



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E
MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Yasmin Serpa Gomes

Sistemas de liberação mistos vetorizados para moléculas fotoativas: efeitos de auto-organização e fotoproteção

Florianópolis
2021

Yasmin Serpa Gomes

Sistemas de liberação mistos vetorizados para moléculas fotoativas: efeitos de auto-organização e fotoproteção

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Passarella Gerola.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Ferreira Affeldt.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra

Gomes, Yasmin Serpa
Sistemas de liberação mistos vetorizados para moléculas
fotoativas: efeitos de auto-organização e fotoproteção /
Yasmin Serpa Gomes ; orientador, Adriana Passarella
Gerola, coorientador, Ricardo Ferreira Affeldt, 2021.
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Química. 2. Fotoquímica; Sistema de liberação; Polímero,
Fotoproteção. I. Passarella Gerola, Adriana . II. Ferreira
Affeldt, Ricardo . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Yasmin Serpa Gomes

Sistemas de liberação mistos vetorizados para moléculas fotoativas: efeitos de auto-organização e fotoproteção

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Vanderlei Gageiro Machado, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.(a) Tayana Mazin Tsubone, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Lizandra Czermainski Bretanha, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em química.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Dr.^a Adriana Passarella Gerola
Orientadora

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado à minha mãe e às mulheres que lutaram antes de mim e possibilitaram que hoje eu me tornasse quem eu nasci para ser.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, minha mãe Leila, meu pai Vanderlei, meus irmãos Luan e Renan e meu pai de coração Paulo. Em tudo que faço eu sinto a força e coragem que me ensinaram. Sem vocês eu não teria vindo para Florianópolis há tantos anos atrás e a filha e irmã que sou têm um imenso orgulho de vocês. À ti, todo meu amor e minhas conquistas.

Às todas as minhas amigas e amigos, principalmente à Ana, Agnes, Bianca e Marcela, que estiveram desde o segundo em que descobri que trilharia esta jornada e permanecem ao meu lado através das adversidades. São mulheres com as quais aprendo todos os dias, admiro e sou imensamente grata por tê-las em meu caminho. Obrigada por me ensinarem o quanto o amor é um ato revolucionário. Este trabalho e meu coração são de vocês.

Às minhas companheiras e companheiros de pesquisa do LACFI que com todos os perrengues seguem firme na tarefa difícil de ser cientista. Ao Will, Lari, Jenni, Pati, Catiu e todas as outras pessoas que conviveram comigo mais do que qualquer um neste período, vocês foram essenciais; amo vocês do fundo do coração e desejo todo o sucesso do mundo.

Ao meu anjo da guarda e orientadora neste trabalho, prof^a Dr^a Adriana, que se tornou minha grande amiga há muitos anos e pude ver se tornar a grande professora que sempre esteve destinada a ser; que sempre me apoiou e aconselhou nos momentos que mais precisei. Obrigada, de todo meu coração, por ter sido minha parceira neste período. Não poderia ter sido qualquer outra pessoa.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Ricardo, que sempre se mostrou muito solícito e gentil; a profissional que quero ser se espelha muito em você. Ao professor Faruk Nome (*in memoriam*), que viu em mim o potencial para estar neste momento defendendo este trabalho em seu nome.

Às forças espirituais que me fortaleceram nos momentos mais difíceis e de dúvida. À Deus que, como diz Chico César, sempre me protegeu de mim; da maldade de gente boa; da bondade das pessoas ruins e me governou, me guardou e me iluminou.

Ainda, agradeço à UFSC, ao CNPQ e ao INCT-Catálise pela infraestrutura e apoio financeiro.

*Nestes tempos difíceis, mais do que nunca:
“Eu luto e não me rendo, caio e não me vendo
Não recuo nem em pensamento
Sigo em movimento, que pra mim é natural
De resistência cultural”*

(Marcelo Maldonado Peixoto, Vinicius Leonard Moreira e Helio Bentes)

RESUMO

Em busca de fotossensibilizadores (FS) para aplicação na Terapia Fotodinâmica (TFD), neste trabalho foi obtido o derivado de clorofila *a* (feoforbídeo *a* - Pheid) a partir de matéria-prima natural e foi realizada subsequente metalação com Zn para obtenção do Zn-Pheid. As moléculas obtidas foram avaliadas quanto a propriedades fotofísicas e fotoquímicas em meio homogêneo e sistemas de liberação nanoestruturados. A análise dos FS em meio homogêneo demonstra que a interferência de interações não específicas e específicas com o solvente produziu diferenças significativas nos espectros de absorção UV-Vis, deslocamento de Stokes e rendimento quântico de fluorescência. Solventes nos quais os FS encontram-se autoagregados levaram a menores valores de coeficiente de absorvidade molar, rendimento quântico de fluorescência e tempo de vida de fluorescência. A presença do metal coordenado ao anel clorínico para o Zn-Pheid possibilitou a formação de estruturas auto-organizadas do FS, sendo que em clorofórmio propõe-se a complexação intramolecular do carboxilato com o metal central, enquanto em água tem-se a complexação intermolecular do carboxilato de uma molécula com o metal de outra. Em comparação ao Pheid, a presença do metal determinou a menor fotoestabilidade do Zn-Pheid nos diferentes solventes avaliados, sendo que em água, meio adequado para aplicações biológicas, o rendimento quântico de fotobranqueamento foi muito alto. Ainda, foi desenvolvido o sistema de *drug delivery* misto baseado no fosfolípídeo dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) e polímero Pluronic® PF-127 vetorizado com ácido fólico (PFA). A funcionalização do polímero foi confirmada por ¹H-RMN, e análise térmica. Os sistemas de liberação mistos DPPC/PF-127 e DPPC/PFA apresentaram tamanhos na ordem de 10-20 nm na presença e ausência do FS, o que é interessante para aplicação *in vivo* devido ao efeito de *enhanced permeation and retention* (aumento de permeação e retenção, em tradução livre). A internalização dos FS nos sistemas de liberação possibilitou a monomerização destes e alterações nas propriedades fotofísicas a diferir do sistema a qual foi incorporado. Os resultados de fotobranqueamento nos sistemas de liberação evidenciam diferenças quando se relaciona a monomerização dos FS e a fotoproteção. Para o Pheid a monomerização possibilitou a diminuição do efeito de autossupressão de energia em meio aquoso, favorecendo os processos fotoinduzidos, incluindo o fotobranqueamento, enquanto para o Zn-Pheid a monomerização no sistema de liberação resultou em uma intensa fotoproteção no sistema de liberação, sendo que esta fotoproteção foi mais intensa na presença do polímero funcionalizado com ácido fólico. Assim, os sistemas de liberação obtidos mostram-se promissores para a aplicação dos FS em aplicações fotodinâmicas futuras, atuando tanto na fotoproteção do FS como na vetorização ativa deste visando a maior seletividade do tratamento.

Palavras-chave: Feoforbídeo; Fotoquímica; Sistema de liberação; Polímero, Fotoproteção.

ABSTRACT

In the search of photosensitizers (FS) for application in Photodynamic Therapy (PDT), in this work the chlorophyll a derivative (pheophorbide a - Pheid) was found from natural raw material, in which subsequent metallation was performed with Zn to obtain Zn-Pheid. Those molecules were evaluated for its photophysical and photochemical properties in homogeneous media and nanostructured delivery systems. The FS analysis in homogeneous medium demonstrates that the interference of non-specific and specific interactions with the solvent produced significant differences in the UV-Vis absorption spectra, Stokes shift and fluorescence quantum yield. Solvents in which the FS were encountered self-aggregated led to lower values of molar absorptivity coefficient, fluorescence quantum yield and fluorescence lifetime. The presence of the metal coordinated to the chlorinic ring for Zn-Pheid enabled the formation of self-organized structures of the FS, and in chloroform an intramolecular complexation of the carboxylate with the central metal is proposed, while in water there is an intermolecular complexation from carboxylate moiety from one molecule with the metal of another. Compared to Pheid, the presence of the metal determined the lower photostability of Zn-Pheid in the different solvents evaluated, and in water, a suitable medium for biological applications, the photobleaching quantum yield was very high. Furthermore, a mixed drug delivery system based on the phospholipid dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and Pluronic® PF-127 polymer vectored with folic acid (PFA) was developed. Polymer functionalization was confirmed by ¹H-NMR and thermal analysis. The mixed release systems DPPC/PF-127 and DPPC/PFA presented sizes in the order of 10-20 nm in the presence and absence of FS, which is interesting for in vivo application due to the EPR effect. The internalization of FS in the release systems allowed their monomerization and changes in photophysical properties to differ from the system to which it was incorporated. The results of photobleaching in release systems show differences when it comes to FS monomerization and photoprotection. For Pheid, monomerization enabled the reduction of the energy self-suppression effect in aqueous media, favoring photoinduced processes, including photobleaching, while for Zn-Pheid, monomerization in the release system resulted in an intense photoprotection in the release system. This photoprotection was more intense in the presence of the polymer functionalized with folic acid. Thus, the release systems obtained show promise for the application of FS in future photodynamic applications, acting both in the photoprotection of FS and in its active vectorization aiming at greater selectivity of the treatment.

Keywords: Pheophorbide; Photochemistry; Drug delivery system; Polymer; Photoprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama representativo dos orbitais moleculares presentes no formaldeído	17
Figura 2. Representação do Diagrama de Jablonski	18
Figura 3. Representação esquemática das reações do tipo I (a) e I (b)	22
Figura 4. Representação esquemática das reações descritas para o mecanismo tipo II	22
Figura 5. Representação estrutural de um oligômero de hematoporfirina, utilizada como fármaco pelo nome Photofrin®	24
Figura 6. Representação estrutural da clorofila a	26
Figura 7. Representação esquemática da estrutura do feoforbídeo a	27
Figura 8. Representação estrutural da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	29
Figura 9. Representação estrutural do polímero Pluronic® F-127, onde os blocos de poli (óxido de propileno) são descritos em vermelho e o bloco de poli(óxido de etileno) é demarcado em azul.....	30
Figura 10. Representação esquemática da estrutura do ácido fólico	31
Figura 11. Representação esquemática da nanopartícula polimérica desenvolvida	32
Figura 12. Espectros de absorção para (a) Pheid ($3,91 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) e (b) Zn-Pheid ($7,7 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em diferentes solventes	44
Figura 13. Espectro de emissão de fluorescência para (a) Pheid ($1,95 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) e (b) Zn-Pheid ($9,9 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) em diferentes solventes	46
Figura 14. Sobreposição dos espectros de absorção e emissão de fluorescência para (a) Pheid ($2,31 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) e (b) Zn-Pheid ($9,9 \times 10^{-9}$ mol L ⁻¹) em etanol	48
Figura 15. Cinética de decaimento do estado excitado para o Zn-Pheid (4×10^{-6} mol L ⁻¹) em etanol.....	54
Figura 16. (a) Espectros de absorção sobrepostos em clorofórmio para fotodegradação do Pheid ($3,91 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) e (b) Cinética de fotobranqueamento do Pheid em clorofórmio	55

Figura 17. (a) Espectros de absorção sobrepostos para fotodegradação do Zn-Pheid ($7,77 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em clorofórmio e (b) Cinética de fotobranqueamento para Zn-Pheid em clorofórmio	56
Figura 18. Cinéticas de fotodegradação do Zn-Pheid em etanol com e sem borbulhamento de N ₂	60
Figura 19. Espectros de absorção do Zn-Pheid ($7,7 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em água e em solução aquosa de NaN ₃ (10 mmol L ⁻¹)	63
Figura 20. Cinéticas de fotobranqueamento do Zn-Pheid em meio aquoso na ausência (a) e presença (b) de NaN ₃	64
Figura 21. Espectros de absorção do AU (1×10^{-4} mol L ⁻¹) em etanol na presença de Pheid (1×10^{-6} mol L ⁻¹) com o tempo de iluminação. A cinética de degradação do AU em 285 nm é inserida	65
Figura 22. Curvas térmicas para as matérias-primas (PF-127 e Ácido fólico) e para o derivado polimérico (PFA)	68
Figura 23. (a) Espectros de fluorescência do pireno (5×10^{-7} mol L ⁻¹) com crescentes concentrações de PF-127. (b) Razão da intensidade das bandas I/III em função da concentração de polímero. $\lambda_{exc} = 340$ nm	69
Figura 24. Gráfico de tensão superficial (mN/m) <i>versus</i> concentração de PFA para obtenção da CMC	70
Figura 25. (a) Espectros de absorção UV-Vis do FA ($2,6 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) e (b) PFA ($6,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) em função do pH	72
Figura 26. Intensidade de absorção do FA e do PFA em 280 nm em função do pH. Medidas realizadas a 25 °C	73
Figura 27. Representação esquemática dos sistemas desenvolvidos e de seus tamanhos aproximados	76
Figura 28. Espectros de absorção para o Pheid em água ($3,91 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) e em DPPC/PF-127 (4×10^{-6} mol L ⁻¹)	77
Figura 29. Espectros de fluorescência para o Pheid (4×10^{-6} mol L ⁻¹) em diferentes meios	78
Figura 30. Cinéticas de fotodegradação para o Zn-Pheid (4×10^{-6} mol L ⁻¹) nos sistemas de liberação mistos	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes do sistema misto nanoparticulado e suas respectivas concentrações.....	38
Tabela 2. Valores de comprimento de onda máximo (λ_{\max}) e coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para as bandas Soret e Q	45
Tabela 3. Valores de comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), e de deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) em diferentes solventes, a 25 °C.	49
Tabela 4. Parâmetros de Kamlet-Taft para os diferentes solventes (REICHARDT, 2003).....	51
Tabela 5. Valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e tempo de vida de fluorescência (τ_F), a 25 °C	52
Tabela 6. Valores de constante de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}) para o Pheid e Zn-Pheid em diferentes solventes	57
Tabela 7. Valores de constante de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}) em meio aerado e desaerado após borbulhamento de N_2	60
Tabela 8. Descrição dos valores encontrados de k_{FB} e Φ_{FB} para os FS na presença de supressores de espécies reativas de O_2	61
Tabela 9. Valores de constante de velocidade de degradação do ácido úrico (k_{AU}) e rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}).....	66
Tabela 10. Valores de diâmetro hidrodinâmico (D_h) e potencial zeta (ζ) encontrados para os sistemas desenvolvidos em tampão PBS (pH = 7,4) a 25 °C	74
Tabela 11. Valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e tempo de vida de fluorescência (τ_F)	79
Tabela 12. Valores de deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) para os FS em meio heterogêneo	80
Tabela 13. Descrição dos parâmetros de fotobranqueamento encontrados para Pheid e Zn-Pheid (4×10^{-6} mol L^{-1}) em sistemas heterogêneos	82

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese do feoforbídeo de zinco (Zn-Pheid).....	35
Esquema 2. Síntese do derivado PFA.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS
(em ordem alfabética)

AU: ácido úrico

$a^1\Delta_g$: estado excitado do oxigênio singleto de maior energia

$b^1\Sigma^+_g$: estado excitado do oxigênio singleto de menor energia

CAC: concentração agregacional crítica

CI: conversão interna

CIS: cruzamento intersistema

CMC: concentração micelar crítica

D_h : diâmetro hidrodinâmico

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio padrão

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

DMPC: 1,2-dimiristil-fosfatidilcolina

DSC: calorimetria diferencial exploratória (em tradução literal do inglês “*differential scanning calorimetry*”)

E_N : eletronegatividade de Pauling

EPR: permeabilização e retenção aumentada (em tradução literal do inglês “*enhanced permeabilization and retention*”)

EROS: espécies reativas de oxigênio

ϵ : coeficiente de absorvidade molar

ϵ_s : constante dielétrica do solvente

FRET: transferência de energia ressonante por Förster

FS: fotossensibilizador

$h\nu_{max}$: energia de transição entre diferentes estados energéticos

k: constante de velocidade

k_{FB} : constante de velocidade de fotobranqueamento

HOMO: orbital molecular ocupado de maior energia (em tradução literal do inglês “*highest occupied molecular orbital*”)

IRF: função de resposta do instrumento (em tradução literal do inglês “*instrument response function*”)

I_{Ex} : intensidade de emissão de fluorescência da banda do excímero da sonda pireno

I_M: intensidade de emissão de fluorescência da banda do monômero da sonda pireno

LUMO: orbital molecular desocupado de menor energia (em tradução literal do inglês “lowest unoccupied molecular orbital”)

L_{1H}: indica uma molécula de solvente coordenada ao centro metálico e uma ligação de hidrogênio

MEC: matriz extracelular

MM: massa molar

MMP: metaloproteinase de matriz

MPS: sistema mononuclear fagocitário (em tradução literal do inglês “*mononuclear phagocyte system*”)

n: índice de refração

O₂^{•-}: ânion superóxido

OH[•]: radical hidroxila

OH•: radical hidroxil

¹O₂: oxigênio singleto

³O₂: oxigênio tripleto

Π: símbolo pi, referenciando elétrons pi

P: potência

PF-127: Pluronic® F-127

PFA: derivado polimérico da conjugação entre PF-127 e ácido fólico

Pheid: feoforbídeo a

PHS: fosforescência

Py: sonda pireno

Py*: sonda pireno no estado excitado

S₀: estado fundamental singleto

S₁: primeiro estado excitado singleto

S₂: segundo estado excitado singleto

SOD: enzima superóxido dismutase

³FS*: sensibilizador no estado tripleto excitado

τ: tempo de vida de um determinado processo

τ_F: tempo de vida de fluorescência

T: estado tripleto

T₁: primeiro estado excitado tripleto

TFD: terapia fotodinâmica

UV-vis: ultravioleta-visível

Zn-Pheid: feoforbídeo a metalado com zinco.

λ : comprimento de onda

λ_{\max} : comprimento de onda máximo de absorção

Φ : rendimento quântico de um fotoprocesso

Φ_{Δ} : rendimento quântico de oxigênio singleto

Φ_{isc} : rendimento quântico de conversão intersistema

Φ_{F} : rendimento quântico de fluorescência

Φ_{FB} : rendimento quântico de fotobranqueamento

Φ_{P} : rendimento quântico de fluorescência do composto padrão

$\Delta\nu$: deslocamento de Stokes

α : grau de doação de ligação hidrogênio de um solvente

β : grau de aceitação de ligação hidrogênio de um solvente

π^* : polaridade/polarizabilidade de um solvente

γ_{Δ} : eficiência fotodinâmica química

μ_{E} : momento de dipolo no estado excitado

μ_{G} : momento de dipolo no estado fundamental

ζ potencial zeta

$^1\text{H NMR}$: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
	2.1 Processos fotofísicos e fotoquímicos	17
	2.2 Terapia Fotodinâmica	21
	2.3 Derivados de clorofila como fotossensibilizadores	25
	2.4 Sistemas de liberação nanoparticulados	28
3	OBJETIVOS	
	3.1 Objetivo geral	33
	3.2 Objetivos específicos	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	
	4.1 Reagentes	34
	4.2 Obtenção dos fotossensibilizadores	
	4.2.1 Extração do feoforbídeo a	34
	4.2.2 Síntese do feoforbídeo de zinco (Zn-Pheid).....	34
	4.3 Obtenção e caracterização do conjugado Pluronic® F-127/Ácido fólico	
	4.3.1 Síntese e purificação do derivado polimérico	36
	4.3.2 Obtenção e caracterização do sistema de liberação misto	37
	4.3.3 Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	38
	4.3.4 Caracterização do espectro de absorção do FA e do PFA em função do pH	38
	4.3.5 Análise do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos sistemas coloidais	38
	4.4 Caracterização espectroscópica dos fotossensibilizadores em meio homogêneo e nos sistemas mistos de liberação	
	4.4.1 Determinação do deslocamento de Stokes e rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)	38
	4.4.2 Determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_F).....	39

4.4.3	Determinação do rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{FB})	40
4.4.4	Determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ})	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1	Caracterização dos fotossensibilizadores em meio homogêneo	
5.1.1	Caracterização fotofísica	42
5.1.2	Fotoestabilidade dos fotossensibilizadores em meio homogêneo	53
5.1.3	Investigação do mecanismo de fotobranqueamento através do borbulhamento de nitrogênio e adição de sondas supressoras de espécies reativas de oxigênio	58
5.1.4	Rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ})	63
5.2	Caracterização dos sistemas de liberação	
5.2.1	Caracterização do Pluronic® F-127 funcionalizado com ácido fólico	65
5.2.2	Determinação da concentração micelar crítica (CMC) do Pluronic® F-127 funcionalizado com ácido fólico	67
5.2.3	Caracterização do espectro de absorção na região do UV-Vis do ácido fólico e do PFA em função do pH e avaliação da porcentagem de funcionalização do polímero	70
5.2.4	Caracterização dos sistemas de liberação mistos baseados em PFA/DPPC	73
5.2.5	Caracterização espectroscópica dos fotossensibilizadores nos sistemas de liberação mistos	76
5.2.6	Efeito dos sistemas de liberação mistos na fotoestabilidade dos fotossensibilizadores	79
6	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

O uso de moléculas ativas farmacologicamente encontradas ao seu redor para fins curativos e profiláticos é um aparato bem estabelecido pela humanidade desde os primórdios, ainda que não fosse possível o esclarecimento de causa e efeito destas estruturas e sua utilização dependesse estritamente da experiência. Plantas como papoula (gên. *Papaver*) e mandrágora (gên. *Mandragora*) têm seu uso descrito desde 5,000 anos a.c. (PETROVSKA, 2012). Com o avanço da tecnologia farmacêutica atualmente é possível o isolamento e aperfeiçoamento das mesmas estruturas utilizadas desde a antiguidade, alcançando assim tratamentos mais eficientes e específicos. Fármacos como ácido acetilsalicílico puderam ser desenvolvidos e produzidos em grande escala a partir do reconhecimento da salicina como molécula ativa da casca de salgueiro, utilizada *in natura* desde 3,500 a.c. (DESBOROUGH; KEELING, 2017).

Desta forma, a busca na natureza por moléculas que possam ser transportadas para uso na medicina é justificada não só pela variedade de insumos mas pelo fato dos mesmos serem utilizados como estruturas base para novos fármacos levando à formulação de novos medicamentos mais eficazes e seguros. O uso e estudo de fontes renováveis como a luz em aliança à essas formulações se tornam cada vez mais valiosos no sentido da utilização dos fenômenos observados na natureza para fins diversos, entre eles a medicina. A terapia fotodinâmica surge neste contexto buscando através da combinação de fármacos, oxigênio e luz no tratamento de infecções bacterianas, condições dermatológicas e até oncológicas (AGOSTINIS et al., 2011; KHARKWAL et al., 2011; WAN; LIN, 2014).

Nesse contexto, derivados de clorofila são compostos promissores para uso na terapia fotodinâmica de acordo com sua estrutura e matéria-prima abundante. A extensa conjugação de elétrons π possibilita que tais moléculas sejam usadas como fármacos de uso tópico e sistêmico (RADESTOCK et al., 2007). O feoforbídeo *a*, metabólito da clorofila *a*, é bem descrito na literatura como fotosensibilizador (FS) adequado de acordo com certas premissas relevantes à terapia fotodinâmica como baixa toxicidade, biocompatibilidade, entre outros parâmetros fotofísicos. Desta forma, este FS é explorado para diferentes usos, principalmente para uso como fármaco anticâncer - dentre uso único ou junto à outros fármacos antineoplásicos

(RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2017; YOU et al., 2011; ZHANG et al., 2018), obtendo bons resultados. Fung e colaboradores (2009) demonstram resultados promissores *in vitro* no uso do feoforbídeo *a* como protocolo de tratamento para células de carcinosarcoma, promovendo apoptose celular e inviabilizando mais de 90% das células analisadas em comparação à células não tratadas a partir deste protocolo (TANG et al., 2009).

Entretanto, a problemática recorrente entre fotossensibilizadores como o feoforbídeo *a* é sua hidrofobicidade. A agregação em meios aquosos consiste em grande desvantagem e diminui significativamente a biodisponibilidade do fotossensibilizador. Para contornar essa situação, na literatura são descritas formulações microheterogêneas como propostas de plataforma de *drug delivery*, como lipossomas, nanopartículas poliméricas, conjugados FS-polímero hidrofílico, entre outros (CHATTERJEE; FONG; ZHANG, 2008). A conjugação benéfica entre fotossensibilizador e lipossoma é explorada por diferentes autores (ISELE et al., 1994; KRAMER et al., 1996; SONG et al., 2017). Atualmente, devido à baixa estabilidade de lipossomas e sua captação pelo sistema imunológico, sistemas mistos a partir de polímeros hidrofílicos como polietilenoglicol (PEG) são propostos para promover maior tempo de circulação na corrente sanguínea através de suas propriedades “furtivas” (MASTROTTO et al., 2020).

Ainda, é possível aumentar a seletividade do sistema e conseqüentemente diminuir seus efeitos colaterais sistêmicos através da vetorização ativa da formulação. A vetorização ativa através da conjugação da nanopartícula com moléculas bioativas como anticorpos, proteínas ou fragmentos específicos pode promover a captação seletiva da formulação por células que apresentem os receptores buscados. A vetorização ativa com ácido fólico é desenvolvida por diversos autores e descrita como promissora para *drug delivery* de diferentes fármacos, considerando que receptor do mesmo é super-expresso em células tumorais de alguns tipos de neoplasia (LI et al., 2020; MANASPON; VIRAVAIIDYA-PASUWAT; PIMPHA, 2012; YE et al., 2014).

Desta forma, busca-se a otimização do tratamento com feoforbídeo *a* através do aperfeiçoamento do FS e do encapsulamento do mesmo em sistema nanoparticulado misto vetorizado com ácido fólico, desenvolvendo assim uma formulação promissora para uso dentro da terapia fotodinâmica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

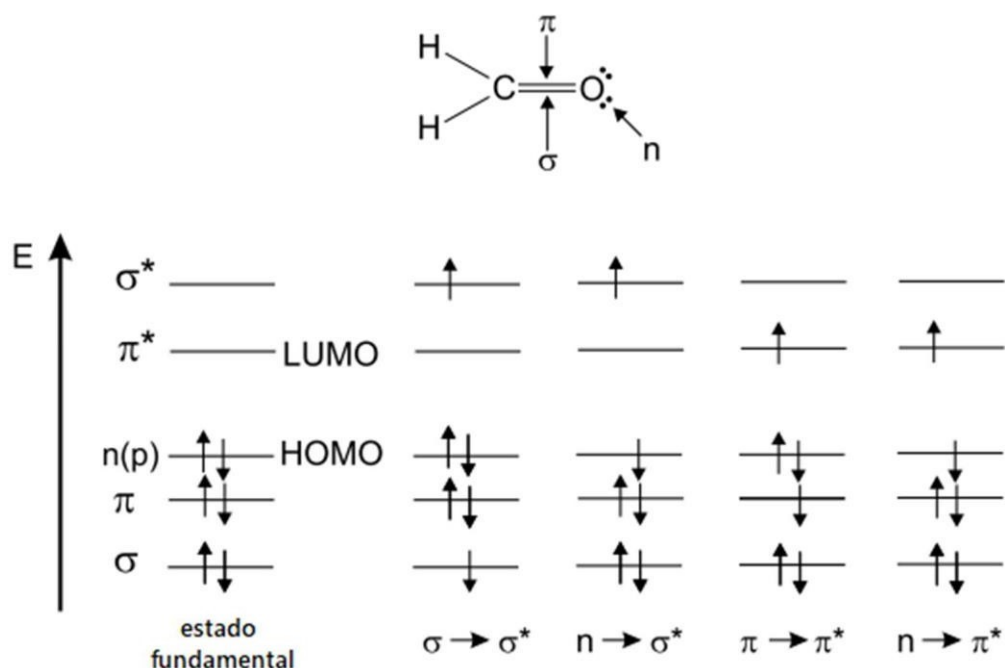
2.1 Processos fotofísicos e fotoquímicos

“We can easily forgive a child who is afraid of the dark; the real tragedy of life is when men are afraid of the light.”

(Plato)

O estudo de processos fotofísicos e fotoquímicos se baseia fundamentalmente nos efeitos decorrentes da interação entre fótons e a matéria. A absorção de um fóton pelo grupo cromóforo de uma molécula gera o trânsito de um elétron de um orbital ocupado (em seu estado fundamental) a um orbital vazio de maior energia, conferindo à mesma um estado eletronicamente excitado (**Figura 1**). Em relação à moléculas orgânicas, as transições de maior importância são as referentes a excitação de elétrons (π, π^*) e (n, π^*) (WARDLE, 2009).

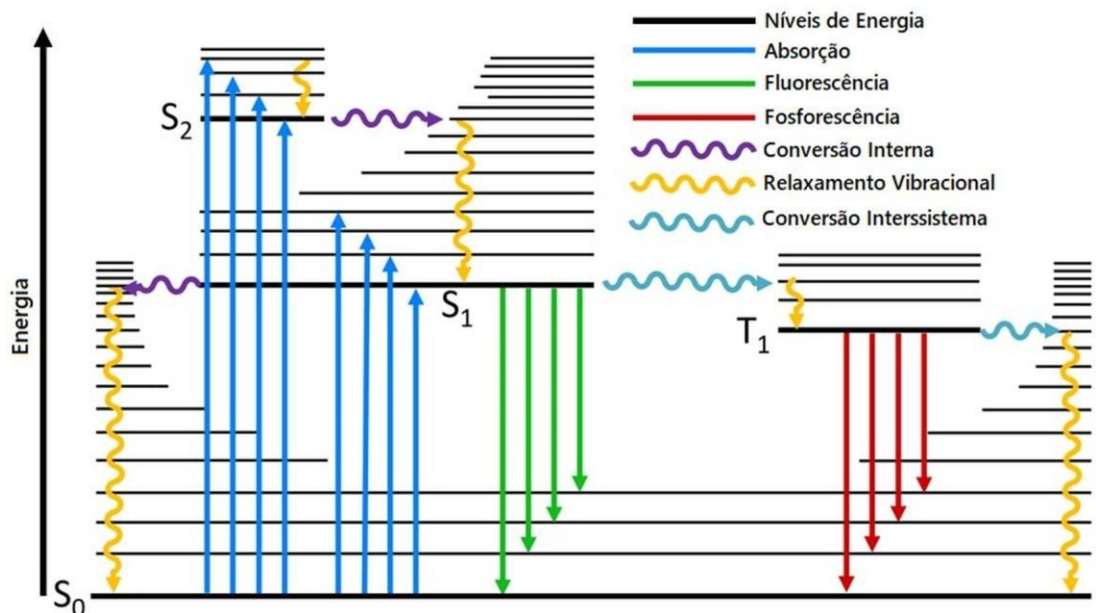
Figura 1. Diagrama representativo dos orbitais moleculares presentes no formaldeído.



Fonte: adaptado de VALEUR, 2001.

A partir deste momento, a energia absorvida do fóton é somada à energia total da molécula que parte do estado singlete fundamental (S_0) para os estados de maior energia S_1 (primeiro estado singlete excitado), S_2 (segundo estado singlete excitado), etc. Tal energia confere instabilidade à molécula em questão, a qual passa então por processos de decaimento de energia descritos no diagrama de Jablonski (**Figura 2**) (WARDLE, 2009).

Figura 2. Representação do Diagrama de Jablonski.



S_0 : estado singlete fundamental; S_1 : primeiro estado singlete excitado; S_2 : segundo estado singlete excitado; T_1 : primeiro estado tripleto excitado; T_2 : segundo estado tripleto excitado. **Fonte:** página comercial da Edinburgh Instruments¹.

O diagrama de Jablonski é uma representação dos níveis energéticos e vibracionais que podem ser atingidos a partir da excitação de um composto. De forma geral, os processos descritos a seguir ocorrem a partir do nível vibracional 0 de qualquer nível de energia, já que a perda de energia por relaxamento vibracional

– descrita como a transferência de energia intra ou intermolecularmente – ocorre em escalas de tempos muito pequenas (em torno de 10^{-12} s) (VALEUR, 2001).

¹ Disponível em: <<https://trends.directindustry.com/edinburgh-instruments/project-25178-193661.html>>. Acesso em 19 abr 2020.

Dentre os processos fotofísicos, pode-se caracterizar não-radiativos ou radiativos que competem entre si, sendo que a contribuição de cada um depende de sua constante de velocidade (k). A eficiência de cada processo é calculada através da expressão matemática de rendimento quântico (Φ) (**Equação 1**) (ROHATGI-MUKHERJEE, 1978).

$$\Phi_{\text{processo}} = \frac{\text{número de moléculas que sofrem o processo}}{\text{número de fótons absorvidos}} = \frac{k_{\text{processo}}}{k_{\text{absorção}}} \quad (1)$$

A partir do estado S_n ou T_n , a conversão interna (CI) é um processo de transição entre estados vibrônicos isoenergéticos de mesma multiplicidade de spin. A desativação através da CI acontece rapidamente principalmente a partir de níveis de energia acima do S_1 , já que a diferença energética entre estes estados e o primeiro estado singlete excitado é consideravelmente menor em relação à diferença $S_1 \rightsquigarrow S_0$ (10^{-11} a 10^{-9} s). Desta forma, outros processos radiativos e não radiativos apenas competem a partir do menor nível vibracional de S_1 (VALEUR, 2001).

A fluorescência é um processo radiativo o qual ocorre a partir do nível energético $S_1 \rightsquigarrow S_0$. Processos radiativos são marcados pela perda de energia através da emissão de fótons produzindo um espectro de emissão à semelhança do espectro de absorção, a diferenciar apenas pelo deslocamento de Stokes, cujo fundamento se deve à perda de energia decorrente do relaxamento vibracional após absorção $S_0 \rightarrow S_1$. Como o processo de relaxamento vibracional é muito mais eficiente (10^{-12} - 10^{-10} s) comparativamente à emissão de fluorescência (10^{-10} - 10^{-7} s) este último evento partirá do menor subnível vibracional de S_1 , causando um deslocamento de energia no espectro de emissão que ocorrerá em maior comprimento de onda, por conseguinte, menor energia. Tal deslocamento pode ser verificado pela diferença entre os máximos de absorção ($S_0 \rightarrow S_1$) e emissão ($S_1 \rightarrow S_0$) (BALZANI et al, 2014; VALEUR, 2001).

O deslocamento de Stokes é um parâmetro útil para avaliação da interação do sistema ao qual uma molécula está inserida já que o solvente pode interferir com a mesma de duas formas principalmente: interações gerais (universais),

dependentes diretamente da constante dielétrica do solvente (ϵ_s) e o índice de refração (n); interações específicas, já relacionadas à formação de ligações de hidrogênio, interações ácido-base, formação de exciplexos (complexos de transferência de carga formados no estado excitado), entre outros (ROHATGI-MUKHERJEE, 1978).

A considerar processos de decaimento energético proibidos por spin, tem-se a conversão intersistema (CIS) e em consequência a fosforescência (PHS). Naturalmente, transições entre estados de spin diferentes (singleto e tripleto) são proibidas pela regra de seleção de spin, a qual não permite transições entre estados de diferente multiplicidade. Entretanto, perturbações providas de campos eletromagnéticos fortes — de um núcleo de alto número atômico, por exemplo — pode interferir no momento angular de spin do elétron e provocar uma “mistura” de estados (acoplamento spin-órbita) em decorrência do efeito do átomo pesado. De forma que a perturbação é relacionada ao campo eletromagnético próximo ao núcleo atômico, quanto maior for o número atômico maior a interferência; a presença de átomos pesados intra ou intermolecularmente no sistema pode promover maior rendimento quântico para processos como conversão intersistema e fosforescência, diminuindo o rendimento de desativação por fluorescência. Transições fortemente proibidas passam a ser fracamente permitidas e assim possuem caráter mais competitivo em relação à processos naturalmente permitidos, possuindo em consequência maior coeficiente de absorção molar (ϵ). Em relação à CIS, a mesma consiste na transição $S_1 \rightsquigarrow T_1$, cujo tempo de vida de decaimento 10^{-10} - 10^{-8} s normalmente não seria capaz de competir com outros processos de desativação. A partir do estado T_1 , a CI e a PHS são transições passíveis de acontecer, esta última sendo uma transição radioativa e gerando emissão de fótons na ordem de 10^{-6} - 1 s (BALZANI et al, 2014; ROHATGI-MUKHERJEE, 1978).

Ainda, outros processos intermoleculares podem tomar parte da desativação energética. A transferência de elétrons e/ou energia para o oxigênio molecular (O_2) se destaca como etapa crucial para o desenvolvimento da terapia fotodinâmica. O O_2 , molécula que em seu estado fundamental encontra-se no estado tripleto, interage com o $^3FS^*$ para gerar, entre outras espécies, oxigênio singleto. (WARDLE, 2009; VALEUR, 2001).

2.2 Terapia Fotodinâmica

O termo *magic bullet* (bala mágica, em tradução livre) foi cunhado pela primeira vez em 1900 pelo pesquisador Paul Ehrlich, laureado em 1908 com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina. De forma sucinta, o conceito sugere um tratamento que ou medicamento que trate de forma específica a malignidade de forma a não atingir células saudáveis. A diminuição dos efeitos colaterais de diversas medicações tem sido pauta de diversas linhas de pesquisa, sendo o uso da terapia fotodinâmica uma de tais propostas.

O uso de luz e um fotossensibilizador que pode produzir espécies reativas de oxigênio *in situ* pode promover uma terapia seletiva de forma que apenas a região irradiada seria atingida pelas espécies citotóxicas. Ainda, o uso concomitante de sistemas de liberação com *active targeting* (direcionamento ativo, em tradução livre) pode condicionar de forma ainda mais específica o tratamento para os locais necessários no organismo.

A devida absorção de luz pelo FS depende principalmente da capacidade do mesmo de absorver em comprimentos de onda capazes de penetrar de forma efetiva as camadas epiteliais, uma região no espectro da luz visível denominado “janela fototerapêutica” — em torno de 600 a 1200 nm. Ainda, a presença de oxigênio é essencial já que o *modus operandi* do FS depende principalmente de tal interação.

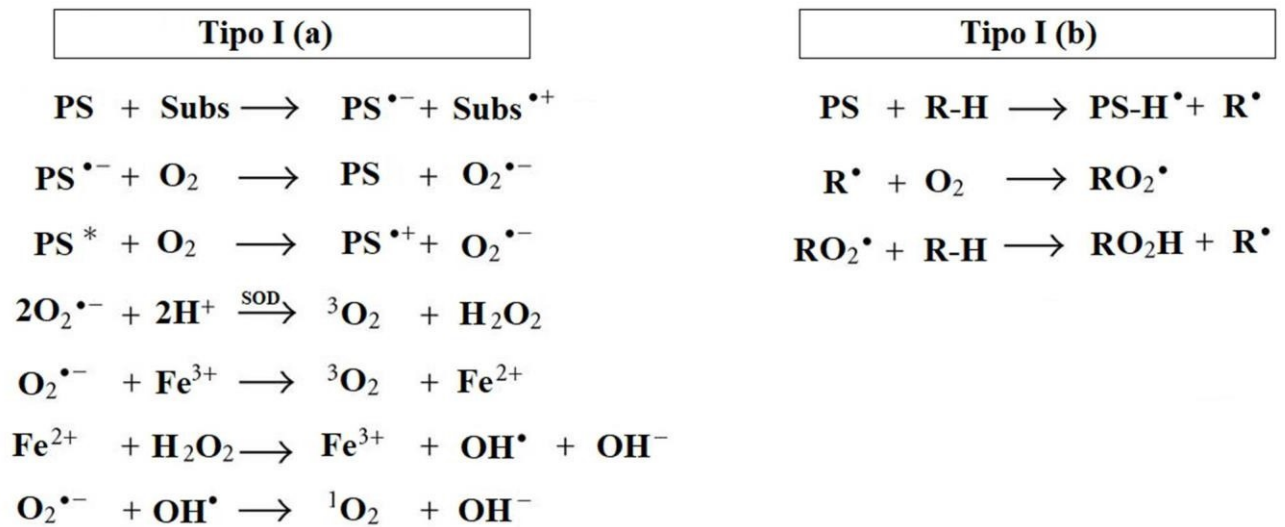
As reações envolvendo oxigênio molecular e o $^3\text{FS}^*$ podem ser classificados como tipo I ou tipo II. Ainda, o mecanismo tipo I pode ser subclassificado em:

Tipo I (a): envolve a transferência de um elétron diretamente para o oxigênio molecular formando o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ou para substratos vizinhos formando assim espécies aniônicas ou catiônicas que posteriormente darão origem ao $\text{O}_2^{\cdot-}$ (**Figura 3**). Este último é capaz de ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Ainda, o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é capaz de reduzir $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, que posteriormente pode produzir os ânions hidróxido (OH^-) e radicais hidroxila (OH^\cdot) através da redução do H_2O_2 . Todas estas espécies reativas de oxigênio (EROS) são capazes de interagir com biomoléculas porém, devido à sua natureza radicalar, OH^\cdot se destaca pelo seu extenso dano oxidativo à ácidos graxos, aminoácidos e ácidos nucleicos, a depender do sítio de geração. Ainda, é capaz de

continuar formando espécies radiculares em cascata, causando extenso dano celular (JOSEFSEN; BOYLE, 2008; PLAETZER et al., 2009).

Tipo I (b): Este mecanismo parte da transferência de um próton a partir de um substrato, reduzindo o FS, gerando espécies radiculares que continuamente reagem podendo produzir as mesmas espécies intermediárias descritas no mecanismo tipo I (a).

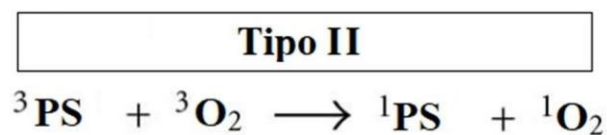
Figura 3. Representação esquemática das reações do tipo I (a) e I (b).



Fonte: adaptado de JOSEFSEN, BOYLE, 2007.

O mecanismo tipo II (**Figura 4**) é baseado na transferência de energia do FS (T_1) para o oxigênio molecular, naturalmente no estado fundamental tripleto, gerando a espécie altamente reativa oxigênio singleto.

Figura 4. Representação esquemática das reações descritas para o mecanismo tipo II.



Fonte: adaptado de JOSEFSEN, BOYLE, 2007.

Existem 2 espécies produzidas a partir da transferência de energia entre o $^3\text{FS}^*$ e o oxigênio molecular: $\text{O}_2(\text{b}^1\Sigma^+_g)$ e $\text{O}_2(\text{a}^1\Delta_g)$. Entretanto, quando em solução a primeira espécie decai rapidamente para produzir a segunda, de forma que a segunda espécie é a principal a ser tratada neste trabalho. As EROS produzidas e principalmente o oxigênio singlete são capazes de reagir com componentes celulares importantes que podem levar a processos de morte celular como autofagia, apoptose ou necrose, além da promoção de respostas imunes e inflamatórias já que é naturalmente produzido no organismo por neutrófilos e macrófagos durante a resposta imunológica (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; FAN; HUANG; CHEN, 2016; REDMOND; KOCHEVAR, 2006).

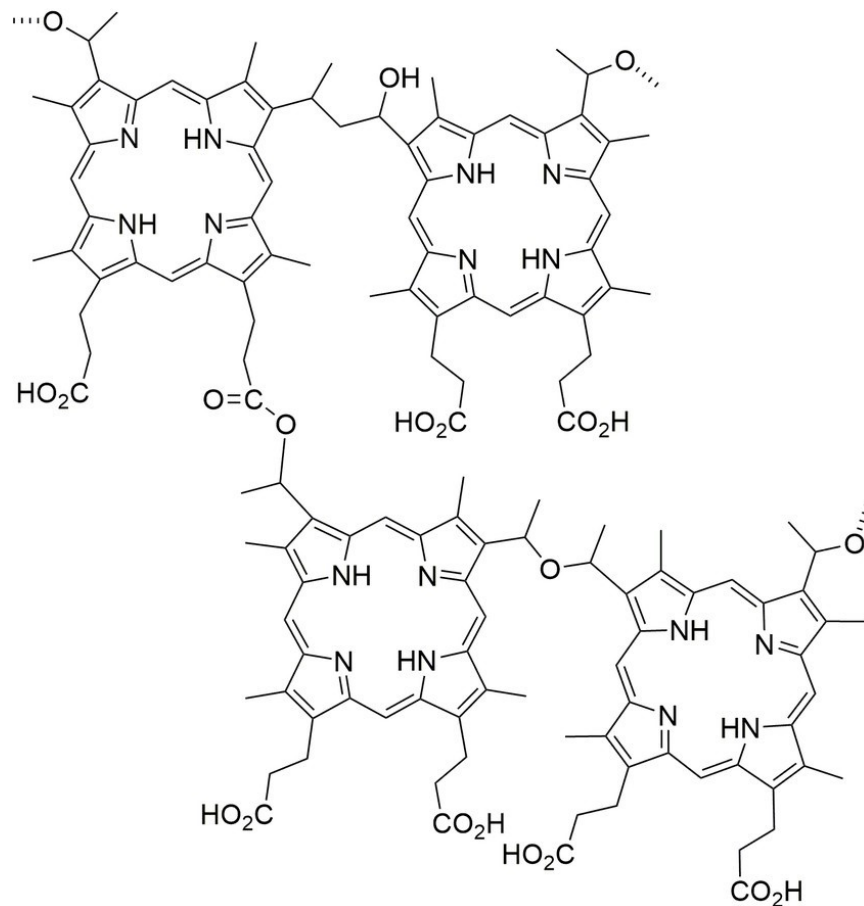
Apesar de seu curto tempo de vida (τ), curto alcance e possível desativação pelo solvente, $\text{O}_2(\text{a}^1\Delta_g)$ é eficiente no ataque *in situ* a neoplasias malignas através da destruição da própria célula neoplásica ou da circulação que envolve o tumor, impedindo o recebimento de oxigênio e nutrientes necessários para seu crescimento (REDMOND; KOCHEVAR, 2006).

Ainda, a terapia fotodinâmica se mostra extremamente eficaz frente à infecções bacterianas. A colonização por microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococci β -hemolíticos* comumente presentes em lesões cutâneas pode prolongar a fase inflamatória, gerando diminuição nos níveis de fatores de crescimento e da diminuição da quantidade de matriz extracelular (MEC) pelo nível aumentado de metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas capazes de digerir proteínas da MEC (DAI et al., 2010; MAYET et al., 2014; PASTAR et al., 2014).

Através do prejuízo da integridade da membrana celular desses organismos, o uso da fototerapia se mostra mais eficaz contra bactérias Gram positivas (G+) (*Staphylococcus aureus*, etc) em detrimento das Gram negativas (G-) (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, etc). Tal diferença se justifica pela complexidade da membrana celular de bactérias G- que possuem, além da camada usual de peptidoglicano comum à G+ e G-, uma membrana celular adicional que confere maior proteção a estes organismos. Entretanto, a adição de grupos catiônicos na estrutura do FS possibilita a eficiente inativação de bactérias tanto G+ quanto G- pelo aumento da interação com as cargas negativas presentes na membrana (MERCHAT et al., 1996; MINNOCK et al., 1996).

Neste contexto, o desenvolvimento de novos FS têm sido foco de pesquisa há décadas levando a uma variedade de diferentes estruturas que em sua maioria são baseadas em anéis tetrapirrólicos. A primeira geração de FS é marcada por fármacos com estruturas porfirínicas e pelo desenvolvimento do Photofrin® (**Figura 5**), o primeiro FS regulamentado pela FDA para distribuição e tratamento para câncer pulmonar e esofageal. A formulação consiste em uma mistura de monômeros, dímeros, trímeros e oligômeros de derivados de hematoporfirina. Inovador, o Photofrin® trouxe à tona as vantagens do uso da TFD como uma opção não carcinogênica/mutagênica a partir das doses utilizadas e sem potencial de desenvolvimento de multirresistência aos fármacos. Entretanto, apesar de eficaz, o uso de Photofrin® acompanha efeitos colaterais como hiperssensibilidade à luz até 6 semanas após o uso (JOSEFSEN; BOYLE, 2008).

Figura 5. Representação estrutural de um oligômero de hematoporfirina, utilizada como fármaco pelo nome Photofrin®.



Fonte: GOMES et al., 2018.

A segunda geração de FS busca por estruturas que absorvam em comprimentos de onda de menor energia, propiciando maior penetração tecidual. Fotossensibilizadores desta geração compreendem derivados porfirínicos, como ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas, sendo que estas duas últimas consistem em macrociclos tetrapirrólicos como estrutura cromófora, provenientes principalmente da oxidação da clorofila (WEIJER et al., 2015).

2.3 Derivados de clorofila como fotossensibilizadores

*“Man cannot give a true reason for the green under his feet.
Why it should be green rather than red or any other colour.”*

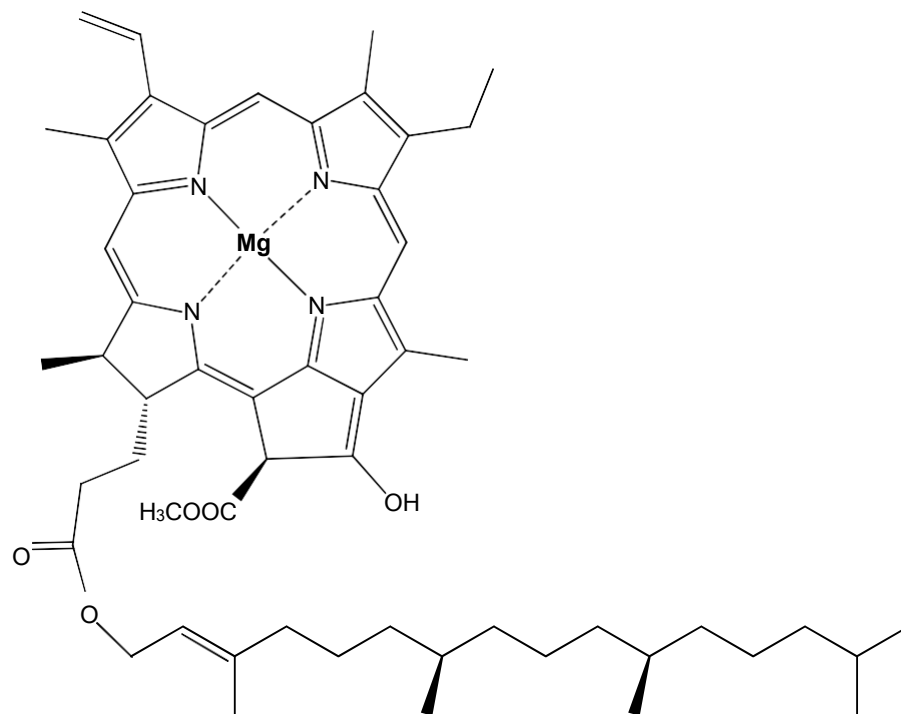
(Sir Walter Raleigh)

As clorofilas são dihidroporfirinas encontradas de forma abundante nos mais diferentes organismos fotossintéticos, em especial a clorofila *a* (**Figura 6**), sendo sua principal característica sua intensa cor verde devido a fortes absorções nas regiões do azul e vermelho do espectro eletromagnético, fazendo com que transmitam na região do verde. Sua presença é fundamental nos fotossistemas I e II, complexos presentes em diferentes organismos capazes de converter radiação eletromagnética em energia química. Tais aspectos em consequência de sua estrutura fitoclorínica trazem à clorofila *a* e seus derivados características interessantes para TFD observadas em seu espectro de absorção.

As estruturas descritas acima possuem duas regiões de interesse características de centros porfirínicos no seu espectro decorrentes das transições (π , π^*) a partir dos quatro orbitais de fronteira. As bandas sobrepostas Soret são provenientes de transições $S_0 - S_2$ polarizadas ao longo do eixo x (através dos dois átomos de nitrogênio pertencentes aos anéis B e D) e y (transição transpassada pelos dois átomos de nitrogênio dos anéis A e C). Já a banda Q mais intensa, proveniente da transição $S_0 - S_1$ é especialmente interessante no que concerne à TFD já que está dentro da “janela fototerapêutica”, de forma que a radiação eletromagnética penetra mais profundamente nos tecidos. A cadeia fitílica conjugada ao macrociclo não produz alterações significativas no espectro de absorção, mas

impacta diretamente na hidrossolubilidade da clorofila e possui função importante na ancoragem da estrutura para correto posicionamento quando presente nos cloroplastos durante o processo de fotossíntese (GRIMM, 2006; WACHTER et al., 2012).

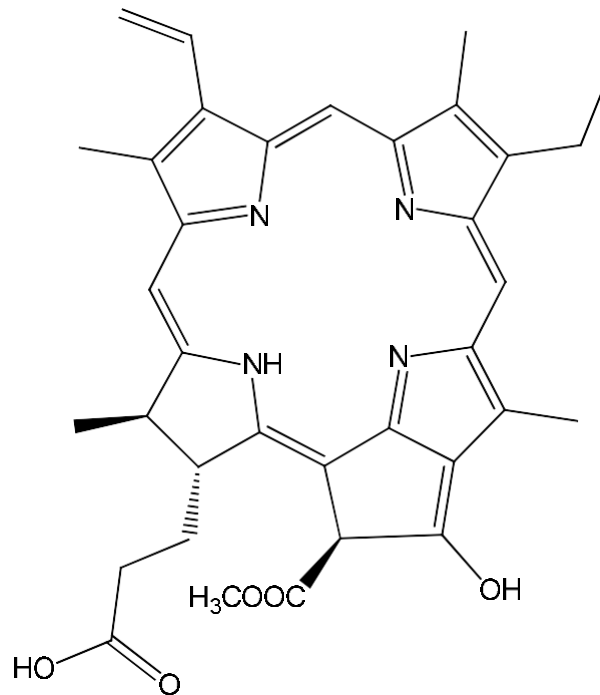
Figura 6. Representação estrutural da clorofila a.



Fonte: adaptado de MILENKOVIĆ et al., 2012.

O feoforbídeo a (Pheid) (**Figura 7**) é um metabólito da clorofila a obtido a partir de sua demetalção e defitilação. A demetalção da estrutura promove diferenças no espectro, sendo que o uso do feoforbídeo a e suas derivações na TFD é documentado na literatura, sendo relatada sua atividade contra diversas neoplasias e atividade antimicrobiana (GEROLA, 2013; LEE et al., 2015; RUIZ-GONZÁLEZ et al., 2017; WONGSINKONGMAN et al., 2002; YOU et al., 2011; ZHANG et al., 2018).

Figura 7. Representação esquemática da estrutura do feoforbídeo *a*.



Fonte: adaptado de MILENKOVIĆ et al., 2012.

Não produzindo espécies citotóxicas quando não irradiado, o feoforbídeo *a* possui absorção na região do azul (410 nm) e vermelho (bandas Q, especialmente em 669 nm). Ainda, possui um longo tempo de vida (τ) no estado tripleto ($\tau = 10^{-4}$ s em etanol) o que possibilita tempo suficiente para a formação de espécies citotóxicas como 1O_2 ($\Phi_{\Delta} = 0.59$ em etanol), Ainda, seu espectro demonstra 4 bandas Q bem definidas, presentes em decorrência da demetalção do anel porfirínico que leva à alteração de simetria da estrutura (DER et al., 2000; E. XODO et al., 2012).

Como já mencionado, a presença de átomos pesados na estrutura de uma molécula é capaz de alterar, entre outros parâmetros, o rendimento quântico de conversão intersistema (Φ_{ISC}) aumentando a eficiência de formação do estado T_1 . Naturalmente, é interessante que não haja formação de espécies citotóxicas como subprodutos do processo fotossintético e moléculas como os carotenóides funcionam como supressores contra as EROS formadas (STRAIN, 1966).

Porém, a transposição da clorofila e seus derivados para uso na TFD torna interessante o uso de metais que tenham influência em seu Φ_{ISC} . A possibilidade de

inserção de metais no centro do anel aumenta a gama de oportunidades para este FS. Na literatura, são poucos estudos que descrevem a metalação e estudos das propriedades fotofísicas do feoforbídeo a (YOON, IL et al., 2011).

Para configurar um bom FS, o composto deve possuir certas características específicas como seletividade ao tecido doente; baixa toxicidade no escuro e/ou à longo prazo, estabilidade, além de características específicas à um fotossensibilizador como alto coeficiente de absorção molar na faixa terapêutica de absorção; alto rendimento de oxigênio singleto, entre outras propriedades.

A alta hidrofobicidade de análogos porfirínicos leva à agregação em meios anfifílicos, diminuindo significativamente seu Φ_{Δ} devido à menor capacidade de absorção de luz e menor biodisponibilidade. O núcleo porfirínico possibilita interações π - π intermoleculares levando a agregação na forma de “empilhamento” (*stacking*). Para evitar a autoagregação em solução do feoforbídeo a e derivados, uma possibilidade consiste no seu encapsulamento em sistemas de liberação como lipossomas, mantendo-o assim em sua forma monomérica e intactas suas propriedades fotofísicas.

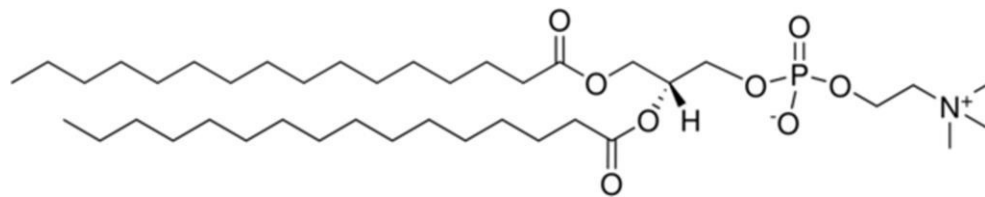
2.4 Sistemas de liberação nanoparticulados

Apesar de seu potencial como FS, os feoforbídeos apresentam estruturas altamente lipofílicas o que dificulta sua biodistribuição no organismo e leva à formação de agregados em meio aquoso. Dessa maneira, a formulação destas moléculas em sistemas de liberação torna-se uma alternativa. O uso de sistemas de liberação pode facilitar a absorção e trânsito de tais moléculas no organismo, aumentando a biodisponibilidade dos FS.

Nesse contexto, lipossomas são uma opção atrativa de plataforma de *drug delivery*: são fáceis de produzir, biocompatíveis, biodegradáveis e adaptáveis para de liberação controlada. Ainda, são flexíveis a estes fármacos a serem incorporados, já que a vesícula lipídica pode comportar moléculas hidrofóbicas em sua bicamada fosfolipídica ou hidrofílicas em seu core aquoso. Fármacos podem ser encapsulados nas mesmas a partir de duas abordagens: passiva, que consiste na incorporação do fármaco durante a formação do lipossoma e de especial importância para ativos hidrofóbicos; ativa, cuja incorporação se dá após a estruturação do nanocarreador (AKBARZADEH et al., 2013; BULBAKE et al., 2017; LEMBO; CAVALLI, 2010).

O arranjo de fosfolipídios como DPPC (**Figura 8**), DMPC, entre outros, em uma estrutura coloidal é governado de forma geral pela repulsão hidrofóbica das cadeias ao meio aquoso ao qual estão inseridas; desta forma, a porção hidrofílica da estrutura se posiciona de maneira a formar uma corona; um core então é formado e preenchido pela porção hidrofóbica que se mantém protegida. O auto arranjo espontâneo destas moléculas em uma partícula coloidal quando acima da concentração agregacional crítica (CAC) em solução possibilita um método fácil e rápido para obtenção destes sistemas. A CAC corresponde ao limite de concentração em que há uma saturação interfacial levando à auto agregação do sistema (BULBAKE et al., 2017; CALIXTO et al., 2016; CHAKRABORTY; CHAKRABORTY; GHOSH, 2011).

Figura 8. Representação estrutural da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).



Fonte: adaptado de RUNGUANG et al., 2016.

A internalização de lipossomas através da membrana celular geralmente é ocorre através de endocitose ou fusão. As características celulares e do próprio lipossoma são definitivos em relação à eficiência da captura, sendo que de forma geral lipossomas com carga catiônica de superfície são mais aptos em decorrência da interação eletrostática com a carga negativa da membrana celular (Dan, 2002).

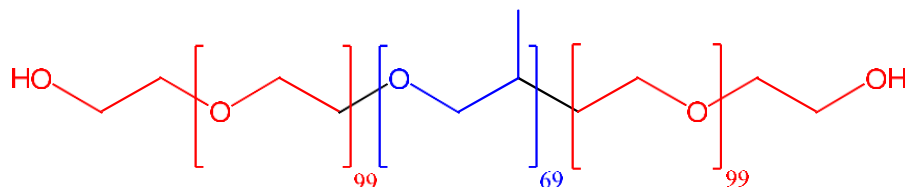
Lipossomas naturalmente se acumulam em tecidos tumorais através de vetorização passiva, ou efeito EPR (*enhanced permeabilization and retention*, permeabilização e retenção aumentada, em tradução livre). O tecido neoplásico demanda angiogênese intensa levando à formação de vascularização defeituosa, com junções intersticiais “frouxas” entre as células do endotélio vascular. Assim, nanoestruturas com < 200 nm são capazes de extravasar da corrente sanguínea para o interior destes tumores e bioacumular nestes tecidos devido à escassa

circulação linfática. Entretanto, como efeito EPR é um mecanismo passivo, é altamente dependente do tempo de circulação do lipossoma para que o mesmo possa ter a chance de efundir no tecido tumoral e vesículas lipossomais são rapidamente opsonizadas e fagocitadas pelo sistema fagocítico mononuclear (MPS), composto principalmente por macrófagos presentes no fígado e no baço (MALAM; LOIZIDOU; SEIFALIAN, 2009; MARUYAMA, 2011).

Nesse contexto, estudos recentes investigam o uso revestimento com polímeros hidrofílicos como polietilenoglicol, entre outros, que conferem propriedades furtivas aos lipossomas, aumentando seu tempo de circulação na corrente sanguínea. A presença de polímeros na superfície do lipossoma pode impedir seu sequestro por células fagocíticas mononucleares já que através do impedimento estérico impede a adsorção de proteínas importantes (DAN, 2002).

A classe de Pluronic® é composta por polímeros compostos de um bloco de poli (óxido de propileno) flanqueado por dois blocos de poli (óxido de etileno), sendo o Pluronic® F-127 (PF-127) a estrutura escolhida para este trabalho (**Figura 9**). Esta classe de polímeros têm tomado cada vez mais espaço em sistemas para liberação de fármacos em decorrência de suas propriedades como baixa toxicidade, hidrossolubilidade, versatilidade para solubilização de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, etc. (AKBARZADEH et al., 2013; PELLOSI et al., 2016).

Figura 9. Representação estrutural do polímero Pluronic® F-127, onde os blocos de poli (óxido de propileno) são descritos em **vermelho** e o bloco de poli (óxido de etileno) é demarcado em **azul**.



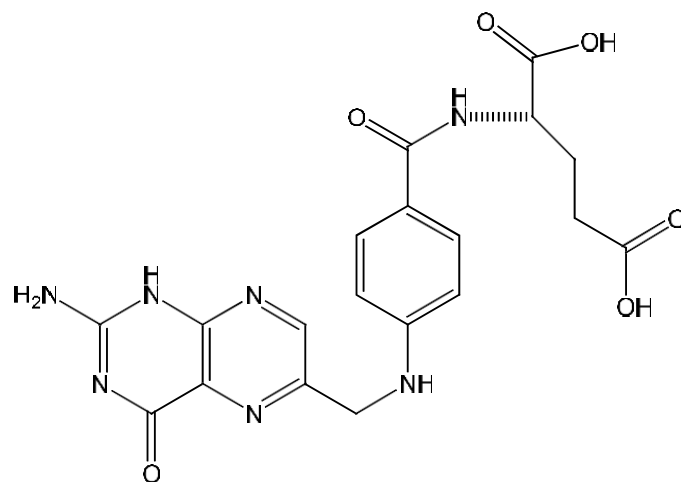
Fonte: a própria autora.

Nesse contexto, a formulação de sistemas mistos pode promover ao lipossoma, estrutura já consolidada, propriedades furtivas através do revestimento da bicamada lipídica com PF-127, aumentando seu tempo de biocirculação. Ainda, a vetorização ativa pode proporcionar maior seletividade no tratamento de forma a diminuir efeitos colaterais sistêmicos, sendo que a estratégia configura na

funcionalização do sistema junto à moléculas que interajam diretamente com a superfície de células tumorais, como anticorpos através receptores antigênicos e/ou receptores de moléculas como ácido fólico.

Receptores de ácido fólico são super expressos na membrana de células neoplásicas (e.g. tumores epiteliais, ovarianos, cervicais, mamas, pulmões, entre outros) em decorrência da sua alta demanda para síntese, metilação e reparo da molécula de DNA, enquanto sua presença em células saudáveis é limitada. A pequena estrutura do ácido fólico (**Figura 10**) e a manutenção da sua capacidade de interagir com receptores mesmo conjugado à polímeros o torna promissor para uso em sistemas de liberação (ZWICKE; MANSOORI; JEFFERY, 2012).

Figura 10. Representação esquemática da estrutura do ácido fólico.



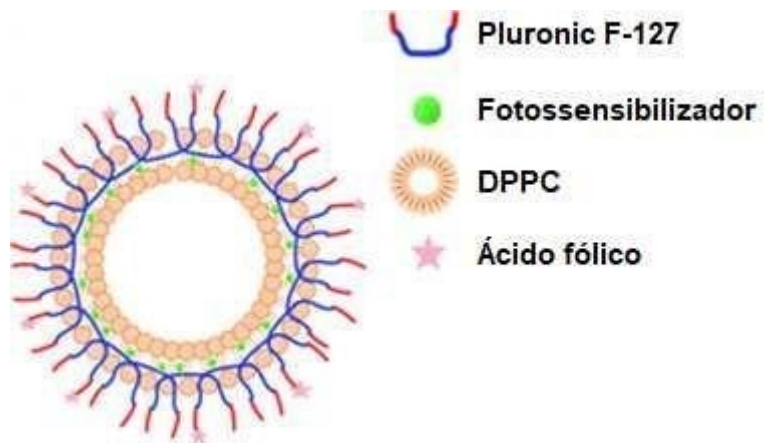
Fonte: a própria autora.

Wang e colaboradores (2007) demonstram um aumento na captação de micela polimérica mista funcionalizada com ácido fólico. O aumento da concentração intracelular do fármaco hidrofóbico paclitaxel nas linhagens celulares analisadas no estudo sugere aumento na internalização do fármaco através da interação do ácido fólico com receptores expostos na membrana, avaliação de acordo com o resultados de outros autores na literatura (TIE et al., 2020; YE et al., 2014).

Assim, a utilização sistemas poliméricos nanoparticulados mistos (**Figura 11**) como plataforma de liberação é uma abordagem de interesse para a solubilização e

liberação dos FS nos sítios alvos, garantindo as propriedades fotofísicas de interesse.

Figura 11. Representação esquemática da nanopartícula polimérica desenvolvida.



Fonte: adaptado de Wang et al., 2013.

Além da vetorização passiva através do efeito *EPR*, a funcionalização do PF-127 através da conjugação com moléculas de ácido fólico pode proporcionar maior seletividade no local de ação do fármaco e aumentando a eficácia do tratamento, além de possibilitar menor dosagem de uso.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Preparação e caracterização fotofísica de derivados de clorofila *a* e desenvolvimento de sistemas nanoparticulados mistos vetorizados visando aplicações fotodinâmicas.

3.2 Objetivos específicos

(i) Obter derivados de clorofila *a* (Pheid) e subsequente metalação (Zn-Pheid) e caracterização;

(ii) Avaliar as propriedades fotofísicas dos derivados sintetizados em meio homogêneo, como: deslocamento de Stokes; rendimentos quânticos de fluorescência, tempo de vida de fluorescência, oxigênio singleto e fotobranqueamento;

(iii) Sintetizar um derivado do Pluronic® F-127 vetorizado com ácido fólico e caracterizar o produto através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e calorimetria diferencial exploratória;

(iv) Preparar formulações mistas baseadas no fosfolípídeo (DPPC) e do polímero funcionalizado pelo método de dispersão sólida e caracterização dos sistemas de liberação nanoestruturados pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta;

(v) Caracterização dos fotossensibilizadores nos sistemas de liberação nanoparticulados mistos quanto à suas propriedades fotofísicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

O derivado de clorofila a, feoforbídeo a, foi obtido por extração através de adaptação de metodologia descrita na literatura (STREIN, SVEC, 1966). O feoforbídeo a e derivados foram caracterizados pelos seus espectros de absorção eletrônica (UV-Vis Varian Cary 50, EUA).

O surfactante polimérico Pluronic® F-127 (PF-127, MM = 12600 g mol⁻¹) foi obtido através da Sigma-Aldrich (EUA) e o ácido fólico (FA) adquirido através da Dinâmica (BRA). O fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foi obtido através da Avanti Polar Lipids Co. (EUA). Todos os materiais utilizados entre solventes, surfactantes e reagentes são de grau analítico (P.A.).

4.2 Obtenção dos fotossensibilizadores

4.2.1 Extração do feoforbídeo a

Para obter clorofila, foram escolhidas espécies de plantas as quais possuem grande quantidade da mesma. Folhas de agrião (*Nasturtium officinale*) (98,06 g) foram suspensas em 200 mL de uma mistura metanol:éter de petróleo (2:1). Posteriormente, foi realizada extração líquido/líquido com uso de éter etílico:éter de petróleo (1:1). A fase orgânica foi separada e o solvente evaporado, os pigmentos foram então separados a partir de cromatografia em coluna com a utilização de sílica gel 60 Å, 70 - 230 mesh, eluente éter de hexano:acetato de etila (80:20). Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, o feoforbídeo a foi isolado como um sólido marrom.

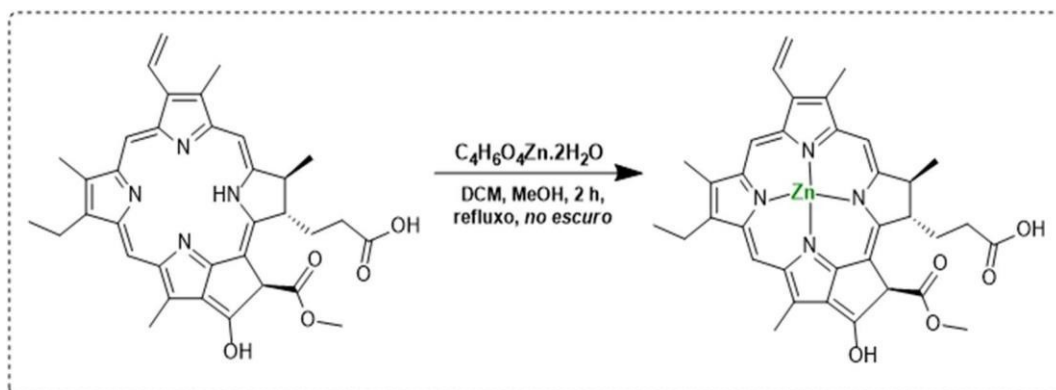
A identificação do feoforbídeo a (C₃₅H₃₆N₄O₅, MM = 592.2685 g mol⁻¹) foi feita através de espectroscopia de absorção eletrônica. A partir do produto obtido foi feita uma solução estoque, em etanol, de concentração caracterizada através do coeficiente de absorção molar (ϵ) descrito em literatura (para $\lambda = 667$ nm, $\epsilon = 49000$ L mol⁻¹cm⁻¹) (GEROLA et al., 2012).

4.2.2 Síntese do feoforbídeo de zinco (Zn-Pheid)

Para a síntese do Zn-Pheid, dissolveu-se 0,0166 mmol de feoforbídeo em 5mL de diclorometano (DCM), e juntou-se 0,0332 mmol de acetato de zinco

dihidratado dissolvido em 5 mL de metanol (MeOH). A mistura foi colocada em refluxo, no escuro, por 2 h (**Esquema 1**).

Esquema 1. Síntese do feoforbídeo de zinco (Zn-Pheid).



Após o refluxo, a solução foi diluída em água e o produto foi extraído 3 (três) vezes com diclorometano. A fase orgânica formada foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi então evaporado, obtendo-se um sólido verde escuro com rendimento de 34,51%.

A identificação do Zn-Pheid ($C_{35}H_{36}N_4O_5Zn$, $MM = 655,18 \text{ g mol}^{-1}$) foi feita através de espectroscopia de absorção eletrônica. A partir do produto obtido foi feita uma solução estoque, em etanol, de concentração caracterizada através do coeficiente de absorção molar (ϵ) descrito em literatura (para $\lambda = 660 \text{ nm}$, $\epsilon = 75300 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (GEROLA et al., 2012).

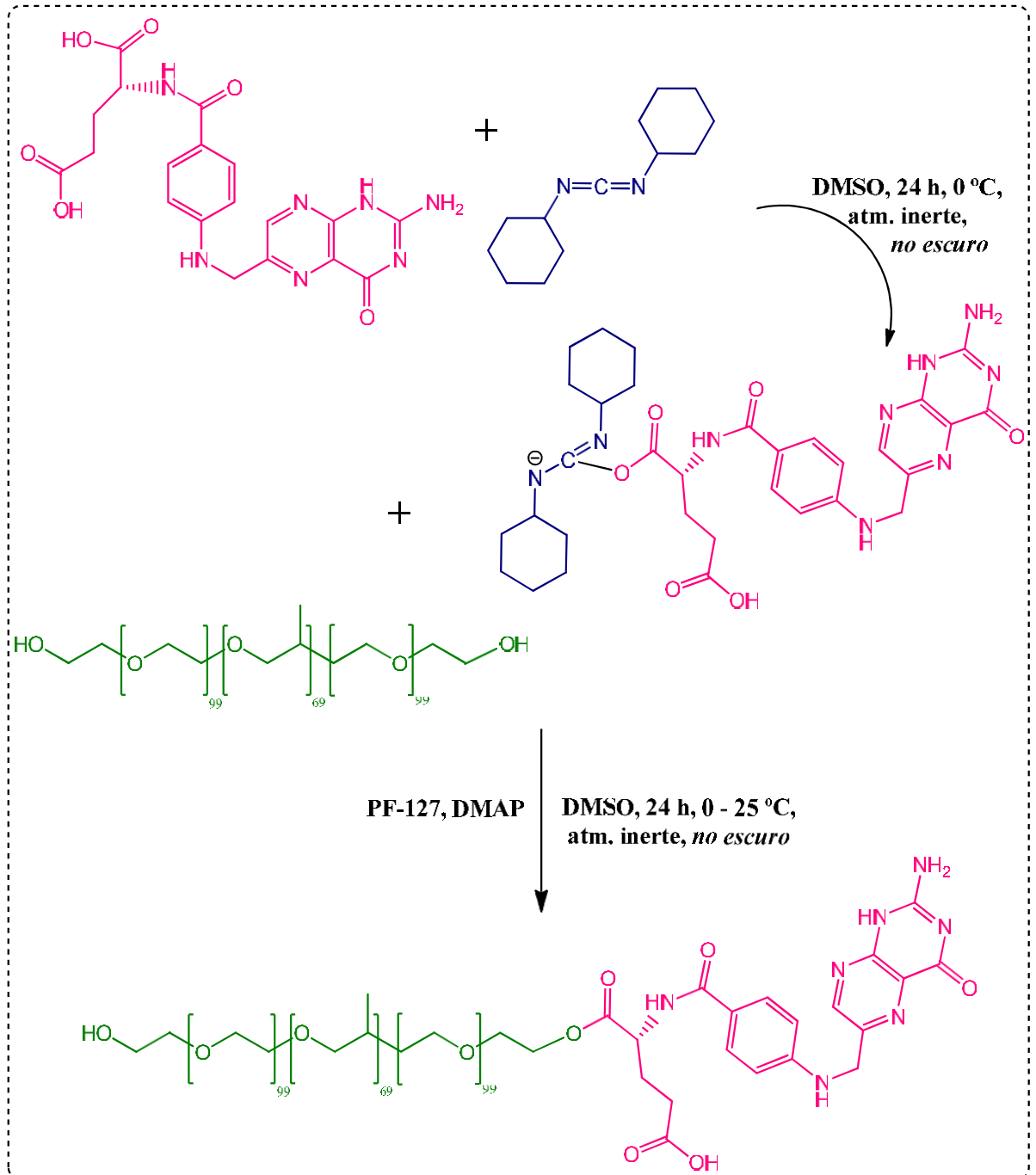
4.3 Obtenção e caracterização do conjugado Pluronic® F-127/Ácido fólico

4.3.1 Síntese e purificação do derivado polimérico

Para o desenvolvimento do derivado denominado PFA, foi utilizada metodologia adaptada de (LI et al., 2020). Em 50 mL de DMSO seco previamente em peneira de 4 Å, foram adicionados 1,9 mmol de ácido fólico e 1,75 mmol de *N, N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC); a solução foi então deixada em agitação por 24 h, em aproximadamente 0 °C e sob atmosfera de argônio. 1,2 mmol de Pluronic® F-

127 junto à 0,8 mmol de DMAP foram então adicionados e o sistema foi deixado por outras 48 h, aquecendo naturalmente até 25 °C (**Esquema 2**).

Esquema 2. Síntese do derivado PFA.



Após este período, o sistema foi centrifugado para posterior remoção de subprodutos insolúveis. O sobrenadante foi então coletado e colocado em

membrana de diálise (MWCO = 1000 Da) em DMSO por 6 h e posteriormente em água deionizada por 48 h, renovando regularmente o solvente do sistema.

Para remoção da água, o produto foi liofilizado em liofilizador de bancada (Terroni, BRA) até completa remoção do solvente. A caracterização foi feita através de RMN H^1 (DRX Avance 200 MHz, Bruker, EUA) usando o solvente DMSO- d^6 como solvente (**Anexo A**).

A análise por DSC foi realizada nas condições: curvas obtidas em célula Q20 (TA Instruments, USA), aquecimento $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ de 0 a $250\text{ }^\circ\text{C}$, atmosfera dinâmica de nitrogênio $50\text{ mL}/\text{min}$, utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados com aproximadamente 2 mg de amostra. Os dados obtidos foram processados em software OriginPro 9.

O rendimento de funcionalização foi obtido através de curva de calibração com ácido fólico em DMSO, onde diferentes concentrações de ácido fólico solubilizado no solvente supracitado foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary50 (Varian, EUA) e as leituras em 285 nm foram utilizadas para a construção da curva.

4.3.2. Obtenção e caracterização do sistema de liberação misto

Os sistemas de liberação foram produzidos de acordo com metodologia adaptada de Freitas e colaboradores (2019). Os sistemas de liberação foram produzidos a partir de um filme fino obtido após evaporação de 5 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (4:1) contendo diferentes composições de PF-127/DPPC/FS ou PFA/DPPC/FS, suas respectivas concentrações são descritas na **Tabela 1**. Após 12 h em dessecador para retirada de qualquer resquício de solvente, o sistema foi ressuspenso em tampão PBS $0,01\text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) sob ultrassom (P = 66W; Ecosonics, BRA) por 1 h .

Tabela 1. Componentes do sistema misto nanoparticulado e suas respectivas concentrações.

Componentes	Concentração (mol L ⁻¹)
PF-127	1,59x10 ⁻³
PFA	1,59x10 ⁻³
DPPC	5,44x10 ⁻⁴
FS	4,00x10 ⁻⁶

4.3.3 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A CMC foi determinada através do uso de sonda fluorescente de pireno, em concentração de 5×10^{-7} mol L⁻¹, em tampão TRIS 0,01 mol L⁻¹ a pH 7,4. Neste estudo foi escolhido o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 340 nm; leitura entre 350 a 500 nm; slit de excitação e emissão 10 e 2,5, respectivamente. Para a obtenção da CMC, foi utilizada a razão entre a emissão das bandas $I_{I/III}$ e $I_{I/Exc}$, obtidas através de espectros de fluorescência adquiridos no equipamento Cary Eclipse (Varian, EUA).

Ainda, a CMC do derivado foi determinada complementarmente através da alteração da tensão superficial a partir da adição de PFA em tampão TRIS 0,01 mol L⁻¹ a pH 7,4. Tais medidas foram realizadas com auxílio do equipamento EasyDyne (Kruss, EUA).

4.3.4 Caracterização do espectro de absorção do FA e do PFA em função do pH

O perfil de absorção espectral do ácido fólico e do PFA foi registrado em função do pH (2,5 - 7,5). O ajuste dos valores de pH foi realizado com o auxílio do potenciômetro Metrohm modelo 713. Foram utilizados os tampões citrato, TRIS e carbonato, todos a 0,01 mol L⁻¹. Para os compostos utilizados, foram padronizadas as concentrações de [FA = $2,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹] e [PFA = $7,6 \times 10^{-4}$ g/mL].

4.3.5 Análise do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos sistemas coloidais

Os diâmetros hidrodinâmicos e potenciais zeta dos sistemas de liberação foram determinados com auxílio do equipamento de espalhamento dinâmico de luz DLS - ZetaPlus (Brookhaven, EUA).

4.4 Caracterização espectroscópica dos fotossensibilizadores em meio homogêneo e nos sistemas mistos de liberação

4.4.1 Determinação do deslocamento de Stokes e rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)

A partir dos compostos obtidos, foram feitas análises em etanol, água e clorofórmio de seus espectros de absorção eletrônica usando um espectrofotômetro Varian Cary50, e também de emissão de fluorescência registrada em um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian, EUA).

Todas as medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com quatro lados translúcidos a 25 °C. As concentrações do Pheid e do Zn-Pheid foram de $8,32 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $9,91 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, respectivamente. Para obter os espectros de emissão de fluorescência, as moléculas foram excitadas em comprimento de onda de 411 nm, slits de excitação e emissão 5 e 5, respectivamente.

A partir dos espectros de absorção e emissão em diferentes solventes foi possível obter o valores de deslocamento de Stokes para cada meio através da **Equação 2**:

$$\Delta\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)} = 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_{abs,max}} - \frac{1}{\lambda_{emi,max}} \right) \quad (2)$$

No caso acima, $\lambda_{abs,max}$ e $\lambda_{emi,max}$ referem-se ao comprimento de onda de absorção e emissão máximo, respectivamente.

O cálculo para obtenção do valor de rendimento quântico de fluorescência é então adquirido através da **Equação 3**, utilizando-se do valor de referência do feoforbídeo a em etanol como padrão ($\Phi_P = 0,30$) (GEROLA et al, 2011).

$$\phi_F = \frac{Abs_p F_c n_p^2}{Abs_c F_p n_c^2} \phi_P \quad (3)$$

Para a equação acima, descreve-se o subíndice p representando o composto padrão e o subíndice c denominando o composto a ser analisado; Abs a absorvância da banda Q, F a área espectro de emissão. Os índices de refração (denotados como n) foram retirados do HandBook de física e química (LIDE, 2005).

4.4.2 Determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_F)

Para as análises de tempo de vida de fluorescência para cada FS em meio homogêneo e heterogêneo foi utilizado o equipamento EasyLife. A concentração dos FS escolhida foi 4×10^{-6} mol L⁻¹, justamente por ser a concentração utilizada para formulação dos sistemas coloidais. Para esta análise, foi utilizada fenda de 5,5 nm e um LED de comprimento de onda correspondente com a região de absorção da banda Soret em aproximadamente 370 nm, com adição de filtro em comprimento de onda de 380 nm. Ainda, foi feita leitura de padrão de comparação IRF (suspensão aquosa de sílica coloidal, 30% em massa) na mesma intensidade de cada análise de FS, cuja variação de intensidade é alcançada através da abertura ou fechamento da fenda de leitura.

4.4.3 Determinação do rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{FB})

A fim de avaliar o efeito do metal, diferentes solventes, supressores e condições no processo de fotodegradação dos compostos analisados, foram realizadas cinéticas de fotobranqueamento monitoradas por espectroscopia UV-Vis através do espectrofotômetro Varian Cary50, utilizando-se de cubetas de quartzo com 4 faces translúcidas. As reações de fotobranqueamento foram acompanhadas para os FS (5×10^{-6} mol L⁻¹), com o auxílio de um laser vermelho com emissão em comprimento de onda 648 nm (P= 100 mW) como fonte de radiação contínua. As cinéticas de fotobranqueamento foram acompanhadas pela variação da absorção da banda Q com o tempo de iluminação. As constantes de velocidade de

fotobranqueamento (k_{FB}) foram obtidas pelo ajuste das cinéticas a modelos de primeira ordem, ou reações em duas etapas consecutivas de primeira ordem.

Os valores de Φ_{FB} foram obtidos através da **Equação 4** descrita abaixo

$$\Phi_{FB} = \frac{(A_0 - A)V_s N_a h c}{\epsilon l \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P(\lambda) I_0 (1 - 10^{-bc\epsilon}) \cdot e^{-k_{FB}t} d\lambda dt} \quad (4)$$

onde A_0 e A são as absorvâncias inicial e final, respectivamente, V_s é o volume de solução na cubeta, N_a é a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$), c é a velocidade da luz ($3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$), ϵ é o coeficiente de absorção molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) do composto em questão no solvente analisado, l é o caminho ótico da cubeta (cm), λ_2 e λ_1 são os comprimentos de onda final e inicial (nm) - respectivamente, P é a potência (W ou $\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-3}$) e k_{FB} é a constante de velocidade da fotodegradação (s^{-1}).

4.4.4 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto

(Φ_{Δ})

Para o estudo e avaliação da produção de oxigênio singleto pelos FS foi utilizada uma solução de ácido úrico (AU) $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol como sonda. Facilmente oxidado pelo oxigênio singleto produzido, a diminuição da absorvância do composto em 290 nm é monitorada e o Φ_{Δ} pode ser calculado através da **Equação 5**, estabelecida por Gerola e colaboradores (2012).

$$\Phi_{\Delta} = \frac{\phi_{\Delta}^P}{\gamma_{\Delta}^P} \gamma_{\Delta} \quad (5)$$

A equação acima descreve o valor de Φ_{Δ} de acordo com os valores de rendimento de oxigênio singleto do padrão de feoforbídeo a em etanol (ϕ_{Δ}^P), cujo valor segundo a literatura é 0,51 (GEROLA et al, 2012). Ainda, são utilizados os valores de eficiência fotodinâmica do padrão (γ_{Δ}^P) e do FS a ser analisado (γ_{Δ}), cuja expressão a ser utilizada para seu cálculo é descrita abaixo (**Equação 6**),

$$\gamma\Delta \propto \frac{k_{AU}}{N_{Abs}} \quad (6)$$

onde k_{AU} é a constante de velocidade de fotodegradação do ácido úrico, e N_{Abs} , é o número de fótons absorvidos pelo FS (**Equação 7**).

$$N_{Abs} = \frac{\Delta t}{N_a \cdot h \cdot c} \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I_{0(\lambda)} (1 - 10^{-\epsilon c l(\lambda)}) \cdot P_{(\lambda)} d\lambda \quad (7)$$

onde N_a é o valor da constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$), c é a velocidade da luz ($3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$).

Ainda, ϵ descreve o coeficiente de absorção molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) do FS, l o caminho óptico da cubeta (cm), λ_2 e λ_1 são os comprimentos de onda final e inicial (nm) - respectivamente, P é a potência (W ou $\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-3}$) e Δt é o tempo de iluminação de 10 minutos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos fotossensibilizadores em meio homogêneo

5.1.1 Caracterização fotofísica

O anel clorínico presente nos derivados de clorofila conferem ao espectro de absorção na região do UV-Vis características distintas facilmente identificáveis. Destaca-se a presença da banda Soret na região de 400 nm e a banda Q em torno de 650 nm. A determinação do comprimento de onda para cada banda é através da diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO, cujas transições entre os mesmos dão origem aos sinais observados. Por conseguinte, mudanças estruturais que alterem os níveis de energia desses orbitais podem ser avaliadas através desses espectros. Estruturas diferentes podem alterar estados de agregação, grau de protonação, polaridade e polarizabilidade, etc. (LAKOWICZ, 2006).

Nesse sentido, inicialmente registrou-se o espectro de absorção do Pheid e do Zn-Pheid em solventes de diferentes polaridades (**Figura 12**). Os comprimentos de onda máximos e coeficientes de absorvidade molar são expostos na **Tabela 2**. Conhecidamente, o Pheid é solubilizado e monomerizado em etanol, enquanto em meio aquoso encontra-se autoagregado (EICHWURZEL; STIEL; RÖDER, 2000). As variações das bandas do Pheid monomerizado e agregado podem ser observadas na **Figura 12a**, evidenciando para a espécie agregada em água uma grande diminuição do coeficiente de absorvidade molar e o alargamento das bandas. Adicionalmente, em clorofórmio o Pheid manteve as características de monômero. Os valores de comprimento de onda máximo encontrados para o Pheid estão de acordo com o exposto na literatura (FIEDOR et al., 2003). Para o Pheid, tanto a banda Q como a banda Soret são pouco sensíveis ao solvente, com a exceção sendo em água, onde as alterações no espectro e nos parâmetros obtidos resultam da agregação do FS.

Figura 12. Espectros de absorção para **(a)** Pheid ($3,91 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e **(b)** Zn-Pheid ($7,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes solventes.

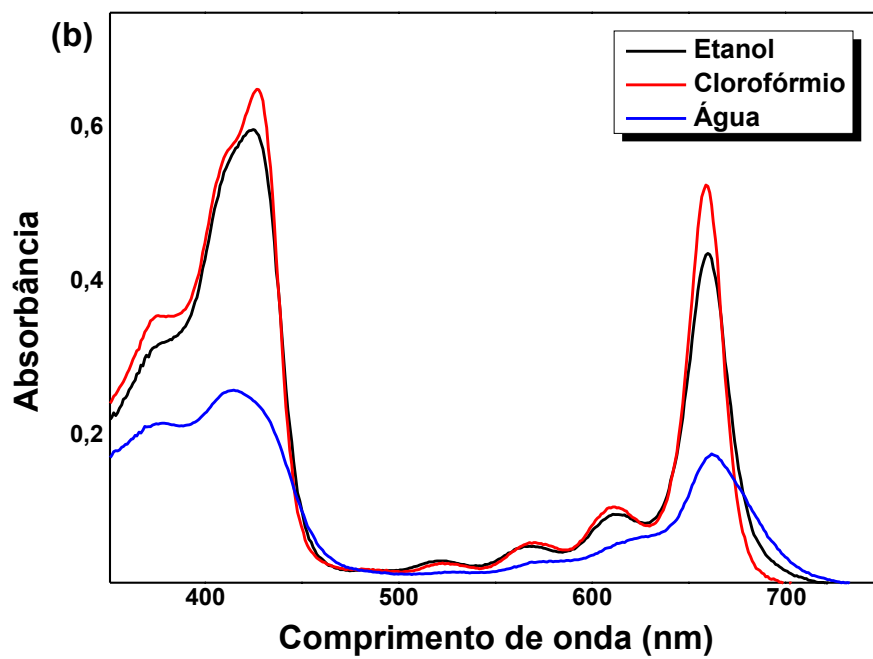
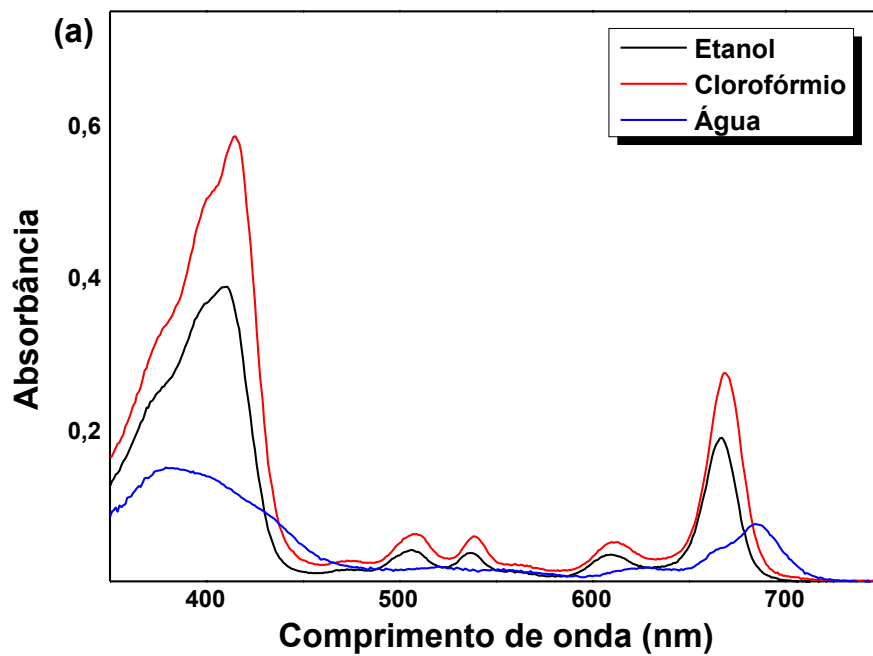


Tabela 2. Valores de comprimento de onda máximo (λ_{\max}) e coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para as bandas Soret e Q.

FS	Etanol		Clorofórmio		Água	
	λ_{\max} (nm)	ϵ ($10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ ($10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ ($10^3 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Pheid	409	97,1	415	117	381	30,1
	667	49 ^a	669	55	685	15,3
Zn- Pheid	428	90,9	426	118,6	415	45,9
	659	75,3 ^a	660	90,9	662	32

^aGerola et al., 2011.

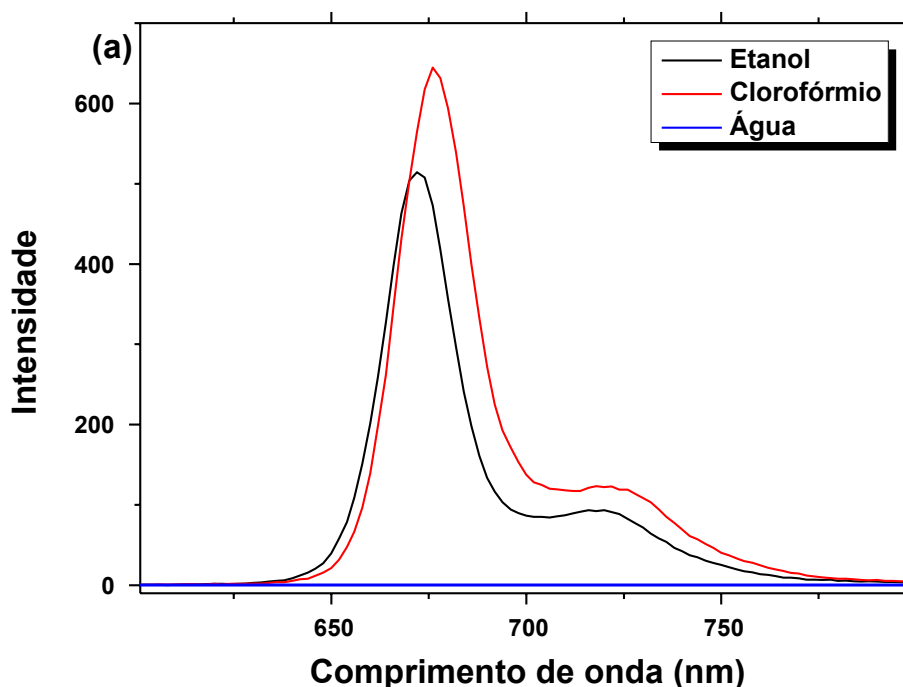
De maneira similar ao Pheid, o Zn-Pheid mostrou-se monomerizado em etanol e clorofórmio e agregado em água (**Figura 12b**). Estudos em relação ao comportamento do Zn-Pheid em água demonstram a manutenção do comprimento de onda máximo de absorção quando a espécie está monomerizada e dimerizada, a diferenciar pelo seu coeficiente de absorção molar e largura das bandas. Logo, espera-se para o Zn-Pheid que a alteração do λ_{\max} esteja mais estritamente relacionada a interações específicas com o solvente (EICHWURZEL; STIEL; RÖDER, 2000).

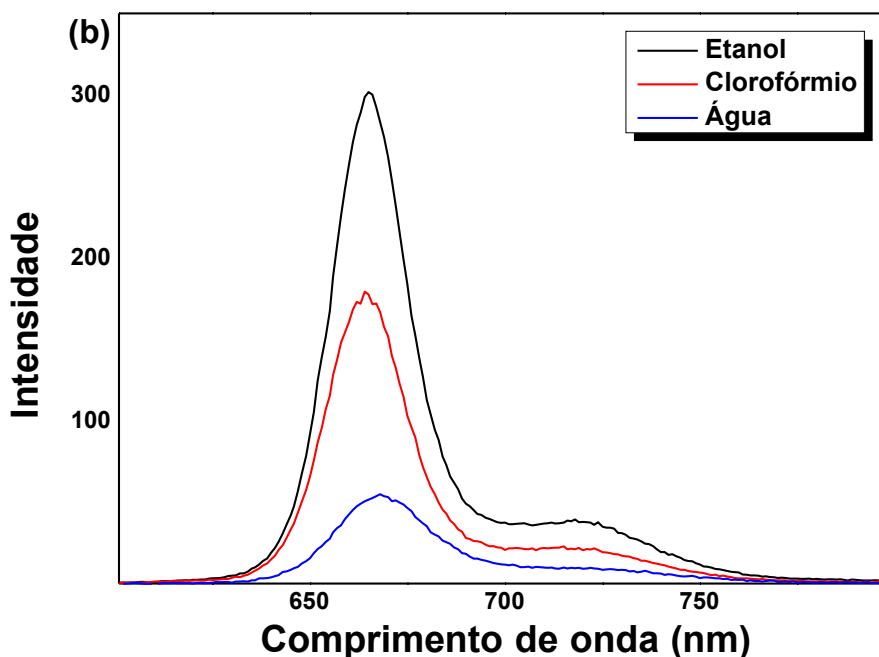
Com relação ao efeito do metal no espectro de absorção eletrônica de Zn- Pheid, observou-se um desvio batocrômico da banda Soret e hipsocrômico parabanda Q em comparação ao Pheid, sendo o efeito mais pronunciado para a banda Soret. Fiedor e colaboradores (2003) encontraram o mesmo padrão para a banda Q, onde as bandas para clorofilida *a* para etanol e clorofórmio encontram-se na mesma posição. No presente trabalho, a diferença entre os λ_{\max} entre o Pheid e Zn-Pheid nos diferentes solventes pode estar relacionada à alteração da densidade da nuvem de elétrons π do macrociclo devido à presença do metal, consequentemente alterando as energias de transição ($h\nu_{\max}$) entre os orbitais do estado fundamental e excitado. O deslocamento pode ser então correlacionado com a escala de eletronegatividade de

Pauling (E_N), já que o efeito indutivo gerado pela eletronegatividade do metal é predominante neste caso. Por exemplo, metais como Pd — cuja eletronegatividade está em 2,2, contra 1,65 do Zn — possui tendência a deslocar a banda de forma ainda mais significativa. Quando metalado com paládio, o composto metil- feoforbídeo produz um deslocamento de 25 nm (669 para 644 nm) (HARTWICH et al., 1998; YOON, IL et al., 2011).

Adicionalmente, registraram-se os espectros de emissão de fluorescência do Pheid e do Zn-Pheid em diferentes solventes (**Figura 13**). É possível observar que, em comparação aos espectros de absorção (**Figura 12**), o espectro de emissão de fluorescência é apresentado como a imagem espelhada do primeiro espectro citado. Tal efeito acontece de acordo com o princípio de Franck-Condon, onde a transição eletrônica entre os estados acontece tão rapidamente que não possibilita a mudança da geometria nuclear. Desta forma, os espectros de absorção e emissão são invertidos e semelhantes, considerando que as transições eletrônicas e vibracionais envolvidas em tais processos são as mesmas (LAKOWICZ, 2002).

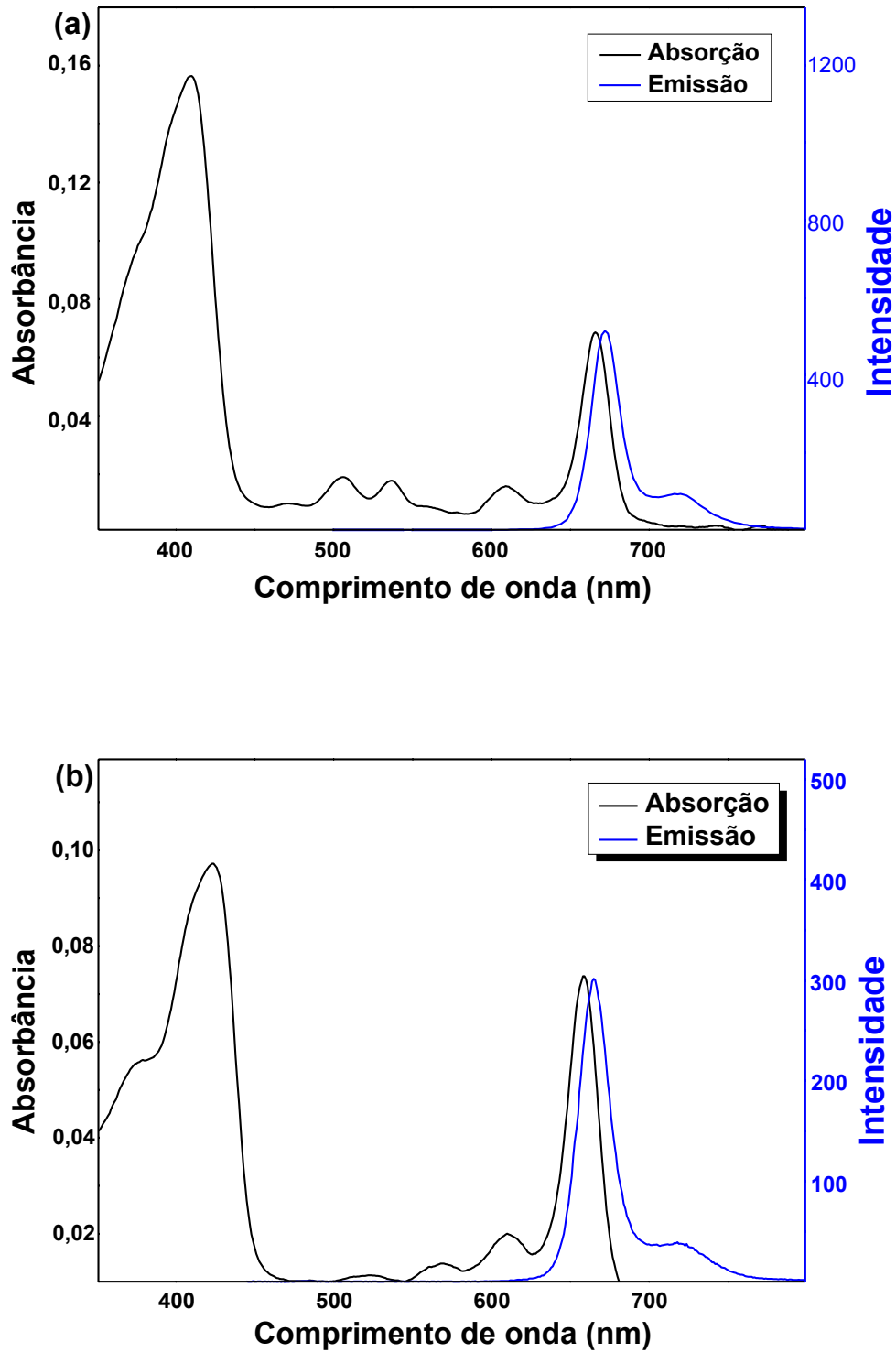
Figura 13. Espectro de emissão de fluorescência para (a) Pheid ($1,95 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e (b) Zn-Pheid ($9,9 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) em diferentes solventes.





Os espectros de emissão de fluorescência dos FS apresentaram um comprimento de onda máximo deslocado para o vermelho em relação ao espectro de absorção (deslocamento batocrômico) (**Figura 14**). O efeito do solvente em relação à emissão de um fluoróforo pode compreender diferentes aspectos de interações gerais como polaridade e polarizabilidade, viscosidade, índice de refração, entre outros. De forma geral, solventes polares tendem a produzir um desvio batocrômico ainda maior para o espectro de emissão devido à estabilização do estado excitado. Tradicionalmente, estruturas no estado excitado possuem momento de dipolo do estado excitado (μ_E) maior em comparação ao momento de dipolo do estado fundamental (μ_G). A estabilização provinda do solvente do μ_E provoca a diminuição da diferença de energia entre os estados e leva à emissão em comprimentos de onda maiores — i.e. menor energia. Ainda, é importante citar possíveis alterações no espectro provindas de interações específicas entre o solvente e o fluoróforo como ligações de hidrogênio, formação de complexos de transferência de carga, solvatação preferencial, etc. (KATZ et al., 1972; LAKOWICZ, 2002).

Figura 14. Sobreposição dos espectros de absorção e emissão de fluorescência para **(a)** Pheid ($2,31 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e **(b)** Zn-Pheid ($9,9 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) em etanol.



O efeito do solvente na estabilização do estado excitado pode ser caracterizado pelo deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$); o mesmo é decorrente da perda de

energia para o meio através de relaxamento vibracional após a transição $S_0 \rightarrow S_1$; desta forma, outros processos de desativação acontecem a partir do nível vibracional n para o nível vibracional 0 do estado S_1 . Os valores de Δv foram obtidos através da **equação 2** para os compostos analisados e são descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Valores de comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), e de deslocamento de Stokes (Δv) em diferentes solventes, a 25 °C.

FS	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Δv (cm ⁻¹)
<i>Etanol</i>			
Pheid	667	672	111
Zn-Pheid	659	665	137
<i>Clorofórmio</i>			
Pheid	669	676	155
Zn-Pheid	660	664	91
<i>Água</i>			
Pheid	685	-	-
Zn-Pheid	662	668	136

Para o Zn-Pheid os valores de Δv mostraram a seguinte ordem: etanol > água > clorofórmio. Por outro lado, para o Pheid observou-se o maior deslocamento de Stokes em clorofórmio seguido do etanol. Normalmente, os valores de deslocamento de Stokes são relacionados com a polaridade do solvente, que interfere diretamente no dipolo do estado excitado estabilizando-o e diminuindo sua energia, deslocando assim a emissão para comprimentos de onda de menor

energia. Assim, para o Zn-Pheid o menor $\Delta\nu$ foi encontrado para o clorofórmio seguido do etanol, contudo a sequência não foi seguida em água. Por outro lado, para o Pheid o maior deslocamento de Stokes foi observado para o solvente de menor polaridade (clorofórmio).

De fato, espera-se para os FS investigados interajam de formas diferentes com os solventes analisados. Avalia-se a ocorrência de interações específicas com o solvente, inclusive a possibilidade de formação de diferentes espécies agregadas em água. Para o FS contendo o Zn^{2+} como centro metálico coordenado aos átomos de nitrogênio do anel pirrol, espera-se a formação de ligações axiais com moléculas de solvente que possua elétrons isolados, possibilitando a doação de elétrons. Essas interações axiais podem afetar tanto a solubilidade do FS no solvente, quanto às suas propriedades fotofísicas. Em solventes apolares como clorofórmio, os grupos carbonílicos periféricos na estrutura dos FS podem atuar como doadores de elétrons e coordenar-se com o metal complexado (KATZ et al., 1972).

É possível comparar os resultados obtidos com os parâmetros de Kamlet-Taft - α (grau de doação de ligação hidrogênio — acidez, ou capacidade de receber elétrons), β (grau de aceitação de ligação hidrogênio, ou capacidade de doar elétrons) e π^* (polaridade/polarizabilidade). Tais parâmetros são mostrados na **Tabela 4**. Para os solventes polares práticos (etanol e água, com maiores valores de

□) espera-se a formação de ligação de hidrogênio com grupos doadores de elétrons periféricamente ligados à estrutura dos FS. Além disso, esses solventes podem estar coordenados ao centro metálico (maiores β) alterando o número de coordenação. Em clorofórmio interações hidrofóbicas devem prevalecer.

Tabela 4. Parâmetros de Kamlet-Taft para os diferentes solventes (REICHARDT, 2003).

Solvente	α	β	π^*
Etanol	0,86	0,75	0,54
Água	1,17	0,47	1,09
Clorofórmio	0,2	0,1	0,58

A rigidez dos FS nos solventes é um parâmetro importante a ser considerado, visto que a organização do sistema pode contribuir de forma a possibilitar menor número de modos de relaxação ao diminuir os possíveis graus de liberdade. Quando se tem grande possibilidade de dissipação de energia para o meio tem-se maiores valores de Δv . Comparando o Zn-Pheid em água e etanol tem-se aproximadamente o mesmo Δv , contudo seguindo a polaridade dos solventes espera-se o maior deslocamento em água. Os valores encontrados podem ser relacionados com a organização do Zn-Pheid (autoagregado) em água, o que diminui o número de modos de relaxação possíveis.

Adicionalmente, determinou-se os valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), através da **equação 3**, para os compostos analisados (**Tabela 5**). Em etanol e clorofórmio, onde ambos os FS estão monomerizados, observou-se um maior rendimento quântico de fluorescência para o Pheid. Isso porque a inserção do zinco na estrutura pode aumentar a conversão intersistema para o estado tripleto, que compete diretamente com a emissão de fluorescência. O efeito do Zn no valor de Φ_F é consequência do tamanho do átomo, visto que a influência do momento angular orbital de um elétron em seu próprio momento angular do spin leva à um acoplamento spin-órbita, efeito que leva à uma mistura de estados: o estado singleto passa a ter certo caráter tripleto e vice-versa. Como transições $S_1 \rightarrow T_1$ são naturalmente proibidas pela regra de conservação de spin, são pouco prováveis; a inserção de átomos pesados como Zn aumenta o rendimento desses processos, levando à diminuição do rendimento de caminhos competitivos como a fluorescência (WARDLE, 2009).

Em água, o rendimento quântico de fluorescência do Zn-Pheid foi de 0,1, enquanto o Pheid não apresentou emissão de fluorescência. Como discutido anteriormente, em meio aquoso o Pheid encontra-se autoagregado, e este processo resulta na diminuição de emissão de fluorescência devido ao efeito de autossupressão de energia (GEROLA et al., 2011). Adicionalmente, os espectros de absorção do Zn-Pheid evidenciaram a formação de autoagregados, sendo estes ainda capazes de emitir fluorescência.

Tabela 5. Valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e tempo de vida de fluorescência (t_{TF}), a 25 °C.

Φ_F			
	Etanol	Clorofórmio	Água
FS			
Pheid	0,30 ^a	0,15	- ^b
Zn-Pheid	0,16	0,10	0,10
t_{TF}			
Pheid	7,51	6,89	- ^b
Zn-Pheid	6,00	4,41	4,72

Viscosidade dos solventes utilizados (cP) a 25 °C: etanol (1,074); clorofórmio (0,908) e água (0,890). **Fonte:** LIDE (2005).

^a Valor de referência obtido em GEROLA et al, (2011)

^b Não há emissão de fluorescência.

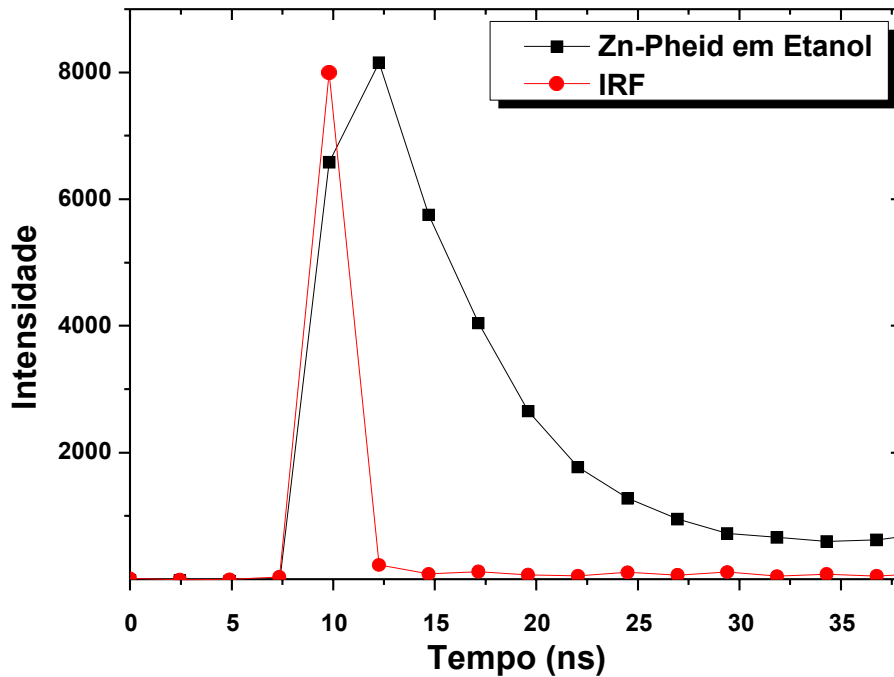
Para ambos os FS observou-se um menor Φ_F em clorofórmio em comparação ao etanol. Visto que em ambos os solventes espera-se a solubilização e monomerização dos FS, a diferença observada pode estar relacionada ao favorecimento de outros processos na presença de clorofórmio, como a conversão intersistema e processos fotoquímicos. De fato, estudos prévios realizados com derivados de clorofila em tetracloreto de metano (CCl₄) mostraram um rendimento

quântico de oxigênio singleto significativamente maior do que em etanol (REDMOND, GAMLIN, 1999), o que está em concordância com a maior conversão intersistema no solvente halogenado.

Adicionalmente, registrou-se a emissão de fluorescência resolvida no tempo para os FS nos diferentes solventes, como exemplificado para o Zn-Pheid em etanol na **Figura 15**. Essas medidas foram utilizadas para a determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_F) (**Tabela 5**). O tempo de vida do Pheid em etanol foi ligeiramente maior do que em clorofórmio, enquanto em água a baixa intensidade de emissão devido à autoagregação impossibilitou a determinação do tempo de vida. Analisando os valores de τ_F do Zn-Pheid, observa-se a seguinte ordem: etanol > clorofórmio > água. A maior variação no tempo de vida do Zn-Pheid com o solvente pode ser devido a interações específicas do FS nos diferentes solventes. Para clorofilidas, é conhecida a coordenação intermolecular do oxigênio do grupo carboxilato na posição axial do átomo de metal (Mg ou Zn) (KATZ et al., 1972; GEROLA et al., 2011). Essa coordenação deve estar diretamente relacionada à polaridade do solvente, uma vez que em solventes mais polares e capazes de formar ligação hidrogênio como a água e o etanol tem-se a maior solvatação do grupo carboxilato, diminuindo a formação do complexo. Por outro lado, em solventes como o clorofórmio a formação do complexo deve prevalecer, e isso resulta em alterações das propriedades fotofísicas do FS, como a diminuição do tempo de vida de fluorescência.

Essa hipótese pode ser confirmada pela análise do tempo de vida da bacterioclorofila *a* — a qual possui Mg^{2+} como metal coordenado (CONNOLLY; SAMUEL; JANZEN, 1982) em clorofórmio e etanol, para esse caso os valores foram similares, evidenciando a importância do carboxilato livre para a formação do complexo. Ainda, a formação dos agregados para Pheid e Zn-Pheid em água parece proceder de forma diferente: enquanto para Pheid existe clara supressão dos processos fotofísicas, a estrutura formada pelo Zn-Pheid aparenta manter parcela de suas propriedades, de forma a apresentar τ_F comparável ao clorofórmio. Assim, pode-se esperar para o Zn-Pheid em água a formação de complexos axiais intermoleculares.

Figura 15. Cinética de decaimento do estado excitado para o Zn-Pheid (4×10^{-6} mol L⁻¹) em etanol.



5.1.2 Fotoestabilidade dos fotossensibilizadores em meio homogêneo

Um processo muito importante para os fotossensibilizadores no estado excitado é o fotobranqueamento, que leva a diminuição da intensidade de absorção sob iluminação, e resulta na diminuição da eficiência dos processos fotodinâmicos. Para a avaliação da fotoestabilidade dos FS nos solventes utilizou-se uma fonte de luz LASER (LED, $\lambda_{\text{max}} = 663$ nm, $P = 100$ mW). Os espectros de absorção em função do tempo de iluminação para o Pheid e o Zn-Pheid em clorofórmio são apresentados nas **Figuras 16a e 17a**, respectivamente. Durante a iluminação houve uma diminuição da absorção das bandas características dos FS. As cinéticas de fotodegradação foram criadas na banda Q, e são mostradas nas **Figuras 16b e 17b**, respectivamente. Como pode ser visto nas cinéticas, os tempos necessários para a fotodegradação dos FS são muito diferentes, de maneira que a fotodegradação completa do Pheid leva cerca de 800 min, enquanto a fotodegradação do Zn-Pheid ocorreu em aproximadamente 20 min, evidenciando a maior fotoestabilidade do Pheid demetalado. Para uma quantificação desses resultados determinaram-se as

constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) e os rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}), expostos na **Tabela 6**.

Figura 16. (a) Espectros de absorção sobrepostos em clorofórmio para fotodegradação do Pheid ($3,91 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e (b) Cinética de fotobranqueamento do Pheid em clorofórmio.

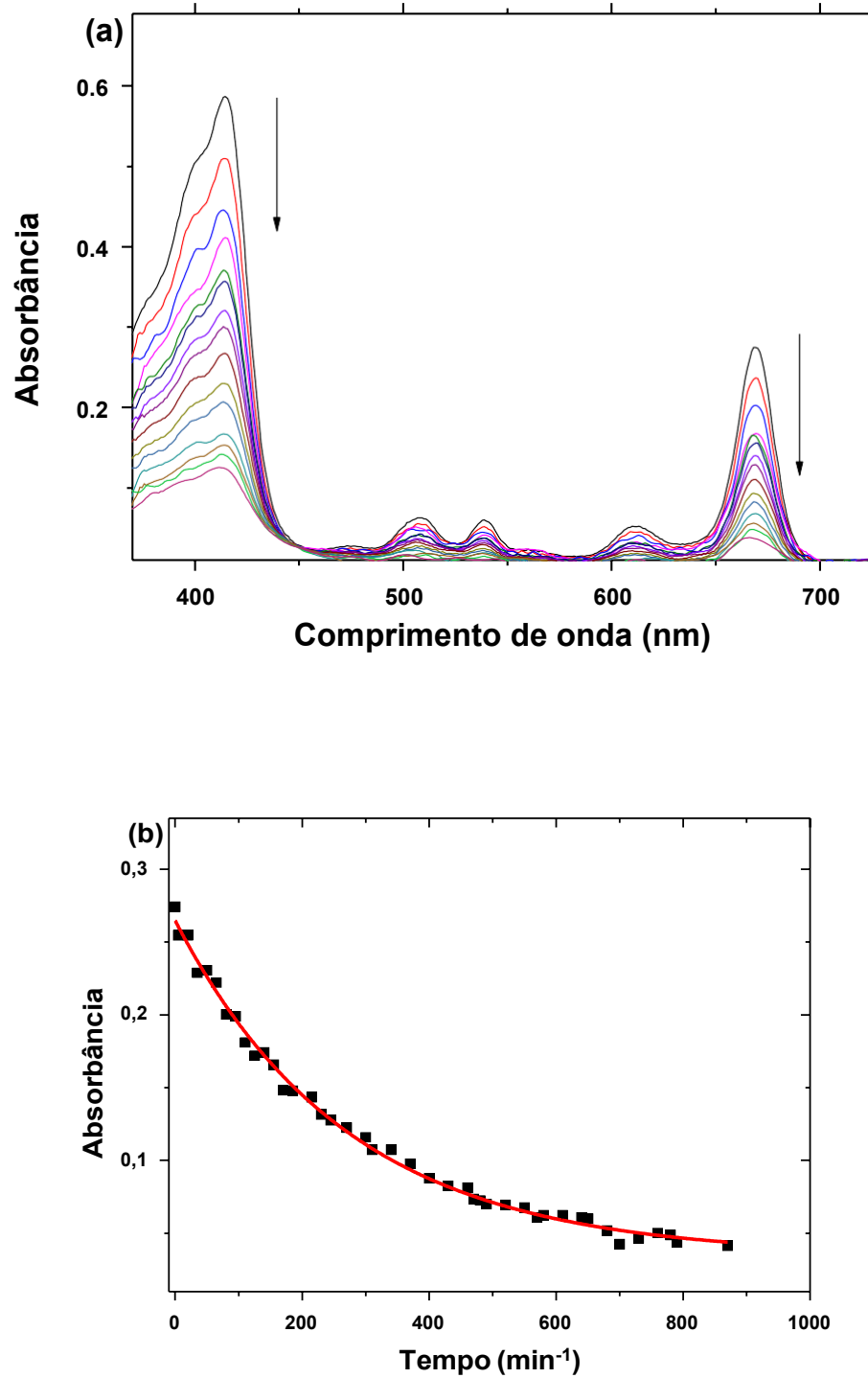


Figura 17. (a) Espectros de absorção sobrepostos para fotodegradação do Zn-Pheid ($7,77 \times 10^{-6}$ mol L^{-1}) em clorofórmio e **(b)** Cinética de fotobranqueamento para Zn-Pheid em clorofórmio.

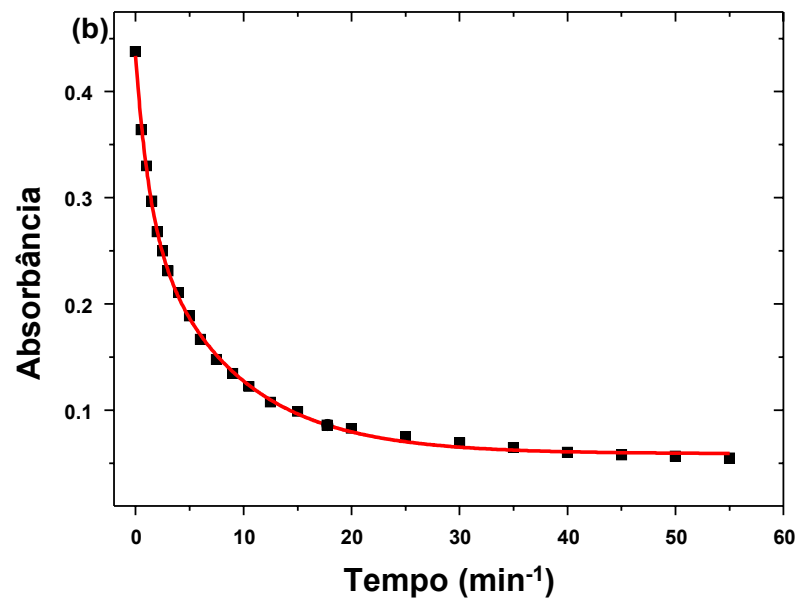
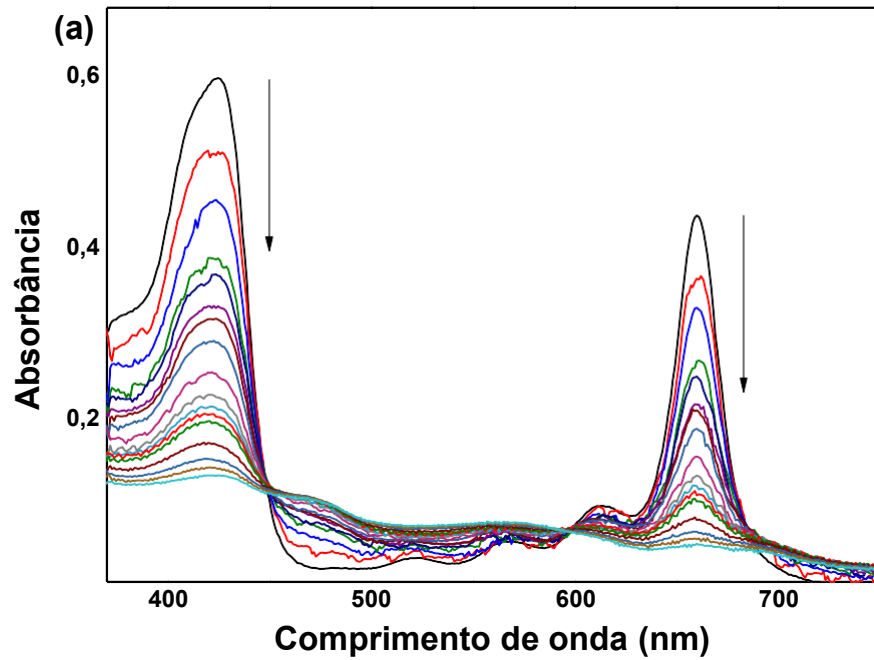


Tabela 6. Valores de constante de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}) para o Pheid e Zn-Pheid em diferentes solventes.

FS	k_{FB} (s^{-1})	Φ_{FB}
<i>Etanol</i>		
Pheid	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-4}$
Zn-Pheid	$2,6 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-3}$
<i>Clorofórmio</i>		
Pheid	$6,0 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-3}$
Zn-Pheid	$k_1 = 1,3 \times 10^{-2}$ $k_2 = 2,0 \times 10^{-3}$	0,29
<i>Água</i>		
Pheid	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-2}$
Zn-Pheid	$k_1 = 1,8 \times 10^{-2}$ $k_2 = 2,5 \times 10^{-4}$	0,65

Constantes dielétricas dos solventes utilizados: etanol (24,70); clorofórmio (4,72) e água (78,39). **Fonte:** LIDE (2005).

Para o Pheid os valores de k_{FB} aumentaram na seguinte ordem: etanol < clorofórmio < água. Contudo, nesses solventes a capacidade do FS absorver a radiação é alterada como pode ser visto pelos valores de coeficiente de absorvidade molar. Assim, para comparar os processos de fotobranqueamento determinou-se o rendimento quântico de fotobranqueamento (**Tabela 6**). O maior valor de Φ_{FB} foi encontrado em água, seguido de clorofórmio e etanol, sendo que o menor Φ_{FB} em etanol está em concordância com os valores de Φ_F discutidos previamente. Para o Pheid em etanol, tem-se o maior valor de Φ_F em comparação ao clorofórmio, e como os processos são competitivos espera-se a diminuição do

rendimento de outros processos fotoquímicos, dentre os quais o fotobranqueamento. Quando se compara os valores de Φ_{FB} para o Pheid em água e etanol, tem-se uma fotodegradação muito mais intensa em meio aquoso, o que pode ser avaliado através da diferença da constante dielétrica (ϵ) de cada um dos solventes. Isso porque a ϵ_s da água é muito maior do que a constante dielétrica do etanol, possibilitando a estabilização de espécies íon-radicaís formadas durante a fotorreação (SPIKES, 1991).

A cinética de fotobranqueamento do Zn-Pheid em etanol seguiu um modelo de primeira ordem, obtendo a constante de velocidade de fotobranqueamento, a partir da qual se determinou o Φ_{FB} . Comparando os valores de Φ_{FB} em etanol, observa-se a maior fotodegradação para o FS metalado. Em concordância com esse resultado, Scheer e colaboradores (2006) descrevem a maior fotoestabilidade de derivados de bacterioclorofila não metalados ou cujo metal coordenado não possibilite ligantes extras; desta forma, o oxigênio não permanece nas vizinhanças. Estes compostos apresentam baixa afinidade em relação ao oxigênio, que não se liga da mesma forma como em estruturas metaladas com Zn^{2+} ou Mg^{2+} , por exemplo, notadamente mais suscetíveis ao fotobranqueamento como exposto por Gerola (2011) em seu estudo a partir de derivados de clorofila a. A presença de Zn^{2+} no centro do anel possibilita a ligação axial com espécies reativas de oxigênio, aumentando assim sua interação e possibilidade de oxidação, levando a Φ_{FB} consideravelmente mais altos que seu análogo não metalado.

Em adição, para o fotobranqueamento do Zn-Pheid em clorofórmio e água, as cinéticas ajustaram-se a um modelo biexponencial com duas etapas consecutivas, obtendo duas constantes de velocidade k_1 e k_2 (**Tabela 6**). Os rendimentos quânticos de fotobranqueamento foram determinados a partir de k_1 (MASKILL, 1999). Para o Zn-Pheid os valores de Φ_{FB} seguiram a ordem: água > clorofórmio >> etanol. Nesse caso, os valores extremamente altos de Φ_{FB} em água e clorofórmio, bem como o perfil cinético em duas etapas vão ao encontro da discussão anterior, que sugeriu a formação de complexos de coordenação do carboxilato com o átomo de zinco, de maneira intramolecular para o clorofórmio e intermolecular para a água. Assim, os efeitos observados na fotodegradação em função do solvente é resultado de diferentes organizações do Zn-Pheid em cada solvente.

5.1.3 Investigação do mecanismo de fotobranqueamento através do borbulhamento de nitrogênio e adição de sondas supressoras de espécies reativas de oxigênio

A presença de oxigênio molecular é essencial para a efetividade do FS em TFD. Contudo, a produção de espécies reativas de O_2 e oxigênio singleto, através dos mecanismos do tipo I e II, são o aparato para sua própria degradação. O impacto da presença destas espécies reativas pode ser avaliado através da diminuição da sua concentração de oxigênio no meio pelo borbulhamento de nitrogênio. Assim, foram realizadas cinéticas de fotodegradação para os FS com e sem o borbulhamento de N_2 , como exemplificado para o Zn-Pheid na **Figura 18**. Os valores de constante de velocidade de fotobranqueamento e de rendimento quântico de fotobranqueamento em etanol foram determinados para os FS (**Tabela 7**). Para ambos os FS observou-se uma diminuição nos valores de k_{FB} e Φ_{FB} com o borbulhamento de nitrogênio. Esse resultado confirma a participação do oxigênio na fotodegradação dos derivados de clorofila, através da formação de espécies reativas de oxigênio. Vale destacar que a diminuição foi mais intensa para o Zn-Pheid, que como previamente discutido apresenta a capacidade de ligar-se axialmente com as espécies oxidativas, favorecendo os processos de fotodegradação.

Figura 18. Cinéticas de fotodegradação do Zn-Pheid em etanol com e sem borbulhamento de N_2 .

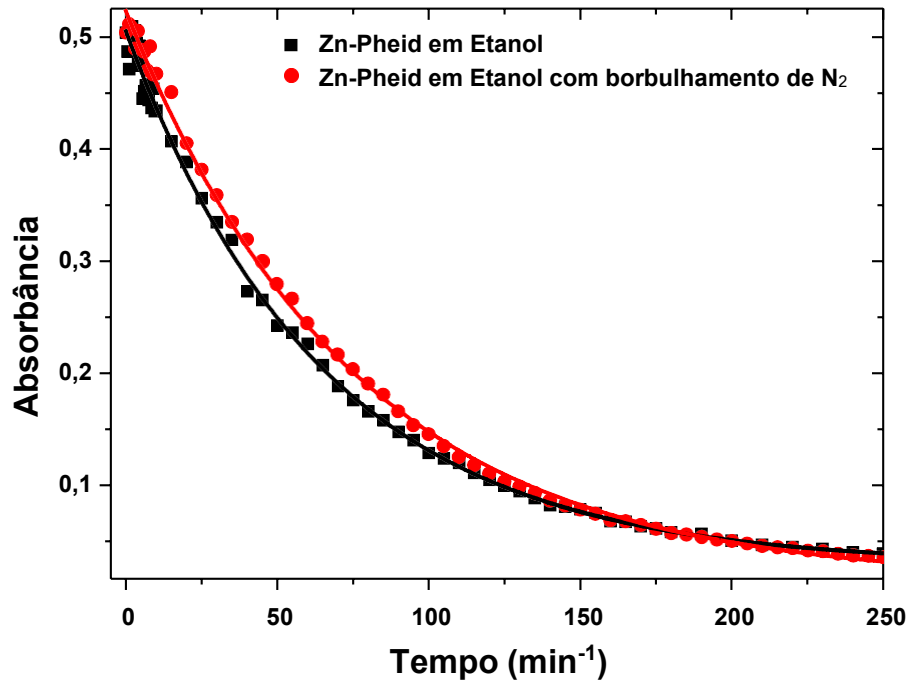


Tabela 7. Valores de constante de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}) em meio aerado e desaerado após borbulhamento de N_2 .

FS	k_{FB} (s^{-1})	Φ_{FB}
<i>Etanol</i>		
Pheid	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-4}$
Zn-Pheid	$2,6 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-3}$
<i>Etanol em atmosfera de N_2</i>		
Pheid	$2,8 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-5}$
Zn-Pheid	$2,3 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-4}$

A fim de avaliar a importância de cada espécie reativa para a fotodegradação do FS, investigou-se a presença de supressores “scavengers” nas fotoreações. Por exemplo, a azida de sódio é utilizada como supressor de oxigênio singleto, enquanto o DMSO é utilizado como sonda para avaliar a formação de radical hidroxil (OH•), já que o mesmo é facilmente oxidado para forma de ácido metanosulfônico. Os valores de constante de velocidade e de Φ_{FB} na presença dos supressores são mostrados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Descrição dos valores encontrados de k_{FB} e Φ_{FB} para os FS na presença de supressores de espécies reativas de O_2 .

FS	Solvente	Supressor	Espécie suprimida	k_{FB} ($10^{-4} s^{-1}$)	Φ_{FB}
Pheid	<i>Etanol</i>	-	-	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-4}$
	<i>Etanol</i>	DMSO ^a	HO•	$8,4 \times 10^{-6}$	$6,4 \times 10^{-4}$
	<i>Água</i>	-	-	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-2}$
	<i>Água</i>	Azida de sódio ^b	1O_2	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-2}$
Zn-Pheid	<i>Etanol</i>	-	-	$2,5 \times 10^{-4}$	$6,9 \times 10^{-3}$
	<i>Etanol</i>	DMSO ^a	HO•	$3,1 \times 10^{-4}$	$8,3 \times 10^{-3}$
	<i>Água</i>	-	-	$k_1 = 1,8 \times 10^{-2}$ $k_2 = 2,5 \times 10^{-3}$	0,65
	<i>Água</i>	Azida de sódio ^b	1O_2	$7,2 \times 10^{-3}$	0,17

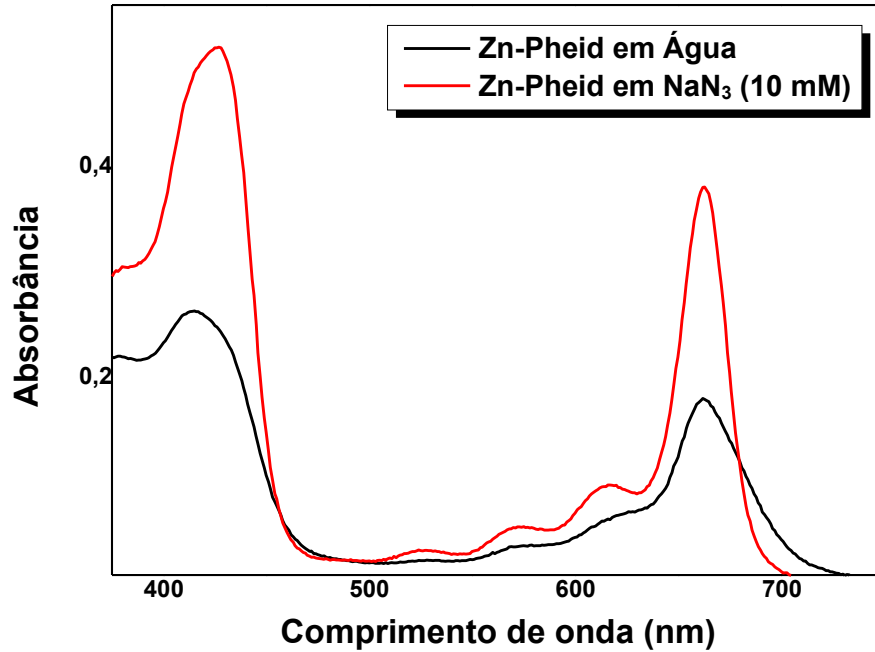
^aConcentração: 0,28 M.

^bConcentração: 10 mM.

Para o Pheid, na presença de ambos os supressores (DMSO e azida de sódio) observou-se o aumento da velocidade de fotodegradação e do rendimento quântico de fotobranqueamento (**Tabela 8**). Esse resultado indica de modo indireto que o oxigênio singlete e o radical hidroxil não estão diretamente envolvidos no processo de fotodegradação do FS, nesse caso a clivagem do FS deve acontecer. Em adição, o aumento das velocidades de reação na presença dos supressores deve ser consequência de interações específicas do FS e intermediários da fotorreação com o DMSO e a azida de sódio. Vale ressaltar que os rendimentos quânticos de fotobranqueamento do Pheid são extremamente baixos e esse FS é fotoestável.

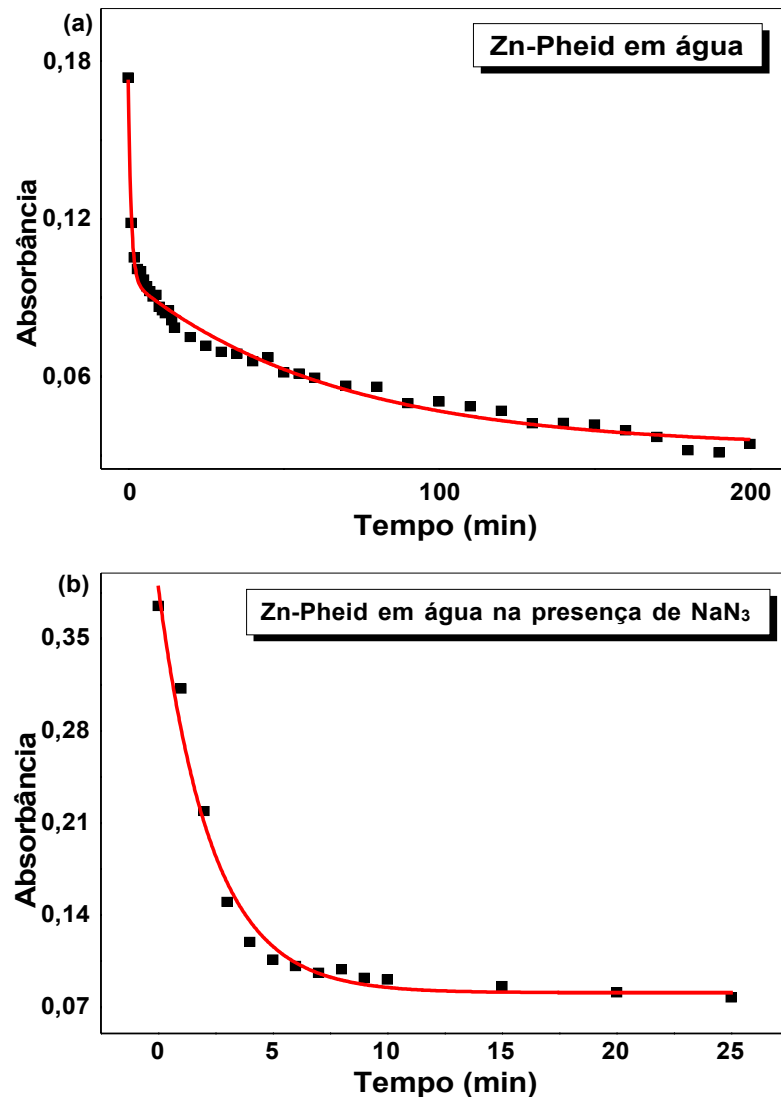
Para o fotobranqueamento do Zn-Pheid também avaliou-se o efeito da presença de DMSO e de azida (**Tabela 8**). Assim como para o Pheid, o radical hidroxil não aparenta ser importante no mecanismo de fotodegradação. Na presença de azida de sódio houve uma grande diminuição do rendimento quântico de fotobranqueamento para o Zn-Pheid, o que indicaria a participação do oxigênio singlete no mecanismo de foto-oxidação. Contudo, uma observação do espectro de absorção do FS na presença de azida de sódio mostra uma grande variação (**Figura 19**), que indica a monomerização do FS, ou seja, a diminuição do agregado envolvendo a ligação axial intermolecular do carboxilato com o zinco. Esse resultado pode ser explicado pela coordenação axial da azida ao zinco (HIMO et al., 2003) e está em concordância com o perfil cinético observado (**Figura 20**), de maneira que na ausência de azida quando o FS está agregado tem-se uma reação em duas etapas consecutivas (**Figura 20a**), enquanto na presença de azida com o FS monomerizado, a cinética seguiu um modelo de primeira ordem (**Figura 20b**). Assim, os estudos de fotobranqueamento realizados corroboram com os resultados de solvatação e organização da molécula nos diferentes meios.

Figura 19. Espectros de absorção do Zn-Pheid ($7,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em água e em solução aquosa de NaN_3 (10 mmol L^{-1}).



Com relação à investigação do mecanismo de fotodegradação na presença de *scavengers*, tem-se para os FS estudados uma interação significativa dos supressores com os FS, que dificultou a avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio no mecanismo de reação. Ainda assim, estes estudos ajudaram a visualizar a importância dos estados de agregação do FS para a sua fotoestabilidade.

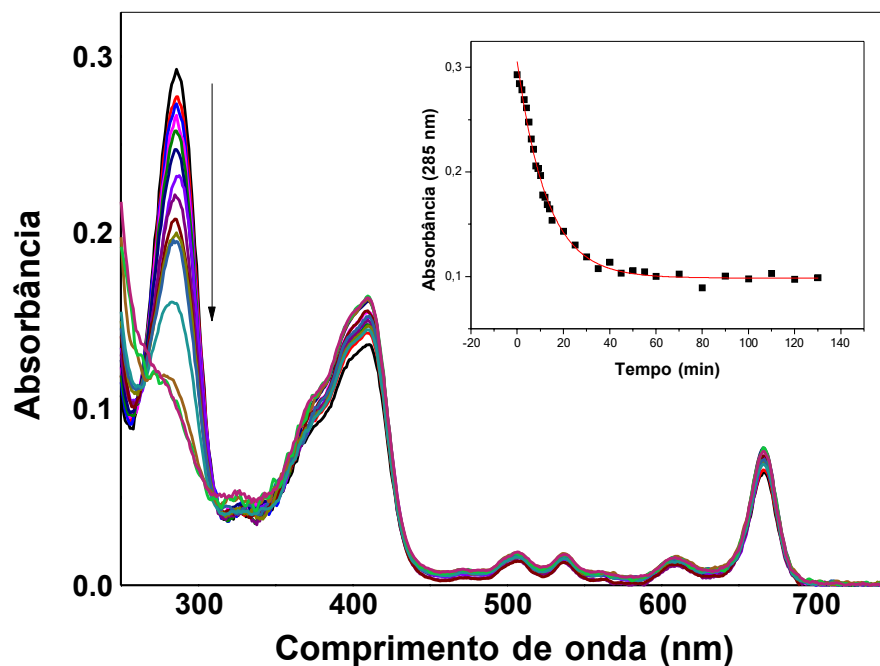
Figura 20. Cinéticas de fotobranqueamento do Zn-Pheid em meio aquoso na ausência (a) e presença (b) de NaN_3 .



5.1.4 Rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ})

O alto rendimento quântico de oxigênio singleto é característica essencial para possíveis FS, já que esta forma reativa de oxigênio é essencial para o sucesso da terapia fotodinâmica. O uso de ácido úrico (AU) como sonda para obtenção do Φ_{Δ} é uma ferramenta de baixo custo, na qual se avalia a diminuição da banda característica da sonda (em aproximadamente 290 nm), que ocorre devido à rápida oxidação do AU na presença do oxigênio singleto (**Figura 21**).

Figura 21. Espectros de absorção do AU (1×10^{-4} mol L $^{-1}$) em etanol na presença de Pheid (1×10^{-6} mol L $^{-1}$) com o tempo de iluminação. A cinética de degradação do AU em 285 nm é inserida.



Os valores de constante de velocidade de degradação do AU foram obtidos a partir do ajuste a um modelo cinético de primeira ordem (**anexo na Figura 2 e Tabela 9**). Em adição, a **Tabela 9** mostra os valores de número de fótons absorvidos (N_{Abs}) em 10 min de iluminação, o valor da eficiência fotodinâmica química (Φ_{Δ}) e o rendimento quântico de oxigênio singleto.

Os valores de Φ_{Δ} para o Pheid e o Zn-Pheid foram similares entre si, e próximo a 0,5, o que evidencia o potencial desses FS para gerar oxigênio singleto. Por outro lado, espera-se na presença de metais pesados coordenados ao centro do anel porfirínico um aumento significativo do Φ_{Δ} . Isso porque o efeito do metal pesado favorece o acoplamento spin-órbita e favorece a transição $S_1 \rightarrow T_1$, onde acontece a transferência de energia entre o FS e o oxigênio molecular (em estado tripleto naturalmente), gerando então o oxigênio singleto.

Tabela 9. Valores de constante de velocidade de degradação do ácido úrico (k_{AU}) e rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}).

FS	[FS] (10^{-6} mol L $^{-1}$)	k_{AU} (min $^{-1}$)	N_{Abs} (10^{-7} mol)	\square_{Δ} (10^6)	Φ_{Δ}
Pheid	1	0,078	0,59		
	2	0,138	0,95	1,03	0,51 ^a
	4	0,208	1,80		
Zn-Pheid	1	0,123	0,77		
	2	0,184	1,36	1,00	0,49
	4	0,136	2,50		

^aROEDER et al., 1990.

Os resultados encontrados vão de acordo com o demonstrado na literatura, sendo os valores de Φ_{Δ} para a feofitina e a feofitina de zinco em etanol 0,51 e 0,46, respectivamente (ROEDER et al., 1990; GEROLA et al., 2011). Como discutido

anteriormente, o Zn-Pheid em etanol mostrou menor Φ_F e \square_{TF} do que o Pheid, o que sugere a maior conversão interssistema para o estado tripleto, e assim o Zn-Pheid no estado tripleto deve ter menor eficiência no processo de transferência de energia para o oxigênio molecular, favorecendo outros processos fotoquímicos, como exemplo, as reações de fotobranqueamento.

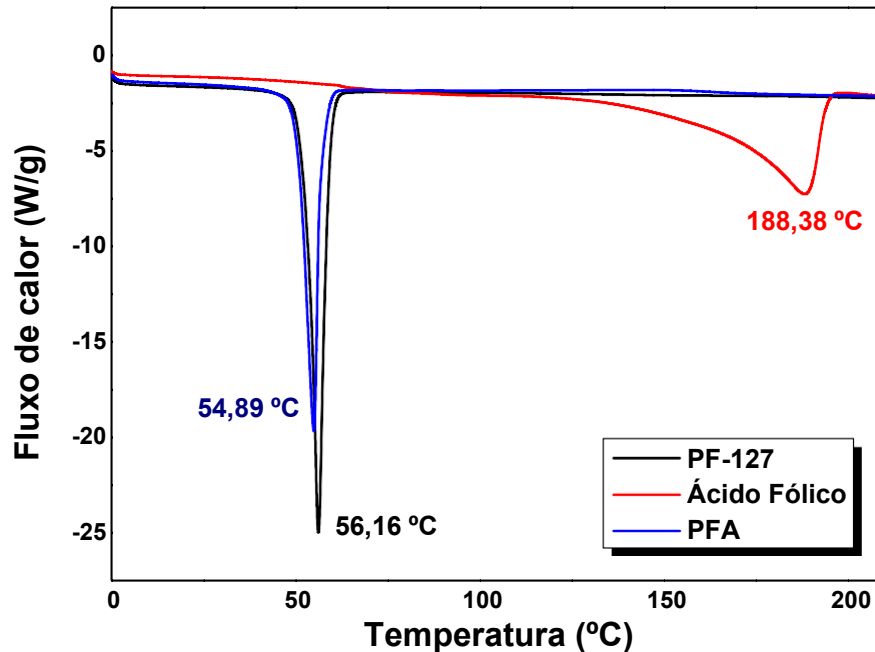
5.2 Caracterização dos sistemas de liberação

5.2.1 Caracterização do Pluronic® F-127 funcionalizado com ácido fólico

A caracterização do polímero funcionalizado foi realizada por ^1H -RMN, o espectro é mostrado no **Anexo A**. Observou-se para o PFA (DMSO- d_6 , 200 MHz) os seguintes deslocamentos químicos, δ (ppm): 1,00~1,08 (m, -CH₃ do PPO), 3,32~3,50 (m, -CH₂-CHO- do PPO e -CH₂-CH₂O- do PEO), 4,53 (C₉-H₂ do FA), 6,62 (hidrogênios aromáticos do FA), 7,46 (hidrogênios aromáticos do FA), 8,10 (C₇-H do FA). A presença dos deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios aromáticos do ácido fólico confirma a conjugação com o polímero. A baixa intensidade dos prótons provenientes do ácido fólico na estrutura se deve à baixa proporcionalidade entre os hidrogênios relativos ao ácido fólico e o polímero, diminuindo a proporção entre os sinais observados no espectro.

Adicionalmente, realizaram-se medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para PF-127, ácido fólico e PFA, os resultados obtidos são apresentados na **Figura 22**. Segundo a literatura, o ponto de fusão para o PF-127 se apresenta como um evento endotérmico em 56,15 °C ou 329,15 K. Neste trabalho, o polímero apresenta o evento na mesma temperatura de fusão, sendo que a curva para o PFA apresenta um deslocamento deste evento e não apresenta o evento endotérmico característico para o ácido fólico em 188,38 °C, garantindo a ausência de ácido fólico livre na amostra de PFA e a estabilidade do conjugado frente à degradação térmica, já que este único evento endotérmico presente para o ácido fólico é descrito na literatura como sua degradação (BHOMIA et al., 2014, GAZZALI A., et al, 2016). Além disso, a alteração no ponto de fusão entre o polímero e o seu derivado, indica a alteração na estrutura deste último.

Figura 22. Curvas térmicas para as matérias-primas (PF-127 e Ácido fólico) e para o derivado polimérico (PFA).

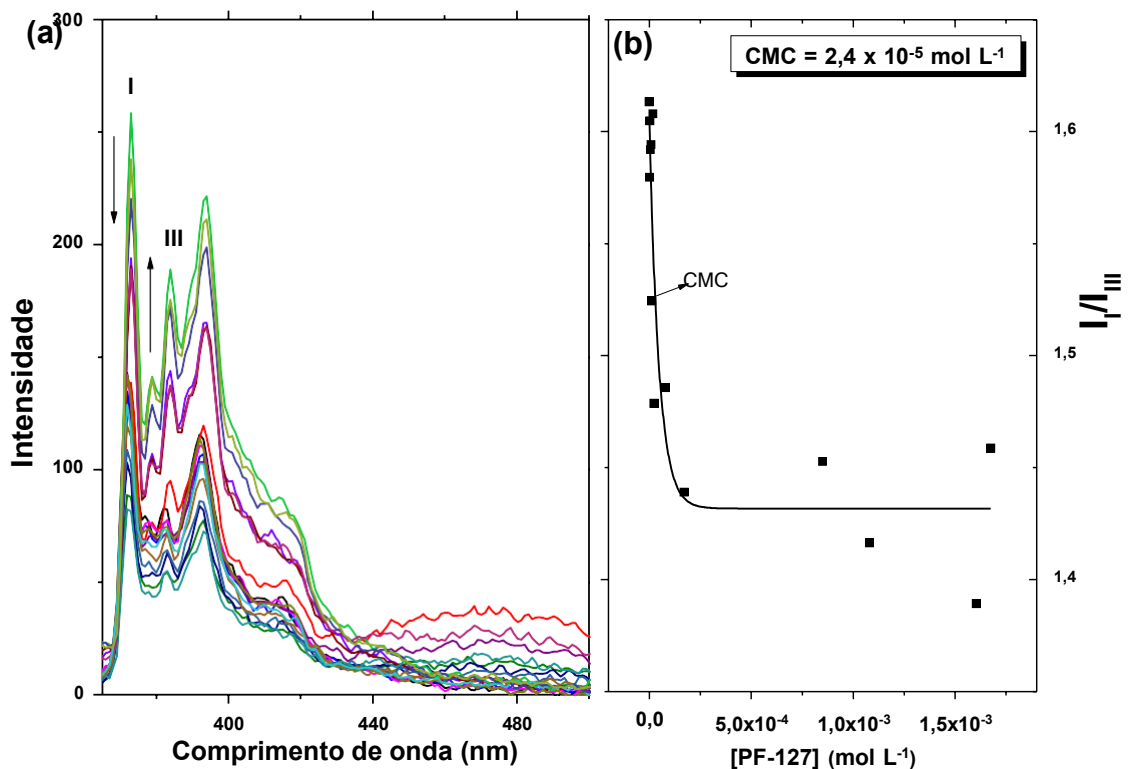


5.2.2 Determinação da concentração micelar crítica (CMC) do Pluronic® F-127 funcionalizado com ácido fólico

Para a caracterização do sistema polimérico, avaliou-se a concentração micelar crítica do PF-127 funcionalizado com ácido fólico (PFA) e do PF-127 não funcionalizado para efeito de comparação. Inicialmente, a CMC foi determinada pela utilização do pireno como sonda fluorescente. Conhecidamente, o pireno é uma sonda capaz de avaliar a variação de polaridade do meio, e conseqüentemente pode-se avaliar a formação de micelas com microambientes hidrofóbicos. Isso porque com a formação de micelas, tem-se a partição da sonda para os microambientes hidrofóbicos. Os espectros de emissão do pireno em diferentes concentrações de polímero são apresentados na **Figura 23a** para o PF-127. Com o aumento da concentração de polímero houve uma diminuição da razão das bandas I e III, observadas em 272 e 282 nm, respectivamente. Essa variação é mostrada na **Figura 23b** e foi utilizada para a determinação da CMC de $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Em adição, acompanhou-se a formação de excímero de pireno com máximo de emissão em 475 nm. A presença da banda do excímero é conseqüência direta da interação

de duas moléculas de pireno no meio, uma no seu estado excitado (Py^*) e outra no estado fundamental (Py). A formação de excímero de pireno é dependente da concentração da sonda e na concentração utilizada não é observada, contudo, com a formação de microambientes mais apolares tem-se a partição da sonda para esses microambientes resultando na formação do excímero. A razão das bandas de excímero e monômero ($I_{\text{Ex}}/I_{\text{M}}$) em função da concentração do PF-127 é mostrada no **Anexo B**. Com o aumento da concentração do polímero houve um aumento da formação de excímero, com máximo próximo a CMC. Para $[\text{PF-127}] > \text{CMC}$ verificou-se a diminuição da emissão do excímero, o que é justificado pela diluição da sonda nos microambientes hidrofóbicos.

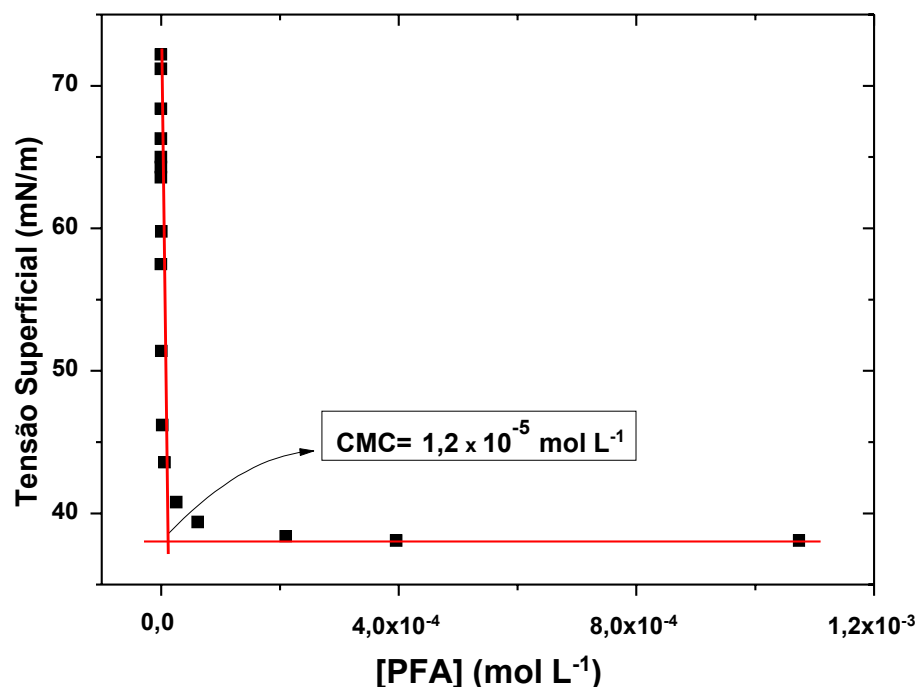
Figura 23. (a) Espectros de emissão de fluorescência do pireno ($5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) com crescentes concentrações de PF-127 (b) Razão da intensidade das bandas I/III em função da concentração de polímero. $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$.



Para a determinação da CMC do PFA utilizou-se inicialmente o pireno como sonda fluorescente. Contudo, com a adição do polímero observou-se uma intensa supressão da emissão do pireno.

A interação entre o ácido fólico presente no PFA e pireno com o subsequente *quenching* de fluorescência deste último pode advir de diferentes processos. O aumento da concentração de PFA diminui a distância entre as espécies e pode provocar a formação de exciplexo Pyr-PFA, provocando a transferência de energia ressonante por Förster (FRET), entre outros processos. Diante do exposto, não foi possível usar essa metodologia para a determinação da CMC do PFA e por isso optou-se pela técnica de tensão superficial (**Figura 24**). O uso da tensão superficial para avaliação da concentração micelar crítica é fundamentado pela baixa solubilidade em água da cadeia hidrofóbica do surfactante, assim, para baixas concentrações de surfactante — na forma monomérica, a porção polar do polímero permanece na interface aquosa enquanto a parte apolar mantém-se na superfície, para minimizar ao máximo o contato com o meio aquoso. A presença destas cadeias na superfície desorganiza as moléculas de água provocando a diminuição da tensão superficial. A CMC do PFA foi de $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 24. Gráfico de tensão superficial (mN/m) versus concentração de PFA para obtenção da CMC.



5.2.3 Caracterização do espectro de absorção na região do UV-Vis do ácido fólico e do PFA em função do pH e avaliação da porcentagem de funcionalização do polímero

Apesar da importância do ácido fólico, inclusive em sistemas de liberação, tem-se uma dificuldade na avaliação dos valores de pKas, devido a baixa solubilidade e fotodegradação. Além disso, os valores de pKas referentes aos equilíbrios dos grupos carboxílicos (**Anexo C**) não podem ser avaliados por UV-Vis. Levando em consideração os equilíbrios mostrados no **Anexo C**, o pK_{a1} é de 3,36 e o pK_{a2} de 4,7 (SZAKÁCS; NOSZÁL, 2006).

Apesar das limitações descritas anteriormente, investigou-se os equilíbrios ácido-base do ácido fólico isolado e ligado ao polímero por UV-Vis, como uma técnica adicional para a caracterização do material funcionalizado. Os espectros de absorção do ácido fólico em função do pH são apresentados na **Figura 25**, com mudanças características nas absorções em 280, 300 e 350 nm. O perfil espectral observado está em concordância com os espectros do ácido fólico em solução tampão (MODUPE; MAURRAS; DIOSADY, 2020). Adicionalmente, registrou-se os espectros de absorção do PFA em diferentes pHs, e nesse caso, verificou-se que os máximos de absorção do PFA ligado ao polímero foram equivalentes ao FA livre, contudo a banda em torno de 280 nm mostrou-se menos definida. Apesar da menor definição da banda em 280 nm para o PFA, tem-se um perfil de variação da intensidade de absorção em função do pH idêntico ao FA livre (**Figura 26**). Esse resultado está em concordância com a funcionalização esperada, evidenciando a presença de FA no polímero, além disso, o carboxilato não tem relação com a parte cromofórica da molécula.

Figura 25. (a) Espectros de absorção UV-Vis do FA ($2,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) e (b) PFA ($6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) em função do pH.

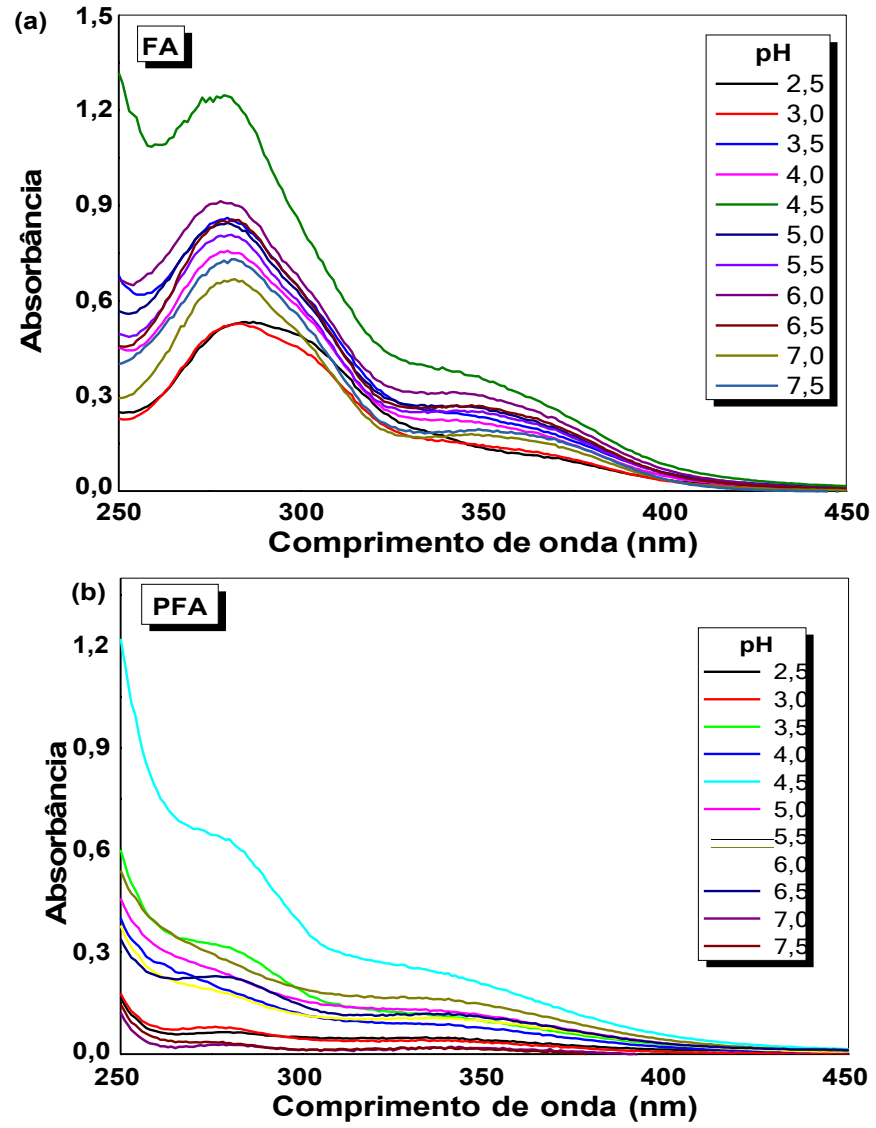
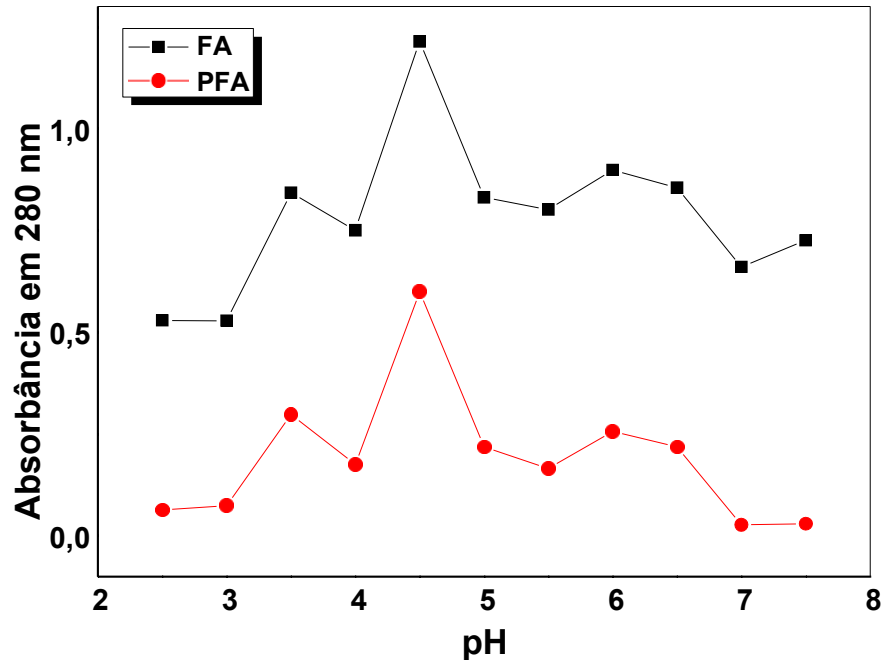


Figura 26. Intensidade de absorção do FA e do PFA em 280 nm em função do pH. Medidas realizadas a 25 °C.



O perfil espectral característico do FA mesmo após a funcionalização em sistemas de liberação possibilita a avaliação da funcionalização desses materiais. Para isso, normalmente avalia-se a banda em torno de 280 nm característica do FA. Neste trabalho, inicialmente realizou-se uma curva de calibração do ácido fólico em DMSO (**Anexo D**), e como foi observado tem-se um perfil linear na faixa de concentração avaliada. O coeficiente de absorvidade molar do ácido fólico em DMSO foi obtido pelo ajuste linear do gráfico de absorção *versus* concentração, e foi de $32,2 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Na sequência registrou-se a absorção de uma solução de PFA (2,7 mg de PFA em 5 mL de DMSO), e a absorbância em 280 nm foi de 0,6. Com isso, calculou-se a razão molar de ácido fólico/polímero de 0,44. A funcionalização está dentro do esperado, tornando o material adequado para avaliação dos sistemas de liberação (LI et al., 2020).

5.2.4 Caracterização dos sistemas de liberação mistos baseados em PFA/DPPC

O PFA foi utilizado para a preparação de sistemas de liberação mistos com o fosfolípido DPPC. A utilização de um sistema de liberação de fármacos depende de diferentes propriedades as quais este sistema deve-se adequar. Neste contexto, foram avaliados os diâmetros hidrodinâmicos (D_h) e potencial zeta (ζ) dos sistemas desenvolvidos, os dados obtidos então descritos na **Tabela 10**. Para devida comparação, foram feitos sistemas com apenas um único componente (1, 2 e 3); sistemas sem FS (4 e 5); sistemas completos — com FS (6, 7, 8 e 9).

Tabela 10. Valores de diâmetro hidrodinâmico (D_h) e potencial zeta (ζ) encontrados para os sistemas desenvolvidos em tampão PBS (pH = 7,4) a 25 °C.

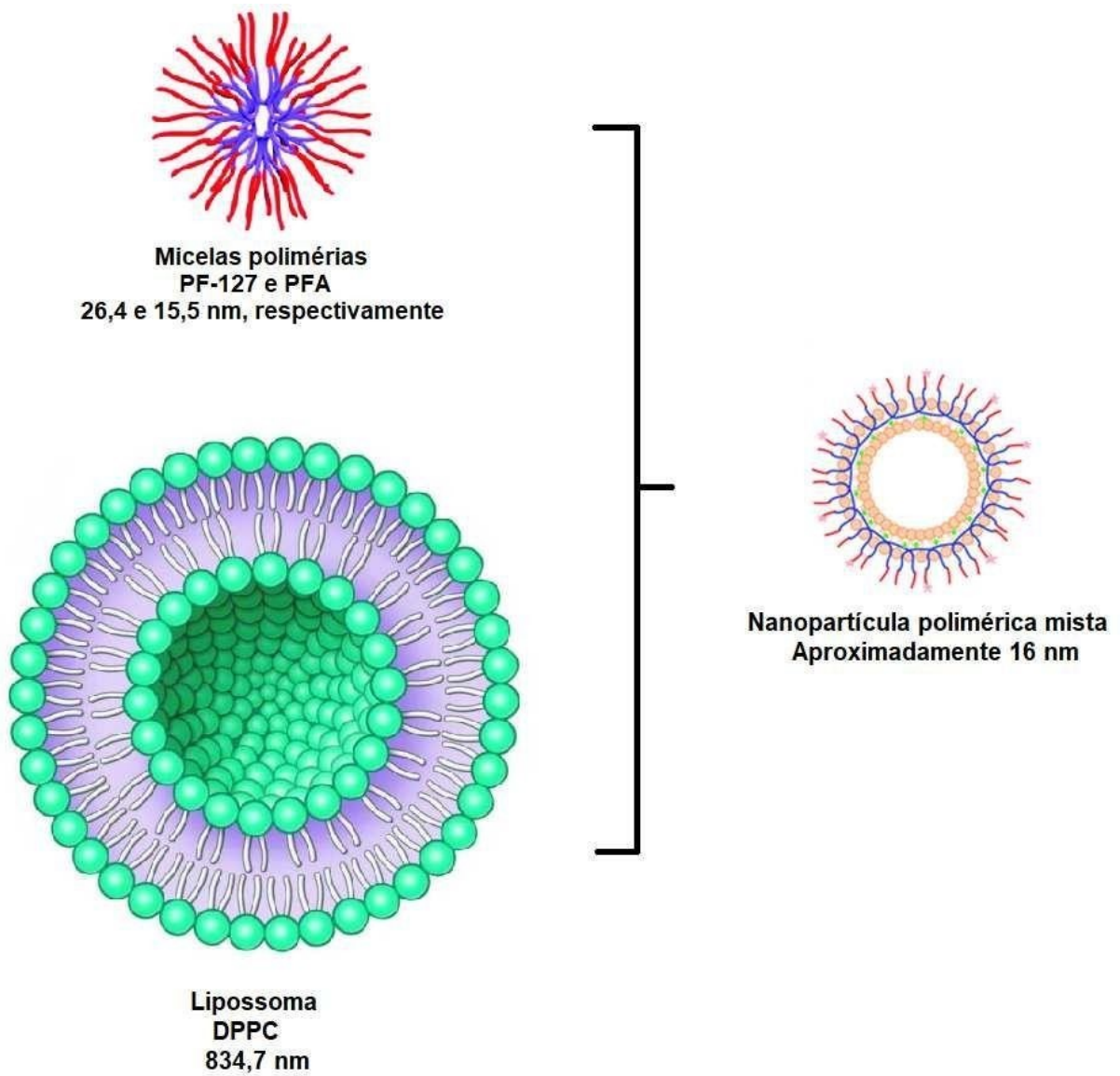
	Formulação	Diâmetro hidrodinâmico (D_h) (nm)	Potencial zeta \pm DP (ζ) (mV)
1	DPPC	834,7	-2,87 \pm 0,57
2	PF-127	26,4	1,74 \pm 1,04
3	PFA	15,5	-1,08 \pm 1,48
4	DPPC/PF-127	16,2	+2,80 \pm 1,60
5	DPPC/PFA	15,5	-2,22 \pm 1,79
6	DPPC/PF-127/Pheid	11,4	+3,37 \pm 1,50
7	DPPC/PF-127/ZnPheid	15,8	+2,25 \pm 0,97
8	DPPC/PFA/Pheid	16,7	-0,84 \pm 1,96
9	DPPC/PFA/Zn-Pheid	17,4	+0,07 \pm 0,52

DP: desvio padrão.

As substâncias descritas acima seguem as concentrações (mol L⁻¹): [PF-127] = 1,59x10⁻³; [PFA] = 1,59x10⁻³; [DPPC] = 5,44x10⁻⁴ e [FS] = 4,00x10⁻⁶.

Analisando inicialmente os diâmetros hidrodinâmicos dos componentes individuais tem-se para o DPPC um tamanho maior de 800 nm, característico de vesículas multilamelares, o que está em concordância com o método de obtenção empregado o qual não utilizou processos de extrusão ou filtração. Para o PF-127 o tamanho foi de 26,4 nm, compatível com tamanhos descritos na literatura para micelas poliméricas (AW; GULATI; LOSIC, 2011). É interessante notar que o tamanho micelar para o PFA foi significativamente menor em relação ao PF-127, o que pode ser associado à diminuição do número de agregação para o polímero funcionalizado. Para os sistemas mistos DPPC/PF-127 e DPPC/PFA o diâmetro da partícula foi 146 nm. A obtenção de vesículas unilamelares de DPPC na presença de PF-127 funcionalizado com biotina foi reportada por de Freitas e colaboradores (2019) com tamanho médio de 100 nm. Em adição, no presente trabalho a presença do FS não afetou significativamente o diâmetro do sistema de liberação. Para melhor visualização destes resultados, a **Figura 27** mostra uma representação esquemática dos sistemas de liberação micelares, lipossomais e nanoparticulados mistos.

Figura 27. Representação esquemática dos sistemas desenvolvidos e de seus tamanhos aproximados.



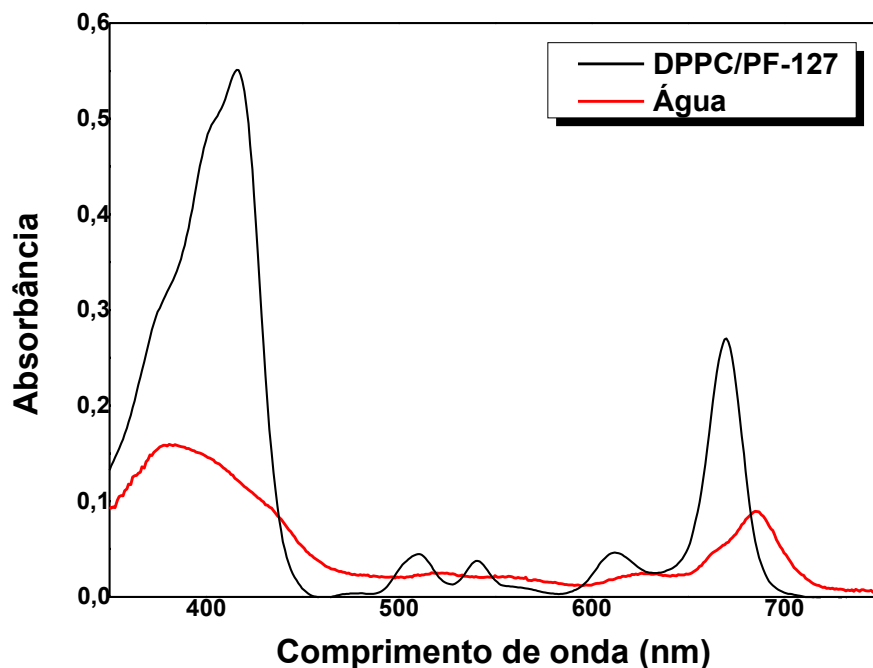
Fonte: adaptado de YANG et al., 2015; Wang et al., 2013; página da web².

² Disponível em <<https://www.essentique.com/liposomes/>>. Acesso em 03 abr 2021.

5.2.5 Caracterização espectroscópica dos fotossensibilizadores nos sistemas de liberação mistos

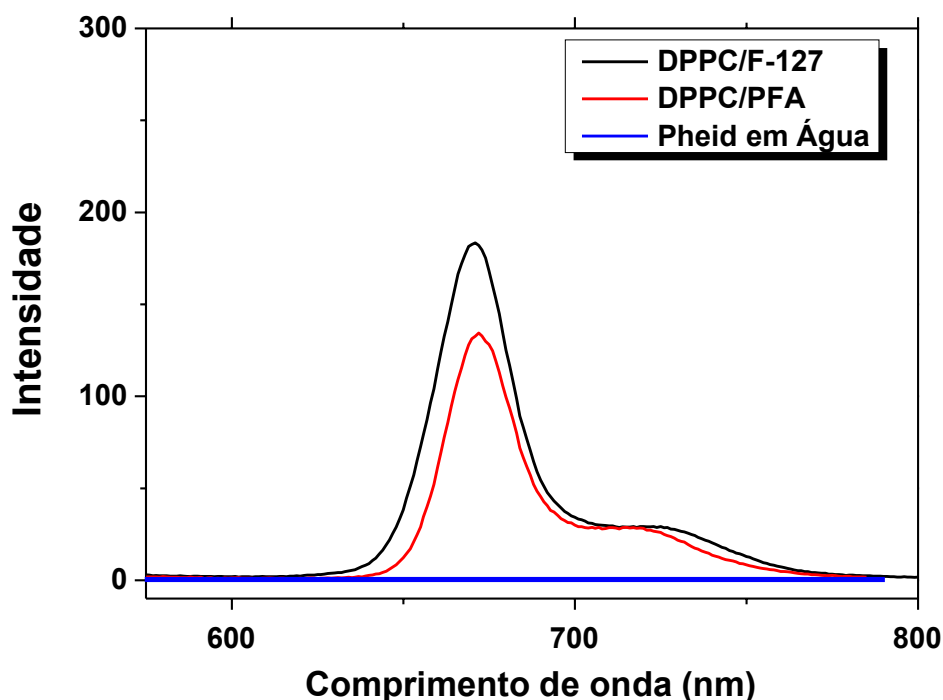
Os sistemas de liberação mistos foram investigados com relação à capacidade de solubilização e manutenção das propriedades fotofísicas dos FS. A formação de microambientes hidrofóbicos possibilita a solubilização do FS de forma a mantê-lo como espécie monomérica em meio aquoso, sendo que tal efeito foi perceptível através dos espectros de absorção, como exemplificado para o Pheid na **Figura 28**, onde foi possível observar que em meio aquoso a presença do sistema de liberação nanoparticulado de DPPC/PF-127 levou ao estreitamento das bandas Soret e Q, e ao aumento do coeficiente de absortividade molar com relação à água. Esses resultados evidenciam a solubilização do FS na forma monomérica.

Figura 28. Espectros de absorção para o Pheid em água ($3,91 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e em DPPC/PF-127 (4×10^{-6} mol L⁻¹).



Ainda, é possível observar um aumento significativo para a emissão de fluorescência (**Figura 29**), de forma a caracterizar a presença do monômero em solução. Para o Pheid, é notável a emissão de fluorescência nos sistemas de liberação em comparação ao meio aquoso, o qual não possui emissão significativa.

Figura 29. Espectros de fluorescência para o Pheid (4×10^{-6} mol L⁻¹) em diferentes meios.



A partir dos espectros de absorção e emissão dos FS nos sistemas de liberação mistos, determinou-se o rendimento quântico de fluorescência, sendo os dados mostrados na **Tabela 11**. Os valores em água foram adicionados para comparação. Adicionalmente, os valores de tempo de vida de fluorescência dos FS em água e nos sistemas de liberação são apresentados na **Tabela 11**. Para o Pheid, o aumento do rendimento quântico de fluorescência nos sistemas de liberação em relação ao meio aquoso é resultado direto da maior solubilização dos FS analisados. Quando se comparam os valores de Φ_F com os solventes estudados previamente, tem-se uma diminuição significativa da capacidade de emissão de fluorescência do Pheid nos sistemas de liberação. Neste caso, a diminuição deve ser consequência do favorecimento de outros processos fotofísicos, como exemplo, os processos de supressão. O tempo de vida do Pheid no sistema misto DPPC/PF-127 foi similar ao registrado em etanol, enquanto uma pequena diminuição foi observada em DPPC/PFA. Para o Zn-Pheid os valores de rendimento quântico de fluorescência e de tempo de vida nos sistemas de liberação mistos seguiram o padrão observado no meio homogêneo. Em relação aos valores de tempo de vida, tanto para o Pheid quanto para o Zn-Pheid houve uma diminuição no sistema misto DPPC/PFA, do polímero funcionalizado.

Tabela 11. Valores de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e tempo de vida de fluorescência (τ).

Solvente	Φ_F	τ (ns)	R^2
<i>Pheid</i>			
Água	-	-	-
DPPC/PF-127	0,077	7,74	0,99
DPPC-PFA	0,055	5,96	0,99
<i>Zn-Pheid</i>			
Água	0,10	4,72	0,97
DPPC/PF-127	0,20	4,59	0,99
DPPC/PFA	0,11	3,85	0,99

Em adição, determinaram-se os valores de deslocamento de Stokes dos FS nos sistemas de liberação (**Tabela 12**). A alteração de meio onde o FS encontra-se afeta diretamente suas propriedades fotofísicas de forma que parâmetros como deslocamento de Stokes podem ser alterados pela solubilização dos compostos nos sistemas de liberação. Como pode ser observado, os valores de $\Delta\nu$ foram maiores na presença do PFA e mais significativos para o Zn-Pheid, o que pode ser resultado das mudanças de micropolaridade local e ainda do efeito de interações específicas do ácido fólico com o FS (transferência de carga, interações ácido-base, etc) de forma a justificar as diferenças significativas observadas.

Tabela 12. Valores de deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) para os FS em meio heterogêneo.

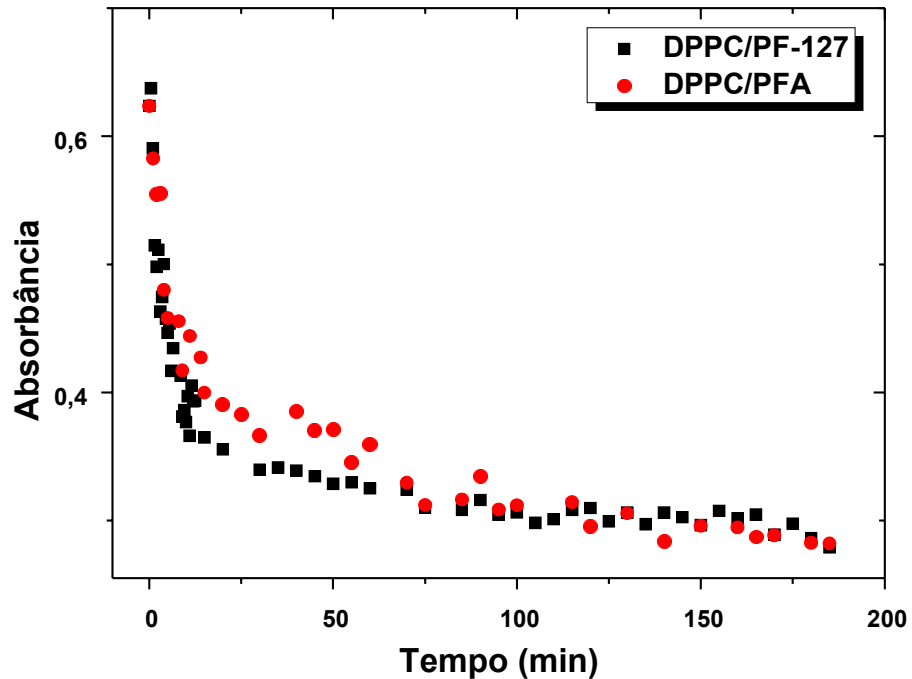
Solvente	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})
<i>Pheid</i>			
Água	685	-	-
DPPC/PF-127	665	670	112
DPPC/PFA	670	678	176
<i>Zn-Pheid</i>			
Água	662	668	155
DPPC/PF-127	663	670	158
DPPC/PFA	668	677	199

5.2.6 Efeito dos sistemas de liberação mistos na fotoestabilidade dos fotossensibilizadores

O uso de sistemas coloidais como plataformas de *drug delivery* é bem explorado na literatura, a incluir especificamente para utilização na terapia fotodinâmica (CALIXTO et al., 2016; CHATTERJEE; FONG; ZHANG, 2008). O encapsulamento de FS em micelas poliméricas, por exemplo, pode aumentar a proporção monomérica em decorrência da maior solubilidade do composto no meio heterogêneo. A forma monomérica é sabidamente mais eficiente na produção de espécies reativas de oxigênio, essenciais para eficiência da terapia. Entretanto, a forma monomérica também é mais suscetível à fotodegradação em comparação a espécies agregadas, de forma que o fotobranqueamento dos FS pode aumentar a depender do grau de solubilização no meio heterogêneo. Assim, avaliaram-se os

processos de fotodegradação dos FS nos sistemas de liberação. A **Figura 30** mostra as cinéticas de fotodegradação do Zn-Pheid em DPPC/PF-127 e DPPC/PFA.

Figura 30. Cinéticas de fotodegradação para o Zn-Pheid (4×10^{-6} mol L⁻¹) nos sistemas de liberação mistos.



A considerar os resultados encontrados pelos ajustes cinéticos de primeira ordem, obtiveram-se as constantes de velocidade de fotobranqueamento (**Tabela 13**), a partir das quais se calcularam os rendimentos quânticos de fotobranqueamento. É possível observar um favorecimento dos processos de fotodegradação do Pheid no sistema misto DPPC/PF-127 em relação à água. Esse resultado pode ser explicado pela solubilização e monomerização do FS neste meio favorecendo os processos fotoquímicos, dentre eles a fotodegradação. Adicionalmente, espera-se para o Pheid uma localização externa no sistema de liberação em um microambiente mais polar, o que favorece a estabilização de intermediários dos processos de fotobranqueamento. Por outro lado, o rendimento quântico de fotobranqueamento do Pheid no sistema DPPC/PFA foi similar ao meio aquoso, mesmo com a monomerização do FS. Para este sistema de liberação, verificaram-se alterações em

outros processos como menores tempo de vida e emissão de fluorescência, além de um maior deslocamento de Stokes.

Tabela 13. Descrição dos parâmetros de fotobranqueamento encontrados para Pheid e Zn-Pheid (4×10^{-6} mol L⁻¹) em sistemas heterogêneos.

Solvente	k_{FB} (10^{-3} s^{-1})	Φ_{FB}
<i>Pheid</i>		
Água	0,10	0,010
DPPC/PF-127	0,28	0,087
DPPC/PFA	0,09	0,013
<i>Zn-Pheid</i>		
Água	$k_1 = 18$ $k_2 = 0,25$	0,65
DPPC/PF-127	2,44	0,095
DPPC/PFA	0,54	0,0011

Em relação ao fotobranqueamento do Zn-Pheid nos sistemas de liberação, as cinéticas ajustaram-se a um modelo de primeira ordem, diferente do que acontece em água apenas. Isso se deve ao fato de que nos sistemas de liberação tem-se a monomerização do FS e ausência dos complexos intermoleculares entre o carboxilato de uma molécula e o metal da outra. As constantes de velocidade e os valores de Φ_{FB} são mostrados na **Tabela 13**. Assim, ambos os sistemas de liberação investigados possibilitaram a fotoproteção do Zn-Pheid em meio aquoso. Comparativamente o sistema DPPC/PF-127 mostrou maiores valores de Φ_{FB} , bem como maiores Φ_F , tempo de vida de fluorescência, além de um menor deslocamento de Stokes.

Em resumo, os sistemas de liberação mistos baseados em DPPC/P-127 e DPPC/PFA foram eficientes na monomerização dos FS, influenciando diretamente suas propriedades fotofísicas. Para o Pheid, a monomerização em meio aquoso possibilitou a eficiência de processos fotofísicos, contudo favoreceu o processo de fotodegradação. Este resultado é esperado em ambientes mais polares do que nos solventes previamente estudados. Ainda assim, a fotodegradação é relativamente baixa e não compromete aplicações fotodinâmicas futuras. Por outro lado, para o Zn-Pheid a monomerização em meio aquoso na presença dos sistemas de liberação mistos diminuiu drasticamente a fotodegradação do FS. Essa fotoproteção do sistema de liberação, relacionada à monomerização do FS possibilitará a aplicação deste FS em estudos para aplicação do mesmo no tratamento de diferentes patologias no futuro.

6 CONCLUSÃO

A avaliação das propriedades fotofísicas e fotoquímicas do Pheid e do Zn-Pheid em meio homogêneo mostrou a influência de interações específicas e não específicas entre o FS e o meio. Para o Pheid verificou-se a formação de autoagregados em meio aquoso, sendo estes incapazes de emitirem fluorescência, devido ao efeito de autossupressão de energia do estado excitado, enquanto em solventes orgânicos tem-se a solubilização e monomerização do FS com alta intensidade de emissão de fluorescência. Apesar do Pheid ser uma molécula consideravelmente fotoestável, essa fotoestabilidade foi dependente do meio: etanol > clorofórmio > água. Nesse caso, essa tendência não pode ser explicada pela formação de espécies reativas de oxigênio, e deve ser associada com a clivagem direta do FS com a irradiação. Comportamento distinto foi observado para o Zn-Pheid em meio homogêneo, tanto com relação à auto-organização do FS como nas suas propriedades. Em etanol o Zn-Pheid mostrou-se monomerizado, enquanto em água e clorofórmio tem-se o FS auto-organizado, sendo que em clorofórmio tem-se a complexação intramolecular do carboxilato com o metal central, enquanto em água propõe-se uma complexação intermolecular entre o carboxilato de uma molécula e o centro metálico de outra molécula. Por um lado, o Zn-Pheid monomerizado mostrou o maior rendimento quântico de fluorescência, enquanto a auto-organização em água e clorofórmio favoreceu os processos de fotobranqueamento, observando-se altos rendimentos quânticos de fotobranqueamento. A fotodegradação foi mais intensa em água, meio que estabiliza possíveis intermediários íon-radicais formados durante a fotodecomposição.

A incorporação dos fotossensibilizadores em sistemas de liberação nanoestruturados baseados em DPPC, F-127 e PFA, previamente sintetizado e caracterizado, possibilitou a solubilização e monomerização de ambos os FS em meio aquoso, influenciando diretamente suas propriedades fotofísicas. Com a monomerização do Pheid em sistemas nanoparticulados observou-se o favorecimento de processos fotofísicos e fotoquímicos, neste caso houve um aumento do rendimento quântico de emissão de fluorescência, e também das reações de fotodegradação. Por outro lado, com a monomerização do Zn-Pheid nos sistemas de liberação verificou-se uma grande fotoproteção do FS, principalmente para os sistemas mistos contendo o polímero funcionalizado com ácido fólico. Essa

fotoproteção resultante da incorporação do FS no sistema de liberação, possibilitará a aplicação deste FS em estudos para aplicação do mesmo no tratamento de diferentes patologias no futuro. Em adição, a incorporação dos FS no sistema de liberação não alterou de forma significativa o tamanho dos sistemas, mantendo-os na faixa de 10 a 20 nm – adequados quando se considera o efeito *EPR*.

Em resumo, os sistemas fotossensibilizadores desenvolvidos possuem características promissoras para futuras aplicações como ativos na TFD. O FS Zn-Pheid, quando encapsulado em sistema DPPC/PFA, demonstra fotoestabilidade e propriedades fotofísicas promissoras para estudos futuros. É interessante notar como a compreensão do estado de organização e monomerização do FS pode ajudar a compreender a fotoproteção do FS. Ainda, a avaliação destes FS em diferentes condições pode auxiliar na interpretação dos efeitos que podem influenciar nos processos fotofísicos e químicos relacionados à TFD e em outros processos fotossintéticos em geral, como interações gerais e específicas do solvente, formação de agregados inter ou intramoleculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 15 fev. 2016.

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 102, dez. 2013.

AW, M. S.; GULATI, K.; LOSIC, D. Controlling Drug Release from Titania Nanotube Arrays Using Polymer Nanocarriers and Biopolymer Coating. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 02, n. 05, p. 477–484, 2011.

BULBAKE, U. et al. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 12, 27 mar. 2017.

CALIXTO, G. et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 11 mar. 2016.

CHAKRABORTY, T.; CHAKRABORTY, I.; GHOSH, S. The methods of determination of critical micellar concentrations of the amphiphilic systems in aqueous medium. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 265–270, 1 jul. 2011.

CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2008 Editors' Collection. v. 60, n. 15, p. 1627–1637, 14 dez. 2008.

CONNOLLY, J. S.; SAMUEL, E. B.; JANZEN, A. F. EFFECTS OF SOLVENT ON THE FLUORESCENCE PROPERTIES OF BACTERIOCHLOROPHYLL a. **Photochemistry and Photobiology**, v. 36, n. 5, p. 565–574, nov. 1982.

DAI, T. et al. Topical Antimicrobials for Burn Wound Infections. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 5, n. 2, p. 124–151, 1 jun. 2010.

DAN, N. Effect of liposome charge and PEG polymer layer thickness on cell–liposome electrostatic interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1564, n. 2, p. 343–348, 31 ago. 2002.

DER, B. R. et al. Photophysical properties of pheophorbide a in solution and in model membrane systems. **J. Porphyrins Phthalocyanines**, p. 8, 2000.

DESBOROUGH, M. J. R.; KEELING, D. M. The aspirin story – from willow to wonder drug. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 5, p. 674–683, 2017.

E. XODO, L. et al. The Chlorophyll Catabolite Pheophorbide a as a Photosensitizer for the Photodynamic Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 799–807, 1 fev. 2012.

EICHWURZEL, I.; STIEL, H.; RÖDER, B. Photophysical studies of the pheophorbide a dimer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 54, n. 2–3, p. 194–200, fev. 2000.

FAN, W.; HUANG, P.; CHEN, X. Overcoming the Achilles' heel of photodynamic therapy. **Chemical Society reviews**, v. 45, 26 set. 2016.

FIEDOR, L. et al. Phytol as one of the determinants of chlorophyll interactions in solution. p. 11, [s.d.].

GEROLA, A. P. et al. Effects of Metal and the Phytyl Chain on Chlorophyll Derivatives: Physicochemical Evaluation for Photodynamic Inactivation of Microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, n. 4, p. 884–894, 2011.

GRIMM, B. (ED.). **Chlorophylls and bacteriochlorophylls: biochemistry, biophysics, functions and applications**. Dordrecht: Springer, 2006.

HARTWICH, G. et al. Metal-Substituted Bacteriochlorophylls. 1. Preparation and Influence of Metal and Coordination on Spectra. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 15, p. 3675–3683, abr. 1998.

ISELE, U. et al. Large-Scale Production of Liposomes Containing Monomeric Zinc Phthalocyanine by Controlled Dilution of Organic Solvents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 11, p. 1608–1616, 1 nov. 1994.

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 1, p. 1–3, 1 maio 2008.

KATZ, J. J. et al. Chlorophyll-chlorophyll interactions. Ring V keto carbonyl donor properties from carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, n. 8, p. 2883–2885, abr. 1972.

KHARKWAL, G. B. et al. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications: PHOTODYNAMIC THERAPY FOR INFECTIONS. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 755–767, set. 2011.

KRAMER, M. et al. Liposomal Benzoporphyrin Derivative Verteporfin Photodynamic Therapy: Selective Treatment of Choroidal Neovascularization in Monkeys. **Ophthalmology**, v. 103, n. 3, p. 427–438, 1 mar. 1996.

LEE, E. J. et al. Enhanced *in vitro* photocytotoxicity of water-soluble dendritic pheophorbide-a. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 19, n. 07, p. 830–837, jul. 2015.

LEMBO, D.; CAVALLI, R. Nanoparticulate Delivery Systems for Antiviral Drugs. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 21, n. 2, p. 53–70, dez. 2010.

LI, Z. et al. Novel folated pluronic F127 modified liposomes for delivery of curcumin: preparation, release, and cytotoxicity. **Journal of Microencapsulation**, v. 37, n. 3, p. 220–229, 2 abr. 2020.

MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 11, p. 592–599, nov. 2009.

MANASPON, C.; VIRAVAIIDYA-PASUWAT, K.; PIMPHA, N. Preparation of Folate-Conjugated Pluronic F127/Chitosan Core-Shell Nanoparticles Encapsulating Doxorubicin for Breast Cancer Treatment. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

MARUYAMA, K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 161–169, mar. 2011.

MASTROTTO, F. et al. In Vitro and in Vivo Behavior of Liposomes Decorated with PEGs with Different Chemical Features. **Molecular Pharmaceutics**, v. 17, n. 2, p. 472–487, 3 fev. 2020.

MAYET, N. et al. A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2211–2230, 1 ago. 2014.

MERCHAT, M. et al. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 3, p. 153–157, fev. 1996.

MINNOCK, A. et al. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 3, p. 159–164, 1 fev. 1996.

MODUPE, O.; MAURRAS, J. B.; DIOSADY, L. L. A spectrophotometric method for determining the amount of folic acid in fortified salt. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, p. 100060, 1 dez. 2020.

PASTAR, I. et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 445–464, 17 mar. 2014.

PELLOSI, D. S. et al. Pluronic® mixed micelles as efficient nanocarriers for benzoporphyrin derivatives applied to photodynamic therapy in cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 314, p. 143–154, jan. 2016.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1–5, 2012.

PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259–268, 1 mar. 2009.

RADESTOCK, A. et al. Induction of Apoptosis in HaCaT Cells by Photodynamic Therapy with Chlorin e6 or Pheophorbide a. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 20, n. 1, p. 3–9, 2007.

REDMOND, R. W.; KOCHEVAR, I. E. Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 5, p. 1178–1186, set. 2006.

RUIZ-GONZÁLEZ, R. et al. Photodynamic Synergistic Effect of Pheophorbide a and Doxorubicin in Combined Treatment against Tumoral Cells. **Cancers**, v. 9, n. 2, 17 fev. 2017.

SONG, X. et al. Liposomes co-loaded with metformin and chlorin e6 modulate tumor hypoxia during enhanced photodynamic therapy. **Nano Research**, v. 10, n. 4, p. 1200–1212, abr. 2017.

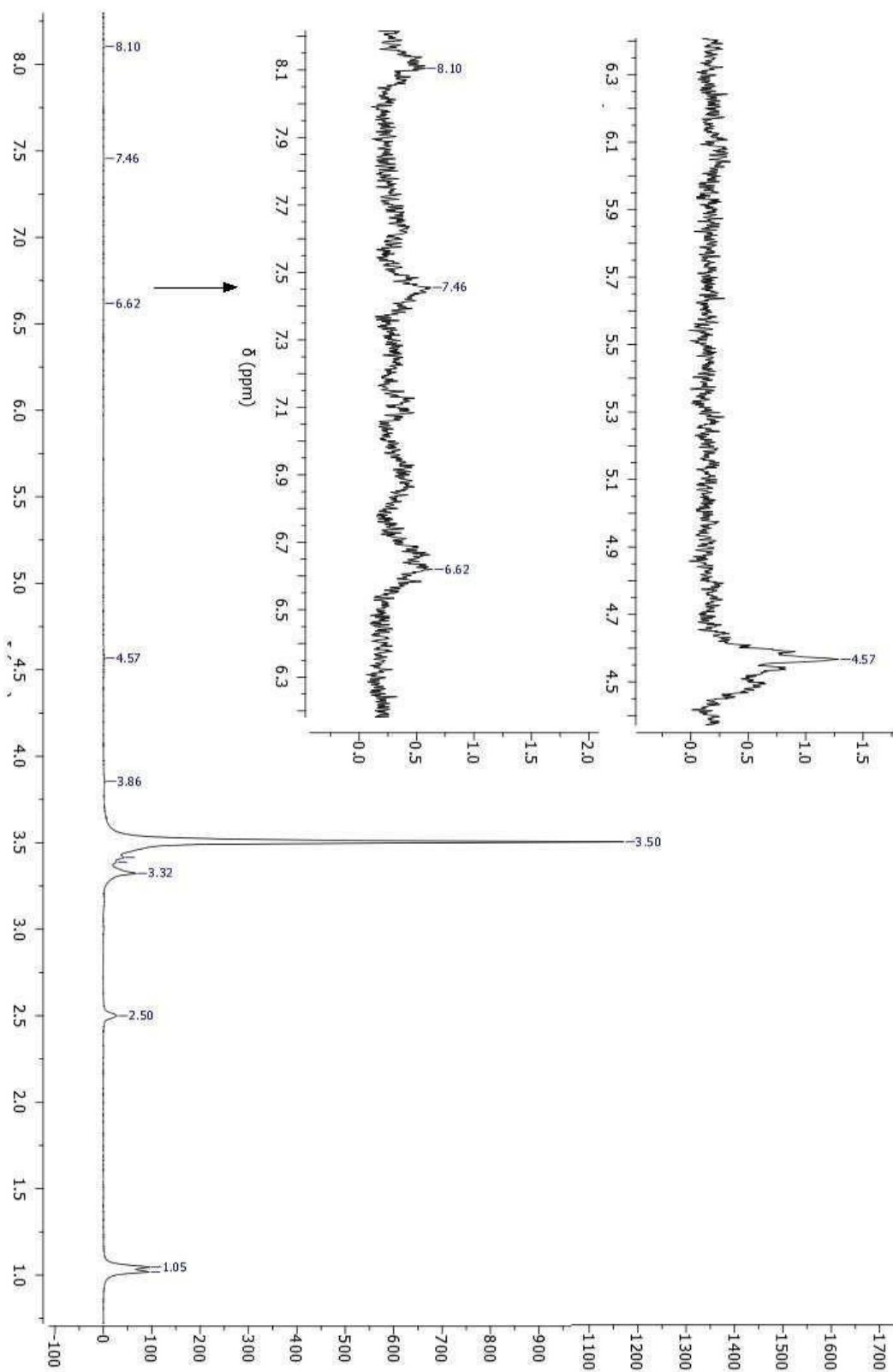
SZAKÁCS, Z.; NOSZÁL, B. Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, v. 27, n. 17, p. 3399–3409, 2006.

TANG, P. M.-K. et al. Pheophorbide a based photodynamic therapy induces apoptosis via mitochondrial-mediated pathway in human uterine carcinosarcoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 8, n. 6, p. 533–539, 15 mar. 2009.

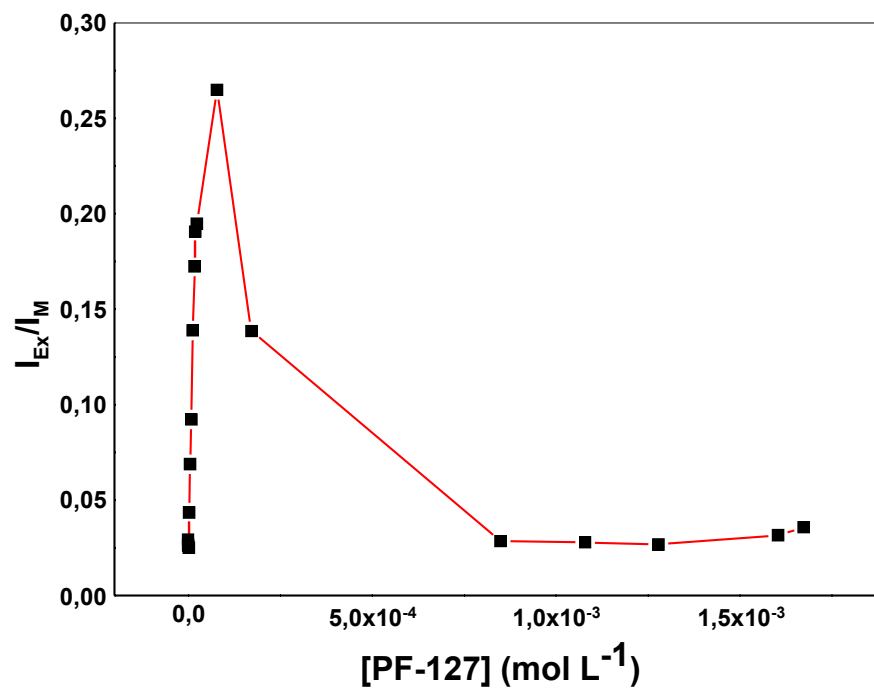
TIE, Y. et al. Targeting folate receptor β positive tumor-associated macrophages in lung cancer with a folate-modified liposomal complex. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 22 jan. 2020.

VALEUR, B. Molecular Fluorescence Principles and Applications. **Molecular Fluorescence**, p. 399, 2001.

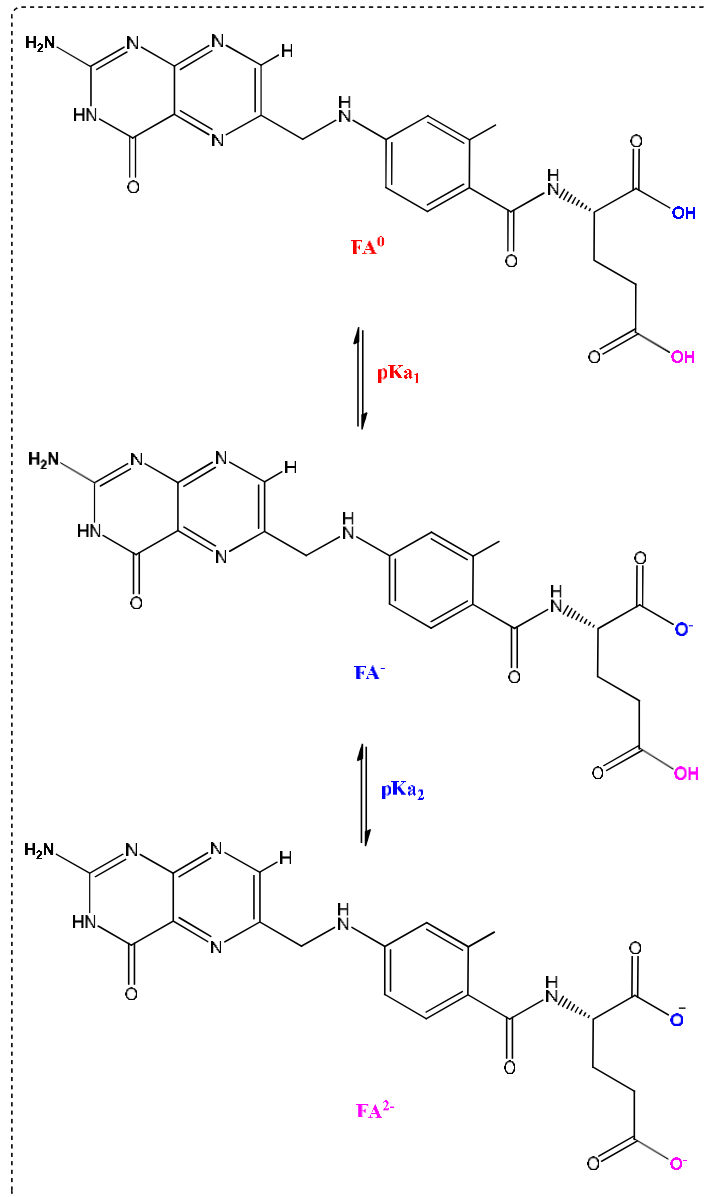
- WACHTER, E. et al. Light-activated ruthenium complexes photobind DNA and are cytotoxic in the photodynamic therapy window. **Chemical Communications**, v. 48, n. 77, p. 9649, 2012.
- WAN, M. T.; LIN, J. Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 145–163, 21 maio 2014.
- WANG, Y. et al. Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: Synergistic effect of folate-mediated targeting and Pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1, p. 63–73, 7 jun. 2007.
- WANG, Y. et al. Pluronic L61 as a long-circulating modifier for enhanced liposomal delivery of cancer drugs. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 10, p. 2958, 2013.
- WEIJER, R. et al. Enhancing photodynamic therapy of refractory solid cancers: Combining second-generation photosensitizers with multi-targeted liposomal delivery. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 23, p. 103–131, 1 jun. 2015.
- WONGSINKONGMAN, P. et al. Antitumor agents. Part 209: Pheophorbide-a derivatives as photo-Independent cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 583–591, 1 mar. 2002.
- YE, P. et al. Folate receptor-targeted liposomes enhanced the antitumor potency of imatinib through the combination of active targeting and molecular targeting. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2167–2178, 7 maio 2014.
- YOON, IL et al. Photodynamic and Antioxidant Activities of Divalent Transition Metal Complexes of Methyl Pheophorbide-a. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. spc8, p. 2981–2987, 20 ago. 2011.
- YOU, H. et al. Synthesis of pheophorbide-a conjugates with anticancer drugs as potential cancer diagnostic and therapeutic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5383–5391, set. 2011.
- ZHANG, C. et al. Co-delivery of doxorubicin and pheophorbide A by pluronic F127 micelles for chemo-photodynamic combination therapy of melanoma. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 20, p. 3305–3314, 2018.
- ZWICKE, G. L.; MANSOORI, G. A.; JEFFERY, C. J. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. **Nano Reviews**, v. 3, n. 1, p. 18496, 1 jan. 2012.

ANEXOS**ANEXO A** - Espectro de RMN¹H (200 MHz) PFA obtido em solução de DMSO-d⁶.

ANEXO B - Razão da intensidade das bandas de excímero e monômero de pireno (I_{Ex}/I_M) em função da concentração de polímero. [Pireno] = 5×10^{-7} mol L⁻¹, λ_{exc} = 340 nm.



ANEXO C - Representação esquemática das diferentes espécies de FA de acordo com o grau de desprotonação.



ANEXO D — Curva de calibração obtida por UV-Vis para o ácido fólico em DMSO.

