC com a formulação lipídica de FC. Experimentos A e C realizados com as micro/nanocápsulas poliméricas; e experimentos B e D realizados com os lipossomas de FC. $[3MMe] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Em C e D irradiação em 650 nm.

7.4 Taxa de Incorporação Celular

A incorporação da porfirina 3MMe em células HeLa foi investigada através da incubação das células com o composto fotoativo encapsulado nos sistemas poliméricos e em lipossomas de FC, a fim de compreender os possíveis fatores responsáveis pelas diferenças de fotoatividade observadas.

A técnica de espectrofotometria de absorção é comumente utilizada nestes experimentos para avaliar a incorporação de drogas. Entretanto, como se trata de um sistema particulado, a quantificação da absorção de luz pela porfirina fica comprometida em virtude do espalhamento provocado pelas partículas. Assim, utilizou-se a técnica de fluorescência para avaliar a incorporação de 3MMe, visto que esse derivado porfirínico exibe uma elevada fluorescência na região do vermelho.

Inicialmente, registrou-se o espectro de emissão para as formulações poliméricas e lipídica, diluídas em meio de cultura incolor, de forma a obter soluções com concentração de porfirina na faixa de $1,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ Mol.L⁻¹. Registrou-se a intensidade de emissão em 655 nm (comprimento de onda máximo de emissão) para todas as soluções, de maneira que, nos três sistemas avaliados, verificou-se uma excelente correlação linear ($R = 0,999$) em função da concentração do derivado porfirínico. A Figura 49 apresenta as curvas de intensidade de emissão vs concentração para os dois sistemas poliméricos desenvolvidos, onde pode-se observar que a técnica pode ser empregada para a determinação da taxa de incorporação da porfirina 3MMe nas células.

A incorporação em células HeLa do derivado porfirínico encapsulado em ACM (pontos em verde) e em HEC (pontos em vermelho), calculada através da Equação 4, também segue um perfil linear, aumentando significativamente com o tempo de incubação, como mostrado na Figura 50. De acordo com os resultados apresentados anteriormente (Figura 42a

e Figura 45a), a viabilidade celular diminui com o aumento do tempo de incubação, de forma que a eficiência fotodinâmica em tempos mais longos de incubação deve ser resultado da maior quantidade de Fs incorporada nas células.

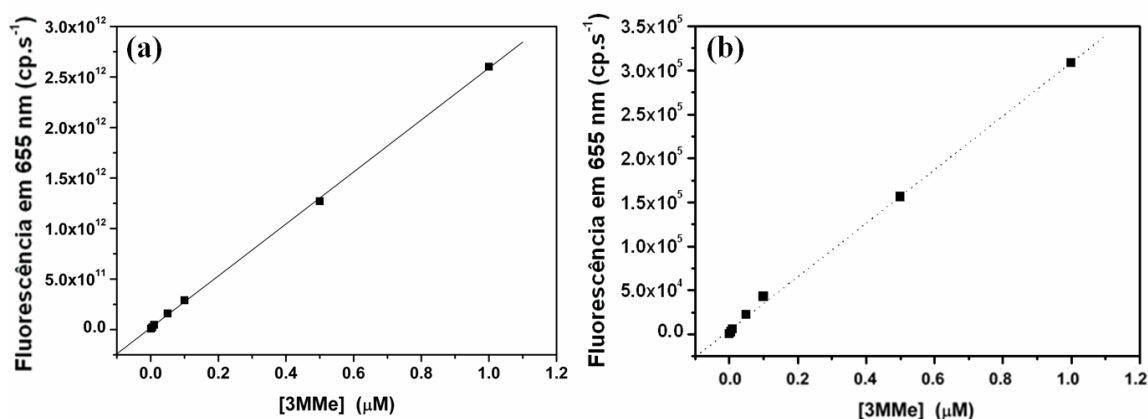


Figura 49- Intensidade de fluorescência em 655 nm (em contagem de fótons por segundo, cp.s⁻¹) em função da concentração de 3MMe, na faixa de $1,0 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, para as formulações poliméricas de (a) ACM e (b) HEC. $\lambda_{exc}=417$ nm. As amostras foram diluídas em meio de cultura DMEM incolor.

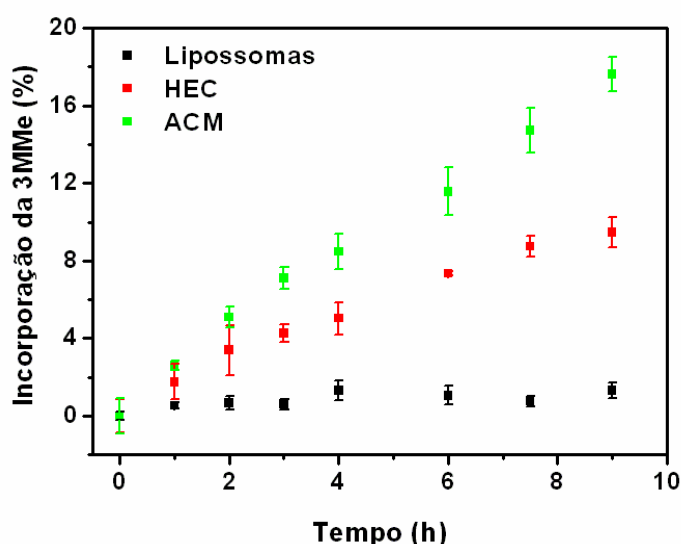


Figura 50- Percentagem de incorporação da porfirina 3MMe em células HeLa, em função do tempo de incubação, para as formulações poliméricas de HEC e ACM e para a formulação lipídica de FC. Concentração de 3MMe nas formulações= $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

Na Figura 50 também são apresentados os resultados referentes à incorporação da porfirina 3MMe quando em lipossomas (pontos em preto), onde observa-se uma taxa de incorporação significativamente inferior em relação às formulações poliméricas. Tais resultados indicam que provavelmente a baixa taxa de morte celular observada com a aplicação da formulação lipídica (dados apresentados na Figura 48) é resultado da baixa incorporação da porfirina contida nos lipossomas de FC, ao passo que a maior fototoxicidade das cápsulas de ACM deve estar relacionada à sua maior taxa de incorporação nas células.

Os resultados apresentados até o momento sugerem que a porfirina 3MMe encapsulada em ACM apresenta maior fotoatividade, além de não apresentar nenhuma toxicidade nas condições avaliadas. Em contrapartida, as nanocápsulas de HEC, além de apresentarem uma toxicidade significativa, diminuiu significativamente a fotoatividade da 3MMe. Desse modo, os estudos foram estendidos para o restante da série de derivados porfirínicos sintetizada, encapsulando-os no sistema polimérico de ACM, em virtude dos melhores resultados obtidos.

7.5 Cito e Fototoxicidade dos Derivados Porfirínicos Sintetizados Encapsulados em ACM

Oito formulações poliméricas de ACM, contendo as respectivas porfirinas da série apresentada na Figura 14, foram preparadas utilizando o método de coacervação, conforme procedimento já descrito anteriormente. Essas emulsões foram preparadas de forma a apresentar a mesma concentração de porfirina, $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Células HeLa, na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/poço, foram incubadas com as formulações (diluídas 100 vezes em meio de cultura DMEM incolor) durante 6 horas, no escuro, a fim de avaliar uma possível citotoxicidade desses sistemas. Pode-se observar na Figura 51 que não houve

decréscimo significativo da viabilidade celular em nenhum dos casos, indicando que não há evidência de toxicidade na ausência de luz, conforme já havia sido observado para o caso da porfirina 3MMe. Os resultados foram obtidos por meio da comparação da viabilidade celular de todos os experimentos realizados com um experimento controle, onde as formulações poliméricas não foram empregadas.

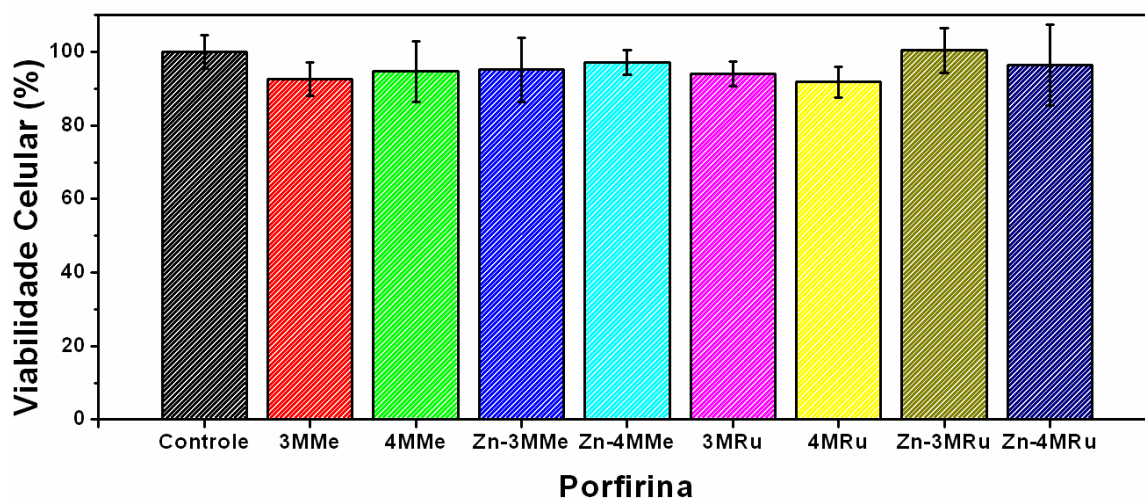


Figura 51- Percentagem de células viáveis após 6 horas de incubação, na ausência (**controle**) e presença de cápsulas poliméricas de ACM contendo os 8 compostos fotoativos na concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Experimento realizado na ausência de irradiação.

Quando irradiadas por 10 minutos com um laser vermelho, com comprimento de onda de 650 nm, observou-se um decréscimo significativo da viabilidade celular. Essa fototoxicidade foi avaliada após 6 horas de incubação, inicialmente com as formulações contendo as porfirinas base-livre (sem a presença do íon metálico Zn(II) no centro do anel). Observa-se que a taxa de morte celular chegou a cerca de 90% quando as células foram incubadas com a emulsão contendo a porfirina 4MMe, como mostrado na Figura 52 onde esses resultados são apresentados. De forma geral, as duas porfirinas tendo grupos metilpiridínio na periferia do anel foram mais eficientes que os respectivos derivados de

complexo de rutênio. Com relação à posição de ligação do substituinte metil ou do complexo bis-piridina rutênio (II) em *meta* ou *para* (posições 3 e 4, respectivamente), os valores de viabilidade celular apresentaram-se bem próximos, indicando que não exerce grande influência na fotoatividade da formulação polimérica.

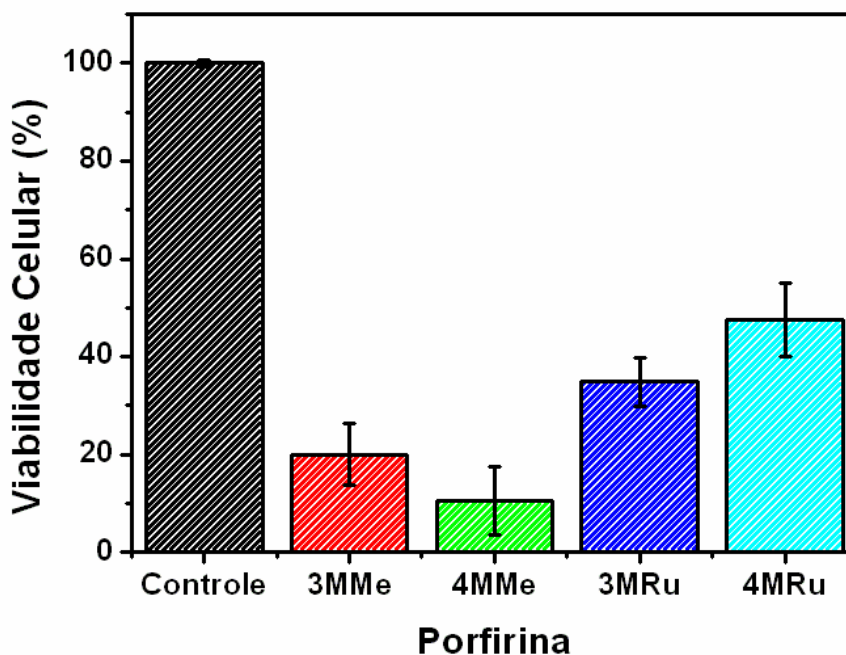


Figura 52- Comparação da fototoxicidade das porfirinas base-livre ($1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹) encapsuladas em ACM, perante células HeLa. As células foram incubadas durante 6 horas e o tempo de irradiação, em 650 nm, foi de 10 minutos.

O espectro eletrônico das porfirinas exibe uma banda intensa na região de 400 a 450 nm, denominada banda Soret. Na região entre 500 e 700 nm as porfirinas exibem outras bandas de menor intensidade chamadas de bandas Q. Porfirinas base livre apresentam uma banda de absorção em torno de 650 nm, correspondente a banda Q de menor energia dos espectros em linha preta apresentados na Figura 21 (compostos metilados) e Figura 24 (porfirinas com complexo de rutênio), que coincide com o comprimento de onda do laser vermelho utilizado nos experimentos. Entretanto, os derivados porfirínicos metalados

(espectros de linha vermelha nas mesmas figuras citadas anteriormente) apresentam somente duas bandas Q, cujos máximos de absorção estão em comprimentos de onda menores que 650 nm. Tal fato restringiu a utilização do laser vermelho, empregado no experimento da Figura 52, no caso das metaloporfirinas. Como alternativa, utilizou-se uma fonte de luz branca, constituída de duas lâmpadas de mercúrio, cujo espectro de emissão é mostrado na Figura 53.

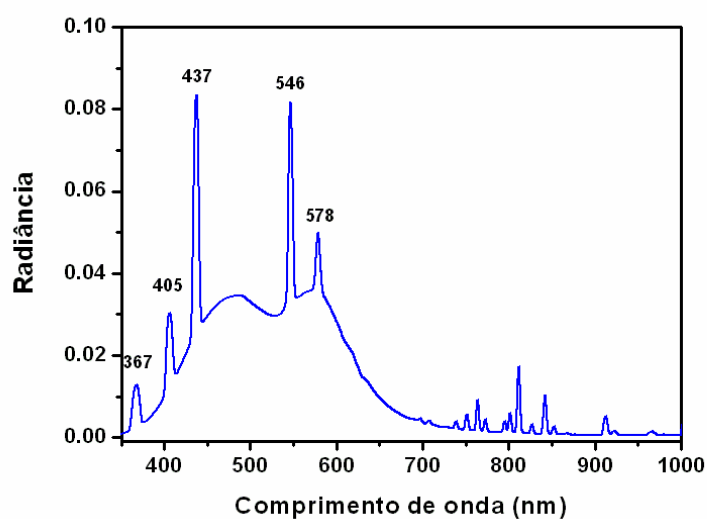


Figura 53- Espectro da lâmpada de Hg utilizada nos experimentos de fotoatividade.

As placas contendo as formulações de porfirinas metaladas foram então irradiadas com essa fonte de luz, durante 1 hora, com densidade de potência de 16 mW/cm^2 , e os resultados são apresentados na Figura 54. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre a fotoatividade dos derivados metalados (Figura 54a), sendo que todos causaram uma redução da viabilidade celular em cerca de 50%.

Para fins de comparação, as emulsões de porfirinas base-livre também foram irradiadas com essa fonte de luz branca e os resultados estão apresentados na Figura 54b. Foi verificado o mesmo perfil de morte celular observado anteriormente (Figura 52) com a irradiação com laser vermelho: as porfirinas metiladas apresentaram uma maior fotoatividade que os derivados de complexo de $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$.

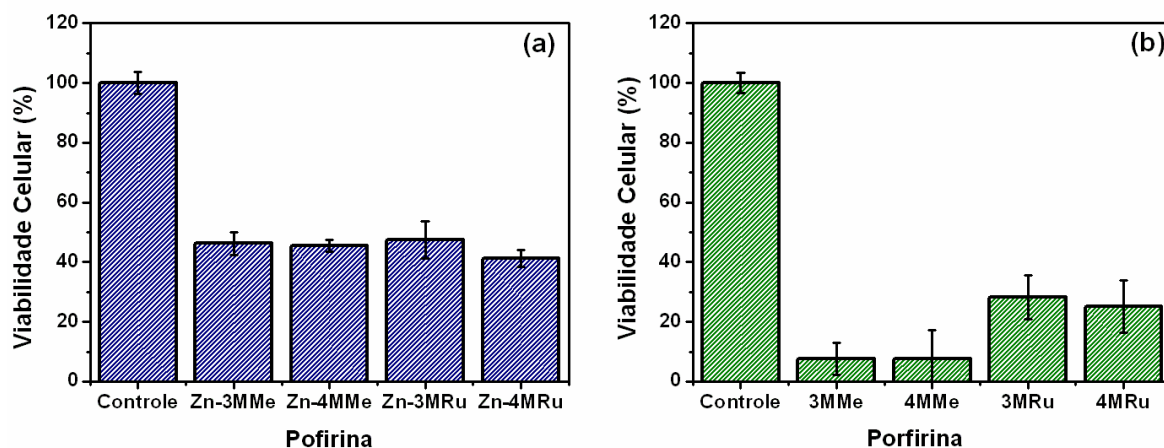


Figura 54- Viabilidade celular após 6 horas de incubação das células HeLa com as (a) metaloporfirinas e (b) porfirinas base-livre encapsuladas em ACM. Irradiação com fonte de luz branca por 60 minutos. $[porfirina] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de eficiência fotodinâmica dos derivados porfirínicos encapsulados em ACM, que foram extraídos dos resultados apresentados na Figura 54, e novamente os respectivos valores de rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, apresentados no item 7.5. Como relatado anteriormente, as porfirinas 3MMe e 4MMe foram as que apresentaram a maior eficiência fotodinâmica, o que parece ser resultante dos maiores valores de ϕ_{Δ} observados. Entretanto, embora os dois derivados base-livre metilados apresentem uma fotoatividade semelhante, os valores de ϕ_{Δ} são significativamente diferentes entre si. A porfirina 3MMe apresenta um ϕ_{Δ} de 0,79, enquanto para a 4MMe esse valor é de 0,55, sugerindo que processos de auto-agregação desse fotossensibilizador podem estar causando essa diminuição na eficiência de produção de $^1\text{O}_2$. Tal fato pode ser facilmente compreendido se fatores estruturais forem levados em consideração. No caso da porfirina 3MMe, a disposição do grupo metila para fora do plano do anel porfirínico dificulta o processo de agregação, o que não ocorre no caso da 4MMe onde o grupo metila, além de ser relativamente pequeno, se encontra no mesmo plano do anel, não

provocando um impedimento estérico significativo para inibir a agregação. Os valores similares de fototoxicidade observados sugerem que, uma vez no meio intracelular, a desagregação da porfirina 4MMe pode ocorrer, em virtude da associação com biomoléculas presentes, tornando sua eficiência em gerar $^1\text{O}_2$ maior que em solução.

Tabela 9- Rendimentos quânticos de formação de $^1\text{O}_2$, ϕ_Δ , tempos de vida τ (em CHCl_3) e eficiências fotodinâmicas ϕ_{EF} perante células HeLa, dos oito derivados porfirínicos sintetizados. TPP utilizada como padrão.

Porfirina	ϕ_Δ (DP)	τ (μs) (DP)	ϕ_{EF} (%)
TPP	0,50	183,4 (4,2)	
3MMe	0,79 (0,04)	163,2 (3,1)	92,3
4MMe	0,55 (0,02)	160,2 (2,6)	92,3
3MRu	0,50 (0,02)	161,1 (4,7)	71,9
4MRu	0,51 (0,03)	162,6 (1,4)	74,9
Zn-3MMe	0,40 (0,01)	140,6 (7,5)	54,0
Zn-4MMe	0,48 (0,03)	138,9 (5,0)	54,5
Zn-3MRu	0,40 (0,03)	139,3 (2,6)	53,0
Zn-4MRu	0,36 (0,02)	144,7 (3,4)	58,8

A presença de complexos de rutênio na periferia do anel (porfirinas 3MRu e 4MRu) não alterou significativamente o tempo de vida do $^1\text{O}_2$, entretanto o rendimento quântico de formação dessa espécie foi significativamente reduzido em relação às espécies metiladas, sendo responsável, provavelmente, pela diminuição na eficiência fotodinâmica observada. A metalação das porfirinas com Zn(II) ocasionou uma redução significativa tanto no tempo de vida, quanto no ϕ_Δ o que provavelmente resultou na menor eficiência fotodinâmica de toda a série

sintetizada. Esses resultados indicam que tanto a presença de complexos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$ quanto a metalação com $\text{Zn}(\text{II})$ favorecem outros caminhos de desativação do estado excitado, que não envolvem a transferência de energia para o O_2 .

7.6 Fotoatividade da Porfirina 3MMe Não Encapsulada e Incorporada no Sistema Polimérico de ACM

Embora o encapsulamento dos derivados porfirínicos sintetizados tenha sido uma estratégia para viabilizar a sua utilização em TFD, uma avaliação da influência do material polimérico na eficiência do fotossensibilizador foi realizada. Para estes estudos, utilizou-se a formulação de 3MMe incorporada em ACM, visto que esta (juntamente com a 4MMe) se mostrou como a mais promissora de toda a série preparada.

No sentido de avaliar a influência das micro e nanocápsulas de ACM como veículo para a distribuição da porfirina nas células, avaliou-se a cito e fototoxicidade da porfirina 3MMe incorporada nas cápsulas de ACM e em solução (não encapsulada).

Uma solução concentrada da porfirina ($3,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em DMSO foi preparada, de forma que a adição de 3 μL dessa solução estoque a 10 mL de meio de cultura incolor, resultasse em uma concentração final de 3MMe de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, a mesma concentração final obtida com a diluição das formulações de nanocápsulas por cerca de 100 vezes. A concentração final de DMSO, nesse caso de 0,03%, não é tóxica às células, tendo-se em vista que esse composto é capaz de causar efeitos citotóxicos relevantes somente em concentrações acima de 2%. As células foram então incubadas com as duas soluções durante 3 horas, sendo uma parte do experimento realizada sem irradiação e a outra com irradiação em 650 nm, durante 10 minutos. Os resultados desse experimento estão apresentados na Figura 55, onde pode-se observar que não houve uma redução da viabilidade celular quando os experimentos

foram realizados no escuro (experimentos A e B), o que já havia sido observado para a porfirina 3MMe encapsulada em ACM. Todavia, a porfirina não encapsulada mostrou-se muito mais fotoativa quando irradiada (experimento D), atingindo uma taxa de morte celular de praticamente 100%, enquanto que a formulação polimérica diminuiu a viabilidade celular em somente cerca de 40% (experimento C). Esses resultados indicam que a porfirina incorporada em ACM apresenta uma atividade fotodinâmica consideravelmente reduzida em relação à sua utilização sem nenhum veículo carreador.

A menor fototoxicidade observada para a formulação polimérica pode estar relacionada à forma de interação com as células, visto que quando encapsulada a interação inicial ocorre entre a cápsula e a célula, e não há interação direta com a droga. Foram então realizadas medidas de incorporação da porfirina 3MMe em células HeLa, quando encapsulada e quando em solução, a qual foi preparada de acordo com o mesmo procedimento dos experimentos de cito e fototoxicidade. A incorporação de 3MMe nas células foi avaliada em diferentes tempos de incubação, de 1 a 9 horas, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 7.4. Os resultados são apresentados na Figura 56 onde pode-se observar que a taxa de incorporação da 3MMe não encapsulada (descrita somente como 3MMe) chega a ser duas vezes maior que para a porfirina encapsulada (descrita como ACM). A maior taxa de incorporação celular observada para a 3MMe não encapsulada provavelmente é um dos fatores responsáveis pela maior eficiência fotodinâmica (Figura 55) observada em relação ao Fs encapsulado no sistema polimérico.

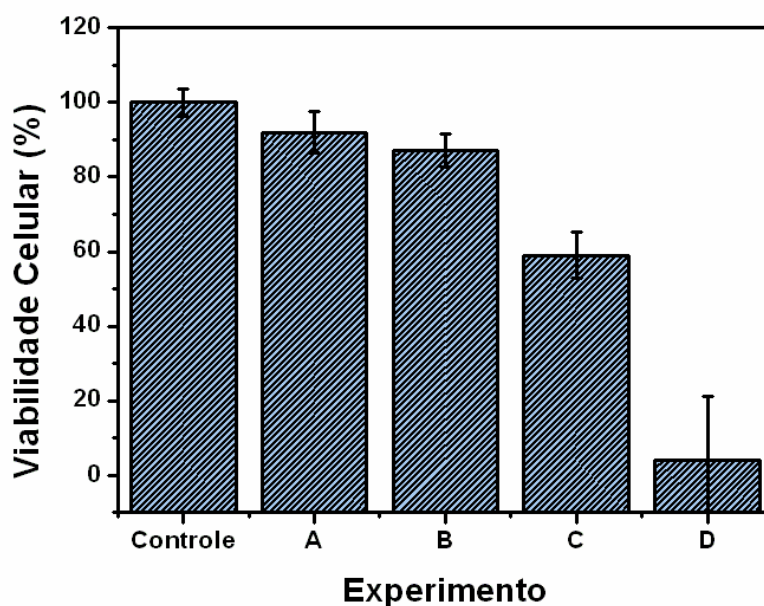


Figura 55- Porcentagem de células viáveis após 3 horas de incubação, na ausência (**controle**) e presença de cápsulas poliméricas de ACM contendo a porfirina 3MMe (**A e C**) e da porfirina 3MMe não encapsulada (**B e D**); não irradiadas (**A e B**); e irradiadas em 650 nm (**C e D**). $[3MMe] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

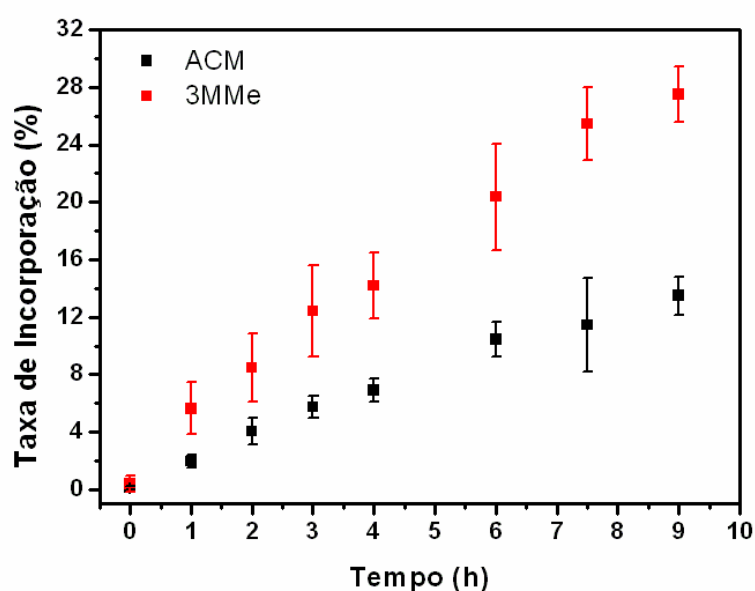


Figura 56- Taxa de incorporação da porfirina 3MMe não encapsulada (pontos vermelhos) e incorporada em partículas poliméricas de ACM (pontos pretos). $[3MMe] = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

7.7 Conclusões Parciais

As micro/nanocápsulas de ACM e HEC, contendo como composto fotoativo encapsulado a porfirina 3MMe, apresentaram interessantes resultados no tocante a sua aplicação no tratamento de câncer por TFD. A ausência de citotoxicidade significativa no escuro, aliada a uma elevada toxicidade na presença de radiação na região espectral do vermelho são as principais características que um Fs deve apresentar. Nesse aspecto, os resultados obtidos com a formulação de ACM são promissores, indicando uma menor citotoxicidade, maior eficiência fotodinâmica e maior taxa de incorporação celular da porfirina quando incorporada nesse sistema em relação às nanocápsulas de HEC.

Ambas as formulações poliméricas apresentaram uma taxa de incorporação celular maior quando comparadas a lipossomas contendo o mesmo pigmento fotoativo, de maneira que isso se refletiu em uma elevada fototoxicidade da 3MMe quando incorporada às formulações poliméricas em relação à formulação lipídica.

As oito formulações de ACM investigadas permitiram concluir que porfirinas base-livre, contendo um grupo metilpiridínio em uma das posições *meso* do macrociclo (compostos 3MMe e 4MMe), apresentaram uma maior atividade fotodinâmica quando comparados aos compostos contendo complexos de rutênio na periferia do anel porfirínico e/ou íons Zn(II) coordenados ao macrociclo. Essa maior atividade dos compostos base-livre metilados se deve, provavelmente, ao maior rendimento quântico de formação de oxigênio singlete dessas moléculas, aliado ao maior tempo de vida em relação aos demais derivados porfirínicos da série.

O encapsulamento das porfirinas em ACM reduz a taxa de incorporação do composto fotoativo em células HeLa, resultando ao mesmo tempo em uma redução significativa da fotoatividade. Esse fato provavelmente está relacionado à forma de interação com as células,

de maneira que uma investigação criteriosa desta hipótese foi realizada e será relatada no próximo capítulo.

Capítulo 8.
Citolocalização e
Mecanismo de Morte
Celular

8. Citolocalização e Mecanismo de Morte Celular

A maior taxa de incorporação da porfirina em solução, relatada no capítulo anterior, provavelmente é um dos fatores que resultou na maior fototoxicidade mostrada na Figura 55. Assim, tornou-se necessário uma melhor compreensão da interação entre a cápsula e as células, assim como da porfirina livre em solução e as células, de forma a relacionar essa interação com a eficiência fotodinâmica.

Durante a realização dos experimentos envolvendo a solução de porfirina 3MMe não encapsulada, observou-se que os danos causados nas células eram tão severos que, logo após o procedimento de irradiação, mudanças na morfologia da célula eram facilmente perceptíveis até mesmo num microscópio óptico simples. Em contrapartida, as células tratadas com a 3MMe encapsulada em ACM, pareciam inalteradas, o que despertou interesse acerca das diferenças no processo de morte celular que poderiam estar ocorrendo nas duas formas de tratamento empregadas.

Como o processo de morte celular em TFD pode ser influenciado por diversos fatores como concentração e forma de administração da droga, dose de irradiação e citolocalização, [91] uma investigação da localização intracelular da droga e do mecanismo de morte de células HeLa submetidas aqueles dois tratamentos foi realizada, avaliando-se alguns processos intracelulares relacionados à necrose e apoptose, as duas formas mais comuns de morte celular que ocorrem em decorrência da TFD.

8.1 Localização Intracelular da Porfirina 3MMe

Aproveitando-se do fato de que a porfirina exibe uma alta fluorescência na região do vermelho do espectro eletromagnético, utilizou-se a Microscopia de Fluorescência Confocal a fim de visualizar e acompanhar a incorporação e citolocalização da 3MMe nas células. As células (na concentração de $1,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas inicialmente por 3 horas com a formulação polimérica e também com uma solução da porfirina 3MMe em meio de cultura, preparada como descrito anteriormente. A concentração de 3MMe em ambos os casos foi de $1,5 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹. Essa concentração foi escolhida após uma série de testes realizados utilizando-se concentrações na faixa de $1,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-9}$ mol.L⁻¹.

Utilizou-se também marcadores fluorescentes para algumas organelas específicas, com os quais as células foram incubadas durante 1 hora antes da aquisição das imagens. Foram utilizados os marcadores Mitotracker Orange, LysoTracker Green e Hoechst, específicos para mitocôndrias, lisossomos e núcleo, respectivamente. A Tabela 10 apresenta os dados referentes à concentração utilizada desses marcadores, bem como o comprimento de onda de excitação e a região de emissão. As concentrações de marcadores utilizadas também foram ajustadas de forma a obter uma boa visualização da fluorescência.

A Figura 57 apresenta os espectros de excitação (linha tracejada) e emissão (linha contínua) dos três marcadores utilizados. Esses espectros foram obtidos através do Fluorescence SpectraViewer, um recurso da Molecular Probes® da Invitrogen. [103] A emissão desses marcadores, após incubação com as células HeLa por 1 hora, é apresentada na Figura 58. Pode-se observar a presença da fluorescência azul marcando o núcleo celular, bem como a emissão no verde e no laranja em várias regiões do citoplasma devido à marcação de mitocôndrias e lisossomos, respectivamente.

Tabela 10- Concentração, comprimento de onda de excitação e região de emissão da porfirina 3MMe e dos marcadores de organelas utilizados nas imagens de Microscopia de Fluorescência Confocal.

Marcador	Organelas	Concentração do fluoróforo (Mol.L ⁻¹)	Comprimento de onda de excitação (nm)	Região de emissão
3MMe	-	1,5x10 ⁻⁸	488	Vermelho
LysoTracker	Lisossomos	15,0x10 ⁻⁸	488	Verde
MitoTracker	Mitocôndria	15,0x10 ⁻⁸	543	Laranja
Hoescht	Núcleo	10,0x10 ⁻⁸	364	Azul

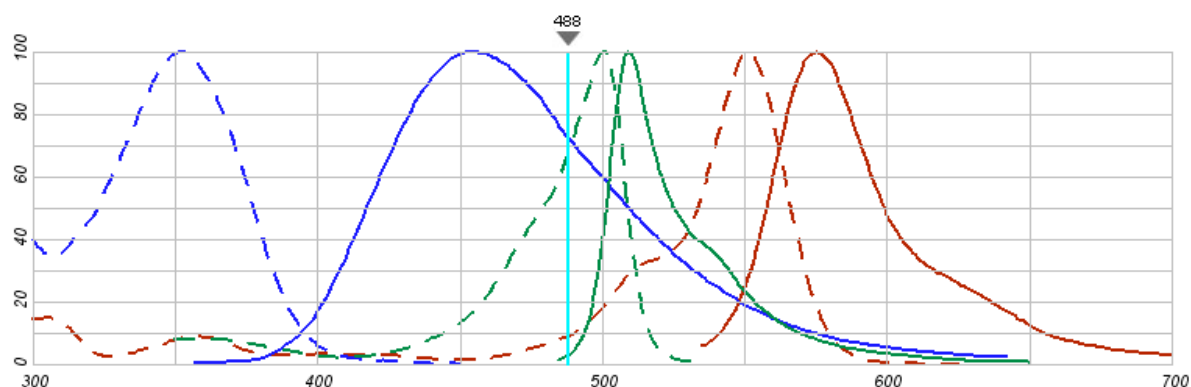


Figura 57- Espectros de excitação (linha tracejada) e de emissão (linha contínua) dos marcadores Hoescht 33258 (azul), LysoTracker Green (verde) e MitoTracker Orange (vermelho). Espectros obtidos utilizando-se o Fluorescence SpectraViewer, um recurso da Molecular Probes® da Invitrogen. [103]

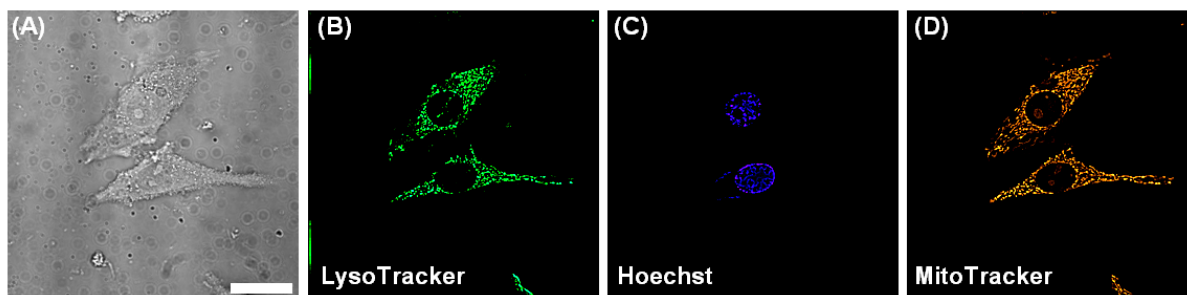


Figura 58- Imagens de microscopia confocal de fluorescência de células Hela. (A) sem a visualização da fluorescência e (B), (C) e (D) monitorando-se a emissão dos marcadores de lisossomos, núcleo celular e mitocôndrias, respectivamente.

As imagens de microscopia confocal das células incubadas durante 3 horas com a formulação de 3MMe encapsulada em ACM, e durante uma hora com o marcador de mitocôndrias, são apresentadas na Figura 59. A emissão da porfirina (em vermelho) é observada por todo o citoplasma da célula como mostrado na Figura 59A, e nenhuma fluorescência é observada no núcleo celular. A Figura 59B apresenta a fluorescência do marcador de mitocôndrias, também observado em várias regiões do citoplasma. Embora esse marcador apresente emissão na região laranja do espectro, a fluorescência aparece em verde para uma melhor diferenciação da fluorescência vermelha da porfirina. A combinação das duas imagens de fluorescência, apresentada na Figura 59C, indica que há vários pontos de sobreposição entre as duas emissões, ou seja, uma co-localização entre a porfirina e o marcador.

Cálculos de sobreposição das duas imagens foram realizados, utilizando o software Metamorph 6.3r2 (Molecular Devices, 2005), indicando uma percentagem de sobreposição entre os dois compostos fluorescentes de 28,39 %. A co-localização com o marcador de lisossomos também foi avaliada, sendo esta de 22,07%. Todos os resultados de percentagem de sobreposição neste relatório correspondem à média dos valores obtidos através da análise de várias imagens diferentes, de forma que os dois valores citados anteriormente são

destacados novamente na Tabela 11, onde estão acompanhados dos respectivos desvios padrão.

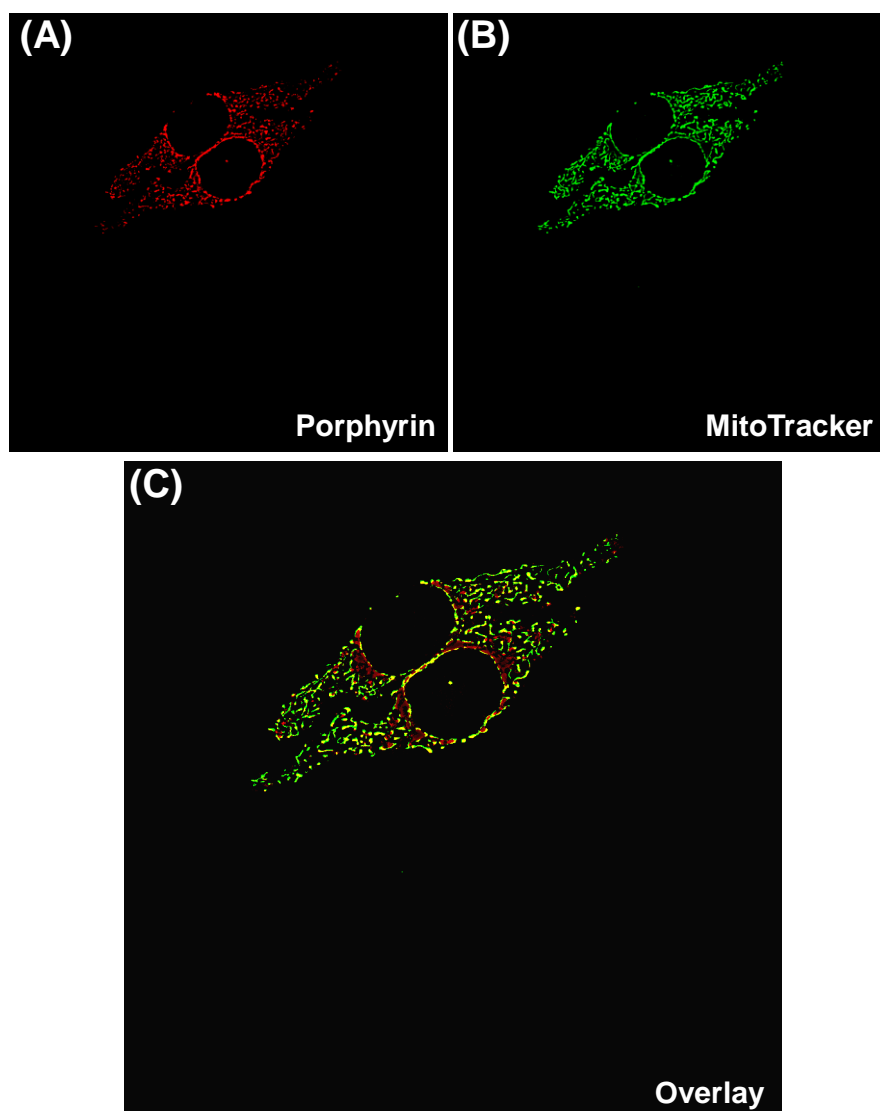


Figura 59- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa incubadas durante 3 horas com a porfirina 3MMe encapsulada em ACM. Imagens de fluorescência (A) da porfirina 3MMe encapsulada e (B) do marcador de mitocôndrias. Em (C) a sobreposição das duas imagens de fluorescência.

Tabela 11- Percentagem de sobreposição da porfirina 3MMe encapsulada em ACM com os marcadores de mitocôndrias e lisossomos.

Organela	Colocalização (DP), %
Mitocôndrias	28,39 (4,71)
Lisossomos	22,07 (5,23)

O tempo de incubação foi então variado de 1 a 9 horas de maneira a observar possíveis mudanças na citolocalização da droga. A Figura 60 apresenta as imagens obtidas nos quatro tempos de incubação investigados: 1, 3, 6 e 9 horas. A porfirina continua localizada, mesmo em tempos mais longos, no citoplasma da célula, não atingindo o núcleo celular que aparece marcado pela fluorescência azul na Figura 60. Quando encapsulada, a porfirina não apresentou seletividade por uma organela específica, sendo observada em mitocôndrias e lisossomos em uma porcentagem considerável, como discutido anteriormente. Mesmo considerando-se os tempos mais longos de incubação investigados, não foram observadas mudanças significativas nos valores de porcentagem de colocalização, indicando que não ocorrem mudanças na citolocalização da droga em função do tempo. As médias desses valores de colocalização, juntamente com o desvio padrão das medidas, estão apresentados na Tabela 12. As percentagens de sobreposição determinadas para o marcador do núcleo celular Hoescht são pequenas e estão muito próximas do erro experimental das medidas.

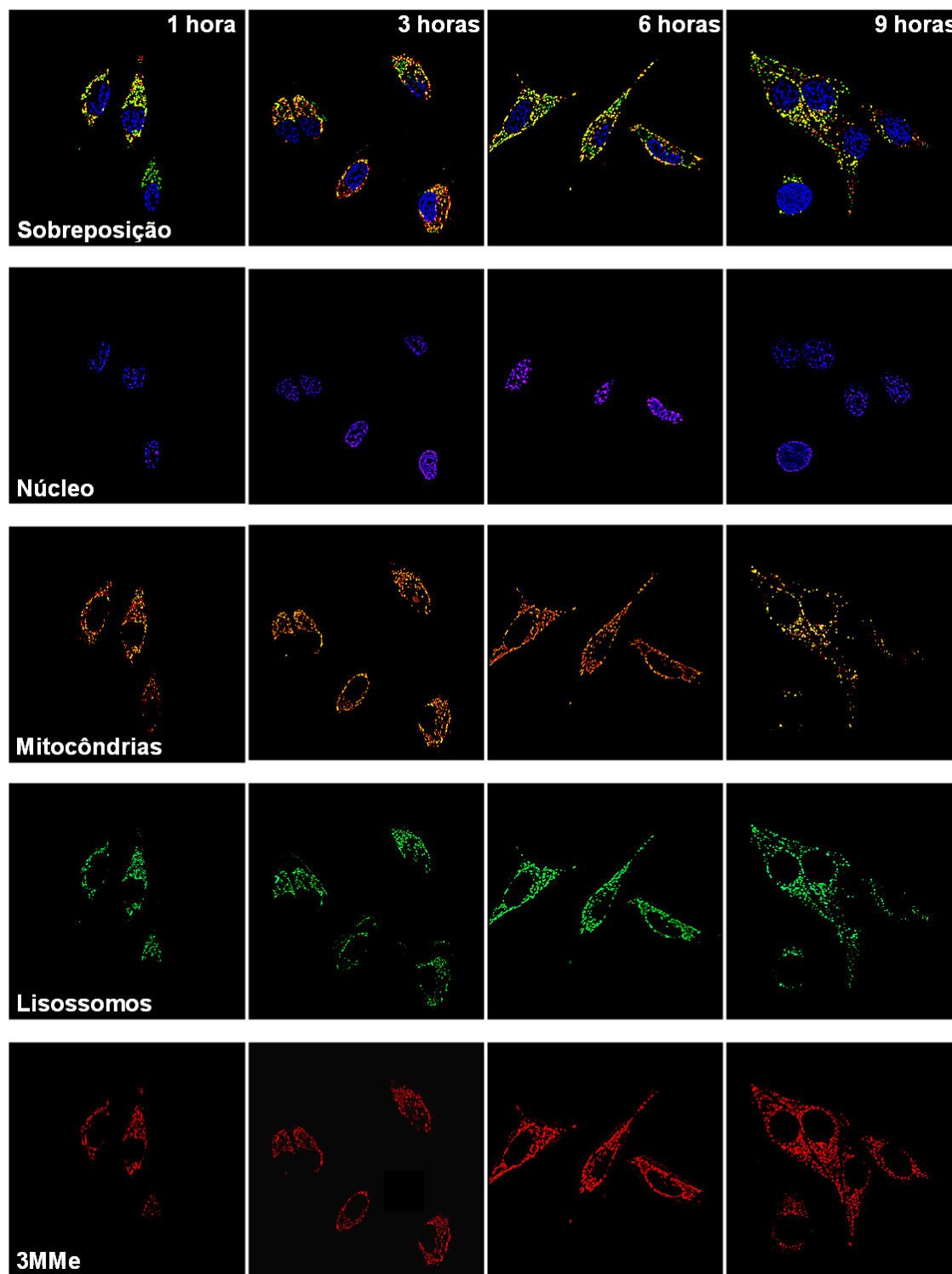


Figura 60- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa, incubadas com a porfirina 3MMe encapsulada em ACM, durante 1, 3, 6 e 9 horas (colunas da esquerda para a direita, respectivamente); na presença de marcadores de núcleo, mitocôndrias e lisossomos (fluorescência azul, laranja e verde, respectivamente).

Tabela 12- Percentagem de sobreposição da porfirina 3MMe encapsulada em ACM com os marcadores de mitocôndrias, lisossomos e núcleo. Tempo de incubação variado de 1 a 9 horas. Entre parênteses, o desvio padrão (DP) das medidas.

Tempo, Horas	Sobreposição (DP), %		
	Mitocôndrias	Lisossomos	Núcleo
1	36,26 (8,71)	29,23 (9,11)	1,75 (1,39)
3	33,30 (8,19)	29,96 (5,32)	3,14 (1,67)
6	38,43 (10,79)	31,06 (7,80)	1,27 (1,04)
9	30,59 (7,07)	33,84 (7,77)	2,32 (1,62)

A citolocalização da porfirina também foi avaliada quando a incubação com as células foi realizada utilizando-se uma solução de 3MMe em DMSO, não encapsulada. A Figura 61 apresenta a imagem de microscopia de fluorescência confocal das células incubadas durante 3 horas com uma solução de 3MMe. A fluorescência azul corresponde ao núcleo celular marcado com Hoescht e a emissão vermelha refere-se à fluorescência da porfirina. Pode-se observar claramente que a 3MMe se concentra principalmente na membrana celular, demarcando o contorno da célula.

Esse fato indica que o sistema polimérico utilizado altera significativamente as propriedades de interação com a membrana citoplasmática, de forma que quando encapsulada a porfirina alcança o meio intracelular acumulando-se em organelas como lisossomos e mitocôndrias. Quando em solução (não encapsulada), as fortes interações hidrofóbicas e também eletrostáticas entre a porfirina e a membrana celular, que ocorrem devido ao caráter lipofílico da molécula e a presença de um grupo positivamente carregado em uma das posições *meso* do anel porfirínico, favorecem o acúmulo de 3MMe na membrana celular. Essa forte interação resulta em uma maior concentração da droga não encapsulada nas células,

conforme descrito anteriormente e cujo resultado foi apresentado na Figura 56.

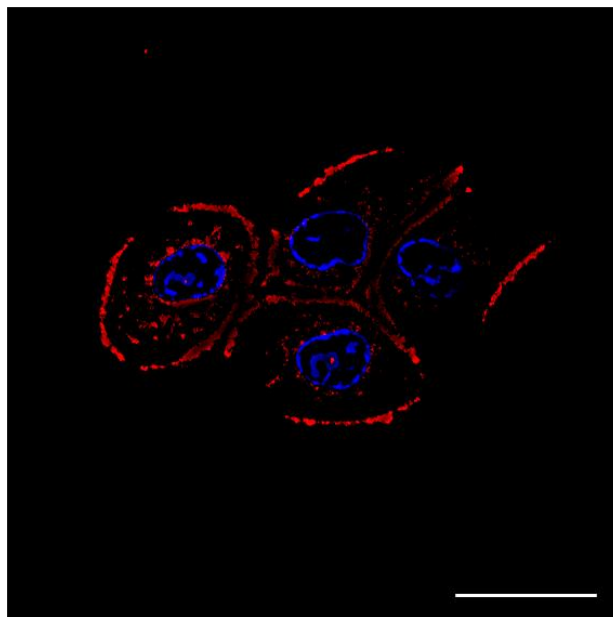


Figura 61- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa, incubadas com a porfirina 3MMe ($1,5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$) não encapsulada, durante 3 horas, na presença do marcador de núcleo Hoescht (fluorescência azul). A barra equivale a 20 μm .

Os resultados obtidos indicam que as nanocápsulas poliméricas de ACM são excelentes veículos para favorecer a entrada e o acúmulo do Fs no meio intracelular. Nesse momento, decidiu-se investigar também se a porfirina 3MMe das nanocápsulas é liberada uma vez atingido o citoplasma da célula. Assim, foi realizada uma marcação da suspensão de nanocápsulas de ACM utilizando a Fluorescamina. Esse marcador é capaz de se ligar facilmente a grupos amino e é frequentemente utilizado como marcador de proteínas, de maneira que sua ligação ao atelocolágeno presente na formulação seria bastante favorecida.

A marcação foi realizada através da adição de 100 μL de uma solução estoque de fluorescamina, preparada em DMSO, a 5 mL de uma mistura PBS:meio de cultura sem soro 4:1, a mesma que seria posteriormente utilizada para incubação com as células. Somente uma

pequena quantidade de meio de cultura foi utilizada a fim de evitar que o marcador pudesse se ligar às proteínas presentes no mesmo. A Figura 62 apresenta a imagem de fluorescência confocal de uma cápsula marcada com fluorescamina onde pode-se observar, além da fluorescência vermelha da porfirina 3MMe (Figura 62b), a emissão de luz do marcador que ocorre na região azul do espectro eletromagnético (Figura 62c).

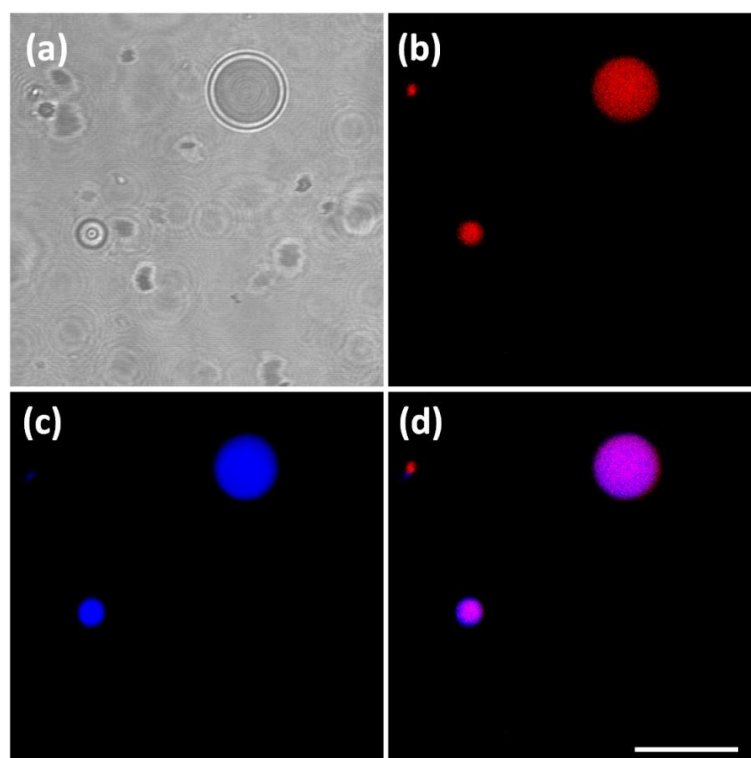


Figura 62- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de cápsulas de ACM marcadas com fluorescamina, contendo a porfirina 3MMe. Em (a) é mostrada a imagem óptica convencional, sem a visualização da fluorescência. Em (b) e em (c) visualização da emissão da porfirina e da fluorescamina, respectivamente; em (d) a sobreposição da fluorescência da porfirina e da fluorescamina. A barra equivale a 20 μm .

As células foram então incubadas com essa formulação marcada, durante três horas. Imagens foram obtidas em um microscópio de fluorescência confocal, onde observou-se a fluorescência da 3MMe e também da fluorescamina como mostrado na Figura 63. A emissão

Daiana K. D. Nogueira

de ambos os fluoróforos é observada no citoplasma das células, indicando que, não somente a porfirina, mas as nanocápsulas alcançam o meio intracelular.

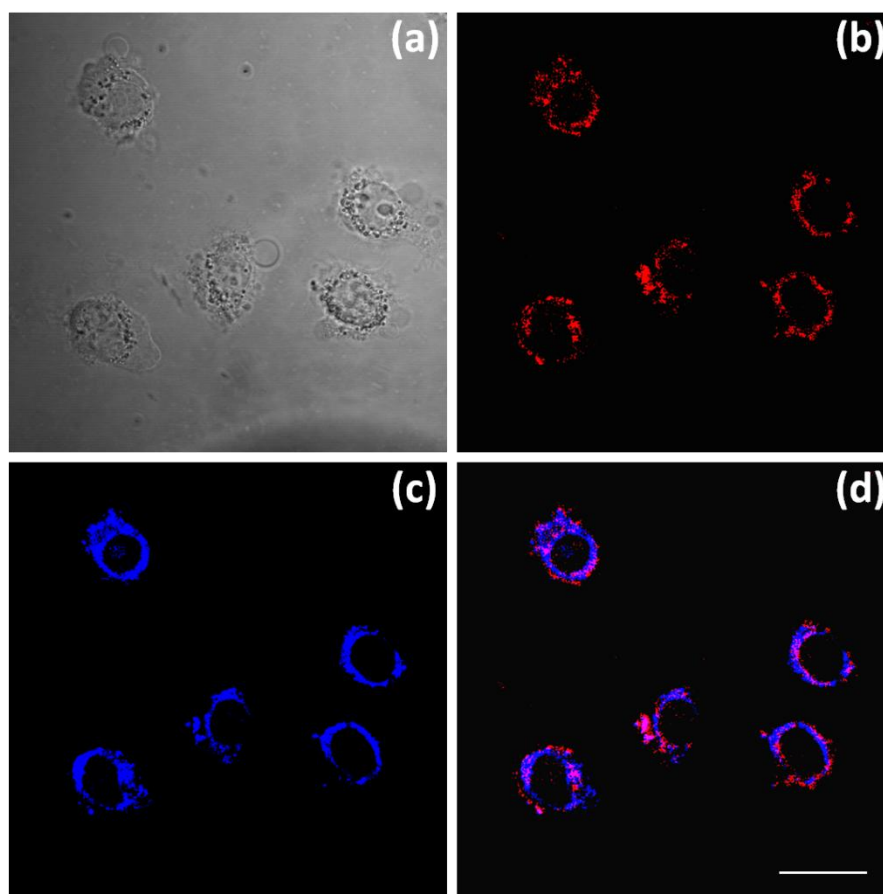


Figura 63- Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa, incubadas com a formulação de ACM marcada com fluorescamina. Em (a) a imagem sem visualização da fluorescência; em (b) e (c) visualização da emissão da porfirina 3MMe e da fluorescamina, respectivamente; em (d) a sobreposição das imagens de fluorescência. A barra equivale a 20 μm .

Cálculos de co-localização realizados indicam que a porcentagem de sobreposição das emissões vermelha e azul é de cerca de 47% ($\pm 5,7$), o que pode ser observado nas regiões de coloração mais rosada na Figura 63d. Pode-se considerar, portanto, que parte das nanocápsulas liberam a porfirina 3MMe no citoplasma das células e que, embora não tenha

sido ainda comprovado experimentalmente, essa liberação deve aumentar com o tempo ocasionando maiores taxas de morte celular como foi observado nos resultados da Figura 42.

Os resultados indicam também que, quando a porfirina está na cápsula, os danos causados pela sua fotoatividade parecem ser bastante reduzidos o que explicaria as elevadas taxas de morte celular observadas quando a 3MMe não está encapsulada.

Dessa forma, pode-se inferir que além do encapsulamento e da citolocalização da 3MMe influenciarem significativamente a fototoxicidade, podem influenciar também no mecanismo de morte celular. Nesse aspecto, deu-se início a uma série de experimentos no sentido de avaliar as diferenças no mecanismo de morte causada pela ação fotodinâmica da porfirina 3MMe não encapsulada e incorporada em ACM.

8.2 Mecanismo de Morte Celular

Mortes celulares por necrose ou apoptose são distintas do ponto de vista mecânico, uma vez que necrose é meramente um resultado passivo de um dano celular e a apoptose é parte integral de um processo fisiológico celular normal. [116] O processo de morte de células submetidas à TFD geralmente ocorre por apoptose, mas necrose ou até mesmo uma combinação dos dois mecanismos pode ocorrer dependendo, entre outros fatores, da dose, forma de administração e citolocalização da droga.

Na apoptose, várias alterações biológicas celulares ocorrem numa sequência ordenada. Algumas delas podem ser exploradas para discriminar células vivas e em processo de morte e também para analisar a extensão e o mecanismo de morte celular. [117] Nesse sentido, uma série de experimentos foi realizada visando monitorar alguns desses processos biológicos relacionados à morte celular.

8.2.1 Marcação com Azul de Tripán

Os danos sofridos pelas células submetidas à TFD com a porfirina 3MMe não encapsulada pareciam ser muito severos, visto que pouco tempo após a irradiação já se observavam alterações significativas na morfologia celular. Assim, no sentido de avaliar a intensidade desses danos, realizou-se um experimento onde a viabilidade das células submetidas à TFD com a 3MMe não encapsulada e incorporada nas nanocápsulas de ACM, foi avaliada cerca de uma hora após a irradiação.

Adicionou-se aos poços 100 μ L de uma solução 4% de azul de tripan, comumente empregado em laboratório para a marcação de células inviáveis nas quais a membrana citoplasmática está comprometida e, portanto, permite a difusão do corante através da mesma marcando o núcleo das células mortas. A Figura 64 apresenta os resultados desta avaliação, onde praticamente não se observa núcleos corados nos experimentos realizados no escuro (Figura 64c e d) e nas células controle e controle irradiado (Figura 64 a e b). Após uma hora do término do processo de irradiação, apenas cerca de 4% das células tratadas com a formulação de ACM tiveram seu núcleo marcado com azul de tripan (Figura 64e). Em contrapartida, cerca de 70% das células submetidas ao tratamento com a solução de 3MMe não encapsulada aparecem coradas (Figura 64f), indicando que este tratamento ocasiona a morte quase que imediata das células. Além disso, indicam que nesse caso os danos causados pela TFD atingem principalmente a membrana celular. A Figura 65 apresenta a porcentagem média de células marcadas com azul de tripan em cada tratamento e os respectivos desvios padrão, obtidos através da análise de pelo menos seis imagens em cada condição experimental.

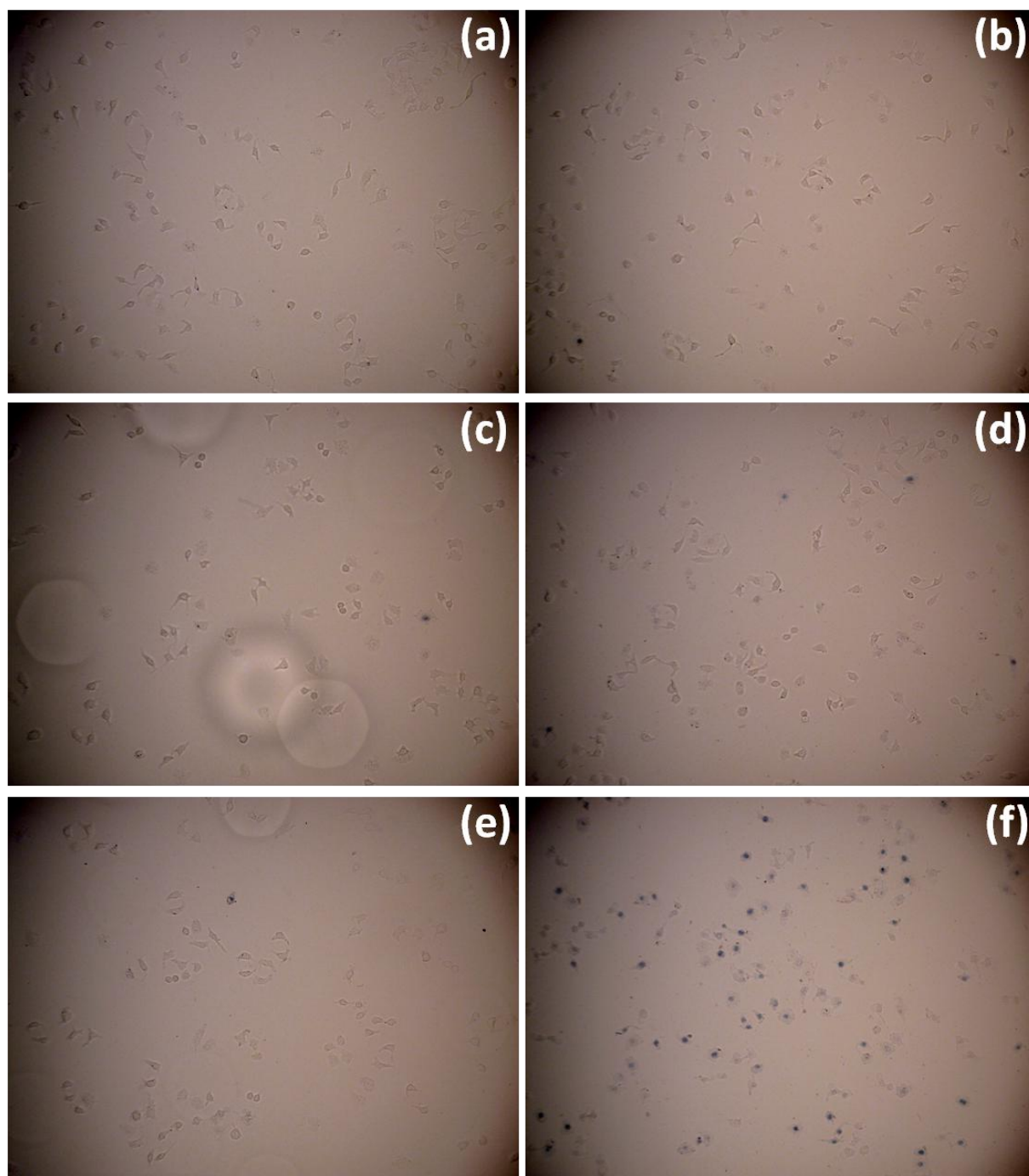


Figura 64- Marcação com azul de tripan em células mantidas como controle (a) e controle irradiado (b); incubadas com a formulação de ACM, mantidas no escuro (c) e irradiadas (e); e incubadas com a porfirina 3MMe não encapsulada, mantidas no escuro (d) e irradiadas (f). Tempo de incubação= 3 horas; tempo de irradiação em 650 nm= 10 minutos.

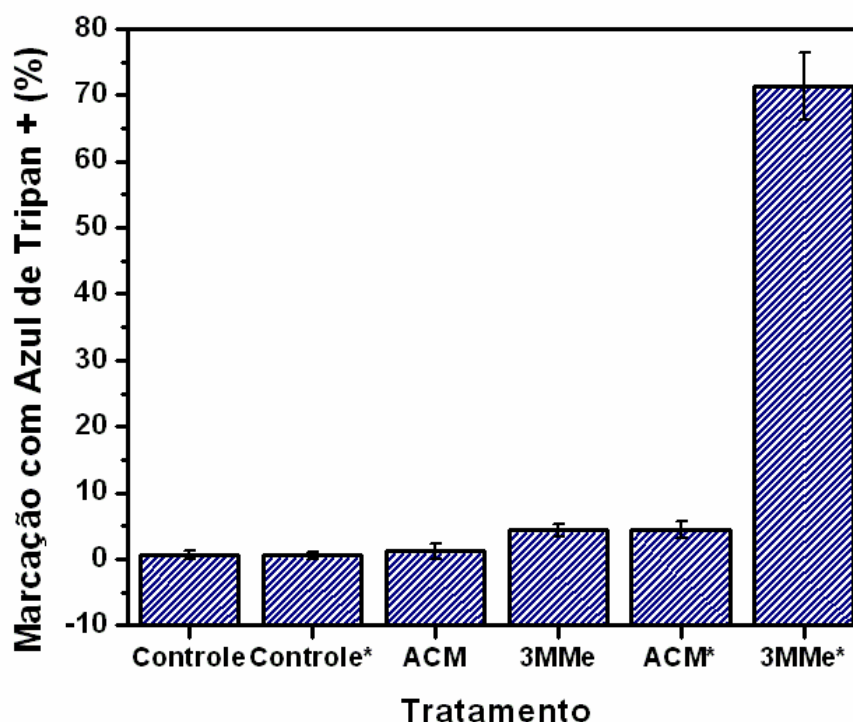


Figura 65- Porcentagem de células marcadas com azul de tripan nos tratamentos realizados envolvendo a porfirina encapsulada (ACM) e em solução (3MMe). * indica experimentos realizados com irradiação em 650 nm. A concentração de porfirina empregada em ambos os tratamentos foi de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Estes resultados iniciais indicam que as células submetidas ao tratamento por TFD com a 3MMe não encapsulada entram em processo de morte quase imediatamente após a irradiação, o que pode ser característica de um processo de necrose celular. Para as células tratadas com a formulação polimérica de ACM, esse processo de morte parece ser mais lento, o que pode estar relacionado a uma destruição controlada, de maneira que uma investigação de possíveis alterações bioquímicas relacionadas a apoptose celular foi realizada e são descritas a seguir.

8.2.2 Fragmentação de DNA

Se uma população de células diplóides é corada com uma substância fluorescente que se liga às moléculas de DNA, é possível verificar a existência de células com quantidade relativa de DNA característicos das fases G1, síntese, G2, e mitose do ciclo celular. O processo de divisão celular propriamente dito é a fase M do ciclo celular (mitose). A replicação do DNA nuclear é conhecida como a fase S (síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é conhecido como a fase G1 (gap ou lacuna) e G2 é o intervalo entre o final de síntese de DNA e o início da mitose. G1 e G2 propiciam um tempo adicional para o crescimento celular (duplicação da massa antes da divisão celular). Se forem encontrados fragmentos de DNA menores que os característicos de G1, esses fragmentos serão considerados sub-diplóides, por seu menor tamanho e são característicos de apoptose. Assim, a porcentagem de DNA sub-G1 pode ser um indicativo da quantidade de células que morreram por apoptose. [117] Entretanto, alguns autores relatam que a presença de fragmentos de DNA também pode ocorrer quando a morte celular ocorre por necrose.

Inicialmente, realizou-se uma quantificação desses núcleos sub-diplóides em células HeLa incubadas com a porfirina 3MMe não encapsulada e incorporada em ACM. Estes experimentos foram realizados com amostras no escuro e após irradiação com um laser vermelho durante 10 minutos. A Figura 66 apresenta a porcentagem de núcleos sub-diplóides (ou fragmentos de DNA) detectadas em cada tratamento através da técnica de citometria de fluxo.

Observa-se que nas amostras controle tanto no escuro, quanto irradiadas [6], praticamente não se observa a presença de núcleos sub G1 (M1), indicando que apenas a irradiação sem a presença de um Fs lesiona de maneira pouco significativa as células. O mesmo comportamento foi observado na presença da 3MMe quando incorporado em ACM

(ACM) e quando não encapsulada (3MMe), na ausência de irradiação, onde a porcentagem de fragmentação de DNA permanece muito baixa conforme também foi observado no experimento controle.

Os tratamentos das células, incubadas com a porfirina incorporada em ACM e não encapsulada, irradiadas na região do vermelho, resultou em um grande aumento na fragmentação de DNA. Observa-se que quando encapsulada (ACM*), a porfirina promoveu cerca de 20% de fragmentação do DNA, enquanto que quando não encapsulada (3MMe*) a porfirina foi mais efetiva em promover a formação de núcleos sub-diplóides (quase 100%).

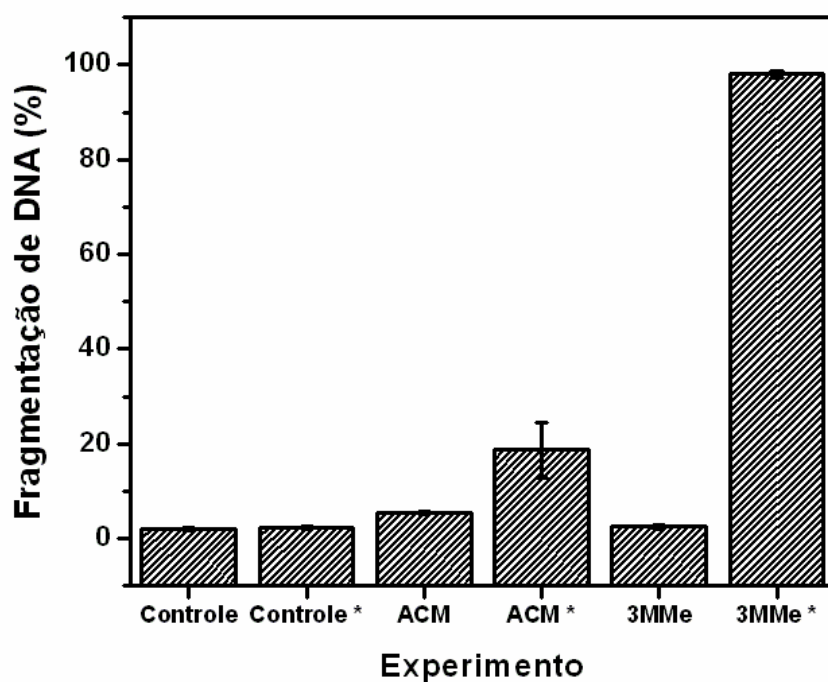


Figura 66- Porcentagem de núcleos sub-diplóides (M1) em células HeLa. Células tratadas com a porfirina não encapsulada (3MMe) e incorporada à formulação polimérica (ACM), no escuro ou irradiadas. * indica irradiação em 650 nm. A concentração de porfirina empregada em ambos os tratamentos foi de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

8.2.3 Liberação de Citocromo C

Como descrito no item 1.6, durante o processo de morte celular por apoptose através da via intrínseca, ocorre liberação de citocromo c do espaço intermembranas da mitocôndria. Assim, foi realizado um experimento com o intuito de verificar e quantificar essa liberação. De forma mais detalhada, o procedimento envolve a quantificação do citocromo c que ainda se encontra na mitocôndria, através da lise da membrana citoplasmática e transferência do citocromo c do citosol para a fase sobrenadante que foi descartada. A concentração dessa proteína é então determinada, através da sua ligação com anticorpo fluorescente, por citometria de fluxo, e os resultados são mostrados na Figura 67.

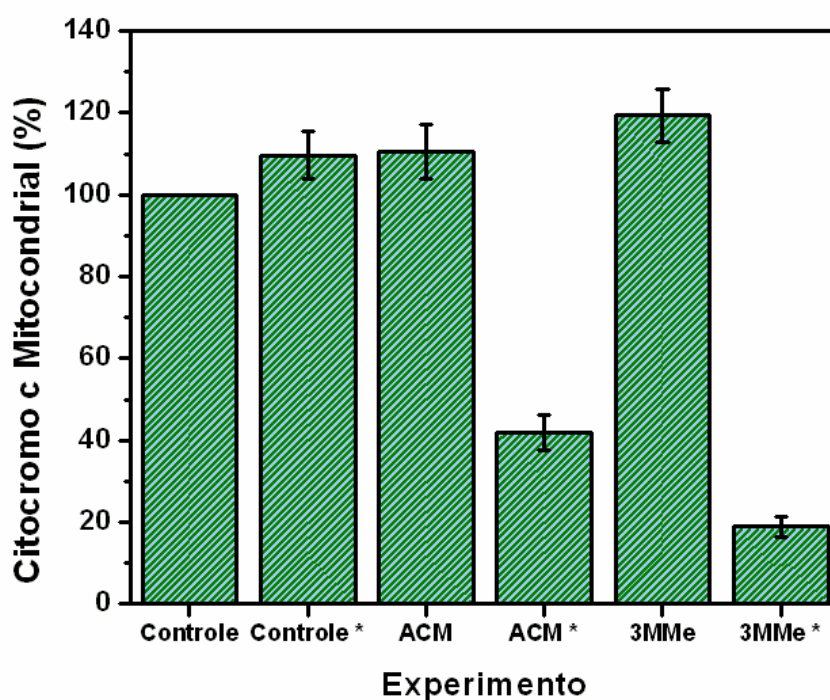


Figura 67- Porcentagem de citocromo c mitocondrial em células HeLa. Células tratadas com a porfirina não encapsulada (3MMe) e incorporada à formulação polimérica (ACM), no escuro e irradiadas (*) em 650 nm. A concentração de porfirina empregada em ambos os tratamentos foi de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

Considerando-se a concentração dessa proteína como 100% no experimento controle, observa-se que não há nenhuma alteração quando as células do experimento controle são irradiadas (controle*); ou submetidas à incubação com a porfirina não encapsulada (3MMe) e incorporada em nanocápsulas poliméricas (ACM), na ausência de luz. Todavia, quando estas são irradiadas, observa-se uma diminuição de cerca de 60% da concentração de citocromo c mitocondrial no caso do tratamento empregando a formulação polimérica (ACM*). Já no experimento empregando a 3MMe em solução, verificou-se um aumento e liberação de cerca de 80% do citocromo c (3MMe*), indicando que nesse caso danos mais severos foram causados às mitocôndrias.

8.2.4 Perda do Potencial de Membrana Mitocondrial Ψ

Com o intuito de investigar a extensão dos danos causados às mitocôndrias, avaliou-se também o potencial de membrana dessa organela. A perda do potencial de membrana mitocondrial também é um dos efeitos desencadeados no processo de morte celular e possível indicador de apoptose, principalmente nos casos em que o F_s se acumula nessa organela.

A utilização de fluoróforos carregados positivamente, como a Rhodamina, por exemplo, é a principal estratégia utilizada para medir os possíveis danos causados nessa organela. A Rhodamina se acumula preferencialmente na mitocôndria em virtude da atração eletrostática entre sua carga positiva e o potencial de membrana negativo da organela em questão. Se ocorrer perda de potencial (ou despolarização) da membrana, o acúmulo da rhodamina na mitocôndria será menor e, como consequência, ocorrerá uma diminuição na intensidade de emissão daquele fluoróforo. Este procedimento em geral é realizado utilizando também iodeto de propídeo (IP), que marca células cuja integridade da membrana citoplasmática esteja comprometida, ou seja, células em necrose.

A Figura 68 apresenta os resultados obtidos para este experimento. O experimento controle (Figura 68a) apresenta toda a população de células no quadrante inferior à direita, sendo estas consideradas como não marcadas por IP e sem perda de potencial de membrana mitocondrial. A presença de células marcadas por IP seria caracterizada pelo aparecimento de uma população no quadrante superior à esquerda; enquanto células com perda de potencial mitocondrial apareceriam como uma população no quadrante inferior à esquerda. Tanto no caso das células controle quanto nas incubadas no escuro com a formulação polimérica ou a porfirina 3MMe em solução (Figura 68b-d, respectivamente), não foram observadas nem a presença de células em necrose nem a despolarização da membrana mitocondrial.

Todavia, foi observado perda de potencial de membrana somente nas células tratadas com a porfirina 3MMe em solução e irradiadas (Figura 68f), o mesmo não tendo sido observado para o Fs encapsulado. Este resultado pode também ser visualizado na Figura 69, onde se observa que cerca de 90% das células submetidas ao tratamento fotodinâmico com a porfirina 3MMe em solução apresentaram despolarização da membrana mitocondrial (Rh-), refletindo novamente a intensidade dos danos resultantes do processo de morte desencadeado. Quando encapsulada em ACM a porfirina ocasionou a perda de potencial de membrana mitocondrial em somente cerca de 15% das células, ou seja, apenas ligeiramente superior aos experimentos realizados no escuro ou como controle.

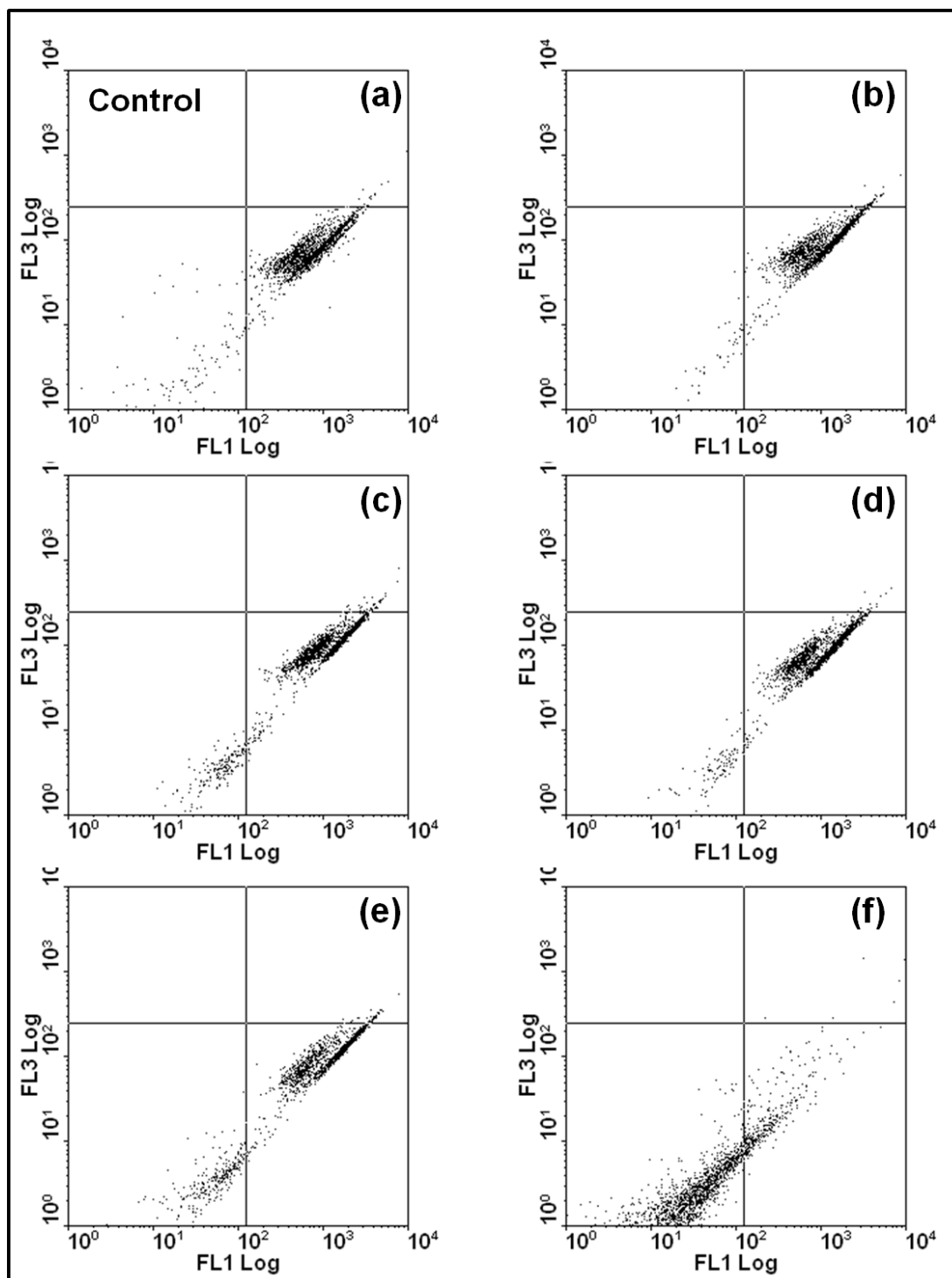


Figura 68- Perda do potencial de membrana mitocondrial de células HeLa tratadas com formulação polimérica de ACM no escuro (c) e após a irradiação (e), e com a porfirina 3MMe em solução no escuro (d) e quando irradiada (f). Os histogramas (a) e (b) referem-se ao grupo controle no escuro e quando irradiado, respectivamente. Irradiação em 650 nm. A concentração de porfirina empregada em ambos os tratamentos foi de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

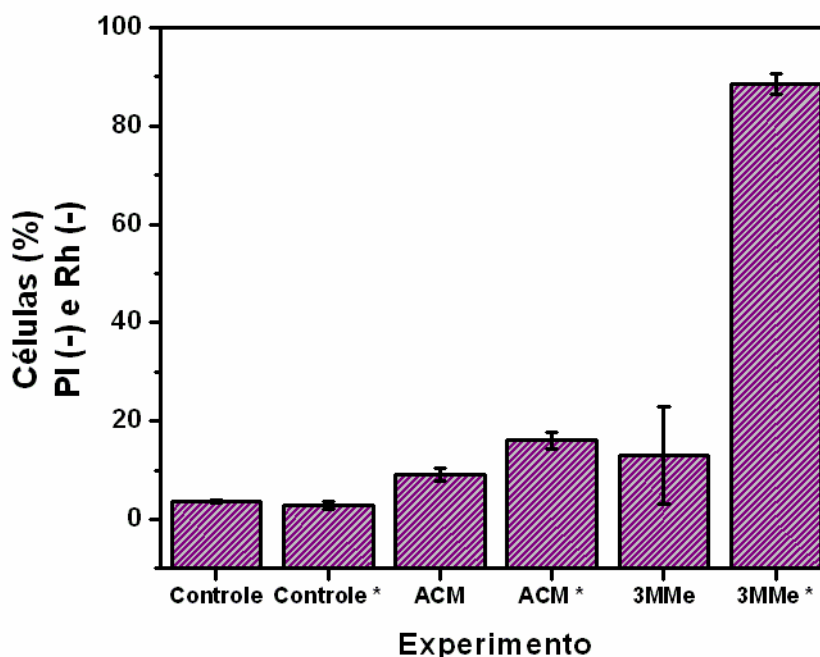


Figura 69- Porcentagem de células HeLa com diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Células tratadas com a porfirina não encapsulada (3MMe) e incorporada à formulação polimérica (ACM), no escuro ou irradiadas (*) em 650 nm. A concentração de porfirina empregada em ambos os tratamentos foi de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$.

De uma forma geral, os resultados sugerem que o encapsulamento da porfirina 3MMe influencia significativamente a forma de interação com as células, de maneira que quando não encapsulada, a porfirina se acumula preferencialmente na membrana celular, ao passo que quando incorporada em partículas de ACM, a porfirina atinge o meio intracelular, acumulando-se em várias organelas citoplasmáticas. Uma vez atingido o citoplasma, as nanocápsulas liberam a porfirina provavelmente de forma gradual, de maneira que o aumento da fotoatividade com o tempo de incubação relatado no capítulo anterior pode estar relacionado à cinética desse processo de liberação.

Pôde-se verificar também que, além do encapsulamento alterar significativamente a citolocalização da porfirina, tal fato parece influenciar significativamente no mecanismo de

morte celular. Os resultados obtidos até o momento acerca da morte celular após a TFD com a porfirina 3MMe em solução e encapsulada em ACM nos mostram que no primeiro caso os danos causados são muito mais severos, de maneira que a morte celular ocorre rapidamente com inativação de ~70% das células cerca de uma hora após a irradiação, dando indícios de um eventual processo de necrose celular. Além disso, a investigação de alguns processos bioquímicos relacionados à apoptose permitem fazer algumas suposições.

O processo apoptótico mais comum em TFD envolve a rápida liberação do citocromo c mitocondrial no citosol, seguido pela ativação do apoptossomo e procaspase-3 (Figura 12). Essa liberação foi observada após irradiação tanto na presença da porfirina 3MMe em solução quanto encapsulada.

A despolarização da membrana mitocondrial foi observada somente no caso das células tratadas com a 3MMe em solução. Entretanto, danos na mitocôndria são principalmente observados quando se tem acúmulo do Fs nessa organela. Dados dos experimentos de citolocalização revelaram que quando encapsulada em ACM, a porfirina atinge o meio intracelular, acumulando-se em organelas, inclusive na mitocôndria. Entretanto, pelos resultados apresentados não ocorreu perda do potencial de membrana mitocondrial quando a porfirina encapsulada foi empregada, indicando que os danos causados nessa organela podem não ser tão severos, mas suficientes para provocar a liberação de citocromo c e desencadear a morte celular, provavelmente apoptose por via intrínseca, processo normalmente observado quando o Fs se acumula em mitocôndrias.

Quando a porfirina 3MMe está em solução, a microscopia de fluorescência confocal revelou seu acúmulo preferencialmente na membrana citoplasmática. Fs's que se acumulam na membrana celular tendem a desencadear apoptose por via extrínseca, através da ativação de receptores de morte como TNF e FAS, justificando os sinais apoptóticos observados como a perda do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e fragmentação do

DNA. Entretanto, pouco tempo após o término da irradiação, observou-se o comprometimento da membrana das células, que se tornou permeável ao azul de tripan, evidenciando um eventual processo de necrose. Dados da literatura sugerem que quando o Fs se localiza na membrana, o processo de morte celular pode rapidamente mudar para necrose provavelmente em virtude da perda da integridade da membrana plasmática e do rápido esgotamento do ATP intracelular.[118] Tem sido sugerido que apoptose e necrose compartilham vias iniciais do processo de morte e o resultado final, ou seja, o mecanismo principal é definido pela presença de uma caspase ativa. Isso implica que se a apoptose for inibida de alguma maneira, ocorre a reorientação do mecanismo de morte para necrose, mas alguns processos bioquímicos característicos de apoptose podem ser observados, exceto pela ativação de caspases executoras.

Uma análise mais criteriosa da Figura 61 permite observar que, além do acúmulo preferencial do Fs na membrana celular, há algumas regiões fluorescentes no citoplasma que podem sugerir um acúmulo da 3MMe nas mitocôndrias. Além disso, alguns autores relatam a redistribuição de porfirinas catiônicas da membrana citoplasmática para o citosol após a irradiação. Tal fato pode resultar na fotoinativação da procaspase-9 e procaspase-3 como relatado por Kessel.[99] Essa inibição das caspases promove a mudança do mecanismo de morte celular, favorecendo a ativação e propagação da necrose celular. Assim, a obtenção de imagens de microscopia de fluorescência confocal após o procedimento de irradiação seria fundamental a fim de se verificar a possível redistribuição da porfirina no citosol da célula, e serão realizadas posteriormente.

Além disso, medidas de atividade de receptores de morte como TNF e FAZ (ativados na via extrínica da apoptose), e das caspases 3 e 8 seriam também fundamentais para elucidar e compreender o mecanismo de morte celular. A caspase-3 executora será ativada na morte por apoptose por via intrínica ou extrínica. Entretanto, a não ativação da caspase-3 será um

indício de necrose celular. Já no caso da caspase-8, sua ativação somente será visualizada no caso de apoptose por via extrínica, conduzindo para uma possível elucidação e diferenciação entre os mecanismos.

8.3 Conclusões Parciais

A análise dos resultados obtidos sugerem que a utilização do sistema polimérico de ACM permite que a porfirina 3MMe atinja o citoplasma das células, favorecendo o seu acúmulo em diferentes organelas e a sua liberação gradativa para o citosol.

Além disso, o encapsulamento do Fs altera significativamente a sua citolocalização e, por consequência o processo de morte celular. Quando não encapsulada, a porfirina se acumula na membrana citoplasmática, provavelmente ativando receptores de morte e desencadeando a apoptose celular por via extrínica. Entretanto, o comprometimento da integridade da membrana, verificado através de marcação com azul de tripan, indica uma possível reorientação do mecanismo de morte, favorecendo a necrose celular, indesejável em TFD, por resultar em processos inflamatórios nos tecidos tratados. Em contrapartida, a utilização do sistema polimérico de ACM permite que, uma vez disperso no citoplasma, o Fs provoque danos menos severos à célula, mas suficientes para desencadear a morte celular, provavelmente apoptose por via intrínica, um mecanismo mais desejável para tumores tratados com TFD.

Capítulo 9. Conclusões e Perspectivas

9. Conclusões e Perspectivas

Uma série de oito derivados porfirínicos monocatiônicos, foi sintetizada e caracterizada. O caráter anfifílico aliado ao elevado rendimento quântico de formação de oxigênio singlete destes compostos, são características que indicam a potencialidade dos mesmos como fotossensibilizadores para TFD.

Quando incorporados em micro/nanocápsulas poliméricas de ACM e HEC, os derivados porfirínicos apresentaram elevada fotoatividade frente à células HeLa, que resultou em uma significativa redução da viabilidade celular após incubação e irradiação. Os resultados foram bastante promissores, principalmente quando os derivados porfirínicos foram incorporados na formulação de ACM, onde nenhuma toxicidade foi observada no escuro e uma elevada fotoatividade foi observada quando as células foram submetidas à TFD. De toda a série de oito fotossensibilizadores, as duas porfirinas base livre metiladas apresentaram a maior fototoxicidade, provavelmente em virtude do seu elevado rendimento quântico de formação de oxigênio singlete.

As micro/nanocápsulas poliméricas de ACM se mostraram muito adequadas para dispersar os derivados porfirínicos em meio aquoso, além de serem excelentes veículos para entrega dos mesmos no meio intracelular. As nanocápsulas são capazes de penetrar através da membrana celular, atingindo o citoplasma e liberando o fotossensibilizador gradativamente, de maneira que a eficácia do tratamento por TFD aumenta consideravelmente com o tempo de incubação com as células.

Quando não encapsulada, em solução, tem-se a interação direta das porfirinas com a membrana citoplasmática, de maneira que as interações hidrofóbica e eletrostática entre a

porfirina e a bicamada lipídica favorecem o acúmulo da mesma principalmente na membrana citoplasmática, como observado para a 3MMe.

Uma maior taxa de morte celular foi observada quando as células HeLa foram incubadas com o fotossensibilizador não encapsulado, em solução. Neste caso, os danos celulares parecem ter sido mais intensos, principalmente na membrana celular onde ele se acumula, sugerindo um mecanismo de morte por necrose, indesejável em TFD por resultar em processos inflamatórios dos tecidos. Em contraste, quando encapsulada, a porfirina exibiu uma menor fototoxicidade e danos menos severos à célula, ocasionando a liberação de citocromo c mitocondrial e fragmentação do DNA. Além disso, a integridade da membrana citoplasmática foi mantida, sugerindo um processo de morte mais controlado/programado, provavelmente pelo mecanismo de apoptose, desejável em TFD.

Assim, embora o encapsulamento tenha ocasionado uma diminuição na eficiência fotodinâmica da porfirina, a utilização da formulação polimérica resulta em danos menos severos às células, favorecendo um mecanismo de morte menos agressivo e mais desejável para a eliminação de tecidos doentes por TFD.

De uma maneira geral, os resultados indicaram que tanto as características físico-químicas e estruturais da droga, como a forma de administração (livre ou encapsulada) são fatores que influenciam diretamente na incorporação e localização celular e que, por consequência, tem relação direta com a eficiência fotodinâmica e o mecanismo de morte desencadeado.

Assim, a síntese de novos fotossensibilizadores com propriedades adequadas e sua combinação com veículos que possam carregá-los pelos sistemas biológicos e permitir a sua interação/penetração em células tumorais, pode resultar em sistemas cada vez mais eficientes e seletivos, contribuindo para uma inovação nos protocolos clínicos atualmente empregados em TFD.

Capítulo 10. Referências Bibliográficas

10. Referências Bibliográficas

- [1] L.R. Milgron. The Colors of Life - An introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds. Oxford: Oxford University Press, (1997), 249p.
- [2] R.K. Murray. Harper's Biochemistry Connecticut: Appleton & Lange, (2000), 785p.
- [3] D.L. Nelson, M.M. Cox. Lehninger Principles of Biochemistry. New York: WH Freeman, 4 ed (2005) 1119p.
- [4] A.D. Adler, F.R. Longo, J.D. Finarell, J. Goldmach, J. Assour, L. Korsakof. J. Org. Chem., 32 (1967) 476-479.
- [5] D.O. Cheng, E. Legoff, Tetrahedron Lett., (1977) 1469-1472.
- [6] F. M. Engelmann, H. Winnischofer, K. Araki, H.E. Toma, J. Porphyrins and Phthalocyanines, 6 (2002) 33-42.
- [7] J.C.P. Grancho, M.M. Pereira, M.D. Miguel, A.M.R. Gonsalves, H.D. Burrows, Photochem. Photobiol., 75 (2002) 249-256.
- [8] J.M. Lehn, Angew. Chem., Int. Ed., 27 (1988).
- [9] J.M. Lehn, Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives, New York: VHC, (1995).
- [10] J.M. Lehn. Supramolecular chemistry: Receptors, catalysts and carriers, Science, 227 (1985) p.849.
- [11] C.J. Pedersen, J.M. Lehn and D.J. Cram, J. Inclusion Phenom. 6 (1988), pp. 337–350.
- [12] K. Araki, H.E. Toma, N4-Macrocyclic Metal Complexes. New York: Springer, (2006) 255-314.
- [13] D. Dolphin, T.G. Traylor, L.Y. Xie, Acc. Chem. Res., 30 (1997) 251-259.

- [14] S.K. Pushpan, S. Venkatraman, V.G. Anand, J. Sankar, D. Parmeswaran, S. Ganesan, T.K. Chandrashekar, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, 2 (2002) 187-207.
- [15] R. Bonnett, *Chemical aspects of photodynamic therapy*, London: Gordon and Breach Science Publishers, (2000) 305p (*Advanced chemistry texts*, v.301).
- [16] <http://www.qlight.info/?q=en/node/219>, Acessado em 10 de maio de 2011.
- [17] T.J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, 58 (1993) 895-900.
- [18] A.E.d.H. Machado, *Quim. Nova*, 23 (2000) 237-243.
- [19] F.I. Simplício, F. Maionchi, N. Hioka, *Quim. Nova*, 25 (2002) 801-807.
- [20] H. Von Tappeiner, A. Jesionek, *Muench. Med. Wochenschr.*, 47 (1903) 2042-2046.
- [21] A.C.R. Policard, *Soc. Biol.*, 91 (1924) 1423-1427.
- [22] S.K. Schwartz, K. Absolon, H. Wermund, *University of Minnesota Med. Bull.*, 7 (1955) 27-30.
- [23] W.M. Sharman, C.M. Allen, J.E. van Lier, *Drug Discov. Today*, 4 (1999) 507-517.
- [24] T. Martijn, e. al., *The Oncologist*, 11 (2006) 1034-1044.
- [25] R.R. Allison, H.C. Mota, V.S. Bagnato, C.H. Sibata, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 5 (2008) 19-28.
- [26] G.I. Stables, D.V. Ash, *Cancer Treat. Rev.*, 21 (1995) 311-323.
- [27] C. Hopper, *Lancet Oncol*, 1 (2000) 212-219.
- [28] K.M. Kadish, B.G. Maiya, C. Araullo-Cadams, *J. Phys. Chem.-Us*, 95 (1991) 427-431.
- [29] K. Araki, C.A. Silva, H.E. Toma, L.H. Catalani, M.H.G. Medeiros, P.D. Mascio, J. *Inorg. Biochem.*, 78 (2000) 269-273.
- [30] I. Mayer, e. al., *Inorg. Chim. Acta*, 358 (2005) 2629-2642.
- [31] A.F. Nogueira, A.L. Formiga, H. Winnischofer, M. Nakamura, F.M. Engelmann, K. Araki, H.E. Toma, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3 (2004) 56-62.
- [32] J. Onuki, et. al., *Photochem. Photobiol.*, 63 (1996) 272-277.

- [33] J.L. Ravanat, J. Cadet, K. Araki, H.E. Toma, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, *Photochem. Photobiol.*, 68 (1998) 698-702.
- [34] H.E. Toma, K. Araki, *Coord. Chem. Rev.*, 196 (2000) 307-329.
- [35] D.M. Tomazela, F.C. Gozzo, I. Mayer, R.M. Engelmann, K. Araki, H.E. Toma, M.N. Eberlin, *J. Mass Spectrom.*, 39 (2004) 1161-1167.
- [36] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.L. Viriot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob, *Trends Biotechnol.*, 26 (2008) 612-621.
- [37] C. Hopper, *Lancet Oncology*, 1 (2000) 212-219.
- [38] E. Paszko, C. Ehrhardt, M.O. Senge, D.P. Kelleher, J.V. Reynolds, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, doi:10.1016/j.pdpdt.2010.12.001 (2011).
- [39] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart, *Oncologist*, 11 (2006) 1034-1044.
- [40] S.I. Moriwaki, J. Misawa, Y. Yoshinari, I. Yamada, M. Takigawa, Y. Tokura, *Photodermatol., Photoimmunol. Photomed.*, 17 (2001) 241-243.
- [41] F.M. Engelmann, Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, (2005).
- [42] F.M. Engelmann, S.V.O. Rocha, H.E. Toma, K. Araki, M.S. Baptista, *Int. J. Pharm.*, 329 (2007) 12-18.
- [43] F.M. Engelmann, I. Mayer, D.S. Gabrielli, H.E. Toma, A.J. Kowaltowski, K. Araki, M.S. Baptista, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 39 (2007) 175-185.
- [44] H. Furuta, T. Asano, T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 767-768.
- [45] P.J. Chmielewski, L. Latos-Grazynski, K. Rachlewicz, T. Glowink, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 33 (1994).
- [46] H. Furuta, T. Ishizuka, A. Osuka, T. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (2000) 5748-5757.

- [47] K. Araki, F.M. Engelmann, I. Mayer, H.E. Toma, M.S. Baptista, H. Maeda, A. Osuka, H. Furuta, Chem. Lett., 32 (2003) 244-245.
- [48] K. Araki, H. Winnischofer, H.E. Toma, H. Maeda, A. Osuka, H. Furuta, Inorg. Chem., 40 (2001) 2020-2025.
- [49] H. Furuta, T. Morimoto, A. Osuka, Org. Lett., 5 (2003) 1427-1430.
- [50] H. Furuta, T. Ogawa, Y. Uwatoko, K. Araki, Inorg. Chem., 38 (1999) 2676-2682.
- [51] F.M. Engelmann, e. al., J. Photochem. Photobiol. A, 163 (2004) 403-411.
- [52] H. Furuta, H. Maeda, A. Osuka, J. Am. Chem. Soc., 122 (2000) 803-807.
- [53] E. Reddi, J. Photochem. Photobiol. B, 37 (1997) 189-195.
- [54] V.P. Torchilin, Adv. Drug Delivery Rev., 58 (2006) 1532-1555.
- [55] Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allemann, J. Photochem. Photobiol. B, 66 (2002) 89-106.
- [56] S.R. Schaffazick, S.S.U. Guterres, L.D. Freitas, A.R. Pohlmann, Quim. Nova, 26 (2003) 726-737.
- [57] C. Silva, A. Ribeiro, D. Ferreira, F. Veiga, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 39 (2003) 1-19.
- [58] F.M. Menger, B.M. Sykes, Langmuir, 14 (1998) 4131-4137.
- [59] C.H. Bamford, H. Tompa, Trans. Faraday Soc., 46 (1950) 310-316.
- [60] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Int. J. Pharm., 385 (2010) 113-142.
- [61] Z.J. Dong, A. Toure, C.S. Jia, X.M. Zhang, S.Y. Xu, J. Microencapsulation, 24 (2007) 634-646.
- [62] W. Dong, R. Bodmeier, Int. J. Pharm., 326 (2006) 128-138.
- [63] N.V.N. Jyothi, M. Prasanna, S. Prabha, P.S. Ramaiah, G. Srawan, S.N. Sakarkar Internet J. Nanotechnol., 3 (2009).
- [64] S. Gouin, Trends Food Sci. Technol., 15 (2004) 330-347.

- [65] M. Kovochich, T. Xia, J. Xu, J.I. Yeh, A.E. Nel, *Environment Nanotechnology - Applications and Impacts of Nanomaterials*. New York: McGraw-Hill, (2007) 205-229.
- [66] C. Buzea, I.I. Pacheco, K. Robbie, *Biointerphases*, 2 (2007) 17-71.
- [67] G.J. Nohynek, E.K. Dufour, M.S. Roberts, *Skin Pharmacol. Phys.*, 21 (2008) 136-149.
- [68] G. Blundell, W.J. Henderson, E.W. Price, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 83 (1989) 381-385.
- [69] M. Corachan, *Med. Clin. (Barcelona)*, 91 (1988) 97-100.
- [70] S.S. Tinkle, J.M. Antonini, B.A. Rich, J.R. Roberts, R. Salmen, K. DePree, E.J. Adkins, *Environ. Health Perspect.*, 111 (2003) 1202-1208.
- [71] R. Toll, U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, J. *Invest. Dermatol.*, 123 (2004) 168-176.
- [72] L. Xiao, H. Takada, K. Maeda, M. Haramoto, N. Miwa, *Biomed. Pharmacother.*, 59 (2005) 351-358.
- [73] K.F. Soto, A. Carrasco, T.G. Powell, K.M. Garza, L.E. Murr, J. *Nanopart. Res.*, 7 (2005) 145-169.
- [74] A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, *Science*, 311 (2006) 622-627.
- [75] N. Li, C. Sioutas, A. Cho, D. Schmitz, C. Misra, J. Sempf, M.Y. Wang, T. Oberley, J. Froines, A. *Environ. Health Perspect.*, 111 (2003) 455-460.
- [76] C. Carlson, S.M. Hussain, A.M. Schrand, L.K. Braydich-Stolle, K.L. Hess, R.L. Jones, J.J. Schlager, *J. Phys. Chem. B*, 112 (2008) 13608-13619.
- [77] A.M. Schrand, L.K. Braydich-Stolle, J.J. Schlager, L.M. Dai, S.M. Hussain, *Nanotechnology*, 19 (2008) -.
- [78] J.R. Gurr, A.S.S. Wang, C.H. Chen, K.Y. Jan, *Toxicology*, 213 (2005) 66-73.
- [79] S.M. Hussain, L.K. Braydich-Stolle, A.M. Schrand, R.C. Murdock, K.O. Yu, D.M. Mattie, J.J. Schlager, M. Terrones, *Adv. Mater.*, 21 (2009) 1549-1559.

-
- [80] N.L. Oleinick, Photodynamics News, 6 (1998) 8-9.
- [81] B. Alberts, Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre: Artmed 5. ed. (2010) 1115-1128.
- [82] M. Jacobson, N. McCarthy, Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death. New York: Oxford, (2002) 1-8.
- [83] G. Kroemer, B. Dallaporta, M. Resche-Rigon, Annu. Rev. Physiol., 60 (1998) 619-642.
- [84] A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Photodiagn. Photodyn. Ther., 2 (2005) 1-23.
- [85] E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis, Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer, 1776 (2007) 86-107.
- [86] <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2007/11/microbial-socio.html>, Data de acesso: 02 de março de 2011.
- [87] X.Y. He, R.A. Sikes, S. Thomsen, L.W.K. Chung, S.L. Jacques, Photochem. Photobiol., 59 (1994) 468-473.
- [88] B.B. Noodt, K. Berg, T. Stokke, Q. Peng, J.M. Nesland, Br. J. Cancer, 74 (1996) 22-29.
- [89] S. Nagata, A. Obana, Y. Gohto, S. Nakajima, Lasers Surg. Med., 33 (2003) 64-70.
- [90] X.H. Chen, P. Zhao, F.S. Chen, L.B. Li, R.C. Luo, Laser Med. Sci., 26 (2011) 69-78.
- [91] N.L. Oleinick, R.L. Morris, T. Belichenko, Photochem. Photobiol. Sci., 1 (2002) 1-21.
- [92] J.Y. Chen, N.H. Cheung, M.C. Fung, J.M. Wen, W.N. Leung, N.K. Mak, Photochem. Photobiol., 72 (2000) 114-120.
- [93] W.H. Lei, J.F. Xie, Y.J. Hou, G.Y. Jiang, H.Y. Zhang, P.F. Wang, X.S. Wang, B.W. Zhang, J. Photochem. Photobiol. B, 98 (2010) 167-171.
- [94] D. Kessel, Y. Luo, J. Photochem. Photobiol. B, 42 (1998) 89-95.
- [95] D. Kessel, Y. Luo, Cell Death Differ., 6 (1999) 28-35.
- [96] D. Kessel, Y. Luo, Y.Q. Deng, C.K. Chang, Photochem. Photobiol., 65 (1997) 422-426.

- [97] A.T. Hoye, J.E. Davoren, P. Wipf, M.P. Fink, V.E. Kagan, *Acc. Chem. Res.*, 41 (2008) 87-97.
- [98] D. Kessel, M. Antioiovich, K.M. Smith, *Photochem. Photobiol.*, 74 (2001) 346-349.
- [99] D. Kessel, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1 (2002) 837-840.
- [100] A.F. Uchoa, C.S. Oliveira, M.S. Baptista, J. Porphyrins Phthalocyanines, 14 (2010) 832-845.
- [101] E.B. Fleischer, A.M. Shachter, *Inorg. Chem.*, 30 (1991) 3763-3769.
- [102] K. Berg, M.B. Hansen, S.E. Nielsen, *Apmis*, 98 (1990) 156-162.
- [103] <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>. Data de acesso: 05 de setembro de 2010.
- [104] A. Stone, E.B. Fleischer, *J. Am. Chem. Soc.*, 90 (1968) 2735-2748.
- [105] G.R. Friedermann, Curitiba: Tese (Doutorado em "Química Inorgânica"), Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, (2005) 195p.
- [106] M. Gouterman, In "The Porphyrins"; Dolphin, D., New York: Academic Press, 3ed (1979).
- [107] F.M. Engelmann, São Paulo: Dissertação (Mestrado em "Química Inorgânica"), Universidade de São Paulo, (2001) 108p.
- [108] V.P.d. Barros, Ribeirão Preto: Dissertação (Mestrado em "Química"), Departamento de Química, Universidade de São Paulo., (2003) 112p.
- [109] D. Dolphin, *The Porphyrins - Structure and Synthesis*. New York: Academic Press, 1ed (1978) 643.
- [110] M.E. Milanesio, M.G. Alvarez, E.I. Yslas, C.D. Borsarelli, J.J. Silber, V. Rivarola, E.N. Durantini, *Photochem. Photobiol.*, 74 (2001) 14-21.
- [111] D.J. Quimby, F.R. Longo, *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 5111-5117.
- [112] K.S. Mayya, A. Bhattacharyya, J.F. Argillier, *Polym. Int.*, 52 (2003) 644-647.

- [113] N. Nihant, C. Grandfils, R. Jerome, P. Teyssie, J. Control. Release, 35 (1995) 117-125.
- [114] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, Small, 4 (2008) 26-49.
- [115] A.W. Girotti, J. Photochem. Photobiol. B, 63 (2001) 103-113.
- [116] I. Vermes, C. Haanen, C. Reutelingsperger, J. Immunol. Methods, 243 (2000) 167-190.
- [117] M.D. Klaus, Cancer Immunol. Immunother., 53 (2004) 153-159.
- [118] D. Kessel, R.D. Poretz, Photochem. Photobiol., 71 (2000) 94-96.

Súmula Curricular

Súmula Curricular

i. DADOS PESSOAIS

Nome: Daiana Kotra Deda Nogueira

Nascido em 23/07/1985 na cidade de Irati-PR.

ii. EDUCAÇÃO

2007 - Atual Doutorado em Química (Química Inorgânica), Encapsulamento de Pigmentos Fotoativos Visando Aplicações em Terapia Fotodinâmica, USP, São Paulo, Brasil.

2003 – 2006 Graduação em Química Licenciatura e Bacharelado. Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, Paraná, Brasil.

2000 – 2002 Ensino Médio Colégio São Vicente de Paulo, Irati, Paraná, Brasil

iii. OCUPAÇÃO

2007 – Atual: Bolsista de Doutorado, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

2007 – 2007 Bolsista de Mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

2009 - 2009 Estágio supervisionado em docência no programa de aperfeiçoamento em ensino. Disciplina QFL-0605 - Química Geral. Curso: Geologia. Supervisor: Prof. Dr. Harrald Victor Linnert. Carga horária: 6h.

2009 - 2009 Estágio supervisionado em docência no programa de aperfeiçoamento em ensino. Disciplina QFL-2426 - Físico-Química XVII. Curso: Engenharia Química. Supervisor: Prof^ª.

Dra. Márcia Temperini. Carga horária: 6h.

2008 - 2008 Estágio supervisionado em docência no programa de aperfeiçoamento em ensino.

Disciplina QFL-0230 – Química Analítica. Curso: Farmácia. Supervisor: Prof^a. Dra. Maria Encarnacion V. Suárez-Iha. Carga horária: 6h.

2008 - 2008 Estágio supervisionado em docência no programa de aperfeiçoamento em ensino.

Disciplina QFL-3100 – Introdução à Estrutura da Matéria. Curso: Química. Supervisor: Prof. Dr. Hermi F. de Brito. Carga horária: 6h.

iv. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. D. K. DEDA, C. Pavani, E. Carita, M. S. Baptista, H. E. Toma and K. Araki, *Correlation of Photodynamic Activity and Singlet Oxygen Quantum Yields in Two Series of Hydrophobic Monocationic Porphyrins*. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, v. 15 (11/12), 2011.
2. D. K. DEDA; A. F. Uchoa; E. Caritá; M. S. Baptista; H. E. Toma; K. Araki. *A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment*. International Journal of Pharmaceutics, v. 376, p. 76-83, 2009.
3. J. L. S. Gonçalves; D. K. DEDA; T. T. Tominaga. *Agregação da Porfirina Aquo-solúvel Meso-tetrakis(4-fenilsulfonato) na Presença da Albumina de Soro Bovino*. Revista Ciências Exatas e Naturais (Impresso), v. 11, p. 191-208, 2009.
4. T. T. Tominaga; D. K. DEDA; C. P. F. Borges. *Estudos Espectroscópicos da Porfirina Aniônica Hidrossolúvel Meso-tetrakis (p-fenilsulfonato) em Meio Micelar*. Revista de Ciências Exatas e Naturais, v. 9, p. 9-21, 2007.

v. PEDIDOS DE PATENTES

1. D. K. DEDA; E. Caritá; M. S. Baptista; H. E. Toma; K. Araki. *Formulações poliméricas para tratamento de tumores de pele por terapia fotodinâmica*. 2010. P. I. 1.001.299-0.

vi. ARTIGOS SUBMETIDOS

1. P. M. Lalli, B. A. Iglesias, D. K. DEDA, H. E. Toma, K. Araki and M. N. Eberlin, *Resolution of Isomeric Multi-Ruthenated Porphyrins by Travelling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry*, Rap. Commun. Mass Spectr.
2. D. K. DEDA, C. Pavani, E. Caritá, H. E. Toma, M. S. Baptista, K. Araki. *Influence of encapsulation on the cytolocalization of a Monocationic porphyrin and cell death mechanism*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

vii. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (COMPLETO)

1. D. K. DEDA; H. Imasato; T. T. Tominaga. Estudos espectroscópicos da porfirina aniônica *meso*-tetrakis (p-fenilsulfonato) em função do pH e da interação com albumina de soro bovino. In: XV Encontro Anual de Iniciação Científica e VI Encontro de Pesquisa da UEPG, 2006, Ponta Grossa-PR.

viii. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

1. D. K. DEDA, C. Pavani, M. S. Baptista, H. E. Toma, K. Araki. Porfirinas monocatiônicas nanoencapsuladas: uma avaliação da eficiência fotodinâmica e formação de oxigênio singlete. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.

2. B. A. Iglesias, D. K. DEDA, K. Araki, M. O. Senge. Síntese e caracterização de Porfirinas Trans-Substituídas: Novos Fotossensibilizadores para Terapia-Fotodinâmica (PDT). In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
3. M. K. Uchiyama, D. K. DEDA, K. Araki, S. M. Bolonheis, S. H. P. Farsky, Efeitos citotóxicos de nanopartículas de ouro conjugadas a biomoléculas em leucócitos circulantes humanos. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
4. D. K. DEDA, M. F. Huila, C. Pavani, E. Caritá, M. S. Baptista, H. E. Toma, K. Araki. Interaction of Polymeric Micro/Nanoencapsulated Monocationic Porphyrin with HeLa Cells by Fluorescence Spectroscopy and Confocal Fluorescence Microscopy. In: PITTCON-Conference and Expo 2010, 2010, Orlando. EUA.
5. D. K. DEDA, E. Carita, M. S. Baptista, H. E. Toma, K. Araki. Photo and Cytotoxicity of Two Polymeric Nanocapsule Formulations with Potential Application in Photodynamic Therapy. In: Meeting on Nanotechnology, Liposome and Health, 2009, Itaparica.
6. D. K. DEDA, A. F. Uchoa, M. S. Baptista, H. E. Toma, K. Araki. Avaliação da Fotoatividade in vitro da Porfirina 3MMe Encapsulada em Micro e Nanocápsulas Poliméricas. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.
7. D. K. DEDA, A. F. Uchoa, M. S. Baptista, H. E. Toma, K. Araki. Avaliação da Fotoatividade in vitro da Porfirina 3MMe Encapsulada em Micro e Nanocápsulas Poliméricas. In: 1º Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Química - USP, 2009, São Paulo.
8. D. K. DEDA, E. Carita, H. E. Toma, K. Araki. Encapsulation of hydrophobic porphyrin in polymeric micro and nanocapsules. In: XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry and I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry, 2008, Foz do Iguaçu.
9. D. K. DEDA, E. Carita, H. E. Toma, K. Araki. Influence of surfactant concentration

on the size distribution of capsules obtained by coacervation. In: XIV Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry and I Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry, 2008, Foz do Iguaçu.

10. D. K. DEDA, H. Imasato, T. T. Tominaga. Estudos espectroscópicos da interação da porfirina aniônica *meso*-tetrakis (*p*-fenilsulfonato) com albumina de soro bovino. In: IV Semana de Estudos de Física, 2006, Guarapuava-PR.

11. D. K. DEDA, H. Imasato, T. T. Tominaga. Estudos espectroscópicos da interação da porfirina aniônica *meso*-tetrakis (*p*-fenilsulfonato) com albumina de soro bovino. In: 13ª Jornada Nacional de Iniciação Científica - 58ª Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis-SC.

12. D. K. DEDA, T. T. Tominaga. Estudos da potencialidade da porfirina aquo-solúvel *meso*-tetrakis (*p*-fenilsulfonato) na Terapia Fotodinâmica. In: XVIII Seminário de Pesquisa, XIII Semana de Iniciação Científica e I Jornada Paranaense de Grupos PET, 2006, Guarapuava-PR.

13. D. K. DEDA, R. S. Barbieri, K. Araki, T. T. Tominaga. Síntese e estudo espectroscópico da porfirina *meso*-tetrakis (N-metil-3-piridil)-Mn³⁺ em função do pH e da interação com micelas iônicas. In: 14ª SBQSul - Química na Sociedade: significados e implicações, 2006, Erechim-RS.

14. D. K. DEDA, T. T. Tominaga, C. P. F. Borges. Estudos espectroscópicos da porfirina aniônica hidrossolúvel *meso*-tetrakis (*p*-fenilsulfonato), em meio micelar. In: XVIII Seminário de Pesquisa, XIII Semana de Iniciação Científica e I Jornada Paranaense de Grupos PET, 2006, Guarapuava.

15. D. K. DEDA, C. P. F. Borges, T. T. Tominaga. Efeito de surfactantes iônicos e zwitteriônicos na transição monômero-dímero de Mn-porfirinas. In: XIV Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC, 2005, Guarapuava-PR.

16. D. K. DEDA, T. T. Tominaga, C. P. F. Borges. Efeito de surfactantes iônicos e zwiteriônicos na transição monômero-dímero de Mn-porfirinas. In: XVII Seminário de Pesquisa, XII Semana de Iniciação Científica e I Jornada Regional Sul de Grupos PET, 2005, Guarapuava-PR.
17. D. K. DEDA, T. T. Tominaga, C. P. F. Borges. Efeito de surfactantes iônicos e zwiteriônicos na transição monômero-dímero de Mn-porfirinas. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.
18. G. M. L. Moreira, D. K. DEDA, T. T. Tominaga, C. P. F. Borges. Interação das porfirinas TPPS₄ e TMPyP com micelas iônicas: uma avaliação utilizando UV-Vis. In: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas.
19. T. T. Tominaga, D. K. DEDA, H. Imasato. Influência do pH nos espectros eletrônicos e de dicroísmo circular magnético da porfirina *meso*-tetrakis (*p*-fenilsulfonato). In: XIII Encontro de Química da Região Sul, 2005, Florianópolis.
20. D. K. DEDA, J. C. Moraes, C. P. F. Borges, T. T. Tominaga. Influência dos surfactantes iônicos e zwiteriônicos na transição monômero - dímero da MnTMPyP: Um estudo por absorção ótica. In: XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava-PR.
21. D. K. DEDA, T. T. Tominaga, J. C. Moraes, C. P. F. Borges. Determinação do pK de dimerização da porfirina catiônica *meso*- tetrakis (N- metil- 4-piridil)-Mn³⁺ na ausência e na presença de sds, hps e ctab. In: XIII Encontro Anual de Iniciação Científica, 2004, Londrina-PR.
22. D. K. DEDA, T. T. Tominaga, C. P. F. Borges, J. C. Moraes. Determinação do pK de dimerização da porfirina catiônica *meso*- tetrakis (N- metil-4- piridil)-Mn³⁺ na ausência e na presença de sds, hps e ctab. In: XVI Seminário da Pesquisa e XI Semana de Iniciação Científica da UNICENTRO, 2004, Guarapuava-PR.

23. E. M. Pizyblski, C. P. F. Borges, D. K. DEDA, J. C. Moraes, T. T. Tominaga. Determinação do pK de dimerização da porfirina catiônica *meso*-tetrakis (N-metil-4-piridil)-Mn³⁺ na ausência e na presença de surfactantes iônicos e zwitteriônicos. In: IV Encontro de Pesquisa da UEPG, 2004, Ponta Grossa.

ix. APRESENTAÇÃO DE TRABALHO/CONFERÊNCIA

1. D. K. DEDA. Derivados porfirínicos Nanoencapsulados como Fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica. Seminários da Pós-Graduação. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava, PR. 2010.
2. D. K. DEDA, M. K. Uchiyama, K. Araki. Efeito da concentração de PEG no encapsulamento de um derivado porfirínico hidrofóbico em micelas de AOT. 2007.
3. D. K. DEDA, H. Imasato, T. T. Tominaga. Estudos espectroscópicos da interação da porfirina aniônica *meso*-tetrakis (*p*-fenilsulfonato) em função do pH e da interação com albumina de soro bovino. 2006.
4. D. K. DEDA, T. T. Tominaga. Estudos espectroscópicos de porfirinas aquo-solúveis em sistemas biomiméticos. 2006.
5. D. K. DEDA, C. P. F. Borges, T. T. Tominaga. Estudos espectroscópicos da porfirina aniônica hidrossolúvel *meso*-tetrakis (*p*-fenilsulfonato), em meio micelar. 2006.
6. D. K. DEDA, T. T. Tominaga. Estudos da potencialidade da porfirina aquo-solúvel *meso*-tetrakis (*p*-fenilsulfonato) na Terapia Fotodinâmica. 2006.
7. D. K. DEDA, C. P. F. Borges, T. T. Tominaga. Efeito de surfactantes iônicos e zwitteriônicos na transição monômero-dímero de Mn-Porfirinas. 2005.
8. D. K. DEDA, C. P. F. Borges, T. T. Tominaga. Efeito de surfactantes iônicos e zwitteriônicos na transição monômero-dímero de Mn-Porfirinas. 2005.