UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS – IQSC

LUIZA ARAÚJO GUSMÃO

**Inclusão supramolecular de Hipericina em β -ciclodextrina visando
aplicação em terapia fotodinâmica**

Orientador: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos, SP

2019

LUIZA ARAÚJO GUSMÃO

**Inclusão supramolecular de Hipericina em β -ciclodextrina visando
aplicação em terapia fotodinâmica**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade São
Paulo como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e
Biológica

Orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues
Perussi

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos, SP

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

"Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza."

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus passos e pensamentos.

À minha mãe, meu porto-seguro, dedico mais este trabalho e agradeço por entender meus impasses durante toda essa jornada e me apoiar em todos os momentos, mesmo quando era ela quem precisava de ombro e afago. Obrigada pelo seu carinho, amor, dedicação, força, exemplo e, principalmente, por compartilhar mais esse sonho comigo!

Ao meu pai, pelo amor, torcida, pelas conversas diárias e pelas visitas.

Aos meus familiares que torceram para essa conquista. Em especial, à Anna Isa pelo incentivo constante. Aos meus padrinhos Jane e Nélío que estão sempre junto a mim e de minha mãe nos momentos mais importantes das nossas vidas.

Aos meus amigos Diego Godina, Jhonathan, Juliane, Ludymila, Raquel e Yasmim, que me incentivaram nos momentos em que eu não acreditava no que eu era capaz e por não esquecerem de mim, mesmo na distância. Em especial, agradeço ao Victor pela companhia diária, pelos ensinamentos químicos e culinários. À Leticia pela amizade de longa data e pelo apoio emocional. Agradeço imensamente à Renata pelo carinho e pelas conversas amigáveis e aconselhadoras durante essa caminhada. À Thayz por me receber com carinho e atenção no laboratório. À Ana Paula pelos conselhos, ajudas no dia-a-dia do laboratório, pelos momentos de divertimento e pela amizade. Ao Darlon pelo ombro amigo, risadas e *cookies*. À Luana pela amizade e incentivo. Agradeço também ao Alex, Cristian e Larissa pela acolhida, receptividade, pelos ensinamentos e cafés da tarde no Laboratório de Fotossensibilizadores. Cristian, agradeço em especial pela ideia inicial desse projeto.

A todos os professores que passaram pela minha jornada agradeço pela contribuição no direcionamento da minha escolha profissional. Em especial, sou grata à Prof. Janice R. Perussi pela orientação, conselhos e conhecimento compartilhado no Laboratório de Fotossensibilizadores. Ao Prof. Dr. Daniel Cardoso por ceder o laboratório para uso do leitor de placas. Ao Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro por fornecer a hipericina para estudo neste trabalho. Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e suas alunas Andressa e Camila pela colaboração com os experimentos de permeação. Aos professores da banca que aceitaram tão prontamente o convite para colaborarem em minha avaliação.

Ao CEPOF pelo apoio no desenvolvimento dessa pesquisa, com financiamento FAPESP. À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos pelo suporte e instalações para desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica baseada na interação de um corante não tóxico e sensível à luz, denominado fotossensibilizador (FS), com luz em comprimento de onda adequado que, na presença de oxigênio molecular gera espécies reativas capazes de provocar morte celular. Alguns FSs como a hipericina (HY) apresentam natureza hidrofóbica, que acarreta agregação em meios aquosos comprometendo sua aplicação em TFD. A obtenção de complexos de inclusão com ciclodextrinas (CD) pode melhorar as propriedades do FS como aumento da solubilidade e bioacumulação. O presente trabalho teve como objetivo a formação de um complexo de inclusão entre HY e β -ciclodextrina (β -CD) para melhorar a solubilidade da HY e estudar os efeitos dessa melhoria em suas propriedades químicas, fotoquímicas e biológicas, visando aplicação em TFD. A formação do complexo de inclusão β -CDHY foi confirmada por técnicas espectroscópicas de IV e RMN- ^1H . A solubilidade aquosa da HY foi aumentada e suas propriedades fotoquímicas (estabilidade química, fotoestabilidade, atividade fotodinâmica e rendimento quântico) não foram alteradas após a inclusão nas cavidades da β -CD. No entanto o complexo β -CDHY apresentou uma liberação *in vitro* seis vezes mais rápida do que a HY livre. Além disso, β -CDHY exibiu perfil de permeação cutânea mais lento, indicando possibilidade de aplicação para uso tópico, devido a maior retenção nas camadas mais superficiais da pele. A acumulação intracelular da HY livre e complexada, bem como a cito e fototoxicidade, foram avaliadas nas linhagens HeLa, Vero e MCF7. Em células HeLa houve um aumento de aproximadamente duas vezes na acumulação, o que proporcionou uma fototoxicidade 40% maior da β -CDHY em relação à HY livre nas doses 3, 6 e 10 J cm $^{-2}$. Nas células MCF7, a acumulação foi a mesma para HY livre e complexada, mas houve uma redução em torno de 20% nos valores de IC $_{50}$ quando o complexo foi incubado com as células e excitado nas doses luminosas 3 e 6 J cm $^{-2}$. Para as células Vero verificou-se uma acumulação na ordem de 10 ^{3} vezes menor quando comparado às células HeLa e MCF7, indicando que HY livre e complexada acumulam seletivamente em células tumorais. Os resultados obtidos sugerem, portanto, que a utilização de β -CD como sistema de entrega para a HY é eficaz e permite a aplicação do complexo formado (β -CDHY) em Terapia Fotodinâmica.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Hipericina; β -ciclodextrina; solubilidade; acumulação; fototoxicidade.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a technique based on the interaction of a non-toxic and light-sensitive dye, called photosensitizer (PS), with light at an appropriate wavelength that in the presence of oxygen results in the formation of reactive species that causes cell death. Some PSs, e.g. hypericin (HY), are hydrophobic and causes aggregation in water media, affecting the PDT application. Obtaining of cyclodextrins (CD) inclusion complexes can improve some properties of PSs such as solubility and bioavailability. This study aimed to produce an inclusion complex between HY and β -Cyclodextrin (β -CD) to improve HY solubility and to study the effect of this improvement on its chemical, photochemical and biological properties for application in PDT. The inclusion complex β -CDHY formation was confirmed by FTIR and NMR- ^1H spectroscopy techniques. HY solubility was improved and its photochemical properties (chemical stability, photostability, photodynamic activity, and quantum yield) were not affected after being included in the β -CD cavities. The complex β -CDHY presented an *in vitro* release six times faster than HY free. Besides, β -CDHY exhibited a slower cutaneous permeation profile, indicating the possibility of being applied in topic uses due to the greater retention in superficial skin layers. Intracellular accumulation of free and complexed HY, as well as the cito and phototoxicity, were evaluated in HeLa, MCF7 e Vero cell lines. In HeLa cells there was nearby two times fold improvement in accumulation, leading to an increase of 40% in the phototoxicity of β -CDHY related to free HY in 3, 6 and 10 J cm $^{-2}$. In MCF7 cells, the intracellular accumulation was the same for free and complexed HY, however, there was a decrease of about 20% in IC $_{50}$ values when the complex was incubated within the cells under 3 and 6 J cm $^{-2}$. In Vero cells it was obtained a cell uptake 10 ^{3} times lower than the values for HeLa and MCF7, suggesting that free and complexed HY accumulate selectively in carcinogenic cells. Therefore, these results suggest that the use of β -CD as a drug delivery system for HY is effective and allows its application in Photodynamic Therapy.

Keywords: Photodynamic therapy; Hypericin; β -cyclodextrin; solubility; bioavailability; phototoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da administração do FS em um paciente tratado por terapia fotodinâmica	4
Figura 2 – Diagrama de Jablonski relacionando os principais eventos que levam a reações do Tipo I e Tipo II	5
Figura 3 – Representação esquemática da propagação de luz através dos tecidos. As setas coloridas representam diferentes comprimentos de onda e sua respectiva penetração no tecido.	7
Figura 4 – Espectros de absorção de algumas biomoléculas.....	8
Figura 5 – Estrutura de alguns fotossensibilizadores empregados na Terapia Fotodinâmica. A) hematoporfirina, B) Foscan ® , C) Ftalocianina e D) Protoporfirina IX	10
Figura 6 – Representação da fórmula estrutural da hipericina, com as marcações para atribuição do espectro de RMN- ¹ H e seu espectro de absorção	12
Figura 7 – Estrutura molecular e tridimensional das ciclodextrinas	14
Figura 8 – Esquema representativo da formação de complexos de inclusão em solução, formando complexos de proporção entre molécula e CD de (a) 1:1 ou (b) 1:2.....	15
Figura 9 – Dispositivo de irradiação (Biotable) LED 590 ± 10 nm utilizado para irradiação da HY livre e complexada	19
Figura 10 – Esquema de síntese dos complexos de inclusão entre β-CD e HY.....	20
Figura 11 – Representação da célula de difusão vertical (Célula Franz) utilizada para o ensaio de permeação	25
Figura 12 – Aparato experimental utilizado para o ensaio de permeação. (A) programador, (B) células de difusão vertical e (C) amostrador automatizado	26
Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura de (A) β-CD, (B) HY, (C) β -CDHY e (D) mistura física HY e β-CD	29
Figura 14 – Espectro vibracional no infravermelho para β-CD, HY, β-CDHY e mistura física (β-CD + HY).....	32
Figura 15 – Espectros de absorção de (A) HY, (B) β-CDHY obtidos periodicamente para acompanhamento da estabilidade química e (C) quantificação de residual de FSs em solução em função do tempo de HY e BCDHY	35

Figura 16 – Fotodegradação acompanhada pela absorção das soluções ($4,5 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em DMSO de Hipericina em função do tempo de irradiação. A) HY, B) β -CDHY e C) Percentual de HY remanescente em solução em função do tempo de irradiação (590 ± 10 nm; $I = 15,8$ mW cm ⁻²).....	36
Figura 17 – Principal produto de reação formado a partir da reação com $^1\text{O}_2$	39
Figura 18 – Espectros de absorção antes e após irradiação das misturas de AU com (A) HY e (B) β -CDHY em SDS 2% em PBS	39
Figura 19 – Reação de fotodecomposição do DPBF. Quando o FS é irradiado ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Este último é sequestrado pela molécula de DPBF resultando na formação de um endoperóxido	41
Figura 20 – Acompanhamento da fotodecomposição do DPBF na presença de (A) FtZN, (B) HY e (C) β -CDHY e as respectivas curvas de calibração da absorbância em função do tempo	42
Figura 21 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> de HY e β -CDHY em PBS 2% SDS.	44
Figura 22 – Representação das camadas da pele	45
Figura 23 – Espectros de emissão de fluorescência de HY e suas respectivas curvas analíticas em (A e B) PBS 1% Tween 20 ($\lambda_{\text{emissão}}=602\text{nm}$) e (C e D) etanol ($\lambda_{\text{emissão}}=597$ nm). O $\lambda_{\text{excitação}}$ em ambos os casos foi de 552 nm. Para a curva obtida PBS 1% Tween 20 (B) utilizou-se uma tensão elétrica de 700 V e para a curva obtida em etanol (D) utilizou-se uma tensão elétrica de 400 V	46
Figura 24 – (A) Perfil de permeação <i>in vitro</i> de HY e β -CDHY através de pele porcina dermatomizada e (B) quantidade total de HY e β -CDHY retida no estrato córneo (EC) e na derme e epiderme (D+E), após 24 h. (*) indica significância estatística com $p<0,05$ em relação a HY livre.....	48
Figura 25 – Gráficos quantitativos da acumulação intracelular de HY e β -CDHY em diferentes tempos de incubação nas células (A) Vero, (B) HeLa e (C) MCF7	50
Figura 26 – Viabilidade celular de diferentes linhagens celulares (A) HeLa, (B) MCF7 e (C) Vero na presença de β -CD após 2 h de incubação no escuro e após irradiação em três diferentes doses com LED 590 ± 10 nm e $I = 8,4$ mW cm ⁻¹ . Os resultados estão apresentados como média $\pm$ DP (n = 3)	52
Figura 27 – Viabilidade celular no escuro de diferentes linhagens celulares (A) HeLa, (B) MCF7 e (C) Vero na presença de HY e β -CDHY após 2 h de incubação. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ DP (n = 3)	54

Figura 28 – Curvas de viabilidade celular para (A) HeLa tratada com HY, (B) HeLa tratada com β -CDHY, (C) MCF7 tratada com HY, (D) MCF7 tratada com β -CDHY, (E) Vero tratada com HY e (F) Vero tratada com β -CDHY após irradiação em três diferentes doses luminosas. Os resultados apresentados são a média $\pm$ DP	55
Figura A 1 – Espectro de RMN- ^1H em DMSO- d_6 e estrutura da β -CD	75
Figura A 2 – Espectro de RMN- ^1H em DMSO- d_6 da HY livre	76
Figura A 3 – Espectro de RMN- ^1H em DMSO- d_6 do complexo β -CDHY	77
Figura A 4 – Microscopias de fluorescência para avaliação da acumulação em células HeLa em diferentes períodos de incubação. A) controle celular, B) controle celular com excitação, C, D, E) HY, F, G e H) β -CDHY. Filtro de excitação em 490 nm e emissão em 520 nm	78
Figura A 5 – Microscopias de fluorescência para avaliação da acumulação em células MCF7 em diferentes períodos de incubação. A) controle celular, B) controle celular com excitação, C, D, E) HY, F, G e H) β -CDHY. Filtro de excitação em 490 nm e emissão em 520 nm	79
Figura A 6 – Microscopias de fluorescência para avaliação da acumulação em células HeLa em diferentes períodos de incubação. A) controle celular, B) controle celular com excitação, C, D, E) HY, F, G e H) β -CDHY. Filtro de excitação em 490 nm e emissão em 520 nm	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades das ciclodextrinas mais conhecidas.....	15
Tabela 2 – Propriedades comparativas dos precursores livres (HY e β -CD) e do complexo β -CDHY. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP, com $n = 12$ para as medidas de tamanho e PDI e $n = 3$ para as demais medidas.....	30
Tabela 3 – Atribuições vibracionais no infravermelho em pastilha de KBr para β -CDHY, seus respectivos precursores (β -CD e HY) e para a mistura física entre eles	32
Tabela 4 – Rendimentos quânticos de fluorescência para os FS livres e complexados com β -CD. Os valores são a média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$)	37
Tabela 5 – Coeficientes de atividade fotodinâmica dos FSs livres e complexados. Os dados estão apresentados como média $\pm$ SD ($n = 3$).....	40
Tabela 6 – Valores de rendimento quântico por geração de oxigênio singlete ($\phi\Delta$) pela degradação do DPBF para HY livre e complexada. Os dados estão apresentados como média $\pm$ SD ($n = 3$).....	41
Tabela 7 – Dados analíticos para determinação da concentração de HY por medidas fluorimétricas em diferentes solventes.....	47
Tabela 8 – Parâmetros de permeação cutânea	48
Tabela 9 – IC_{50} de HY e β -CDHY em diferentes linhagens celulares, após 2 h de incubação e irradiação com LED 590 ± 10 nm, $I=8,4$ mW cm ⁻¹ em diferentes doses de luz. Os valores estão apresentados como média $\pm$ DP ($n = 3$)	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlete

AF - Atividade fotodinâmica

ALA – ácido 5-aminolevulênico

AU – ácido úrico

β -CD – Beta-ciclodextrina

β -CDHY – Complexo de inclusão entre β -CD e HY

CAQI – Central de Análises Químicas Instrumentais

CD – Ciclodextrina

CIS – Cruzamento intersistema

DLS – *Dynamic Light Scattering*

DMEM – Dulbecco's Modified Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio Padrão

DPBF – 1,3-Difenilisobenzofurano

EC – estrato córneo

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FS – Fotossensibilizador

GPX-4 – Glutathione peroxidase

HY – Hipericina

HP- β -CD – Hidroxipropil- β -Ciclodextrina

IV – Espectroscopia na região do Infravermelho

J – fluxo de permeação

LD – Limite de detecção

LED – *Light-emitting Diode*

LQ – Limite de quantificação

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mTHPC - meta-tetra(di-hidroxifenil)clorina

MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Salino Fosfato

PCL-PEG – poliprolactona-poli(etilenoglicol)

PDI – índice de polidispersividade

PLLA – ácido poli-lático

RMN-¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TFD – Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer e os tratamentos convencionais	1
1.2 Terapia Fotodinâmica	2
1.2.1 Princípio fotoquímico da Terapia Fotodinâmica	4
1.3 Fonte luminosa na TFD.....	6
1.4 Fotossensibilizadores.....	8
1.4.1 Hipericina.....	10
1.5 Química supramolecular: ciclodextrinas como sistema de liberação	12
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Reagentes e sistemas de irradiação	18
3.2 Obtenção e Caracterização dos Complexos de Inclusão	19
3.4 Avaliação da eficiência de complexação	20
3.5 Solubilidade dos FS livres e complexados	21
3.6 Rendimento quântico de fluorescência dos FSs livres e complexados	21
3.7 Determinação da atividade fotodinâmica dos FSs livres e complexados	22
3.8 Determinação do rendimento quântico de geração de oxigênio singleto ($\phi\Delta$) pela decomposição do DPBF.....	22
3.9 Determinação da fotoestabilidade dos FSs livres e complexados.....	23
3.10 Determinação da estabilidade química dos FSs livres e complexados	23
3.11 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> dos FSs livres e complexados	23
3.12 Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i>	24
3.13 Avaliação da retenção cutânea (<i>tape-stripping</i>).....	26
3.14 Ensaios Biológicos	27
3.14.1 Cultivo de Células.....	27
3.14.2 Acumulação intracelular dos FS livres e complexados	27

3.14.3 Citotoxicidade dos FSs livres e complexados	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
4.1 Caracterização do complexo de inclusão.....	29
4.2 Espectroscopia no Infravermelho	31
4.3 RMN- ¹ H	33
4.4 Estabilidade química dos FSs livres e complexados	34
5.5 Fotodegradação dos FSs livres e complexados	35
4.6 Rendimento Quântico de Fluorescência.....	37
4.7 Atividade fotodinâmica da HY livre e complexada obtida pela degradação do ácido úrico.....	38
4.8 Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete obtido pela degradação do DPBF 40	
4.9 Liberação <i>in vitro</i> da HY livre e complexada	43
4.10 Permeação cutânea <i>in vitro</i>	45
4.11 Acumulação intracelular de HY livre e complexada.....	49
4.12 Aplicação da β -CDHY em TFD <i>in vitro</i>	51
4.12.1 Cito e fototoxicidade da β -CD	52
4.12.2 Citotoxicidade de HY livre e β -CDHY no escuro.....	53
4.12.3 Efeito da dose luminosa na fototoxicidade da HY e β -CDHY em células HeLa, MCF7 e Vero.....	55
5. CONCLUSÃO	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e os tratamentos convencionais

Câncer é um conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas por uma série de alterações que afetam a atividade molecular intracelular e a comunicação entre células e tecidos (HANAHA e WEINBERG, 2011). Células normais são capazes de se formar por meio de processo contínuo e natural e, então, crescem, multiplicam-se e morrem de modo ordenado. Entretanto, as células cancerosas ao invés de morrerem, crescem de maneira incontrolável, formando células novas e anormais (INCA, 2018a). O processo de formação do câncer, denominado oncogênese, consiste em mutações ou ativação anormal dos genes celulares, associados à exposição aos efeitos cumulativos de diferentes agentes carcinógenos – químicos, físicos e/ou biológicos – que são responsáveis pelo início, promoção, progressão e inibição do tumor. O surgimento dessas mutações também pode estar vinculado a fatores externos, relacionados ao meio ambiente em que o indivíduo se encontra e correspondem a 80-90% dos casos de câncer, ou fatores internos, associados à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2018 (a) e (b)).

O câncer é uma das doenças que mais preocupam a sociedade, uma vez que está associado a elevados índices de mortalidade e dor. Em seu último levantamento, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reporta que em 2012 foram 14 milhões de novos casos, sendo 8 milhões de mortes relatadas (STEWART, B. W., WILD, 2014; WHO, 2015). Segundo o último levantamento do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o biênio 2018-2019 estão previstos 600 mil novos casos de câncer no Brasil (INCA, 2017). Segundo a OMS, o câncer de mama é o que mais afeta as mulheres, com uma incidência de 25% no total de casos de câncer entre elas e o câncer de colo de útero é o quarto tipo de câncer mais comum na população feminina (7,9 %). No Brasil, as estimativas para o biênio 2018-2019 apontam que 29,5% das mulheres poderão ser acometidas com câncer de mama e 8,1% com câncer de colo de útero (INCA, 2017; STEWART, B. W., WILD, 2014). Dados do INCA apontam que o câncer de pele não melanoma é o tumor que mais acomete homens e mulheres no Brasil, porém apresenta baixa letalidade, com estimativa de 85 170 novos casos para o biênio 2018-2019. Já o câncer de pele melanoma tem menor incidência, porém na maioria das vezes um prognóstico favorável ocorre apenas em caso de diagnóstico na fase inicial (INCA, 2017). Sabendo que os casos de incidência de câncer estão em um

crescente, os estudos relacionados ao seu tratamento são de extrema necessidade e importância.

Existem diversos tipos de tratamento para o câncer, os quais variam de acordo com o tipo e estágio de avanço da neoplasia. Os tratamentos convencionais para este tipo de doença são: (i) cirurgia, para remoção do tumor, mas que ocasiona lesões permanentes nos pacientes, (ii) radioterapia, na qual se emprega doses pré-estabelecidas de radiação ionizante, por determinado tempo, para causar a morte das células cancerígenas e reduzir os tumores e (iii) quimioterapia, que é baseada na utilização de agentes químicos, como alquilantes e antimetabólitos, para erradicar células tumorais (BRASIL, 2006; INCA, 2017). As desvantagens do tratamento convencional estão relacionadas principalmente às lesões que podem ser causadas, bem como aos efeitos colaterais dos agentes utilizados. Fármacos quimioterápicos afetam o crescimento celular de células tumorais, mas também de células normais, o que pode acarretar reações adversas como perda de apetite, enjoo, vômito, anemia, tonturas e queda de cabelo. Radioterápicos também causam, a curto prazo, efeitos colaterais similares aos da quimioterapia e, a longo prazo, podem causar fibroses induzidas pela radiação, atrofias, danos neurais e vasculares. Esses efeitos acabam limitando a dose de radiação que pode ser utilizada durante o tratamento e afeta diretamente a vida do paciente (BRASIL, 2006; STEWART e WILD, 2014; BENTZEN, 2006).

Sabendo desses efeitos colaterais e que a eficiência das terapias convencionais é limitada, têm-se proposto terapias alternativas para o tratamento do câncer, levando em conta que uma terapia ideal deve ser capaz de destruir seletivamente as células tumorais em seu sítio primário e, ao mesmo tempo, estimular o sistema imunológico a reconhecer quaisquer reincidências das células tumorais (URAMOTO e TANAKA, 2014). Nesse sentido, a Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento para o câncer que se destaca, principalmente, por ser minimamente invasiva e consideravelmente seletiva (REGINATO, WOLF e HAMBLIN, 2014).

1.2 Terapia Fotodinâmica

Há registros que já na antiguidade, os povos do Egito antigo, Índia e China utilizavam dos princípios da TFD para tratar diferentes doenças, como psoríase, raquitismo, vitiligo e câncer (DOBSON; DE QUEIROZ; GOLDING, 2018; DOLMANS

et al., 2002). Entretanto, a TFD avançou no início do século XX, tendo seu primeiro relato científico quando Oskar Raab acidentalmente observou a morte de protozoários após serem tratados com acridina e expostos à luz, postulando então que a transferência de energia luminosa para a molécula de acridina era crucial para a citotoxicidade observada (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007; RAAB, 1900; ZHANG et al., 2018). No ano de 1903, von Tappeiner e Jesionek propuseram a utilização tópica de eosina exposta à luz para tratamento de tumores em humanos (VON TAPPEINER e JESIONEK, 1903).

Desde então, muitos avanços foram alcançados nos estudos e aplicação da TFD, tornando-a mais difundida e acessível não só no meio acadêmico mas, também, para a sociedade em geral, em função da cooperação entre diversas áreas do conhecimento, contando com a especialidade de físicos, químicos, médicos, biólogos e bioquímicos. Assim sendo, além do tratamento oncológico, a TFD tem sido utilizada no tratamento de doenças oftalmológicas (DĄBROWSKI; ARNAUT, 2015), dermatológicas (GRANDI et al., 2018), doenças virais (AMARAL e PERUSSI, 2015), infestações bacterianas (DE OLIVEIRA et al., 2015; HANAKOVA et al., 2014) bem como para tratamentos odontológicos (MASIERA et al., 2017) e questões de saúde pública, como em estudos de ação fotolarvicida para eliminar larvas do mosquito da dengue (SOUZA et al., 2019).

A TFD é baseada na interação de três componentes não tóxicos: uma molécula cromófora, denominada fotossensibilizador (FS), o qual absorve luz em um comprimento de onda específico e na presença de oxigênio celular que resulta na geração de espécies reativas capazes de provocar morte celular por necrose ou apoptose, eliminando a lesão cancerosa e, posteriormente, permitindo a completa restauração do tecido. As espécies reativas de oxigênio (EROs) reagem rapidamente com os constituintes celulares, apresentando, portanto, citotoxicidade elevada. O tratamento clínico se inicia após a administração ao paciente do FS (agente terapêutico) por injeção intravenosa ou no local lesionado, em caso de câncer de pele, por exemplo. Após um tempo de espera, quando a concentração do corante atinge um máximo de acumulação no tecido lesado, expõe-se o tumor à radiação visível, em comprimento de onda específico para excitação do FS (DAI et al., 2012; DOBSON; DE QUEIROZ e GOLDING, 2018; KWIATKOWSKI et al., 2018). Um esquema representativo da ação da TFD, desde sua administração até a morte celular, está representado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema representativo da administração do FS em um paciente tratado por terapia fotodinâmica

Fonte: Adaptado de Kocki et al., 2017

1.2.1 Princípio fotoquímico da Terapia Fotodinâmica

O princípio fotoquímico da TFD está relacionado aos processos de transferência de elétrons (mecanismo tipo I) e de transferência de energia (mecanismo tipo II). No mecanismo tipo I, ao incidir luz sobre o sistema, os elétrons deslocalizados do estado fundamental (S_0) da molécula de FS absorvem fótons e são excitados para um estado de maior energia, o que resulta num estado singleto excitado (S_1) dessa molécula. Sabe-se que o estado singleto excitado é instável e possui tempo de meia vida curto, o que possibilita a ocorrência de interações muito rápidas, as quais tendem a dissipar o excesso de energia por meio de um processo denominado relaxação vibracional. Nesse processo, ocorrem colisões com as moléculas de solvente, de modo que as espécies inicialmente excitadas decaem até o nível vibracional zero do estado excitado correspondente. A relaxação resulta na obtenção de um estado tripleto excitado (T_1) do FS, o qual possui maior tempo de vida e possibilita, portanto, a interação dos elétrons do FS com os demais componentes do sistema, resultando na geração de íons radicais, O_2^- , $\cdot OH$ e H_2O_2 , também denominadas EROs (DAI *et al.*, 2012; JHONSON, MUTHUKRISHNAN e PELLOIS, 2013).

A formação do estado T_1 ocorre devido à troca de spin, nominalmente proibida, do estado singleto excitado, por meio de um processo isoenergético denominado cruzamento intersistema (CIS). O estado tripleto do FS pode decair para

o estado singlete fundamental (S_0) emitindo fosforescência, como também pode interagir diretamente com os substratos celulares (JHONSON, MUTHUKRISHNAN e PELLOIS, 2013). De maneira geral, o estado triplete possui menor energia que o estado singlete excitado, o que justifica os processos de fosforescência ocorrerem em comprimentos de onda maiores do que a fluorescência. Além disso, a fosforescência possui maior tempo de vida do que a fluorescência, já que sua ocorrência está relacionada à mudança de multiplicidade do spin (ZHANG et al., 2018).

No mecanismo tipo II, o FS no estado triplete transfere energia ao oxigênio molecular em seu estado fundamental ($^3O_2$) produzindo oxigênio singlete ($^1O_2$), o qual é a forma mais reativa do oxigênio e o principal mediador do dano fotoquímico causado pelos FSs às células (JHONSON, MUTHUKRISHNAN e PELLOIS, 2013; LAKOWICZ, 2006; ONISZCZUK et al., 2016). Esta interação só ocorre pois, ao contrário da interação triplete-singlete que é proibida, as interações triplete-triplete são permitidas. O fato do $^1O_2$ não ser um radical faz com que ele reaja com moléculas biológicas por meio de diferentes mecanismos, o que leva a diferentes caminhos de reação com os componentes celulares (DAI et al., 2012). Na Figura 2 está representado o Diagrama de Jablonski, com os níveis de energia eletrônica/vibracional de um FS em seu estado excitado, bem como a associação dos mecanismos (tipo I e tipo II) envolvidos nos processos da TFD.

Figura 2 – Diagrama de Jablonski relacionando os principais eventos que levam a reações do Tipo I e Tipo II

Fonte: Adaptado de Zhang et al., 2018

As EROs e o $^1\text{O}_2$ gerados são responsáveis pelo efeito citotóxico do FS e reagirão com as biomoléculas por meio de diferentes mecanismos de ação, uma vez que possuem reatividades diferentes entre si (JORI e TROTTA, 2016). Devido à elevada reatividade desses elementos e curto tempo vida, especialmente do $^1\text{O}_2$, apenas células próximas à área onde essas espécies são produzidas são imediatamente afetadas pela reação fotodinâmica, o que torna a TFD um tratamento localizado (NUNEZ, RIBEIRO e GARCEZ, 2013; DOLMANS, FUKUMURA e JAIN, 2003). Além disso, o fato das EROs reagirem de modo não específico com as moléculas orgânicas faz com que as macromoléculas sejam alvos em potencial para a TFD, uma vez que múltiplas reações e alvos dificultam o desenvolvimento de mecanismos de resistência para a célula e isso é um fator promissor para utilizar a TFD combinada a outras terapias convencionais (CALLAHAN e SENGE, 2018. SPRING *et al.*, 2013).

Outros mecanismos de ação indireta também atuam na ação fotodinâmica como a ativação do sistema imunológico contra as células tumorais, por meio do estímulo luminoso e colapso no sistema vascular local, resultando em hipóxia tumoral pós-TFD (AGOSTINIS *et al.*, 2011; DOBSON; DE QUEIROZ e GOLDING, 2018).

1.3 Fonte luminosa na TFD

A escolha da fonte de luz, bem como o comprimento de onda adequado, dose e intensidade luminosa são fundamentais para a eficiência da TFD. Em particular, o comprimento de onda utilizado está relacionado ao FS utilizado a fim de se obter maior absorção de luz e, portanto, maior geração de EROs. A extensão da penetração luminosa é uma das barreiras da aplicação de TFD para o tratamento do câncer, principalmente no que tange ao tratamento de tecidos mais profundos (DABROSKI *et al.* 2017). A quantidade de luz que atinge o tecido e é capaz de ativar a produção de EROs dentro do mesmo depende de diferentes fatores como a coeficiente de absorção molar do FS utilizado, intensidade luminosa empregada e das características óticas teciduais. Como exemplificado na Figura 3, a luz não somente é absorvida pelos tecidos, como também pode sofrer processos de espalhamento e reflexão, os quais diminuem a quantidade de luz disponível para a geração de EROs dentro das células (LERNER, SCHOENBERG e STERNBERG, 2006; PATRICE, 2003).

Figura 3 – Representação esquemática da propagação de luz através dos tecidos. As setas coloridas representam diferentes comprimentos de onda e sua respectiva penetração no tecido.

Fonte: Agostinis et al., 2011

A absorção de luz na região visível do espectro (400 – 700 nm) é desejada para a aplicação da TFD e, em alguns casos, luz no infravermelho próximo tem sido utilizada (DABROWSKI E ARNAUT, 2015; SMITH, MANCINI e NIE, 2009), devido a sua maior penetração nos tecidos (Figura 3). No entanto, algumas biomoléculas, denominadas de fluoróforos endógenos, como hemoglobina, aminoácidos e vitaminas (Figura 4) têm absorção de luz considerável em comprimentos de onda abaixo de 600 nm, o que pode interferir na eficiência da TFD. Dessa maneira, diz-se que a janela fototerapêutica para aplicação da TFD está entre 600 e 850 nm, ou seja, um FS que tenha banda de absorção nessa região é capaz de gerar mais espécies reativas, essencialmente em tecidos mais profundos (PATRICE, 2003). Em média, uma fonte luminosa de 630 nm utilizada para tratamento clínico utilizando Photofrin® penetra de 1 a 3 mm dependendo do tecido (LERNER, SCHOENBERG e STERNBERG, 2006). No entanto, a utilização de FSs com absorção em comprimentos de onda mais energéticos, os quais não estão dentro da janela terapêutica ideal, é muito útil no tratamento de neoplasias superficiais, visto que nesses casos não se requer penetração luminosa tão profunda.

Figura 4 – Espectros de absorção de algumas biomoléculas

Fonte: DABROWSKI et al., 2015

1.4 Fotossensibilizadores

Como mencionado anteriormente, a efetividade da terapia fotodinâmica está condicionada a três fatores: aos FSs, à fonte de irradiação e a presença de oxigênio intracelular, sendo o FS o componente de maior importância neste processo, estando associado, muitas vezes, ao sucesso da técnica. Os FSs são substâncias capazes de absorver luz em um comprimento de onda específico, desencadeando reações fotoquímicas e fotofísicas e, idealmente, devem possuir características como: absorção luz na região visível do espectro, síntese facilitada com elevado grau de pureza, estabilidade química, mínima toxicidade na ausência de radiação, ser fotoestável, apresentar rápida eliminação nas células saudáveis, entre outras (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016; KWIATKOSKI et al., 2018).

A acumulação do FS ocorre preferencialmente em células tumorais, permitindo que o efeito fotodinâmico ocorra nas células doentes em detrimento das saudáveis. Assim, diz-se que o acúmulo do FS ocorre de forma seletiva. Embora não seja um mecanismo muito bem elucidado, propõe-se que os FSs se combinam preferencialmente com lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais agirão como facilitadores da entrega dos FS às células (CRUZ *et al.*, 2013; KWIATKOWSKI *et al.*, 2018; POPOVIC *et al.*, 2015). Além disso, outras alterações na natureza de uma célula

tumoral como pH reduzido e aumento da atividade de endocitose também contribuem para acumulação seletiva dos FSs (CRAIG *et al.*, 2014).

As porfirinas e derivados de hematoporfirinas são os agentes terapêuticos pioneiros e mais importantes em uso. Photofrin®, constituído por uma mistura de monômeros, oligômeros e dímeros de hematoporfirina, foi o primeiro FS a ser aprovado comercialmente e é o mais conhecido deles, sendo amplamente utilizado para o tratamento de cânceres no esôfago, pulmão e colo de útero (CRAIG *et al.*, 2015; ONISZCZUK *et al.*, 2016). Apesar de serem bastante difundidos, os derivados de hematoporfirina, cuja estrutura está apresentada na Figura 5(A), apresentam algumas limitações para aplicação química, como (i) a baixa pureza química, já que consiste de uma mistura de mais de 60 moléculas, (ii) baixa taxa de eliminação do organismo, (iii) possuem bandas de absorção de diferentes extensões, o que dificulta a eficácia terapêutica, além do (iv) tempo de meia-vida longo, acarretando hipersensibilidade à luz (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

Para suprir as limitações dos derivados de hematoporfirina outras moléculas fotossensibilizadoras foram desenvolvidas, dentre elas: clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas e purpurinas constituem outras classes de moléculas, resultantes de diferentes alterações químicas no anel tetrapirrólico das porfirinas, compostos não-porfirinóides como o ácido 5-aminolevulênico (ALA), fenotiazinas, curcumina e hipericina. Entretanto, é necessário destacar que algumas dessas moléculas apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, o que limita a aplicação em TFD (LINARES, OLIVEIRA e PERUSSI, 2017; BERNAL *et al.*, 2015; FAHEY e GIROTTI, 2015; O'CONNOR; GALLAGHER e BYRNE, 2009; POPOVIC; WIGGINS e DAVIDS, 2015)

Mais recentemente, as propostas para desenvolvimento de FSs com melhor desempenho fotodinâmico se baseiam na utilização de sistemas de entrega para os agentes fototerapêuticos já existentes e amplamente utilizados. Esses sistemas utilizam nanocarreadores, micelas, emulsões e até mesmo ligações com moléculas receptoras a fim de melhorar a solubilidade e biodisponibilidade dos FS nos tecidos tumorais (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

Figura 5 – Estrutura de alguns fotossensibilizadores empregados na Terapia Fotodinâmica. A) hematoporfirina, B) Foscan®, C) Ftalocianina e D) Protoporfirina IX

Fonte: Autoria própria

1.4.1 Hipericina

A hipericina (HY), cuja estrutura está apresentada na Figura 6, é um pigmento natural encontrado em uma planta herbácea da espécie *Hypericum perforatum*, popularmente conhecida como erva de São João, que por ser fotoativa é empregada como um potente e promissor FS para terapia fotodinâmica (JENDŽELOVSKÁ et al., 2016; BROCKMANN, 1939). Além de suas propriedades fotodinâmicas, a hipericina é comumente utilizada como um agente antidepressivo, antiviral, antimicrobiano (SAW et al., 2005) e antitumoral (DONGRE, BADAMI e GODAVARTHI, 2008; KIL et al., 1996; ROSCETTI et al., 2004). A identificação da sua atividade fotodinâmica está relacionada à fotossensibilidade e irritação aguda na pele, apresentada por alguns animais de pasto, quando ingeriam quantidades consideráveis da referida planta e ficavam expostos à radiação solar. Esse efeito ficou conhecido como hipericismo (KARIOTI e BILIA, 2010; AGOSTINIS et al., 2002).

Para aplicação em TFD, a HY apresenta vantagens, como elevado rendimento quântico do estado triplete e formação do oxigênio singlete, baixa fotodegradabilidade, intensa absorção na região visível do espectro, com picos principais em 550 e 598 nm (Figura 6) e ampla faixa de excitação. Estudos disponíveis na literatura demonstram a eficácia do uso de HY como agente terapêutico da TFD, como uso tópico em tratamento de queratoses actínicas (ZEISSER-LABOUÈBE et al., 2006), para o tratamento do câncer (BOIY; ROELANDTS e DE WITTE, 2011; GONÇALVES et al., 2017), bem como avaliação da atividade fotodinâmica da HY contra microrganismos (BERNAL et al., 2011, 2015; KASHEF et al., 2013).

Apesar das vantagens apresentadas, a molécula de HY apresenta natureza hidrofóbica, que compromete a sua aplicação em TFD, acarretando a formação de agregados em meios aquosos, o que dificulta a aplicação da HY em doses terapêuticas, uma vez que a agregação ocasiona uma diminuição do estado excitado de energia do FS, reduzindo a habilidade de gerar oxigênio singlete e, conseqüentemente, diminui significativamente a eficácia da atividade fotodinâmica (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016; GARCIA et al., 2015; MONTANHA et al., 2017). Para evitar esses problemas de agregação, muitos FSs, inclusive a HY, têm sido associados a sistemas de encapsulação ou veículos de entrega como, por exemplo, micelas, lipossomas, emulsões e nanopartículas poliméricas, cerâmicas e nanocristais. Penjweini e seus colaboradores (2015) analisaram a entrega de HY mediada por nanopartículas biodegradáveis de ácido poli-L-lático (PLLA) em células de carcinoma pulmonar, mostrando que as nanopartículas contribuem para uma melhor dinâmica de difusão de HY dentro das células. Nafee et al. (2013) mostraram a encapsulação de HY em nanopartículas do copolímero poliprolactona-poli(etilenoglicol) (PCL-PEG) para inativação fotodinâmica de biofilmes e culturas planctônicas de *Staphylococcus aureus*, tendo observado um acréscimo de inibição na formação de biofilme quando HY foi combinada com as nanopartículas. No nosso grupo, Lima et al. (2013) estudaram a melhoria da eficiência da TFD a partir da encapsulação de HY em nanopartículas lipídicas sólidas em células HEp-2 e B16-F10, evidenciando que, quando encapsulada, a HY apresenta um aumento de solubilidade e 30% a mais de acumulação intracelular em relação à HY livre. Zhang e colaboradores (2013) obtiveram complexo de inclusão de HY com β -Ciclodextrina e mostraram que a complexação é uma estratégia para aumentar a solubilidade da HY; entretanto, não era objetivo do estudo a melhoria na aplicação da HY como FS em

TFD após a complexação, mas a caracterização química da formação do complexo. Já Plenagl *et al.* (2019) reportam um aumento na acumulação e do desempenho fotodinâmico quando um complexo HY e hidroxipropil- β -Ciclodextrina (HP- β -CD) é encapsulado em lipossomas.

Figura 6 – Representação da fórmula estrutural da hipericina, com as marcações para atribuição do espectro de RMN- ^1H e seu espectro de absorção

Fonte: Adaptado de ZEISSER-LABOUÈBE *et al.*, 2006

1.5 Química supramolecular: ciclodextrinas como sistema de liberação

A química supramolecular tem tido bastante destaque nas pesquisas químicas, biológicas e de ciências de materiais, uma vez que envolve interações não covalentes entre diferentes moléculas, bem como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, atração hidrofóbica/hidrofílica e forças de van der Waals (GANGEMI *et al.*, 2018). O desenvolvimento da química supramolecular é bastante influenciado pelos modelos biológicos, uma vez que as interações de moléculas distintas são essenciais e muito comuns para o funcionamento dos sistemas biológicos. De maneira simplificada, supramoléculas são formadas por duas ou mais moléculas a fim de desempenharem funções como reconhecimento químico e construção de moléculas com tamanhos, formas, funções e propriedades específicas (ARIGA e KUNITAKE, 2014; MATTIA; OTTO, 2015). Assim sendo, compostos supramoleculares possuem ampla possibilidade de aplicação como por exemplo na construção de materiais funcionalizados, sistemas de liberação de fármacos e catálise de reação (GANGEMI *et al.*, 2018).

Complexos de inclusão, ou complexos *guest-host*, são importantes compostos supramoleculares, formados pela interação de uma molécula, geralmente

macrocíclica, se comportando como um “hospedeiro” (*host*) no interior da qual será incluída total ou parcialmente uma ou mais moléculas receptoras ou “hóspede” (*guest*) somente por forças físicas, ou seja, sem que haja formação de ligações covalentes. A formação desses complexos ocorre de maneira simples e reversível, o que possibilita diferentes arranjos supramoleculares. Ciclodextrinas, ciclofanos e valinomicina são alguns exemplos de moléculas cíclicas utilizadas para formação de complexos de inclusão (CHU et al., 2017; GANGEMI et al., 2018).

As ciclodextrinas (CD) são um grupo de oligossacarídeos cíclicos, constituídos por subunidades de glicopirranose ligadas por ligações α -(1,4)-glicosídicas, isoladas pela primeira vez em 1891 por Villiers como produto da degradação enzimática bacteriana do amido (YALLAPU; JAGGI e CHAUHAN, 2010). As CDs produzidas mais comumente e com maiores rendimentos possuem seis, sete e oito unidades de glicose sendo, respectivamente, α -, β - e γ -ciclodextrina, as quais são cristalinas, homogêneas e não higroscópicas. As estruturas das principais CDs estão mostradas na Figura 7. Tridimensionalmente, as CDs apresentam-se em forma cônica, em função da conformação cadeira das unidades de glicopirranose, e a disposição dos grupamentos hidroxila (-OH) na estrutura das CDs levam à formação de uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna lipofílica que justificam sua considerável solubilidade em meio aquoso. Os grupos hidroxila ligados ao carbono 2 e ao carbono 3 da molécula de glicose são denominados grupos primários e estão localizados na parte mais larga da estrutura cônica das CDs, enquanto que o grupo hidroxila ligado ao carbono 6 encontra-se na região mais estreita da estrutura (CHU et al., 2017; FRÖMMING e SZEJTLI, 1993; OLIVEIRA; SANTOS e COELHO, 2009).

Figura 7 – Estrutura molecular e tridimensional das ciclodextrinas

Figura 7

Fonte: Autoria própria

Devido à sua cavidade hidrofóbica e quiral, as CD têm sido amplamente utilizadas como enzimas miméticas (ZHENG-YU, 2013), reagentes quirais (BRESLOW e DONG, 1998) e sensores (PIPERAKI e PARISSI-POULOU, 2010). No que tange aos usos farmacêuticos, as CD têm sido empregadas como excipientes e como sistema de liberação para certos fármacos, uma vez que possibilitam a melhoria de propriedades como solubilidade, estabilidade, absorção e biodisponibilidade de compostos no organismo (DEL VALLE, 2004; OLIVEIRA; SANTOS e COELHO, 2009; PONNU e ANSLYN, 2010). Para isso, são formados complexos de inclusão entre as CD e a molécula de interesse.

As CD, portanto, são tipicamente moléculas “hospedeiras”, nas quais é possível incluir uma variedade de moléculas, em diferentes proporções (Figura 8), com tamanho compatível com sua cavidade interior, que varia em função do número de unidades de glicopirranose, conforme é possível observar nos dados da Tabela 1 (CHU et al., 2017). O mecanismo de formação do complexo varia conforme a molécula a ser encapsulada, mas, no geral, é regido por processos entálpicos na liberação de moléculas de água do interior da cavidade, bem como por interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, mudanças conformacionais e interações de transferências de carga (SURVANA *et al.*, 2017).

Figura 8 – Esquema representativo da formação de complexos de inclusão em solução, formando complexos de proporção entre molécula e CD de (a) 1:1 ou (b) 1:2

Fonte: Autoria própria

Tabela 1 – Propriedades das ciclodextrinas mais conhecidas

Propriedade	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades de piranose	6	7	8
Solubilidade em água a 25°C (%m/v)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

Fonte: LAZA-KNOERR; GREF e COUVREUR, 2010

Entre três as CD naturais citadas anteriormente, apesar de a β -CD apresentar a menor solubilidade em água, é a CD com a melhor capacidade de formar complexos

com diferentes fármacos hidrofóbicos, possui síntese mais facilitada em relação às demais, estando disponível em maiores quantidades com menor custo, além de possuir uso aprovado como excipiente para preparações farmacêuticas (LAZAKNOERR; GREF e COUVREUR, 2010).

O uso de CDs combinado com FSs é estudado desde a década de 1990 e mostra uma promissora estratégia para entrega facilitada de FSs hidrofóbicos. Reubner e colaboradores (1999) sintetizaram um complexo formado por um dímero de β -CD e um derivado de ftalocianina para avaliar o papel da CD na melhoria na geração de oxigênio singlete. Ou et al. (2001) estudaram a melhoria da solubilidade da hipocrelina B (HB) por meio de ligações com CD e validaram as propriedades fotodinâmicas do composto conjugado (HBCD). Yankovsky et al. (2016) reportam que a formação de um complexo de inclusão entre dois derivados de β -CD e a molécula de meta-tetra(di-hidroxifenil)clorina (mTHPC) aumentou a liberação, acumulação e distribuição celular do FS em questão em células de adenocarcinoma humano HT29, bem como melhorou a difusão do mTHPC o que implica em processo acelerado de entrega às células tumorais. Os trabalhos de Mohan *et al.* (2012), Hagbani e Nazzal (2017) e Mangolin et al. (2014) evidenciam a melhoria de solubilidade da curcumina após a complexação com diferentes CDs, bem como aumento da sua fotoestabilidade. Por sua vez, Popat e colaboradores (2014) estudaram a complexação de CD com curcumina para aplicação em linhagens de células de câncer de pele (SCC25), sem aplicação da TFD. Nesse estudo, observou-se um aumento da solubilidade da curcumina após complexação, aumento em torno de 70% na liberação *in vitro* em relação a curcumina livre, bem como o complexo apresentou maior citotoxicidade. Sattler *et al.* (1997) sintetizaram um complexo de inclusão entre hipericina e 2-hidroxipropil β -ciclodextrina e obtiveram melhoria da liberação e transporte de HY em células de câncer do cólon (Caco-2), atribuídos ao aumento de solubilidade da hipericina quando complexada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo a formação de um complexo de inclusão entre a HY e o oligossacarídeo β -Ciclodextrina visando melhorar a solubilidade da HY em meio aquoso. Além disso, foram estudados os efeitos dessa complexação nas propriedades químicas e fotoquímicas da HY, a fim de facilitar a aplicação desta molécula em Terapia Fotodinâmica.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar o complexo de HY com β -CD;
- Avaliar a solubilidade de HY livre e complexada com β -CD;
- Avaliar a estabilidade química de HY livre e complexada com β -CD;
- Avaliar a fotodegradação de HY livre e complexada com β -CD;
- Avaliar o rendimento quântico de geração de oxigênio singlete e a atividade fotodinâmica de HY livre e complexada com β -CD;
- Comparar a liberação *in vitro* de HY livre e complexada com β -CD;
- Comparar a permeabilidade cutânea de HY livre e complexada com β -CD;
- Avaliar a fototoxicidade de HY livre e complexada com β -CD em células HeLa, MCF7 e Vero;
- Comparar a acumulação intracelular de HY livre e complexada com β -CD em células HeLa, MCF7 e Vero.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e sistemas de irradiação

A β -ciclodextrina utilizada neste trabalho foi adquirida da Sigma-Aldrich com pureza de 99%. A hipericina foi obtida em colaboração com o Prof. Dr. Anderson Orzari Ribeiro da UFABC, cujo grupo foi responsável pela síntese da molécula a partir da emodina, conforme descrição na literatura (FALK, MEYER e OBERREITER, 1993; HUYGENS, KAMUAHABWA e WITTE, 2005). As soluções estoque de FSs livres e complexados foram preparadas em DMSO. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e/ou grau espectroscópico e a água grau Milli-Q Plus (Millipore).

Para os ensaios celulares foram utilizados os meios Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Sigma-Aldrich) e Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de alta glicose (GibcoBRL). Soro fetal bovino e antibiótico (Penicilina 10.000 U.I. / mL e estreptomicina 10 mg / mL) foram adquiridos da Cultilab. Para determinação da viabilidade celular foi utilizado o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) com 98% de pureza (Sigma-Aldrich).

As medidas de absorção ótica foram realizadas no espectrofotômetro HITACHI U-2800, enquanto que as de fluorescência realizadas em espectrofluorímetro HITACHI F-4500. As cubetas utilizadas para as medidas espectroscópicas eram de quartzo com caminho ótico de 10mm. As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas no microscópio de fluorescência modelo *Olympus BX41*. Os equipamentos citados anteriormente estão disponíveis no Laboratório de Fotossensibilizadores (IQSC-USP). Um leitor de placas modelo Multiscan FC (ThermoScientific) com filtro em 570 nm foi utilizado para leitura de absorbância nas placas de 96 poços para os ensaios de viabilidade celular, disponibilizado pelo Grupo de Química Inorgânica e Analítica (IQSC USP – Prof. Dr. Daniel Cardoso). Um difusor vertical do tipo células Franz (permeador) modelo Microetteplus 60-301-106-6 (Hanson Research) foi utilizado para os ensaios de permeação cutânea, realizados no Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Marlus Chorilli.

O sistema ótico de irradiação utilizado (Figura 9) é formado por um conjunto de lâmpadas de LED montado em um dispositivo denominado Biotable, com design

adequado para irradiação de culturas celulares em placas multipoços e recipientes planos. Esse dispositivo foi desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Técnico do Centro de Pesquisas em Ótica e Fotônica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP).

Figura 9 – Dispositivo de irradiação (Biotable) LED 590 $\pm$ 10 nm utilizado para irradiação da HY livre e complexada

Fonte: Autoria própria

3.2 Obtenção e Caracterização dos Complexos de Inclusão

Os complexos de inclusão entre HY e β -CD foram obtidos por meio de adaptação do método de co-solvente descrito por Maria *et al.* (2016) e por Yallapu *et al.* (2010). Uma massa de β -CD foi previamente dissolvida em 9 mL de água em quantidade equivalente à proporção de 1:1 em mol de HY, previamente dissolvidos em 600 μ L de acetona. A solução foi agitada durante 10 min e, em seguida, submetida à sonicação em banho ultrassônico durante 30 min a 30°C. Os sistemas foram mantidos sob agitação contínua à temperatura ambiente, *overnight* e, ao final da síntese, imersos novamente em banho ultrassônico por 30 min também a 30°C. As soluções finais foram filtradas para garantir que o sobrenadante contivesse apenas o complexo solúvel, o qual foi seco em uma centrífuga a vácuo à -80°C (*Thermo Savant SC210A SpeedVac®Plus*) e armazenadas em frascos de vidro âmbar a 4°C. Um esquema simplificado da metodologia de síntese está apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Esquema de síntese dos complexos de inclusão entre β -CD e HY

Fonte: Autoria própria

A caracterização dos complexos obtidos foi realizada por meio das seguintes técnicas: Ressonância Magnética Nuclear (RMN- ^{1} H), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IV), espectroscopia de absorção na região do UV-vis e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os equipamentos estão disponíveis na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Medidas de tamanho de partícula e índice de polidispersividade (PDI - do inglês *polydispersity index*) também foram realizados por dispersão dinâmica de luz (DLS – do inglês *Dynamic Scattering Light*) em um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), com ângulo de espalhamento 173°. As medições foram realizadas em triplicata a 25 °C, após a diluição da amostra em tampão fosfato (pH 6,8) com 10% glicerol (Goszczyński et al., 2017), com quatro varreduras por amostra (n = 12).

3.4 Avaliação da eficiência de complexação

Para determinar a eficiência de complexação, 2 mg do complexo obtido foram dissolvidos em 1 mL de DMSO e, em seguida, realizou-se a leitura da absorbância dessa solução no comprimento de onda de 598 nm. O cálculo do percentual de complexação foi feito utilizando a **Equação 1** (MARIA et al., 2016). O instrumento de medida utilizado foi um espectrofotômetro Hitachi U2800 disponível no Laboratório de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

$$\% \text{ complexação} = \frac{[\text{FS}]_{\text{experimental}}}{[\text{FS}]_{\text{teórico}}}$$

Equação 1

3.5 Solubilidade dos FS livres e complexados

Para a determinação da solubilidade foram adicionados 2 mL de água deionizada a 25°C a 2 mg do FS livre ou complexado e o sistema foi agitado por 1 min em agitador Vórtex. Em seguida, o conteúdo do tubo foi centrifugado (419 g durante 4 min) e a absorbância de cada amostra foi obtida em 598 nm (MANGOLIM et al., 2014). Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados expressos pelas médias e desvios-padrão (DP).

3.6 Rendimento quântico de fluorescência dos FSs livres e complexados

A determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) do FS livre e complexado foi realizada relacionando o ϕ_f de um padrão com o da amostra. Para isso, uma solução etanólica de rodamina B, cujo ϕ_f é 0,65 em etanol, foi utilizada como padrão e as amostras de FS foram solubilizadas em DMSO. As intensidades de fluorescência das amostras, bem como as absorbâncias foram medidas em triplicata e o cálculo dos valores de ϕ_f foram realizados a partir da Equação 2. Para evitar o efeito de filtro interno e para assegurar a obediência da Lei de Lambert-Beer, os valores de absorbância em 552 nm (comprimento de onda de excitação) foram monitorados e mantidos abaixo de 0,10 (FERY-FORGUES e LAVABRE, 1999; GONÇALVES, 2015). Os resultados foram expressos pelas médias e DP das medidas.

$$\phi_f = \frac{F_a}{F_p} \cdot \frac{A_p}{A_a} \cdot \left(\frac{\eta_a}{\eta_p} \right)^2 \cdot \phi_p$$

Equação 2

sendo que η é o índice de refração dos solventes utilizados, A é a absorbância, F é a intensidade de fluorescência no comprimento de emissão específico e a e p são índices que identificam a amostra utilizada e o padrão, respectivamente.

3.7 Determinação da atividade fotodinâmica dos FSs livres e complexados

A atividade fotodinâmica é uma medida indireta da quantidade de $^1\text{O}_2$ produzida pelo FS ao ser irradiado e pode ser mensurada por meio do acompanhamento da fotoxidação do ácido úrico (AU) (Fluka Chemia – 98%). Para isso, inicialmente foi preparada uma solução de AU a uma concentração de $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio (pH 7,0), contendo 0,001% de Tween 20. A partir dessa solução, foram preparadas soluções de HY e β -CDHY ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), as quais foram submetidas à 5 min de irradiação em LED $590 \pm 10 \text{ nm}$, com irradiância de $15,8 \text{ mW cm}^{-2}$ (GONÇALVES, 2015; MA, 2016). Os espectros de absorção da mistura de FS e AU foram obtidos antes e depois da irradiação, para que fosse possível calcular o coeficiente de atividade fotodinâmica (AF), a partir do acompanhamento do decréscimo na intensidade da banda característica do AU em 290 nm , aplicando-se a Equação 3.

$$AF = \frac{\Delta A_{AU} \cdot 10^5}{P \cdot t \cdot A_{\lambda_{irrad}}}$$

Equação 3

sendo que AF é o coeficiente de atividade fotodinâmica ($\text{m}^2 \text{ J}^{-1}$), ΔA_{AU} é a variação da intensidade da absorção do AU em 290 nm , P é a potência da luz (W m^{-2}), t é o tempo de irradiação em segundos e $A_{\lambda_{irrad}}$ é absorbância do FS na mistura no comprimento de onda de irradiação do LED.

3.8 Determinação do rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (ϕ_Δ) pela decomposição do DPBF

A determinação do ϕ_Δ foi realizada a partir do acompanhamento da oxidação do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) na presença do FS, por meio do acompanhamento da diminuição da absorbância em 411 nm de uma solução etanólica de DPBF ($1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) contendo os FSs livres e complexados com absorção média de 0,029, previamente solubilizados em DMSO. Tais soluções foram irradiadas no comprimento de onda correspondente à máxima absorção do FS, que é $590 \pm 10 \text{ nm}$ com irradiância de $15,8 \text{ mW cm}^{-2}$. Durante a irradiação foram retiradas alíquotas das soluções em intervalos de tempo de 10s para monitoramento da absorbância (LIMA et al., 2013).

A quantificação do ϕ_{Δ} foi obtida empregando-se a Equação 4, utilizando a ftalocianina de zinco solubilizada em DMSO como padrão de rendimento quântico, cujo ϕ_{Δ} é equivalente a 0,72 (IQBAL et al., 2012).

$$\phi_{\Delta} = \frac{k_a}{k_p} \cdot \frac{(1 - 10^{Absp})}{(1 - 10^{Absa})} \cdot \left(\frac{\eta_p}{\eta_a}\right)^2 \cdot \phi_{\Delta p}$$

Equação 4

em que k é a constante de velocidade de decomposição do DPBF, η é o índice de refração dos solventes utilizados, Abs corresponde a absorbância do FS no comprimento de onda da irradiação e os índices p e a identificam o padrão e a amostra em análise, respectivamente.

3.9 Determinação da fotoestabilidade dos FSs livres e complexados

Para estudar e comparar a fotoestabilidade da HY antes e após a complexação foram preparadas soluções dos FSs em DMSO a uma concentração de $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções foram irradiadas ininterruptamente por um período de 3 h, tempo suficiente para que houvesse toda a fotodecomposição dos FSs, sob agitação para manter uma reposição de oxigênio constante, empregando LED com emissão em $590 \pm 10 \text{ nm}$ a uma irradiância de $15,8 \text{ mW cm}^{-2}$. Alíquotas foram retiradas para acompanhamento do espectro de absorção em diferentes intervalos de tempo.

3.10 Determinação da estabilidade química dos FSs livres e complexados

A estabilidade química da HY livre e complexada foi acompanhada por um período de 125 dias, por meio da leitura dos espectros de absorção de soluções dos FS livres e complexados. As absorbâncias no comprimento de absorção máximo (598 nm) foram utilizadas para o cálculo do percentual da quantidade remanescente de FS em solução durante o período citado.

3.11 Ensaio de liberação *in vitro* dos FSs livres e complexados

A avaliação de liberação *in vitro* foi realizada pelo método de diálise com aparato convencional, utilizando uma membrana de celulose (*cutoff* equivalente a 14 kDa) (D'SOUZA, 2014; ZAMBITO, PEDRESCHI e DI COLO, 2012). Para esses ensaios, a formulação preparada continha uma concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HY

(livre ou complexada) em PBS e foi colocada dentro da membrana de diálise. Como solução receptora, utilizou-se 10 mL de PBS (pH = 6,8) contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS). O processo de diálise foi acompanhado durante 24 h, sendo que a cada 20 min alíquotas de 1 mL eram retiradas para quantificação da intensidade de fluorescência, sempre com reposição da mesma quantidade retirada na solução receptora, para que o volume de solução receptora durante a diálise se mantivesse constante para os cálculos de diluição.

É importante ressaltar que foi previamente obtida uma curva de calibração analítica para quantificação do sinal de fluorescência em função da concentração de fotossensibilizador. A validação do método foi realizada com base na determinação das figuras de mérito: linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) determinados por meio das Equações 5 e 6, respectivamente (VALDERRAMA, BRAGA e POPPI, 2009).

$$LD = \frac{3DP_b}{s}$$

Equação 5

$$LQ = \frac{10DP_b}{s}$$

Equação 6

sendo DP_b o desvio padrão amostral dos brancos da amostra e s o coeficiente angular da curva analítica obtida.

3.12 Avaliação da permeação cutânea *in vitro*

A determinação da penetração dos FSs foi realizada em um aparato experimental é constituído por um conjunto de 6 células de Franz de difusão (permeadores) com um compartimento receptor de 3,0 mL e diâmetro de 1,0 cm (com área superficial de 1,77 cm²), conforme apresentado nas Figuras 11 e 12. Orelhas porcinas foram obtidas de um abatedouro local, lavadas e devidamente dermatomizadas com espessura de 500 µm (Dermaton, Novag, Suíça), preservando as camadas da derme e epiderme e acondicionadas em refrigerador (-18°C) até o uso. As amostras de pele foram presas entre as duas câmaras da célula de difusão com o extrato córneo (EC) voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o

compartimento receptor. A fase receptora foi composta por tampão salino fosfato (PBS – pH 6,8) contendo 1% (v/v) Tween 20. Os fotossensibilizadores livre e complexado também foram solubilizados nos mesmos componentes da solução receptora em uma concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para HY e $\beta\text{-CDHY}$, a partir de uma solução estoque em DMSO garantindo um residual de 5% de DMSO. Em seguida, 300 μL de formulação foram colocados no compartimento doador. Para manter a superfície da pele em 32°C a solução receptora foi mantida a 37°C e agitada a 300 rpm (DE PAULA et al., 2008). Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados por um período de 8 h para leitura em espectrofotômetro de fluorescência e determinação da quantidade total de FS livre e complexado permeada através da pele. O experimento foi conduzido em triplicata.

Antes da quantificação foi realizada curva de calibração da intensidade de fluorescência em função da concentração de FS no meio receptor para validação analítica do método.

Figura 11 – Representação da célula de difusão vertical (Célula Franz) utilizada para o ensaio de permeação

Fonte: Adaptado de Ruela et al., 2016

Figura 12 – Aparato experimental utilizado para o ensaio de permeação. (A) programador, (B) células de difusão vertical e (C) amostrador automatizado

Fonte: Autoria própria

3.13 Avaliação da retenção cutânea (*tape-stripping*)

Após o experimento de penetração cutânea, a fase doadora foi removida e a pele utilizada foi lavada com água deionizada para remover qualquer solução doadora remanescente em sua superfície. Em seguida, a pele foi seca cuidadosamente e foi utilizada a técnica *tape-stripping* para separar o EC das demais camadas da pele. Dessa maneira, o EC foi separado das camadas mais profundas da pele, que são a derme e epiderme (D+E), utilizando-se 16 fitas adesivas (Scotch Book Tape nº 845, 3M), as quais foram colocadas em tubos cônicos contendo 5,0 mL de etanol, que foi o meio extrator para o FS. As amostras foram agitadas durante 2 min em agitador do tipo vórtex e mantidas em banho ultrassônico por 30 min a 30°C para extrair o FS retido no EC. Após o processo de *tape-stripping*, a pele que contém a derme e a epiderme, foi triturada, colocada em tubo cônico contendo 3,0 mL de etanol e, posteriormente, triturada em misturador durante 3 min para extração do FS retido nessas camadas. Em ambos os processos, as amostras foram preparadas em triplicata, filtradas em membrana de 0,45 µm e, então, realizou-se a leitura de fluorescência para determinação da concentração de FS penetrante (DE PAULA et al., 2008).

3.14 Ensaios Biológicos

3.14.1 Cultivo de Células

Para os ensaios citotóxicos foram utilizadas duas linhagens celulares tumorais e uma linhagem celular não tumoral. A linhagem celular epitelial de adenocarcinoma humano de colo de útero (HeLa – ATCC CCL-2) foi cultivada aderida a um substrato sólido, ou seja, garrafas de polipropileno, em meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove com 10% de soro fetal bovino e antibióticos penicilina 10 000 U.I. mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹. A linhagem celular epitelial de adenocarcinoma humano de mama (MCF7), bem como a linhagem celular não tumoral de rins de macaco verde M, africano (Vero) também foram cultivadas aderidas a um substrato sólido. Entretanto, o meio de cultura utilizado para ambas foi DMEM com adição de 10% de soro fetal bovino e antibióticos penicilina 10000 U.I. mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹. As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ até que estivessem confluentes para que as passagens fossem realizadas. Todas as manipulações celulares foram realizadas em capela de fluxo laminar, com ambiente estéril e materiais previamente esterilizados para evitar contaminação celular por microrganismos.

3.14.2 Acumulação intracelular dos FS livres e complexados

Os ensaios de acumulação dos FSs nas células utilizadas foram realizados para comparar a acumulação intracelular da HY livre e complexada nos tecidos-alvo. Para isso, foram incubados 3 mL de suspensão de cada uma das três linhagens celulares utilizadas a uma concentração celular de 1×10^5 cel mL⁻¹ em placas de seis poços, nas quais foram colocadas lamínulas microscópicas, para que as células crescessem aderidas à elas. Após 24 h retirou-se o meio e adicionou-se FS livre e complexado. Após diferentes intervalos de incubação o FS era retirado do poço e a monocamada celular lavada com PBS, as lamínulas retiradas e alocadas em lâminas microscópicas para aquisição das imagens no microscópio de fluorescência.

Para a quantificação das imagens obtidas pela microscopia de fluorescência foram obtidas imagens de três regiões diferentes da placa em cada tempo de incubação. Em seguida, as intensidades de fluorescência de cada imagem foram determinadas utilizando-se o software *ImageJ*®. Os valores de fluorescência obtidos no teste de acumulação foram normalizados pela área de células contidas em cada região escolhida. Os resultados estão apresentados como média e DP das medidas e

a análise estatística dos valores experimentais foi feita utilizando-se o teste t-Student para mostrar a significância da diferença entre pares de médias.

3.14.3 Citotoxicidade dos FSs livres e complexados

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, nas quais foram incubadas 5×10^4 células mL^{-1} em meio de cultura Iscove's e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 gasoso. Após um período de incubação de 24 horas, o meio foi removido por aspiração e a monocamada de células lavada com PBS. Em seguida, as células foram incubadas com diferentes concentrações de FSs livres e complexados por um período de 2h, após o qual as células foram lavadas com PBS para retirada do FS não acumulado e adicionou-se meio de cultura, seguido de irradiação com LED 590 ± 10 nm para a HY e β -CDHY. Um controle celular foi feito com o FS sem irradiação. Após irradiação as células foram mantidas em estufa de cultura celular por 24 h para finalização do ensaio após o tratamento fotodinâmico. Após este período, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o método colorimétrico do MTT. O MTT quando incubado com células vivas é reduzido a um composto denominado formazan, de coloração roxa que absorve em 570 nm. Essa redução é realizada pelas desidrogenases mitocondriais presentes somente nas células vivas. Para isso, 50 μL de MTT a 1 mg mL^{-1} foi adicionado aos poços e após 3 h de incubação foi retirado dos poços e adicionados 50 μL de álcool etílico e 150 μL de mistura (1:1) de PBS e álcool isopropílico para solubilização dos cristais de formazan. Por fim, a absorbância de cada poço da placa foi quantificada em leitor de placas (Multiscan FC ThermoScientific) com filtro de 570nm. Desse modo, foi possível determinar concentração inibitória média (IC_{50}) (DENIZOT e LANG, 1986; CARMICHAEL et al., 1987). Os resultados estão apresentados pelas médias e DP das medidas e a análise estatística dos valores experimentais foi feita utilizando-se o teste t-Student para mostrar a significância da diferença entre pares de médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização do complexo de inclusão

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentadas na Figura 13 foram obtidas a fim de verificar a existência de alguma mudança morfológica após o processo de complexação da HY.

Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura de (A) β -CD, (B) HY, (C) β -CDHY e (D) mistura física HY e β -CD

Fonte: Dados da Pesquisa

Alguns artigos na literatura, como de Guimarães et al. (2015) e Dandawate et al. (2012), propõem que um dos indícios de complexação é a mudança de características morfológicas quando complexos de inclusão são formados. Para a inclusão entre β -CD e HY, proposta neste trabalho, verificou-se que não houveram alterações morfológicas significativas quando se compara os precursores livres (Figura 13 (A) e (B)) com a forma complexada (Figura 13 (C)). Em todos os casos, os

compostos se apresentam como sólidos amorfos e com tamanhos variados. A comparação com a mistura física seria útil para comprovar a presença de HY e β -CD sem interação, mas também não é eficiente para a síntese realizada, uma vez que as estruturas de ambos são muitos semelhantes entre si.

A eficiência de complexação, bem como o tamanho e a solubilidade do complexo obtido em comparação com a HY livre estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Propriedades comparativas dos precursores livres (HY e β -CD) e do complexo β -CDHY. Os resultados estão expressos em média $\pm$ DP, com $n = 12$ para as medidas de tamanho e PDI e $n = 3$ para as demais medidas

Compostos	Solubilidade (mg mL ⁻¹)	Complexação (%)	Tamanho (μ m)	PDI
β -CD	18,50*	-	0,33 $\pm$ 0,03	0,4 $\pm$ 0,1
HY	Insolúvel	-	6 $\pm$ 1	0,28 $\pm$ 0,08
β -CDHY	0,138 $\pm$ 0,017	42,17 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,2	0,51 $\pm$ 0,09

*LAZA-KNOERR; GREF e COUVREUR, 2010.

Fonte: Dados da pesquisa

É possível observar que a HY, considerada insolúvel em meio aquoso, teve sua solubilidade aumentada após a inclusão em β -CD. De fato, era esperado que a complexação desta molécula fotossensibilizadora com β -CD provocasse esse aumento de solubilidade, isto porque a HY é uma molécula hidrofóbica que após a inclusão ocupa o interior também hidrofóbico da β -CD. Assim sendo, a solubilidade será regida pela superfície hidrofílica da β -CD que fará a interação com as moléculas de água (KRYJEWSKI et al., 2015; ZHANG et al., 2014). O estudo de Zhang et al. (2013) mostra que a solubilidade da HY quando complexada com um polímero de β -CD e epiclorigrina em condições alcalinas é de 1,794 mg mL⁻¹. Plenagl et al. (2019) estudaram o efeito da encapsulação em lipossomas de complexos de HY com HP- β -CD; entretanto, não mencionam melhorias na solubilidade. Sattler (1997) sugere que a solubilidade da HY varia conforme o tipo de CD que se utiliza, uma vez que isso implica em interações diferentes entre os grupos da cavidade hospedeira e a molécula hóspede. Não é de nosso conhecimento nenhum estudo que tenha feito a complexação da HY com β -CD para comparação direta com o complexo β -CDHY

obtido nesse trabalho. Portanto, o incremento na solubilidade da HY pela inclusão com β -CD é inédito e se refere a uma conquista na tentativa de melhorar a questão da elevada hidrofobicidade desta molécula, responsável pela limitação de sua aplicação.

O percentual de complexação foi calculado a partir das absorbâncias por meio da Equação 1. Na literatura, diferentes trabalhos que propõem a inclusão de diferentes moléculas em CDs apresentam porcentagens variáveis de eficiência de inclusão (MARIA et al., 2016; MANGOLIM et al., 2014; AZZY et al., 2017). Isto acontece porque a proporção de complexação está diretamente relacionada com o método de síntese utilizado, o qual influi na maneira pela qual as moléculas de interesse se incluirão na cavidade da CD, bem como na força e extensão dessa inclusão. A utilização de um co-solvente adequado e com menor afinidade pela cavidade da CD, como foi utilizado neste trabalho, é fundamental para que não haja competição entre as moléculas de água e a molécula hospedeira.

No que tange ao tamanho de partícula determinado por DLS, observou-se que as partículas de β -CDHY são menores que as partículas de HY e maiores que as partículas de β -CD em solução aquosa, o que também é indício de que a complexação realmente ocorreu.

4.2 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) foi uma das técnicas utilizadas para comprovar a formação do complexo de inclusão entre HY e β -CD. Os espectros obtidos para os precursores, complexo e mistura física estão apresentados na Figura 14 e as atribuições das bandas características estão contidas na Tabela 3.

Figura 14 – Espectro vibracional no infravermelho para β -CD, HY, β -CDHY e mistura física (β -CD + HY)

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3 – Atribuições vibracionais no infravermelho em pastilha de KBr para β -CDHY, seus respectivos precursores (β -CD e HY) e para a mistura física entre eles

Atribuições vibracionais	β -CD	HY	β -CDHY	MIX	$\Delta^* / \text{cm}^{-1}$
$\delta(\text{OH})$	940	-	947	940	+7
$\nu(\text{C-O-C})$	1021	-	1034	1021	+ 13
$\nu(\text{C-O})$	1157	-	1157	1157	0
$\nu(\text{C-O}_{\text{aromático}})$	-	1256	1256	1256	0
$\nu(\text{C=C}_{\text{aromático}})$	-	1590	1597	1590	+ 7
$\nu(\text{O-O-H})$	1647	-	-	-	-
$\nu(\text{C-H})$	2920	-	2920	2920	0
$\nu(\text{OH})$	3342	3450	3374	3386	+24

Mix – mistura física de β -CD e HY

* diferença entre número de onda do pico no complexo β -CDHY em relação ao sinal do precursor, β -CD ou HY

Fonte: Dados da pesquisa

Na Figura 14 é possível observar que a β -CDHY apresenta bandas referentes a vibrações de grupos das moléculas de β -CD e HY. Em especial, verifica-se que a

banda característica da HY em 1590 cm^{-1} , atribuída às vibrações axiais do grupo carbonila (C=O) e das ligações C=C no anel aromático sofre um deslocamento para 1597 cm^{-1} quando o complexo é formado. A banda referente à vibração da ligação C–O–C das unidades de glicose na β -CD em 1021 cm^{-1} também sofre um deslocamento positivo de 13 cm^{-1} . A deformação angular da ligação –OH da β -CD fora do plano em 940 cm^{-1} sofre um deslocamento para 947 cm^{-1} no complexo β -CDHY. Portanto, pode-se sugerir que houve inclusão da HY nas cavidades da β -CD, uma vez que os deslocamentos indicam mudanças nas interações atômicas das duas moléculas (KAPINUS et al., 1999; MOHAN et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

A comparação com os espectros de IV da mistura física dos precursores é imprescindível, já que, como foi possível notar, nas misturas físicas os deslocamentos das bandas muitas vezes não ocorrem e, quando ocorrem, o fazem em menor proporção em relação ao complexo. Isto reafirma os indícios de que, quando ocorre a formação do complexo, há presença de interações efetivas entre β -CD e HY que alteram a disposição e interação dos átomos e, portanto, suas vibrações de ligação.

4.3 RMN- ^1H

Complementarmente, a análise dos espectros de RMN- ^1H também foi utilizada para verificar a formação dos complexos de inclusão. Os espectros da β -CD e da HY livre e complexada, bem como as integrais de cada sinal estão representados nas Figura A1, A2 e A3 do anexo. Observou-se que a β -CD apresentou sinais de RMN- ^1H (DMSO- d_6) em 5,71 (d, 3-OH), 5,66 (d, 2-OH), 4,83 (d, 1-H), 4,44 (t, 6-OH), 3,26 – 3,26 ppm (m, H1 – H6). A HY apresenta sinais de hidrogênio em 18,43 (s, 4,4'-OH), 14,73 (s, 6,6'-OH), 14,08 (s, 1,1'-OH), 7,44 (s, 5,5'-H), 6,58 (s, 2,2'-H), 2,74 ppm (s, 3,3'-H) (DAX et al., 1999; FALK e SCHIMITZBERGER, 1992; TATSISI et al., 2008).

O complexo de inclusão β -CDHY apresentou os picos pertencentes à β -CD e HY. No entanto, nota-se que no espectro do complexo β -CDHY há uma supressão do sinal em 18,43 ppm, característico da HY, que fundamenta a complexação entre β -CD e HY. Este sinal é atribuído aos H-4,4' da hidroxila, conforme especificado na Figura 6 e o mesmo, segundo Dax (1999) e Sikos et al. (2017), sugere que a HY existe em sua forma iônica em DMSO- d_6 e, devido às ressonâncias ao seu entorno, tais hidrogênios encontram-se desblindados, de modo que seu sinal aparece em deslocamentos químicos maiores, diferentemente dos hidrogênios das demais hidroxilas. O cálculo das integrais para β -CDHY permitiu a constatação de que a

estequiometria do complexo obtido (β -CDHY) ocorre na proporção molar de 1:2 (HY: β -CD).

Já que não há modificações nos sinais das integrais, bem como em suas multiplicidades, é possível inferir que a inclusão ocorre provavelmente por meio de interações supramoleculares envolvendo ligações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, além de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas existentes nas moléculas de HY e β -CD (TANG et al., 2002). A publicação de Zhang e colaboradores (2013) é uma das poucas que reportam a complexação de HY com algum tipo de CD, tendo investigado o processo de inclusão da HY com um polímero de β -CD e epicloridrina, mostrando os parâmetros que evidenciam a complexação. Por meio da integração dos sinais de RMN- ^1H e pelo Método de Job, os autores provaram que a estequiometria de complexação também foi 1:2 em proporção molar, o que sugere uma tendência de que a complexação da HY com β -CD ocorra de maneira a formar uma estrutura do tipo sanduíche, como mostrado na Figura 8.

4.4 Estabilidade química dos FSs livres e complexados

Para análise da estabilidade química dos FSs ao longo do tempo, foram realizadas periodicamente medidas de espectroscopia de absorção na região visível do espectro. Os espectros coletados, bem como a quantificação residual de FS livre e complexado em solução estão apresentados na Figura 15.

Por meio da comparação entre os espectros da HY e β -CDHY é possível observar que ocorreu uma leve diminuição da concentração de HY e β -CDHY em solução em função do tempo. Ao final do período de acompanhamento de 125 dias, a solução de β -CDHY ainda continha 88% de HY intacta, enquanto a solução de HY livre manteve 83% da sua concentração inicial, sugerindo uma leve melhoria na estabilidade da HY após a complexação. Tendo em vista que a HY livre por si só já é um composto bastante estável quimicamente e com baixa taxa de degradação ao longo do tempo (BERNAL, 2011; MA, 2015), não seria de fato esperado um ganho expressivo de estabilidade química.

Figura 15 – Espectros de absorção de (A) HY, (B) β -CDHY obtidos periodicamente para acompanhamento da estabilidade química e (C) quantificação de residual de FSs em solução em função do tempo de HY e BCDHY

Fonte: Dados da pesquisa

5.5 Fotodegradação dos FSs livres e complexados

A maioria dos estudos envolvendo a complexação de FSs com diferentes tipos de ciclodextrinas avaliam detalhadamente a estabilidade química (MANGOLIM et al., 2014; ZHANG et al., 2013), térmica e em meio biológico dos produtos de inclusão (POPAT et al., 2014; YADAV et al., 2009). No entanto, não é descrita a avaliação da fotodegradação em comprimentos de onda específicos para os complexos obtidos, muito provavelmente por não visarem a aplicação em terapia fotodinâmica, mas sim na indústria alimentícia ou aplicações farmacêuticas sem necessidade do uso de luz. A fotodegradação, também conhecida como fotobranqueamento, consiste no processo de degradação de uma espécie cromófora quando exposta à luz (ELSAIE, 2013). Nesse processo ocorre a perda da cor característica do composto com o

decorrer da irradiação, além de possíveis mudanças estruturais dos cromóforos (MA, 2016).

Uma vez que o objetivo do presente estudo é aplicação da HY em TFD, foi avaliada também a fotodegradação da HY livre e do complexo com β -CD e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 16. Após 3h de irradiação há uma pequena diminuição da fotodegradação da HY de 88% para 83% quando complexada com β -CD. A mesma tendência é observada ao longo de todos os períodos de irradiação monitorados (Figura 16(c)), sugerindo que a complexação com β -CD não afeta significativamente a fotoestabilidade da HY. Deve-se mencionar que nenhum dos estudos que reportam a complexação de HY com CDs abordam estudos comparativos de fotoestabilidade.

Figura 16 – Fotodegradação acompanhada pela absorção das soluções ($4,5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) em DMSO de Hipericina em função do tempo de irradiação. A) HY, B) β -CDHY e C) Percentual de HY remanescente em solução em função do tempo de irradiação (590 ± 10 nm; $I = 15,8$ mW cm⁻²)

Fonte: Dados da pesquisa

Azzy e colaboradores (2017) estudaram a fotoestabilidade do nerolidol (sesquiterpeno utilizado como agente flavorizante nas indústrias de cosmético e alimentícia) após sua complexação com diferentes CDs, sendo que o nerolidol livre apresentou 83% de fotodegradação e complexado com 2-hidroxipropil- β -CD apenas 30%, indicando que a inclusão nas cavidades provocou um efeito protetivo contra a fotodegradação da molécula do nerolidol quando exposto à luz ultravioleta. Barata *et al.* (2015) avaliaram o efeito fotodinâmico do meso-tris(pentafluoreofenil)corrol conjugado com β -CD para uso em TFD e constataram um aumento (quantificação não mencionada) na fotoestabilidade para os produtos de conjugação. Paramera *et al.* (2011) estudaram a estabilidade fotoquímica da curcumina complexada com β -CD e observaram uma redução da estabilidade quando o complexo foi exposto durante 30 dias à luz solar.

Portanto, verifica-se que a inclusão com CDs pode aumentar ou diminuir a fotoestabilidade de moléculas hóspedes e isso pode ser justificado pela habilidade dos compostos em interagir de diferentes maneiras, formando interações inter e intramoleculares que podem estabilizar ou desestabilizar o composto frente à ação da luz (MANGOLIM *et al.*, 2014; PANAMERA *et al.*, 2011; TONNESEN, 2002). O fato de os complexos obtidos neste trabalho não apresentarem alteração na fotoestabilidade dos FSs não inviabiliza a aplicação destes em TFD e, portanto, o estudo de parâmetros importantes para essa aplicação será apresentado a seguir.

4.6 Rendimento Quântico de Fluorescência

A determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) foi realizada em relação a uma substância padrão de fluorescência, neste caso, rodamina B. Os valores de ϕ_f obtidos para os FSs livres e complexados (Tabela 3) estão em concordância com aqueles encontrados na literatura (GONÇALVES, 2015).

Tabela 4 – Rendimentos quânticos de fluorescência para os FS livres e complexados com β -CD. Os valores são a média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$)

FS	ϕ_f
HY	0,115 $\pm$ 0,003
β -CDHY	0,115 $\pm$ 0,005

Fonte: Dados da pesquisa

A análise estatística de tais valores indicou que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o ϕ_f da HY e do complexo β -CDHY. Na literatura, não são descritos dados comparativos do rendimento quântico de fluorescência entre HY e seus complexos obtidos com diferentes tipos de CDs. Todavia, sabe-se que o fenômeno da fluorescência ocorre devido a transições do tipo singleto-singleto. Portanto, um decaimento nesse parâmetro poderia indicar um aumento em outros processos radioativos como a formação de estados tripleto, resultantes de cruzamentos intersistemas, que levariam a uma maior formação de espécies tripleto excitadas. O aumento nesse parâmetro, por sua vez, refletiria em uma diminuição de espécies disponíveis para o estado tripleto (SILVA et al., 2011). Assim sendo, os resultados aqui obtidos e expressos na Tabela 4 sugerem que a inclusão com β -CD não altera a probabilidade de retorno da HY excitada para o estado fundamental através da emissão de fluorescência.

A influência da inclusão de FSs em CDs no que diz respeito aos processos de fluorescência não pode ser generalizada. O trabalho de Silva et al. (2011) mostra que a mesma ftalocianina de cloro alumínio tem seu ϕ_f aumentado quando complexada com β -CD e diminuído ao ser complexada com HP- β -CD. Já Ogunsipe e Aletan (2015) não observaram nenhuma alteração ao complexar ftalocianina de zinco e derivados com β -CD. A mesma observação foi reportada nos estudos de Mosinger et al. (2002) nos quais não houve alteração nos ϕ_f de ftalocianinas de zinco e paládio ao serem complexadas com diferentes tipos de CD. Por meio dessas evidências, verifica-se que o aumento, diminuição ou constância dos valores de ϕ_f em relação aos FSs livres pode ser associado a diferentes fatores como modo, tipo de interação e extensão da inclusão, os quais variam de acordo com a molécula hóspede e com a natureza da CD.

4.7 Atividade fotodinâmica da HY livre e complexada obtida pela degradação do ácido úrico

A atividade fotodinâmica foi determinada por meio do acompanhamento da fotoxidação do ácido úrico (AU), que atua como um dosímetro químico para determinação quantitativa da atividade fotodinâmica. O AU reage proporcionalmente com $^1\text{O}_2$ gerado pela irradiação da molécula de FS, ocasionando uma diminuição na

sua banda de absorção em 290 nm devido à degradação da molécula de ácido úrico, conforme apresentado na Figura 17 (BREGNHØJ et al., 2019; FISCHER et al., 1998; RABELLO et al., 2012).

Figura 17 – Principal produto de reação formado a partir da reação com $^1\text{O}_2$

Fonte: Autoria própria

Dito isto, na Figura 18 estão apresentados os espectros da mistura de cada FS e AU antes e depois de 5 min de irradiação, em que se pode notar em todos os casos a diminuição da banda em 290nm. Na Tabela 4 estão apresentados os valores calculados, a partir da Equação 3, dos coeficientes de atividade fotodinâmica (AF).

Figura 18 – Espectros de absorção antes e após irradiação das misturas de AU com (A) HY e (B) β -CDHY em SDS 2% em PBS

Fonte: Dados da Pesquisa

Tabela 5 – Coeficientes de atividade fotodinâmica dos FSs livres e complexados. Os dados estão apresentados como média $\pm$ SD (n = 3).

FS	AF / m ² J ⁻¹
HY	75 $\pm$ 2
β -CDHY	77 $\pm$ 6

Fonte: Dados da pesquisa

A análise estatística dos dados apresentados na Tabela 4 indicou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de AF da HY e β -CDHY. Na literatura, também não são descritos dados comparativos do coeficiente de atividade fotodinâmica entre HY e seus complexos obtidos com diferentes tipos de CDs. Assim sendo, os resultados obtidos sugerem que a complexação com CD não alterou a capacidade de geração de oxigênio singlete dos FSs em estudo, o que corrobora também com os dados obtidos nesse estudo para o rendimento quântico de fluorescência da HY livre e complexada.

4.8 Rendimento quântico de geração de oxigênio singlete obtido pela degradação do DPBF

Outra maneira de monitorar a geração de oxigênio singlete pela molécula de FS é pelo método da fotodegradação do DPBF, o qual é utilizado como um sequestrador químico de $^1\text{O}_2$. O DPBF é capaz de reagir irreversivelmente com o $^1\text{O}_2$ produzido pelo FS, resultando na formação de um endoperóxido, conforme apresentado na Figura 19, que leva a sua fotodecomposição a qual pode ser detectada pela diminuição de intensidade da banda de absorção do DPBF, em 411 nm (HOWARD e MENDENHALL, 1975; FUJI et al., 2004).

Figura 19 – Reação de fotodecomposição do DPBF. Quando o FS é irradiado ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Este último é sequestrado pela molécula de DPBF resultando na formação de um endoperóxido

Fonte: Autoria própria

Na Figura 20 estão apresentadas as curvas de decomposição do DBPF na presença do padrão FtZn e na presença da HY livre e complexada para determinação das constantes de decomposição do sequestrador químico. Os valores dos coeficientes de ϕ_Δ estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de rendimento quântico por geração de oxigênio singlete (ϕ_Δ) pela degradação do DPBF para HY livre e complexada. Os dados estão apresentados como média $\pm$ SD ($n = 3$)

Composto	$K_d (\times 10^{-2}) / \text{s}^{-1}$	ϕ_Δ
ZnFt	$-0,89 \pm 0,034$	$0,72^*$
HY	$-3,7 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,02$
β -CDHY	$-3,34 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,02$

* IQBAL et al., 2012.

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 20 – Acompanhamento da fotodecomposição do DPBF na presença de (A) FtZN, (C) HY e (E) β -CDHY e as respectivas curvas de calibração da absorbância em função do tempo (B, D e F).

Fonte: Dados da pesquisa

Os testes estatísticos indicaram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as constantes de decomposição, bem como nos ϕ_{Δ} da HY livre e complexada. Tais resultados corroboram as conclusões obtidas na determinação da AF (item 5.7), confirmando o fato de que a inclusão da HY na cavidade de β -CD mantém a sua capacidade de geração de $^1\text{O}_2$.

Assim como o rendimento quântico de fluorescência, mudanças no ϕ_{Δ} em função da complexação com CDs variam conforme a natureza tanto da molécula hóspede quanto da molécula hospedeira. Tau et al. (2003) indicaram que algumas ftalocianinas apresentaram um aumento de ϕ_{Δ} quando complexadas com β -CD, sugerindo que a inclusão diminui o estado de agregação dessas moléculas fotossensibilizadoras, permitindo um aumento nos processos de cruzamento intersistema para obtenção de estados tripleto. No entanto, o mesmo trabalho mostrou que outros derivados de ftalocianinas não apresentaram mudanças no ϕ_{Δ} após a inclusão. Diferentes derivados de ftalocianina de zinco e paládio estudadas por Mosinger et al. (2002) também não apresentaram diferenças no ϕ_{Δ} .

4.9 Liberação *in vitro* da HY livre e complexada

Do ponto de vista farmacoterapêutico, o estudo da liberação de fármacos é importante para quantificar com mais eficiência e precisão as dosagens das formulações que devem agir em um determinado sítio-alvo em função do tempo e da taxa de absorção pelo organismo. Além disso, a liberação permite avaliar a via de administração mais apropriada para cada tipo de fármaco (D'SOUZA, 2014).

Os perfis de liberação *in vitro* para a HY livre e complexada estão apresentados na Figura 21. Nela, é possível observar que após 2h a concentração de HY liberada pelo complexo β -CDHY atinge um máximo (116 nmol L^{-1}), sendo aproximadamente seis vezes maior que a concentração de HY livre liberada (21 nmol L^{-1}) no mesmo período.

Figura 21 – Perfil de liberação *in vitro* de HY e β -CDHY em PBS 2% SDS.

Fonte: Dados da pesquisa

A utilização de CDs como sistema de liberação de fármacos, além de modificações nas propriedades químicas e físicas, permite que os complexos de inclusão apresentem diferentes tipos de mecanismos de liberação, que podem ser por liberação imediata, prolongada ou modificada (HIRAYAMA e UEKAMA, 1999). Em meio aquoso as moléculas hóspedes e as CDs estão em equilíbrio dinâmico, ou seja, os complexos são continuamente formados e dissociados. Logo, o processo de liberação depende da interação entre a CD e a molécula a ser incluída em suas cavidades, de maneira a se obter uma constante de dissociação favorável para a manutenção da espécie complexada em solução (JANSOOK et al., 2018). No caso do perfil mostrado na Figura 21, pode-se dizer que a complexação da HY com β -CD proporcionou uma liberação imediata (tempo < 20 min) do FS em meio fisiológico e isto está diretamente associado ao ganho de solubilidade da β -CDHY em relação a HY livre. Particularmente, formulações com liberação imediata são úteis para usos em situações emergenciais, especialmente para administração oral de fármacos pouco solúveis. Dessa maneira, dado o melhoramento do perfil de liberação da HY após a inclusão, sugere-se que o complexo β -CDHY apresenta potencial para ser utilizado em formulações orais.

4.10 Permeação cutânea *in vitro*

Primeiramente faz-se necessário saber que, como apresentado na Figura 22, as principais estruturas da pele são:

- (1) estrato córneo (EC) é a primeira barreira cutânea, contendo de 15 a 20 camadas de células densas, anucleadas e ligadas a queratina, com espessura de 10 a 15 μm ;
- (2) epiderme (E) é uma região não vascularizada de tecido viável, localizada logo abaixo do EC;
- (3) derme (D) é a camada mais profunda da pele, de constituição complexa e altamente vascularizada, com espessura de 3 a 5 mm.

Figura 22 – Representação das camadas da pele

Fonte: Adaptado de Ruela et al., 2016

O estudo da administração de fármacos através da pele pode direcionar a aplicação de uma determinada formulação, uma vez que esta é uma via que possibilita aplicação localizada e minimiza efeitos colaterais sistêmicos. Além disso, é possível explorar liberação controlada e prolongada através da pele, sendo uma alternativa à administração oral de fármacos. A avaliação da absorção de uma formulação na pele consiste de duas etapas: (i) quantificação da quantidade de FS que permeia a pele e pode atingir o sistema circulatório, útil para formulações transdérmicas e (ii) quantificação da quantidade de FS que penetra por algumas camadas da pele, útil para aplicação tópica de um fármaco (RUELA et al., 2016).

Visando quantificar por espectroscopia de fluorescência a concentração de FS absorvido pelas camadas da pele, obteve-se uma curva de calibração da

intensidade de fluorescência em função da concentração de FS no meio receptor (PBS contendo 1% Tween 20) para as medidas de permeação e no meio extrator (etanol) para as medidas de *tape-stripping*. Os espectros de emissão de fluorescência e as curvas analíticas em função da concentração para HY em diferentes solventes estão apresentados na Figura 23, respectivamente. A Tabela 7 contém os parâmetros para validação do método analítico de quantificação.

Figura 23 – Espectros de emissão de fluorescência de HY e suas respectivas curvas analíticas em (A e B) PBS 1% Tween 20 ($\lambda_{\text{emissão}}=602\text{nm}$) e (C e D) etanol ($\lambda_{\text{emissão}}=597\text{ nm}$). O $\lambda_{\text{excitação}}$ em ambos os casos foi de 552 nm. Para a curva obtida PBS 1% Tween 20 (B) utilizou-se uma tensão elétrica de 700 V e para a curva obtida em etanol (D) utilizou-se uma tensão elétrica de 400 V

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 7 – Dados analíticos para determinação da concentração de HY por medidas fluorimétricas em diferentes solventes

FS	Solvente	Curva analítica*	R ²	LD ng mL ⁻¹	LQ ng mL ⁻¹
HY	PBS 1% Tween 20	$y = 9,0 \cdot 10^9 x + 16$	0,999	0,268	0,892
	Etanol	$y = 1,4 \cdot 10^8 x + 0,10$	0,998	1,43	4,75

Fonte: Dados da pesquisa

A fluorimetria é conhecida por ser uma técnica espectrofotométrica de 10 a 100 vezes mais sensível do que a espectroscopia de absorção, permitindo análise de elementos traços (ITAGAKI, 2000). Realmente, a sensibilidade pode ser confirmada a partir dos valores do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) apresentados na Tabela 7, os quais encontram-se na ordem de 10^{-9} g mL⁻¹. As curvas analíticas do tipo $y = ax + b$ apresentadas na Tabela 7 foram utilizadas para a quantificação de HY permeada através da pele, sendo y a intensidade de fluorescência e x a concentração de HY em g mL⁻¹. Tais curvas foram obtidas em potências diferentes do equipamento, pois a sensibilidade para leitura da amostra em PBS 1% Tween 20 foi menor em 400V. Por isso, o coeficiente angular da curva em etanol apresentou-se menor que o mesmo coeficiente para a curva em PBS 1% Tween 20.

Os dados obtidos para avaliação da permeação *in vitro* da HY em pele porcina estão apresentados na Figura 24 e os parâmetros calculados estão contidos na Tabela 8.

Figura 24 – (A) Perfil de permeação *in vitro* de HY e β -CDHY através de pele porcina dermatomizada e (B) quantidade total de HY e β -CDHY retida no estrato córneo (EC) e na derme e epiderme (D+E), após 24 h. (*) indica significância estatística com $p < 0,05$ em relação a HY livre

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 8 – Parâmetros de permeação cutânea

FSs	Fluxo ($\mu\text{g h/cm}^2$)	Período de latência (h)	Kp* (10^{-5} cm/s)
HY	$4,63 \pm 1,55$	0	$2,6 \pm 0,9$
β -CDHY	$1,20 \pm 0,18$	0	$0,7 \pm 0,1$

* Kp é a constante de permeação do fármaco através da pele

Fonte: Dados da pesquisa

Analisando o gráfico da Figura 24(A) observa-se que a HY livre possui maior facilidade de permeação cutânea quando comparada ao complexo de inclusão β -CDHY. Essa observação pode ser melhor compreendida ao verificar que o fluxo – correspondente à quantidade de HY que permeia 1 cm^2 de pele por hora – é maior para a HY livre do que para o complexo β -CDHY (Tabela 8). Além disso, a constante de permeação (K_p), que é um parâmetro cinético obtido por meio da curva não linear de permeação (Figura 24(A)), também indica a melhor permeação cutânea da HY livre em relação a β -CDHY, já que este último apresentou menor K_p . O período de latência corresponde ao menor tempo em que foi detectada a permeação de HY. Dessa

maneira, é possível dizer que ocorreu permeação imediata tanto da HY livre como do complexo β -CDHY, uma vez que o período de latência de ambos os compostos foi zero.

Alguns estudos mostram que as CDs podem tanto aumentar como diminuir a capacidade de permeação de fármacos através de barreiras biológicas (LOFTSON e MASSON, 2001; LOPEZ et al., 2000; SHAKORY et al., 2010). Sabe-se que as membranas biológicas são lipofílicas e, portanto, apenas aquelas moléculas com relativa lipofilicidade podem penetrar através das mesmas. Nesse sentido, os sistemas comumente utilizados para melhorar a penetração cutânea (à base de álcoois ou lipídios) agem de modo a romper a camada lipídica das membranas biológicas. Já o mecanismo de ação das CDs se dá por meio do aumento da disponibilidade de fármaco na superfície dessas barreiras biológicas, que eventualmente leva a uma maior permeação (MASSON et al., 1999). Entretanto, uma quantidade em excesso de CD, utilizada muitas vezes para garantir a solubilidade de uma molécula em estudo, pode levar uma diminuição na sua penetração (JAHRO et al., 1996). Essa diminuição, segundo Arima et al. (1996;1998) pode estar relacionada com a competição de lipídios presentes na membrana cutânea pela cavidade das CDs, visto que os complexos de inclusão estão em equilíbrio dinâmico com as moléculas hospedeiras (*apud* LOFTSSON e MASSON, 2001).

Por outro lado, a Figura 24 (B) permite analisar a retenção da HY livre e complexada, nas camadas da pele. Neste caso, observou-se que o complexo β -CDHY apresentou maior retenção tanto no EC como nas camadas mais profundas (D+E). Esses resultados indicam que o complexo β -CDHY pode ser mais apropriadamente empregado para formulações de uso tópico, o que permite aplicá-lo para tratamento de câncer de pele, bem como dermatites, psoríases e acnes por meio de Fototerapia cosmética, com expectativa de melhor performance em comparação com a HY livre, a qual já é estudada com tais finalidades de aplicação (KASHEF et al., 2013; POPOVIC, WIGGINS E DAVIS, 2015; ZEISSER-LABOUÈBE et al., 2006).

4.11 Acumulação intracelular de HY livre e complexada

O ensaio de acumulação intracelular tem como finalidade quantificar o FS incubado em uma determinada linhagem celular em função do tempo. Para isso, após diferentes tempos de incubação das linhagens celulares com o FS livre e complexado, imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas em diferentes tempos de

incubação para quantificação da quantidade de FS internalizada nas células HeLa, MCF7 e Vero, imobilizadas em lamínulas microscópicas, conforme apresentado nas Figuras A4, A5 e A6 do anexo, respectivamente. Os resultados de quantificação estão contidos na Figura 25, em que a intensidade de fluorescência normalizada pela área celular foi determinada em triplicata para cada tempo de incubação nas diferentes células utilizadas.

Figura 25 – Gráficos quantitativos da acumulação intracelular de HY e β -CDHY em diferentes tempos de incubação nas células (A) Vero, (B) HeLa e (C) MCF7

(***) indica diferença significativa entre HY e β -CDHY com $p < 0,001$

Fonte: Dados da Pesquisa

A análise da acumulação intracelular nas três linhagens celulares empregadas nos tempos de incubação de 30, 60 e 120 min sugere que ocorre uma acumulação seletiva da HY livre e complexada nas células tumorais em detrimento da célula normal utilizada para comparação, uma vez que a intensidade de fluorescência dos FSs internalizados nas células Vero é entre uma e duas vezes menor que a intensidade nas células HeLa e MCF7, respectivamente. Essa seletividade é geralmente associada ao elevado índice de LDL presente nas células tumorais, pois esses lipídeos têm a função de suprir os tecidos com a quantidade necessária de colesterol para formar suas membranas durante o processo de divisão celular. Considerando o fato de que células tumorais se multiplicam mais rapidamente, há um aumento expressivo na quantidade de LDL produzido pelo organismo, que agirá como um transportador do FS para os tecidos tumorais, ou seja, age como facilitador da entrega dos FS às células (CRUZ *et al.*, 2013; KWIATKOWSKI *et al.*, 2018; POPOVIC *et al.*, 2015).

Em relação à comparação da acumulação intracelular da HY livre e complexada, verificou-se que apenas em células HeLa houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre a acumulação da HY e da β -CDHY, para os três períodos de incubação avaliados. Para MCF7 e Vero, HY e β -CDHY apresentam estatisticamente ($p > 0,05$) a mesma acumulação para todos os períodos de incubação.

Na literatura, diferentes efeitos são observados em relação a internalização de FSs nas células após a complexação com CDs. Yankovsky et al. (2016) avaliaram a acumulação de mTHPC em células de câncer colorretal (HT-29), verificando que conforme a concentração de CD utilizada este FS pode ter a acumulação aumentada ou diminuída em relação ao FS livre. Segundo Loftsson e Brewster (1996) o efeito das CDs na acumulação de moléculas hidrofóbicas pode ser atribuído ao aumento de permeabilidade devido à melhoria da solubilidade do composto complexado e, conseqüentemente, do seu perfil de dissolução na membrana plasmática. Além disso, ciclodextrinas são capazes de se ligar a vários componentes da membrana plasmática, ocasionando mudanças na estrutura e na composição das mesmas, alterando suas funções de barreira e facilitando a acumulação do composto incluído dentro das células.

Trabalhos anteriores do grupo mostraram que o tempo de incubação de 2h é suficiente para que a HY apresente resultados fotodinâmicos eficientes (BERNAL et al., 2015; GONÇALVES et al., 2017; LIMA et al., 2013). Por esse motivo, e devido ao fato de que em células HeLa 2h de incubação resultam em 2 vezes mais acumulação de HY após inclusão em β -CD, optou-se por utilizar 2h como tempo padrão de incubação para os ensaios de cito e fototoxicidade apresentados nos itens a seguir.

4.12 Aplicação da β -CDHY em TFD *in vitro*

Foram realizados ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade para avaliar o efeito da complexação da HY com a β -CD em células HeLa, MCF7 e Vero. É importante lembrar que a dose de luz (D) se refere à quantidade de energia transmitida durante o intervalo de tempo (t) de irradiação e é proporcional à intensidade de luz (I), conforme a Equação 3 (RESNICK e HALLIDAY, 1979).

$$I = \frac{D}{t}$$

Equação 3

Para irradiação da HY livre e do complexo β -CDHY utilizou-se um LED de 590 $\pm$ 10 nm e uma intensidade luminosa de 8,4 mW cm⁻², com tempos de irradiação de 6, 12 e 20 minutos equivalentes, respectivamente, às doses 3, 6 e 10 J cm⁻². Tais doses já foram empregadas em trabalho anteriores do grupo com HY e apresentaram bons resultados (LIMA, 2013; MA, 2016).

4.12.1 Cito e fototoxicidade da β -CD

Primeiramente, como controle, foram realizados testes citotóxicos em células HeLa, MCF7 e Vero frente à β -CD no escuro e irradiadas nas doses escolhidas, após 2h de incubação e os resultados estão apresentados na Figura 26. As concentrações de β -CD utilizadas foram duas vezes maiores que as concentrações para os testes com HY e β -CDHY, uma vez que a proporção molar do complexo obtido foi de 1:2.

Figura 26 – Viabilidade celular de diferentes linhagens celulares (A) HeLa, (B) MCF7 e (C) Vero na presença de β -CD após 2 h de incubação no escuro e após irradiação em três diferentes doses com LED 590 $\pm$ 10 nm e $I = 8,4$ mW cm⁻¹. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ DP (n = 3)

Fonte: Dados da pesquisa

Pela análise dos dados da Figura 26, verificou-se que a β -CD não exibiu efeito citotóxico nas três linhagens utilizadas, apresentando em todos os casos viabilidade celular maior que 90%. Em realidade, uma das vantagens do uso de CDs como sistemas de liberação de fármacos está relacionada ao fato de apresentarem baixa toxicidade em estudos *in vitro* e *in vivo* (CARNEIRO et al., 2019). Na literatura, não foram encontrados dados referentes à viabilidade celular de linhagens celulares utilizadas neste trabalho na presença de β -CD. Entretanto, Kiss et al. (2010) avaliaram a citotoxicidade de diferentes derivados de β -CD em células de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) e mostraram que os derivados de β -CD utilizados apresentaram IC_{50} maiores que 45 mmol L⁻¹. Segundo Matileinen et al. (2008), β -CD apresenta redução na viabilidade de células de câncer de pulmão (Calu-3) a partir de uma concentração de 5 mmol L⁻¹. Estes valores de IC_{50} encontrados na literatura são na ordem de 10³ vezes maiores que as concentrações de β -CD utilizadas no presente trabalho, visto que a faixa de concentração para aplicação da HY em TFD variou de 0 a 1 μ mol L⁻¹.

No presente estudo, mostramos que, além de não ser citotóxica, a β -CD não é fototóxica nas três doses de luz empregadas. De fato, uma vez que a β -CD intrinsecamente não absorve luz na região visível do espectro, não era esperado que este composto sozinho apresentasse efeitos fototóxicos. Poucos trabalhos reportam testes controle para verificar a viabilidade da β -CD sob efeito de radiação e, portanto, os dados disponíveis variam conforme as características das células estudadas, bem como das ciclodextrinas utilizadas. Kolárova et al. (2003) analisaram a dependência da viabilidade celular de células câncer de pele (G361) em diferentes doses luminosas, na presença de HP- β -CD sem fotossensibilizador e mostraram que a viabilidade se manteve acima de 90% para todas as doses (1 a 150 J cm⁻²).

Dessa maneira, os resultados obtidos para a β -CD nas células HeLa, MCF7 e Vero são relevantes e reforçam a viabilidade em se utilizar este oligassacarídeo como sistema de liberação de fármacos, já que um veículo de entrega ideal deve conduzir as moléculas ao alvo sem provocar efeitos adversos.

4.12.2 Citotoxicidade de HY livre e β -CDHY no escuro

As suspensões celulares (5.10⁴ cel mL⁻¹) foram incubadas por um período de 2h com diferentes concentrações de HY e β -CDHY, para avaliar a viabilidade celular

sem irradiação (escuro) e os resultados obtidos para todas as células em estudo estão apresentados na Figura 27.

Figura 27 – Viabilidade celular no escuro de diferentes linhagens celulares (A) HeLa, (B) MCF7 e (C) Vero na presença de HY e β -CDHY após 2 h de incubação. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ DP (n = 3)

Fonte: Dados da pesquisa

Por meio dos valores de viabilidade mostrados nos gráficos da Figura 27, confirmou-se que, na faixa de concentração utilizada para HY e BCDHY, não houve morte celular significativa das células HeLa, MCF7 e Vero na ausência de radiação, sendo que as viabilidades celulares encontram-se acima de 90% para todos os casos. Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Fotossensibilizadores por Bernal et al. (2015), Gonçalves et al. (2017) e Lima et al. (2013) também mostraram que a HY no escuro não apresentou citotoxicidade para diferentes linhagens celulares. Dessa maneira, sugere-se que os efeitos de morte celular apresentados nos próximos itens

serão provenientes exclusivamente da interação da luz com os FSs na presença de oxigênio intracelular.

4.12.3 Efeito da dose luminosa na fototoxicidade da HY e β -CDHY em células HeLa, MCF7 e Vero

Os ensaios citotóxicos na presença de luz foram conduzidos após 2h de incubação, aplicando-se três diferentes doses luminosas assim como foi feito para os ensaios com β -CD livre: 3, 6 e 10 J cm⁻². As curvas de viabilidade celular utilizadas para determinação das concentrações inibitórias médias (IC₅₀) estão apresentadas na Figura 28.

Figura 28 – Curvas de viabilidade celular para (A) HeLa tratada com HY, (B) HeLa tratada com β -CDHY, (C) MCF7 tratada com HY, (D) MCF7 tratada com β -CDHY, (E) Vero tratada com HY e (F) Vero tratada com β -CDHY após irradiação em três diferentes doses luminosas. Os resultados apresentados são a média $\pm$ DP

Fonte: Dados da pesquisa

Após a irradiação com luz e reação com MTT para determinar a viabilidade celular, os valores de IC_{50} foram determinados e estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – IC_{50} de HY e β -CDHY em diferentes linhagens celulares, após 2 h de incubação e irradiação com LED 590 ± 10 nm, $I=8,4$ mW cm^{-1} em diferentes doses de luz. Os valores estão apresentados como média $\pm$ DP ($n = 3$)

IC_{50} (nmol L^{-1})									
Linhagens celulares	HeLa			MCF7			Vero		
Doses de luz ($J\ cm^{-2}$)	3	6	10	3	6	10	3	6	10
HY	132 $\pm$ 13	74 $\pm$ 6	60 $\pm$ 6	483 $\pm$ 31	221 $\pm$ 45	254 $\pm$ 12	255 $\pm$ 41	147 $\pm$ 15	106 $\pm$ 12
β -CDHY	95 $\pm$ 2 (*)	41 $\pm$ 6 (**)	35 $\pm$ 3 (**)	384 $\pm$ 37 (**)	159 $\pm$ 29 (ns)	246 $\pm$ 35 (ns)	282 $\pm$ 41 (ns)	153 $\pm$ 16 (ns)	112 $\pm$ 21 (ns)

(*) indica diferença significativa entre HY e β -CDHY com $p < 0,05$

(**) indica diferença significativa entre HY e β -CDHY com $p < 0,01$

(ns) dados sem significância estatística entre HY e β -CDHY com $p > 0,05$

Fonte: Dados da pesquisa

Analisando os dados da Tabela 9 nota-se que, para as células HeLa, os valores de IC_{50} da β -CDHY apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos valores de IC_{50} da HY livre, confirmadas pela variação de 28, 45 e 42% nas doses 3, 6 e 10 $J\ cm^{-2}$, respectivamente. Isto implica em dizer que, nas condições propostas, a β -CDHY apresentou maior fototoxicidade, justificada pela sua maior solubilidade em comparação com a HY livre, que contribuiu para uma melhor dispersão e liberação deste FS em meio fisiológico e, conseqüentemente, para uma maior acumulação intracelular, como apresentado anteriormente nos itens 5.1, 5.9 e 5.11.

Para células MCF7, observou-se uma redução em torno de 20% do IC_{50} da β -CDHY em comparação com o IC_{50} da HY nas doses 3 e 6 $J\ cm^{-2}$. Entretanto, os testes estatísticos realizados indicaram que apenas os valores de IC_{50} de HY e β -CDHY na dose 3 $J\ cm^{-2}$ foram estatisticamente diferentes, com $p < 0,05$. Os valores de IC_{50} na dose 10 $J\ cm^{-2}$ para HY livre e complexada também não foram diferentes. O fato de os valores não serem estatisticamente diferentes provavelmente está associado à semelhança nos valores de acumulação intracelular da HY livre e complexada, como mostrado na Figura 25.

Para a linhagem de células não tumorais (Vero), os valores de IC_{50} não diferiram para HY livre e complexada em nenhuma das 3 doses utilizadas. Além disso, observa-se que os valores de IC_{50} para as células Vero são maiores que os valores em HeLa para todas as doses, o que indica seletividade da TFD por células tumorais. No entanto, a mesma seletividade não pode ser observada ao comparar os resultados das células Vero e MCF7. Isso pode ser justificado pois as células MCF7 tendem a ser mais resistentes do que outras células ao tratamento por TFD, uma vez que é passível da ação de mecanismos antioxidantes de defesa, por meio da ação de algumas enzimas. Nesse contexto, Kimáková et al. (2016) mostraram que a geração de EROs em células MCF7 diminuiu com o tempo após tratamento fotodinâmico com HY, que foi relacionado com o aumento da atividade da enzima superóxido dismutase, a qual está associada a mecanismos de resistência e redução da fototoxicidade das células após a TFD. Theodossiou et al. (2017) estudaram o impacto da glutathione no mecanismo de defesa contra as EROs associado à resiliência de células MCF7 após TFD com HY. Neste contexto, os pesquisadores verificaram que nas células MCF7 há expressão da proteína de membrana antioxidante glutathione peroxidase 4 (GPX-4) que age na destruição das EROs induzidas pela TFD. Além disso, sugerem que a HY pode ser um substrato que favorece a conjugação da GPX-4 com outras enzimas da família das glutathionas que dificultam a acumulação desse FS na célula, diminuindo, portanto, sua sensibilidade na TFD.

Em relação aos efeitos da inclusão com CDs no desempenho da TFD, alguns trabalhos da literatura reportam aumento da fototoxicidade de certos FSs quando complexados com CDs. Lu et al. (2016) avaliaram o efeito da complexação de diferentes CDs (α , β e γ) com a ftalocianina de zinco, tendo observado que, após irradiação, a inclusão ocasionou um aumento da fototoxicidade da ftalocianina em células HeLa. Em especial, o complexo formado com β -CD foi mais fototóxico do que com as demais CDs. Yankovsky et al. (2016) observaram que o uso de derivados de β -CD combinados com mTHPC diminuiu a LD_{50} , dose de luz necessária para matar 50% das células testadas (adenocarcinoma colorretal, HT-29). O trabalho de Plenalg et al. (2019) apresenta os efeitos da complexação de HY com HP- β -CD encapsulada em lipossomas na aplicação em TFD. Neste trabalho, foi observado que o IC_{50} do complexo HY-HP β CD em células de câncer de ovário (SK-OV-3) foi menor que os valores de IC_{50} após a encapsulação com lipossomas para quatro diferentes doses luminosas avaliadas: 2,1; 4,1; 8,3 e 12,4 J cm⁻², indicando que o complexo sem

encapsulação é mais suscetível aos processos fotodinâmicos, uma vez que os lipossomas apresentaram um efeito fotoprotetor para a molécula fotossensibilizadora.

Visando a melhoria da performance fotodinâmica da HY, Lima et al. (2013) realizaram a encapsulação de HY em nanopartículas lipídicas sólidas, obtendo com o FS encapsulado uma redução de 25 e 30% nos valores de IC_{50} em células HEp-2 e B16-F10, respectivamente, utilizando dose de luz 6 J cm^{-2} . Percebe-se, portanto, que os percentuais de redução dos valores IC_{50} apresentados no presente trabalho se assemelham ao trabalho anterior desenvolvido no nosso grupo de pesquisa.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho observou-se a formação do complexo de inclusão supramolecular de HY com β -CD por meio da metodologia proposta. As imagens de MEV não indicaram diferenças na morfologia do complexo formado em comparação com a dos precursores; no entanto, as medidas do raio hidrodinâmico das partículas formadas obtidas por DLS indicaram redução de tamanho em relação a HY livre. A inclusão da HY nas cavidades da β -CD aumentou a solubilidade deste FS em meio aquoso.

O processo de complexação não alterou a estabilidade química, nem tampouco as propriedades fotoquímicas da HY. Assim sendo, a fotoestabilidade, rendimento quântico de fluorescência e de oxigênio singlete se mantiveram constantes após a formação da espécie β -CDHY.

Verificou-se que a liberação *in vitro* da β -CDHY em meio fisiológico foi mais rápida em comparação com a HY livre e isto indica que o aumento de solubilidade é vantajoso para o processo de liberação controlada. No que se refere à permeação cutânea *in vitro*, verificou-se que esta propriedade para β -CDHY foi menor do que a HY livre, porém a penetração do complexo nas camadas da pele foi maior, sugerindo que o complexo pode ser mais promissor que a HY livre para uso em formulações tópicas.

A acumulação intracelular, após 2h de incubação, se mostrou aproximadamente duas vezes maior para a β -CDHY em células HeLa e estes resultados foram consoantes com os valores de IC_{50} obtidos para esta linhagem celular, para a qual a β -CDHY mostrou-se mais fototóxica quando comparada com a HY livre para todas as doses. A acumulação em células Vero e MCF7 não foram estatisticamente diferentes, porém para esta última observou-se uma redução de IC_{50} em torno de 20% para as doses 3 e 6 J cm⁻².

Levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho é possível inferir que a inclusão de HY nas cavidades da β -CD é uma boa alternativa para melhorar a solubilidade deste FS, que conseqüentemente melhora a dispersão em meio fisiológico e contribui para o aumento da acumulação intracelular de FS, diminuindo as concentrações necessárias para obter o efeito fototóxico em algumas linhagens celulares, sem entretanto, alterar as propriedades fotoquímicas da HY. Deste modo, o complexo sintetizado (β -CDHY) pode ser utilizado para aplicação em Terapia Fotodinâmica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **The Biochemical Journal**, London, v. 473, p. 347-364, 2016.

AGOSTINIS, P.; VANTIEGHEM, A.; MERLEVEDE, W.; WITTE, P. A. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 34, p. 221-41, 2002.

AMARAL, L. S.; PERUSSI, J. R. Effectiveness of hypericin in decreasing the population of *Propionibacterium acnes*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 355, 2015.

ARIGA, K.; KUNITAKE, T. **Supramolecular chemistry: fundamentals and applications**. Heidelberg: Springer, 2014. 214 p.

AZZY, J.; DANJOU, P.-E.; LANDY, D.; RUELLAN, S.; AUEZOVA, L.; GREIGES-GERGES, H.; FOURMENTIN, S. The effect of cyclodextrin on the solubility and photostability of nerolidol as pure compound and as main constituent of cabreuva essential oil. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 13, p. 835-844, 2017.

BARATA, J. F. B.; ZAMARRON, A.; NEVES, M. G. P. M. S.; FAUSTINO, M. A. F.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; RÖDER, B.; JUARRANZ, A.; SÁNZ-RODRIGUEZ, F. Photodynamic effects induced by meso-tris(pentafluorophenyl)corrole and its cyclodextrin conjugates on cytoskeletal components of HeLa cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 92, p. 135-144, 2015.

BENTZEN, S. M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 6, n. 9, p. 702–713, 2006.

BERNAL, C. **Hipericina, photodithazine e photogem: um estudo comparativo da atividade fotodinâmica**. 2011. 157f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

BERNAL, C.; RIBEIRO, A. O.; ANDRADE, G. P.; PERUSSI, J. R. Photodynamic efficiency of hypericin compared with chlorin and hematoporphyrin derivatives in HEp-2 and Vero epithelial cell lines. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 176-185, 2015.

BERNAL, C.; RODRIGUES, J. A. O.; GUIMARÃES, A. P. P.; RIBEIRO, A. O.; OLIVEIRA, K. T.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Selective photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin. **Laser Physics**, Bristol, v. 21, n. 1, p. 245–249, 2011.

BOIY, A.; ROELANDTS, R.; DE WITTE, P. A. M. Photodynamic therapy using topically applied hypericin: comparative effect with methyl-aminolevulinic acid on UV

induced skin tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 123–131, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

BREGNHØJ, M.; DICHMANN, L.; MCLOUGHLIN, C. K.; WESTBERG, M.; OGILBY, P. R. Uric Acid: a less-than-perfect probe for singlet oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, Hoboken, v. 95, p. 202-210, 2019.

BRESLOW, R., DONG, S. D. Biomimetic reactions catalyzed by cyclodextrins and their derivatives. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, n. 5, p. 1997-2011, 1998.

BROCKMANN, H.; HASCHAD, M. N.; MAIER, K.; POHL, F. Über das hypericin, den photodynamisch wirksamen farbstoff aus hypericum perforatum. **Naturwissenschaften**, Heidelberg, v. 27, p. 550, 1939.

CALLAGHAN, S.; SENGE, M. O. The good, the bad, and the ugly – controlling singlet oxygen through design of photosensitizers and delivery systems for photodynamic therapy. **Photochemical and Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 17, p. 1490-1514, 2018.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 47, p. 936-942, 1987.

CARNEIRO, S. B.; DUARTE, F. I. C.; HEIMFARTH, L.; QUINTANS, J. S. S.; QUITANS-JUNIOR, L. J.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, A. A. N. Cyclodextrin-drug inclusion complexes: in vivo and in vitro approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 642, n. 20, p. 1-23, 2019.

CHU, H. M.; ZHANG, R. X.; HUANG, Q.; BAI, C. C.; WANG, Z. Z. Chemical conjugation with cyclodextrins as a versatile tool for drug delivery. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 89, n. 1–2, p. 29–38, 2017.

CRAIG, R. A.; MCCOY, C. P.; GORMAN, S. P.; JONES, D. S. Photosensitizers - the progression from photodynamic therapy to anti-infective surfaces. **Expert Opinion on Drug Delivery**, Oxfordshire, v. 12, p. 85-101, 2015.

CRUZ, P. M. R.; MO, H.; MCCONATHY, W. J.; SABNIS, N.; LACKO, A. G. The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 4, p. 119, 2013.

D'SOUZA, S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. **Advances in Pharmaceutics**, New York, p. 1-12, 2014.

DĄBROWSKI, J. M.; ARNAUT, L. G. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. **Photochemical and Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 14, n. 10, p. 1765–1780, 2015.

DABROWSKI, J. M. Reactive oxygen species in photodynamic therapy: mechanisms of their generation and penetration. **Advances in Inorganic Chemistry**, Maryland Heights v. 70, p. 343-394, 2017.

DAI, T.; FUCHS, B. B.; COLEMAN, J. J.; PRATTES, R. A.; ASTRAKAS, C.; DENIS, T. G. S.; RIBEIRO, M. E.; HAMBLIN, M. R.; TEGOS, G. P. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiol**y, Lausanne, v. 3, p. 1-16, 2012.

DANDAWATE, P.; VYAS, A.; AHMAD, A.; BANERJEE, S.; DESHPANDE, J.; SWAMY, K.V.; JAMADAR, A.; DUMHE-KLAIRE, A.C.; PADHYE, S.; SARKAR, F. inclusion complex of novel curcumin analogue cdf and β -cyclodextrin (1:2) and its enhanced in vivo anticancer activity against pancreatic cancer. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 29, p. 1775-1786, 2012.

DAX, T. G.; FALK, H.; KAPINUS, E. I. A structural proof for the hypericin 1,6-dioxo Tautomer. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, Wien, v. 130, p. 827-831, 1999.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DE OLIVEIRA, K. T.; SOUZA, J. M.; GOBO, N. R. S.; ASSIS, F. F.; BROCKSOM, T. J. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 310–335, 2015.

DE PAULA, D.; MARTINS, C. A.; BENTLEY, M. V. L. B. Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. **Biomedical Chromatography**, Oxford, v. 22, p. 1416-1423, 2008.

DOBSON, J.; DE QUEIROZ, G. F.; GOLDING, J. P. Photodynamic therapy and diagnosis: principles and comparative aspects. **Veterinary Journal**, London, v. 233, p. 8-18, 2018.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews. Cancer**, London, v. 3, n. 5, p. 380–387, 2003.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; KADAMBI, A.; HILL, J. S.; WATERS, C. A.; ROBINSON, B. C.; WALKER, J. P.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after

photodynamic therapy. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 62, n. 7, p. 2151–2156, 2002.

D'SOUZA, S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. **Advances in Pharmaceutics**, New York, p. 1-12, 2014.

ELSAIE, M.L.T. **Photodynamic therapy: new research**. New York: Nova Biomedical, 2013. p. 172.

FAHEY, J. M.; GIROTTI, A. W. Accelerated migration and invasion of prostate cancer cells after a photodynamic therapy-like challenge: role of nitric oxide. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, Maryland Heights, v. 49, n. 2, p. 47–55, 2015.

FALK, H.; MEYER, J.; OBERREITER, M. A convenient semisynthetic route to hypericin. **Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly**, Wien, v. 124, p. 339-341, 1993.

FERY-FORGUES, S.; LAVABRE, D. Are fluorescence quantum yields so trick to measure? A demonstration using familiar stationery products. **Journal of Chemical Education**, Washington, v. 76, n.9, p.1260-1264, 1999.

FISCHER, F.; GRASCHEW, G.; SINN, H. J.; MAIER-BORST, W.; LORENZ, W. J.; SCHLAG, P. M. A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 274, p.89-104, 1998.

FRÖMMING, K.-H.; SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in pharmacy**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993.

FUJII, M.; USUI, M.; HAYASHI, S. Chemical reaction mediated by excited states of Si nanocrystals – singlet oxygen formation in solution. **Journal of Applied Physics**, Melville, v. 95, p. 3689-3693, 2004.

GANGEMI, C. M. A.; PUGLISI, R.; PAPPALARDO, A.; SFRAZZETTO, G.T. Supramolecular complexes for nanomedicine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 28, n. 20, p. 3290–3301, 2018.

GARCÍA, I., BALLESTA, S., GILABERTE, Y., REZUSTA, A.; PASCUAL, Á. Antimicrobial photodynamic activity of hypericin against methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Future Microbiology**, London, v. 10, n. 3, p. 347-356, 2015.

GONÇALVES, J. **Caracterização físico-química e fotodinâmica de fotossensibilizadores: efeito da modificação química para aumentar a solubilidade em meio aquoso**. 2004. 132 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

GONÇALVES, J. L. S.; BERNAL, C.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Hypericin cytotoxicity in tumor and non-tumor cell lines: a chemometric study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 20, p. 86–90, 2017.

- GRANDI, V.; SESSA, M.; PISANO, L.; ROSSI, R.; GALVAN, A.; GATTAI, R.; MORI, M.; TIRADRITTI, L.; BACCI, S.; ZUCCATI, G.; CAPPUGI, P.; PIMPINELI, N. Photodynamic therapy with topical photosensitizers in mucosal and semimucosal areas: review from a dermatologic perspective. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 23, p. 119–131, 2018.
- GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M. A.; ALVES, R. S.; MENEZES, P. P.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S.; BEZERRA, D. P.; QUINTANS JUNIOR, L. J. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of orégano, with β -Cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, Shannon, v. 227, p.66-76, 2015.
- HAGBANI, T. A.; NAZZAL, S. Curcumin complexation with cyclodextrins by the autoclave process: Method development and characterization of complex formation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.520, p.173-180, 2017.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Cambridge, v. 144, n.5, p. 646-674, 2011.
- HANAKOVA, A.; BOGDANOVA, L.; TAMAJOVA, K.; PIZOVA, K.; MALOHLAVA, J.; BINDER, S.; BAJGAR, R.; LANGOVA, K.; KOLAR, M.; MOSINGER, J.; KOLAROVA, H. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. **Microbiological Research**, Muenchen, v. 169, n. 2–3, p. 163–170, 2014.
- HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 36, p.125-141, 1999.
- HOWARD, J. A.; MENDENHALL, G. D. Autooxidation and photooxidation of 1,3-diphenylisobenzofuran – kinetic and product study. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 53, n. 14, 1975. p. 2199-2201.
- HUYGENS, A.; KAMUHABWA, A. R.; WITTE, P. A. M. Stability of different formulations and ion pairs of hypericin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 59, p.461-468, 2005.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **ABC do Câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. 4. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2018(a).
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Tratamento do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>. Acesso em: 18 de jul. 2018(b).

IQBAL, Z.; OGUNSIPE, A.; NYOKONG, T.; LYUBIMTSEV, A.; HANACK, M.; ZIEGLER, T. Photophysics and photochemistry of octaglucoylated zinc phthalocyanine derivatives. **Journal of Porphyrins and Phtalocyanines**, Singapore, v. 16, p. 413-422, 2012.

ITAGAKI, H. Fluorescence spectroscopy. *In*: EXPERIMENTAL methods in polymer science. Cambridge: Academic Press, 2000. p. 156.

JANSOOK, P.; OGAWA, N.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 532, p. 272-284, 2018.

JARHO, P.; JARVINEN, K.; URTTI, A.; STELLA, V. J.; JARVINEN, T. Modified β -Cyclodextrin (SBE7- β -CyD) with viscous vehicle improves the ocular delivery and tolerability of polycarpine prodrug in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, v. 48, p. 246-270, 1996.

JENDŽELOVSKÁ, Z.; JENDZELOVSKY, R.; KUCHÁROVÁ, B.; FEDOROCKO, P. Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 1–20, 2016.

JOHNSON, G.A.; MUTHUKRISHNAN, N.; PELLOIS, Jean-Philippe. Photoinactivation of gram positive and gram negative bacteria with the antimicrobial peptide (klakla)₂ conjugated to the hydrophilic photosensitizer eosin Y. **Bioconjugate Chemistry**. Washington, v.24, p.114-123, 2013.

JORI, G.; TROTTA, M. **Singlet oxygen**. Cambridge: RSC, v. 2, 2016. 445 p.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Alternative Medicine Review**, Napa, v. 14, n. 2, p. 141–154, 2009.

KAPINUS, E. L.; FALK, H.; TRAN, H. T. N. Spectroscopic investigation of the molecular structure of hypericin and its salts. **Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly**, Wien, v. 130, p. 623-635, 1999.

KARIOTI, A.; BILIA, A.R. Hypericin as potential leads for new therapeutics, **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 11, p. 562-594, 2010.

KASHEF, N.; BORGHEI, Y. S.; DJAVID, G. E. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v.10, p. 150–155, 2013.

KIMÁKOVÁ, P. SOLÁR, P.; FECKOVÁ, B.; SACKOVÁ, V.; SOLÁROVÁ, Z.; ILKOVICOVÁ, L.; KELLO, M. Photoactivated hypericin increases the expression of SOD-2 and makes MCF-7 cells resistant to photodynamic therapy. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 85, p. 749-755, 2017.

KISS, T.; FENYVESI, F.; BÁCSKAY, I.; VÁRADI, J.; FENYVESI, É.; IVÁNYI, R.; SZENTE, L.; TÓSAKI, Á.; VECSENYÉS, M. Evaluation of the cytotoxicity of β -

cyclodextrin derivatives: evidence for the role of cholesterol extraction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 40, p. 376-380, 2010.

KOCKI, T.; CZARCZYNSKA-GOSLINSKA, B.; KOCKA, K.; STOLARSKA, M.; WACHOWSKA, D.; LIJEWSKI, S. Nurses and pharmacists in interdisciplinary team of health care providers in photodynamic therapy. *In*: Tanaka, Y., ed. **Photomedicine: advances in clinical practice**. London: InTechOpen, 2017. p. 113-133.

KOLÁROVÁ, H.; MOSINGER, J.; LENOBEL, R.; KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; STRNAD, M. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 17, p. 775-778, 2003.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 86, p. 694-707, 2007.

KRYJEWSKI, M.; GOSLINSKI, T.; MIELCAREK, J. Functionality stored in the structures of cyclodextrins-porphyrinoid systems. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 300, p. 101-120, 2015.

KWIATKOWSKI, S.; KNAP, B.; PRZYTUPSKI, D.; SACZKO, J.; KEDZIERSKA, E.; KNAP-CZOP, K.; KOTLINSKA, J.; MICHEL, O.; KOTOWSKI, K.; KULLBACKA, J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 106, p. 1098-1107, 2018.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Maryland: Springer, 2006. 954 p.

LAZA-KNOERR, A. L.; GREF, R.; COUVREUR, P. Cyclodextrins for drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, Oxfordshire, v. 18, n. 9, p. 645–656, 2010.

LERNER, S. P.; SCHOENBERG, M. P.; STERNBERG, C.N. **Textbook of bladder cancer**. Abingdon: Taylor & Francis Group, 2006. p. 377-378.

LIMA, A. M.; PIZZOL, C. D.; MONTEIRO, F. B. F.; CRECZYNSKY-PASA, T. B.; ANDRADE, G. P.; RIBEIRO, A. O.; PERUSSI, J. R. Hypericin encapsuled in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 125, p. 146-154, 2013.

LINARES, I. A. P.; OLIVEIRA, K. T.; PERUSSI, J. R. Chlorin derivatives sterically-prevented from self-aggregation with high activity for photodynamic therapy. **Dyes and Pigments**, Oxford, v. 145, 2017. p. 518-527.

LOFTSSON, T.; BREWTER, M. R. Pharmaceutical application of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Science**, New York, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 225, p.15-30, 2001.

LOPEZ, R. F. V.; COLLETT, J. H.; BENTLEY, M. V. L. B. Influence of cyclodextrin complexation on the in vitro permeation and skin metabolism of dexamethasone. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 200, p.127-132, 2000.

LU, S.; WANG, A.; MA, Y. J.; XUAN, H. ; ZHAO, B.; LI, X .D.; ZHOU, J. H.; ZHOU, L.; WEI, S. H. Cyclodextrin type dependent host-guest interaction mode with phthalocyanine and their influence on photodynamic activity to cancer. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 148, p. 236-242, 2016.

MA, H. L. **Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da hipericina e da curcumina em células tumorais**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

MACEDO, P. D.; CORBI, S. T.; KITAGAWA, J. F. A.; PERUSSI, J. R.; RIBEIRO, A. O.; MARCANTONIO, R. A. C. Evaluation of the effects of photodynamic therapy with hypericin-glucamine in the treatment of periodontal disease induced in rats. **Lasers in Dental Science**, Heidelberg, v. 2, p. 255-263, 2018.

MACEDO, P. D.; CORBI, S. T.; DE OLIVEIRA G. J. P. L.; PERUSSI, J. R.; RIBEIRO, A. O.; MARCANTONIO R. A. C. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 25, 43-49, 2019.

MANGOLIM, C. S.; MORIWAKI, C.; NOGUEIRA, A. C.; SATO, F.; BAESSO, M. L.; MEDINA NETO, A.; MATIOLI, G. Curcumin-B-cyclodextrin inclusion complex: stability, solubility, characterization by FT-IR, FT-Raman, X-Ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 153, p. 361-370, 2014.

MARIA, D. N.; MISHRA, S. R.; WANG, L.; ABD-ELGAWAD, A. H.; SOLIMAN, O. A.; EL-DAHAN, M. S.; JABLONSKI, M. M. Water-soluble complex of curcumin with cyclodextrins: enhanced physical properties for ocular drug delivery. **Current Drug Delivery**, Sharjah, v. 14, n. 6, 2016.

MASIERA, N.; BOJARSKA, A.; GAWRYSZEWSKA, I.; SADOWY, E.; HRYNIEWICZ, W.; WALUK, J. Antimicrobial photodynamic therapy by means of porphycene photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, Amsterdam, v. 174, p. 84-89, 2017.

MÁSSON, M.; LOFTSSON, T.; MÁSSON, G.; STEFÁNSSON, E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluation and in vitro testing. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 59, 1999. p. 107-118.

- MATILAINEN, L.; TOROPEINEN, T.; VIHOLA, H.; HIRVONEN, J.; JÄRVINEN, T.; JARHO, P.; JÄRVINEN, K. In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 126, p. 10-16, 2008.
- MATTIA, E.; OTTO, S. Supramolecular systems chemistry. **Nature nanotechnology**, London, v. 10, n. 2, p. 111-9, 2015.
- MOHAN, P. R. K.; SREELAKSHMI, G.; MURALEEDHARAN, C. V.; JOSEPH, R. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: characterization by FT-Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 62, p. 77-84, 2012.
- MONTANHA, M. C.; SILVA, L. L.; PANGONI, F. B. B.; CÉSAR, G. B.; GONÇALVES, R. S.; CAETANO, W.; HIOKA, N.; TOMINAGA, T. T.; CONSOLARO, M. E. L.; DINIZ, A.; KIMURA, E. Response surface method optimization of a novel Hypericin formulation in P123 micelles for colorectal cancer and antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 170, p. 247-255, 2017.
- MOSINGER, J.; KLIMENT JUNIOR, V.; SEJBAL, J.; KUBÁT, P.; LANG, K. Host-guest complexes of anionic porphyrin sensitizers with cyclodextrins. **Journal of Porphyrins and Phtalocyanines**, Singapore, v. 6, p. 514-526, 2002.
- NAFEE, N.; YOUSSEF, A.; EL-GOWELLI, H.; ASEM, H.; KANDIL, S. Antibiotic-free nanotherapeutics: hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and *in vivo* antimicrobial photodynamic therapy and wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 454, p. 249-258, 2013.
- NUÑEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. **PDT – Terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 6-8.
- OGUNSIPE, A.; ALETAN, U. Solubilization of hydrophobic zinc phtalocyanine derivatives – spectral and photophycochemical consequences. **International Journal of Chemical Science**, Udaipur, v. 13, p. 1835-1843, 2015.
- OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, v. 6, p. 70-83, 2009.
- ONISZCZUK, A.; WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, T.; KASPRAZAK, K. The potential of photodynamic therapy (PDT) – Experimental investigations and clinical use. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 83, p. 912-929, 2016.
- OU, Z. Z.; CHEN, J.; WANG, X.; ZHANG, B.; CAO, Y. Synthesis and photodynamic therapy properties of a water-soluble hypocrellin modified by cyclodextrin. **Chemistry Letters**, Tokyo, v. 26, p. 838-839, 2001.
- O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic

therapy. **Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 85, n. 5, p. 1053–1074, 2009.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 913–922, 2011.

PATRICE, T. **Photodynamic therapy**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003. p. 22-23. (Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology, 2).

PENJWEINI, R.; DEVILLE, S.; D'OLIESLEAGER, L.; BERDEN, M.; AMELOOT, M.; ETHIRAJAN, A. Intracellular localization and dynamics of hypericin loaded PLLA nanocarriers by image correlation spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 2018, p. 82-93, 2015.

PIPERAKI, S., PARISSI-POULOU, M. Use of cyclodextrins as chiral selectors for direct resolution of the enantiomers of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine by HPLC. **Chirality**, Hoboken, v. 5, p. 258–266, 2010.

PLENAGL, N.; DUSE, L.; SEITZ, B.S.; GEORGEN, N.; PINNAPIREDDY, S. R.; JEDELSKA, J.; BRÜBLER, J.; BAKOWSKY, U. Photodynamic therapy – hypericin tetraether liposome conjugates and their antitumor and antiangiogenic activity. **Drug Delivery**, Oxfordshire, v. 26, n. 01, p.23-33, 2019.

PONNU, A.; ANSLYN, E. V. A fluorescence-based cyclodextrin sensor to detect nitroaromatic explosives. **Supramolecular Chemistry**, Oxford, v. 22, p. 55-71, 2010.

POPAT, A.; KARMAKER, S.; JAMBHRUNKAR, S.; XU, C.; YU, C. Curcumin-cyclodextrin encapsulated chitosan nanoconjugates with enhanced solubility and cell cytotoxicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 117, p. 520-527, 2014.

POPOVIC, A.; WIGGINS, T.; DAVIDS, L. M. Differential susceptibility of primary cultured human skin cells to hypericin PDT in an in vitro model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 149, p. 249–256, 2015.

RAAB, O. Über die Wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. **Zeitschrift für Biologie**, Berlin, v. 39, p. 24–46, 1900.

RABELLO, B.R.; GEROLA, A.P.; PELLOSI, D.S.; TESSARO, A.L.; APARÍCIO, J.L.; CAETANO, W.; HIOKA, N. Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: systematic evaluation. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Amsterdam, v. 238, p. 53-62, 2012.

REGINATO, E.; WOLF, P; HAMBLIN, M. R. Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. **World Journal of Immunology**, Pleasanton, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2014.

RESNICK, R.; HALLYDAY, D. **Física**. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1979. 396 p.

REUBNER, A.; YANG, Z.; LEUNG, D.; BRESLOW, R. A cyclodextrin with autocleavable linker as a possible carrier for the photosensitizer in photodynamic tumor therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 26, p. 14692-14693, 1999.

RUELA, A. L. M.; PERISSINATO, A. G.; LINO, M. E. S.; MUDRIK, P. S.; PEREIRA, G. R. Evaluation of skin absorption of drugs from tropical and transdermal formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 52, n. 3, p. 527-344, 2016.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Curcumin-mediated photodynamic therapy for the treatment of oral infections: a review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 21, p. 409–415, 2018.

SATTLER, S.; SCHAEFER, U.; SCHENIDER, W.; HOELZL, J. LEHR, C. M. Binding, uptake and transport of Hypericin by Caco-2 Cell monolayers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 86, n. 10, p. 1120-1126, 1997.

SAW, C. L.; OLIVIO, M. CHIN, W. W.; SOO, K. C.; HENG, P. W. Transport of hypericin across chick chorioallantoic membrane and photodynamic therapy vasculature assessment. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 6, p. 1054–60, 2005.

SHAKORY, R.; KHODABANDEH, M.; TOLIYAT, T.; AZIMZADEH, S.; SADIGH, Z.-A.; BADIEFAR, L. Enhancing effects of cyclodextrins on in vitro skin permeation of hGH. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, Guntur, v. 4, p. 784-790, 2010.

SHITYAKOV, S.; SALMAS, R. E.; DURDAGI, S.; ROEWER, N.; FORSTER, C.; BROSCHEIT, J. Solubility profiles, hydration and desolvation of curcumin complexed with γ -cyclodextrin and hydroxypropyl- γ -cyclodextrin. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 1134, p. 91–98, 2017.

SILVA, A. R. A.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C. Photophysical and complexation studies of chloro-aluminum phthalocyanine with beta-cyclodextrin and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Valencia, v. 11, p. 4046-4055, 2011.

SISKOS, M. G.; CHOUDHARY, M. I.; GEROTHANASSIS, I. P. Hydrogen atomic positions of O-H...O Hydrogen bonds in solution and in the solid state: the synergy of quantum chemical calculations with ^1H -NMR chemical shifts and X-ray diffraction methods, **Molecules**, Basel, v. 22, p. 1-32, 2017.

SMITH, A. M.; MANCINI, M. C.; NIE, S. Bioimaging: second window for in vivo imaging. **Nature Nanotechnology**, London, v. 4, p. 710, 2009.

SOUZA, L. M.; INADA, N. M.; VENTURINI, F. P.; CARMONA-VARGAS, C. C.; PRATAVIEIRA, S.; OLIVEIRA, K. T.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Photolavricidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Taiwan, v.22, p. 151-158, 2019.

SPRING, B. Q.; RIZVI, I.; XU, N.; HASAN, T. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance, **Photochemical and Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 14, p. 1476-1491, 2015.

STEWART, B. W., WILD, C. P. **World Cancer Report 2014** - WHO - OMS -. Lyon: IARC Nonserial Publication, 2014. p. 630.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrins derivatives: an insight. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 88, p. 1122-1144, 2017.

TANG, B.; WANG, H.-Y.; ZHANG, G.-Y. Study on the supramolecular Interaction of Curcumin and β -cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 6, p. 1355-1361, 2002.

TATSIS, E. C.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; GEROTHANASSIS, I. P. ^1H NMR determination of hypericin and pseudohypericin in complex natural mixtures by the use of strongly deshielded OH groups, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 607, p. 219-226, 2008.

TAU, P.; OGUNSIPE, A. O.; MAREE, S.; MAREE, M. D.; NYOKONG, T. Influence of cyclodextrins on the fluorescence, photostability and singlet oxygen quantum yields of zinc phthalocyanine and naphthalocyanine complexes. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, Singapore, v. 7, p. 439-446, 2003.

THEODOSSIS, A. T.; OLSEN, C.E.; JONSSON, M.; KUNBIN, A.; HOTHERSALL, J.S.; BERG, K. The diverse roles of glutathione-associated cell resistance against hypericin photodynamic therapy. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 12, p. 191-197, 2017.

TØNNESEN, H.H.; MÁSSON, M. LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 5, p. 127-135, 2002.

URAMOTO, H.; TANAKA, F. Recurrence after surgery in patients with NSCLC. **Translational Lung Cancer Research**, Hong Kong, v. 3, p. 42-49, 2014.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Estado da Arte de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1278-1287, 2009.

VOGEL, H. A; PELLETIER, J. Curcumin-biological and medicinal properties. **Journal of Pharmacology**, Gujarat, v. 2, 1815. p. 50.

VON TAPPEINER, H.; JESIONEK, A. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden Stoffen. **Muenchener Medizinische Wochenschrift**, Munich, v. 47, p. 2042–2044, 1903.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World cancer report 2014**. Genebra: WHO Press, 2015. 632 p.

YADAV, V. R; SURESH, S.; DEVI, K.; YADAV, S. Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and anti-inflammatory activity in rat colitis model. **Journal of PharmaSciTech**, West Bengal, v. 10, n. 3, p. 752-762, 2009.

YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 113–125, 2010.

YANKOVSKY, I.; BASTIEN, E.; YAKAVETS, I.; KHLUDEYEV, I.; LASSALLE, Henry-Pierre; GRAFE, S.; BEZDETNAYA, L.; ZORIN, V. Inclusion complexation with - Cyclodextrin derivatives alters photodynamic activity and biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 91, p. 172-182, 2016.

ZAMBITO, Y.; PEDRESCHI, E.; DE COLO, G. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticle systems? - A case study. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 434, p.28-34, 2012.

ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; Delie F. Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 326, n. 1–2, p. 174–181, 2006.

ZHANG, J.; TANG, G.; XU, X.; LI, N. Development and evaluation of a novel phytosome-loaded chitosan microsphere system for curcumin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 448, p. 168-174, 2013.(a)

ZHANG, J.; JIANG, C.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; ZHANG, H.; MUEHLMANN, L. A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Beijing, v. 8, n. 2, p. 137–146, 2018.

ZHANG, W.; GONG, X.; CAI, Y.; ZHANG, C.; YU, X.; FAN, J.; DIAO, G. Investigation of water-soluble inclusion complex of hypericin with β -cyclodextrin polymer. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 95, p. 366-370, 2013.(b)

ZHANG, W. GONG, X.; LIU, C.; PIAO, Y.; SUN, Y.; DIAO, G. Water-soluble inclusion complex of fullerene with γ -cyclodextrin polymer for photodynamic therapy, **Journal of Materials Chemistry B**, London, v. 2, p. 5107-5115, 2014.

ZHENG-YU, J. **Cyclodextrin chemistry**: preparation and application. Singapura: World Scientific Publishing 2013. 290 p.

ANEXOS

Figura A 1 - Espectro de RMN- ^1H em DMSO- d_6 e estrutura da β -CD com marcações para atribuição dos sinais

Fonte: Dados da pesquisa

Figura A 2 – Espectro de RMN- ^1H em DMSO- d_6 da HY livre

Fonte: Dados da pesquisa

Figura A 3 –Espectro de RMN- ^1H em DMSO-d $_6$ do complexo β -CDHY

Fonte: Dados da pesquisa

Figura A 4 – Microscopias de fluorescência para avaliação da acumulação em células HeLa em diferentes períodos de incubação. **A)** controle celular, **B)** controle celular com excitação, **C, D, E)** HY, **F, G e H)** β -CDHY. Filtro de excitação em 490 nm e emissão em 520 nm

Fonte: Dados da Pesquisa

Figura A 5 – Microscopias de fluorescência para avaliação da acumulação em células MCF7 em diferentes períodos de incubação. **A)** controle celular, **B)** controle celular com excitação, **C, D, E)** HY, **F, G e H)** β -CDHY. Filtro de excitação em 490 nm e emissão em 520 nm

Fonte: Dados da Pesquisa

Figura A 6 – Microscopias de fluorescência para avaliação da acumulação em células HeLa em diferentes períodos de incubação. **A)** controle celular, **B)** controle celular com excitação, **C, D, E)** HY, **F, G e H)** β -CDHY. Filtro de excitação em 490 nm e emissão em 520 nm

Fonte: Dados da Pesquisa