

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

ANA CLAUDIA PEDROZO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DOS COMPOSTOS
PROTOPORFIRINA IX E AZURE A INCORPORADOS NA FORMA
MISTA EM SISTEMAS MICELARES NANOESTRUTURADOS.**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA
2015

ANA CLAUDIA PEDROZO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO DOS COMPOSTOS
PROTOPORFIRINA IX E AZURE A INCORPORADOS NA FORMA
MISTA EM SISTEMAS MICELARES NANOESTRUTURADOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de licenciada.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Tessaro

APUCARANA

2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luiz Tessaro
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana
Orientador

Prof. Dr. Augusto Cesar Gracetto
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana
Membro

Prof. Dr. Johny Paulo Monteiro
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por se mostrar presente em todos os momentos, me dando força e determinação para a realização deste sonho. Hoje sei que seus planos para mim são maiores que os meus e que tudo tem seu tempo certo para acontecer.

Aos meus pais, Devair e Lusinete, ao meu irmão, Eder, e ao meu namorado, Sérgio, pela paciência, incentivo e compreensão em todos os momentos de minha graduação. Especialmente à minha avó, Luzia, por todos os conselhos e por nunca ter deixado de acreditar na força da família e do amor. Sei que de onde estiver ainda zela por mim.

Ao Prof. Dr. André Luiz Tessaro por toda ajuda, orientação, paciência e incentivo durante a realização do curso. Por ser exemplo de ética, didática e dedicação para quem, como eu, também deseja seguir a carreira acadêmica e por sempre ter confiado e acreditado em mim.

Aos professores Dr. Augusto Gracetto e Dr. Sandro Venter pelos ensinamentos, sugestões e apoio, e também pela companhia nos últimos semestres.

A professora Dra. Graciana Palioto por todo ensinamento e auxílio nos ensaios microbiológicos.

Aos amigos e companheiros de laboratório: Susan, Guilherme e Luana Dumas pela amizade e discussões que contribuíram para este trabalho.

Aos novos e velhos amigos: Washington, Tayssa, Gabi, Bruna, Angélica, Henrique, Ana Carla, Meiri, Luana, Dani, Bruno, Kleber, Maiara, Juliana, Jéssica e Flavianny, que fizeram toda diferença nessa etapa de minha vida, agradeço pela companhia, amizade e todos os momentos que compartilhamos.

Aos professores Dr. Noboru Hioka e Dr. Wilker Caetano da Universidade Estadual de Maringá e a seus alunos: Bianca, Camila, Flávia, Bruno Rabello, Bruno Vilsinski, Evelin, Patrícia, Renato e demais, que me auxiliaram em diversos momentos deste trabalho.

E a todos os professores incríveis que tive a sorte de conhecer durante a vida acadêmica e que hoje são exemplo e inspiração para a carreira que escolhi: muito obrigada!

RESUMO

SILVA, Ana Claudia P. Avaliação do efeito sinérgico dos compostos Protoporfirina IX e Azure A incorporados na forma mista em sistemas micelares nanoestruturados. 2015. 52p. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2015.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste na combinação de um composto fotossensível e luz em comprimento de onda adequado na presença de oxigênio. Os fármacos, chamados fotossensibilizadores (FS), devem possuir algumas características favoráveis à técnica, como baixa toxicidade no escuro e alta absorção de luz na “janela fototerapêutica”. Essa modalidade clínica pode ser empregada no tratamento de doenças que possuem em comum o crescimento anormal de células, como o câncer, ou ainda, na inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDMO). A busca por novos fármacos tem mostrado que compostos porfirínicos e fenotiazínicos são fotossensibilizadores promissores para TFD/IFDMO. A aplicação desses compostos pode ter sua ação fotodinâmica potencializada através da combinação dos mesmos, fato que poderá agir sinergicamente no grau de morte celular. Sendo assim, este trabalho visou a formulação de um sistema misto contendo os fotossensibilizadores Protoporfirina IX e Azure A em micelas do copolímero P-123. Esse sistema tem a vantagem de ambos os corantes absorverem luz na mesma região de comprimento de onda (630 nm). Os fotossensibilizadores mantiveram-se na forma monomérica por um longo período, quer seja na forma individual ou combinada, demonstrando que o processo de formulação foi satisfatório. As análises realizadas indicaram que a Protoporfirina IX, mais hidrofóbica, está mais internalizada na micela, enquanto o Azure A encontra-se na parte mais externa da mesma. A elevação da força iônica, parâmetro que favorece a autoagregação dos corantes, causa agregação apenas no Azure A. Este fato indica que o mesmo está em um ambiente mais exposto à água, o que corrobora com os estudos de ligação. Por fim, os valores de Eficiência Fotodinâmica Química (γ_{Δ}) sugeriram que no formulado misto a geração de oxigênio singlete é causada apenas pelo Azure A, fato que pode estar ligado à localização interna da porfirina ou mesmo à sua autoagregação com o passar do tempo.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. P-123. Protoporfirina IX. Azure A.

ABSTRACT

SILVA, Ana Claudia P. Evaluation of the synergistic effect of the compounds Protoporphyrin IX and Azure A incorporated in mixed form in nanostructured micellar systems. 2015. 52p. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2015.

Photodynamic therapy (PDT) is the combination of a photosensitizing compound and suitable wavelength of light in the presence of oxygen. The drugs, called photosensitizers (PS), must have some favorable characteristics to the technique, such as low dark toxicity and high absorption of light in "phototherapeutic window". This clinical modality can be used in the treatment of diseases that have in common the abnormal growth of cells, such as cancer or, in the photodynamic inactivation of microorganisms (PDI). The search for new drugs has shown that porphyrins and phenothiazines compounds are promising photosensitizers for PDT/PDI. The application of these compounds can have their photodynamic action enhanced by the combination of both, fact which may act synergistically in the degree of cell death. Thus, this study aimed to formulate a mixed system containing the photosensitizers Protoporphyrin IX and Azure A in polymeric micelles of P-123. This system has the advantage of both dyes absorb light in the same wavelength region (630 nm). The photosensitizers were maintained in monomeric form for a long period, either in single or combined form, demonstrating that the formulation process was satisfactory. The analysis indicated that Protoporphyrin IX, more hydrophobic, is internalized in the micelle, while the Azure A is on the interface micelle/water. The increase in ionic strength, a parameter which favors self-aggregation of the dye, it seems to impact only on Azure A. This indicates that this dye is more exposed to aqueous environment, which agrees with the localization studies. Finally, the values of Chemical Photodynamic Efficiency (γ_{Δ}) suggested that in the mixed formulation the generation of singlet oxygen is caused only by the Azure A, which can be associated to the internal location of the porphyrin or because their self-aggregation.

Keywords: Photodynamic Therapy; P-123; Protoporphyrin IX; Azure A.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Jablonski.....	14
Figura 2: Relação entre comprimento de onda da luz e seu nível de penetração no tumor.....	18
Figura 3: Estrutura base das porfirinas.....	20
Figura 4: Estrutura da Protoporfirina IX.....	21
Figura 5: Estrutura do fenotiazínico Azure A.....	22
Figura 6: Estrutura do plurônico P-123.....	24
Figura 7: Sobreposição dos espectros de absorção (A) Formulado AzA/P-123 e solução estoque de Azure A em água ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (B) Formulado PPIX/P-123 e solução estoque de Protoporfirina IX ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). Dados normalizados.....	32
Figura 8: Sobreposição dos espectros de absorção nas temperaturas de $30,0^{\circ}\text{C}$ (linha contínua preta) e $50,0^{\circ}\text{C}$ (linha contínua vermelha). (A) Formulado AzA/P-123 ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (B) Formulado PPIX/P-123 ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (C) Formulado AzA/PPIX/P-123 ($5,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).....	33
Figura 9: Sobreposição de espectros de emissão de fluorescência com o aumento da [I-]. As setas indicam as variações observadas com a adição de iodeto. (A) Formulado AzA/P-123 com $\lambda_{\text{exc}}=570\text{nm}$; (B) Formulado PPIX/P-123 com $\lambda_{\text{exc}}=407\text{nm}$; (C) Formulado misto com $\lambda_{\text{exc}}=570\text{nm}$; (D) Formulado misto com $\lambda_{\text{exc}}=407\text{nm}$. $T= 30,0^{\circ}\text{C}$	34
Figura 10: Plots de Stern-Volmer para os formulados em P-123. $[\text{AzA}] = 2,95 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{PPIX}] = 2,95 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{P-123}] = 7,20 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $30,0^{\circ}\text{C}$. (■) Formulado AzA/P-123, $\lambda_{\text{exc}}=570\text{nm}$; (●) Formulado PPIX/P-123, $\lambda_{\text{exc}}=407\text{nm}$; (▲) Formulado misto, $\lambda_{\text{exc}}=570\text{nm}$; (■) Formulado misto, $\lambda_{\text{exc}}=407\text{nm}$	35
Figura 11: Sobreposição das distribuições de tamanho das partículas do formulado “branco”. $[\text{P-123}] = 5,15 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $30,0^{\circ}\text{C}$	36
Figura 12: Estabilidade temporal dos formulados incorporados em micelas de P-123. (A) Formulado AzA/P-123 em etanol ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (B) Formulado PPIX/P-123 em clorofórmio ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (C) Formulado misto em etanol ($5,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (D) Formulado misto em clorofórmio ($5,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).....	39
Figura 13: Sobreposição dos espectros de absorção em diferentes concentrações de NaCl. As setas indicam as variações observadas com o aumento de $[\text{NaCl}]$. (A) Formulado AzA/P-123 ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$); (B) Formulado PPIX/P-123 ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$); (C) Formulado AzA/PPIX/P-123 ($5,90 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). $T=30,0^{\circ}\text{C}$	40
Figura 14: Ilustração da sobreposição entre os espectros de emissão do doador e de absorção do receptor.....	42
Figura 15: Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência com variação da $[\text{PPIX}]$. (A) ausência de Azure A; (B) Presença de Azure A, $[\text{AzA}] = 2,20 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{P-123}] = 7,18 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $30,0^{\circ}\text{C}$	43
Figura 16: Espectro de absorção do AU + formulado misto (linha contínua preta) e emissão do LED (linha contínua vermelha).....	44

Figura 17: (A) Variação espectral do formulado AzA/PPIX/P-123 na presença de ácido úrico durante iluminação. (B) Cinéticas de decomposição do AU (■) e de fotobranqueamento (●).....44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singleto
γ_{Δ}	Eficiência Fotodinâmica Química
ALA	Ácido δ -aminolevulínico
AU	Ácido úrico
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CI	Conversão Interna
CIS	Cruzamento inter-sistemas
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
EPR	Permeabilidade aumentada e retenção
FRET	Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência
IFDMO	Inativação Fotodinâmica de Microrganismos
LED	Diodo emissor de luz
ONU	Organização das Nações Unidas
P.A.	Pureza Analítica
TFD	Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	A LUZ E SUA INTERAÇÃO COM A MATÉRIA	14
3.2	TERAPIA FOTODINÂMICA	15
3.3	BREVE HISTÓRICO DA TFD	17
3.4	FOTOSENSIBILIZADORES	18
3.5	PORFIRINAS	20
3.6	FENOTIAZÍNICOS	22
3.7	SURFACTANTES	23
4	METODOLOGIA	25
4.1.	MATERIAIS	25
4.2.	MÉTODOS	26
4.2.1	Formulação dos fotossensibilizadores no copolímero P-123	26
4.2.2	Avaliação da estabilidade dos formulados	27
4.2.3	Taxa de carregamento dos fotossensibilizadores na micela	27
4.2.4	Avaliação da localização dos fotossensibilizadores na micela	28
4.2.5	Determinação do tamanho das partículas	29
4.2.6	Estudo de efeitos de Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET)	29
4.2.7	Determinação da eficiência fotodinâmica química (γ_{Δ})	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	Formulação dos fotossensibilizadores no copolímero P-123	31
5.2	Determinação da localização dos fotossensibilizadores na micela polimérica	33
5.3	Caracterização do tamanho das partículas dos formulados isolados e na forma mista	36
5.4	Estabilidade temporal e carregamento dos fotossensibilizadores nas micelas de P-123	38
5.5	Estudos da influência da Força Iônica na estabilidade dos compostos formulados no copolímero P-123	39
5.6	Estudo de efeitos de Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET)	41
5.7	Determinação da Eficiência Fotodinâmica Química. (γ_{Δ})	43
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Em 20 de dezembro de 2013, a ONU (Organização das Nações Unidas) proclamou 2015 como o Ano Internacional da Luz e Tecnologias baseadas na Luz. Essa escolha coloca em pauta e traz reconhecimento a um fenômeno que desempenha papel essencial na ciência, na medicina, no desenvolvimento de novos meios de comunicação, na geração de energia e em tantas outras áreas.

Ao que cabe à química, a interação da luz com a matéria em processos denominados fotoquímicos tem sido fundamental para a vida desde os primórdios do mundo. Isso pode ser observado através da fotossíntese, processo essencial para a manutenção da vida na Terra. Reações fotoquímicas envolvem a excitação de moléculas a estados excitados através da interação com a radiação e são estudadas para diversas aplicações.

Na área medicinal, a utilização da luz tem propiciado o desenvolvimento de uma modalidade clínica chamada terapia fotodinâmica, onde o fármaco só é ativado após a irradiação do mesmo. A terapia fotodinâmica destaca-se como um tratamento promissor contra o câncer, apresentando diversas vantagens quando comparada a técnicas mais invasivas, como a radioterapia e a quimioterapia. Além disso, pode ser utilizada no tratamento de outras doenças que possuem como característica o crescimento anormal das células, como a degeneração macular da retina. (PERUSSI, 2007)

Os fármacos utilizados na terapia fotodinâmica devem possuir características favoráveis para que sejam eficientes no ataque ao tecido doente e atualmente, são poucos os agentes terapêuticos aprovados pelas autoridades de saúde para o tratamento de moléstias através dessa técnica, o que a torna ainda de preço elevado.

A literatura tem destacado diversas características desejadas em um composto visando sua utilização nessa modalidade de tratamento, como sua baixa toxicidade no escuro, alta absorvidade na chamada “janela fototerapêutica” (600-800 nm), interação com sistemas biológicos e estabilidade na forma monomérica (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; MACHADO, 2000). Porém, muitos dos compostos estudados para esse fim, como as porfirinas, ftalocianinas e fenotiazínicos são relativamente hidrofóbicos. Apesar de ser um fator importante na

interação da droga com a membrana celular, a hidrofobicidade pode resultar no fenômeno da autoagregação em meio aquoso, o que diminui significativamente a atividade fotodinâmica do corante, além de possibilitar sua precipitação.

Devido aos motivos mencionados, diversas estratégias de formulação de fármacos têm sido investigadas de modo a manter o composto em sua forma monomérica, como por exemplo, a encapsulação do mesmo em lipossomos, nanopartículas poliméricas ou surfactantes. Além de estabilizar o monômero, esses sistemas são conhecidos como carreadores de fármacos e tem como função a “entrega” seletiva da droga no tecido doente (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002).

Visto que os compostos porfirínicos e fenotiazínicos tem se destacado por possuírem características favoráveis à técnica, como alta absorvidade na janela fototerapêutica e alto rendimento na geração de oxigênio singleto, esse trabalho propõe a formulação mista de dois compostos dessas classes: a Protoporfirina IX e o Azure A, respectivamente. Nesse caso se utiliza como vantagem o fato de ambos os corantes absorverem na mesma região do espectro, ao redor de 630 nm. Adicionalmente, a literatura reporta com sucesso o uso de fotossensibilizadores combinados na inibição de crescimento tumoral (ACEDO et al, 2014). Assim, a proposta inclui a formulação de ambos os compostos em micelas de P-123, um surfactante polimérico da classe dos Pluronic[®] e a avaliação de seu potencial fotodinâmico por meio de ensaio preliminar sobre a bactéria *Escherichia coli*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação das propriedades físico-químicas e fotodinâmicas dos compostos Protoporfirina IX e Azure A encapsulados na forma mista em micelas poliméricas de P-123.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir um formulado misto dos corantes Azure A, Protoporfirina IX e do copolímero P-123 e para fins de comparação formular também cada composto de forma isolada no mesmo copolímero;

Avaliar a estabilidade dos formulados preparados;

Avaliar a toxicidade do efeito fotodinâmico dos formulados preparados sobre a bactéria *Escherichia coli*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A LUZ E SUA INTERAÇÃO COM A MATÉRIA

A luz e sua interação com os corpos são fenômenos estudados e aplicados desde os primórdios do mundo, sendo que a própria natureza se utiliza desses processos fotoquímicos para a manutenção da vida, como no caso da fotossíntese e na produção de vitamina D.

A luz é uma radiação eletromagnética de caráter dual (partícula-onda), conforme estudado pela Mecânica Quântica, e transporta energia na forma de fótons em quantidade inversamente proporcional ao seu comprimento de onda. Isso faz com que a luz tenha diferentes interações com a matéria, de acordo com a quantidade de energia que carrega. A radiação de micro-ondas, por exemplo, causa a rotação das moléculas, enquanto o infravermelho causa a vibração das mesmas. As reações fotoquímicas que consistem em transições eletrônicas do nível fundamental a níveis excitados são produzidas pela absorção de radiação eletromagnética na região do visível (Vis) e/ou ultravioleta (UV).

Os processos de absorção e emissão de luz podem ser ilustrados através do Diagrama de Jablonski (Figura 1), que abrange os processos moleculares que podem ocorrer no estado excitado. O Diagrama é distribuído verticalmente em níveis energéticos e horizontalmente por diferentes multiplicidades de spin do elétron, nos quais são representados os estados singleto (S_0 , S_1 e S_2) e tripleto (T_1 e T_2).

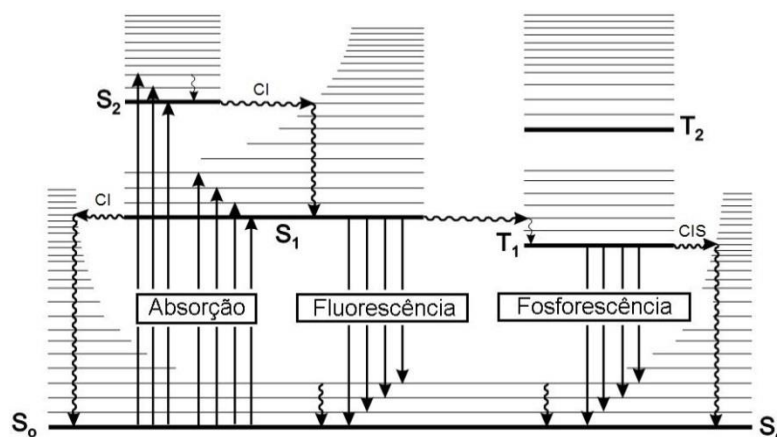


Figura 1: Diagrama de Jablonski.
Fonte: Adaptado de Valeur (2001).

Como ilustrado no Diagrama, a absorção de luz por uma molécula no estado fundamental singleto (S_0) pode levá-la aos níveis vibracionais superiores, usualmente, S_1 e S_2 . No estado S_2 , exceto em raras exceções, as moléculas relaxam rapidamente ($\sim 10^{-12}$ s) através de colisões, processo chamado Conversão Interna (CI). A partir do estado quântico S_1 , a desativação do estado excitado pode ocorrer novamente devido a colisões (CI) ou por emissão de luz (fluorescência). Todos esses processos ocorrem mantendo-se a multiplicidade de spin do elétron. (Valeur, 2001; Lakowicz, 2006)

Um processo competitivo aos mencionados acima é o cruzamento inter-sistemas (CIS) que, apesar de proibido por spin, pode ser observado quando a molécula apresentar acoplamento spin-órbita. O CIS é uma transição não-radiativa entre dois níveis vibracionais de mesma energia mas de diferentes multiplicidades, no caso a transição ocorre de um estado singleto para um tripleto ($S_1 \rightarrow T_1$). De acordo com Valeur (2001), o acoplamento spin-órbita varia com a quarta potência do número atômico, o que explica o favorecimento desse processo na presença de átomos pesados. Uma vez no estado tripleto, a desativação dos estados excitados pode novamente ocorrer por colisões (CIS) ou por emissão de luz (fosforescência).

3.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

Alguns dos processos representados pelo Diagrama de Jablonski consistem nos princípios básicos de uma modalidade fototerapêutica conhecida como terapia fotodinâmica (TFD). Essa técnica tem sido utilizada no tratamento de doenças que possuem em comum o crescimento anormal de células, como por exemplo, o câncer e a degeneração macular da retina, além de também ser eficaz na inativação fotodinâmica de microrganismos (IFDMO). (PERUSSI, 2007).

A terapia fotodinâmica é baseada na excitação do fármaco, conhecido como fotossensibilizador (FS), por luz em comprimento de onda adequado na presença de oxigênio molecular. O medicamento, que pode ser administrado de modo intravenoso ou tópico de acordo com as especificidades do tratamento, acumula-se preferencialmente no tecido doente e após a irradiação do local o composto é

ativado gerando espécies citotóxicas de oxigênio que resultam na morte celular por necrose e/ou apoptose (CASTANO; MROZ; HAMBLIN, 2006).

Após a irradiação do fotossensibilizador no tecido biológico alvo, o mesmo é promovido a um estado singleto excitado ($^1\text{FS}^*$) podendo então sofrer mudança em sua multiplicidade de spin através do cruzamento inter-sistemas, levando-o ao estado tripleto excitado ($^3\text{FS}^*$). O estado tripleto possui maior tempo de vida, o que faz com que reações fotoquímicas importantes geralmente ocorram nesse estado. Tendo o cromóforo chegado à $^3\text{FS}^*$, dois mecanismos são propostos para o processo que leva à geração de espécies citotóxicas. No mecanismo Tipo I, ocorre a *transferência de elétrons* entre o $^3\text{FS}^*$ e substratos biológicos, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio formando as chamadas espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\bullet). Já no mecanismo Tipo II, ocorre a *transferência de energia* do $^3\text{FS}^*$ diretamente para o oxigênio em seu estado fundamental, que já é tripleto ($^3\text{O}_2$), levando à formação do oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), espécie altamente oxidante. Ambos os caminhos podem levar a morte celular, no entanto, o mecanismo Tipo II é proposto como principal via de ação da TFD. (ORMOND; FREEMAN, 2013; CELLI et al., 2010; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

Essa modalidade de tratamento vem se destacando nas pesquisas oncológicas por apresentar diversas vantagens frente a técnicas como a radioterapia e a quimioterapia. Eficiente para os mais diversos tipos de câncer, a TFD também apresenta alta seletividade, diminuindo as chances de que células saudáveis sejam afetadas. Isso ocorre, pois, além de estudos voltados à entrega seletiva da droga ao tecido afetado, a posterior irradiação também pode ser direcionada apenas a esse local (PERUSSI, 2007).

Adicionalmente, muitos estudos tem se voltado à utilização do mecanismo de ação da TFD para a inativação fotodinâmica de microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. A técnica oferece vantagens como um amplo espectro de ação, sendo eficiente inclusive sobre microrganismos resistentes a antibióticos e apresentando menor toxicidade quando comparada a outros tratamentos antimicrobianos (JORI et al., 2006; WAINWRIGHT, 1998). Além disso, uma vez que a inativação se dá através da produção de oxigênio singleto, há pouca probabilidade de que se desenvolva uma resistência microbiana natural. Segundo Perussi (2007), a utilização da IFDMO tem sido relevante na esterilização de bolsas de sangue,

desinfecção de água, periodontia e tratamento de alimentos. A técnica, conhecida aproximadamente desde 1900 com os estudos de Raab, tem ganhado força atualmente devido à disseminação da AIDS e do aumento de casos de infecção hospitalar.

3.3 BREVE HISTÓRICO DA TFD

Historicamente, o uso terapêutico da luz data de mais de 4000 anos. Isso porque antigas civilizações no Egito e na Índia já utilizavam da ação fototerapêutica dos psoralenos para o tratamento do vitiligo. O efeito era obtido após a ingestão de plantas e exposição à luz solar. No entanto, a primeira publicação científica na área surge em 1900, onde Raab descreve a ação do corante acridina na morte de organismos unicelulares. Já em 1903, é reportada a primeira utilização fotodinâmica de corantes no tratamento de tumores por Tappeiner e Jesionek, utilizando a eosina como fotossensibilizador (MACHADO; 2000).

A história dos chamados “medicamentos da primeira geração” tem início apenas na década de 50 com os estudos de Schwartz e Lipson sobre a acumulação preferencial de uma mistura de oligômeros da hematoporfirina nos tumores implantados em animais, levando Lipson a tratar com sucesso uma mulher com câncer de mama. Os trabalhos sobre derivados hematoporfirínicos prosseguiram nos anos 70 com Dougherty culminando no desenvolvimento do Photofrin[®], o primeiro fotossensibilizador com uso autorizado pelos órgãos governamentais (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; CELLI et al., 2010).

A busca por novos medicamentos, da chamada segunda geração, propiciou o desenvolvimento de dois novos fármacos aprovados pela “Food and Drugs Administration” dos Estados Unidos: o Levulan[®] Kerastick, uma pró-droga para lesões de pele, e o Visudyne[®] para degeneração macular da retina, cujo princípio ativo é uma benzoporfirina (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Destacam-se nas pesquisas por novos fotossensibilizadores compostos como porfirinas, ftalocianinas, clorinas e fenotiazínicos.

3.4 FOTOSSENSIBILIZADORES

Para ser um potencial fotossensibilizador, viável e eficaz em sua ação fototerapêutica, um composto deve possuir as seguintes características (ORMOND; FREEMAN, 2013; STERNBERG; DOLPHIN, 1998):

- Alta absorção de luz, preferencialmente entre 600nm e 800nm, onde a luz possui maior penetração no tecido biológico;
- Alto rendimento quântico de oxigênio singlete;
- Baixa toxicidade no escuro;
- Seletividade pelo acúmulo em tecido doente em detrimento do tecido saudável;
- Rápida eliminação pelo organismo;
- Simplicidade na formulação e estabilidade do formulado.

A alta absorção de luz na chamada “janela fototerapêutica” pode ser observada a partir da Figura 2 abaixo. A imagem demonstra que quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior será sua penetração no tecido. No entanto, acima de 800nm ocorre a absorção da radiação por moléculas de água, o que acaba impondo também um limite superior.

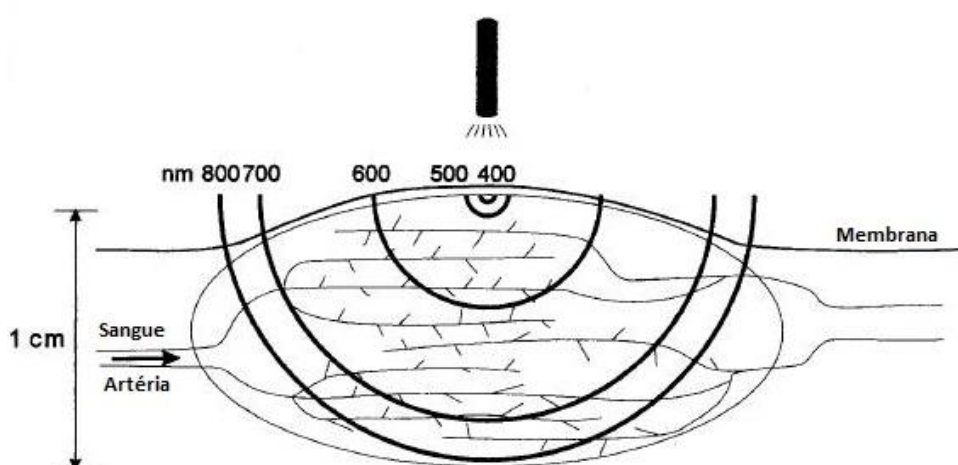


Figura 2: Relação entre comprimento de onda da luz e seu nível de penetração no tumor.
Fonte: Adaptado de Sternberg e Dolphin (1998)

A interação e incorporação de um fotossensibilizador em membranas biológicas, constituídas principalmente por lipídios e proteínas, estão diretamente associadas à hidrofobicidade do composto. Devido a isso, a alta hidrofobicidade de uma molécula é uma característica favorável à TFD, entretanto essa propriedade em meio aquoso pode levar ao processo de autoagregação.

A agregação é definida como a aglomeração ou associação de moléculas em solução e reduz drasticamente a eficiência fotodinâmica de um fotossensibilizador. Além do decréscimo de biodisponibilidade da molécula, a autoagregação reduz drasticamente a geração de oxigênio singlete e pode levar à precipitação do fármaco, causando dor no momento da injeção ou mesmo a morte do paciente. Esses fatores demonstram a importância de uma formulação adequada do medicamento que mantenha o composto na forma monomérica (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; BRAGA et al., 2014; TESSARO et al., 2005).

Fatores como a concentração (GILANI, GHORBANPOUR, SALMANPOUR; 2013), o solvente (BRAGA et al., 2014; TSUBONE et al., 2014) e o pH do meio (TESSARO et al., 2011) são algumas das condições experimentais que podem influenciar no processo de autoagregação dos compostos. Esse fenômeno normalmente é caracterizado a partir de técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia de absorção ou de fluorescência.

As modificações apresentadas nos espectros de absorção de espécies agregadas, como os deslocamentos ou a presença de bandas adicionais, são explicadas pela Teoria do Exciton, proposta por Kasha e colaboradores (1965). De acordo essa teoria, o momento dipolar da transição das unidades monoméricas indica as diferenças de energia dos possíveis dímeros e conseqüentemente explica os deslocamentos espectrais. Em dímeros do tipo J, a transição permitida possui menor energia e, portanto sua banda se forma em comprimentos de onda maiores que a do monômero (deslocamento batocrômico). Já em agregados H, a transição permitida possui energia maior e sua banda surge em comprimentos de onda menores (deslocamento hipsocrômico). Existe ainda um caso especial onde a banda do agregado e a do monômero coincidem no espectro. O ângulo necessário para que esse fenômeno ocorra é denominado ângulo mágico ($54,7^\circ$) (KASHA; RAWLS; EL-BAYOUMI, 1965). Como citado, a determinação dos agregados pode também ser realizada através da espectroscopia de fluorescência, uma vez que nessas

condições os compostos não emitem luz em função da auto-supressão de energia dos estados excitados. (TESSARO, 2010)

Dentre os compostos citados como relevantes na busca por novos fotossensibilizadores muitos apresentam alta hidrofobicidade, resultando na indesejada autoagregação. Desta forma, torna-se de fundamental importância estudos voltados à formulação dos fármacos, de modo que estes sejam mantidos sob a forma monomérica.

3.5 PORFIRINAS

As porfirinas consistem em um grupo de compostos intensamente coloridos que possuem em comum um macrociclo aromático tetrapirrólico (Figura 3), de origem natural ou sintética. Pequenas variações na estrutura básica desse macrociclo levam a uma vasta diversidade de funções bioquímicas, dentre as quais se destaca o transporte de oxigênio pelo organismo, processo essencial para a vida. (TESSARO, 2010)

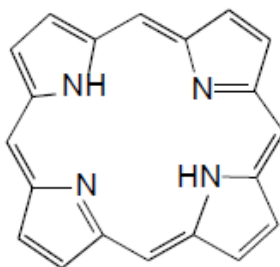


Figura 3: Estrutura base das porfirinas.

A estrutura da porfirina, ilustrada na Figura 3, foi proposta por Kuster em 1912 e é composta por vinte átomos de carbono circundando quatro átomos centrais de nitrogênio. Esse arranjo fornece à molécula uma configuração altamente estável de ligações simples e duplas, contendo 18 elétrons π em conjugação. Essas características das porfirinas são responsáveis por sua absorção de luz em regiões do ultravioleta e do visível, o que leva o composto a se destacar nos estudos voltados ao desenvolvimento de novos fármacos para TFD. (MILGRON, 1997)

Historicamente, diversos compostos pertencentes à classe das porfirinas tem se sobressaído na busca por novos fotossensibilizadores, como as hematoporfirinas, benzoporfirinas e protoporfirinas. Uma das vantagens do uso dessas moléculas encontra-se em sua alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade, o que resulta em uma maior seletividade por tecidos afetados pelo câncer, uma vez que esses possuem grande número de receptores para esse tipo de lipoproteína.

O método tradicional de tratamento clínico através da TFD envolve geralmente a administração de um fármaco seguida de um período de espera para que o mesmo se acumule preferencialmente em tecidos alvo. Um modo alternativo desenvolvido por Kennedy e Pottier por volta de 1990, resultou no pré-fármaco Levulan[®]Kerastick. O composto presente nesse medicamento, o ácido δ-aminolevulínico (ALA), é uma molécula sem as características necessárias a um FS, porém, precursora *via* biossíntese da Protoporfirina IX (Figura 4), que é fotoativa. (STERNBERG; DOLPHIN, 1998; CELLI et al., 2010; ORMOND; FREEMAN; 2013)

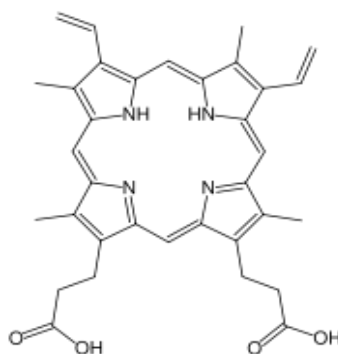


Figura 4: Estrutura da Protoporfirina IX.

A utilização do ALA como precursor da Protoporfirina IX tem sido muito estudada, principalmente para aplicações dermatológicas, apresentando como vantagem a rápida degradação da Protoporfirina IX em tecidos normais. No entanto, apesar de tamanho destaque dado a esse composto em sua forma endógena, poucos são os trabalhos voltados a seu uso exógeno.

3.6 FENOTIAZÍNICOS

Os fenotiazínicos são compostos heterocíclicos de grande importância biológica e medicinal, apresentando aplicações como sedativos e antidepressivos (PÁRKÁNYI; BONIFACE, 1993). Dessa classe de compostos o principal representante é o corante Azul de Metileno, que é amplamente estudado e já muito utilizado na área medicinal. (SCHIRMER et al., 2011)

O Azure A (Figura 5) é um corante de fórmula estrutural muito similar à do Azul de Metileno se diferenciando apenas pelo grupo amina presente no primeiro anel aromático da molécula, onde para o Azul de Metileno esse grupo é uma amina terciária. O Azure A (AzA) pode ser utilizado, conforme reporta a literatura, em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e na indústria de dispositivos eletrocromáticos, sensores ópticos e células fotovoltaicas (SABNIS, 2010). No tocante a sua ação fotodinâmica tem sido reportado sua eficiência na inibição do crescimento do microrganismo *Candida albicans* (MOREIRA et al., 2010).

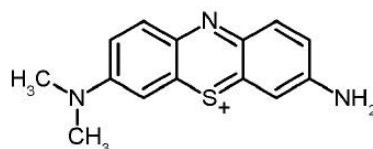


Figura 5: Estrutura do fenotiazínico Azure A.

Os fenotiazínicos também apresentam características interessantes para aplicações fotodinâmicas, como sua absorção em altos comprimentos de onda no espectro visível e seu caráter catiônico. Através de atração eletrostática, os fenotiazínicos carregados positivamente acumulam-se em mitocôndrias cujo potencial de membrana é negativo. O fármaco desse grupo possui seletividade para células tumorais, uma vez que essas possuem um potencial de membrana negativo ainda maior que o de células sadias. (BRAGA, 2014; CRUZ et al., 2010)

Ainda pouco explorado pela TFD, o Azure A apresenta alto rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) e a vantagem de ser um pouco mais hidrofílico que o já conhecido Azul de Metileno, evitando processos de autoagregação mesmo em maiores concentrações.

3.7 SURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfifílicas que possuem uma parte hidrofóbica, geralmente uma extensa cadeia de hidrocarboneto, ligada a uma parte hidrofílica polar ou iônica. Quando em solução, os surfactantes possuem tendência a se organizarem de forma que suas partes hidrofílicas interajam com moléculas de água, enquanto sua cadeia hidrofóbica se volta para localizações mais afastadas do meio. Essa estrutura formada pelo aglomerado de moléculas do surfactante é chamada micela e a concentração em que essa organização passa a ocorrer é denominada concentração micelar crítica (cmc).

Dentre os diferentes grupos, tem se destacado para aplicações medicinais os surfactantes poliméricos triblocos, conhecidos como plurônicos ou polaxâmeros. Essas moléculas são compostas por grupos hidrofílicos oxietileno (EO) e hidrofóbicos oxipropileno (PO) arranjados com a seguinte estrutura: $EO_x-PO_x-EO_x$, na qual a variação da quantidade de grupos EO e PO leva a alteração da lipofilicidade do surfactante. (KABANOV et al., 2002; ALEXANDRIDIS; HOLZWARTH; HATTON, 1994)

A utilização de surfactantes é conhecidamente efetiva na formulação de fármacos hidrofóbicos em meio aquoso, uma vez que mantendo-os no interior da micela devido interação entre os grupos hidrofóbicos, minimiza o processo de autoagregação. Além disso, as micelas poliméricas representam um modelo simples de membrana e possibilitam a entrega seletiva do medicamento ao tecido alvo com menor toxicidade e efeitos colaterais. (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002).

A Figura 6 abaixo ilustra o plurônico P-123 que será utilizado nesse trabalho para formulação e estabilização dos corantes Protoporfirina IX e Azure A. O P-123 possui elevada massa molar ($5,820 \text{ g.mol}^{-1}$) e baixa cmc ($0,9 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) em meio aquoso à 30°C . (WANKA; HOFFMANN; ULBRICHT, 1994)

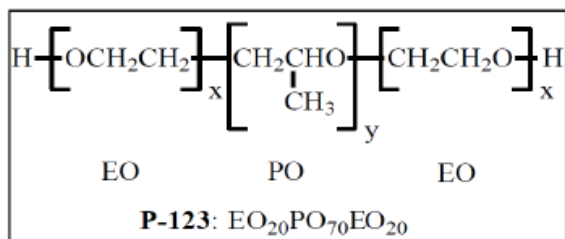


Figura 6: Estrutura do plurônico P-123.
Fonte: Tessaro (2010).

4 METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Solventes e Reagentes

Os corantes Protoporfirina IX dimetil éster (pureza $\geq 95\%$) e Azure A (pureza 96%) foram obtidos da Sigma-Aldrich e caracterizados através de espectroscopia de absorção UV-Vis. O surfactante polimérico P-123 da classe dos Pluronic[®] também foi adquirido da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes e solventes empregados foram de grau analítico (P.A).

4.1.2. Equipamentos

Os parâmetros físico-químicos dos formulados foram monitorados nos espectrofotômetros de absorção UV-Vis Cary-50 e de fluorescência Cary Eclipse, ambos da marca Agilent Technologies, e no espectrofotômetro de absorção UV/Vis/NIR USB4000 da Ocean Optics. Para estudos da estabilidade térmica foi utilizado o espectrofotômetro Beckman DU 800 (temperatura controlada por sistema Peltier). A avaliação do tamanho das partículas foi realizada através do equipamento NanoPlus DLS da marca Particulate Systems. Durante as análises foram utilizadas cubetas de quartzo de 1,00 ou 0,1 cm de caminho óptico.

4.2. MÉTODOS

4.2.1 Formulação dos fotossensibilizadores no copolímero P-123.

A incorporação dos compostos Protoporfirina IX ($4,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e Azure A ($4,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em micelas de P-123 (6% m/v, $0,0103 \text{ mol L}^{-1}$) nas formas isoladas e mista foi realizada na proporção 1:1 e 2:1 (fármaco:micela), respectivamente. Para o cálculo das concentrações levou-se em consideração o número de agregação do copolímero de acordo com Wanka e colaboradores (1994).

Os formulados foram preparados através do método de dispersão sólida que consiste na co-solubilização dos compostos em um solvente orgânico seguido da rotaevaporação do solvente para a formação de uma matriz sólida. Sendo assim, os corantes foram solubilizados juntamente ao copolímero P-123 em 40,0mL de metanol e cada solução então foi rotaevaporada até a formação de um filme na superfície do balão. Desta forma quatro formulados foram preparados: AzA/P-123, PPIX/P-123, AzA/PPIX/P-123 e apenas P-123 (branco). Após a rotaevaporação, os balões foram protegidos da luz e deixados sob vácuo durante 12 horas. Depois desse tempo, os quatro formulados foram reidratados com 40,0mL de solução tampão aquosa de McIlvaine ($0,016 \text{ mol L}^{-1}$) com pH 7.6. E, por fim, permaneceram sob agitação e aquecimento (50°C) por 6 horas para completa solubilização. A concentração final dos formulados nas formas isoladas foi de $4,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e do formulado misto $8,46 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo 50% de PPIX e 50% de AzA. Todos continham 6% (m/v) de P-123.

Os formulados foram armazenados em recipientes plásticos, uma vez que o Azure A possui grande tendência em se aderir ao vidro, e foram mantidos protegidos da luz durante todo o tempo de execução deste trabalho.

4.2.2 Avaliação da estabilidade dos formulados.

A caracterização e avaliação da estabilidade dos formulados foram realizadas através de espectroscopia de absorção UV/Vis e de fluorescência. Para isso, alíquotas de 150 μ L eram diluídas em 2,0mL de água destilada em cubetas de quartzo e agitadas vigorosamente. Também foram realizados estudos de estabilidade térmica, monitorando-se os espectros de absorção e fluorescência em temperaturas de 30,0°C e 50,0°C. Por fim, avaliou-se a estabilidade dos formulados frente à variação da força iônica do meio. Esse estudo foi realizado através dos espectros de absorção diluindo-se 150 μ L de cada formulado em cubetas com 2,0mL de solução contendo as seguintes concentrações de cloreto de sódio: 3,0 mol L⁻¹, 2,0 mol L⁻¹, 1,0 mol L⁻¹, 0,50 mol L⁻¹ e 0,15 mol L⁻¹. A influência da força iônica também foi avaliada com relação ao tempo, retirando-se espectros de absorção a cada 3 minutos durante 2 horas; a cada 5 minutos por mais 2 horas e, por fim, a cada 10 minutos por 4 horas.

Todas as análises envolvendo espectros de emissão de fluorescência foram realizadas da seguinte forma: formulado AzA/P-123 $\lambda_{exc} = 570\text{nm}$, formulado PPIX/P-123 $\lambda_{exc} = 407\text{nm}$ e formulado misto $\lambda_{exc} = 570\text{nm}$ e $\lambda_{exc} = 407\text{nm}$.

4.2.3 Taxa de carregamento dos fotossensibilizadores na micela.

Com base na estabilidade das micelas e nas características específicas de cada fotossensibilizador, a porcentagem de carregamento do fármaco na micela foi investigada para se avaliar a eficiência do método. Para isso, alíquotas de 150 μ L do formulado de PPIX isolada e do formulado misto foram adicionadas a 2,0mL de clorofórmio e em seguida foram analisadas através de seus espectros de absorção e de emissão de fluorescência. Da mesma forma, o formulado de Azure A na forma isolada e novamente o formulado misto foram avaliados em cubetas contendo 2,0mL de etanol. Antes de cada teste os formulados eram vigorosamente agitados e as alíquotas eram cuidadosamente retiradas para que não fosse analisado nenhum

particulado. Os espectros de emissão de fluorescência foram retirados conforme a descrição do item acima.

Os dados obtidos através da espectroscopia de absorção foram trabalhados de acordo com a Lei de Lambert-Beer, Equação 1, onde “A” é a absorbância, “ ϵ ” o coeficiente de absorvidade molar, “b” o caminho óptico da cubeta e “C” a concentração do analito.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (1)$$

Os coeficientes de absorvidade molar utilizados foram de $34.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o Azure A em meio aquoso (GILANI; GHORBANPOUR; SALMANPOUR, 2013), $63.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para o Azure A em etanol (WAINWRIGHT, 2007) e $171.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para a PPIX em clorofórmio (FALK, 1961).

4.2.4 Avaliação da localização dos fotossensibilizadores na micela.

Para determinação da localização de cada corante na micela polimérica realizou-se uma titulação dos formulados. Os mesmo foram mantidos constantes nas concentrações $2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (formulados isolados) e $5,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (formulado misto) e a cada um foram adicionadas alíquotas de solução de iodeto de sódio ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Após homogeneizar a mistura a cada adição e aguardar um minuto para estabilização, registraram-se os espectros de emissão de fluorescência, conforme descrito no item 4.2.2. Todos os experimentos foram realizados à temperatura de $30,0^\circ\text{C}$ e os valores obtidos nesses estudos foram ajustados através de um fator de correção para que as diferenças de intensidade de emissão não fossem consequência de diluições e sim por efeitos de supressão de fluorescência.

Para avaliar a supressão de fluorescência foram calculadas as constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) para cada caso através da Equação 2, onde F_0 e F são, respectivamente, as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do íon iodeto supressor.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [I^-] \quad (2)$$

4.2.5 Determinação do tamanho das partículas.

Os tamanhos das partículas foram estimados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês, *Dynamic Light Scattering*), realizada na Universidade Estadual de Maringá. Para isso, os formulados foram diluídos até a concentração de $2,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (formulados dos corantes isolados) e $4,23 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (formulado misto) e transferidos para cubetas de quartzo, onde foram analisados em triplicata.

4.2.6 Estudo de efeitos de Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET).

Para determinar a presença ou ausência de FRET (do inglês, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre os fotossensibilizadores foram utilizados os estoques de Protoporfirina IX em DMSO e Azure A em água. Em um primeiro teste, alíquotas crescentes do estoque de PPIX foram adicionadas em 2,0 mL do formulado branco totalizando as seguintes concentrações: $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Cada adição foi seguida da leitura dos espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 407 \text{ nm}$). Adicionalmente os mesmos volumes de PPIX foram adicionados em uma cubeta contendo 2,0 mL do formulado branco e $2,20 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de Azure A, seguidos novamente da leitura dos espectros de emissão com excitação no mesmo comprimento de onda. Todos os experimentos foram realizados com temperatura controlada ($30,0^\circ\text{C}$) e cada espectro foi retirado após 1 minuto de estabilização da mistura.

4.2.7 Determinação da eficiência fotodinâmica química (γ_{Δ})

Os ensaios para determinação da eficiência fotodinâmica química foram realizados na Universidade Estadual de Maringá, seguindo a metodologia proposta por Rabello (2011). De forma breve, o método consiste na adição de ácido úrico (AU, sequestrante de oxigênio singlete) à solução dos formulados e, após o tempo de estabilização deste nas micelas, inicia-se a iluminação. Para tal utilizou-se um conjunto com seis LEDs com máximo de emissão em 642 nm (na região onde os FS absorvem) e potência média de 9,5 mW. As cinéticas de decaimento do AU foram ajustadas considerando queda monoexponencial e o número de fótons absorvidos (N_{Abs}) pelos FS foram calculados de acordo com a Equação 3:

$$N_{Abs} = \frac{1}{h.c.Na} \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P_{Abs(\lambda)} \cdot e^{-k_{FB}t} d\lambda dt \quad (3)$$

onde c é a velocidade da luz ($2,997 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$), λ é o comprimento de onda, e Na é o número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), h a constante de Planck

($6,626 \times 10^{-34} \text{ Js}$), $\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P_{em(\lambda)} d\lambda$ representa a potência emitida em cada comprimento de

onda e k_{FB} é a constante de fotobranqueamento do FS.

Para o cálculo da eficiência fotodinâmica química utilizou-se a Equação 4:

$$\gamma_{\Delta} = \frac{k}{N_{Abs}} \quad (4)$$

Onde k é a constante de velocidade de decaimento do AU.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Formulação dos fotossensibilizadores no copolímero P-123

Inicialmente os formulados foram preparados com $[PPIX] = 1,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $[AzA] = 1,35 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $[P-123] = 8,62 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (0,5% m/v). Os compostos foram então solubilizados em 25,0 mL de etanol, sendo que os dois formulados contendo a Protoporfirina IX tiveram que ser sonicados por meia hora para completa solubilização. Após a etapa de rotaevaporação não se observou nenhum material particulado no filme indicando, a princípio, a completa solubilização de ambos FS. Contudo, após a reidratação notou-se que os balões contendo a PPIX apresentavam-se turvos, um indicativo da presença de agregados e possíveis precipitados. Os espectros de absorção e fluorescência (não mostrados) confirmaram as suspeitas. Conforme Leuner e Dressman (2000), para eficácia do método de dispersão sólida é preciso que todos os compostos sejam suficientemente solúveis em um mesmo solvente. Sendo assim, foram avaliados outros solventes orgânicos em busca de um que fosse eficiente na solubilização dos três compostos. Dentre os solventes testados: acetato de etila, diclorometano, clorofórmio, éter e metanol, o último foi o único que se mostrou adequado, solubilizando ambos os corantes e o copolímero.

Buscando garantir a encapsulação das moléculas dos corantes e devido a pouca quantidade de PPIX disponível, as concentrações de cada composto foram recalculadas de forma que a proporção final totalizasse 1 fármaco por micela nos formulados isolados, e 2 fármacos por micela no misto. Sendo assim, a concentração final dos formulados nas formas isoladas foi de $4,23 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e do formulado misto $8,46 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, todos contendo $0,0103 \text{ mol L}^{-1}$ de P-123. Durante o preparo dos formulados em metanol, notou-se que as soluções contendo o corante Azure A formaram filmes avermelhados, mas que retornaram à coloração azul quando reidratados com solução aquosa.

Para as análises seguintes, é importante ressaltar que os estudos espectrais dos compostos foram realizados sempre através da banda em 630nm para o

composto Azure A e em 407nm para a Protoporfirina IX (banda de Soret), uma vez que no formulado misto existe sobreposição das bandas em 630nm.

A caracterização dos formulados foi feita através da comparação dos espectros de absorção dos mesmos com seus respectivos corantes na forma pura (estoque). Essa comparação, ilustrada pela Figura 7, sugeriu que os fotossensibilizadores encontravam-se na forma monomérica, uma vez que não apresentaram alargamento de bandas ou formação de bandas adicionais, variações características de agregados. No entanto, mesmo não encontrando alterações espectrais significativas, experimentos envolvendo temperatura também foram realizados para confirmar a ausência de autoagregação.

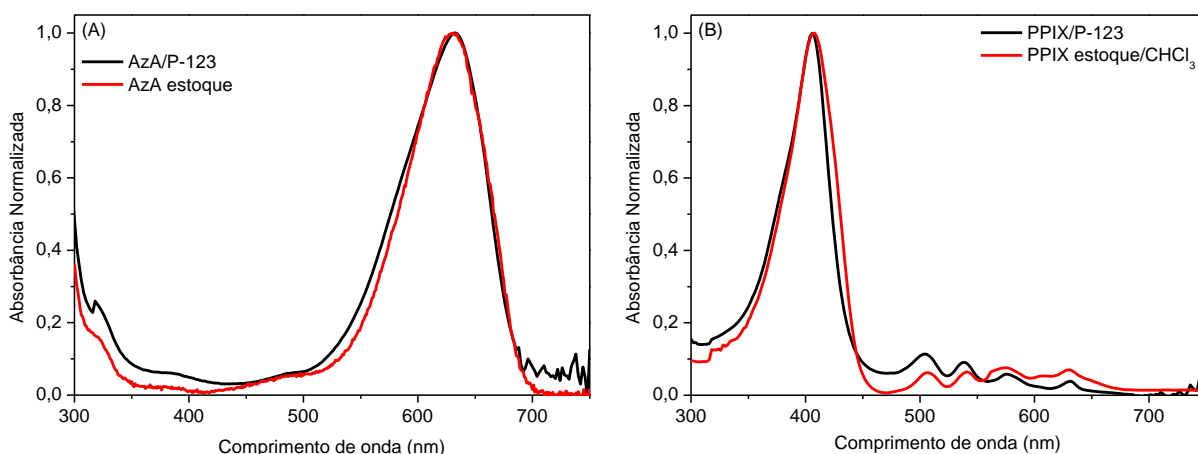


Figura 7: Sobreposição dos espectros de absorção (A) Formulado AzA/P-123 e solução estoque de Azure A em água ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (B) Formulado PPIX/P-123 e solução estoque de Protoporfirina IX ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$). Dados normalizados.

Altas temperaturas tendem a desfazer possíveis agregados, indicando a presença destes quando o aumento da temperatura levar também a um aumento da absorbância. Além de possibilitar a compreensão de propriedades físico-químicas influenciadas pela temperatura, como os processos de autoagregação dos fotossensibilizadores, a avaliação de estabilidade térmica é relevante uma vez que o sistema fármaco/micela pode sofrer uma série de variações de temperatura até o ato da administração. Micelas poliméricas também podem sofrer alterações induzidas diretamente pela temperatura, como: dissociação, mudança no grau de hidratação do core e da corona e microviscosidade. (CAMPANHOLI, 2014).

Diante desse contexto, a estabilidade dos formulados foi analisada através dos espectros de absorção, nas temperaturas de 30,0°C e 50,0°C. Conforme pode ser observado na Figura 8, a variação de temperatura do sistema não causou grandes variações espectrais, fato que indica a estabilidade dos formulados em ambas as condições.

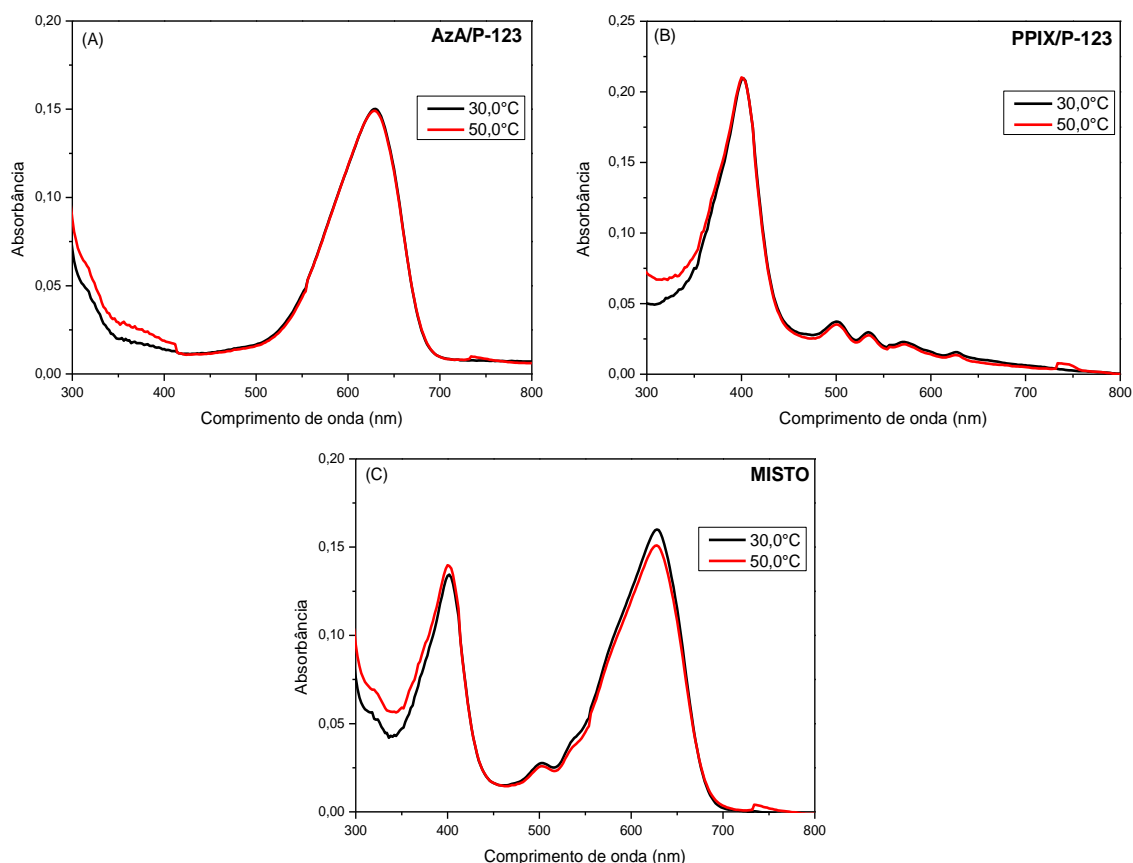


Figura 8: Sobreposição dos espectros de absorção nas temperaturas de 30,0°C (linha contínua preta) e 50,0°C (linha contínua vermelha). (A) Formulado AzA/P-123 ($2,95 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹); (B) Formulado PPIX/P-123 ($2,95 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹); (C) Formulado AzA/PPIX/P-123 ($5,90 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹).

5.2 Determinação da localização dos fotossensibilizadores na micela polimérica.

As micelas poliméricas normalmente são estruturadas em forma esférica, de modo que os grupos PO formam a estrutura interna, chamada “core”, e os grupos EO formam a “corona” com caráter hidrofílico. Compostos altamente hidrofóbicos são encapsulados no core da micela polimérica, por possuírem maior interação com os grupos PO.

A localização dos compostos PPIX e AzA em micelas de P-123 foi avaliada a partir dos experimentos de supressão de fluorescência utilizando-se como supressor o íon iodeto, uma sonda aquossolúvel. Os experimentos foram realizados da seguinte forma: formulado AzA/P-123 $\lambda_{exc} = 570\text{nm}$, formulado PPIX/P-123 $\lambda_{exc} = 407\text{nm}$ e formulado misto $\lambda_{exc} = 570\text{nm}$ e $\lambda_{exc} = 407\text{nm}$ para avaliar os dois fotossensibilizadores.

A Figura 9 ilustra as sobreposições de espectros de emissão de fluorescência em várias concentrações de iodeto (NaI).

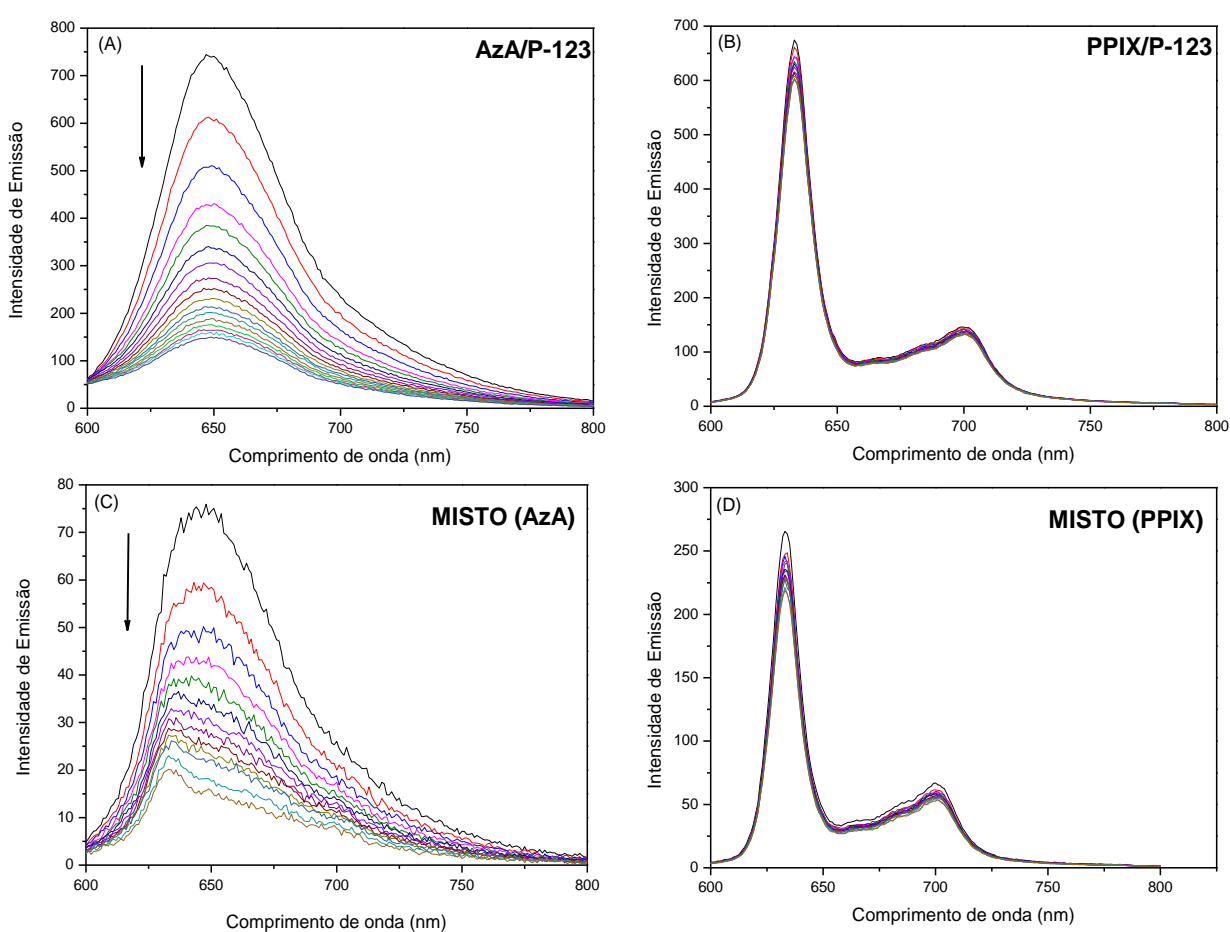


Figura 9: Sobreposição de espectros de emissão de fluorescência com o aumento da [I-]. As setas indicam as variações observadas com a adição de iodeto. (A) Formulado AzA/P-123 com $\lambda_{exc}=570\text{nm}$; (B) Formulado PPIX/P-123 com $\lambda_{exc}=407\text{nm}$; (C) Formulado misto com $\lambda_{exc}=570\text{nm}$; (D) Formulado misto com $\lambda_{exc}=407\text{nm}$. T= 30,0°C.

Analisando-se a Figura 9 é possível constatar que os íons iodeto suprimem energia do AzA, entretanto o mesmo fenômeno não é observado para a PPIX, uma

vez que seus espectros de emissão permanecem quase inalterados. Os dados de supressão de fluorescência foram analisados utilizando-se a Equação 2, que resulta nos plots de Stern-Volmer representados abaixo (Figura 10).

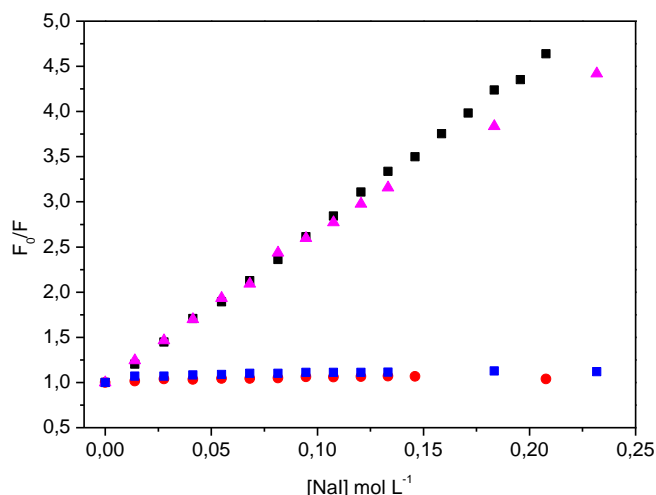


Figura 10: Plots de Stern-Volmer para os formulados em P-123. [AzA] = $2,95 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹; [PPIX] = $2,95 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹; [P-123] = $7,20 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹; 30,0°C. (■) Formulado AzA/P-123, $\lambda_{exc}=570$ nm; (●) Formulado PPIX/P-123, $\lambda_{exc}=407$ nm; (▲) Formulado misto, $\lambda_{exc}=570$ nm; (■) Formulado misto, $\lambda_{exc}=407$ nm.

Os dados apresentaram boa linearidade indicando que os mesmos se ajustam ao modelo proposto. A inclinação das retas acima fornece os valores de constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) que são indicados na Tabela 1:

Tabela 1: Constantes de Stern-Volmer dos formulados. T=30,0°C.

Formulado	Ksv
AzA/P-123 ($\lambda_{exc}=570$ nm)	17,60±0,11
PPIX/P-123 ($\lambda_{exc}=407$ nm)	0,236±0,076
Misto ($\lambda_{exc}=570$ nm)	14,99±0,35
Misto ($\lambda_{exc}=407$ nm)	0,390±0,095

Os valores de K_{sv} demonstram que o Azure A é mais susceptível à supressão dos íons iodeto, indicando que está na região mais externa e hidrofílica da micela composta por unidades de EO. A literatura sugere que esta porção da micela pode conter água, e nesse caso, permitir a acessibilidade dos íons iodeto (KABANOV; ZHU; ALAKHOV, 2005). De forma contrária, a Protoporfirina IX teve sua fluorescência minimamente suprimida, o que indica que a mesma se encontra na

parte mais interna da micela, porém ainda um pouco acessível aos íons iodeto. Pode-se ainda inferir que no formulado misto o Azure A possa estar ligeiramente mais internalizado na micela e por isso tenha uma menor supressão pelo iodeto, fato que sugere que a formulação deste na presença da PPIX pode alterar sua distribuição na micela.

5.3 Caracterização do tamanho das partículas dos formulados isolados e na forma mista.

O diâmetro das partículas foi determinado através de espalhamento de luz dinâmico (DLS), técnica que, baseada nos conceitos de “Movimento Browniano” e “Efeito Doppler”, calcula uma distribuição estatística de tamanho dentre uma população de partículas (GOLDBURG, 1999).

Os formulados foram diluídos até a concentração de $2,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (puros) e $4,23 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (misto). A diluição um pouco maior foi necessária, pois o laser do equipamento emite no mesmo comprimento de onda em que os compostos absorvem.

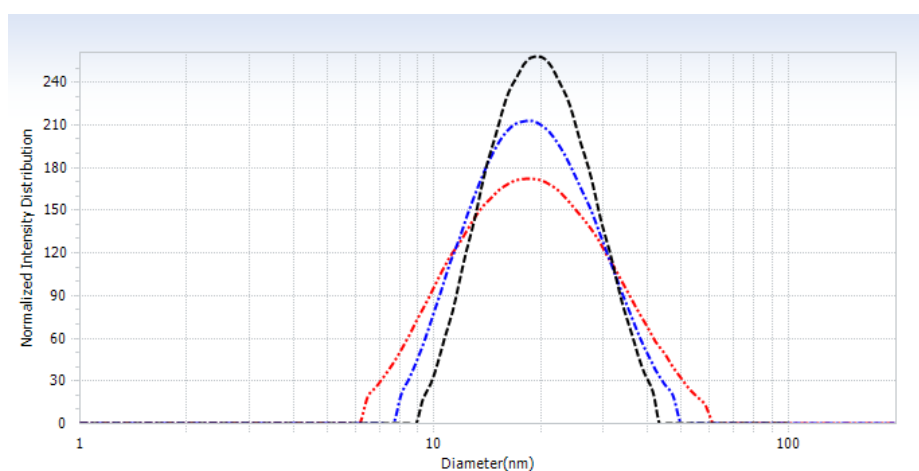


Figura 11: Sobreposição das distribuições de tamanho das partículas do formulado “branco”. [P-123]= $5,15 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $30,0^{\circ}\text{C}$.

A Figura 11 ilustra a triplicata realizada para o formulado que contém apenas o copolímero P-123. A sobreposição das distribuições fornece um tamanho médio de

partículas de 20 nm, valor que está de acordo com o encontrado na literatura para o mesmo surfactante (BHARATIYA et al., 2008). O tamanho médio para os demais formulados segue descrito na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2: Tamanho das partículas dos formulados. T=30,0°C

Formulado	Tamanho médio
P-123	20 nm
AzA/P-123	23 nm
PPIX/P-123	28 nm
Misto	51 nm

Os resultados demonstraram uma pequena variação quando há a encapsulação apenas do Azure A. Isso pode ser justificado por sua localização na micela, uma vez que a corona (grupos EO) é a parte mais “fluida” da estrutura micelar e aparentemente se molda para acomodar o composto. A diferença maior causada pela entrada da PPIX se dá devido a diferenças estruturais, já que esse corante possui grupos volumosos e por isso apresenta uma maior estrutura quando comparado ao Azure A. Além disso, a PPIX é altamente hidrofóbica e viu-se no item acima que se encontra próxima ao core da micela, local que deve se expandir/modelar para acomodar o fármaco. Por fim, é interessante notar que o tamanho da partícula no formulado misto é exatamente a soma dos tamanhos dos formulados isolados. Esse valor sugere que para a encapsulação dos dois fármacos a micela já não se molda de forma tão simples, mas que precisa se reestruturar e assim aumenta significativamente de tamanho.

O tamanho das partículas (20-50nm), em especial àquelas constituintes do formulado misto, é adequado à formulações voltadas para o tratamento de doenças com crescimento desordenado de células. Partículas dessa magnitude têm seu acúmulo preferencial em células cancerígenas pelo efeito EPR (do inglês, *enhanced permeability and retention*) (KHAN, 2010). Assim, no tocante ao tamanho, a formulação mista é vantajosa quando comparada aos formulados isolados.

5.4 Estabilidade temporal e carregamento dos fotossensibilizadores nas micelas de P-123.

Levando em conta as características de cada fotossensibilizador e as concentrações de cada formulado, a taxa de carregamento dos corantes na micela foi avaliada através de espectros de absorção e solventes que desfazem a estrutura micelar. Esse experimento foi realizado no intuito de analisar a eficiência de encapsulação dos sistemas preparados.

Para avaliar a taxa de carregamento da Protoporfirina IX, utilizou-se o solvente clorofórmio que destrói a micela e solubiliza apenas este fotossensibilizador. Já para avaliar o carregamento do Azure A, foi utilizado o etanol com a mesma função, porém solubilizando apenas o fenotiazínico.

O teste realizado logo após o preparo dos formulados resultou nos dados a seguir. Para o formulado AzA/P-123, uma quantidade de 81% do corante havia sido “carregada”, ou seja, estava na micela. Da mesma forma, o sistema misto foi testado em etanol, para se analisar a encapsulação do AzA, resultando em um valor de 87%. Já para o sistema PPIX/P-123, foi encontrada uma porcentagem de carregamento de 96%, enquanto no misto esse valor para a PPIX foi de 83%.

Com os valores de carregamento a estabilidade temporal dos formulados foi sendo monitorada durante todo o tempo de realização deste trabalho. Esse acompanhamento da dinâmica dos formulados se mostra importante para monitorar aspectos de reorganização da micela e possível liberação dos fármacos com o passar do tempo. É importante ressaltar que após 90 dias os formulados de PPIX isolada e o misto apresentavam pequenos particulados em solução. Assim, para a análise destes as alíquotas eram cuidadosamente retiradas da parte homogênea da solução e filtradas (membrana de fluoreto de polivinilideno, tamanho de poro de 0,22 μ m).

Conforme ilustra a Figura 12 o formulado contendo o AzA puro mostra-se estável com o tempo, mesmo após 111 dias. Por outro lado, o formulado contendo a PPIX isolada mostrou-se estável por 30 dias. A partir desse tempo a quantidade de FS na micela foi diminuindo gradativamente, o que mostra que mesmo na presença de micelas de P-123 o processo de autoagregação não é completamente evitado.

Contudo, mesmo após 111 dias da confecção do formulado ainda restam aproximadamente 50 % da PPIX na forma monomérica.

No formulado misto a estabilidade temporal de ambos os FS mostrou-se semelhante àquela observada quando os mesmo são formulados isoladamente, fato que sugere os FS comportam-se de maneira independente quanto á estabilidade dentro da micela, isto é, sem qualquer efeito sinérgico ou antagônico. Este fato é condizente com a diferente localização dos FS na micela.

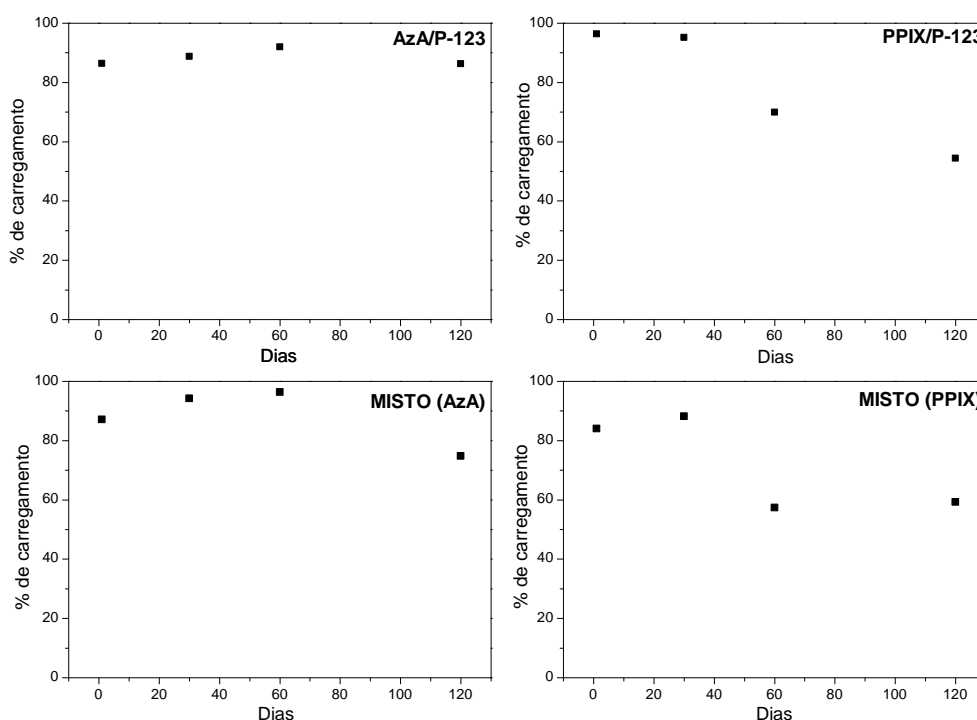


Figura 12: Estabilidade temporal dos formulados incorporados em micelas de P-123. (A) Formulado AzA/P-123 em etanol ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (B) Formulado PPIX/P-123 em clorofórmio ($2,95 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (C) Formulado misto em etanol ($5,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); (D) Formulado misto em clorofórmio ($5,90 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

5.5 Estudos da influência da Força Iônica na estabilidade dos compostos formulados no copolímero P-123.

É bem estabelecido na literatura que a presença de sais em solução é um fator experimental que favorece o processo de autoagregação de fotossensibilizadores

(WU, J. et al., 2008). Sendo assim, para avaliar a estabilidade dos formulados preparados, avaliou-se o comportamento dos mesmos frente a diferentes concentrações de cloreto de sódio (Figura 13).

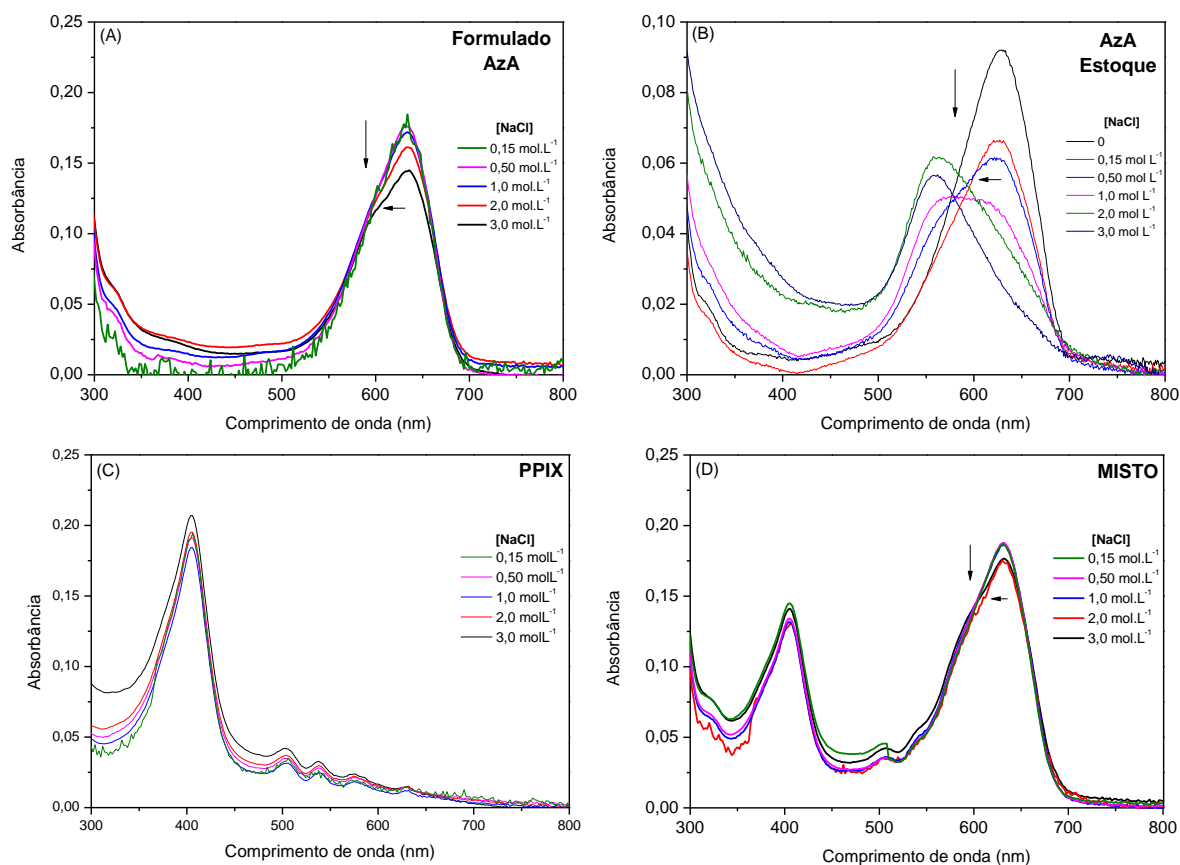


Figura 13: Sobreposição dos espectros de absorção em diferentes concentrações de NaCl. As setas indicam as variações observadas com o aumento de [NaCl]. (A) Formulado AzA/P-123 ($2,95 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹); (B) Solução AzA/H₂O ($2,95 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹); (C) Formulado PPIX/P-123 ($2,95 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹); (D) Formulado AzA/PPIX/P-123 ($5,90 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹). T=30,0°C

Independente do sistema avaliado não foram verificadas variações significativas no perfil de absorção dos compostos até 1,0 mol L⁻¹ de NaCl, indicando a estabilidade das formulações nessas condições. Do ponto de vista aplicado esse resultado é importante, uma vez que em condições fisiológicas a concentração de eletrólitos pode chegar a aproximadamente 0,15 mol L⁻¹.

A PPIX isolada (Figura 13C) mostrou-se estável, mesmo quando altas concentrações de sal foram adicionadas, o que reforça a localização mais interna deste FS na micela. Mesmo no formulado misto não se observa variação espectral significativa da banda referente a este FS (banda Soret, 407nm).

No caso do AzA a elevação da concentração de sal causa redução da banda de monômeros (630nm) e surgimento simultâneo de banda em 590nm, relativa a presença de autoagregados conforme já relatado na literatura (GILANI, GHORBANPOUR, SALMANPOUR; 2013). Tais alterações são observadas a partir de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Adicionalmente, o mesmo experimento foi realizado para a solução estoque de AzA (Figura 13B) que se mostrou muito mais susceptível à autoagregação, como pode ser observado pela predominância da banda em 590nm quando em maiores concentrações de NaCl. Esse dado demonstra que no formulado AzA/P-123 uma quantidade significativa do fotossensibilizador encontra-se protegida pela micela.

A maior susceptibilidade de agregação do AzA (formulado), em comparação com a PPIX, advém de sua localização mais externa na micela, na chamada corona. Nesta região mais fluida da micela existem moléculas de água e, possivelmente, acessibilidade aos íons. Adicionalmente, a literatura reporta que a adição de grandes quantidades de sal pode levar a desidratação e reestruturação das micelas, o que eventualmente pode deixar o Azure A mais exposto ao meio rico em eletrólito. No caso do Azure A na formulação mista, o comportamento foi similar ao observado quando na forma isolada, novamente mostrando o comportamento independente dos fotossensibilizadores.

5.6 Estudo de efeitos de Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET).

Em formulados compostos por mais de um fotossensibilizador é importante se estudar possíveis efeitos de Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET). Essa transferência de energia não-radiativa pode ocorrer quando o espectro de emissão do doador se sobrepõe ao espectro de absorção do receptor, como é mostrado na Figura 14 (VALEUR, 2001). Entretanto para ocorrência de FRET além da condição supracitada outro pré-requisito é a proximidade de ambas as espécies.

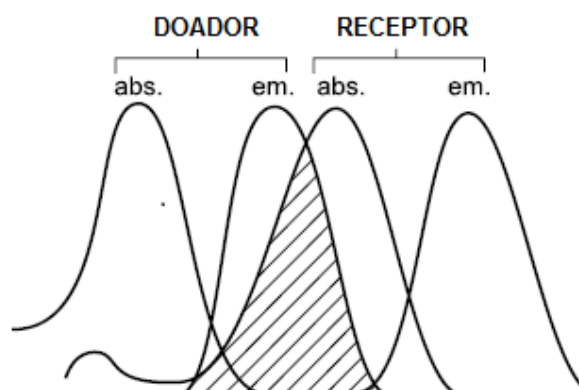


Figura 14: Ilustração da sobreposição entre os espectros de emissão do doador e de absorção do receptor.

Fonte: Adaptada de Valeur (2001).

A sobreposição dos espectros é verificada no formulado proposto nesse trabalho, uma vez que a PPIX excitada em 407nm emite em 630nm, região exata de absorção do Azure A. Dessa forma, a avaliação desse efeito é uma comprovação adicional da localização de ambos o FS. Para se avaliar a presença desse efeito foram retirados espectros de emissão de fluorescência da PPIX em diferentes concentrações, na ausência e na presença do Azure A. Para isso foram utilizados os estoques puros de cada corante e cubetas contendo 2,0mL do formulado branco contendo apenas P-123.

Percebe-se pela Figura 15 que os espectros de emissão de fluorescência da PPIX na ausência (A) e na presença (B) de Azure A possuem poucas diferenças e que a emissão em 630nm também se intensifica com o aumento da concentração de PPIX em ambos os casos. Essa característica demonstra que não há processo de FRET no formulado misto.

De acordo com Valeur (2001), a Teoria de Foster implica que a taxa de transferência de energia através de FRET é inversamente proporcional à distância entre doador e receptor elevada a sexta potência. Como já foi demonstrado que no formulado misto PPIX encontra-se no core e Azure A na corona da micela, essa distância entre os corantes impede ou minimiza fortemente os possíveis efeitos de transferência energética.

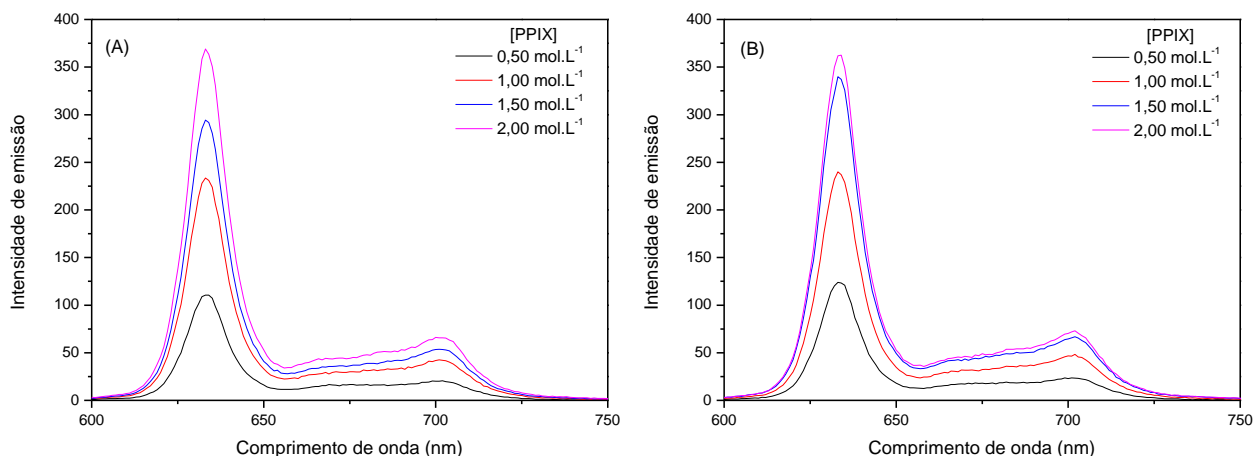


Figura 15: Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência com variação da [PPIX]. (A) ausência de Azure A; (B) Presença de Azure A, [AzA]= $2,20 \times 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$; [P-123]= $7,18 \times 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$, 30,0°C.

5.7 Determinação da Eficiência Fotodinâmica Química. (γ_{Δ})

A avaliação indireta do rendimento quântico de oxigênio singleto se faz através do uso do Ácido Úrico como sensor químico, uma vez que este composto é forte sequestrante de $^1\text{O}_2$. Entretanto dada a grande diferença de absorvidade molar entre o Azure A e a PPIX, utilizaram-se concentrações diferentes dos FS a fim de manter, aproximadamente, a mesma absorbância na região de 630nm, onde a fonte de iluminação utilizada emite. Para garantir a completa estabilização do AU nas micelas de P-123 aguardou-se 40 minutos para iniciar a iluminação. Na fotoexcitação dos FS utilizou-se de um conjunto de seis dispositivos LED vermelho, com potência média de 9,5 mW. A Figura 16 ilustra o espectro de emissão do LED juntamente com o espectro de absorção do AU na presença do formulado misto. Observa-se que a iluminação ocorre apenas na região de comprimento de onda onde os fotossensibilizadores absorvem.

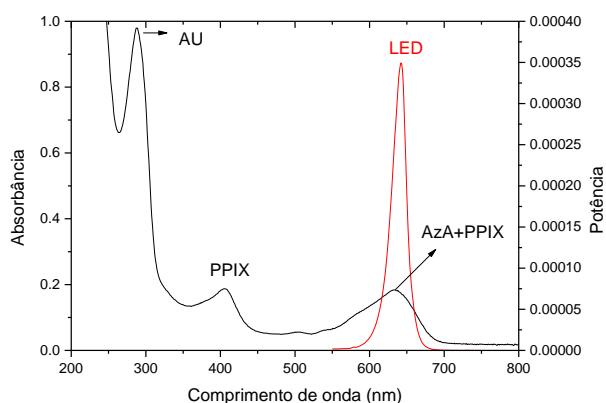


Figura 16: Espectro de absorção do AU + formulado misto (linha contínua preta) e emissão do LED (linha contínua vermelha).

A reação do $^1\text{O}_2$ com AU foi monitorada obtendo-se sucessivos espectros de absorção UV-Vis mostrados na Figura 17A e para análise toma-se a variação junto ao comprimento de onda de máxima absorção do AU (292nm), Figura 17B.

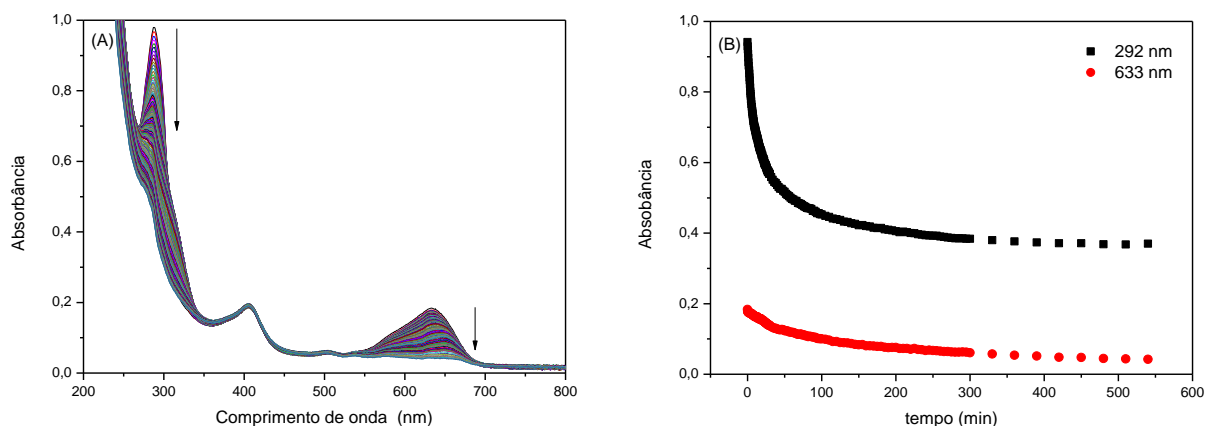


Figura 17: (A) Variação espectral do formulado AzA/PPIX/P-123 na presença de ácido úrico durante iluminação. (B) Cinéticas de decomposição do AU (■) e de fotobranqueamento (●).

Enquanto a PPIX mostrou-se fotoestável (não mostrado) o Azure A sofreu considerável fotobranqueamento (Figura 17A). Este fato não o impediu de gerar oxigênio singlete, como sugere a redução da banda do ácido úrico, em 292nm. No entanto, como o Azure A também possui banda de absorção em 290nm essa queda poderia ser resultante do fotobranqueamento do composto. Comprova-se então a geração de oxigênio singlete através de “ombro” gerado em torno de 312nm,

correspondente ao intermediário formado na degradação do ácido úrico. Para o ajuste cinético, foi aplicado à curva do ácido úrico o modelo exponencial de primeira ordem. Assim, a eficiência fotodinâmica química (γ_{Δ}) foi estimada pela Equação 4. Como a PPIX não sofreu reação de fotobranqueamento, o termo exponencial nesta equação é igual à unidade, já para os Azure A e a mistura este termo foi substituído pelas respectivas velocidades específicas de fotobranqueamento. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Eficiência dos formulados na formação de $^1\text{O}_2$ (γ_{Δ}), calculada através de Número de fótons absorvidos (N_{Abs}) e constante de velocidade de degradação (k_1).

Formulado	$k_{1_{292\text{nm}}} (\text{min}^{-1})$	$N_{\text{Abs}} (10^{-8} \text{ mol})^*$	$\gamma_{\Delta} (10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1})$
Azure-A	0,115	4,14	2,8
Misto	0,123	4,13	3,0
PPIX	0,068	4,10	1,7

*Tempo utilizado para os cálculos: 1800 s.

Como já ressaltado, em função da diferença de absorvidade entre o Azure A e a PPIX, na região de 630nm, optou-se por trabalhar com todos os sistemas com aproximadamente o mesmo número de fótons absorvidos.

Os dados da tabela mostram que a eficiência fotodinâmica química do Azure A e do sistema misto foram muito semelhantes, fato que nos leva a acreditar que na eficiência do misto a contribuição seja quase totalmente do fenotiazínico. Esse fato se deve à formulação do misto ter sido realizada através da mesma concentração de cada um dos corantes associada à alta absorvidade molar do Azure A em 630nm, significativamente maior que a da PPIX. Sendo assim, praticamente todos os fótons direcionados ao formulado misto foram absorvidos pelo Azure A.

Além disso, a justificativa para a baixa eficiência da PPIX isolada pode residir na localização mais interna da PPIX aliada à alta concentração de P-123 utilizada (6% m/v) o que pode prejudicar a difusão do oxigênio singleto e, conseqüentemente, em sua reação com o AU. De acordo com a literatura o oxigênio singleto é uma espécie muito lábil, com tempo de vida ao redor de 2 μs em meio aquoso, o que limita seu raio de ação à regiões de diâmetro não maiores do que a espessura da membrana celular (MACDONALD, I.J.; DOUGHERTY, T.J., 2001). Outro fator que pode ter prejudicado a formação de oxigênio singleto proveniente da

PPIX é sua autoagregação. Quando os experimentos foram realizados, a concentração de PPIX havia caído aproximadamente 50% e durante a realização dos experimentos observou-se elevação da linha base dos espectros, fato condizente com a presença de agregados grandes. Assim, a determinação correta da eficiência fotodinâmica química de sistemas envolvendo a PPIX foi prejudicada e esses resultados devem ser repetidos para melhor conclusão acerca da eficiência de formação de oxigênio singlete, principalmente no sistema misto o qual se esperaria efeito sinérgico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visto que ambos os compostos Protoporfirina IX e Azure A absorvem no comprimento de onda de 630nm, região de grande interesse para a Terapia Fotodinâmica, neste trabalho buscou-se a avaliação de um possível efeito sinérgico na formulação de um sistema misto. Além disso, levando em conta a alta hidrofobicidade da Protoporfirina IX e os estudos que demonstram as vantagens do uso de sistemas carreadores de fármacos, esse sistema misto e seus respectivos fotossensibilizadores isolados foram encapsulados em micelas poliméricas de P-123.

A formulação, realizada através da técnica de dispersão sólida, mostrou-se satisfatória, mantendo os fotossensibilizadores monomerizados durante todos os testes iniciais. Entretanto, após cerca de 30 dias observou-se queda na porcentagem de carregamento da PPIX, indicando que parte desta tenha se agregado.

Os testes de localização dos FS na micela polimérica confirmaram o que era esperado de acordo com a hidrofobicidade dos compostos. A PPIX, mais hidrofóbica, mostrou-se mais internalizada no sistema por possuir mais interações com grupos PO. Enquanto o Azure A, mais hidrofílico, localiza-se na corona, região mais externa da micela, provavelmente próximo à interface água/micela.

Ainda para avaliar a estabilidade dos sistemas, foram realizados estudos com variação de força iônica. Nesse caso, seja nos formulados isolados, seja no formulado misto não foram verificadas variações significativas até $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, indicando a estabilidade das formulações nessas condições. Esse resultado é relevante, pois em condições fisiológicas a concentração de eletrólitos pode chegar a aproximadamente $0,15 \text{ mol L}^{-1}$.

A eficiência de um composto como fármaco em TFD está estritamente relacionada à sua capacidade de gerar oxigênio singleto. Assim, a avaliação indireta desse fator foi avaliada uso do ácido úrico como sensor químico, uma vez que este composto é forte sequestrante de $^1\text{O}_2$. A eficiência fotodinâmica química não apresentou o efeito sinérgico esperado para o composto misto, indicando contribuição apenas do Azure A, o que pode ser associado à grande diferença de absorvidade molar dos compostos no comprimento de onda avaliado. Nos

formulados isolados, a baixa eficiência da PPIX deve-se à sua localização mais interna combinada a alta concentração de P-123, o que pode ter dificultado a difusão do oxigênio singlete para o exterior da micela. Além disso, o teste foi realizado em um período de tempo onde já haviam indícios de autoagregação da PPIX, fator que também diminui drasticamente a eficiência fotodinâmica de um fármaco.

De modo geral, o formulado misto apresentou boas características e estabilidade durante os estudos. No entanto, os testes de eficiência fotodinâmica e a aplicação dos formulados em meio biológico foram prejudicados pelo efeito temporal e possível autoagregação da PPIX, indicando que os mesmos precisam ser refeitos para uma melhor compreensão do efeito resultante da combinação dos fármacos.

7 REFERÊNCIAS

ACEDO, P. et al. Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. **Cell Death and Disease**, v.5, p. 1-12, 2014.

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J.F.; HATTON, T.A. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propyleneoxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. **Macromolecules**, v.27, p. 2414-2425, 1994.

BHARATIYA, B. et al. The effects of salts and ionic surfactants on the micellar structure of tri-block copolymer PEO-PPO-PEO in aqueous solutions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.29, p.696-701, 2008.

BRAGA, G. **Propriedades Físico Químicas do Fenotiazínico Azul de Ortotoluidina em sistemas homogêneos e copoliméricos de P-123 e F-127**. 2014. 169 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

BRAGA, G. et al. Autoagregação da 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina (TMPP): estudos espectroscópicos e análises multivariadas. **Química Nova**, v.37, n.4, p.648-652, 2014.

CAMPANHOLI, K.S.S. **Estudos das propriedades físico-químicas e fotodinâmicas dos derivados da clorofila a e lapachol em sistemas homogêneos e incorporados, na forma mista, nos copolímeros micelares Pluronic® P-123 e F-127**. 2014. 173f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

CASTANO, A.P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews**, v.6, p.535-545, 2006.

CELLI, J.P. et al. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms monitoring, and optimization. **Chemical Reviews**, v.110, n.5, p.2795-2838, 2010.

CRUZ, T.S. et al. On the mechanisms of phenothiazine-induced mitochondrial permeability transition: thiol oxidation, strict Ca^{2+} dependence, and cyt c release. **Biochemical Pharmacology**, v.80, p. 1284-1295, 2010.

FALK, J.E. Chromatography of porphyrins and metalloporphyrins. **Journal of Chromatography**, v.5, p.277-299, 1961.

GEROLA, A.P. et al. Estudos quimiométricos da pheo formulada em pluronics®: ação fotodinâmica sobre artemia salina. **Química Nova**, v.36, n.1, p.97-101, 2013.

GILANI, A.G.; GHORBANPOUR, T.; SALMANPOUR, M. Additive effect on the dimer formation of thiazine dyes. **Journal of Molecular Liquids**, v.177, p.277-282, 2013.

GOLDBURG, W.I.; Dynamic Light Scattering. **American Journal of Physics**, v.12, p.1152-1160, 1999.

JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in surgery and Medicine**, v.38, p.468-481, 2006.

KABANOV, A.V. et al. Pluronic® block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 223-233, 2002.

KABANOV, A.V.; ZHU, J.; ALAKHOV, V. Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. **Advances in Genetics**, v.53, p.231-261, 2005.

KASHA, M.; RAWLS, H.R.; EL-BAYOUMI, M.A. The exciton model in molecular spectroscopy. **Pure and Applied Chemistry**, v.11, n.3, p. 371-392, 1965.

KHAN, D.R. The use of nanocarriers for drug delivery in cancer therapy. **Journal of Cancer Science and Therapy**, v. 2, n.3, p.58-62, 2010.

KONAN, Y.N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.66, p. 89-106, 2002.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, 3^a Ed., Singapore, Springer, 2006.

LEUNER, C.; DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.47-60, 2000.

MACDONALD, I.J.; DOUGHERTY, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of porphyrins and phthalocyanines**, v.5, p105-129, 2001.

MACHADO, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p. 237-243, 2000.

MICHAEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. **Science**, v.123, p.464, 1956.

MILGROM, L.R. **The Colours of Life: na introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds**. New York: Oxford University Press, 1997.

MOREIRA, L. M. et al. Azure dyes as new photosensitizer prototypes to application in photodynamic therapy against *Candida* spp. **Spectroscopy**, v.24, p.621-628, 2010.

ORMOND, A.B.; FREEMAN, H.S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, v.6, p.817-840, 2013.

PÁRKÁNYI, C.; BONIFACE, C. A quantitative study of the effect of solvent on the electronic absorption and fluorescence spectra of substituted phenothiazines: evaluation of their ground and excited singlet-state dipole moments. **Spectrochimica Acta**, v. 49^a, n.12, p. 1715-1725, 1993.

PERUSSI, J. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v.30, n.4, p.988-994, 2007.

RABELLO, B.R. **Desenvolvimento de metodologia para determinação quantitativa de oxigênio singlete de princípios ativos fotodinâmicos**. 2011. 96f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

SABNIS, R.W. **Handbook of Biological Dyes and Stains: synthesis and industrial applications**. New Jersey: Wiley, 2010.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v.25, n.5, p.801-807, 2002.

SCHIRMER, R.H. et al. "Lest we forget you – methylene blue..." **Neurobiology of Aging**, v. 32, p. 7-16, 2011.

STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v.54, p.4151-4202, 1998.

TESSARO, A.L. **Estudos comparativos de regioisômeros de benzoporfirinas em meio homogêneo e heterogêneo**. 2010. 108 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

TESSARO, A.L. et al. Stability of benzoporphyrin photosensitizers in water/ethanol mixtures: pKa determination and self-aggregation processes. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v.24, p.155-161, 2011.

TESSARO, A.L. et al. Influences of experimental parameters of the stability of a benzoporphyrin drug in water/ethanol mixtures: a statistical approach investigation. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.9, p.609-616, 2005.

TSUBONE, T.M. et al. Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.25, n.5, p.890-897, 2014.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence Principles and Applications**. Weinheim: Wiley, 2001.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, p.13-28, 1998.

_____. Phenothiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. **Dyes and Pigments**, v. 73, p. 7-12, 2007.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. **Macromolecules**, v.27, p.4145-4159, 1994.

WU, J. et al. J-Aggregates of Diprotonated Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin Induced by Ionic Liquid 1-Butyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate. **Journal of Physical Chemistry B**, v.112, p.8134-8138, 2008.