Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Preparação, caracterização e propriedades de lipossomas contendo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o agente fotossensibilizador AICIPc: Um novo sistema carreador específico com ação sinérgica aplicado a terapia fotodinâmica”

Italo Rodrigo Calori

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Preparação, caracterização e propriedades de lipossomas contendo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o agente fotossensibilizador AICIPc: Um novo sistema carreador específico com ação sinérgica aplicado a terapia fotodinâmica”

Italo Rodrigo Calori

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Calori, Italo Rodrigo

Preparação, caracterização e propriedades de lipossomas contendo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o agente fotossensibilizador ALCIPc: Um novo sistema carreador específico com ação sinérgica aplicado a terapia fotodinâmica. Ribeirão Preto, 2016.

123 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Lipossoma. 2. Ftalocianina de alumínio-cloro. 3. α -ciano-4-hidroxicinâmico. 4. Terapia fotodinâmica.

Agradecimentos

Há quase dez anos eu ingressei no mundo da Química. O motivo pelo qual iniciei e continuo meus estudos em Química está intimamente imbricado ao meu inexorável fascínio frente às particularidades das dimensões atômicas. Sou um eterno amante do mundo invisível a insciência. Ao ser apresentado à matemática avançada, no primeiro ano de graduação, comecei a observar que poderia ir além das exterioridades e construir conhecimento de maneira elegante e eficaz. Empirista quando experimental e racionalista quando teórico, hoje, sobretudo, sou um dualista. Percebo que é plausível extrair mais conclusões com lápis e papel do que os químicos costumam acreditar. Particularmente, me impressiona o encontro empírico-teórico. A exclusividade empírica da primeira lei da termodinâmica alinhada à peculiar definição teórica de entropia é uma das mais elegantes e eficazes demonstrações desta combinação. Talvez este seja o principal motivo de meu fascínio pela termodinâmica, minha maior paixão após a fotofísica.

No presente momento fui capaz de finalizar meu trabalho de dissertação. Entretanto, este trabalho tem recebido importantes contribuições de muitas pessoas envolvidas no seu desenvolvimento. Eu gostaria de agradecer a todos. Muitos destes com importantes contribuições não somente na realização desta pesquisa, mas ainda em minha vida privada. Impossível citar todos os nomes responsáveis pelo estado da arte da Química Moderna, mas este trabalho não se sustentaria sem suas imprescindíveis contribuições. Aos humanamente citáveis, primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe, Luiza Calori, que arduamente forneceu todos os suportes físicos, emocionais e financeiros para o início e continuação dos meus estudos e aos demais familiares não menos importantes em minha jornada. Ao meu orientador de dissertação, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, que prontamente me aceitou em seu grupo de pesquisa, me concedeu liberdade de trabalho e que, a cada vez que a luz no fim do túnel parecia diminuída, me amparou acendendo uma vela ao lado. Sou muito grato pelo seu apoio.

Durante minha graduação, por três anos tive o prazer de desenvolver um projeto de iniciação científica no Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF) da Universidade Estadual de Maringá. Lá obtive grande parte dos meus conhecimentos em fotofísica e físico-química, fiz grandes amigos e companheiros de profissão. O grupo NUPESF sempre esteve de portas abertas quando necessitei de suporte. Sou profundamente grato aos coordenadores do NUPESF profs. Dr. Wilker Caetano e Dr. Noboru Hioka. Ainda, meus sinceros agradecimentos aos membros e, acima de tudo, amigos do CNET: Emanuel, Dr. Fernando, Maryanne, as “Nathalias” (Ribeirão e Rio Preto), Nayara, Graciely, Jaqueline, Olimpia, Patrícia, Tácia, Camila e, em especial, aos meus amigos Jayme, Dr. Barcelos e Diogo. Por fim, gostaria de destacar meus agradecimentos aos profs. Dr. Iouri Borissevitch e Dr. Amando Ito pelos valiosos conhecimentos compartilhados e por disponibilizarem gentilmente seus laboratórios e equipamentos todas as vezes que necessitei.

Este trabalho é dedicado à minha mãe.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci.

Resumo

CALORI, I. R Preparação, caracterização e propriedades de lipossomas contendo o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e o agente fotossensibilizador AlClPc: Um novo sistema carreador específico com ação sinérgica aplicado a terapia fotodinâmica. 2016. 123f Dissertação de (mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Ftalocianina de alumínio-cloro (AlClPc) é um fotossensibilizador de segunda geração em terapia fotodinâmica (TFD) caracterizado por seu caráter anfifílico e tendência de auto-agregação em meio aquoso, o que prejudica seu potencial de aplicação. O aChC é um substrato de transportadores de monocarboxilato (MCT) superexpresso em células de MCF-7. Objetivando a solubilização da AlClPc e aumento de internalização em tecidos neoplásicos nos propomos aqui o uso de DSPC e DOPC em diferentes proporções para formar vesículas lipídicas mistas (LV) na presença de aChC como sistemas veiculadores de fármaco. Lv foi preparado pelo método de injeção etanólica e formou vesículas de dimensões nanométricas (aproximadamente 100 nm) com bom índice de polidispersão, valores negativos de potencial zeta e estáveis em meio aquoso por mais de 50 dias. AlClPc se complexou com o fosfato das LV o que conferiu uma localização interfacial às moléculas de AlClPc como demonstrado pelos resultados de supressão de fluorescência. Medidas de anisotropia, fluorescência estática e resolvida no tempo corroboram com estes resultados e demonstram que a auto-agregação da AlClPc ocorre mesmo em lipossomas. Entretanto, a veiculação da AlClPc por LV em carcinoma de células escamosas oral (OSCC) levou a um processo de desagregação demonstrado por (FLIM). Este incrível comportamento é novo e aumenta o conhecimento científico sobre o mecanismo intracelular de ação de fotossensibilizadores em TFD. Em TFD, ambos os sistemas LVIII+AlClPc e LVIII+AlClPc+ α ChC não apresentaram toxicidade no escuro no período de incubação de 3 h com as concentrações de lipídios, AlClPc e α ChC iguais a $0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. De maneira inesperada, o sistema LVIII+AlClPc foi mais eficiente em TFD que o sistema LVIII+AlClPc+ α ChC, devido ao caráter antioxidante do α ChC. Estes resultados abrem uma nova perspectiva do potencial uso de LV-AlClPc para o tratamento fotodinâmico.

Abstract

CALORI, I. R Preparation, characterization and properties of liposomes containing the α -cyano-4-hydroxycinnamic acid and the photosensitizer agent AlClPc: A new specific carrier system with synergistic action applied to photodynamic therapy. 2016. 123f Dissertation (master). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Aluminum phthalocyanine chloride (AlClPc) is a second-generation photodynamic therapy (PDT) photosensitizer characterized for its high hydrophobicity and self-aggregation tendency in aqueous media, which hampers its potential application. The α CHC is a monocarboxylate transporter substrate (MCT) overexpressed in MCF-7 line cell. Aiming at AlClPc solubilization and uptake increase we proposed here the use of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) at different proportions to form mixed lipid vesicles (LV) in presence of α CHC as a drug delivery system. LV were prepared by ethanol injection method and formed nano-sized vesicles (about 100 nm) with suitable polydispersity index, negative zeta potential, and stable in aqueous medium for at least 50 days. AlClPc strongly interacts with LV (high binding constant values), especially due to aluminum-phosphate specific interactions, which gives a surface localization to AlClPc molecules as demonstrated by fluorescence quenching data. Anisotropy, static and time-resolved fluorescence measurements corroborated with these results and demonstrated that AlClPc self-aggregation occurred even in the liposomes. However, formulation uptake by oral squamous cell carcinoma (OSCC) the AlClPc suffered a disaggregation process demonstrated by fluorescence life-time imaging microscopy. This amazing behavior is new and increases the scientific knowledge about the intracellular mechanism of action of PDT photosensitizers. In PDT, both systems LV_{III}+AlClPc e LV_{III}+AlClPc+ α CHC did not show toxicity in the dark at 3 h incubation period with lipid, AlClPc, and α CHC concentrations equal at $0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, and $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectively. Unexpectedly, the system LV_{III}+AlClPc was more effective in PDT than the LV_{III}+AlClPc+ α CHC, devido ao caráter antioxidante do α CHC due to the antioxidant character of α CHC. These results open a new perspective to the potential use of AlClPc-LV formulations for photodynamic treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Jablonski modificado. As setas lineares indicam processos radiativos enquanto as setas curvas indicam processos não radiativos. As duas setas que levam ao tipo I e II representam processos de transferência de elétrons (tipo I) e transferência de energia (tipo II) do estado tripleto para substratos biológicos.	21
Figura 2. Estrutura base das ftalocianinas.	25
Figura 3. Estrutura molecular da ftalocianina de alumínio cloro.	26
Figura 4. Modelo do mosaico fluido para a membrana celular (Extraído de Singer; Nicolson, 1972).	27
Figura 5. Bicamada de glicerofosfolípido.	28
Figura 6. Estrutura molecular do 1,2-distearoil-sn-glicero-3-phosphocholina (A) e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-phosphocholina (B).	29
Figura 7. Vesícula lipídica unilamelar.	31
Figura 8. Modelo de transporte para o lactato em células de câncer. Adaptado de (DHUP et al., 2012).	32
Figura 9. Estrutura molecular do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α CHC).	33
Figura 10. Disposição clássica de um espectrofotômetro.	34
Figura 11. Vetor campo elétrico da radiação não polarizada (A) e vetor campo elétrico da radiação polarizada (B).	38
Figura 12. Sobreposição espectral, J , do espectro de emissão do doador com o espectro de absorção do aceptor.	44
Figura 13. Representação esquemática de uma partícula carregada negativamente, sua camada de Stern e camada difusa.	46
Figura 14. Espectro de absorção ($0,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) da AlClPc em etanol. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$	60
Figura 15. Espectro de absorção ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e emissão ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) normalizados da AlClPc em etanol. Detalhe do máximo de absorção e emissão no <i>insert</i> . Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$	61
Figura 16. Espectro de absorção da AlClPc em etanol na faixa de concentração de $0,13$ a $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Desvio da lei de Lambert-Beer da AlClPc em etanol no comprimento de onda de 672 nm (B). Relação linear entre a concentração de AlClPc e seus valores de absorção em 672 (C), 350 (D), 607 (E) e 642 nm (F) em etanol. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$	63
Figura 17. Espectros de fluorescência da AlClPc em etanol na faixa de concentração entre $0,43$ e $10,23 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Relação linear entre os valores de fluorescência máxima (676 nm)	

normalizada da AlClPc em etanol e sua concentração ($R^2 = 0.9998$) (B). Intensidade de fluorescência máxima (676 nm) normalizada da AlClPc em etanol em função da concentração com desvios de Lambert-Beer acima de $0,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (C). Fluorescência e RLS máximo (676 nm) normalizado da AlClPc em etanol em função da concentração (C). As linhas tracejadas indicam a relação linear entre a fluorescência e concentração de AlClPc em etanol e facilita a visualização do desvio de Lambert-Beer acima de $0,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.	65
Figura 18. Espectro de absorção da AlClPc ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em misturas água/etanol a 30 (—), 50 (—), 60 (—) e 70 (—) % de água (A). Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$	68
Figura 19. Decaimento de fluorescência (—) e ajuste teórico (—) da AlClPc em mistura binária água/etanol a 10 (A) e 90% (B) de água (v/v). Medidas a $24 (\pm 2) ^\circ\text{C}$.	69
Figura 20. Espectro de absorção do αCHC em água (tampão PBS, $\text{pH} = 7,4$ e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) na faixa de concentração entre $80,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Relação linear entre a intensidade de absorção em 233 (B) e 327 nm (C) do αCHC em água (tampão PBS, $\text{pH} = 7,4$ e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.	71
Figura 21. Espectro de absorção do αCHC em etanol na faixa de concentração de $0,8$ a $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Intensidade de absorção das bandas em 204 (B), 236 (C) e 328 (D) nm do αCHC em etanol (B). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$	72
Figura 22. Desvios de Stern-Volmer do αCHC em etanol a altas concentrações (acima de $1,6 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$) nos máximos de absorção em 236 (A) e 328 nm (B). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.	72
Figura 23. Intensidade máxima de absorção em função da concentração do αCHC em etanol na faixa de comprimento de onda de 236 a 242 nm (A) e 328 a 340 nm (B). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.	73
Figura 24. Espectro de absorção do αCHC em octan-1-ol na faixa de concentração entre $0,2$ e $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A). Intensidade de absorção em 212 (B), 240 (C) e 335 nm (D) do αCHC em octan-1-ol em função da concentração. Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.	74
Figura 25. Espectro de absorção do αCHC a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água (—, PBS, $\text{pH} 7,4$ e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), etanol (—) e octan-1-ol (—) (A). Espectro de absorção do αCHC a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água (---, PBS, $\text{pH} 7,4$ e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e em LV_{III} (—, $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de AlClPc ($3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) (B). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.	77
Figura 26. Anisotropia de fluorescência do DPH em vesículas lipídicas em função da temperatura. DSPC (A), LV_{I} (C), LV_{II} (E), LV_{III} (G). Segunda derivada da anisotropia do DPH em função da temperatura em DSPC (B), LV_{I} (D), LV_{II} (F), LV_{III} (H). Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, tampão PBS, $\text{pH} 7,4$ e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.	80

Figura 27. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico do LV _{III} na ausência (A) e presença (B) de AlClPc. Distribuição do potencial zeta do LV _{III} na ausência (C) e presença (D) de AlClPc. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico do LV _{III} +AlClPc na ausência (E) e presença (F) do α CHC. Distribuição do potencial zeta do LV _{III} +AlClPc na ausência (G) e presença (H) do α CHC. Medidas a 25 ($\pm$ 1) °C e μ = 1.0 mmol L ⁻¹ .	82
Figura 28. Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão dos LV _I (A), LV _{II} (B), LV _{III} (C) e LV _{IV} (D) a $0,9 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ na presença de AlClPc a $3,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ em função do tempo. Medidas a 25 ($\pm$ 1) °C e μ = 1.0 mmol L ⁻¹ .	83
Figura 29. Espectro de absorção da AlClPc ($4,84 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em etanol (—) e em tampão PBS, pH 7.4 e μ = 0.1 mol L ⁻¹ . (-•-) (A). Espectro de absorção da AlClPc ($3,00 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) nos LV _I (-■-), LV _{II} (-Δ-), LV _{III} (—) e LV _{IV} (□), pH 7,4 e μ = 0,1 mol L ⁻¹ (B). Medidas realizadas a 25 ($\pm$ 1) °C.	85
Figura 30. Absorção normalizada da AlClPc em LV _I (-○-), LV _{II} (-x-), LV _{III} (---) E LV _{IV} (—). LV dispersos em tampão PBS, pH 7,4 e μ = 0,1 mol L ⁻¹ . Medidas a 25 ($\pm$ 1) °C, tampão PBS, pH 7,4 e μ = 0.1 mol L ⁻¹ .	86
Figura 31. Intensidade de absorção da AlClPc em LV _{II} nos dias 1 (—) e 4 (---) (A) e LV _{III} nos dias 1 (—), 2 (---), 3 (■), 7 (□), 13 (▲), 18 () e 62 (▼) (B). LV dispersos em tampão PBS, pH 7,4 e μ = 0,1 mol L ⁻¹ . Medidas a 25 ($\pm$ 1) °C, tampão PBS, pH 7,4 e μ = 0.1 mol L ⁻¹ .	86
Figura 32. Valores máximos de absorbância da AlClPc em DSPC/DOPC/Chol (0.28:0.41:0.31) na presença (■) e ausência (○) de O ₂ . Medidas a 25 ($\pm$ 1) °C, tampão PBS, pH 7,4 e μ = 0.1 mol L ⁻¹ .	87
Figura 33. Tempo de vida de fluorescência longo da AlClPc e sua amplitude em misturas binárias água/etanol. Medidas a 24 ($\pm$ 2) °C.	89
Figura 34. Cinética de ligação por fluorescência da AlClPc ($0,3 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em LV _I ($1,75 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹)(Δ), DOPC (□) (A). Queda na intensidade de fluorescência após o alcance do patamar (B). Ajuste teórico da cinética de ligação por fluorescência da AlClPc ($0,3 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em LV _I (C), LV _{II} (D) e LV _{III} (E)([LV] = $1,75 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹). Ajuste teórico da cinética de ligação por absorção da AlClPc ($3,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em LV _I (F). Medidas a 25 ($\pm$ 1) °C, tampão PBS, pH 7,4 e μ = 0.1 mol L ⁻¹ .	90
Figura 35. Intensidade de fluorescência da AlClPc em função da concentração de LV _{III} na faixa de concentração entre $2,33 \times 10^{-6}$ e $1,17 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ (A). Intensidade máxima de fluorescência (~ 680 nm) normalizada com ajuste teórico da AlClPc em função da concentração de LV _I após 3 h (B),	

LV _{II} após 5 h (C) , LV _{III} após 9 (Δ) e 24 h (□) (D) e LV _{IV} após 5 h (E). Todos os LV foram dispersos em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$	94
Figura 36. Rendimento quântico de fluorescência da AlClPc ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em uma série de álcoois, em LV _{III} na presença e ausência de αCHC ($2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) (A) e em misturas binárias água/etanol (B) entre 0 a 50% de água (v/v). Medidas a $25 ^\circ\text{C}$	95
Figura 37. Gráfico de Stern-Volmer para a AlClPc nos LV na presença de diferentes concentrações de iodeto de sódio. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$	96
Figura 38. Intensidade de fluorescência da AlClPc ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em mistura binária água/etanol (4/6 [v/v]) na ausência (●) e presença de fluoreto (○, $14,41 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) (A). Intensidade de fluorescência da AlClPc ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV _{III} ($1,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência (●) e presença de fluoreto (○, $5,31 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) (A). O insert mostra a cinética de ligação da AlClPc no LV _{III} na ausência (●) e presença de fluoreto (○, $5,31 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$. LV _{III} em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$	97
Figura 39. Imagem de microscopia por tempo de vida de fluorescência (FLIM). Células de OSCC (A). Células de OSCC incubadas com AlClPc ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (B). Células de OSCC incubadas com AlClPc ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) formuladas em LV _{III} (C). Sinal de fluorescência relativo à amplitude do tempo de vida curto da AlClPc em células de OSCC (D). Sinal de fluorescência relativo à amplitude do tempo de vida longo da AlClPc em células de OSCC (E). Sobreposição dos sinais de fluorescência curto e longo da AlClPc em células de OSCC (F). A concentração de AlClPc empregada em todas as medidas foi de $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com tempo de incubação de 3 horas a 37°C , 5% de CO_2 e sob atmosfera úmida.....	99
Figura 40. Representação do mecanismo de agregação da AlClPc nos LVs em função do tempo e monomerização após entrega em células de OSCC.	101
Figura 41. Viabilidade celular de MCF-7 na presença de LV _{III} vazio (ausência de AlClPc) e sob ausência de luz. Tempo de incubação de 3 h.....	102
Figura 42. Viabilidade celular de MCF-7 na presença de AlClPc em LV _{III} na ausência de luz com tempo de incubação de 3 h.	102
Figura 43. Viabilidade celular da MCF-7 na presença de αCHC em diferentes concentrações formuladas em LV _{III} ($0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) contendo AlClPc ($0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Tempo de incubação de 3 h.	103
Figura 44. Viabilidade celular da MCF-7 na presença de AlClPc ($0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV _{III} ($0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e AlClPc ($0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) + αCHC ($10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV _{III} ($0,15 \times$	

10 ⁻³ mol L ⁻¹) com doses de luz de 40 × 10 ⁻³ J, 180 × 10 ⁻³ J e 318 × 10 ⁻³ J. Período de incubação de 3 h a 37° e 5% de CO ₂	104
Figura 45. Intensidade de absorção do ácido úrico (292 nm) em mistura água/etanol (4/6 v/v) em função do tempo. Irradiação (30 mW) da AlClPc em 670 nm na ausência (□) e presença (●) do αCHC. Medidas realizadas a 25 (± 1) °C.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficiente de absorção molar (ϵ) da AlClPc em etanol. Medidas a 25 (± 1) °C e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	64
Tabela 2. Tempo de vida de fluorescência da AlClPc em diferentes concentrações em etanol. Medidas a 24 (± 2) °C.	66
Tabela 3. Tempos de vida da AlClPc em misturas água-etanol. Comprimento de onda de excitação em 640 nm, 24 (± 2) °C.....	69
Tabela 4. Coeficiente de absorção molar (ϵ) do α CHC em água (tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), etanol e octan-1-ol a 25 °C.	75
Tabela 5. Valores de absorção máxima na fase aquosa e octanólica, K_p e $\log K_p$ do α CHC em mistura binária água/octa-1-ol a 25 °C.....	76
Tabela 6. Valores de anisotropia de fluorescência (r) do DPH ($[DPH] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) nos diferentes LV ($[LV] = 1,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ à 15 e 70 (± 1) °C.....	77
Tabela 7. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (ζ) dos LV na presença e ausência de AlClPc e α CHC em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas a 25 (± 1) °C.	82
Tabela 8. Tempos de vida da AlClPc ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em etanol e LV ($0,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com excitação em 640 nm. LV dispersos em tampão PBS, pH 7,4, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 25 (± 1) °C.	88
Tabela 9. Valores das constantes cinéticas de ligação da AlClPc ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV _I	91
Tabela 10. Valores das amplitudes das constantes cinéticas de ligação da AlClPc ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV _I	92
Tabela 11. Valores de constante de ligação da AlClPc nos diversos LV. LV dispersos em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas a 25 (± 1) °C.....	94
Tabela 12. Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) para a AlClPc ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV ($0,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)	97
Tabela 13. Dados de tempos de vida da AlClPc e suas amplitudes internalizada em linhagem celular OSCC em função do envelhecimento da formulação.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA: ácido desoxirribonucleico

INCA: instituto nacional de câncer José de Alencar Gomes da Silva

PF: Processos fotodinâmicos

FS: fotossensibilizador

¹FS: fotossensibilizador no estado fundamental singlete

¹FS* : fotossensibilizador no estado excitado singlete

³FS* : fotossensibilizador no estado excitado triplete

TFD: terapia fotodinâmica

FDA: do inglês = Food and Drug Administration

CI: conversão interna

CIS: cruzamento intersistemas

SB: substratos biológicos

EROs: espécies reativas de oxigênio

³O₂: oxigênio molecular

MFc: ftalocianinas metaladas

AlClPc: ftalocianina de alumínio-cloro

DSPC: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-phosphocolina

DOPC: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-phosphocolina

T_f: transição de fase

DDS: do inglês = Drug Delivery System

SUV: do inglês = Small Unilamellar Vesicles

LUV: do inglês = Large Unilamellar Vesicles

GUV: do inglês = Giant Unilamellar Vesicles

MCTs: transportadores de monocarboxilatos

αCHC: α-ciano-4-hidroxicinâmico

f: força do oscilador

n: índice de refração

ε: coeficiente de absorção molar

dν̄: diferencial do número de onda.

T: transmitância

A: absorbância

I₀: intensidades da radiação antes de atravessar a amostra

I: intensidades da radiação após atravessar a amostra

B: caminho ótico (cm)

C: concentração (mol L⁻¹)

LASER: do inglês = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

r: anisotropia de fluorescência

Γ_F: decaimento por fluorescência

Γ_p : decaimento por fosforescência
 Γ : taxa de decaimento radiativo
 k_{nr} : taxa de decaimento não radiativo
 k_T : taxa de decaimento total
 Φ_F : rendimento quântico de fluorescência
 Φ_{std} : rendimento quântico de fluorescência do padrão
 k_q : constante de supressão bimolecular
 k_{sv} : constante de Stern-Volmer
 $[Q]$: concentração de supressor
 K_s : constante de associação
FRET: do inglês = Fluorescence Resonance Energy Transfer
 F_d : intensidade de fluorescência do doador
J: Sobreposição espectral
 τ_d : tempo de vida de fluorescência do doador na ausência do acceptor
 k^2 : ângulo entre os dipolos de transição do doador e acceptor
 ϕ_d : rendimento quântico do doador na ausência do acceptor
 N_0 : numero de Avogadro.
 R_0 : distância de Forster
E: eficiência de transferência de energia
r: distância entre o par doador-acceptor
DLS: do ingles = Dynamic Light Scattering
PCS: do inglês = Photon Correlation Spectroscopy
B: linha de base da função de correlação em atraso infinito
 β : amplitude da função de correlação em atraso zero
D: coeficiente de difusão
 λ_0 : comprimento de onda no vácuo
K: constante de Boltzman
T: temperatura em Kelvin
 η : viscosidade do solvente
DDP: diferença de potencial elétrico
 U_E : mobilidade eletroforética
 ζ : potencial zeta
 ϵ : constante dielétrica
 $f(ka)$: função de Henry

SUMÁRIO

CAPITULO I	18
1 introdução	18
1.1 Câncer.....	18
1.1.1 Câncer de mama.....	18
1.2 Processos fotodinâmicos.....	19
1.3 Histórico da terapia fotodinâmica.....	20
1.4 Diagrama de Jablonski.....	21
1.5 Mecanismos de ação	23
1.5.1 Mecanismo do tipo I.....	23
1.5.2 Mecanismo do tipo II.....	24
1.6 Fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica.....	24
1.6.1 Ftalocianinas.....	24
1.6.2 Ftalocianina de cloro alumínio	25
1.7 Auto-agregados	26
1.7.1 Auto-agregados de ftalocianina de alumínio cloro	26
1.8 A membrana celular	27
1.8.1 Lipídios de membrana	28
1.9 Sistemas de veiculação de fármacos.....	29
1.10 Sistemas biomiméticos de membrana	30
1.6.3 Vesículas lipídicas	30
1.11 Acidose tumoral	31
1.12 Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico	32
CAPITULO II	33
2 CONCEITOS matemáticos	33
2.1 Espectroscopia de absorção eletrônica.....	34
2.1.1 Auto-agregados do tipo H e J	35
2.2 Espectroscopia de emissão de fluorescência.....	36
2.2.1 Deslocamento de Stokes	36
2.2.2 A regra de Kasha.....	36
2.2.3 Regra da imagem espelho	37
2.3 Anisotropia de fluorescência.....	37
2.4 Tempo de vida de fluorescência	39

2.4.1	Taxas de decaimento radiativo e não radiativo	40
2.5	Rendimento quântico de fluorescência	40
2.6	Supressão de fluorescência	40
2.6.1	A teoria da supressão dinâmica	41
2.6.2	A teoria da supressão estática	42
2.7	Transferência Ressonante de Energia de Fluorescência	43
2.8	Espalhamento de luz dinâmico	45
2.9	Potencial zeta	46
CAPITULO III		48
3	Objetivos	48
CAPITULO IV		49
4	materiais e métodos	49
4.1	Coeficiente de absorção molar da AICIPc em etanol	50
4.2	Coeficiente de absorção molar do α CHC em diferentes solventes	51
4.3	Coeficiente de partição do α CHC em água/octan-1-ol	51
4.4	Desvios da linearidade em medidas de fluorescência da AICIPc em etanol	51
4.5	Encapsulamento da AICIPc em vesículas lipídicas de DSPC:DOPC contendo colesterol.....	52
4.6	Tamanho de partícula e índice de polidispersão	52
4.7	Medida de potencial zeta.....	52
4.8	Rendimento quântico de fluorescência	52
4.9	Cinética de ligação da AICIPc nas vesículas lipídicas mistas.....	53
4.10	Avaliação da oxidação do DOPC nas vesículas lipídicas mistas.....	53
4.11	Anisotropia de fluorescência.....	53
4.12	Constante de ligação da AICIPc nos LV.....	54
4.13	Supressão de fluorescência da AICIPc em vesículas lipídicas mistas	54
4.14	Tempo de vida de fluorescência da AICIPc nas vesículas lipídicas mistas.....	54
4.15	Tempo de vida de fluorescência da AICIPc na mistura binária água/etanol.....	55
4.16	Avaliação da complexação alumínio (AICIPc)-fosfato (fosfolipídio).....	55
4.17	Crescimento e expansão das linhagens celular.....	55
4.18	Plaqueamento das linhagens celular	56
4.19	Internalização celular em carcinoma de células escamosa oral	56
4.19.1	Plaqueamento da linhagem celular.....	56
4.19.2	Incubação do LV _{III} +AICIPc em células de MCF-7.....	56
4.20	Ensaio de citotoxicidade em MCF-7	57

4.20.1	Citotoxicidade das vesículas lipídicas mistas	57
4.20.2	Citotoxicidade da AICIPc em vesículas lipídicas mistas	57
4.20.3	Citotoxicidade do α CHC em vesículas lipídicas mistas na presença de AICIPc.	57
4.20.4	Teste de MTT – Viabilidade celular	58
4.21	Ensaio de fototoxicidade em MCF-7	58
4.22	Avaliação do caráter antioxidante do α CHC	58
CAPITULO V		60
5	resultados e discussão.....	60
5.1	Ftalocianina de alumínio-cloro em meio homogêneo	60
5.1.1	Espectroscopia de absorção	60
5.1.2	Espectroscopia de fluorescência	61
5.1.3	Sobreposição espectral e transferência de energia	61
5.1.4	Desvios da lei de Lambert-Beer.....	62
5.1.5	Desvios da linearidade em fluorescência	64
5.1.6	Estudos de agregação.....	67
5.1	Estudos espectroscópicos do α CHC em meio homogêneo e em LV _{III}	70
5.1.1	Coeficiente de absorção molar do α CHC	70
5.2	Coeficiente de partição água/octan-1-ol	75
5.2.1	O efeito solvente	76
5.3	Ftalocianina de alumínio-cloro em vesículas lipídicas mistas	77
5.3.1	Caracterização das vesículas lipídicas mistas	77
5.3.2	Caracterização da AICIPc nas vesículas lipídicas mistas	84
5.4	Ensaio <i>in vitro</i>	98
5.4.1	Internalização em linhagem neoplásica	98
5.4.2	Citotoxicidade dos LV _{III} vazio	101
5.4.3	Citotoxicidade da LV _{III} +AICIPc	102
5.4.4	Citotoxicidade do α CHC em diferentes concentrações incorporado em LV _{III} ($0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de AICIPc ($0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).	102
CAPITULO VI		106
6	conclusão.....	106
7	Referências.....	106

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O notável médico e filósofo grego Hipócrates (460 a 377 a.C) cunhou a palavra câncer. Do latim *karkínos*, câncer significa “caranguejo” e faz referência ao tumor e sua neovascularização circundante.

O câncer, ou neoplasia maligna, é definido como um conjunto de mais de 100 tipos de doenças, caracterizadas pelo crescimento anômalo de células, que invadem tecidos ou órgãos. Seu crescimento descontrolado cria regiões de acúmulo de células que levam a formação de tumores. A migração destas células para a corrente sanguínea e seu posterior depósito em regiões distintas do corpo é chamada de metástase e pode levar o indivíduo, em último estágio, à morte (FIDLER, 2003).

O surgimento do câncer, processo denominado de carcinogênese, é lenta e ocorre principalmente pelo contato prolongado com agentes carcinogênicos. Estes agentes são capazes de promover alterações nos genes que formam o DNA (ácido desoxirribonucleico, do inglês: *deoxyribonucleic acid*) de células normais. Mutações em genes especiais, denominados protooncogenes, podem dar origem aos oncogenes os quais são responsáveis pela cancerização das células e, portanto, pelo estágio de iniciação da formação do câncer.

Entretanto, não há uma causa específica para a ocorrência do câncer. Fatores como a idade, o ambiente, fatores comportamentais, endócrinos, genéticos e hereditários podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias mamárias (ADAMI; HUNTER e TRICHOPOULOS, 2008).

A ocorrência de oncogenes em diferentes tipos de células leva à formação de neoplasias distintas. Assim, os tipos de câncer são classificados de acordo com suas células de origem. Por exemplo, carcinomas são originados de tecidos epiteliais (como as células da pele e das mucosas) ao passo que os tecidos conjuntivos (como os ossos e as cartilagens) dão origem aos sarcomas.

1.1.1 Câncer de mama

De acordo com o INCA (instituto nacional de câncer José de Alencar Gomes da Silva), entre as mulheres o câncer de mama é responsável por cerca de 25% dos novos casos

de câncer sendo o mais comum após o não melanoma de pele. No Brasil, a estimativa para o ano de 2015 foi de 57.120 novos casos de câncer de mama, com maior incidência entre pessoas acima de 50 anos. O número de óbitos por câncer de mama em 2013 foi de 181 homens e 14.207 mulheres (INCA, 2015).

Apesar da baixa incidência de câncer de mama entre as mulheres com menos de 35 anos, o número cresce progressivamente após essa idade e é de maior risco após os 50 anos (INCA, 2015). O consumo excessivo de bebidas alcoólicas, a obesidade e a exposição a altas taxas de radiação ionizante estão entre os fatores comportamentais/ambientais mais relevantes (ADAMI; HUNTER e TRICHOPOULOS, 2008; MARMOT et al., 2007). Os fatores genéticos e hereditários responsáveis pelo desenvolvimento do câncer de mama estão relacionados a algumas mutações em genes específicos como nos BRCA1 e BRCA2. Entretanto, a frequência de câncer de mama por esta via corresponde a apenas 5% a 10% de todos os casos reportados (ADAMI; HUNTER e TRICHOPOULOS, 2008).

Os tratamentos convencionais do câncer de mama, de modo geral, envolvem uma combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A ausência de seletividade destes tratamentos clássicos constitui uma das mais relevantes preocupações do uso destas terapias no combate a neoplasias malignas. O ataque a células normais é responsável por efeitos colaterais severos que, muitas vezes, inviabilizam novas seções por estes tipos de tratamentos. Ademais, a remoção da mama por cirurgia pode trazer consequências sociais e psicológicas importantes para as mulheres (SILVA, 2008). Em virtude disso, tratamentos alternativos que visam minimizar os efeitos colaterais tem se desenvolvido nas últimas décadas. Dentre os novos, inclui-se alguns processos fotodinâmicos via ativação de drogas fotossensíveis com luz visível (não ionizante), metodologia denominada terapia fotodinâmica.

1.2 Processos fotodinâmicos

Processos fotodinâmicos (PF) englobam a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Esta interação desencadeia diversos fenômenos fotofísicos que vão desde o aquecimento do meio circundante à transferência de energia entre um agente fotossensibilizador (FS) no estado eletrônico excitado e o oxigênio molecular. Os PF apresentam grande aplicação na remoção de poluição de resíduos industriais primários por processos de fotooxidação controlados; podem ser também usados para tratar doenças não oncológicas bem como para tratar feridas e queimaduras por meio de um processo chamado

fotobiomodulação. Ademais, PF vem sendo bastante aplicado ao tratamento de doenças caracterizadas pelo crescimento acelerado de tecidos em uma modalidade denominada terapia fotodinâmica (TFD). A TFD faz uso da combinação de um (ou mais) FS com luz visível de comprimento de onda adequado para a geração de espécies citotóxicas responsáveis pela morte do tecido indesejado. Estes são alguns dos diversos exemplos de aplicação de fotoprocessos dinâmicos.

1.3 Histórico da terapia fotodinâmica

A combinação de FS com luz visível no tratamento de doenças é uma pratica antiga. Há mais de 3500 anos os Egípcios utilizavam a ingestão de algumas plantas seguida de exposição à luz solar para o tratamento de vitiligo (descrito no Papiro Ebers). Entretanto, somente no início do século XX esta pratica se consolidou como um método eficiente no combate a algumas patologias. Em 1900, Oscar Raab, que era um estudante de medicina no Instituto Farmacológico de Munique, demonstrou a morte de microorganismos quando expostos à luz solar, na presença de certos corantes, como a quinina. Seu grupo de pesquisa observou que alguns microorganismos apresentavam um comportamento diferente ao serem incubados com os certos corantes em dias de tempestade. Ele confirmou a necessidade de utilização de radiação de comprimentos de onda adequados, que fossem capazes de serem absorvidos pelo corante (VON TAPPEINER, 1900). Von Tappenier, seu orientador, introduziu o termo "fotodinâmica" para diferenciar o efeito destes corantes do exibido em placas fotográficas¹(VON TAPPEINER e JODLBAUER, 1907). Após três anos, von Tappenier e Jesionek obtiveram bons resultados empregando o corante eosina sobre tumores em humanos (VON TAPPEINER e JESIONEK, 1903). Na sequência, diversos corantes foram testados tópicamente e sistemicamente, mas os estudos foram abandonados devido a efeitos colaterais e a vinda da radiação ionizante no tratamento de câncer. Em 1911, Hausmann demonstrou o efeito fotossensibilizante das hematoporfirinas em ratos (HAUSMANN, 1911). Um ano depois Friedrich Meyer injetou em si mesmo 200 mg de hematoporfirina e tornou-se fotossensível por 2 meses devido a farmacocinética lenta deste tipo de fotossensibilizador (MEYER-BETZ, 1913). Em 1924, Policard demonstrou o acúmulo preferencial de hematoporfirinas em células neoplásicas comparadas às células normais (POLICARD, 1924). No final dos anos 60, Lipson reportou um caso de tratamento bem-sucedido de câncer de mama, utilizando derivados de hematoporfirina e irradiação com luz visível (LIPSON, BALDES e OLSEN, 1961). Trabalhos de Weishaupt e colaboradores (1976) demonstraram

¹ Placas fotográficas foram as precursoras dos filmes fotográficos utilizadas na captura de imagens.

pela primeira vez o papel do oxigênio singlete como agente citotóxico na TFD (WEISHAUPT, GOMER e DOUGHERTY, 1976a). Em 1995 surge o primeiro medicamento aprovado pelo FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*) para TFD em tratamento de câncer de esôfago denominado Photofrin[®], um derivado de hematoporfirina (STERNBERG e DOLPHIN, 1996).

1.4 Diagrama de Jablonski

A etapa primária para os processos fotodinâmicos é a absorção de radiação eletromagnética (muitas vezes na região do visível) seguida de processos que decorrem do estado excitado das moléculas. Tais processos são descritos pelo diagrama de Jablonski.

O diagrama de Jablonski, nome dado em homenagem ao físico Aleksander Jabłoński (1898 - 1980) (Figura 1), ilustra os processos fotofísicos possíveis de ocorrer em decorrência da interação da luz com a matéria (LAKOWICZ, 2013).

Figura 1. Diagrama de Jablonski simplificado. As setas lineares indicam processos radiativos enquanto as setas curvas indicam processos não radiativos. As duas setas que levam ao tipo I e II representam processos de transferência de elétrons (tipo I) e transferência de energia (tipo II) do estado triplete para substratos biológicos.

O diagrama de Jablonski descreve os níveis de energia (eletrônicos e vibracionais) de uma molécula em uma distribuição vertical onde a energia aumenta em relação a posição mais baixa. Considerando uma molécula com estado eletrônico fundamental singlete, o nível eletrônico de menor energia, o fundamental, é simbolizado por S_0 onde S representa a multiplicidade singlete do nível eletrônico e o índice 0 indica que o nível em questão é o de menor energia. Deste modo, o próximo nível eletrônico singlete é representado por S_1 . Os demais podem ser simplificadamente representados por S_n onde n é um número inteiro maior que 1. Os subníveis representados por V estão relacionados a estados vibracionais da

molécula. Devido à diferença de energia entre os níveis vibracionais, estes são dispostos entre os níveis eletrônicos no diagrama.

Processos radiativos são representados no diagrama de Jablonski por setas lineares ao passo que os processos não radiativos são representados por setas curvas (Figura 1). O início da haste indica o nível energético inicial e a ponta da seta indica o nível energético final do processo.

Uma molécula no estado S_0 é capaz de interagir com a radiação eletromagnética, a luz², e ser excitada a um nível de maior energia. Este processo de interação da luz com a matéria é denominado absorção. Para os casos onde a absorção envolve dois níveis eletrônicos o processo passa a ser chamado de absorção eletrônica.

A interação da radiação eletromagnética com a matéria irá ocorrer se a diferença de energia entre os níveis envolvidos corresponder exatamente a energia da radiação eletromagnética em questão. A interação luz-matéria é, portanto, um processo quantizado. Após o processo de absorção, o retorno ao estado fundamental pode ocorrer por emissão de radiação eletromagnética, fenômeno denominado de luminescência.

A luminescência é dividida em dois tipos: fluorescência e fosforescência. O processo de emissão é denominado de fluorescência quando envolve dois orbitais de mesma multiplicidade de spin, ou seja, quando o decaimento radiativo não é precedido de uma inversão de spin eletrônico. Em contraponto, quando há uma inversão de spin (envolve orbitais de multiplicidades diferentes) anterior ao processo de emissão este passa a ser chamado de fosforescência.

A absorção é um processo extremamente rápido, da ordem de 10^{-15} segundos. Entretanto, o tempo necessário para o retorno do elétron ao estado fundamental é da ordem de 10^{-9} e 10^{-4} (podendo chegar a alguns minutos) via processos radiativos sem (fluorescência) e com (fosforescência) inversão de spin, respectivamente. Os altos tempos de vida dos processos de luminescência favorecem a ocorrência de processos intermediários não radiativos. Os processos não radiativos são: conversão interna (CI), cruzamento intersistemas (CIS) e relaxação vibracional.

Os processos de decaimento não radiativo que envolvem transferência de energia vibracional, por colisões, para as vizinhanças são chamados de relaxação vibracional. O CI

² para casos envolvendo radiação eletromagnética de comprimentos de onda entre aproximadamente 400 e 750 nm.

está relacionado à passagem para um estado de mesma energia com a mesma multiplicidade de spin *sem* a emissão de radiação eletromagnética. O CIS envolve uma mudança no spin eletrônico o que resulta em mudança na multiplicidade da molécula, por exemplo, S_I para T_I .

Devido ao elevado tempo de vida do estado triplete ($\sim 10^{-3} - 10^1$ s), a emissão de fosforescência raramente ocorre em solução aquosa à temperatura ambiente. A presença de moléculas supressoras como o oxigênio molecular intensifica o decaimento não radiativo em questão.

Moléculas substancialmente não luminescentes relaxam completamente até o estado fundamental apenas por processos não radiativos. A relaxação vibracional envolve uma transferência de calor, por colisões, da molécula para as vizinhanças. Deste modo, o decaimento de energia de moléculas pouco luminescente resulta em maior aumento de temperatura do meio em que está inserida.

1.5 Mecanismos de ação

A TFD consiste na administração de um ^1FS ao alvo específico e posterior excitação do composto ($^1\text{FS}^*$) com luz visível de comprimento de onda adequado.

Após excitação, o $^1\text{FS}^*$ pode sofrer uma CIS atingindo o estado triplete excitado ($^3\text{FS}^*$).

Em decorrência da sua alta energia, o $^3\text{FS}^*$, metaestável, é capaz de reagir diretamente com substratos biológicos (SB) formando espécies radicalares e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), como representado na Figura 1 (OCHSNER, 1997; WILKINSON, HELMAN e ROSS, 1995; JORI, 1997). De modo geral, a reação ocorre por dois mecanismos principais. Estes mecanismos dividem a TFD em dois tipos em função do modo de interação do FS com os SB.

1.5.1 Mecanismo do tipo I

No mecanismo do tipo I (Figura 1), a interação entre o $^3\text{FS}^*$ e os SB ocorre por meio da transferência de elétrons e resulta em formação de espécies radicalares que, reagindo com

oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), leva a formação de espécies reativas como o O_2^- , H_2O_2 e NO (HEINRICH et al., 2014) os quais, *in situ*, causam danos aos tecidos biológicos. Por exemplo,

1.5.2 Mecanismo do tipo II

Este mecanismo envolve a transferência de energia do ${}^3\text{FS}^*$ para o ${}^3\text{O}_2$ em seu estado fundamental (${}^3\Sigma_g$). Este processo é permitido por spin, ou seja, apresenta alta probabilidade de ocorrência. O mecanismo do tipo II (Figura 1) leva à formação do oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$), espécie de alta reatividade e principal espécie envolvida nos processos de morte celular em TFD (WEISHAUPT, GOMER e DOUGHERTY, 1976b; BARTUSIK et al., 2013), e pode ser descrito por

Todas as espécies descritas acima, *in situ*, podem causar danos estruturais em nível celular, induzir uma cascata de eventos biológicos e, conseqüentemente, resultar em necrose e/ou apoptose do tecido canceroso (LONGO et al., 2013; KIESSLICH et al., 2013).

1.6 Fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica

Uma molécula a ser utilizada na TFD precisa apresentar algumas características específicas, tais como, forte absorção da luz visível; alto rendimento quântico de produção de oxigênio singlete; baixo rendimento de reação de foto-degradação; seletividade ao tecido doente; farmacocinética favorável; fotossensibilidade não prolongada; alta estabilidade e baixa toxicidade no escuro. Entre os compostos que atendem boa parte das exigências acima se encontram as ftalocianinas metaladas (MFC) (MANTAREVA et al., 2013; HORNE, ABRAHAMSE e CRONJÉ, 2012).

1.6.1 Ftalocianinas

Ftalocianinas (Fc) são compostos macrociclos formados por quatro anéis pirrólicos cada qual ligado a um anel benzênico e ligados entre si por quatro átomos de nitrogênio (Figura 2).

A síntese desta estrutura base foi realizada, acidentalmente, pela primeira vez em 1907 por Braun e Tcherniak (BRAUN e TCHERNIAC, 1907). Após isto, diversos derivados de

ftalocianina tem sido extensivamente sintetizados e caracterizados utilizando métodos químicos clássicos (DENT e LINSTead, 1934; LINSTead e LOWE, 1934; BYRNE , LINSTead e LOWE, 1934; LINSTead, 1934) e instrumentais (LINSTEAD e ROBERTSON, 1936; BYRNE , LINSTead e LOWE, 1934).

Figura 2. Estrutura base das ftalocianinas.

As Fc podem interagir com quase todos os metais, resultando em diferentes sistemas com mais estabilidade e diferentes propriedades fotofísicas e fotoquímicas. Seus átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios pirrólicos podem ser substituídos por diversos metais e semimetais dando origem às MFC comumente denominadas de metaloftalocianinas (MANTAREVA et al., 2013).

1.6.2 Ftalocianina de cloro alumínio

Entre as MFC, a ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc, Figura 3) é atualmente bastante empregada em nosso grupo de pesquisa onde inúmeros trabalhos respaldam a utilização da mesma como FS (MIJAN et al., 2014; JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016; DE PAULA et al., 2012; DE PAULA et al., 2015).

Uma das vantagens da utilização da AlClPc em TFD é sua alta absorção em comprimentos de onda entre 600 a 800 nm (absorção máxima = 672 nm em etanol), chamada de janela fototerapêutica, o que garante sua aplicação em TFD onde não há moléculas fotoativas endógenas capazes de competir com AlClPc no processo de absorção. A melanina, o mais natural material protetor da pele, apresenta uma faixa de absorção abaixo de 500 nm que é distante da banda principal de absorção da AlClPc (672 nm em etanol (VILSINSKI et al., 2015a)).

Figura 3. Estrutura molecular da ftalocianina de alumínio cloro.

O caráter anfifílico da AlClPc garante uma boa interação com as membranas biológicas. Entretanto, esta propriedade também promove o processo de auto-agregação em meio aquoso o qual é desfavorável para a TFD.

1.7 Auto-agregados

A solubilidade de um composto está diretamente relacionada à maior magnitude das forças de interação entre as suas moléculas na forma monomérica³ e as moléculas do meio circundante comparada à energia de coesão na interação monômero-monômero. Em muitos casos, a energia de coesão é suficientemente alta para que ocorra a formação de aglomerados moleculares do composto dispersos no solvente (ou até mesmo a sua insolubilidade). Estes aglomerados são chamados de auto-agregados.

1.7.1 Auto-agregados de ftalocianina de alumínio cloro

A auto agregação da AlClPc afeta diretamente suas propriedades fotofísicas e fotossensibilizantes (DHAMI e PHILLIPS, 1996a), uma vez que resulta em diminuição da absorção de luz na janela terapêutica, aumento da desativação dos estados excitado por processos não radiativos e, conseqüentemente, diminuição do tempo de vida dos estados excitados (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016). Além disso, a injeção de espécies auto-agregadas na corrente sanguínea pode levar à precipitação destas e até mesmo o entupimento de veias. Portanto, auto-agregados de AlClPc são considerados altamente ineficientes quando comparados aos monômeros em TFD (VILSINSKI et al., 2015b; UENO , MACHADO e MACHADO, 2009; JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016). Deste modo, inúmeros esforços vem sendo empregados na tentativa de desenvolvimento de sistemas veiculadores

³ Uma única unidade molecular

específicos para a AlCIPc que proporcione de maneira efetiva a sua entrega na forma monomérica ao tecido biológico (NUNES , SGUILLA e TEDESCO, 2004; VILSINSKI et al., 2015b; DE PAULA et al., 2012; DE PAULA et al., 2015). Nesta, uma fina camada lipoprotéica que envolve as células, a membrana celular, pode ser a chave para novos mecanismos de entrega de FS uma vez que esta constitui a barreira primária da interação fármaco-célula.

1.8 A membrana celular

A unidade biológica fundamental, a célula⁴, é delimitada por um fino envoltório composto principalmente de lipídios e proteínas: a membrana celular. Sua espessura varia de aproximadamente 7,5 a 10 nm.

No início da década de 70, os bioquímicos americanos Seymour J. Singer e Garth L. Nicolson propuseram um modelo padrão para a estrutura do envoltório celular o qual nomearam de “o modelo do mosaico fluído” (SINGER e NICOLSON, 1972).

Figura 4. Modelo do mosaico fluído para a membrana celular (Extraído de Singer; Nicolson, 1972).

Neste modelo, os lipídios presentes na membrana celular são organizados de modo a manter uma estrutura em bicamada onde suas caldas hidrofóbicas são voltadas para o centro da membrana e as cabeças polares para a parte externa com proteínas inseridas entre os lipídios. Devido a esta configuração, muitas vezes a membrana celular é denominada de bicamada lipídica.

⁴ Do grego *kytos*, que significa cela + *cella*, do latim, espaço vazio.

1.8.1 Lipídios de membrana

Os lipídios de membrana, constituintes estruturais das membranas biológicas, apesar de apresentarem diferenças estruturais possuem um ponto em comum: não são completamente solúveis em água. O caráter anfipático, ou seja, a presença de uma região hidrofóbica e uma hidrofílica na mesma molécula é a “força motriz” que rege sua organização em bicamadas quando dispostos em meio aquoso.

Dentre os diferentes tipos de lipídios de membrana encontram-se os glicerofosfolipídios. Os glicerofosfolipídios são formados por uma molécula de glicerol em que as hidroxilas ligadas aos carbonos 1 e 2 foram esterificadas por ácidos graxos. Ambas as cadeias carbônicas derivadas dos ácidos graxos compõem a região hidrofóbica (Figura 5). A porção hidrofílica, grupo cabeça-polar, está ligada a um grupo fosfato por sua vez ligado ao oxigênio da hidroxila do carbono 3 do glicerol.

Figura 5. Bicamada de glicerofosfolipídio.

Caso o grupo cabeça-polar apresente uma carga positiva, como no caso do grupo colina ($-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), o lipídio é zwitteriônico, ou seja, apresenta uma carga positiva e uma negativa (fosfato, PO_4^-) próximas entre si em uma mesma molécula. Dois exemplos de fosfolipídios zwitteriônicos são o 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC, Figura 6A) e o 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC, Figura 6B).

A temperatura bem definida em que um lipídio passa de um estado sólido ordenado para um líquido desordenado é denominado de transição de fase (T_f). A mistura de diferentes lipídios possui efeito direto sobre a T_f . Em muitos casos, estas misturas dão origem à

coexistência de diferentes fases em uma mesma membrana além de romper com a bem definida transição de fase dos lipídios puros.

Figura 6. Estrutura molecular do 1,2-distearoil-sn-glicero-3-phosphocolina (A) e 1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-phosphocolina (B).

A presença de pequenas fases distintas (diâmetro de dezenas de nanômetros) inseridas na membrana é definida como *lipid rafts*. Seu nome faz referencia ao movimento de uma jangada em um riacho devido a dinâmica desses *lipid rafts* na bicamada lipídica. Os *lipid rafts* podem ser a chave para o entendimento do mecanismo de ação de diversas patologias (EHEHALT et al., 2003; FANTINI et al., 2002), atuar como plataformas de ataque de proteínas (SIMONS e IKONEN, 1997) bem como sítios de ligação de diversos compostos.

1.9 Sistemas de veiculação de fármacos

Nano ou microestruturas produzidas a partir da combinação de uma ou mais espécies moleculares ou pela fragmentação de uma matriz supramolecular e que apresentam a capacidade de veicular fármacos são chamadas de sistemas de veiculação de fármacos (DDS, do inglês: *Drug Delivery System*). Além de melhorar a eficácia terapêutica, os DDS são capazes de promover a redução de efeitos colaterais e aumentar o tempo de circulação do FS no organismo (SAGADEVAN e PERIASAMY, 2014; OBEROI et al., 2013).

Assim, sistemas biocompatíveis que exibem um microambiente interfacial que mimetizam as membranas biológicas como, por exemplo, nanopartículas poliméricas e lipossomas constituem importantes DDS e vêm sendo bastante empregados com este enfoque de aplicação (CONTE et al., 2016; NAKAMURA et al., 2015; CADDEO et al., 2016). Além destes, podemos citar as nanoesferas lipídicas, (SU et al., 2014) nanopartículas lipídicas sólidas, (UD DIN et al., 2015) nanoemulsões (SHAFIQ et al., 2007) e veiculadores poliméricos.

A ausência de um bom DDS leva ao aumento das doses do fármaco a ser empregada, o que, consequentemente, amplifica os efeitos colaterais indesejáveis (ATEH et al., 2011; DE STEENWINKEL et al., 2007). Por vezes, estes efeitos podem culminar na inviabilização da utilização de fármacos promissores ao tratamento anticâncer, sejam tópicos ou endovenosas.

DDS capazes de atuar em tratamento anticâncer têm recebido ampla atenção nos últimos anos. Enquanto moléculas de baixa massa molecular atravessam rapidamente ambas as membranas plasmáticas de tecidos normais e cancerosos expondo todos os tecidos a diferentes concentrações de fármacos, os fármacos acoplados a DDS particionam-se preferencialmente a tumores, aumentando a seletividade pelo tecido alvo (EL-BADRY , FETIH e SHAKEEL, 2014).

Neste sentido, é essencial a engenharia, desenvolvimento e produção de novos e eficientes DDS, eficazes na entrega seletiva do fármaco ao tecido específico, que otimizem a dosagem administrada com consequente diminuição da toxicidade e reações adversas inerentes ao fármaco.

1.10 Sistemas biomiméticos de membrana

Sistemas automontados compostos por um ou mais tipos de lipídios são bons sistemas biomiméticos de membrana. Dentre eles, podemos citar as monocamadas planares produzidas em cubas de Langmuir, (ULMAN, 1996) os filmes *layer-by-layer* (WANG , ANGELATOS e CARUSO, 2007) e as vesículas lipídicas uni e multilamelares (HARDY , NAYAK e ZAUSCHER, 2013).

1.6.3 Vesículas lipídicas

Vesículas lipídicas ou lipossomas são partículas coloidais esféricas com compartimento interno aquoso que apresentam uma (unilamelar) ou mais (multilamelar) bicamadas fosfolipídicas concêntricas na faixa de aproximadamente 30 nanômetros (vesículas unilamelares pequenas, SUV), 100 nanômetros (vesículas unilamelares grandes, LUV), até alguns micrômetros (vesículas unilamelares gigantes, GUV) em diâmetro (KIM , SHIN e OH, 2003) (Figura 7).

Dentre suas vantagens destaca-se a versatilidade em solubilizar fármacos hidrossolúveis e lipossolúveis; garante proteção à droga contra hidrólises e/ou degradação oxidativa e aumenta o tempo de circulação do fármaco no corpo o que garante o tempo necessário para a entrega do fármaco ao tecido alvo (ELSAYED et al., 2007).

Figura 7. Vesícula lipídica unilamelar.

A quantidade e localização de fármacos nas bicamadas dependem de fatores como seu coeficiente de partição, estrutura do grupo cabeça-polar do lipídio, estado de carga, magnitude da interação com a membrana, geometria molecular do fármaco e fluidez da bicamada (ELSAYED et al., 2007).

1.11 Acidose tumoral

Acidose tumoral é uma das particularidades do microambiente neoplásico mais característica. Ela é influenciada pelo metabolismo da glicose em ácido láctico no interior das células (DHUP et al., 2012). Particularmente, as células tumorais produzem maiores quantidades de ácido láctico que células normais em função do elevado metabolismo de glicose naqueles tecidos. Além disso, o crescimento do tumor, a progressão da metástase de carcinomas e a angiogênese nestes tecidos são fatores que aumentam a concentração de lactato (WEBB et al., 2011a; VALENTA et al., 2000).

Entretanto, o ácido láctico não é capaz de atravessar a membrana plasmática de forma passiva. Seu transporte é feito por proteínas transportadoras específicas dispostas na membrana celular (DHUP et al., 2012). Por isso, geralmente células neoplásicas expressam, em maior quantidade, uma variedade de proteínas integrais de membrana conhecidas como transportadores de monocarboxilatos (MCTs, Figura 8) (PINHEIRO et al., 2008a; PINHEIRO et al., 2008b; FROBERG et al., 2001).

Dentre aquelas, podemos citar o carcinoma cervical (PINHEIRO et al., 2008c), de pulmão (IZUMI et al., 2011), de mama (PINHEIRO et al., 2010b), o câncer gástrico (PINHEIRO et

al., 2009), neoblastoma (FANG et al., 2006), câncer de ovário epitelial (CHEN et al., 2010) e câncer de pâncreas (SCHNEIDERHAN et al., 2009).

Figura 8. Modelo de transporte para o lactato em células de câncer. Adaptado de (DHUP et al., 2012).

Os MCTs, portanto, são importantes na regulação do pH intracelular neoplásico e, consequentemente, na manutenção da homeostase do pH (WEBB et al., 2011b; IZUMI et al., 2003).

1.12 Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

O ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α CHC, Figura 9) atua como inibidor da função dos MCTs 1, 2 e 4 (MORRIS e FELMLEE, 2008) sendo aproximadamente dez vezes maior para MTC1 frente ao MTC4 (SONVEAUX et al., 2012; FOX, MEREDITH e HALESTRAP, 2000). Dentre os MCTs 1-4, somente o MTC 1 apresenta expressão relevante na membrana plasmática de neoplasias de mama, colo, pulmão e ovário, essencial para a atividade do transporte de lactato para fora destas células (PINHEIRO et al., 2010a).

Utilizando estes receptores (principalmente MCT1) como um alvo em potencial, FS associados ao DDS podem ser ativamente direcionados e entregues a diversos tipos de tecidos cancerígenos, o que aumenta a ação do ativo no alvo.

Neste sentido, o α CHC se apresenta como vetorizador de FS para tecidos cancerosos, principalmente neoplasias com alta expressão de MCT1. Portanto, o α CHC aliado ao DDS pode atuar como vetor, direcionando o FS ao sítio desejado e, posteriormente, executar o fotoprocesso dinâmico.

Estudos demonstram que o α CHC induz a apoptose em células de linfoma de Dalton, necrose em gliomas malignos e em modelos de câncer de próstata humano (KIM et al., 2012). Ademais, a inibição de MCT-1 em células cervical carcinoma resulta em decréscimo de biomassa celular que pode estar relacionado à inibição da viabilidade celular, proliferação celular e, ainda, indução de apoptose (PINHEIRO et al., 2010a).

Figura 9. Estrutura molecular do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α CHC).

Diante destas características, o α CHC torna-se o aditivo ideal com boa perspectiva para a aplicação em DDS em tumores neoplásicos com a função de direcionar especificamente o fármaco ao tumor. O α CHC interage com receptores MTCs nas membranas de células de câncer aumentando a seletividade do sistema carreador de fármaco. Além disso, a inibição do MCT1 parece romper a cooperatividade metabólica e a angiogênese, o que pode induzir o processo de apoptose.

CAPITULO II

2 CONCEITOS MATEMÁTICOS

As propriedades fotofísicas de uma molécula estão relacionadas com as diferenças de energia entre seus orbitais moleculares desocupados e ocupados. No estado gasoso estas diferenças apresentam valores bem definidos, ao passo que em fase condensada as diferenças

de energia são dependentes do meio circundante. Moléculas que apresentam propriedades fotofísicas fortemente dependentes do meio são denominadas sondas solvatocrômicas. (LAKOWICZ, 2013)

Além da energia, a intensidade de absorção constitui uma das características mais relevantes de um espectro de transição eletrônica. A probabilidade de ocorrência de uma transição eletrônica é dada pela força de oscilador,

$$f = \frac{4,315 \times 10^{-9}}{n} \int \epsilon d\bar{\nu} \quad (5)$$

onde f é a força do oscilador, n é o índice de refração do meio, ϵ é o coeficiente de absorção molar e $d\bar{\nu}$ é a diferencial do número de onda.

2.1 Espectroscopia de absorção óptica

A espectroscopia de absorção óptica é uma técnica com ampla aplicação na pesquisa química tanto qualitativa quanto quantitativa. Esta técnica é baseada na medida da transmitância (T) de um feixe de radiação monocromática⁵ por uma solução contida em uma célula transparente de caminho óptico conhecido (Figura 10) (SUZUKI, 2012).

Figura 10. Disposição clássica de um espectrofotômetro.

Quando um feixe de radiação de comprimento de onda específico se choca com uma molécula sua energia pode ser absorvida por esta. Este processo resulta na transição de um elétron do estado eletrônico fundamental para um estado de maior energia (estado eletrônico excitado). Este processo é denominado excitação eletrônica. Consequentemente, a intensidade do feixe de radiação transmitida, T , através da célula será menor que a intensidade inicialmente emitida pela fonte de radiação. A relação linear entre T e a absorbância é dada pela Equação 6 que é conhecida como **Lei de Lambert-Beer**.

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (6)$$

⁵ Largura da faixa de comprimentos de onda geralmente menor que 1 nm.

onde A é a absorvância, T é a transmitância, I_0 e I são as intensidades da radiação antes e depois de atravessarem a amostra, respectivamente, ϵ é o coeficiente de absorção molar, b é o caminho ótico do recipiente (em cm) e c é a concentração do cromóforo (em mol L⁻¹).

A lei de Lambert-Beer é uma lei limite, ou seja, ela é estritamente válida somente para uma faixa de concentração suficientemente diluída (ZACCANTI e BRUSCAGLIONI, 1988). Diversos parâmetros contribuem para os desvios da linearidade como a alta densidade ótica de amostras concentradas (ZACCANTI e BRUSCAGLIONI, 1988), a auto-agregação dos cromóforos (JAYME, CALORI e TEDESCO, 2016) e o efeito de emissão residual.

Com relação à densidade ótica, a geometria do equipamento é tal que o feixe de luz tenha seu foco na região central da célula. Em altas concentrações, a radiação eletromagnética de excitação é absorvida antes do foco. Assim, os cromóforos nos primeiros milímetros da célula agem como um filtro, diminuindo significativamente a densidade de radiação ao longo do percurso do feixe de radiação. Este efeito é conhecido como *filtro interno* e é um dos principais fatores que causam erros sistemáticos em medidas de soluções concentradas (CLARKE, 1982).

A emissão residual tem efeito sobre os resultados de absorção uma vez que os comprimentos de onda de fluorescência e excitação coincidem (geralmente em uma pequena faixa específica de comprimentos de onda) o que resulta em um excesso de radiação transmitida no comprimento de onda analisado.

Espécies orgânicas que absorvem em elevados comprimentos de onda geralmente possuem em sua estrutura um amplo sistema de conjugação π . Esta conjugação garante estabilização dos elétrons π e, em geral, resulta na diminuição da energia dos orbitais π^* .

A auto-agregação leva a formação de oligômeros. De modo geral, os oligômeros possuem espectros de absorção distintos da sua forma monomérica (JAYME, CALORI e TEDESCO, 2016) e oligômeros grandes podem espalhar o feixe de luz incidente, portanto, a auto-agregação possui efeito direto nos desvios da lei de Lambert-Beer.

2.1.1 Auto-agregados do tipo H e J

De modo ideal, os agregados do tipo H são formados quando monômeros orientam-se paralelamente uns aos outros ao passo que os agregados do tipo J possuem um ângulo de 180° entre seus cromóforos. De acordo com o modelo do éxciton molecular (KASHA, 1963), o arranjo do tipo H aumenta a energia entre os níveis eletrônicos dos monômeros o que resulta

em um deslocamento hipsocrômico em seus espectros de absorção em relação à forma monomérica. Pelo contrário, há uma redução na energia de transição em agregados de arranjo do tipo J. Deste modo, a avaliação do espectro de absorção destas espécies é bastante útil na investigação da geometria do auto-agregado formado.

Além deste, outros fatores podem afetar o espectro de absorção como, por exemplo, a polaridade do solvente, denominado de *efeito solvente*. Desta forma, o espectro de absorção é fortemente dependente do ambiente químico em que o cromóforo se encontra (LAKOWICZ, 2013).

2.2 Espectroscopia de emissão de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência estática (bem como a resolvida no tempo) foi inicialmente empregada nas áreas de bioquímica e biofísica. Devido a sua relativa alta sensibilidade, atualmente a técnica de fluorescência é extensivamente empregada em estudos e monitoramento de microambientes, processos de auto-agregação de fluoróforos, interações intermoleculares, sequências de macromoléculas, localização e distribuição de fluoróforos em células dentre uma infinidade de outras aplicações.

A espectroscopia de fluorescência ou espectrofluorimetria é uma técnica analítica de amostras que possuem um ou mais componentes com capacidade fluorescente. Após absorver energia (item 2.1) um cromóforo pode retornar ao seu estado eletrônico fundamental por diversos processos, entre eles pela emissão de fluorescência.

2.2.1 Deslocamento de Stokes

Após excitação a níveis eletrônicos e vibracionais mais energéticos, parte da energia é rapidamente ($\sim 10^{-12}$ s) transferida para o meio por relaxação vibracional o que leva a molécula ao nível vibracional fundamental do primeiro nível eletrônico excitado, S_1 (Figura 1). Assim, o espectro de fluorescência (e fosforescência) é deslocado para comprimentos de onda menos energético em relação ao espectro de absorção. A energia transferida para as vizinhanças é igual à diferença entre a energia de absorção e a de emissão e é denominada deslocamento de Stokes (LAKOWICZ, 2013).

2.2.2 A regra de Kasha

O espectro de fluorescência é independente do comprimento de onda de excitação. Este postulado é denominado de regra de Kasha. Independente da sua excitação prévia, a fluorescência ocorrerá do V_0 do S_1 para níveis vibracionais do S_0 devido a perda parcial de

energia por processos não radiativos durante o estado excitado. Algumas exceções podem ser citadas como, por exemplo, moléculas que emitem a partir de S_2 , entretanto, são raras (LAKOWICZ, 2013).

2.2.3 Regra da imagem espelho

O espectro de fluorescência é a imagem espelho do espectro de absorção $S_0 \rightarrow S_1$. Isto ocorre em função dos processos de absorção (para níveis vibracionais do S_1) e de fluorescência envolver as mesmas transições, como discutido acima, e é conhecida como a regra da imagem espelho. Novamente, exceções existem como é o caso de exciplexos, complexos formados no estado excitado (LAKOWICZ, 2013).

2.3 Anisotropia de fluorescência

A interação da radiação eletromagnética com a matéria é, na sua grande parte, influenciada pela interação entre o vetor campo elétrico da radiação e o dipolo de transição eletrônico do cromóforo. A probabilidade de interação é tão maior quanto menor o ângulo entre eles. A componente magnética possui muito pouco efeito sobre a excitação eletrônica e, portanto, abordaremos a excitação eletrônica em função exclusivamente da interação entre a componente elétrica da radiação com a matéria (KAWSKI, 1993).

Exceto para a emissão LASER, fontes de radiação eletromagnética policromáticas (por exemplo, o sol ou uma lâmpada de tungstênio) dão origem a radiações com componentes elétricas randomicamente distribuídas, ou seja, com configuração anisotrópica (Figura 11A). Idealmente, a radiação com luz polarizada apresenta todos os vetores campo elétrico paralelos (Figura 11B). Todavia, a radiação proveniente de fontes de emissão anisotrópica pode ser polarizada utilizando polarizadores externos (LAKOWICZ, 2013).

Figura 11. Vetor campo elétrico da radiação não polarizada (A) e vetor campo elétrico da radiação polarizada (B).

A interação entre a radiação polarizada e a matéria é especialmente importante nos estudos de proteínas e enantiômeros. Estas espécies são capazes de interagir com a radiação polarizada alterando o plano da luz (EFTINK, 2006).

Ademais, estudos de anisotropia podem indicar o grau de liberdade de um cromóforo no meio de interesse. Em geral, valores de anisotropia variam entre 0 a 0,4 (alguns casos podem gerar valores de r de até $-0,2$). Estes são dependentes, entre outras, do ângulo entre os dipolos de transição e excitação da molécula, do tipo de transição eletrônica no processo de excitação e, conseqüentemente, da energia da radiação empregada. Valores próximos de zero indicam alto grau de liberdade do cromóforo no meio (meio isotrópico). Valores mais altos são provenientes de restrição no grau rotacional do cromóforo como, por exemplo, cromóforos particionados do meio aquoso para membranas biológicas (LAKOWICZ, 2013).

A técnica experimental consiste em excitar o cromóforo com radiação polarizada (nas direções vertical e horizontal) e detectar a radiação emitida também sob polarização (vertical e horizontal). O tratamento matemático é dado por,

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}} \quad (7)$$

e

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (8)$$

onde I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} e I_{HH} são as intensidades de fluorescência onde os primeiro e segundo índices são referentes a orientação de polarização da radiação de excitação e emissão, respectivamente. Os índices V e H são referentes à radiação polarizada na direção vertical e

horizontal, respectivamente. O fator G é um fator de correção instrumental para a taxa de radiação polarizada (LAKOWICZ, 2013).

2.4 Tempo de vida de fluorescência

O tempo de vida de fluorescência (τ) é uma das mais importantes características de um fluoróforo. O τ pode ser definido como o tempo em que o elétron permanece em estados excitados da molécula antes do seu retorno ao estado fundamental por emissão de fluorescência. Altos τ propiciam altas probabilidades de interação e/ou difusão do fluoróforo em seu microambiente, o que pode gerar informações qualitativas e quantitativas importantes sobre o sistema em investigação (LAKOWICZ, 2013).

A determinação do τ é realizada por um espectrofluorímetro com resolução temporal. Ao contrário do espectrofluorímetro estático, que faz utilização de uma fonte de luz contínua como fonte de excitação, fluorímetros resolvidos no tempo fazem uso de fontes de luz pulsada. Este modo de excitação garante obter informações relacionadas ao tempo em que a espécie permanece com energia excedente antes do processo de emissão de fluorescência (LAKOWICZ, 2013).

Podemos descrever o processo de emissão espontânea como

$$FS^* = FS + h\nu \quad (9)$$

onde $h\nu$ é igual a energia do fóton emitido.

O processo de emissão espontânea é dependente apenas da concentração de FS^* . Portanto, ele pode ser descrito como uma cinética de primeira ordem {Gilbert, 1991 139 /id} na forma

$$-\frac{d}{dt}[FS^*] = k_T[FS^*] \quad (10)$$

onde k_T é soma de todas as constantes dos processos de decaimento do FS^* .

Tomando a integral de Equação 11 temos,

$$[FS^*] = [FS^*]_0 e^{-k_T \tau} \quad (11)$$

Assim, o tempo de vida de fluorescência pode ser descrito como

$$\tau = k_T^{-1} \quad (12)$$

2.4.1 Taxas de decaimento radiativo e não radiativo

As taxas de decaimento por fluorescência, Γ_F , e fosforescência, Γ_P , compõem a taxa de decaimento radiativo, Γ ,

$$\Gamma = \Gamma_F + \Gamma_P \quad (13)$$

ao passo que a somatória de todas as taxas de processos não radiativos compõem a taxa de decaimento não radiativo, k_{nr} .

2.5 Rendimento quântico de fluorescência

Em espectroscopia de fluorescência, o interesse primário está relacionado aos processos que influenciam as taxas de decaimento radiativo (Γ) e não radiativo (k_{nr}) de um fluoróforo (LAKOWICZ, 2013).

Portanto, a razão entre as taxas de decaimento por fluorescência, Γ_F , e de decaimento total, $k_T = \Gamma + k_{nr}$, é uma medida da eficiência de decaimento por emissão de fluorescência, denominado de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F , Equação 14)

$$\phi_F = \frac{\Gamma_F}{k_T} \quad (14)$$

Experimentalmente, as taxas de decaimento por fluorescência são difíceis de serem determinadas. Por isso, muitas vezes emprega-se o Método do Padrão Secundário, com valor conhecido de ϕ_F , para a determinação do rendimento quântico de fluorescência da amostra de interesse (LAKOWICZ, 2013). A relação matemática que descreve a determinação do rendimento quântico de um fluoróforo utilizando um padrão secundário é dada por

$$\phi_F = \frac{A_{std} \cdot F_F \cdot N_{std}^2}{A_F \cdot F_{std} \cdot N_F^2} \cdot \phi_{std} \quad (15)$$

onde ϕ_F e ϕ_{std} são os rendimentos quânticos de fluorescência do fluoróforo e padrão, respectivamente, A é a absorvância de cada solução, F_F e F_{std} são as áreas dos espectros de fluorescência do fluoróforo (F) e do padrão (std), respectivamente, e n é o índice de refração médio.

2.6 Supressão de fluorescência

Diversos processos fotofísicos e fotoquímicos podem favorecer a taxa de decaimento não radiativo. Dentre estes, as interações intermoleculares como: colisões durante o estado excitado, formação de complexos e transferência de energia estão entre os fatores mais

relevantes. As espécies que promovem o decaimento não radiativo de fluoróforos são denominadas supressores (LAKOWICZ, 2013).

Os mecanismos de supressão podem ser primariamente divididos em dois grandes grupos: a supressão dinâmica e estática.

2.6.1 A teoria da supressão dinâmica

Na supressão dinâmica o aumento da taxa de decaimento não radiativo ocorre devido ao choque do fluoróforo no estado excitado com o supressor. No item 2.5 definimos o rendimento quântico de fluorescência como a razão entre a taxa de decaimento por emissão de fluorescência e a taxa de decaimento total, k_T . Se acrescentarmos um supressor ao sistema é necessário somar sua contribuição para o decaimento não radiativo por colisão. A diminuição do rendimento quântico de fluorescência por supressão colisional é proporcional tanto a constante de supressão bimolecular, k_q , quanto a concentração do supressor. Assim, podemos reescrever a Equação 16 como,

$$\phi_F = \frac{\Gamma_F}{k_T + k_q[Q]} \quad (16)$$

Definindo ϕ_F^0 como o rendimento quântico de fluorescência na ausência de supressor, $k_q[Q] = 0$, a razão entre os rendimentos quânticos de fluorescência na ausência e presença de supressor é descrita como,

$$\frac{\phi_F^0}{\phi_F} = \frac{k_T + k_q[Q]}{k_T} = 1 + \frac{k_q[Q]}{k_T} \quad (17)$$

Como $\tau = k_T^{-1}$ (Equação 12, podemos reescrever a Equação 17 na forma,

$$\frac{\phi_F^0}{\phi_F} = 1 + k_q\tau[Q] \quad (18)$$

onde τ é o tempo de vida do FS na ausência de supressor.

Esta é a elegante dedução da equação de Stern-Volmer a qual diz que a diminuição do rendimento quântico de fluorescência de um fluoróforo é proporcional a concentração do supressor. É fácil imaginar que o produto entre as constantes $k_q\tau$ é também uma constante importante. O produto $k_q\tau$ é denominado constante de Stern-Volmer, k_{sv} .

Assim, podemos escrever a Equação 19 na forma,

$$\frac{\phi_F^0}{\phi_F} = 1 + k_{sv}[Q] \quad (19)$$

A igualdade entre as razões $\frac{\phi_F^0}{\phi_F}$, $\frac{F_0}{F}$ e $\frac{\tau_0}{\tau}$ em supressão dinâmica garante a equação nas suas formas mais conhecidas,

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv}[Q] \quad (20)$$

e

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_{sv}[Q] \quad (21)$$

2.6.2 A teoria da supressão estática

Na supressão estática a diminuição da fluorescência do *FS* é devido a formação de um complexo entre o *FS* e o supressor. O complexo geralmente não absorve na mesma região do *FS* o que resulta em uma diminuição no numero de espécies excitadas (LAKOWICZ, 2013).

A formação do complexo pode ser representada por,

Portanto, a constante de associação do complexo pode ser descrito como,

$$K_s = \frac{[FS - Q]}{[FS][Q]}. \quad (23)$$

A concentração de *FS* total é dada por,

$$[FS]_0 = [FS] + [FS - Q]. \quad (24)$$

Assim,

$$[FS - Q] = [FS]_0 - [FS] \quad (25)$$

A Equação 25 pode ser reescrita como,

$$K_s = \frac{[FS]_0 - [FS]}{[FS][Q]} = \frac{[FS]_0}{[FS][Q]} - \frac{1}{[Q]}. \quad (26)$$

Como a razão $\frac{[FS]_0}{[FS]}$ é igual a $\frac{F_0}{F}$, podemos escrever a Equação 26 na forma,

$$K_s = \frac{F_0}{F[Q]} - \frac{1}{[Q]} = \frac{1}{[Q]} \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right).$$

Rearranjando,

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q]. \quad (27)$$

Apesar das Equações (20 e 27 serem idênticas, a diferenciação entre supressão estática e dinâmica pode ser observada, entre outros métodos, por medidas de tempo de vida de fluorescência. Na supressão estática, o complexo formado é não fluorescente e, portanto, não tem efeitos sobre o tempo de vida do FS. Deste modo, $\frac{\tau_0}{\tau}$ é igual a 1. Em contraponto, na supressão dinâmica o tempo de vida de fluorescência do FS diminui linearmente com o aumento da concentração do supressor. Apesar de outros métodos existirem, este é o mais indicado para diferenciar mecanismos de supressão dinâmica e estática (LAKOWICZ, 2013).

2.7 Transferência Ressonante de Energia de Fluorescência

Além da supressão de fluorescência pelo contato com espécies supressoras, outros mecanismos de interação podem resultar em diminuição na intensidade de fluorescência de um FS. Dentre eles encontra-se a transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET, do inglês: *fluorescence resonance energy transfer*) (LAKOWICZ, 2013).

O *FRET* é um mecanismo de transferência de energia entre um *FS* no estado excitado (doador) e outra espécie (acceptor) sem que haja ambos: contato e emissão de fluorescência. A transferência de energia ocorre em função do acoplamento dos dipolos de transição do par de moléculas envolvidas no processo. Portanto, para que o *FRET* ocorra a energia excedente do *FS** deve corresponder a diferença de energia entre níveis do estado fundamental e excitado do acceptor, ou seja, a região do espectro de fluorescência do doador deve conter pontos em comum com o espectro de absorção do acceptor (LAKOWICZ, 2013). Esta região em comum é denominada sobreposição espectral (J , Figura 12) e é descrita matematicamente por,

$$J = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (28)$$

onde F_d é a intensidade de fluorescência do doador no comprimento de onda analisado e ε_a é o coeficiente de absorção molar do acceptor no comprimento de onda analisado.

Figura 12. Sobreposição espectral, J , do espectro de emissão do doador com o espectro de absorção do aceptor.

A taxa de transferência ressonante de energia de fluorescência é dada por,

$$k_t = \frac{1}{\tau_d r^6} \frac{9000(\ln 10) k^2 \phi_d}{128 \pi^5 n^4 N_0} J \quad (29)$$

onde τ_d é o tempo de vida de fluorescência do doador na ausência do aceptor, k^2 é o ângulo entre os dipolos de transição do doador e aceptor, n é o índice de refração do meio, ϕ_d é o rendimento quântico do doador na ausência do aceptor e N_0 é o numero de Avogadro.

Resolvendo as constantes na Equação 29 e elevando a sexta potencia temos,

$$k_T = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (30)$$

onde,

$$(R_0)^6 = 8.8 \times 10^{25} (k^2 n^{-4} \phi_d J). \quad (31)$$

R_0 é a distância onde 50% do FS^* decai por transferência de energia e é denominada distância de Forster.

A eficiência de transferência de energia é dada por,

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (32)$$

onde r é a distância entre o par doador-aceptor.

Deste modo, o FRET é uma técnica muito útil na determinação da distância entre pares de moléculas dispersas no meio de interesse.

2.8 Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês: *dynamic light scattering*) é também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons (PCS, do inglês: *photon correlation spectroscopy*). O DLS é uma das técnicas mais utilizadas na determinação do raio hidrodinâmico de nano e micropartículas que variam de aproximadamente 0,3 nm a 50, μm (SCHMITZ, 1990).

Em solução, as partículas apresentam um movimento térmico incessante e aleatório denominado movimento Browniano. O movimento Browniano faz com que um feixe de luz monocromático incidido sobre a amostra seja aleatoriamente espalhado e sofra flutuações por interferências construtivas e destrutivas (SCHMITZ, 1990).

As flutuações são descritas pela função de autocorrelação de segunda ordem,

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (33)$$

onde I é a intensidade da luz espalhada no tempo t ,

Para um conjunto de partículas monodispersas, a função de autocorrelação é dada por,

$$g^2(\tau) = B + \beta e^{(-2\Gamma\tau)} \quad (34)$$

onde B é a linha de base da função de correlação em atraso infinito e é inversamente proporcional ao número médio de partículas analisadas e β é a amplitude da função de correlação em atraso zero.

A função de autocorrelação está relacionada ao coeficiente de difusão (D) pela relação,

$$D = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (35)$$

onde q é o ângulo de espalhamento da radiação eletromagnética, descrito por,

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (36)$$

sendo n_0 o índice de refração do meio e λ_0 o comprimento de onda no vácuo da luz incidida.

Se considerarmos que as partículas apresentam uma geometria perfeitamente esférica, podemos relacionar D com o raio hidrodinâmico das partículas pela equação Stokes-Einstein,

$$r_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (37)$$

onde k é a constante de Boltzman, T é a temperatura em Kelvin e η é a viscosidade do solvente.

2.9 Potencial zeta

Partículas com cargas superficiais diferentes de zero estabilizam-se pela formação de uma monocamada de contra íons próxima a superfície (Figura 13). Estes contra íons se mantem fortemente ligados a partícula, formando a camada de Stern. Devido a composição exclusiva em contra íons na camada de Stern, uma segunda camada é formada (com maior concentração de íons de mesma carga da partícula), a camada difusa. Juntas, a camada de Stern e a camada difusa formam a dupla camada elétrica (HUNTER, 2013).

Figura 13. Representação esquemática de uma partícula carregada negativamente, sua camada de Stern e camada difusa.

Íons dispostos na camada difusa são mais fracamente ligados à partícula. Com o movimento Browniano, alguns íons na camada difusa acompanham a partícula ao passo que aqueles suficientemente distantes difundem-se pela solução. No limite, tem-se a interface externa da camada difusa. O potencial existente nesta região é denominado de potencial zeta (HUNTER, 2013).

Ao se aplicar uma diferença de potencial elétrico (DDP) em um eletrólito, partículas carregadas dispostas neste eletrólito migram para o eletrodo de carga oposta. A velocidade com que isto ocorre é denominada mobilidade eletroforética, U_E .

A U_E pode ser determinada pela técnica de *velocimetria laser doppler*. Nesta, o espalhamento de luz durante a aplicação da DDP é comparado a um sinal de referência. Esta

comparação resulta em flutuações da luz espalhada, por interferências construtivas e destrutivas, a qual é proporcional a velocidade das partículas no meio.

De posse da U_E o potencial zeta (ζ) pode ser determinado empregando-se a equação de Henry (Equação 38) na forma,

$$\zeta = \frac{3\eta U_E}{2\varepsilon f(ka)} \quad (38)$$

onde η é a viscosidade do meio, ε é a constante dielétrica e $f(ka)$ é a função de Henry⁶.

⁶ 1,0 ou 1,5 são geralmente usados como aproximação de Huckel (para concentrações baixas de eletrólitos) e Smoluchowski (para concentrações moderadas de eletrólitos), respectivamente.

CAPITULO III

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um sistema de veiculação da ftalocianina de alumínio-cloro para tecidos neoplásicos, em especial para neoplasia de mama, visando sua aplicação em TFD.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Caracterização dos sistemas:

Preparar os sistemas carreadores de fármacos: lipossoma (LV), lipossoma com AlClPc (LV-AlClPc), Lipossoma com CHC (LV- α CHC), lipossoma com AlClPc e α CHC (LV-AlClPc- α CHC); avaliar o efeito do fármaco fotossensível e do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico sobre o tamanho e potencial zeta dos LV; caracterizar via espectroscopia de absorção e fluorescência (no estado estacionário e resolvida no tempo) a AlClPc em meio orgânico e nos diversos LV; determinar o coeficiente de absorção molar da AlClPc e α CHC em meio homogêneo; avaliar a cinética de incorporação da AlClPc nos diferentes LV; determinar o rendimento quântico de fluorescência da AlClPc em meio homogêneo e em LV na presença e ausência de α CHC; determinar a constante de ligação da AlClPc nos diversos LV; Determinar a constante de supressão de Stern-Volmer da AlClPc nos diversos LV; avaliar a estabilidade dos LV na presença e ausência da AlClPc.

3.2.2 Experimentos in vitro:

Realizar o crescimento e manutenção das linhagens de célula OSCC e MCF-7; realizar ensaio de internalização da AlClPc em OSCC por LV; realizar ensaios de citotoxicidade dos LV, LV-AlClPc e LV-AlClPc- α CHC em MCF-7; realizar ensaios de fotototoxicidade dos LV, LV-AlClPc e LV-AlClPc- α CHC em MCF-7.

CAPITULO IV

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A AlClPc (85% de pureza), o iodeto de sódio anidro (>99% de pureza) e o 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação prévia. Água ultrapura foi obtida por meio do sistema de água Direct-Q® 3 (sistema de purificação de água - Millipore). Etanol anidro, grau analítico, foi adquirido da J.T. Becker®. Os lipídios 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocholina (99% de pureza), 1,2-diioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholina (99% de pureza) e colesterol (98% de pureza) foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA). A linhagem celular de adenocarcinoma mamário feminino, MCF7, foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC® HTB-22TM). Para os estudos biológicos foram utilizados o meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM (gibco), anfotericina e antibiótico - penicilina/estreptomicina (Cultilab), tripsina-EDTA, soro feral bovino - SFB - estéril e aminoácidos essenciais (Gibco). O bicarbonato de sódio, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, 97,5% de pureza) e azul de tripan (~40%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Para as medidas de absorção foi utilizado o espectrofotômetro *Amersham Ultrospec* modelo 2100 *pro* (Cambridge, England) com faixa de leitura entre 200 e 800 nm. Os espectros de fluorescência foram determinados utilizando o espectrofluorímetro *fluorolog-3* modelo *Horiba Jobin Ivon-Spex* (New Jersey, EUA) com comprimento de onda de excitação em 610 nm com faixa de leitura de 650 – 800 nm e fendas de excitação e emissão de 2 nm. O diâmetro hidrodinâmico médio (*z-average*), índice de polidispersividade (PdI) e potencial zeta (ζ) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) com ângulo de 173° e mobilidade eletroforética utilizando o *Zetasizer®* (*Nano – ZS, Malvern Instruments*, Reino Unido). Para as medidas de tempos de vida de fluorescência e imagens de microscopia por tempo de vida de fluorescência (FLIM) foi utilizado o *Time-resolved confocal fluorescence microscope* modelo MT200 da *PicoQuant, Inc.* (Berlin, Alemanha). A técnica utilizada para as medidas de tempo de vida de fluorescência foi a Time-Tagged Time-Resolved (TTTR) desenvolvida pela *PicoQuant*, que é uma variação do método clássico de *Time-Correlated Single Photon Counting* (TCSPC). As imagens de microscopia por tempo de vida de fluorescência (FLIM) foram obtidas utilizando um microscópio invertido, *Olympus IX-71*

(Berlin, Alemanha) com uma objetiva de imersão de água, *UPlanSApo 60X, NA 1.2* (Berlin, Alemanha). Em ambas, a excitação foi realizada com um *picosecond laser diode excitation* (640 nm) direcionado por um espelho dicróico, *z440bcm AHF / Chroma* (Berlin, Alemanha) para a objetiva. A largura de pulso do laser foi menor que 70ps e a taxa média de repetição de 80 MHz. A aquisição da fluorescência foi realizada depois de passar por um filtro que bloqueia qualquer radiação de reflexão e excitação (filtro de emissão e HQ460LP chroma, Berlin, Alemanha). Para as medidas de FLIM, a amostra foi escaneada com um movimento monodirecional da objetiva em uma área de $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ com uma exatidão de posição de 1 nm. Os ajustes dos dados foram realizados pelo *software SymPhoTime 64* da *PicoQuant* (Berlin, Alemanha) e sua inspeção foi realizada pela avaliação dos gráficos dos resíduos e do parâmetro estatístico χ^2 (*chi-quadrado*). Para a irradiação das culturas de célula foi utilizado o sistema de LASER diodo *Eagle* modelo *Heron* da *Quantum Tech* (São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de emissão de 670 nm operando no máximo de 830 mW de potência acoplado a uma fibra ótica de direcionamento. As medidas de absorção do formazam nos testes de MTT foram realizadas pelo espectrofotômetro do tipo ELISA (Safire²-Tekan) em 560 nm com correção da absorção basal em 690 nm. Todas as medidas foram realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$. As medidas de anisotropia de fluorescência foram realizadas ainda em diversas temperaturas ($10 - 87 ^\circ\text{C}$). O pH e força iônica (μ) foram controlados por tampão PBS, pH 7,4, na presença da mistura de NaCl ($0,14 \text{ mol L}^{-1}$) e KCl ($2,7 \text{ mmol L}^{-1}$), exceto para o espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta e índice de polidispersão, onde μ foi igual a $1,396 \text{ mmol L}^{-1}$.

4.1 Coeficiente de absorção molar da AlClPc em etanol

O coeficiente de absorção molar (ϵ) da AlClPc em etanol foi determinado por meio da titulação espectrofotométrica da AlClPc em etanol anidro em uma faixa de concentração entre $0,074$ e $6,46 \mu\text{mol L}^{-1}$. As concentrações foram obtidas a partir de uma solução estoque de AlClPc na concentração de $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ em etanol. A partir desta, alíquotas foram transferidas para uma cubeta de caminho óptico de 1 cm contendo 2,00 mL de etanol anidro e, após cada adição a amostra foi homogeneizada por agitação e os respectivos espectros foram coletados.

O ϵ é dado pelo coeficiente angular da reta descrita pela Equação (6) (lei de Lambert-Beer).

4.2 Coeficiente de absorção molar do α CHC em diferentes solventes

O ϵ do ácido α CHC em diferentes solventes foi determinado por meio da titulação espectrofotométrica em uma faixa de concentração entre 0,18 e 13,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS (pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$); 0,20 e 10,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol e 9,30 a 75,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em octan-1-ol. A faixa de concentração desejada foi obtida a partir de soluções estoque de α CHC em PBS (0,90 mmol L^{-1}), etanol anidro (0,10 mmol L^{-1}) e octan-1-ol anidro (1,87 mmol L^{-1}). A partir destas soluções, alíquotas foram transferidas para uma cubeta de caminho óptico de 1 cm contendo 2,00 mL dos respectivos solventes e, após cada adição a amostra foi homogeneizada por agitação e os respectivos espectros foram coletados. Valores de ϵ foram determinados pelo coeficiente angular da reta descrita pela Equação (6).

4.3 Coeficiente de partição do α CHC em água/octan-1-ol

A avaliação do coeficiente de partição do α CHC no sistema água/octan-1-ol foi avaliado pela adição de 2,00 mL da solução de α CHC ($[\alpha\text{CHC}]_{\text{estoque}} = 0,106 \text{ mmol L}^{-1}$) em 20,0 mL de uma mistura 1/1 água/octan-1-ol (v/v) ($[\alpha\text{CHC}]_{\text{final}} = 52,8 \mu\text{mol L}^{-1}$). Após vigorosa agitação a sistema foi mantido em repouso por 48 horas e então 2,00 mL de cada fase (fase aquosa e octanólica) foi coletado e o espectro de absorção foi determinado.

O coeficiente de partição (K_p) é dado por

$$K_p = \frac{[FS]_{\text{oct}}}{[FS]_{\text{w}}} \quad (39)$$

onde K_p é o coeficiente de partição água/octanol, $[FS]_{\text{oct}}$ e $[FS]_{\text{w}}$ é a concentração do FS na fase octan-1-ol e água, respectivamente.

4.4 Desvios da linearidade em medidas de fluorescência da AlClPc em etanol

Os desvios da linearidade na fluorescência da AlClPc em etanol em função da concentração foram avaliados por meio da titulação espectrofotométrica da AlClPc em etanol anidro em uma faixa de concentração entre 43,00 nmol L^{-1} e 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ onde após cada adição a amostra foi homogeneizada por agitação e os espectros de fluorescência foram coletados. A concentração da solução estoque de AlClPc em etanol foi de 10,12 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.5 Encapsulamento da AlClPc em vesículas lipídicas de DSPC:DOPC contendo colesterol.

O encapsulamento da AlClPc foi realizado em vesículas lipídicas mistas (LVs) de DSPC, DOPC e colesterol (chol). Os LVs foram preparados nas seguintes proporções de DSPC, DOPC and chol, respectivamente: 69/00/31 (LV_I); 55/14/31 (LV_{II}); 35/35/31 (LV_{III}) e 21/48/31 (LV_{IV}) (mol%). Soluções etanolicas foram preparadas pelas respectivas dissoluções em etanol anidro (178,4 μ L): 1,47 mg de DSPC e 0,32 mg de chol para LV_I; 1,18 mg de DSPC, 0,29 mg de DOPC e 0,32 mg de chol para LV_{II}; 0,73 mg de DSPC, 0,73 mg de DOPC e 0,32 mg de chol para LV_{III} e 0,44 mg de DSPC, 1,02 mg de DOPC e 0,32 mg de chol para LV_{IV}. A estas soluções foram adicionados 5,1 μ L de AlClPc a partir do estoque em etanol (AlClPc = 1,79 mmol/L). A solução final foi injetada por meio de uma bomba peristaltica com velocidade controlada (1 μ L/s) sob 3,00 mL de uma solução de PBS, pH 7,4, contida em uma janela termostatzada a 57 °C. Para os LVs vazios, as soluções foram preparadas na ausência de AlClPc. A injeção foi realizada sobre agitação magnética constante (155 rpm) na ausência de luz

4.6 Tamanho de partícula e índice de polidispersão

O diâmetro hidrodinâmico médio (*Z average*) e o índice de polidispersão (PdI) dos LVs foram avaliados por um período de 67 dias. As amostras foram preparadas diluindo 20 μ L da respectiva solução de LV em 2 mL de água ultrapura contida em uma cubeta de poliestireno de caminho ótico de 1 cm. Os valores reportados são a média $\pm$ desvio padrão das três medidas diferentes de cada dispersão coloidal.

4.7 Medida de potencial zeta

O potencial zeta (ζ) das LV na presença e ausência de AlClPc foram determinadas por um período de 67 dias. As amostras foram adequadamente diluídas (1/100) com água ultrapura em uma cubeta de poliestireno de caminho ótico de 1 cm. Os valores reportados são a média $\pm$ desvio padrão das três diferentes medidas de cada dispersão coloidal.

4.8 Rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) da AlClPc foram obtidos em LV e em meio homogêneo utilizando-se o método comparativo descrito anteriormente (Equação 15). O composto padrão utilizado foi a ftalocianina de zinco em etanol com Φ_F igual a 0,28 (em densidade ótica < 0,1) (DE PAULA et al., 2013).

4.9 Cinética de ligação da AIClPc nas vesículas lipídicas mistas

A cinética de incorporação da AIClPc nos LV foi investigada por espectroscopia de fluorescência. Foram preparadas diversas soluções de LV na faixa de concentração entre 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,8 mmol L^{-1} pela diluição de LV a partir do estoque de 3,5 mmol L^{-1} em tampão PBS, pH 7,4. Foram adicionados 1,25 μL de AIClPc ($[\text{AIClPc}]_{\text{estoque}} = 0,12 \text{ mmol L}^{-1}$) em etanol anidro obtendo a concentração final de 10,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com imediata aquisição da fluorescência em função do tempo.

Considerando um sistema com n sucessivas reações reversíveis (ligação $\rightleftharpoons$ dissociação, agregação $\rightleftharpoons$ monomerização, etc.), a variação da concentração de todos os componentes em função do tempo pode ser descrita por um conjunto de n expressões exponenciais (VON PISTOR e RAKOWSKI, 1906; KUZELOVA e BRAULT, 1994; GEROLA et al., 2012). Para o nosso caso, os ajustes teóricos foram bem realizados por um modelo exponencial de primeira ordem com três etapas consecutivas (Equação 4) utilizando o *software Origin*® 8.0.

$$F = F_0 + A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 e^{-k_3 t} \quad (40)$$

onde A_1 , A_2 e A_3 são as amplitudes da fluorescência da AIClPc do primeiro, segundo e terceiro estágio, respectivamente; t é o tempo de irradiação; k_1 , k_2 e k_3 são as constantes cinéticas de ligação e F_0 e F são as intensidades de fluorescências no tempo zero e em t , respectivamente.

4.10 Avaliação da oxidação do DOPC nas vesículas lipídicas mistas

Um volume de 4 mL de $\text{LV}_{\text{III}} + \text{AIClPc}$ foram divididos em dois eppendorfs de volume final de 2 mL. A amostra 1 foi armazenada imediatamente, enquanto que a amostra 2 foi submetida a 15 minutos de fluxo de nitrogênio seguida de vedação. Os espectros de absorção das duas amostras foram avaliados em função do tempo. Após cada avaliação a amostra 2 foi novamente submetida ao fluxo de nitrogênio antes de ser estocada. Este experimento se estendeu por um período de 7 dias.

4.11 Anisotropia de fluorescência

Para a estimativa da fluidez relativa dos LV (1,75 mmol L^{-1}) foram analisadas as anisotropias (r) da sonda fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH, 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) particionadas nas LVs na faixa de temperatura de 10 a 80 °C. Os comprimentos de onda

utilizados na excitação e emissão foram de 327 e 430 nm, respectivamente. Valores de **r** e o fator **G** foram calculados de acordo com as Equações 7 e 8, respectivamente.

4.12 Constante de ligação da AlClPc nos LV

A constante de ligação (K_b) da AlClPc nos LV foi estimada por meio da fluorescência da AlClPc em diferentes concentrações de LV. Onze soluções dos respectivos LV em concentrações variando entre 0 e 1,17 mmol L⁻¹ foram preparadas em tampão PBS (pH 7,4) na presença de AlClPc (0,30 μmol L⁻¹). Os espectros de fluorescência da AlClPc foram determinadas após tempo de incubação de 1, 3, 9 e 3 horas⁷ para LV_I, LV_{II}, LV_{III} e LV_{IV}, respectivamente, e após 24 horas para todos os LV. Valores de K_b foram estimados por meio dos ajustes teóricos das curvas experimentais utilizando a equação 7 (BRAULT, 1986).

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{F_\infty - F_0} + \frac{1}{F_\infty - F_0} \cdot K_b \cdot \frac{1}{[L]} \quad (41)$$

onde F é a intensidade de fluorescência; F_∞ é a intensidade de fluorescência da AlClPc ligada aos LV; F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência dos LV, K_b é a constante de ligação e $[L]$ é concentração de lipídio.

4.13 Supressão de fluorescência da AlClPc em vesículas lipídicas mistas

Soluções de LV_I, LV_{II}, LV_{III} e LV_{IV} (30,0 μmol L⁻¹) contendo AlClPc (0,10 μmol L⁻¹) foram tituladas com NaI variando entre 0 e 0,36 mol L⁻¹. Tão logo o sistema atingiu o equilíbrio (~ 10 minutos) os espectros de fluorescência foram coletados. Os ajustes teóricos das curvas experimentais foram realizados pela relação de Stern-Volmer dada pela Equação 20.

4.14 Tempo de vida de fluorescência da AlClPc nas vesículas lipídicas mistas

Soluções de LV_I, LV_{II}, LV_{III} e LV_{IV} contendo AlClPc foram preparadas como descrito no item 4.5. Um volume de 30 uL de cada LV contendo AlClPc foram adicionados entre duas lamínulas de vidro e os decaimentos de fluorescência foram determinados no sistema adequado para leitura em filme (parâmetros descritos acima). Os ajustes teóricos das curvas experimentais foram realizados pela Equação 42.

$$F(t) = \sum_i A_i e^{-t/\tau_i} \quad (42)$$

⁷ Tempos relativos à cinética de internalização da AlClPc nos LV (não mostrado).

onde **F** é a função que descreve o decaimento, **A** é um fator pré-exponencial e τ é o tempo de vida de fluorescência.

4.15 Tempo de vida de fluorescência da AlClPc na mistura binária água/etanol

Foram preparadas 11 soluções estáveis de 2,00 mL de mistura água/etanol nas proporções 0/10, 1/9, 2/8, 3/7, 4/6, 5/5, 6/4, 7/3, 8/2, 9/1 e 10/0 (v/v). A estas soluções, foram adicionados 9 μ L de solução de AlClPc em etanol ($[AlClPc]_{\text{estoque}} = 0,68 \text{ mmol L}^{-1}$) obtendo-se a concentração final de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. As soluções foram mantidas em repouso por 24 h à temperatura ambiente, na ausência de luz. Em seguida, adicionou-se 30 μ L de cada solução entre duas lamínulas de vidro e os decaimentos de fluorescência foram determinados, como descrito anteriormente na seção 4.14. Os ajustes teóricos das curvas experimentais foram realizados pela Equação 42.

4.16 Avaliação da complexação alumínio (AlClPc)-fosfato (fosfolipídio)

A interação específica da AlClPc com o LV_{III} foi avaliada por espectroscopia de fluorescência na presença e ausência de fluoreto. Uma solução de LV_{III} ($1,75 \text{ mmol L}^{-1}$) na ausência de AlClPc foi preparada como descrito no item “14.5”. Um volume de 5 μ L de AlClPc em etanol ($30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram adicionados sobre 1,5 mL de duas soluções de LV_{III} (uma na ausência e uma na presença de $NaF = 5,31 \text{ mmol L}^{-1}$) atingindo a concentração de AlClPc de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os espectros de fluorescência em função do tempo foram “imediatamente” (< 2 segundos) adquirirmos após a adição da AlClPc.

Espectros de fluorescência da AlClPc ($0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) em etanol na ausência e presença de NaF ($14,41 \text{ mol L}^{-1}$) foram coletados a fim de avaliar tanto complexação entre o Alumínio e os íons fluoreto quanto o efeito qualitativo na taxa de emissão fluorescência.

4.17 Crescimento e expansão das linhagens celular

Carcinoma de células escamosas oral (OSCC) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) foram crescidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de aminoácido não essencial e $0,625 \mu\text{g mL}^{-1}$ de anfotericina B. As linhagens de células foram crescidas em uma incubadora a 37°C com 5% de CO_2 no escuro e mantidas em cultura durante todo o período do experimento. O tempo médio de repicagem foi de 2 e 5 dias para a OSCC e MCF-7, respectivamente.

4.18 Plaqueamento das linhagens celular

Após a confluência ($\sim 1,5 \times 10^6$ cel mL⁻¹), atingida em média após 2 (OSCC) e 5 (MCF-7) dias, as células de OSCC / MCF-7 foram retiradas da garrafa de cultura utilizando a incubação (~ 5 minutos) com solução de tripsina (0,05%) / EDTA (0,53 mmol/L) (Invitrogen) em tampão PBS (NaCl 140,0 mmol L⁻¹, KCl 3,0 mmol L⁻¹, Na₂HPO 4,3 mmol L⁻¹ e KH₂PO₄ 1,4 mmol L⁻¹) na ausência de meio de cultura, seguida de centrifugação a 1200 rpm (~ 8 minutos). O pelet foi ressuspensionado em 8 mL de meio de cultura e o número de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. O pelet ressuspensionado foi então corretamente diluído para a concentração de 100.000 células mL⁻¹. Desta diluição, 500 µL foi adicionado em cada poço de uma placa de 24 poços. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ no escuro (~ 24 h) para adesão das respectivas linhagens.

4.19 Internalização celular em carcinoma de células escamosa oral

Foram preparados 24 mL de LV_{III} (1,8 mmol L⁻¹) na presença de AlClPc (6,0 µmol L⁻¹) 24 h antes da primeira incubação (dia 1) em células de OSCC (item 4.19.2) e estocados à temperatura ambiente por todo o período do experimento (15 dias).

4.19.1 Plaqueamento da linhagem celular

Foram plaqueadas 50.000 células por poço em 16 poços de 1 placa de 24 poços (uma passagem distinta⁸ a cada 8 poços) seguida de incubação por 24 h para atingir a confluência, como descrito no item 4.18.

4.19.2 Incubação do LV_{III}+AlClPc em células de MCF-7.

Após 24 h (células em confluência), 8 mL do estoque de LV_{III}+AlClPc foi diluído em meio de cultura DMEM (10% SFB) na proporção de 1/2 (v/v). Em seguida, o meio de cultura da placa foi retirado e 500 µL da solução de LV_{III}+AlClPc diluída foi adicionado aos poços contendo as células de OSCC. As células foram incubadas por 3 h (37°C, 5% de CO₂) no escuro e, após o período de incubação, o meio foi retirado e as medidas de FLIM foram realizadas. Os passos dispostos nos itens 4.19.1 e 4.19.2 foram realizados novamente após 8 e 15 dias.

⁸ O número da passagem é definido como o número de vezes em que as células foram submetidas à ressuspensão (tripsinização, rodinho, etc.) seguida de plaqueamento para expansão da linhagem celular.

4.20 Ensaios de citotoxicidade em MCF-7

A citotoxicidade das respectivas formulações foi investigada por meio das curvas de dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade celular de MTT. Depois de estabelecida a fase de confluência, as células de MCF-7 foram tripsinizadas, plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas (24 h) para adesão (item 4.18). Após o tempo de adesão, as células foram incubadas (3h, 37 °C e 5% de CO₂) com as alíquotas das respectivas formulações (item 4.20.1, 4.20.2 ou 4.20.3) a fim de avaliar a citotoxicidade de cada um dos sistemas. Os experimentos foram realizados com N interno de 8 em triplicata biológica.

4.20.1 Citotoxicidade das vesículas lipídicas mistas

Para avaliar a citotoxicidade das LV_{III}, foram preparados LV_{III} ([lipídio] = 4,5 mmol L⁻¹) (método disponível no item 4.5) na ausência de AIClPc e αCHC e diluído em meio de cultura DMEM (10% SFB (v/v)) nas razões: 0,66/99,34; 6,67/93,33; 13,34/86,66; 20/80 e 33,34/66,66 (v/v). Um volume de 500 µL de cada diluição foi adicionado em 8 poços distintos das placas de 24 poços. A quantificação está descrita no item 4.20.4.

4.20.2 Citotoxicidade da AIClPc em vesículas lipídicas mistas

Para avaliar a citotoxicidade da AIClPc formulada em LV_{III}, foram preparados LV_{III} ([lipídio] = 4,5 mmol L⁻¹) na presença de AIClPc (15,0 µmol L⁻¹) (método disponível no item 4.5) e diluído em meio de cultura DMEM (10% SFB) nas razões: 0,66/99,34; 3,33/96,66; 6,67/93,33 e 20/80. Um volume de 500 µL de cada diluição foi adicionada em 8 poços distintos das placas de 24 poços. A quantificação está descrita no item 4.20.4.

4.20.3 Citotoxicidade do αCHC em vesículas lipídicas mistas na presença de AIClPc.

Para avaliar a citotoxicidade do αCHC, foram preparados quatro formulados de LV_{III}+AIClPc+αCHC (método disponível no item 4.5). Os formulados 1, 2, 3 e 4 foram preparados com αCHC na concentração de 10, 30, 100 e 500 µmol L⁻¹, respectivamente. As concentrações de LV_{III}⁹ (1,5 mmol L⁻¹) e AIClPc (5 µmol L⁻¹) foram mantidas constantes em todos os formulados. Os formulados foram diluídos (1/10 [v/v]) em meio de cultura DMEM (10% SFB) antes da incubação. Um volume de 500 µL de cada diluição foi adicionada (incubada) em 8 poços distintos das placas de 24 poços. A quantificação está descrita no item 4.20.4.

⁹ Concentração de lipídios totais (DSPC+DOPC+Chol)

4.20.4 Teste de MTT – Viabilidade celular

Após o tempo de incubação (3 h) com os respectivos formulados (itens 4.20.2 e 4.20.3), os formulados foram descartados e as células cuidadosamente lavadas com solução PBS. Foram adicionados 80 μL poço⁻¹ de MTT (5,0 mg mL⁻¹ em tampão PBS) e 420 μL poço⁻¹ de meio DMEM seguida de incubação (4 h, 37°C e 5% de CO₂). Após o período de incubação o meio foi retirado e foi adicionado 500 μL de isopropanol para dissolução total do formazan formado. Em seguida, foram realizadas leituras de absorção (ELISA [Safire²-Tekan]) em 560 nm com correção da absorção basal em 690 nm. As células viáveis foram avaliadas referente a um controle o qual não foi submetido a formulação. A porcentagem de células viáveis é dada pela razão entre a absorbância do formazan da amostra e do controle multiplicado por 100.

4.21 Ensaios de fototoxicidade em MCF-7

Foi avaliado o efeito da TFD sob a cultura celular MCF-7 na presença de LV_{III}+ α CHC+AlClPc. A citotoxicidade da AlClPc na presença de α CHC (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) formulada em LV_{III} (0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foi investigada por meio das curvas de dose-resposta obtidas pelo ensaio de viabilidade celular de MTT. Depois de estabelecida a fase de confluência, as células foram tripsinizadas, plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 h para adesão (item 4.18).

Após a adesão o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas (3 h, 37 °C e 5% de CO₂) com 500 μL do formulado de LV_{III}+ α CHC+AlClPc (0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) diluído (Formulado/DMEM = 13/87 [v/v]) em DMEM (10% SFB). Após o tempo de incubação o meio foi descartado e as células cuidadosamente lavadas com solução PBS. Foram adicionados 500 μL poço⁻¹ de meio de cultura DMEM seguido de irradiação por LASER (670 nm) nas doses de 40, 180, 318 e 500 mJ cm⁻². Ao término da irradiação, as placas foram incubadas (24 h, 37 °C e 5% de CO₂) seguidas do ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT (item 4.20.4).

4.22 Avaliação do caráter antioxidante do α CHC

Para avaliar o caráter antioxidante do α CHC, a intensidade de absorção do ácido úrico em 292 nm foi monitorada em função do tempo na presença de AlClPc / AlClPc+ α CHC sob irradiação LASER (30 mW) em 670 nm. Um volume de 2 mL de mistura água/etanol (4/6 [v/v]) contendo ácido úrico (Absorção inicial em 292 nm = 0.6) e AlClPc a 2×10^{-6} mol L⁻¹

foi irradiado (30 mW) em 670 nm e a intensidade de absorção em 292 nm foi determinada em função do tempo. O mesmo procedimento foi realizado na presença de α CHC a 5×10^{-5} mol L^{-1} .

CAPITULO V

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ftalocianina de alumínio-cloro em meio homogêneo

Uma das mais marcantes propriedades da AlClPc é seu caráter anfifílico o qual é responsável pela boa interação da AlClPc com os sistemas biológicos. Em contraponto, o caráter hidrofóbico promove o processo de alto agregação da AlClPc em meio aquoso, o que é desfavorável para a TFD. Assim, os estudos da AlClPc em meio homogêneo foram realizados para entendermos precisamente o processo de auto-agregação da AlClPc o qual não foi descrito completamente a nível molecular até agora e é essencial para a etapa de desenvolvimento dos sistemas LV-AlClPc.

5.1.1 Espectroscopia de absorção

A AlClPc em etanol apresentou duas bandas de absorção principais relacionada a sua forma monomérica (Figura 14).

Figura 14. Espectro de absorção ($0,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) da AlClPc em etanol. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

A mais intensa, com máximo em 672 nm (banda Q_I), é atribuída a transição eletrônica do estado fundamental para o primeiro estado eletrônico excitado ($S_0 \rightarrow S_1$) enquanto que a banda em torno de 350 nm, conhecida como banda B (ou banda Soret), é relacionada a transição eletrônica do estado fundamento para alguns níveis vibracionais do segundo estado

eletrônico excitado ($S_0 \rightarrow S_2$) (OUGH et al., 1988; WIEDERKEHR, 1996). Adicionalmente, duas bandas de menor intensidade em torno de 607 (Q_{III}) e 642 nm (Q_{II}) são relacionadas a transições vibrônicas da excitação $S_0 \rightarrow S_1$ (OUGH et al., 1988).

5.1.2 Espectroscopia de fluorescência

Em medidas de fluorescência, a AlClPc apresentou uma banda principal de emissão em etanol entre aproximadamente 650 e 700 nm ($\lambda_{\max} = 676$ nm), relativa à relaxação eletrônica do primeiro nível eletrônico excitado para o nível eletrônico fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$, Figura 15 linha pontilhada).

Figura 15. Espectro de absorção ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e emissão ($0,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) normalizados da AlClPc em etanol. Detalhe do máximo de absorção e emissão no *insert*. Medidas a 25 (± 1) °C

Ainda, são observadas duas bandas de menor intensidade com máximos próximos a 708 e 742 nm relativas a transições do primeiro nível eletrônico excitado para níveis vibracionais excitado do estado eletrônico fundamental (DOLPHIN, 1978; UENO et al., 2012).

5.1.3 Sobreposição espectral e transferência de energia

Outra característica importante da AlClPc é a similaridade entre a simetria do estado eletrônico excitado e fundamental da AlClPc. Como consequência, a molécula apresenta baixo deslocamento de Stokes, ou seja, alta sobreposição espectral. Esta sobreposição espectral pode afetar as respostas instrumentais de absorção e fluorescência e, por isso, o seu efeito deve ser cuidadosamente avaliado.

A diferença entre os comprimentos de onda máximo de absorção (banda Q₁) e emissão da AlClPc em etanol foi de somente 4 nm (insert da Figura 15). Deste modo, há uma alta probabilidade de transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET, do inglês: *fluorescence resonance energy transfer*) entre pares de moléculas de AlClPc que estão no estado eletrônico excitado e fundamental, respectivamente. O efeito da sobreposição espectral em medidas de absorção e fluorescência é bem demonstrado nos itens 5.1.4 e 5.1.6, respectivamente.

5.1.4 Desvios da lei de Lambert-Beer

Para avaliarmos uma possível auto-agregação da AlClPc em etanol, medidas de absorção e fluorescência da AlClPc em etanol foram realizadas em diversas concentrações. Valores de absorção máxima da banda Q₁ exibiram desvios da lei de Lambert-Beer em direção ao eixo x (A) em concentrações acima de $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ($A = 0,41$).

Figura 16. Espectro de absorção da AlClPc em etanol na faixa de concentração de $0,13$ a $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Desvio da lei de Lambert-Beer da AlClPc em etanol no comprimento de onda de 672 nm (B). Relação linear entre a concentração de AlClPc e seus valores de absorção em 672 (C), 350 (D), 607 (E) e 642 nm (F) em etanol. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Figura 16. Espectro de absorção da AlClPc em etanol na faixa de concentração de $0,13$ a $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Desvio da lei de Lambert-Beer da AlClPc em etanol no comprimento de onda de 672 nm (B). Relação linear entre a concentração de AlClPc e seus valores de absorção em 672 (C), 350 (D), 607 (E) e 642 nm (F) em etanol. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Apesar da auto-agregação e do efeito de filtro interno serem contribuintes para desvios no espectro de absorção (LAKOWICZ, 2013), nossos resultados suportam a ideia de que estes **não** sejam as causas primárias dos desvios observados e serão discutidos abaixo.

Ao contrário da banda Q_I , as bandas B, Q_{III} e Q_{II} exibiram uma relação linear entre os valores de absorção e a concentração de AlClPc nas condições avaliadas ($[\text{AlClPc}]$ de $0,1$ a $18,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); estes dados sugerem que a sobreposição da banda Q_I com a banda de emissão (Figura 15) é o principal fator dos desvios observados.

Na região da banda Q_I , durante a análise de absorção, o comprimento de onda transmitido coincide com o comprimento de onda de alguns fótons emitidos pela AlClPc com o seu retorno ao estado eletrônico fundamental, que é típico para este tipo de composto. Isto pode resultar em desvios da lei de Lambert-Beer em direção ao eixo x . O aumento da concentração

de AlClPc amplifica sua emissão e diminui a radiação transmitida e, assim, a magnitude do desvio aumenta.

Em resumo, o coeficiente de absorção (ϵ) da banda Q_I da AlClPc em etanol deve ser determinado em concentrações menores que $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ onde a relação linear entre a concentração e a intensidade de absorção é observada. Os valores de ϵ para as bandas 350 (banda B), 607 (Q_{III}) e 642 nm (Q_{II}) foram determinados entre 0 e $1,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores de ϵ da AlClPc em etanol no comprimentos de onda de 350, 607, 642 e 672 nm estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Coeficiente de absorção molar (ϵ) da AlClPc em etanol. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$	$\epsilon / (10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	R^2
350	$80,7 \pm 0,2$	0,9999
607	$44,8 \pm 0,2$	0,9997
642	$36,7 \pm 0,2$	0,9996
672	$293,9 \pm 0,9$	0,9999

5.1.5 Desvios da linearidade em fluorescência

O estado da AlClPc em etanol foi também avaliado por espectroscopia de fluorescência em função da sua maior sensibilidade comparado à medidas de absorção. A relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração da AlClPc foi avaliada plotando-se os valores de fluorescência máximo da AlClPc em etanol em função da sua concentração. Na concentração de AlClPc até $0,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a relação é linear (Figura 5B). Entretanto, desvios da linearidade em direção ao eixo x ocorreram em maiores concentrações (C, a linha contínua mostra a linearidade a suficientemente baixas concentrações).

Uma das causas frequentes de desvios em fluorescência é a formação de espécies auto agregadas (KATO et al., 1999; KEPKAY et al., 2002). A maioria destas espécies não apresenta emissão de fluorescência em função, principalmente, do aumento da taxa de conversão interna (GRACETTO et al., 2011; KESSEL e ROSSI, 1982). Como suporte, a técnica de Espalhamento de Luz Ressonante (RLS) é frequentemente empregada na avaliação de auto agregados (PASTERNAK e COLLINGS, 1995; GONÇALVES et al., 2013). Por esta razão, medidas de RLS em conjunto com dados de fluorescência são úteis na avaliação de agregados derivado de espécies fluorescentes.

Os espectros de fluorescência (Figura 17A) e RLS (Figura 17D) da AlClPc em etanol foram determinados em função da concentração de AlClPc. A AlClPc em etanol apresentou um pico em RLS com máximo em 676 nm em todas as concentrações analisadas (Figura 32D). Entretanto, este comprimento de onda máximo em RLS coincidiu com o máximo de emissão de fluorescência da AlClPc no seu estado monomérico. Além disso, a magnitude do sinal de RLS foi proporcional à emissão de fluorescência (Figura 32C). Portanto, foi concluído que o sinal de RLS não é devido ao espalhamento de radiação por espécies auto agregadas, mas é função da sobreposição da banda Q_I com a banda de emissão da AlClPc, ou seja, é função da emissão de espécies monoméricas da AlClPc produzida pela excitação sincrônica em torno da banda Q_I (DE PAULA, ROBBLEE e PASTERNAK, 1995).

Figura 17. Espectros de fluorescência da AlClPc em etanol na faixa de concentração entre $0,43$ e $10,23 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Relação linear entre os valores de fluorescência máxima (676 nm) normalizada da AlClPc em etanol e sua concentração ($R^2 = 0.9998$) (B). Intensidade de fluorescência máxima (676 nm) normalizada da AlClPc em etanol em função da concentração

com desvios de Lambert-Beer acima de $0,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (C). Fluorescência ($\circ$) e RLS ($\blacktriangle$) máximo (676 nm) normalizado da AlClPc em etanol em função da concentração (C). As linhas tracejadas indicam a relação linear entre a fluorescência e concentração de AlClPc em etanol e facilita a visualização do desvio de Lambert-Beer acima de $0,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

De fato, nós temos demonstrado que a auto agregação da AlClPc nestas condições não é favorável (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016). Por outro lado, este sinal de RLS não foi observado para a AlClPc em misturas água/etanol acima de 30% de água (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016). Este fato se deve provavelmente a presença moléculas de água na solução que agem como supressoras de fluorescência e inibem o aparecimento deste sinal. O efeito da água na supressão de fluorescência da AlClPc foi bem descrito por nós em um trabalho anterior (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016).

A transferência de energia (FRET) entre um par de AlClPc em meio homogêneo pode ser avaliada experimentalmente por medidas de tempo de vida de fluorescência em função da concentração de AlClPc. Os tempos de vida da AlClPc em etanol em diferentes concentrações estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Tempo de vida de fluorescência da AlClPc em diferentes concentrações em etanol. Medidas a $24 (\pm 2) ^\circ\text{C}$.

[AlClPc] ($\times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
1,80	6,31	-	0,955
3,59*	6,24	-	1,031
29,30	6,25	-	1,005

*~limite da linearidade

Até a concentração de $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a AlClPc em etanol apresentou um único tempo de vida de fluorescência em torno de 6,3 ns o qual foi independente da sua concentração. Mostramos no item 0 que este tempo de vida é relacionado a AlClPc no estado monomérico. A independência do tempo de vida de fluorescência da AlClPc com a sua concentração sugere que **não** há presença de FRET mesmo com o aumento de sete vezes na concentração acima do limite de linearidade (Tabela 1).

Com relação à hipótese de agregados, mesmo na concentração de $2,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de AlClPc em etanol não foi observado a presença destes (ausência de um tempo de vida mais

curto (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016)) o que sugere que esta não seja a causa dos desvios observados.

5.1.5.1 Efeito de filtro interno

O último efeito importante e que deve ser considerado é a possibilidade de reabsorção da fluorescência da AlClPc devido a ampla sobreposição dos espectros de emissão e absorção da AlClPc em etanol (Figura 15). Deste modo, as moléculas de AlClPc agem como um filtro diminuindo a intensidade de radiação que chega até o detector. Este efeito é conhecido como *filtro interno* e é particularmente pronunciado em fluorescência de compostos cujos comprimentos de onda de emissão e absorção coincidem.

Assim, nós concluímos que os desvios em fluorescência são derivados da reabsorção da radiação emitida por moléculas de AlClPc (filtro interno). Demonstramos aqui e em trabalhos anteriores (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016) que estes desvios não são função da formação de dímeros. Portanto, todas as medidas de fluorescência da AlClPc apresentadas neste trabalho foram realizadas em concentrações abaixo de $0,41 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a fim de minimizar os efeitos citados acima.

5.1.6 Estudos de agregação

Em função da ausência de auto-agregados de AlClPc (a baixas concentrações) em etanol, a dinâmica de agregação da AlClPc em meio homogêneo foi avaliada em misturas binárias de água/etanol.

5.1.6.1 Espectroscopia de absorção

Os espectros de absorção da AlClPc ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em misturas água/etanol (30, 50, 60 e 70% de água (v/v)) apresentaram uma diminuição nas intensidades de absorção das bandas S, Q_{III}, Q_{II} e Q_I em função da porcentagem de água (Figura 18). Ainda, em 70% (v/v) de água, o aparecimento de dois ombros foi observado em 380 (S') e 740 (Q') nm, respectivamente.

Figura 18. Espectro de absorção da AlClPc ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em misturas água/etanol a 30 (—), 50 (—), 60 (—) e 70 (—) % de água (A). Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$

A diminuição na intensidade de absorção em função da porcentagem de água indica a formação de espécies auto agregadas enquanto que o deslocamento batocrômico das bandas S' em relação a S e Q' em relação a Q_I são indicativos de agregados do tipo-J, modelo suportado pela teoria do éxciton molecular (item 2.1.1). Esta auto-agregação afeta diretamente as propriedades fotofísicas e fotossensibilizantes da AlClPc (DHAMI e PHILLIPS, 1996a), aumentando a desativação do estado excitado por processos não radiativos. Assim, a AlClPc não pode ser aplicada diretamente e necessita de um sistema de veiculação efetivo (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2005; DHAMI e PHILLIPS, 1996a)

5.1.6.2 Tempo de vida de fluorescência

Para confirmar a presença destes auto-agregados de AlClPc em mistura água/etanol foram realizadas medidas de decaimento de fluorescência da AlClPc em misturas binárias água/etanol na faixa de 0 a 100% de água (v/v). Os decaimentos de fluorescência da AlClPc em mistura água/etanol a 10 e 90% de água (v/v) estão dispostos na Figura 19.

Exceto para a porcentagem de água entre 50-80%, apenas um tempo de vida foi observado com valores entre 6,2 a 4,7 ns. Em 50% de água há o surgimento de um segundo tempo de vida mais curto, da ordem de 1,5 ns, o qual desaparece em porcentagem de água acima de 80%.

Figura 19. Decaimento de fluorescência (—) e ajuste teórico (—) da AlClPc em mistura binária água/etanol a 10 (A) e 90% (B) de água (v/v). Medidas a $24 (\pm 2) ^\circ\text{C}$.

Notamos que a amplitude da componente do tempo de vida mais longo (A_1) diminui muito lentamente até aproximadamente 50% de água. Entretanto, em 50% de água há uma expressiva queda em A_1 . Estes resultados indicam que há um rápido desaparecimento da espécie com tempo de vida mais longo e surgimento de, pelo menos, outra com tempo de vida mais curto com o aumento da porcentagem de água em torno de 50%. Isto está de acordo com a hipótese de agregação da AlClPc a partir de 50% de água nas condições utilizadas. O desaparecimento do segundo tempo de vida acima de 80% de água faz concluir que este tempo de vida é relativo a agregados de tamanhos pequenos, por exemplo, do tipo dímero.

Na mistura água/etanol os valores de tempo de vida da espécie monomérica são intermediários entre 6,24 (0% de água) e 4,68 (100% de água) ns (Tabela 3). Esta diminuição no tempo de vida é função da supressão de fluorescência da AlClPc pelas moléculas de água (HU et al., 2005; SIMPLICIO et al., 2004).

Tabela 3. Tempos de vida da AlClPc em misturas água-etanol. Comprimento de onda de excitação em 640 nm, $24 (\pm 2) ^\circ\text{C}$.

% água (v/v)	τ_1	A_1	τ_2	A_2	χ^2
0	6,24	19615,21	-	-	1,031
10	6,15	19448,77	-	-	0,983
20	6,03	19135,47	-	-	1,056
30	5,92	18774,28	-	-	1,003
40	5,82	18661,79	-	-	1,053
50	5,74	17632,02	1,41	769,65	0,991
60	5,63	2153,93	1,65	1073,33	1,004
70	5,50	978,35	1,74	617,87	1,025
80	5,25	499,58	1,06	654,52	1,002
90	4,98	345,17	-	-	0,987
100	4,68	661,49	-	-	1,034

5.1 Estudos espectroscópicos do α CHC em meio homogêneo e em LV_{III}.

5.1.1 Coeficiente de absorção molar do α CHC

Os coeficientes de absorção do α CHC em água (PBS, pH 7,4), etanol e octan-1-ol foram determinados.

5.1.1.1 Tampão PBS, pH 7,4.

Na Figura 20A estão dispostos os espectros de absorção do α CHC em água (tampão PBS, pH 7,4) em diferentes concentrações.

Nota-se uma relação linear entre valores de absorção nos máximo em 233 e 327 nm e a concentração de α CHC em toda a faixa de concentração avaliada (B e C). A obediência da lei de Lambert-Beer na faixa de concentração analisada possibilitou a determinação do ϵ do α CHC em água. Os valores de ϵ estão dispostos na Tabela 4

Figura 20. Espectro de absorção do αCHC em água (tampão PBS, pH = 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) na faixa de concentração entre $80,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Relação linear entre a intensidade de absorção em 233 (B) e 327 nm (C) do αCHC em água (tampão PBS, pH = 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$

5.1.1.2 Etanol

Na Figura 21A estão dispostos os espectros de absorção do αCHC em etanol na faixa de concentração de $2,0$ a $24,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nota-se uma estrita relação linear entre valores de absorção e concentração de αCHC em uma faixa de concentração suficientemente diluída (Figura 21B, C e D).

Considerando os valores de absorção no comprimento de onda de 236 e 328 nm, para concentrações acima de $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a curva apresenta desvio em direção ao eixo x (Figura 22).

Figura 21. Espectro de absorção do α CHC em etanol na faixa de concentração de $0,8$ a $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Intensidade de absorção das bandas em 204 (B), 236 (C) e 328 (D) nm do α CHC em etanol (B). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Figura 22. Desvios de Stern-Volmer do α CHC em etanol a altas concentrações (acima de $1,6 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$) nos máximos de absorção em 236 (A) e 328 nm (B). Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Entretanto, na faixa de concentração de $0,2$ a $5,7 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$ nota-se um deslocamento batocrômico de 6 e 12 nm nos máximos de absorção em 236 e 328 nm, respectivamente (Figura 21A). A partir deste ponto o máximo de absorção se mantém estável até a concentração de $10,0 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$ ($A = 2,06$). Acima desta concentração, quase toda radiação de energia próxima a 340 nm incidida na amostra é absorvida pela α CHC ($A > 2$), o que pode afetar as medidas instrumentais.

Para avaliar o efeito do deslocamento das bandas de absorção, os valores de absorção máxima na faixa entre 236 a 242 nm (Figura 23A) e 328 a 340 nm (Figura 23B) foram plotados em função da concentração de α CHC.

Deste modo, foi observada uma boa relação linear entre os valores de absorção e a concentração de α CHC até $7,45 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$. Portanto, sugerimos aqui que os desvios de Stern-Volmer apresentados na figura 22 não possuem influência do efeito de filtro interno, mas resultam de interações entre as moléculas de α CHC dispersas no meio. Entretanto, é necessário uma análise mais refinada utilizando outras técnicas experimentais para avaliar as características destas interações bem como a formação de, por exemplo, dímeros de α CHC em etanol.

Figura 23. Intensidade máxima de absorção em função da concentração do α CHC em etanol na faixa de comprimento de onda de 236 a 242 nm (A) e 328 a 340 nm (B). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Os valores de coeficiente de absorção molar para o α CHC em etanol nos comprimentos de onda de 236 e 328 nm foram obtidos à suficientemente baixas concentrações onde a absorção é função linear da concentração de α CHC (Figura 21C e D). O coeficiente de absorção molar em 204 nm foi obtido a partir de concentrações mais altas. Isto foi necessário devido à baixa definição deste pico em regiões de baixa concentração de α CHC. Ademais, a obediência da lei de Lambert-Beer na faixa de concentração de $1,0$ a $10,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ possibilitou a determinação do coeficiente de absorção molar já que este pico não apresentou deslocamentos em função da concentração. Os valores de ϵ estão dispostos na Tabela 4.

5.1.1.3 octan-1-ol

Na Figura 24A estão dispostos os espectros de absorção do α CHC em octan-1-ol a diferentes concentrações.

Figura 24. Espectro de absorção do α CHC ($0,2$ a $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em octan-1-ol (A). Intensidade de absorção em 212 (B), 240 (C) e 335 nm (D). Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Assim como em etanol, observamos um deslocamento batocrômico nos máximos de absorção da α CHC em função da concentração. Notamos relação linear entre valores de absorção e concentração de α CHC em 212, 240 e 335 nm apenas a suficientemente baixas concentrações (Figura 24B, C e D, respectivamente).

Portanto, os valores de coeficiente de absorção molar para o α CHC em octan-1-ol foram obtidos na faixa de concentração onde os valores de absorção mostrou ser função linear da concentração de α CHC.

Os valores de coeficiente de absorção do α CHC em água (tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), etanol e octan-1-ol estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Coeficiente de absorção molar (ϵ) do α CHC em água (tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), etanol e octan-1-ol a 25 °C.

$\lambda_{\text{máx}} / \text{nm}$	$\epsilon / (10 \cdot \text{L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ $\text{H}_2\text{O}^{\text{a}}$	$\epsilon / (10 \cdot \text{L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ EtOH	$\epsilon / (10 \cdot \text{L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$ $\text{Octan-1-ol}^{\text{a}}$
α CHC			
202 ^a /204 ^b /212 [*]	-	6,27 (0,07) ^e	6,47 (0,04) ^h
233 ^a /236 ^b /240 [*]	10,73 (0,04) ^c	9,65 (0,04) ^f	8,71 (0,07) ⁱ
327 ^a /328 ^b /335 [*]	23,02 (0,08) ^d	22,94 (0,08) ^g	22,06 (0,04) ^j

^aTampão PBS (pH=7,4; força iônica $1,0 \text{ mol L}^{-1}$)

^bEtanol

^{*}Octan-1-ol

^c $R^2=0.9998$

^d $R^2=0.9998$

^e $R^2=0.9992$

^f $R^2=0.9999$

^g $R^2=0.9999$

^h $R^2=0.9953$

ⁱ $R^2=0.9997$

^j $R^2=0.9999$

5.2 Coeficiente de partição água/octan-1-ol

Estudos de partição água/octan-1-ol são importantes para estimar qualitativamente a interação de compostos com os LVs. Sob a análise quantitativa, compostos que apresentam valores de $\log K_P$ menores que zero são considerados compostos hidrofílicos ao passo que $\log K_P$ maiores que 1,5 são referentes a espécies lipofílicas. Valores intermediários são indicativos de compostos com carácter anfifílico (WAINWRIGHT e GIDDENS, 2003).

Estudos fotofísicos da interação de derivados xantênicos com sistemas micelares (PELLOSI et al., 2012) (ESTEVÃO et al., 2014) mostraram que a magnitude de K_b segue a ordem de K_P .

A rosa de bengala, que apresenta $\log k_P$ igual a 0,59, interage fortemente com micelas (PELLOSI et al., 2012) e está localizada em região mais interna ao passo que a eosina Y, com $\log K_P$ igual a 0,18, possui localização interfacial e menor valor de K_b .

Valores de absorção máxima na fase aquosa e octanólica, K_p e $\log K_p$ do α CHC em mistura binária água/octa-1-ol estão dispostos na

Tabela 5. Pelo método comparativo, o derivado α CHC deve se localizar preferencialmente na fase aquosa e/ou interface da vesícula lipídica. A localização interfacial é importante para o nosso caso uma vez que ela está disponível para interagir (agir como sinalizadora) com os receptores de monocarboxilados dispostos na membrana plasmática das células neoplásicas.

Tabela 5. Valores de absorção máxima na fase aquosa e octanólica, K_p e $\log K_p$ do α CHC em mistura binária água/octa-1-ol a 25 °C.

Composto	H ₂ O $A_{\max}(\lambda)$	Octan-1-ol $A_{\max}(\lambda)$	K_p	$\log K_p$
α CHC	1,2406	0,6767	0,54 ₅	-0,26 ₃

5.2.1 O efeito solvente

Um fator importante e que pode afetar o espectro de absorção é a polaridade do solvente, o efeito solvente (LAKOWICZ, 2013). Cada solvente possui um efeito distinto com relação a estabilização do cromóforo. Desta forma, o comprimento de onda máximo de absorção é fortemente dependente do ambiente químico em que o cromóforo se encontra.

Na Figura 25 estão dispostos os espectros de absorção do α CHC a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em água (PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), etanol e octan-1-ol. Nota-se um deslocamento batocrômico com a diminuição da polaridade do solvente. Este deslocamento é útil na avaliação qualitativa da interação dos α CHC com os LVs.

Figura 25. Espectro de absorção do α CHC a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água (—, PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), etanol (—) e octan-1-ol (—) (A). Espectro de absorção do α CHC a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em água (---, PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e em LV_{III} (—, $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de AICIPc ($3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) (B). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Assim, o espectro de absorção do α CHC em água foi comparado com o do α CHC formulado em LV_{III} . Na Figura 15, nota-se um deslocamento batocrômico de 7 nm no espectro de absorção do α CHC em água em comparação com o obtido em LV_{III} . Este deslocamento parece indicar uma interação do α CHC com o LV_{III} . Os resultados de K_p apresentados anteriormente sugerem que esta possível interação ocorra na região interfacial da LV_{III} . Esta interação poderia ter influência na ligação e/ou localização da AICIPc em LV_{III} . Entretanto, nossos dados não apresentaram diferenças significativas nos espectros de absorção da AICIPc em LV_{III} com a presença e ausência de α CHC.

5.3 Ftalocianina de alumínio-cloro em vesículas lipídicas mistas

5.3.1 Caracterização das vesículas lipídicas mistas

5.3.1.1 Anisotropia de fluorescência

Uma das sondas mais utilizadas de microviscosidade de membrana é a bem conhecida 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH). (DAVENPORT , KNUTSON e BRAND, 1986; SANTHOSH et al., 2014; ECKMANN et al., 2014) A alta sensibilidade da anisotropia do DPH com a magnitude de fluidez da membrana faz deste composto uma ótima sonda nos estudos de transição de fase de vesículas lipídicas. (DAVENPORT , KNUTSON e BRAND, 1986; SANTHOSH et al., 2014). Os valores máximos (r_i , $15 ^\circ\text{C}$) e mínimos (r_f , $70 ^\circ\text{C}$) de anisotropia do DPH nos LVs estão listados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de anisotropia de fluorescência (r) do DPH ($[\text{DPH}] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) nos diferentes LV ($[\text{LV}] = 1,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ à 15 e $70 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

LV	r_i^a	r_f^b	Δr^c	$\Delta T_r^d (^\circ\text{C})$	$T_f^e (^\circ\text{C})$
DSPC	0,14	0,03	0,11	25,0	52
LV_I	0,29	0,16	0,13	29,1	50

LV _{II}	0,28	0,11	0,17	54,1	50
LV _{III}	0,27	0,10	0,17	56,2	49

^a15,0 °C

^b70,0 °C

^c $r_i - r_f$

^dLargura de temperatura em que r varia.

^eTemperatura de fluidez intermediária entre as fases gel-ordenada e líquido desordenado.

Os valores de anisotropia do DPH em DSPC em função da temperatura (Figura 26A e B) sugerem uma temperatura de transição entre as fases gel e líquido ordenada em torno de 52 °C. Este valor está próximo aos encontrados na literatura por outros métodos empíricos (MABREY e STURTEVANT, 1976).

Há um aumento nos valores de anisotropia com a adição de colesterol ao sistema o qual sugere um aumento de rigidez das vesículas de DSPC em função da presença de colesterol. Resultados similares foram observados em trabalhos anteriores (PAPAHADJOPOULOS et al., 1973). O ΔT_r , largura da faixa de temperatura em que r varia, do DSPC é alterada com a adição de 31mol% de colesterol ao sistema (Tabela 1). Isto sugere que a transição de fase bem definida do DSPC é afetada com a presença de 31mol% de colesterol. De fato, outros autores sugerem que a principal transição de fase desaparece em concentrações de colesterol acima de 30mol% (ALTUNAYAR, SAHIN e KAZANCI, 2015).

Ao contrário do chol, a baixas temperaturas, a presença/proporção de DOPC no sistema praticamente não tem efeito sobre os valores de r (Figura 26). Entretanto, a altas temperaturas a presença de 20% de DOPC diminui o valor de r de 0,16 para 0,11.

A menor magnitude de interação de van der Waals entre moléculas de DOPC-DSPC comparado a interação DSPC-DSPC contribui para a diminuição nos valores de anisotropia em função do aumento de DOPC nos sistemas. Interessantemente, maiores proporções de DOPC parecem não ter grande efeito sobre r .

A proporção de DOPC também afeta o ΔT_r . A presença de 20% de DOPC no sistema causa um aumento de 25 °C ($\Delta T_r^c_{\text{DSPC:DOPC:Chol (2:8)}} - (\Delta T_r^c_{\text{DSPC:Chol}})$ em ΔT_r . Deste modo, além do colesterol, uma pequena quantidade de DOPC no sistema DSPC/chol possui significativo efeito sobre a transição de fase bem ordenada gel-líquido onde a presença de microdomínios lipídicos (do inglês: *lipid rafts*), pode contribuir para o efeito em questão (ZHAO et al., 2007). Maiores proporções de DOPC parece não possuir grandes efeitos sobre a faixa de fluidez além do observado a 20mol%.

De modo interessante, a presença de DOPC não tem grande efeitos sobre os valores da T_f (Tabela 6), ou seja, o aumento de ΔT_f ocorre simetricamente em torno da T_f . Entretanto, a presença de colesterol diminui ligeiramente os valores da T_f .

Figura 26. Anisotropia de fluorescência do DPH em vesículas lipídicas em função da temperatura. DSPC (A), LV_I(C), LV_{II}(E), LV_{III} (G). Segunda derivada da anisotropia do DPH em função da temperatura em DSPC (B), LV_I(D), LV_{II}(F), LV_{III} (H). Medidas a 25 (± 1) °C, tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$.

A presença e magnitude dos *rafts* em alguns tipos de sistemas podem ter influencia nos resultados obtidos uma vez que o DPH não apresenta distribuição preferencial em LV composto de múltiplas fases (LEFTIN et al., 2013).

5.3.1.2 Tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta

A eficácia do método de injeção etanólica na preparação dos LVs na ausência e presença de AIClPc foi avaliada por DLS. Além deste, o efeito do α CHC sobre o LV_{III} e LV_{III}+AIClPc foi analisado. Após a preparação das formulações (dia 1), o diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (ζ) foram determinados. A distribuição do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta (ζ) para o LV_{III} na presença e ausência de AIClPc e α CHC estão dispostos na Figura 27.

Perfis muito similares foram observados para LV_I, LV_{II} e LV_{III} na presença e ausência de AIClPc. Os valores de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (ζ) do dia 1 estão dispostos na Tabela 7. Nota-se uma diminuição no tamanho dos LV com o aumento da proporção de DOPC. Os resultados sugerem que o DOPC é responsável por uma diminuição no numero de agregação dos lipídios o que resulta em menor volume dos LV. Por consequência, há uma maior quantidade de LV no sistema com o aumento da proporção de DOPC.

A incorporação da AIClPc apresentou uma influencia apenas no tamanho dos LV_{III} e LV_{IV}. É observado um aumento de aproximadamente 8,0 e 5,0 % para os LV_{III} e LV_{IV},

respectivamente, com a presença de $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de AlClPc. Apenas um pequeno aumento no PdI foi observado nos LV_{III} (livre de AlClPc) com a presença do α CHC. Entretanto, o α CHC parece favorecer uma pequena diminuição no diâmetro hidrodinâmico do LV_{III} quando na presença de AlClPc o que pode indicar uma interação entre o α CHC e o LV_{III}+AlClPc. O efeito do α CHC sobre os demais LVs não foi avaliado.

Figura 27. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico do LV_{III} na ausência (A) e presença (B) de AlClPc. Distribuição do potencial zeta do LV_{III} na ausência (C) e presença (D) de AlClPc. Distribuição do diâmetro hidrodinâmico do LV_{III}+AlClPc na ausência (E) e presença (F) do α CHC. Distribuição do potencial zeta do LV_{III}+AlClPc na ausência (G) e presença (H) do α CHC. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ e $\mu = 1.0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabela 7. Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta (ζ) dos LV na presença e ausência de AlClPc e α CHC em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

LV	D. Hidrodinâmico (nm)	PdI	Potencial zeta (ζ)
----	--------------------------	-----	----------------------------

LV _I	111,4 ± 0,3 ¹	0,12 ± 0,02 ¹	-15,3 ± 13,2 ¹
LV _{II}	110,2 ± 0,4	0,11 ± 0,02	-19,5 ± 7,8
LV _{III}	98,0 ± 0,9	0,12 ± 0,01	-12,7 ± 9,5
LV _{IV}	86,7 ± 0,7	0,12 ± 0,01	-18,8 ± 12,3
LV _{III} + αCHC	97,9 ± 1,1	0,14 ± 0,02	-19,6 ± 6,4
LV _I + AlClPc	111,2 ± 0,4	0,15 ± 0,01	-10,4 ± 12,9
LV _{II} + AlClPc	109,8 ± 0,6	0,18 ± 0,02	-9,1 ± 9,2
LV _{III} + AlClPc	106,6 ± 0,3	0,14 ± 0,01	-16,4 ± 12,0
LV _{IV} + AlClPc	91,3 ± 2,1	0,14 ± 0,02	-20,8 ± 19,1
LV _{III} + AlClPc + αCHC	99,62 ± 0,5	0,15 ± 0,01	-24,6 ± 6,0

¹Desvio padrão relativo a triplicata dos valores de z-average; A polidispersão é dada pelo Pdl.

5.3.1.3 Estabilidade

A estabilidade dos LV na ausência e presença de AlClPc em função do tempo foi avaliada por um período superior a sessenta dias (Figura 28).

Figura 28. Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão dos LV_I (A), LV_{II} (B), LV_{III} (C) e LV_{IV} (D) a $0,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de AlClPc a $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ e $\mu = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para os LV na presença de AlClPc, apenas o LV_{II}+AlClPc apresentou um aumento significativo no tamanho logo após o dia 10 o qual se estendeu até 30 dias.

Os demais sistemas se apresentaram estáveis por um período superior a 50 dias. Após este período, houve o aparecimento de precipitados em todos os sistemas. Comportamento similar foram observados para os LV na ausência de AlClPc bem como para o LV_{III}+ α CHC na presença e ausência de AlClPc.

De modo interessante, não notamos aumento no tamanho hidrodinâmico do LV_{IV}+AlClPc após a presença de precipitados (Figura 28D). A presença de precipitado neste sistema parece ser devido a liberação da AlClPc para o meio aquoso ao invés da agregação do LV.

Os valores de potencial zeta (ζ) foram negativos (Tabela 7) para todos os sistemas, mantendo-se entre -10 e -40 mV. Apesar dos altos valores de desvio-padrão, a estabilidade relativa dos LV parece estar relacionada aos valores de ζ . Para os LV na presença de AlClPc, a menor estabilidade do LV_{II}+AlClPc é relacionada ao menor valor em módulo de ζ ao passo que para o LV_{IV}+AlClPc o maior valor de ζ em modulo garante sua maior estabilidade.

Valores intermediários de ζ para os LV_I+AlClPc e LV_{III}+AlClPc são responsáveis por suas estabilidades intermediárias. A presença do α CHC nos LV_{III} e LV_{III}+AlClPc resultou em uma pequena diminuição nos valores de ζ (Tabela 7) o que é importante para garantir a estabilidade dos sistemas em questão.

Os índices de polidispersão (PdI) se mantiveram abaixo de 0,2 para todos os sistemas durante o período analisado (< 67 dias) o que demonstra a baixa polidispersividade dos LV em todos os casos estudados e confirma a eficácia do método de preparo escolhido.

5.3.2 Caracterização da AlClPc nas vesículas lipídicas mistas

5.3.2.1 Incorporação

A agregação da AlClPc em meio aquoso (Figura 29A, linha tracejada) resulta no aumento das taxas de decaimento não radiativo, (KENNES et al., 2014) diminuição do tempo de vida do estado triplete excitado (IDOWU, ARSLANO-fLU e NYOKONG, 2014; KENNES et al., 2014) e, portanto, em redução da formação de espécies reativas *in situ* (PETROVAJOVA et al., 2013b); PETROVAJOVA et al., 2013a) Sendo assim, o conhecimento sobre as características físico-químicas e fotofísicas da AlClPc quando incorporada em LV são essenciais para sua aplicação em TFD. A internalização e monomerização da AlClPc em vesículas lipídicas mistas de DSPC/DOPC/Colesterol

denominadas LV_I, DD_{II}, LV_{III} e LV_{IV} foi avaliada por espectroscopia de absorção. Em LV_I, o baixo valor de intensidade de absorção da banda em 674 nm (banda Q_I, característica de espécie monomérica (TSUBONE et al., 2014)) da AlClPc indica uma baixa eficiência de encapsulação e/ou monomerização da AlClPc neste sistema (Figura 29B).

Na Figura 29B, nota-se um aumento na intensidade de absorção da banda Q_{III} com o aumento da proporção de DOPC no sistema até a proporção 1:1 DSPC:DOPC (LV_{III}). Um aumento da proporção de DOPC a partir deste ponto não resulta em maior incorporação/monomerização da AlClPc.

Figura 29. Espectro de absorção da AlClPc ($4,84 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em etanol (—) e em tampão PBS, pH 7.4 e $\mu = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$. (---) (A). Espectro de absorção da AlClPc ($3,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) nos LV_I (■), LV_{II} (△), LV_{III} (—) e LV_{IV} (□), pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (B). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Dhami e Phillips (1996) tem sugerido que o aumento relativo da intensidade da banda Q_{II} é indicativo de agregação da AlClPc. (DHAMI e PHILLIPS, 1996b) A banda Q_I normalizada da AlClPc é observada na Figura 30. Observa-se uma diminuição relativa das bandas Q_{III} e Q_{II} com o aumento da proporção de DOPC até o LV_{III}. O partir do LV_{III} um pequeno aumento é novamente observado (em LV_{IV}). Além disso, a presença de uma pequena banda em torno de 740 nm (Q') da AlClPc nos LV_I e LV_{II} (de maior intensidade no LV_I), é indicativo de agregados do tipo J (KASHA, 2012). A formação destes agregados parece ser privilegiada pelo aumento da magnitude da ordem dos lipídios nos LV.

Estes dados sugerem que o LV_{III} é o mais eficaz na incorporação/monomerização da AlClPc. Há, portanto, um efeito sinérgico na interação da AlClPc com os LV mistos de DSPC:DOPC com máximo em quantidade equimolar de DSPC/DOPC.

Figura 30. Absorção normalizada da AlClPc em LV_I (-○-), LV_{II} (-x-), LV_{III} (---) E LV_{IV} (—). LV dispersos em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

As alterações fotofísicas da AlClPc nos diferentes LV em função do tempo foram avaliadas (Figura 31). Para o LV_{III}, notamos uma queda na intensidade de absorção com o tempo até o dia 18 (Figura 31B). Após isto, há uma estabilização da intensidade de absorção em aproximadamente 0,11.

Figura 31. Intensidade de absorção da AlClPc em LV_{II} nos dias 1 (—) e 4 (---) (A) e LV_{III} nos dias 1 (—), 2 (---), 3 (■), 7 (□), 13 (▲), 18 (|) e 62 (▼) (B). LV dispersos em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A oxidação de lipídios de DOPC com o tempo poderia levar a uma “expulsão” de monômeros de AlClPc internalizados nos LV e, portanto, ser causa das variações espectrais observadas. Entretanto, a avaliação do efeito na presença e ausência de oxigênio foi realizada e a hipótese foi descartada (Figura 32).

Figura 32. Valores máximos de absorbância da AICIPc em DSPC/DOPC/Chol (0.28:0.41:0.31) na presença (■) e ausência (○) de O₂. Medidas a 25 (±1) °C, tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$.

Por outro lado, a diminuição na intensidade de absorção poderia ser função da liberação da AICIPc para o meio aquoso. Entretanto, estudos posteriores de cinética de incorporação não suportam esta hipótese.

Para os LV_I, LV_{II} (Figura 31A) e LV_{IV} este efeito é intensificado e a intensidade de absorção da AICIPc é diminuída quase completamente em quatro dias. Conclui-se, portanto, que há uma cinética lenta de agregação da AICIPc no interior dos LV a qual é dependente da composição do LV.

5.3.2.2 Tempo de vida de fluorescência

A AICIPc apresentou um único tempo de vida em etanol relativo a sua forma monomérica ao passo que dois tempos de vida foram observados nos LV (Tabela 8). Nestes, o tempo de vida mais longo, em torno de 5 ns, é relacionado a AICIPc na forma monomérica. Sua diminuição em relação ao meio homogêneo sugere localização pouco profunda na membrana onde as moléculas de água acessíveis podem agir como supressoras de fluorescência (TESSARO et al., 2011). Um importante argumento em favor desta hipótese é a alta acessibilidade da AICIPc a baixas concentrações de íons iodeto observado nos estudos de supressão de fluorescência (discutido abaixo). Ainda, a presença de FRET entre moléculas de AICIPc próximas entre si podem ampliar o efeito em questão (discutido abaixo). O tempo de

vida mais curto foi atribuído a presença de agregados suficientemente pequenos de AlClPc uma vez que agregados grandes apresentam-se substancialmente não fluorescentes.

Tabela 8. Tempos de vida da AlClPc ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em etanol e LV ($0,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com excitação em 640 nm. LV dispersos em tampão PBS, pH 7,4, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

LV	τ_1 (ns)	%	τ_2 (ns)	%	χ^2
Etanol	6,25	100	-	-	1,01
LV _I	5,38	92,72	1,62	7,28	1,01
LV _{II}	4,95	90,46	1,29	9,53	0,97
LV _{III}	5,53	95,22	1,97	4,78	0,98
LV _{IV}	5,16	87,15	1,96	12,85	0,99

Os tempos de vida de fluorescência a concentrações mais baixas de AlClPc ($3,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) para LV_I e LV_{III} foram determinados. Para LV_I notamos a presença de dois tempos de vida. O primeiro tempo de vida foi de 5,73 (85,43%) ao passo que o segundo foi de 1,57 (14,57%). De modo interessante, nota-se um aumento da contribuição de agregados nesta condição. Este fato pode ser explicado pelo favorecimento da formação de agregados grandes com o aumento da concentração de AlClPc em LV_I os quais não são fluorescentes. Nestas condições, apenas um tempo de vida de 5,84 ns foi observado para a AlClPc em LV_{III} o que demonstra a maior eficiência deste sistema na monomerização da AlClPc. Estes dados estão de acordo com os resultados de absorção discutidos anteriormente.

O aumento na magnitude do tempo de vida mais longo (relativo a espécie monomérica) com a diminuição da concentração de AlClPc é indicativo da presença de FRET entre pares de AlClPc próximas entre si, como sugerido anteriormente. Entretanto, uma diminuição de dez vezes na concentração de AlClPc resultou um aumento de apenas 1% no tempo de vida mais longo (em ambos LV_I e LV_{III}). Conclui-se que a maior contribuição na diminuição do tempo de vida de fluorescência da AlClPc nos LV com relação ao meio homogêneo deve-se a sua acessibilidade à moléculas de água (localização próxima a interface dos LV) as quais são responsáveis por supressão de fluorescência (TESSARO et al., 2011) e, consequentemente, diminuição no tempo de vida de fluorescência.

Nos LV, o tempo de vida da AIClPc monomerizada se manteve em torno de 5,4 ns. De acordo com os resultados acima, este valor indica um grau de hidratação de 75% como exemplificado na Figura 33.

Figura 33. Tempo de vida de fluorescência longo da AIClPc e sua amplitude em misturas binárias água/etanol. Medidas a 24 (± 2) °C.

Deste modo, as moléculas de AIClPc parecem estar localizadas em um região mais interfacial das vesículas lipídicas. Este é um resultado bastante interessante tendo em vista o comportamento hidrofóbico da AIClPc observado nos resultados anteriores. A localização específica da AIClPc nas vesículas lipídicas é melhor avaliada em estudos de supressão e cinética de ligação mostrados adiante.

5.3.2.3 Cinética de ligação

Em todos os LVs, as cinéticas se ajustam a um modelo exponencial de primeira ordem com três etapas consecutivas (C, D e E). Interessantemente, após o alcance de um patamar, nota-se uma ligeira queda na intensidade de fluorescência para todos os sistemas como visto na Figura 34. Este efeito é mais pronunciado nos sistemas na ausência de colesterol (Figura 34 C). Esta diminuição na intensidade de fluorescência poderia ser devido a FRET. Entretanto, esta hipótese pode ser descartada uma vez que a queda foi também observada por espectroscopia de absorção onde o FRET não deve apresentar efeito (Figura 34 F). Por outro lado, a liberação da AIClPc ou formação de auto agregados suficientemente grandes afetam tanto a fluorescência quanto a absorção. Nestes casos, é esperado um efeito mais pronunciado

a menores concentrações de lipídio como demonstrado pelos resultados de tempo de vida. Para avaliar esta hipótese foi realizada a cinética de ligação da AlClPc em função da concentração de lipídio em LV_I.

Figura 34. Cinética de ligação por fluorescência da AlClPc ($0,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV_I ($1,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)(Δ), DOPC ($\square$) (A). Queda na intensidade de fluorescência após o alcance do patamar (B). Ajuste teórico da cinética de ligação por fluorescência da AlClPc ($0,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV_I (C), LV_{II} (D) e LV_{III} (E) ($[LV] = 1,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Ajuste teórico da cinética

de ligação por absorção da AlClPc ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV_I (F). Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$.

Na Tabela 9. Valores das constantes cinéticas de ligação da AlClPc ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LVI. estão dispostos valores de k_1 , k_2 e k_3 . É observado que as constantes k_1 e k_2 são praticamente independentes das concentrações de lipídio ao passo que a constante k_3 é inversamente proporcional.

Tabela 9. Valores das constantes cinéticas de ligação da AlClPc ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV_I.

LV _I ($\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)	$k_1 (10^{-2} \text{ s}^{-1})$	$k_2 (10^{-2} \text{ s}^{-1})$	$k_3 (10^{-3} \text{ s}^{-1})$
0,06	5,737	1,199	2,893
0,4	4,612	2,362	1,961
1,0	8,111	0,995	1,534
1,8	5,417	1,263	0,654

A hipótese de liberação pode ser resolvida adicionando-se mais vesículas após o ponto de equilíbrio, onde as moléculas liberadas deveriam ser novamente particionadas para as vesículas vazias. Entretanto, este procedimento não afetou a intensidade de fluorescência no ponto de equilíbrio (C). Ainda, uma leve agitação (que pode afetar o equilíbrio FS (monômero) $\rightarrow$ FS (oligômero)) da solução revelou um ligeiro aumento na intensidade de fluorescência. Estes resultados indicam, portanto, uma relação entre k_3 e a auto agregação da AlClPc nas vesículas.

Em estudos anteriores, Maman e colaboradores (1999) mostraram que a constante cinética relacionada à entrada de ftalocianina de alumínio dissulfonada em vesículas de DMPC e DMPC:Chol é diretamente proporcional a concentração de lipídio (MAMAN et al., 1999a). Deste modo, k_1 e k_2 não devem estar relacionadas à entrada da AlClPc nas vesículas lipídicas. Este fato parece ter relação com as características distintas destes FS em água. Como demonstrado no item 0, a AlClPc encontra-se predominantemente auto agregada em água ao passo que a ftalocianina de alumínio dissulfonada apresenta-se na monomérica (MAMAN et al., 1999b). Deste modo, a AlClPc parece particionar para a interface água-vesícula em blocos de agregados grandes os quais são substancialmente não fluorescentes (JAYME, CALORI e TEDESCO, 2016) seguida de monomerização/relocação no interior das vesículas.

Como observado nos estudos de K_b , o aumento da concentração de lipídio resulta em aumento da internalização de AlClPc o que deve refletir-se na amplitude da constante de

monomerização. De fato, notamos que a amplitude de k_1 aumentou cerca de 16 vezes ao passo que k_2 e k_3 aumentaram cerca de 5 vezes com um aumento de 30 vezes na concentração de lipídio (Tabela 10).

Tabela 10. Valores das amplitudes das constantes cinéticas de ligação da AICIPc ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV_I .

$\text{LV}_I (\times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})$	A_1	A_2	A_3
0,06	87044,70	99402,27	67689,22
0,4	632631,34	309186,21	117773,73
1,0	602203,04	157285,33	421892,30
1,8	1385920,00	482512,42	236743,56

Estes dados sugerem que k_1 deve estar relacionado à cinética de monomerização da AICIPc na interface água-vesícula. Finalmente, a constante k_2 poderia estar relacionada à partição da AICIPc para regiões mais internas dos LV, menos hidratadas, um vez que a diminuição na supressão de fluorescência por moléculas de água afetariam as propriedades fluorescentes. Entretanto, os estudos de tempo de vida e supressão de fluorescência indicam apenas uma população de AICIPc. Ainda, Tsong (1975) demonstrou que o sinal de fluorescência referente ao transporte de 8-anilino-1-sulfônico através da bicamada de DMPC-Chol desaparece completamente na presença de 33% de colesterol (TSONG, 1975). Entretanto, as intensidades relativas de k_2 na presença e ausência 31 mol % de colesterol não diferem grandemente.

Ainda, a hipótese de efeito flip-flop deve ser avaliada. Apesar de não ser esperado grandes diferenças na fluorescência de uma única população de AICIPc alocada na camada interna e externa da vesícula, a partição para o sítio da camada interna libera um sítio da camada externa para que uma próxima molécula se ligue e, assim, efeitos na fluorescência poderiam ser observados. Entretanto, as concentrações utilizadas (18000 moléculas de lipídio por AICIPc na condição: $0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de AICIPc e $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de lipídio) garantem a presença de sítios de ligação suficientes na camada externa para a quantidade de AICIPc. Por outro lado, o flip-flop pode garantir maior distância entre pares de AICIPc o que diminui a supressão de fluorescência em função de FRET. De maneira similar, a difusão lateral pode ser responsável por K_2 .

Complementar a isso, as curvas cinéticas obtidas por espectroscopia de absorção, as quais não devem ser afetadas por FRET, se ajustaram a um modelo exponencial de primeira ordem com apenas duas etapas consecutivas (Figura 34 C) ao invés de três observadas *via*

fluorescência. Estes resultados provem evidências de que k_2 está relacionado ao FRET entre moléculas de AlClPc ligadas aos LV. Entretanto, a contribuição relativa de flip-flop e difusão lateral no distanciamento das moléculas de AlClPc particionadas nas LVs ainda não é clara.

5.3.2.4 Constante de ligação

Os espectros de fluorescência da AlClPc em função da concentração de LV_{III} estão dispostos na Figura 35A. Observa-se um aumento na intensidade de fluorescência da AlClPc com o aumento da concentração de LV o que confirma sua interação com estes sistemas. Os valores de fluorescência máxima ($\lambda_{\text{max}} = 680 \text{ nm}$) em função da concentração dos LV foram utilizados para o ajuste teórico como pode ser observado na Figura 35B, C, D e E. Apesar de ocorrer alterações nas intensidades de fluorescência da AlClPc em função do tempo (Figura 35D), os valores de K_b não se alteraram o que descarta erros nos valores de K_b devido a agregação/desagregação da AlClPc.

Figura 35. Intensidade de fluorescência da AlClPc em função da concentração de LV_{III} na faixa de concentração entre $2,33 \times 10^{-6}$ e $1,17 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Intensidade máxima de fluorescência ($\sim 680 \text{ nm}$) normalizada com ajuste teórico da AlClPc em função da concentração de LV_I após 3 h (B), LV_{II} após 5 h (C) , LV_{III} após 9 (Δ) e 24 h ($\square$) (D) e LV_{IV} após 5 h (E). Todos os LV foram dispersos em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Os valores de K_b para a AlClPc nos diversos LV estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de constante de ligação da AlClPc nos diversos LV. LV dispersos em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

LV	$K_b (10^3 \text{ L mol}^{-1})$	R^2
LV _I	$0,90 \pm 0,19$	0,9932
LV _{II}	$3,18 \pm 0,41$	0,9954
LV _{III}	$6,80 \pm 1,30$	0,9856
LV _{IV}	$3,26 \pm 0,41$	0,9847

O valor de K_b para a AlClPc em DSPC na ausência de colesterol foi de $2,15 (0,30) 10^3 \text{ L mol}^{-1}$ sendo aproximadamente 2,4 vezes maior que em DSPC contendo 31 mol% de colesterol (LV_I). A diminuição no valor de K_b com a presença de colesterol indica que a ligação da AlClPc é modulada pela fluidez das vesículas. De fato nota-se um aumento nos valores de K_b com o aumento da fluidez até o LV_{III}. Entretanto, a subsequente queda nos valores de K_b em LV_{IV} demonstram que há um valor ótimo de fluidez da membrana na ligação da AlClPc. A ordem de ligação da AlClPc nos LV foi de $\text{LV}_{\text{III}} > \text{LV}_{\text{IV}} \geq \text{LV}_{\text{II}} > \text{DSPC} > \text{LV}_{\text{I}}$ e estão de acordo com os dados de absorção discutidos anteriormente.

5.3.2.5 *Rendimento quântico de fluorescência*

A AlClPc apresentou um rendimento quântico de fluorescência de 0.41 em etanol ao passo que 0.13 foi obtido em LV_{III} (Figura 36A).

Figura 36. Rendimento quântico de fluorescência da AlClPc ($1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em uma série de álcoois, em LV_{III} na presença e ausência de α CHC ($2,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) (A) e em misturas binárias água/etanol (B) entre 0 a 50% de água (v/v). Medidas a 25 °C.

Esta alta diminuição no rendimento quântico de fluorescência é indicativo de localização da AlClPc próximo a interface água/lipídio onde moléculas de água agem como supressoras de fluorescência. De fato, os resultados não demonstram influência da cadeia hidrofóbica no rendimento quântico de fluorescência da AlClPc em uma série alcoólica (A). A influência de moléculas de água pode ser avaliada utilizando misturas binárias água/etanol. Os rendimentos quânticos de fluorescência em misturas água/etanol estão dispostos na Figura 36B.

É observado uma relação linear entre valores de rendimento quântico de fluorescência da AlClPc e a proporção de água até 50% (v/v). Acima desta ocorre a agregação da AlClPc (JAYME, CALORI e TEDESCO, 2016). Pelo método comparativo, nota-se que a AlClPc em LV_{III} sofre grande influência de moléculas de água a qual corresponde a 80% de água (v/v) em mistura binária água/etanol e está de acordo com sua localização interfacial nas vesículas lipídicas.

5.3.2.6 *Supressão de fluorescência*

A supressão de fluorescência por iodeto é frequentemente utilizada para estimar a localização de fluoróforos em sistemas microheterogeneos (CHMYROV, SANDÉN e

WIDENGREN, 2010). Sua baixa penetração em vesículas faz do íon iodeto uma excelente ferramenta na avaliação da distribuição de fluoróforos nestes sistemas (CHMYROV, SANDÉN e WIDENGREN, 2010).

Em nossos estudos de supressão da AICIPc em LVs por íon iodeto, dois comportamentos foram observados (Figura 37).

Figura 37. Gráfico de Stern-Volmer para a AICIPc nos LV na presença de diferentes concentrações de iodeto de sódio. Medidas a 25 (±1) °C, tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Primeiramente, a baixas concentrações de iodeto ($[I^-] < 0,05 \text{ mol L}^{-1}$), desvios da lei de Stern-Volmer foram observados. Para os LV_{II}, LV_{III} e LV_{VI} estes desvios ocorrem em direção ao eixo x ao passo que para O LV_I, inicialmente, a presença de iodeto ($[I^-] < 0,5 \text{ mol L}^{-1}$) causa um leve aumento na intensidade de fluorescência. Entretanto, em concentrações superiores a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a supressão possui comportamento clássico de Stern-Volmer em todos os LV exceto para LV_I até $0,17 \text{ mol L}^{-1}$.

A priori, os desvios em direção ao eixo x sugerem duas populações de AICIPc em regiões distintas dos LVs. Entretanto, os resultados de tempo de vida descartam esta hipótese. Estudos anteriores utilizando RMN ¹H mostraram a influencia de halogêneos sobre sinais de prótons dos fosfolipídios (JENDRASIAK, 1972). Nenhuma diferença foi observada nos sinais dos grupos $-\text{CH}_2-$ ao passo que significantes deslocamentos químicos foram observados no grupo cabeça-polar colina ($-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) mostrando uma expressiva concentração de iodeto na região interfacial das vesículas. Portanto, os resultados de supressão de fluorescência sugerem localização da AICIPc próxima à região interfacial das vesículas. Isto

está de acordo com os resultados de tempo de vida discutidos anteriormente. As constantes de Stern-Volmer foram determinadas nas regiões de concentração de iodeto entre 0,05 e 0,36 mol L⁻¹ para LV_{II}, LV_{III} e LV_{VI} e entre 0,17 e 0,36 mol L⁻¹ para LV_I e estão dispostos na tabela 6.

O aumento na magnitude de K_{sv} com o aumento da proporção de DOPC parece estar associado ao aumento da fluidez dos LV (item 5.3.1.1). Este resultado, juntamente com os dados de tempo de vida, sugerem que a AlClPc possui aproximadamente o mesmo sítio de ligação em todos os sistemas LVs sendo próximo à carga positiva do grupo cabeça-polar (-O-(CH₂)₂-N⁺(CH₃)₃).

Tabela 12. Constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) para a AlClPc ($3,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em LV ($0,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹)

LV	K_{sv}^a	R^2
LV _I	$0,265 \pm 0,010$	0,9897
LV _{II}	$0,281 \pm 0,006$	0,9833
LV _{III}	$0,299 \pm 0,012$	0,9952
LV _{IV}	$0,328 \pm 0,010$	0,9912

^aFaixa de concentração de iodeto: 0,05 a 0,36 mol L⁻¹.

5.3.2.7 Ligação específica

Para confirmar a localização interfacial e possível interação específica da AlClPc com o grupo fosfato da cabeça-polar colina nas vesículas lipídicas foram realizados estudos de ligação na presença e ausência de íons fluoreto. A adição de íons fluoreto ([NaF] = $14,41 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) sobre a AlClPc ($0,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em água/etanol mistura (4/6 [v/v]) resultou

indica a complexação de fluoreto com o átomo de alumínio central na AlClPc.

Figura 38. Intensidade de fluorescência da AlClPc ($0,1 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em mistura binária

água/etanol (4/6 [v/v]) na ausência (●) e presença de fluoreto (○, $14,41 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) (A). Intensidade de fluorescência da AlClPc ($0,1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV_{III} ($1,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência (●) e presença de fluoreto (○, $5,31 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) (A). O insert mostra a cinética de ligação da AlClPc no LV_{III} na ausência (●) e presença de fluoreto (○, $5,31 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Medidas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$. LV_{III} em tampão PBS, pH 7,4 e $\mu = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$.

O pequeno decréscimo na intensidade de fluorescência ($\sim 5.8 \%$) indica que a taxa de emissão de fluorescência não é, via de regra, afetada pela complexação. Por outro lado, a interação da AlClPc ($0.1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) com o grupo cabeça polar dos fosfolipídios foi efetivamente reduzido na presença de íons fluoretos (Figura 38B). Estes resultados garantem consideráveis evidências de que a ligação da AlClPc com o grupo cabeça-polar dos fosfolipídios é altamente modulada pela complexação alumínio-fosfato na interface das vesículas.

5.4 Ensaios *in vitro*

Apesar do processo de auto-agregação da AlClPc em LV, este ainda é um sistema interessante para a TFD devido a sua alta estabilidade em meio aquoso (0). Estes resultados nos encorajou a avaliar a veiculação da AlClPc pelos LV em carcinoma de células escamosas oral (OSCC). A morfologia das células de OSCC está disposta no anexo I.

5.4.1 Internalização em linhagem neoplásica

A eficácia dos LV_{III} como sistema de veiculação da AlClPc em tecido neoplásico foi avaliada por tempo de vida de fluorescência utilizando a técnica de FLIM. Como referência, foi avaliado um possível sinal de decaimento de fluorescência e/ou espalhamento da OSCC na ausência de AlClPc (Figura 39A) o que confirmou a ausência de qualquer sinal nestas condições.

Em contraponto, um sinal (emissão em 640 nm) foi observado quando a OSCC foi incubada com ambos: AlClPc livre e AlClPc formulada em LV_{III}, o que confirma que o decaimento de fluorescência observado é derivado da AlClPc internalizada nas células de OSCC.

Em células de OSCC, a AlClPc livre apresentou um único tempo de vida de fluorescência médio de 5,61 ns ao passo que dois tempos de vida de 5,84 (τ_1) e 2,53 ns (τ_2) foram observados para a AlClPc veiculada por LV_{III}. Pelos estudos da AlClPc em meio homogêneo podemos inferir que o tempo de vida longo é relacionado a AlClPc na forma

monomérica enquanto que o tempo de vida curto parece estar relacionado a formação de dímeros de AlClPc no interior das células.

Figura 39. Imagem de microscopia por tempo de vida de fluorescência (FLIM). Células de OSCC (A). Células de OSCC incubadas com AlClPc ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (B). Células de OSCC incubadas com AlClPc ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) formuladas em LV_{III} (C). Sinal de fluorescência relativo à amplitude do tempo de vida curto da AlClPc em células de OSCC (D). Sinal de fluorescência relativo à amplitude do tempo de vida longo da AlClPc em células de OSCC (E). Sobreposição dos sinais de fluorescência curto e longo da AlClPc em células de OSCC (F). A concentração de AlClPc empregada em todas as medidas foi de $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com tempo de incubação de 3 horas a 37°C , 5% de CO_2 e sob atmosfera úmida.

Na Figura 39C nota-se um acúmulo preferencial da AlClPc na membrana celular (seta). Desmembrando as imagens em duas, pela separação dos sinais com tempos de vida de fluorescência distintos, podemos notar que a fração de AlClPc no estado monomérico encontra-se preferencialmente na membrana lipídica (Figura 39E) ao passo que a possível presença de dímeros é notável no interior das células (Figura 39D). Na Figura 39F é possível observar os dois sinais sobrepostos.

A diferença na internalização da AlClPc em células de OSCC empregando AlClPc livre e formulada em LV_{III} é observada nas Figura 39B (livre) e C (LV_{III}). A concentração relativa de AlClPc internalizada nas células de OSCC empregando AlClPc livre e AlClPc formulada em LV_{III} pode ser estimada avaliando-se as amplitudes dos tempos de vida de fluorescência da AlClPc nos respectivos sistemas. A amplitude do tempo de vida da AlClPc

livre foi de $2,7 \times 10^2$ ao passo que a AIClPc formulada em LV_{III} apresentou amplitudes de tempo de vida de $3,4 \times 10^3$ (τ_1) e $7,5 \times 10^2$ (τ_2) (somatório de $4,15 \times 10^3$). Portanto, LV_{III} proporcionou um aumento de mais de quinze vezes na veiculação da AIClPc para as células de OSCC. Estes resultados demonstram a eficiência dos LV_{III} como sistema de veiculação de AIClPc para as células de OSCC.

O efeito de agregação da AIClPc no interior do LV sobre a veiculação da AIClPc para as células de OSCC foi avaliado por um período de 14 dias. Os tempos de vida e suas amplitudes estão dispostos na Tabela 13.

Apesar de a AIClPc ter apresentado uma cinética de agregação no interior dos LV_{III}, os valores de amplitudes do sinal de fluorescência da AIClPc foram praticamente os mesmos pelo período avaliado.

Tabela 13. Dados de tempos de vida da AIClPc e suas amplitudes internalizada em linhagem celular OSCC em função do envelhecimento da formulação.

Dias	τ_1	$A_1 (x10^3)$	τ_2	$A_2 (x10^2)$
1	$5,84 \pm 0,20$	$3,4 \pm 1,2$	$2,53 \pm 0,38$	$7,5 \pm 1,8$
8	$5,55 \pm 0,52$	$3,0 \pm 0,7$	$1,93 \pm 0,33$	$5,6 \pm 2,3$
15	$5,56 \pm 0,53$	$3,2 \pm 0,7$	$2,13 \pm 0,35$	$5,9 \pm 1,9$

Estes resultados sugerem que a entrega de AIClPc em células de OSCC é independente da forma da AIClPc (monômero, dímero, etc.) no interior do LV_{III}. No momento da entrega da AIClPc está passa a ocupar um novo ambiente, o ambiente celular. Portanto, as características físico-químicas e fotofísicas da AIClPc a partir deste momento não é influenciada pelo LV. Nas células, a AIClPc novamente tende a forma monomérica. Os resultados suportam a hipótese de que a agregação da AIClPc no interior do LV_{III} não afeta a alta eficiência do sistema de veiculação da AIClPc. Deste modo, o LV_{III} apresenta alto potencial de aplicação como sistema carreador em TFD.

Nossos resultados de FLIM, ou seja, a avaliação da entrega de AIClPc pelas LV_{III} em OSCC evidencia um mecanismo bastante importante e inspirador para a Terapia Fotodinâmica: apesar da agregação da AIClPc no interior das vesículas lipídicas ocorrer com o tempo, há uma monomerização de uma parcela desta AIClPc agregada quando entregue às células como representado na Figura 40.

Com a partição da AlClPc para as células de OSCC esta passa a ocupar um novo ambiente, o ambiente celular. Portanto, as características Físico-Químicas e Fotofísicas da AlClPc a partir deste momento não é influenciada pelo LV_{III}.

Figura 40. Representação do mecanismo de agregação da AlClPc nos LVs em função do tempo e monomerização após entrega em células de OSCC.

Nas células, a AlClPc novamente tende a forma monomérica em um mecanismo que pode ser parecido com o discutido nos resultados de cinética de agregação. A possível agregação da AlClPc incorporada em células de OSCC em função do tempo, como ocorre nos LVs, ainda não foi avaliada. Estes resultados suportam a hipótese de que a agregação da AlClPc no interior do LV_{III} não afeta a alta eficiência do sistema com relação a entrega de AlClPc.

5.4.2 Citotoxicidade dos LV_{III} vazio

A citotoxicidade dos LV_{III} foi avaliada em linhagem celular MCF-7 (morfologia em anexo I). O LV_{III} na ausência de AlClPc não apresentou toxicidade na ausência de luz até a concentração de $9,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 41).

Figura 41. Viabilidade celular de MCF-7 na presença de LV_{III} vazio (ausência de AlClPc) e sob ausência de luz. Tempo de incubação de 3 h.

A $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ notamos uma queda na viabilidade celular para 80,02 %. Entretanto, este resultado pode ser devido a quantidade de tampão PBS utilizada nesta condição (30% v/v). Portanto, tomamos 20% v/v de tampão PBS e $9,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de lipídio como o limite superior seguro.

5.4.3 Citotoxicidade da LV_{III}+AlClPc

A citotoxicidade dos LV_{III}+ AlClPc foi avaliada em linhagem celular MCF-7. A AlClPc encapsulada em LV_{III} até a concentração de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ não apresentou citotoxicidade (Figura 42).

Em $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a viabilidade celular foi de 86 % o que sugere um pequeno efeito da AlClPc nesta concentração. A concentração escolhida para os estudos com LASER foi de $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a qual garante a ausência de toxicidade da AlClPc+LV_{III}.

Figura 42. Viabilidade celular de MCF-7 na presença de AlClPc em LV_{III} na ausência de luz com tempo de incubação de 3 h.

5.4.4 Citotoxicidade do α CHC em diferentes concentrações incorporado em LV_{III} ($0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de AlClPc ($0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

A citotoxicidade do α CHC foi avaliada em linhagem celular MCF-7. Notamos ausência de citotoxicidade do α CHC até a concentração de $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 43).

Figura 43. Viabilidade celular da MCF-7 na presença de α CHC em diferentes concentrações formuladas em LV_{III} ($0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) contendo AlClPc ($0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Tempo de incubação de 3 h.

A 10 e $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a viabilidade foi de 85 e 74%, respectivamente, e demonstram o leve aumento de toxicidade com o aumento da concentração. A concentração de α CHC escolhida para os estudos com LASER foi de $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de AlClPc formuladas em $0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de lipídio (LV_{III}). A MCF-7 apresentou uma viabilidade celular acima de 80% nestas condições o que garante a baixa toxicidade do sistema empregado. Viabilidade celular em função da dose luz.

A fototoxicidade das LV_{III} , $\text{LV}_{\text{III}}+\text{AlClPc}$ e $\text{LV}_{\text{III}}+\text{AlClPc}+\alpha\text{CHC}$ foi avaliada em linhagem a celular MCF-7. Como apresentado anteriormente, notamos ausência de toxicidade significativa para o sistema LV_{III} ($0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) contendo AlClPc ($0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e αCHC ($10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (Figura 44, curva D).

Ainda, a dose de luz máxima empregada não apresentou efeito sobre a viabilidade celular da linhagem MCF-7 (Figura 44, segunda barra). Na presença de luz (λ 670 nm), para os sistemas $\text{LV}+\text{AlClPc}+\alpha\text{CHC}$, a morte celular foi função exponencial da dose de luz empregada (viabilidade celular de 32.94% empregando 318 mJ).

De maneira inesperada, a presença de αCHC reduziu a morte celular. A hipótese é de que o αCHC age como um antioxidante evitando que espécies reativas *in situ* atuem sobre as células.

Figura 44. Viabilidade celular da MCF-7 na presença de AICIPc ($0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV_{III} ($0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e AICIPc ($0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) + α CHC ($10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em LV_{III} ($0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com doses de luz de $40 \times 10^{-3} \text{ J}$, $180 \times 10^{-3} \text{ J}$ e $318 \times 10^{-3} \text{ J}$. Período de incubação de 3 h a 37° e 5% de CO₂.

Para avaliar este efeito, a degradação do ácido úrico – devido as espécies reativas geradas pela AICIPc irradiada em 670 nm – na presença e ausência de α CHC foi avaliada. Na Figura 45 podemos notar que o ácido úrico é degradado mais lentamente quando na presença de α CHC.

Figura 45. Intensidade de absorção normalizada do ácido úrico (292 nm) em mistura água/etanol (4/6 v/v) em função do tempo. Irradiação (30 mW) da AlClPc em 670 nm na ausência ($\square$) e presença ($\bullet$) do α CHC ($5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Medidas realizadas a $25 (\pm 1) ^\circ\text{C}$.

Isto revela o caráter antioxidante do α CHC o que parece ser a chave para a diminuição da morte celular das MCF-7 na presença de α CHC, discutida acima.

CAPITULO VI

6 CONCLUSÃO

Os LVs produzidos neste trabalho apresentaram tamanho pequeno (entre 86.7 e 111.4 nm), bom PDI (<0.3), valores negativos de potencial zeta, estabilidade por mais de 50 dias e encapsulamento útil de moléculas de AlClPc. Estes parâmetros e a extensão da interação AlClPc-LV são dependentes da taxa de DSPC/DOPC. Entretanto, a localização e distribuição da AlClPc é altamente dirigida pela complexação alumínio-fosfato no grupo cabeça-polar dos fosfolipídios. O α CHC também interage com a LV na região interfacial água-lipídio, mas não afeta a interação AlClPc-LV, o que garante a integridade do sistema ($LV_{III}+AlClPc+\alpha CHC$) proposto.

Estudos fotofísicos demonstram claramente uma agregação da AlClPc dependente do tempo dentro dos LV. Apesar desta agregação, o comportamento de internalização em carcinoma de células escamosas oral (OSCC) não foi afetado. Um aumento de mais de 15 vezes na eficiência de veiculação da AlClPc em OSCC frente a AlClPc livre foi observado. De fato, após a internalização intracelular os agregados de AlClPc tendem a assumir novamente a forma monomérica, isto é, apresentam um comportamento agregacional reversível em células. Este interessante mecanismo é novo e essencial para uma potencial aplicação em tratamento fotodinâmico.

Em TFD, ambos os sistemas $LV_{III}+AlClPc$ e $LV_{III}+AlClPc+\alpha CHC$ não apresentaram toxicidade no escuro em MCF-7 no período de incubação de 3 h com as concentrações de lipídios, AlClPc e α CHC iguais a $0,15 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. De maneira inesperada, o sistema $LV_{III}+AlClPc$ foi mais eficiente em TFD que o sistema $LV_{III}+AlClPc+\alpha CHC$, devido ao caráter antioxidante do α CHC.

Estes resultados contribuem para um melhor entendimento da interação, localização e organização da AlClPc em tecidos neoplásicos e aumentam nosso entendimento do mecanismo de ação em TFD.

7 REFERÊNCIAS

ADAMI, H. O.; HUNTER, D. J.; TRICHOPOULOS, D. **Textbook of cancer epidemiology** Oxford University Press, 2008.

ALTUNAYAR, C.; SAHIN, I.; KAZANCI, N. A comparative study of the effects of cholesterol and desmosterol on zwitterionic DPPC model membranes, *Chemistry and physics of lipids*, v. 188, p. 37-45, 2015.

Ateh D. D., V. H. Leinster, S. R. Lambert, A. Shah, A. Khan, H. Walklin, J. Johnstone, N. Ibrahim, M. Kadam, and Z. Malik. **CD95 Targetted Microparticles Enhance Intracellular Drug Delivery and Increase the Efficacy of Paclitaxel Therapy in an Orthotopic Ovarian Cancer Model**, WILEY-BLACKWELL COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA, 2011. S3.

BARTUSIK, D.; AEBISHER, D.; GHOGARE, A.; GHOSH, G.; ABRAMOVA, I.; HASAN, T.; GREER, A. A fiberoptic (photodynamic therapy type) device with a photosensitizer and singlet oxygen delivery probe tip for ovarian cancer cell killing, *Photochemistry and photobiology*, v. 89, p. 936-941, 2013.

BRAUN, A.; TCHERNIAC, J. Über die Produkte der Einwirkung von Acetanhydrid auf Phthalamid, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, v. 40, p. 2709-2714, 1907.

BYRNE, G. T.; LINSTED, R. P.; LOWE, A. R. 213. Phthalocyanines. Part II. The preparation of phthalocyanine and some metallic derivatives from o-cyanobenzamide and phthalimide, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* p. 1017-1022, 1934.

CADDEO, C.; DÍEZ-SALES, O.; PONS, R.; CARBONE, C.; ENNAS, G.; PUGLISI, G.; FADDA, A. M.; MANCONI, M. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin, *Journal of colloid and interface science*, v. 461, p. 69-78, 2016.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three—photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction, *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 2, p. 91-106, 2005.

CHEN, H.; WANG, L.; BERETOV, J.; HAO, J.; XIAO, W.; LI, Y. Co-expression of CD147/EMMPRIN with monocarboxylate transporters and multiple drug resistance proteins is associated with epithelial ovarian cancer progression, *Clinical & experimental metastasis*, v. 27, p. 557-569, 2010.

CHMYROV, A.; SANDÉN, T.; WIDENGREN, J. Iodide as a Fluorescence Quencher and Promoter—Mechanisms and Possible Implications, *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, p. 11282-11291, 2010.

CLARKE, A. D. Effects of filter internal reflection coefficient on light absorption measurements made using the integrating plate method, *Applied optics*, v. 21, p. 3021-3031, 1982.

CONTE, C.; MAIOLINO, S.; PELLOSI, D. S.; MIRO, A.; UNGARO, F.; QUAGLIA, F. Polymeric Nanoparticles for Cancer Photodynamic Therapy. In: **Light-Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine**. Springer, 2016. p. 61-112.

DAVENPORT, L.; KNUTSON, J. R.; BRAND, L. Anisotropy decay-associated fluorescence spectra and analysis of rotational heterogeneity: 2. 1, 6-Diphenyl-1, 3, 5-hexatriene in lipid bilayers, *Biochemistry*, v. 25, p. 1811-1816, 1986.

DE PAULA, C. S.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, p. 371-381, 2013.

DE PAULA, J. C.; ROBBLEE, J. H.; PASTERNAK, R. F. Aggregation of chlorophyll a probed by resonance light scattering spectroscopy, *Biophysical journal*, v. 68, p. 335, 1995.

DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; JARDIM, D. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model, *Journal of applied physics*, v. 111, p. 07B307, 2012.

DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; PINTO, M. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 380, p. 372-376, 2015.

DE STEENWINKEL, J. E.; VAN VIANEN, W.; MARIAN, T.; VERBRUGH, H. A.; VAN AGTMAEL, M. A.; SCHIFFELERS, R. M.; BAKKER-WOUDENBERG, I. A. Targeted drug delivery to enhance efficacy and shorten treatment duration in disseminated Mycobacterium avium infection in mice, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 60, p. 1064-1073, 2007.

DENT, C. E.; LINSTED, R. P. 215. Phthalocyanines. Part IV. Copper phthalocyanines, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* p. 1027-1031, 1934.

DHAMI, S.; PHILLIPS, D. Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminium phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 100, p. 77-84, 1996a.

DHAMI, S.; PHILLIPS, D. Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminium phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 100, p. 77-84, 1996b.

DHUP, S.; DADHICH, R. K.; PORPORATO, P. E.; SONVEAUX, P. Multiple Biological Activities of Lactic Acid in Cancer: Influences on Tumor Growth, Angiogenesis and Metastasis, *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, p. 1319-1330, 2012.

DOLPHIN, D. **The Porphyrins: Structure and Synthesis. Part A** Academic press, 1978.

ECKMANN, J.; CLEMENS, L. E.; ECKERT, S. H.; HAGL, S.; YU-TAEGER, L.; BORDET, T.; PRUSS, R. M.; MULLER, W. E.; LEUNER, K.; NGUYEN, H. P. Mitochondrial membrane fluidity is consistently increased in different models of Huntington disease: restorative effects of olesoxime, *Molecular neurobiology*, v. 50, p. 107-118, 2014.

- EFTINK, M. R. Fluorescence techniques for studying protein structure, *Methods of Biochemical Analysis: Protein Structure Determination*, Volume 35p. 127-205, 2006.
- EHEHALT, R.; KELLER, P.; HAASS, C.; THIELE, C.; SIMONS, K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts, *The Journal of cell biology*, v. 160, p. 113-123, 2003.
- EL-BADRY, M.; FETIH, G.; SHAKEEL, F. Comparative topical delivery of antifungal drug croconazole using liposome and micro-emulsion-based gel formulations, *Drug delivery*, v. 21, p. 34-43, 2014.
- ELSAYED, M. M.; ABDALLAH, O. Y.; NAGGAR, V. F.; KHALAFALLAH, N. M. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research, *International journal of pharmaceutics*, v. 332, p. 1-16, 2007.
- ESTEVÃO, B. M.; PELLOSI, D. S.; DE FREITAS, C. F.; VANZIN, D.; FRANCISCATO, D. S.; CAETANO, W.; HIOKA, N. Interaction of eosin and its ester derivatives with aqueous biomimetic micelles: Evaluation of photodynamic potentialities, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 287, p. 30-39, 2014.
- FANG, J.; QUINONES, Q. J.; HOLMAN, T. L.; MOROWITZ, M. J.; WANG, Q.; ZHAO, H.; SIVO, F.; MARIS, J. M.; WAHL, M. L. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma, *Molecular pharmacology*, v. 70, p. 2108-2115, 2006.
- FANTINI, J.; GARMY, N.; MAHFOUD, R.; YAH, N. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 4, p. 1-22, 2002.
- FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited, *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 453-458, 2003.
- FOX, J. E. M.; MEREDITH, D.; HALESTRAP, A. P. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle, *The Journal of physiology*, v. 529, p. 285-293, 2000.
- FROBERG, M. K.; GERHART, D. Z.; ENERSON, B. E.; MANIVEL, C.; GUZMAN-PAZ, M.; SEACOTTE, N.; DREWES, L. R. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues, *Neuroreport*, v. 12, p. 761-765, 2001.
- GEROLA, A. P.; SEMENSATO, J.; PELLOSI, D. S.; BATISTELA, V. R.; RABELLO, B. R.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: new calculation methodology considering the influence of photobleaching, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 232, p. 14-21, 2012.
- GONÇALVES, P. J.; CORRÊA, D. S.; FRANZEN, P. L.; DE BONI, L.; ALMEIDA, L. M.; MENDONÇA, C. R.; BORISSEVITCH, I. E.; ZÍLIO, S. C. Effect of interaction with micelles on the excited-state optical properties of zinc porphyrins and J-aggregates formation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 112, p. 309-317, 2013.

GRACETTO, A. C.; TESSARO, A. L.; DE SOUZA, V. R.; CAETANO, W.; PONTES, R. M.; BATISTELA, V. R.; DE OLIVEIRA, H. P.; HIOKA, N. Self-aggregation processes of 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene in water/ethanol mixtures with high water percentages, *Applied spectroscopy*, v. 65, p. 604-610, 2011.

HARDY, G. J.; NAYAK, R.; ZAUSCHER, S. Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion, *Current opinion in colloid & interface science*, v. 18, p. 448-458, 2013.

HAUSMANN, W. The sensitizing action of haematoporphyrin, *Biochem. z.*, v. 30, p. 276-316, 1911.

HEINRICH, T. A.; TEDESCO, A. C.; FUKUTO, J. M.; DA SILVA, R. S. Production of reactive oxygen and nitrogen species by light irradiation of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex as a strategy for cancer treatment, *Dalton Transactions*, v. 43, p. 4021-4025, 2014.

HORNE, T. K.; ABRAHAMSE, H.; CRONJÉ, M. J. Investigating the efficiency of novel metallo-phthalocyanine PDT-induced cell death in MCF-7 breast cancer cells, *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 9, p. 215-224, 2012.

INCA, Instituto Nacional de Câncer, Tipos de câncer – mama. Brasil, 2013. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 28 out. 2015.

HU, J. S.; GUO, Y. G.; LIANG, H. P.; WAN, L. J.; JIANG, L. Three-dimensional self-organization of supramolecular self-assembled porphyrin hollow hexagonal nanoprisms, *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, p. 17090-17095, 2005.

HUNTER, R. J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications** 2 ed. Academic press, 2013.

IDOWU, M.; ARSLANOĞLU, Y.; NYOKONG, T. Spectral properties and photophysical behaviour of water soluble cationic Mg (II) and Al (III) phthalocyanines, *Open Chemistry*, v. 12, p. 403-415, 2014.

IZUMI, H.; TAKAHASHI, M.; URAMOTO, H.; NAKAYAMA, Y.; OYAMA, T.; WANG, K.; SASAGURI, Y.; NISHIZAWA, S.; KOHNO, K. Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells, *Cancer science*, v. 102, p. 1007-1013, 2011.

IZUMI, H.; TORIGOE, T.; ISHIGUCHI, H.; URAMOTO, H.; YOSHIDA, Y.; TANABE, M.; ISE, T.; MURAKAMI, T.; YOSHIDA, T.; NOMOTO, M. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy, *Cancer treatment reviews*, v. 29, p. 541-549, 2003.

JAYME, C. C.; CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 153, p. 178-183, 2016.

JENDRASIAK, G. L. Halide interaction with phospholipids: Proton magnetic resonance studies, *Chemistry and physics of lipids*, v. 9, p. 133-146, 1972.

JORI, G. Novel therapeutic modalities based on photosensitized processes, *EPA NEWSLETTER-EUROPEAN PHOTOCHEMISTRY ASSOCIATION* p. 12-18, 1997.

KASHA, M. Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates, *RADIATION RESEARCH*, v. 20, p. 55-70, 1963.

KASHA, M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Aggregates, *RADIATION RESEARCH*, v. 178, p. AV27-AV34, 2012.

KATO, N.; SAITO, K.; AIDA, H.; UESU, Y. Observations of merocyanine J-aggregate domains in mixed molecular monolayers using SHG/fluorescence and atomic force microscopes, *Chemical physics letters*, v. 312, p. 115-120, 1999.

KAWSKI, A. Fluorescence anisotropy: theory and applications of rotational depolarization, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v. 23, p. 459-529, 1993.

KENNES, K.; BAETEN, Y.; VOSCH, T.; SEMPELS, W.; YORDANOV, S.; STAPPERT, S.; CHEN, L.; MÜELLEN, K.; HOFKENS, J.; VAN DER AUWERAER, M. Photophysical Investigation of Cyano-Substituted Terrylene-diimide Derivatives, *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 118, p. 14662-14674, 2014.

KEPKAY, P. E.; BUGDEN, J. B. C.; LEE, K.; STOFFYN-EGLI, P. Application of ultraviolet fluorescence spectroscopy to monitor oil/GC mineral aggregate formation, *Spill Science & Technology Bulletin*, v. 8, p. 101-108, 2002.

KESSEL, D.; ROSSI, E. DETERMINANTS OF PORPHYRING-SENSITIZED PHOTOOXIDATION CHARACTERIZED BY FLUORESCENCE AND ABSORPTION SPECTRA, *Photochemistry and photobiology*, v. 35, p. 37-41, 1982.

KIESSLICH, T.; TORTIK, N.; PICHLER, M.; NEUREITER, D.; PLAETZER, K. Apoptosis in cancer cells induced by photodynamic treatment methodological approach, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 17, p. 197-209, 2013.

KIM, D. W.; SHIN, S. I.; OH, S. G. Adsorption and aggregation of surfactants in solution, *Surfactant Sciences Series*, v. 109, p. 255-268, 2003.

KIM, H. S.; MASKO, E. M.; POULTON, S. L.; KENNEDY, K. M.; PIZZO, S. V.; DEWHIRST, M. W.; FREEDLAND, S. J. Carbohydrate restriction and lactate transporter inhibition in a mouse xenograft model of human prostate cancer, *BJU international*, v. 110, p. 1062-1069, 2012.

KUZELOVA, K.; BRAULT, D. Kinetic and equilibrium studies of porphyrin interactions with unilamellar lipidic vesicles, *Biochemistry*, v. 33, p. 9447-9459, 1994.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy** Springer Science & Business Media, 2013.

- LEFTIN, A.; JOB, C.; BEYER, K.; BROWN, M. F. Solid-State ^{13}C NMR Reveals Annealing of Raft-Like Membranes Containing Cholesterol by the Intrinsically Disordered Protein α -Synuclein, *Journal of molecular biology*, v. 425, p. 2973-2987, 2013.
- LINSTEAD, R. P. 212. Phthalocyanines. Part I. A new type of synthetic colouring matters, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*p. 1016-1017, 1934.
- LINSTEAD, R. P.; LOWE, A. R. 214. Phthalocyanines. Part III. Preliminary experiments on the preparation of phthalocyanines from phthalonitrile, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*p. 1022-1027, 1934.
- LINSTEAD, R. P.; ROBERTSON, J. M. 383. The stereochemistry of metallic phthalocyanines, *Journal of the Chemical Society (Resumed)*p. 1736-1738, 1936.
- LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; OLSEN, A. M. The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection, *Journal of the national Cancer Institute*, v. 26, p. 1-11, 1961.
- LONGO, J. P. F.; DE MELO, L. N. D.; MIJAN, M. C.; VALOIS, C. R. A.; JOANITTI, G. A.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE AZEVEDO, R. B. Photodynamic Therapy Mediated by Liposomal Chloroaluminum-Phthalocyanine Induces Necrosis in Oral Cancer Cells, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, v. 3, p. 148-156, 2013.
- MABREY, S.; STURTEVANT, J. M. Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 73, p. 3862-3866, 1976.
- MAMAN, N.; DHAMI, S.; PHILLIPS, D.; BRAULT, D. Kinetic and equilibrium studies of incorporation of di-sulfonated aluminum phthalocyanine into unilamellar vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1420, p. 168-178, 1999a.
- MAMAN, N.; DHAMI, S.; PHILLIPS, D.; BRAULT, D. Kinetic and equilibrium studies of incorporation of di-sulfonated aluminum phthalocyanine into unilamellar vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1420, p. 168-178, 1999b.
- MANTAREVA, V. N.; ANGELOV, I.; WÖHRLE, D.; BORISOVA, E.; KUSSOVSKI, V. Metallophthalocyanines for antimicrobial photodynamic therapy: an overview of our experience, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 17, p. 399-416, 2013.
- MARMOT, M.; ATINMO, T.; BYERS, T.; CHEN, J.; HIROHATA, T.; JACKSON, A.; JAMES, W.; KOLONEL, L.; KUMANYIKA, S.; LEITZMANN, C. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective, 2007.
- MEYER-BETZ, F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut-und Gallenfarbstoffs, *Dtsch. Arch. Klin. Med*, v. 112, p. 476-503, 1913.
- MIJAN, M.; LONGO, J.; MELO, L.; SIMIONI, A.; TEDESCO, A. Vascular shutdown and pro-inflammatory cytokine expression in breast cancer tumors after photodynamic therapy mediated by nano-sized liposomes containing aluminium-chloride-phthalocyanine, *J Nanomed Nanotechnol*, v. 5, p. 2, 2014.

- MORRIS, M. E.; FELMLEE, M. A. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse γ -hydroxybutyric acid, *The AAPS journal*, v. 10, p. 311-321, 2008.
- NAKAMURA, H.; LILA, A. S. A.; NISHIO, M.; TANAKA, M.; ANDO, H.; KIWADA, H.; ISHIDA, T. Intra-tumor distribution of PEGylated liposome upon repeated injection: No possession by prior dose, *Journal of Controlled Release*, v. 220, p. 406-413, 2015.
- NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 273-284, 2004.
- OBEROI, H. S.; NUKOLOVA, N. V.; KABANOV, A. V.; BRONICH, T. K. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs, *Advanced drug delivery reviews*, v. 65, p. 1667-1685, 2013.
- OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 39, p. 1-18, 1997.
- OUGH, E.; NYOKONG, T.; CREBER, K. A.; STILLMAN, M. J. Electrochemistry and spectroscopy of magnesium phthalocyanine. Analysis of the absorption and magnetic circular dichroism spectra, *Inorganic Chemistry*, v. 27, p. 2724-2732, 1988.
- PAPAHADJOPOULOS, D.; JACOBSON, K.; NIR, S.; ISAC, I. Phase transitions in phospholipid vesicles fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 311, p. 330-348, 1973.
- PASTERNAK, R. F.; COLLINGS, P. J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation, *Science*, v. 269, p. 935-939, 1995.
- PELLOSI, D. S.; ESTEVÃO, B. M.; SEMENSATO, J.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M. S.; POLITI, M. J.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 247, p. 8-15, 2012.
- PETROVAJOVA, D.; JANCURA, D.; MISKOVSKY, P.; CHORVAT JR, D.; CHORVATOVA, A.; RAGAS, X.; GARCIA-DIAZ, M.; NONELL, S.; NADOVA, Z. Monitoring of singlet oxygen luminescence and mitochondrial autofluorescence after illumination of hypericin/mitochondria complex: a time-resolved study, *Laser Physics Letters*, v. 10, p. 075609, 2013a.
- PETROVAJOVA, D.; JANCURA, D.; MISKOVSKY, P.; CHORVAT, D.; CHORVATOVA, A.; RAGAS, X.; GARCIA-DIAZ, M.; NONELL, S.; NADOVA, Z. Monitoring of singlet oxygen luminescence and mitochondrial autofluorescence after illumination of hypericin/mitochondria complex: a time-resolved study, *Laser Physics Letters*, v. 10, 2013b.
- PINHEIRO, C.; PINHEIRO, S.; BOCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; LONGATTO-FILHO, A.; VILLA, L. L.; BALTAZAR, F. 351 Inhibition of monocarboxylate transporter 1 in cervical cancer cells: effect of alpha-cyano-4-hydroxycinnamate and siRNA, *European Journal of Cancer Supplements*, v. 8, p. 111-112, 2010a.

- PINHEIRO, C.; ALBERGARIA, A.; PAREDES, J.; SOUSA, B.; DUFLOTH, R.; VIEIRA, D.; SCHMITT, F.; BALTAZAR, F. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma, *Histopathology*, v. 56, p. 860-867, 2010b.
- PINHEIRO, C.; LONGATTO-FILHO, A.; SCAPULATEMPO, C.; FERREIRA, L. s.; MARTINS, S.; PELLERIN, L.; RODRIGUES, M.; ALVES, V. A.; SCHMITT, F.; BALTAZAR, F. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas, *Virchows Archiv*, v. 452, p. 139-146, 2008a.
- PINHEIRO, C.; LONGATTO-FILHO, A.; SIMÕES, K.; JACOB, C. E.; BRESCIANI, C. J. C.; ZILBERSTEIN, B.; CECCONELLO, I.; ALVES, V. A. F.; SCHMITT, F.; BALTAZAR, F. The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer, *European Journal of Cancer*, v. 45, p. 2418-2424, 2009.
- PINHEIRO, C.; LONGATTO-FILHO, A.; FERREIRA, L. s.; PEREIRA, S. M. M.; ETLINGER, D.; MOREIRA, M. A.; JUBE, L. F.; QUEIROZ, G. S.; SCHMITT, F.; BALTAZAR, F. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma, *International Journal of Gynecologic Pathology*, v. 27, p. 568-574, 2008b.
- PINHEIRO, C.; LONGATTO-FILHO, A.; FERREIRA, L. s.; PEREIRA, S. M. M.; ETLINGER, D.; MOREIRA, M. A.; JUBE, L. F.; QUEIROZ, G. S.; SCHMITT, F.; BALTAZAR, F. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma, *International Journal of Gynecologic Pathology*, v. 27, p. 568-574, 2008c.
- POLICARD, A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood, *CR Soc Biol*, v. 91, p. 1423-1424, 1924.
- SAGADEVAN, S.; PERIASAMY, M. A REVIEW ON ROLE OF NANOSTRUCTURES IN DRUG DELIVERY SYSTEM, *Reviews on Advanced Materials Science*, v. 36, p. 112-117, 2014.
- SANTHOSH, P. B.; KIRYAKOVA, S. I.; GENOVA, J. L.; ULRIH, N. P. Influence of iron oxide nanoparticles on bending elasticity and bilayer fluidity of phosphatidylcholine liposomal membranes, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 460, p. 248-253, 2014.
- SCHMITZ, K. S. An introduction to dynamic light scattering of macromolecules, 1990.
- SCHNEIDERHAN, W.; SCHELER, M.; HOLZMANN, K. H.; MARX, M.; GSCHWEND, J. E.; BUCHOLZ, M.; GRESS, T. M.; SEUFFERLEIN, T.; ADLER, G.; OSWALD, F. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models, *Gut*, v. 58, p. 1391-1398, 2009.
- SHAFIQ, S.; SHAKEEL, F.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; ALI, M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 66, p. 227-243, 2007.
- SILVA, L. C. d. Breast cancer and psychological suffering: female-related aspects, *Psicologia em Estudo*, v. 13, p. 231-237, 2008.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes, *Nature*, v. 387, p. 569-572, 1997.

SIMPLICIO, F. I.; RIBEIRO DA SILVA SOARES, R.; MAIONCHI, F.; SANTIN FILHO, O.; HIOKA, N. Aggregation of a benzoporphyrin derivative in water/organic solvent mixtures: a mechanistic proposition, *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 108, p. 9384-9389, 2004.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Day and Good Membranes and viruses in immunopathology*, p. 7-47, 1972.

SONVEAUX, P.; COPETTI, T.; DE SAEDELEER, C. J.; VÉGRAN, F. d. r.; VERRAX, J.; KENNEDY, K. M.; MOON, E. J.; DHUP, S.; DANHIER, P.; FRÉRART, F.; GALLEZ, B.; RIBEIRO, A.; MICHIELS, C.; DEWHIRST, M. W.; FERON O. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis, *PloS one*, v. 7, p. e33418, 2012.

STERNBERG, E.; DOLPHIN, D. Pyrrolic photosensitizers, *Current medicinal chemistry*, v. 3, p. 239-272, 1996.

SU, C. W.; FAN, T. H.; LI, W. M.; CHEN, S. Y. Synergistic combination therapy using a lipid shell-droplet core nanosphere with tunable thickness, *Chemical Communications*, v. 50, p. 11291-11294, 2014.

SUZUKI, H. **Electronic absorption spectra and geometry of organic molecules: An application of molecular orbital theory** Elsevier, 2012.

TESSARO, A. L.; BATISTELA, V. R.; GRACETTO, A. C. s.; DE OLIVEIRA, M. s.; PAULO, H.; SERNAGLIA, R. L.; DE SOUZA, V. R.; CAETANO, W.; HIOKA, N. Stability of benzoporphyrin photosensitizers in water/ethanol mixtures: pKa determination and self-aggregation processes, *Journal of Physical Organic Chemistry*, v. 24, p. 155-161, 2011.

TSONG, T. Y. Transport of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate as a probe of the effect of cholesterol on the phospholipid bilayer structures, *Biochemistry*, v. 14, p. 5415-5417, 1975.

TSUBONE, T. M.; BRAGA, G.; VILSINSKI, B. H.; GEROLA, A. P.; HIOKA, N.; TESSARO, A. L.; CAETANO, W. Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, p. 890-897, 2014.

UD DIN, F.; MUSTAPHA, O.; KIM, D. W.; RASHID, R.; PARK, J. H.; CHOI, J. Y.; KU, S. K.; YONG, C. S.; KIM, J. O.; CHOI, H. G. Novel dual-reverse thermosensitive solid lipid nanoparticle-loaded hydrogel for rectal administration of flurbiprofen with improved bioavailability and reduced initial burst effect, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 94, p. 64-72, 2015.

UENO, L. T.; JAYME, C. C.; SILVA, L. R.; PEREIRA, E. B.; OLIVEIRA, S. M.; MACHADO, A. E. Photophysics and spectroscopic properties of zinc phthalocyanine revisited using quantum chemistry, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, p. 2237-2247, 2012.

- UENO, L. T.; MACHADO, A. E.; MACHADO, F. B. Theoretical studies of zinc phthalocyanine monomer, dimer and trimer forms, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 899, p. 71-78, 2009.
- ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chemical reviews*, v. 96, p. 1533-1554, 1996.
- VILSINSKI, B. H.; GEROLA, A. P.; LEMOS, É. O.; BARBOSA, P. c. M.; CAMPANHOLI, K. S.; CÉSAR, G. B.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Spectroscopic study of aluminum phthalocyanine chloride (AlPcCl) in homogeneous and micro-heterogeneous media consisting of P-123 and F-127 polymeric micelles, *Química Nova*, v. 38, p. 631-639, 2015a.
- VILSINSKI, B. H.; GEROLA, A. P.; ENUMO, J. A.; CAMPANHOLI, K. d. S. S.; PEREIRA, P. C. d. S.; BRAGA, G.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; TESSARO, A. L.; CAETANO, W. Formulation of Aluminum Chloride Phthalocyanine in Pluronic™ P-123 and F-127 Block Copolymer Micelles: Photophysical properties and Photodynamic Inactivation of Microorganisms, *Photochemistry and photobiology*, v. 91, p. 518-525, 2015b.
- VON PISTOR, J. J.; RAKOWSKI, K. *Pamiętniki o rewolucji polskiej z roku 1794*. Druk Józefa Sikorskiego, 1906.
- VON TAPPEINER, H. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O, *Raab. Muench. Med. Wochenschr*, v. 47, 1900.
- VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen, *Münch Med Wochenschr*, v. 47, p. 2042-2044, 1903.
- VON TAPPEINER, H. E.; JODLBAUER, A. **Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen: gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung, aus dem Pharmakologischen Institute der K. Universität München**. 1907.
- WAINWRIGHT, M.; GIDDENS, R. M. Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application, *Dyes and Pigments*, v. 57, p. 245-257, 2003.
- WALENTA, S.; WETTERLING, M.; LEHRKE, M.; SCHWICKERT, G.; SUNDFØR, K.; ROFSTAD, E. K.; MUELLER-KLIESER, W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers, *Cancer Research*, v. 60, p. 916-921, 2000.
- WANG, Y.; ANGELATOS, A. S.; CARUSO, F. Template Synthesis of Nanostructured Materials via Layer-by-Layer Assembly, *Chemistry of Materials*, v. 20, p. 848-858, 2007.
- WEBB, B. A.; CHIMENTI, M.; JACOBSON, M. P.; BARBER, D. L. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression, *Nature Reviews Cancer*, v. 11, p. 671-677, 2011a.
- WEBB, B. A.; CHIMENTI, M.; JACOBSON, M. P.; BARBER, D. L. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression, *Nature Reviews Cancer*, v. 11, p. 671-677, 2011b.
- WEISHAUP, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor, *Cancer Research*, v. 36, p. 2326-2329, 1976a.

WEISHAUP, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor, *Cancer Research*, v. 36, p. 2326-2329, 1976b.

WIEDERKEHR, N. A. The aggregation behavior of Zinc-Tetracarboxy-Phthalocyanine and Its Spectral Sensitization on Titanium Dioxide Films, *J. Braz. Chem. Soc. (São Paulo)*, v. 7, p. 7-13, 1996.

WILKINSON, F.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v. 24, p. 663-677, 1995.

ZACCANTI, G.; BRUSCAGLIONI, P. Deviation from the Lambert-Beer law in the transmittance of a light beam through diffusing media: experimental results, *Journal of Modern Optics*, v. 35, p. 229-242, 1988.

ZHAO, J.; WU, J.; HEBERLE, F. A.; MILLS, T. T.; KLAUITTER, P.; HUANG, G.; COSTANZA, G.; FEIGENSON, G. W. Phase studies of model biomembranes: complex behavior of DSPC/DOPC/cholesterol, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1768, p. 2764-2776, 2007.

Anexos

Figuras

Anexo I

(A)

(B)

Figura 1. Morfologia das linhagens de célula OSCC (A) e MCF-7 (B).

Anexos

Artigos publicados

Anexo II

Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment

Cristiano Ceron Jayme, Italo Rodrigo Calori, Antonio Claudio Tedesco *

Departamento de Química, Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2015

Received in revised form 17 July 2015

Accepted 12 August 2015

Available online 18 August 2015

Keywords:

Photodynamic therapy

Aggregation

Aluminum chloride phthalocyanine

ABSTRACT

This study evaluated the behavior of aluminum chloride phthalocyanine in a binary water/ethanol mixture using electronic absorption spectroscopy and static and time-resolved fluorescence spectroscopy. The electronic absorption spectra, resonance light scattering and fluorescence quenching of aluminum chloride phthalocyanine in water/ethanol mixtures were studied at several concentrations. The electronic absorption spectra and fluorescence quenching changed significantly at approximately 50% water (v/v). Below 50% water, the dimerization constant values were negative (-2609.2 M^{-1} and -506.5 M^{-1} at 30% and 40% of water, respectively), indicating that the formation of aggregates under these conditions is not favored. However, at 50% water, the dimerization constant value was estimated to be 559.7 M^{-1} , which indicates the presence of dimers. Above 60% water, the aggregation process was responsible for the balance between large complexes (such as trimers, tetramers or oligomers) formed in the medium under these conditions. The appearance of new absorption bands at 387 nm and 802 nm and their bathochromic shift relative to the monomer bands suggested that some J-type aggregates form. These results are relevant to understanding the behavior and use of aluminum chloride phthalocyanine in the design of new drug delivery systems for clinical application in photodynamic therapy as a new approach to treat skin cancer.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The lack of selectivity of classical protocols and procedures in cancer treatments, such as radiotherapy and chemotherapy, is one of the many complications of using these therapies. Generally, both affect cancer cells and healthy tissue. Thus, the development of more selective treatments has emerged in recent decades as efficient and noninvasive methods [1,2]. Among the new treatments, Photodynamic Therapy (PDT) is unique. PDT is a method used to treat diseases related to abnormal growing tissue, e.g., skin [3], oral mucosa [4], prostate and uterine cancers [5,6] and bacterial and fungal diseases [7]. This method consists of the topical or systemic application of a photosensitizing agent (PS) (normally a well-conjugated molecule, such as natural molecule or a commercial one) that can be incorporated into the cancer cells or tissue after activation with visible light of an appropriate wavelength *in situ*, which is generally between 600 nm and 750 nm and is known as the "therapeutic window."

In addition to the high selectivity, PDT causes minimal side effects and has been used for over forty years [8–12]. The photodynamic process has an even greater functionality for removing pollution [13] from primarily industrial waste via a controlled photooxidation process [14]. It can also be used to treat new non-oncological diseases, such as for healing wounds and burns to regenerate tissue via a process known as photobiomodulation [15].

The selection of the PS is the most important step in the above mentioned processes, and its physical chemistry behavior in all of the new drug delivery system (DDS) is designed for specific purposes. To be used in dynamic photoprocesses, the PS needs to exhibit some specific features, such as a strong absorption of visible light, a high quantum yield of singlet oxygen, a low yield of the natural photo-degradation reaction, a high affinity and selective penetration in the diseased organ or tissue, favorable pharmacokinetics, reproducibility and a high stability and low toxicity of the drug in the absence of visible light (used in photoactivation) [16].

Among these compounds, the second-generation family of phthalocyanine compounds includes aluminum chlorides (AlClPc). AlClPc have been commonly used in research since the last decade in most of the applications mentioned above [17–21] with successful results. AlClPc is defined as a tetrapyrrolic macrocycle with a central aluminum ion (Al^{3+}). In addition to the desired characteristics for photosensitization,

* Corresponding author at: Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: jayme@usp.br (C.C. Jayme), caloriitalo@gmail.com (I.R. Calori), atedesco@usp.br (A.C. Tedesco).

Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery

Italo Rodrigo Calori , Antonio Claudio Tedesco

[Show more](#)

doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.03.050

[Get rights and content](#)

Highlights

- DSPC/DOPC/Chol lipid vesicles (LVs) loading AIClPc were stable for at least 50 days.
- AIClPc interacts with LV interface mainly due to aluminum–phosphate complexation.
- AIClPc self-aggregation occurs in LV, but a disaggregation arises in oral squamous cell carcinoma.
- This behavior increases our knowledge about photosensitizer intracellular mechanism.

Abstract

Aluminum phthalocyanine chloride (AIClPc) is a second-generation photodynamic therapy (PDT) photosensitizer characterized for its high hydrophobicity and self-aggregation tendency in aqueous media, which hamper its potential application. Aiming at AIClPc solubilization we proposed here the use of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) at different proportions to form mixed lipid vesicles (LVs) as a drug delivery system. LVs were prepared by ethanol injection method and formed nano-sized vesicles (about 100 nm) with suitable polydispersity index, negative zeta potential, and stable in aqueous medium for at least 50 days. AIClPc strongly interacts with LV (high binding constant values), especially due to aluminum–phosphate specific interactions, which gives a surface localization to AIClPc molecules as demonstrated by fluorescence quenching data. Anisotropy, static and time-resolved fluorescence measurements corroborated with these results and demonstrated that AIClPc self-aggregation occurred even in the liposomes. However, formulation uptake by oral squamous cell carcinoma (OSCC) the AIClPc was distributed in cellular organelles and suffered a disaggregation process demonstrated by fluorescence life-time imaging microscopy. This amazing behavior is new and increases the scientific knowledge about the intracellular mechanism of action of PDT photosensitizers. In addition, these results open a new perspective to the potential use of AIClPc-LV formulations for photodynamic treatment.