



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ADRIANA PASSARELLA GEROLA

**“Estudos Fotofísicos e Fotodinâmicos da clorofila *a* e derivados
formulados em micelas poliméricas e lipossomos”**



MARINGÁ, DEZEMBRO/2013

ADRIANA PASSARELLA GEROLA

**“Estudos Fotofísicos e Fotodinâmicos da clorofila *a* e derivados
formulados em micelas poliméricas e lipossomos”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Noboru Hioka



MARINGÁ, DEZEMBRO/2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

G377e Gerola, Adriana Passarella
Estudos fotofísicos e fotodinâmicos da clorofila a e derivados formulados em micelas poliméricas e lipossomos / Adriana Passarella Gerola. -- Maringá, 2013.
xiv, vi, 144 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Noboru Hioka.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

1. Derivados de clorofila - Terapia fotodinâmica. 2. Derivados de clorofila - Surfactantes poliméricos. 3. Surfactantes poliméricos - Formulação. 4. Derivados de clorofila - Lipossomos. 5. Lipossomos - Formulação. 6. Derivados de clorofila - Propriedades fotofísicas. 7. Propriedades fotofísicas - Oxigênio singlete. 8. Propriedades fotofísicas - Fotobranqueamento. 9. Derivados de clorofila - Inativação fotodinâmica. 10. Inativação fotodinâmica - *Staphylococcus aureus*. I. Hioka, Noboru, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 541.3

AMMA-001248

O Vendedor de Sonhos

Sou apenas um caminhante

Que perdeu o medo de se perder

Estou seguro que sou imperfeito

Podem me chamar de louco

Podem zombar das minhas ideias

Não importa!

O que importa é que sou um caminhante

Que vende sonhos para os passantes

Não tenho bússola nem agenda

Não tenho nada, mas tenho tudo

Sou apenas um caminhante

À procura de mim mesmo.

Augusto Cury

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Fundamentação Teórica.....	4
2.1. Processos Fotofísicos e fotoquímicos.....	4
2.1.1. Processos Fotofísicos.....	4
2.1.2. Processos Fotoquímicos.....	7
2.1.3. Rendimentos quânticos de processos fotofísicos e fotoquímicos.....	7
2.2. Terapia Fotodinâmica.....	8
2.3. Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos (PDI).....	10
2.4. Fotossensibilizadores em processos fotodinâmicos.....	15
2.4.1. Derivados de Clorofila como Fotossensibilizadores.....	18
2.4.1.1. O Espectro Eletrônico de Absorção de Porphirinas e Clorinas (Clorofilas).....	22
2.5. Luz em TFD.....	27
2.6. Oxigênio Singlete.....	29
2.7. Micelas e lipossomos na Formulação de Fármacos.....	31
2.7.1. Micelas Poliméricas.....	32
2.7.2. Lipossomos.....	41
2.8. Utilização de Sistemas Modelo na Mimetização de Membranas Biológicas.....	46
3. Objetivos.....	49
4. Materiais e Métodos.....	50
4.1. Materiais.....	50
4.1.1. Sistema de iluminação.....	50
4.2. Obtenção e caracterização de formulados de Chls em micelas poliméricas e DPPC.....	51
4.2.1. Incorporação e monomerização dos derivados de clorofila em sistemas microheterogêneos constituídos de micelas poliméricas e DPPC.....	51
4.2.2. Formulação dos derivados de clorofila em micelas poliméricas.....	51

4.2.2.1. Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) em sistemas micelares.....	52
4.2.2.2. Estabilidade dos formulados de clorofilas em surfactantes poliméricos.....	53
4.2.3. Formulação dos derivados de clorofila em lipossomos de DPPC.....	53
4.2.3.1. Estudos de supressão de fluorescência em micelas poliméricas e lipossomo	54
4.3. Determinação do potencial zeta (ζ) dos formulados micelares e lipossomais.	54
4.4. Investigação de propriedades fotofísicas e fotodinâmicas das Chls formuladas em micelas poliméricas e lipossomo	55
4.4.1. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)	55
4.4.2. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ})	56
4.4.3. Processos de fotobranqueamento.....	57
4.4.4. Ensaio sobre micro-organismos	58
4.4.4.1. Ensaio de adsorção de FS pelas células bacterianas	59
4.4.4.2. Microscopia de fluorescência e Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC).....	60
4.4.4.3. Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM).....	60
5. Resultados e discussão	62
5.1. Caracterização espectroscópica de derivados de clorofilas	62
5.2. Formulação das clorofilas em micelas poliméricas de P-123 e F-127	64
5.2.1. Estabilidade dos formulados de Chls em surfactantes poliméricos.....	71
5.2.2. Estabilidade térmica dos formulados de Chls em surfactantes poliméricos.....	74
5.2.3. Estudos de supressão de fluorescência em sistemas micelares	90
5.3. Formulação das clorofilas em sistemas lipossomais de DPPC.....	92
5.3.1. Estudos de supressão de fluorescência em formulados lipossomais	93
5.4. Determinação do potencial zeta.....	95
5.5. Propriedades fotofísicas e fotodinâmicas das clorofilas formuladas em micelas poliméricas e lipossomo	98
5.5.1. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).....	98

5.5.2.	Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}).....	99
5.5.3.	Processos de fotobranqueamento das clorofilas.....	100
5.5.4.	Inativação Fotodinâmica	105
5.5.4.1.	Sistema de iluminação.....	105
5.5.4.2.	Ensaio fotodinâmico sobre <i>S. aureus</i> em sistema micelar e lipossomal 107	
5.5.4.2.1.	Efeitos de PDI na ultraestrutura bacteriana por microscopia de transmissão eletrônica (TEM)	116
5.5.4.2.2.	Adsorção das clorofilas pelas células bacterianas	119
5.5.4.2.3.	Determinação do valor D	120
6.	Conclusões.....	123
7.	Referências	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular de: (A) clorofila <i>a</i> e seus derivados; (B) surfactantes poliméricos; e (C) fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).....	2
Figura 2. Digrama de Jablonski, representação esquemática do processo de absorção e caminhos para desativação do estado excitado e dos tempos característicos dos processos envolvidos.	6
Figura 3. Representação esquemática de bactéria Gram-positiva (+) e Gram-negativa (-). (B) Representação esquemática da parede celular de bactéria Gram-positiva e Gram-negativa.....	13
Figura 4. Aspecto geral do espectro de absorção de uma porfirina base livre em etanol.	23
Figura 5. Diagrama dos níveis energéticos das moléculas de porfirina.	25
Figura 6. Representação esquemática de uma micela esférica de copolímeros em bloco (Pluronic [®]).....	33
Figura 7. Mudança estrutural de unímero para micela esférica para o copolímero F-127	35
Figura 8. Esquematisação dos diferentes tipos de lipossomos. Vesículas unilamelares pequenas (SUVs), Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs), e Vesículas Multilamelares (MLV).....	42
Figura 9. Esquema dos mecanismos de interação propostos de lipossomos com células: (a) adsorção, (b) endocitose, (c) troca de lipídeo, e (d) fusão	46
Figura 10. Vista em corte de duas estruturas formadas por fosfolipídios autoassociados (lipossomos e bicamadas lipídicas). Representação esquemática de uma micela formada por anfifílicos da classe dos Pluronic [®] . Representação esquemática de uma secção da membrana biológica com seus principais constituintes.....	48

- Figura 11.** Espectros eletrônicos da clorofila e seus derivados em acetona, a 30,0 °C. 63
- Figura 12.** (A) Espectros de absorção eletrônica da Pheo 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ adicionada diretamente às soluções de P-123 e F-127 2% (m/v) e em etanol, a 30,0 °C. (B) Variação da absorbância ($\lambda = 668 \text{ nm}$) em função da concentração de Pheo em P-123, F-127 e etanol..... 64
- Figura 13.** Espectros de absorção eletrônica das clorofilas em P-123 e F-127 (2%, m/v), água e etanol a 30,0 °C. [FS]= 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. Os formulados foram obtidos pelo método da dispersão sólida. .. 66
- Figura 14.** Espectros de emissão de Chls em água, etanol e sistemas micelares de P-123 e F-127 (2%, m/v), a 30,0 °C. Os formulados micelares foram obtidos pelo método da dispersão sólida. 69
- Figura 15.** Sobreposição espectral das clorofilas formuladas em F-127 2% (m/v) durante 15 dias, a temperatura ambiente. 72
- Figura 16.** Sobreposição espectral das clorofilas formuladas em P-123 2% (m/v) durante 15 dias, a temperatura ambiente. 73
- Figura 17.** Cinéticas de estabilidade das clorofilas formuladas em P-123 e F-127 (2%, m/v), a temperatura ambiente. 74
- Figura 18.** Espalhamento de luz ressonante (RLS) em diferentes temperaturas para (A) F-127 2% (m/v) e (C) P-123 2% (m/v). Intensidade do sinal de RLS em função da temperatura para (B) F-127 2% (m/v) e (D) P-123 2% (m/v). 75
- Figura 19.** Espectros de absorção eletrônica dos FS (4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em F-127 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de absorção da banda Soret dos FS em F-127 em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial. 77

- Figura 20.** Espectros de emissão dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em F-127 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de emissão normalizada dos FS em F-127 em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial. 78
- Figura 21.** Deslocamento de Stokes para as clorofilas formuladas em F-127 com a diminuição da temperatura. 80
- Figura 22.** Espectros de RLS dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em F-127 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de RLS em 310 nm normalizada em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial. 82
- Figura 23.** Espectros de absorção eletrônica dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em P-123 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de absorção da banda Soret dos FS em P-123 em função da temperatura. 85
- Figura 24.** Espectros de emissão dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em P-123 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de emissão normalizada dos FS em P-123 em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial. 86
- Figura 25.** Espectros de RLS dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em P-123 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de RLS em 374 nm normalizada em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial 87
- Figura 26.** Deslocamento de Stokes para as clorofilas formuladas em P-123 com a diminuição da temperatura. 88

- Figura 27.** (A) Espectros de emissão de fluorescência do Pheid em F-127 (2%, m/v) com a adição de I. (B) Plot de Stern-Volmer do Pheid em F-127 (2%, m/v). Experimentos realizados a 30,0 °C, $\lambda_{exc}= 411$ nm e $\lambda_{emi}= 675$ nm. 90
- Figura 28.** Espectros das clorofilas 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ formuladas em DPPC (2mg mL⁻¹) pelo método do filme fino: (A) Espectros de absorção eletrônica e (B) Espectros de emissão de fluorescência, a 30,0 °C. 93
- Figura 29.** Sobreposição espectral da Zn-Chl (4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em F-127 (2%, m/v) com iluminação contínua, a temperatura ambiente. As setas indicam a diminuição das bandas com a exposição à luz. O inserte apresenta a cinética de fotobranqueamento da Zn-Chl em F-127..... 101
- Figura 30.** Espectros de absorção dos derivados de clorofila em F-127 e espectro de emissão do LASER utilizado nos ensaios fotodinâmicos. 105
- Figura 31.** Espectros de absorção dos derivados de clorofila em F-127 e espectro de emissão do LED utilizado nos experimentos de fotobranqueamento..... 106
- Figura 32.** Taxa de mortalidade para diferentes Chls iluminadas com LASER sobre *S. aureus*. Amostras tratadas com FS 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em F-127 2 % (m/v) mantidas no escuro ou com iluminação de 10 min. C+ é o controle na ausência de FS. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão das medidas em triplicata. 108
- Figura 33.** Imagens DIC (à esquerda) e suas correspondentes imagens de microscopias de fluorescência (à direita) de células de *S. aureus* com PI (vermelho). (A) e (B) Pheo em F-127 no escuro; (C) e (D) Pheo em F-127 após iluminação de 20 min (612 J cm⁻²). 110
- Figura 34.** Imagens DIC (à esquerda) e suas correspondentes imagens de microscopias de fluorescência (à direita) de células de *S. aureus* com PI (vermelho). (A) e (B) Pheid

em F-127 no escuro; (C) e (D) Pheid em F-127 após iluminação de 20 min (612 J cm^{-2}).

..... 111

Figura 35. Taxa de mortalidade para Mg-Chl, Zn-Chl e Pheo ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DPPC (multilamelar) sobre *S. aureus* em diferentes tempos de iluminação com LASER (5, 10 e 15 min). Cada ponto representa a média \pm desvio padrão das medidas em triplicata.

..... 112

Figura 36. Imagem DIC (A) e sua correspondente imagem de microscopia de fluorescência (B) de células de *S. aureus* com PI (vermelho). Pheo ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DPPC (multilamelar) após iluminação de 20 min (612 J cm^{-2})..... 114

Figura 37. Inativação fotodinâmica do Pheid (A) e da Zn-Chld (B) em diferentes sistemas de formulação sobre *S. aureus* em função do tempo de iluminação. A concentração de FS foi de $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em P123 e F-127, e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em DPPC. 115

Figura 38. Análise ultraestrutural de *S. aureus*. (A) Controle sem iluminação; (B), (C) e (D) após PDI com Pheid em F-127 (2% m/v, [FS]= $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 10 min de iluminação. 117

Figura 39. Análise ultraestrutural de *S. aureus*. (A) Controle sem iluminação; (B), (C) e (D) após PDI com Pheid em DPPC (2 mg mL^{-1} , [FS]= $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 10 min de iluminação. 118

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação do mecanismo de foto-oxidação de substrato (A) do tipo I -
transferência de elétron..... 8

Esquema 2. Mecanismo fotoquímico do tipo II, com transferência de energia e
formação de oxigênio singlete (agente fortemente oxidante)..... 9

Esquema 3. Compostos/fragmentos formados na fotodecomposição da clorofila..... 22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio.....	29
Tabela 2. Coeficiente de absorvidade molar das Chls em etanol e formuladas em P-123 e F-127 (2%, m/v) pelo método da dispersão sólida, a 30,0 °C.....	67
Tabela 3. Deslocamento de estoques ($\Delta\nu$) e comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{emi}) das clorofilas em P-123, F-127 e etanol.	70
Tabela 4. Valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) das clorofilas em micelas poliméricas, a 30,0 °C.....	91
Tabela 5. Valores da constante de supressão (K_{SV}) das clorofilas em DPPC por íons iodeto, a 30,0 °C.	94
Tabela 6. Comprimentos de onda de máxima absorção da banda Q das clorofilas em etanol e formuladas em DPPC.....	95
Tabela 7. Potencial zeta (ζ) das partículas constituídas de micelas poliméricas (P-123 e F-127) e de lipossomos (DPPC) na ausência (branco) e presença de FS, a 30 °C em água Mille-Q.	96
Tabela 8. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) das Chls em etanol, DPPC, P-123 e F-127.....	98
Tabela 9. Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) usando D ₂ O/1% Triton X100/5% Etanol como padrão.....	100
Tabela 10. Constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) das clorofilas em sistemas micro-heterogêneos.....	102

Tabela 11. Valores de potência absorvida (P_{abs}), número de fótons absorvidos (N_{abs}) e de rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{FB}) das clorofilas formuladas em diferentes meios..... 104

Tabela 12. Potência absorvida pelas clorofilas em F-127 utilizando LED e LASER como fonte de iluminação..... 107

Tabela 13. Moléculas de FS adsorvidas pelos micro-organismos..... 120

Tabela 14. Valores D (min) obtidos para as clorofilas formuladas em F-127, P-123 ([FS]= 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e DPPC ([FS]= 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) frente a *S. aureus*. Utilizando Laser de diodo (100 mW, $\lambda_{\text{max}}= 658 \text{ nm}$) como fonte de iluminação..... 121

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- $^1\text{O}_2$ – Oxigênio Singlete
 S_0 - Estado Fundamental
 S_1 - Primeiro Estado Excitado Singlete
 S_2 - Segundo Estado Excitado Singlete
 T_1 - Primeiro Estado Excitado Triplete
 T_n - Estado Triplete
 $^1\text{FS}^*$ - Fotossensibilizador no Estado Excitado Singlete
 $^3\text{FS}^*$ - Fotossensibilizador no Estado Excitado Triplete
 ^1A – Substrato no Estado Singlete
 Φ - Rendimento Quântico
 Φ_Δ - Rendimento Quântico de Oxigênio Singlete
 Φ_F - Rendimento Quântico de Fluorescência
 ζ - Potencial zeta
 λ_{exc} – Comprimento de Onda de Excitação
 λ_{emi} - Comprimento de Onda de Emissão
 η - Viscosidade
 τ - Tempo de Vida
 k - Constante de Velocidade
 k_{FB} - Constantes de Velocidade de Fotobranqueamento
 Φ_{FB} - Rendimento Quântico de Fotobranqueamento
 ε - Coeficiente de Absortividade Molar
 h - Constante de Planck
 c - Velocidade da Luz no Vácuo
 Δv - deslocamento de Stokes
Mg-Chl - Clorofila *a*
Zn-Chl - Clorofila de Zinco
Pheo - Feofitina
Pheid - Feoforbídeo
Zn-Chld - Clorofilida de Zinco
Abs - Absorbância
Chls – Clorofilas

CI - Conversão Interna
CIS - Conversão Intersistema
CMC - Concentração Micelar Crítica
DIC - Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial
DMSO - Dimetilsulfóxido
DPPC – Dipalmitoilfosfatidilcolina
ELS - *Electrophoretic Light Scattering*
EO - óxido de etileno
EROS - Espécies Radicais de Oxigênio
F-127 - (óxido de etileno)₁₀₀(óxido de propileno)₆₅(óxido de etileno)₁₀₀
FB - Fotobranqueamento
FS - Fotossensibilizador
HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital*
KI - Iodeto de Potássio
 K_{SV} - Constante de Stern-Volmer
LASER - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
LCST - *Lower Critical Solution Temperature*
LED - Diodo Emissor de Luz
LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*
LUV - Vesícula Unilamelar Grande
MLV - Vesícula Unilamelar
 N_A - Número de Avogadro
 N_{abs} - Número de Fótons Absorvidos
P-123 - (óxido de etileno)₂₀(óxido de propileno)₇₀(óxido de etileno)₂₀
P - Potência da Fonte
 P_{abs} - Potência Absorvida
PACT - *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*
PBS - Tampão Fosfato Salino
PDI - *Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos*
PEO - poli(óxido de etileno)
PI - Iodeto de Propídio
PO - óxido de propileno
PPO - poli(óxido de propileno)
RLS - Espalhamento de Luz Ressonante

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SUV - Vesícula Unilamelar Pequena

TFD – Terapia Fotodinâmica

TEM - Microscopia de Transmissão Eletrônica

TMC - Temperatura Micelar Crítica

TSA- *Tryptic Soy Agar*

TSB - *Tryptic Soy Broth*

UFC - Unidades formadoras de colônia

Valor D - Tempo Necessário para Inibição de 90 % dos Micro-organismos

Estudos Fotofísicos e Fotodinâmicos da clorofila a e derivados formulados em micelas poliméricas e lipossomos

RESUMO

A combinação de um fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio é o princípio básico da Terapia Fotodinâmica (TFD) e da inativação fotodinâmica de micro-organismos (PDI). A clorofila (Mg-Chl) e seus derivados: clorofila de zinco (Zn-Chl), feofitina (Pheo), feoforbideo (Pheid) e clorofilida de zinco (Zn-Chld) foram estudados como possíveis fotossensibilizadores para aplicações fotodinâmicas. Os FS foram formulados em micelas poliméricas de F-127 e P-123 e em sistemas lipossomais constituídos de DPPC. Os formulados micelares obtidos foram analisados quanto à estabilidade térmica e temporal. Além disso, todos os formulados foram analisados quanto à localização dos FS nos sistemas carreadores, densidade de carga superficial; e propriedades fotofísicas como rendimentos quânticos de oxigênio singlete (Φ_A) e de fluorescência (Φ_F), fotoestabilidade e aplicação sobre micro-organismos.

Os FS foram incorporados em micelas poliméricas e lipossomos pelo método da dispersão sólida. A formulação possibilitou a monomerização das clorofilas e manutenção das propriedades espectroscópicas e fotofísicas (rendimento quântico de fluorescência e oxigênio singlete) das mesmas, o que possibilitou a aplicação desses FS em ensaios fotodinâmicos.

A estabilidade térmica dos formulados micelares foi avaliada por espectroscopias de absorção eletrônica e emissão de fluorescência, simultaneamente às análises de espalhamento de luz ressonante. A estabilidade térmica desses formulados foi dependente de interações específicas entre o FS e o copolímero. Em baixas

temperaturas, inferiores à temperatura micelar crítica, verificou-se uma modificação das propriedades dos microambientes da micela, como aumento da polaridade e diminuição da viscosidade, causando alterações nos perfis espectrais das clorofilas, principalmente nas intensidades de emissão de fluorescência.

Análises da densidade de carga superficial dos sistemas carreadores avaliadas pelo potencial zeta mostraram que as micelas poliméricas possuem uma densidade de carga superficial negativa, enquanto os lipossomos apresentaram um potencial de superfície positivo, indicando que os últimos são sistemas carreadores mais promissores para aplicação em membranas celulares, com densidade de carga negativa. A incorporação dos FS afetaram os potenciais de superfície dos sistemas carreadores, aproximando-se de zero e diminuindo a estabilidade das suspensões e possibilitando a aglomeração das partículas micelares e lipossomais.

A localização das clorofilas nos sistemas carreadores foi avaliada por estudos de supressão de fluorescência, utilizando iodeto como supressor aquo-solúvel, e pela variação de energia das bandas de absorção e emissão. Nos formulados micelares as clorofilas com a cadeia fitílica (Mg-Chl, Zn-Chl e Pheo) localizaram-se no core hidrofóbico da micela enquanto os derivados forbídeos (Pheid e Zn-Chld) na camada externa hidrofílica. Por outro lado, as clorofilas com a cadeia fitílica nos formulados lipossomais organizaram-se de maneira que o anel clorínico foi localizado na região limitante da bicamada lipídica próximo da cabeça polar e a cadeia fitílica inserida na região hidrocarbônica apolar da bicamada. Já os derivados forbídeos foram incorporados na camada externa do lipossomo próximo à cabeça polar do fosfolipídio.

As clorofilas desmetaladas Pheo e Pheid mantiveram-se estáveis frente à luz, enquanto as clorofilas metaladas com Zn^{2+} e Mg^{2+} sofreram fotobranqueamento. A ordem de velocidade de degradação das clorofilas foi $Mg-Chl > Zn-Chld > Zn-Chl$ em

todos os formulados estudados, mesma ordem obtida em etanol. O processo de fotobranqueamento das clorofilas foi dependente do meio no qual as moléculas foram incorporadas. A sequência da velocidade de degradação obtida foi DPPC > F-127 > P-123.

Os derivados de clorofila levaram à erradicação fotodinâmica da *Staphylococcus aureus*. O sistema carreador constituído de lipossomo DPPC potencializou a ação fotodinâmica dos FS, que foi dependente de processos de fotobranqueamento, localização, Φ_{Δ} e adsorção das clorofilas nas células bacterianas. Adicionalmente, mudanças ultraestruturais analisadas por microscopia de transmissão eletrônica mostraram que os principais alvos de ação fotodinâmica desses formulados sobre *S. aureus* são a membrana citoplasmática e os ácidos nucleicos.

A análise das propriedades físico-químicas dos formulados obtidos juntamente com resultados de inativação fotodinâmica da bactéria *S. aureus* mostrou que os derivados de clorofila são potenciais FS para PDI, principalmente os derivados forbídeos (Pheid e Zn-Chld) formulados em lipossomos.

Palavras-chave: Derivados de Clorofila, Surfactantes Poliméricos, Lipossomos, Propriedades Fotofísicas, Inativação Fotodinâmica, *Staphylococcus aureus*.

*Photophysical and Photodynamic Studies of Chlorophyll Derivatives
Formulated in Polymeric Micelles and Liposomes*

ABSTRACT

The combination of a photosensitizer (PS), light and oxygen is the base of the photodynamic therapy (PDT) and photodynamic inactivation of micro-organisms (PDI). Chlorophylls compounds present interesting characteristics which can be used as PS in PDT. The chlorophyll (Mg-Chl) and derivatives: zinc chlorophyll (Zn-Chl), pheophytin (Pheo), pheophorbide (Pheid) and zinc chlorophyllide (Zn-Chld) were studied. The chlorophylls were formulated in polymeric micelles (F-127 and P-123) and liposomes (DPPC). The formulated micellar systems were analyzed for temporal and thermal stability. In addition, all the samples were analyzed concerning the PS location in carrier systems, surface charge density, and photophysical properties such as fluorescence (Φ_F) and singlet oxygen quantum yields (Φ_{Δ}), photostability and application against microorganisms.

The PS have been incorporated into polymeric micelles and liposome in the monomeric form by the solid dispersion method. The formulation kept the spectroscopic and photophysical properties (fluorescence and singlet oxygen quantum yields) of chlorophylls, which allowed the application in photodynamic assays.

The thermal stability of micellar formulation was evaluated by electronic absorption spectroscopy and fluorescence emission, simultaneously to the analysis of resonant light scattering. The thermal stability of these formulations was dependent on specific interactions between the PS and the copolymer. At low temperatures below the critical micelle temperature, there was a change in the properties of the micellar

microenvironment such as increased viscosity and decreased polarity. These have caused changes in the spectral profiles of chlorophylls, mainly in the fluorescence emission intensities.

Analyses of the surface charge density of carrier systems were evaluated by the zeta potential. Polymeric micelles exhibited a negative surface charge density, whereas liposomes showed positive surface potential. This indicates that the liposomes are carrier systems more advantageous for application to membranes (negative charge). The incorporation of PS affected the potential surface of the carrier systems, approaching to zero. This decreases the stability of suspensions and leads to agglomeration of the particles.

The location of chlorophyll in carrier systems was evaluated by fluorescence quenching studies using iodide as quencher, and by variation of the absorption and emission energy. In micellar systems, the chlorophylls with the phytyl chain (Mg-Chl, Zn-Chl and Pheo) were located in the hydrophobic core of the micelle and the phorbides derivatives (Pheid and Zn-Chld) in the outer layer (hydrophilic). In liposomes, the chlorophylls with phytyl chain showed the chlorin ring located near the polar head and the phytyl chain inserted in lipid bilayer. In addition, the phorbides derivatives were incorporated into the outer layer of the liposome, near to the polar region of phospholipid.

Pheo and Pheid remained stable under light, while metallo-chlorophylls (with Zn^{2+} and Mg^{2+}) undergo photobleaching. The order of degradation rate of chlorophyll was Mg-Chl > Zn-Chld > Zn-Chl for all systems studied. The same order was obtained in ethanol. The photobleaching process of chlorophyll was dependent on the environment in which the molecules were incorporated. The degradation rate followed the order: DPPC > F-127 > P-123.

Chlorophyll derivatives led to the photodynamic eradication of *Staphylococcus aureus*. The formulation of chlorophylls in DPPC enhanced the photodynamic action, which was dependent of photobleaching processes, location, Φ_{Δ} and PS uptake by microbial cell. Additionally, ultrastructural changes analyzed by transmission electron microscopy showed that the main targets of photodynamic action on *S. aureus* cells are the cytoplasmic membrane and the nucleic acids.

Analysis of the physicochemical properties of formulations together with results of photodynamic inactivation showed that chlorophyll derivatives are potential PS for PDI mainly the phorbides derivatives (Pheid and Zn-Chld) in liposomes.

Keywords: Chlorophyll Derivatives, Polymeric Surfactants, Liposomes, Photophysical Properties, Photodynamic Inactivation, *Staphylococcus aureus*.

1. Introdução

A Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos (PDI) é uma alternativa para o crescente desenvolvimento de resistência dos micro-organismos a antibióticos (Demidova e Hamblin, 2005). O princípio básico da PDI é a excitação de um composto fotossensível (FS) com radiação de energia adequada, na presença de oxigênio molecular, formando espécies radicalares de oxigênio (EROS) no mecanismo fotoquímico tipo I e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) no tipo II. O último mecanismo é assumido como principal na destruição das células alvo (Macdonald e Dougherty, 2001).

As clorofilas (Chls) (Figura 1A), compostos presentes em abundância na natureza, possuem características fotofísicas de interesse para aplicações fotodinâmicas, como alta absorção de luz na janela terapêutica (600-800 nm), alto tempo de vida do estado excitado, alto rendimento quântico de oxigênio singlete (Küpper et al., 2002) e alta hidrofobicidade (Gerola et al., 2011), que aumenta a seletividade e interação com membranas (Simplicio et al., 2002).

Todavia, a grande hidrofobicidade das clorofilas leva ao fenômeno de autoagregação em meio aquoso. O estado de agregação de moléculas fotoativas é fundamental na eficácia fotodinâmica do fármaco *in vivo* pelo decréscimo de biodisponibilidade e limitação da capacidade de absorver luz. Além do que as formas monoméricas de fármacos são apreciavelmente mais fotoativas e capazes de gerar oxigênio singlete em relação à eficiência baixa observada para as moléculas empilhadas face a face (autoagregados do tipo H) (Ricchelli et al., 1993). Uma alternativa em busca da estabilização dessas moléculas no estado monomérico são os sistemas nanoestruturados coloidais. Assim, sistemas muito usados na indústria farmacêutica são as micelas poliméricas e os lipossomos empregados para maior solubilização e

prevenção da autoagregação (Liu, 2008).

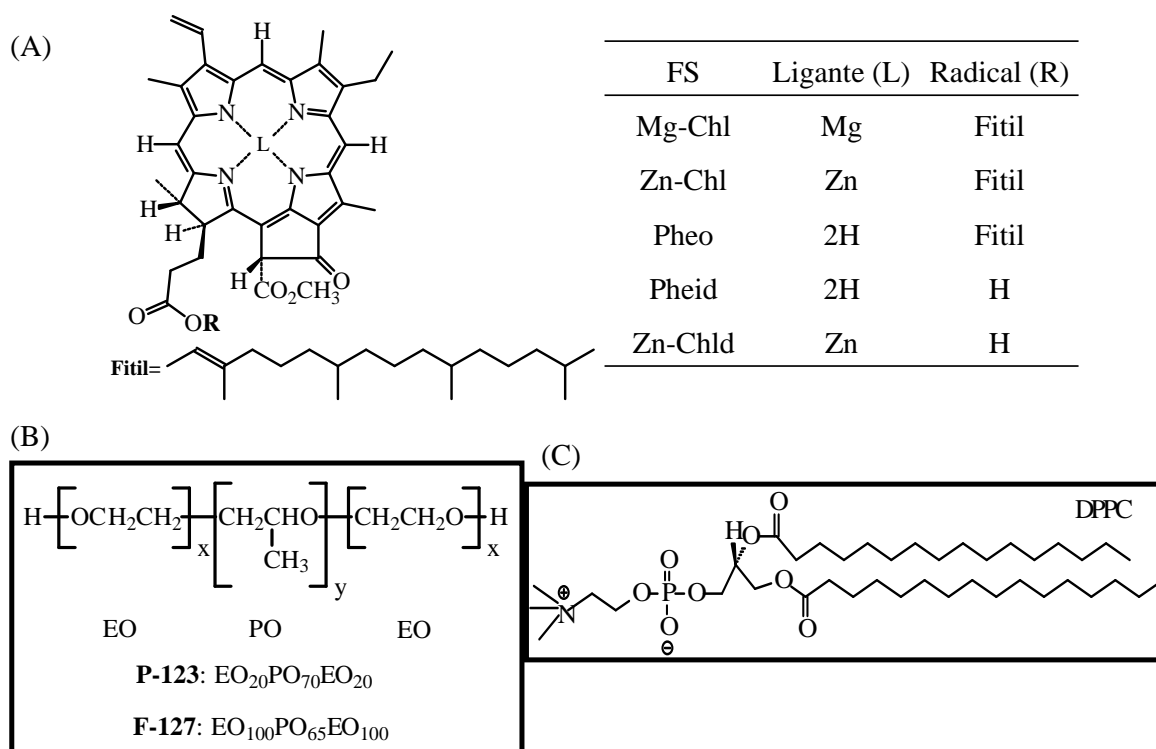


Figura 1. Estrutura molecular de: (A) clorofila *a* e seus derivados; (B) surfactantes poliméricos; e (C) fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

Um sistema de liberação muito usado em *drug delivery* é o de micelas poliméricas do tipo pluronics[®] (ou poloxâmeros), constituído de monômeros hidrofílicos (EO – óxido de etileno) e hidrofóbicos (PO – óxido de propileno) (Kabanov e Zhu, 2005). No presente trabalho o interesse é pelos pluronics P-123 e o F-127 (Figura 1B). Para ambos, a porção PO é similar e a porção EO é muito maior no F-127. Entre as vantagens das micelas poliméricas, tem-se o pequeno tamanho (10 a 100 nm), que permite maior tempo de circulação no sistema biológico sem serem reconhecidas pelo sistema renal e reticuloendotelial possibilitando, adicionalmente, um maior acúmulo do fármaco nas células de interesse; alta estabilidade estrutural – estática e dinâmica *in vitro* e *in vivo*; alta solubilidade em água; baixa toxicidade, comparativamente a micelas iônicas. Outras vantagens são atribuídas à incorporação de diversos tipos de fármacos

nestas micelas e também à sua liberação controlada e proteção das substâncias encapsuladas da degradação e outros danos relacionados ao metabolismo (Liu, 2008).

Por sua vez, os lipossomos são vesículas biocompatíveis e biodegradáveis e, como sistema de liberação, contribuem para a eficiência de liberação de fármacos no sítio alvo, aumentando e mantendo os seus efeitos clínicos, reduzindo a toxicidade dos fármacos e protegendo-os das respostas metabólicas e imunológicas. As propriedades dos lipossomos (na Figura 1C, ilustração de monômero de DPPC) variam com a composição do lipídeo, tamanho, carga superficial e método de preparação. A formulação de moléculas hidrofóbicas em sistemas lipossomais apresenta diversas vantagens, como a solubilização do fármaco, liberação controlada, e vetorização a sítios específicos. A entrega seletiva do princípio ativo às células alvo, decorrentes das interações específicas com membranas biológicas, além de melhorar a eficiência terapêutica possibilita a redução da dose de fármaco aplicada para obtenção da resposta desejada. Além disso, os lipossomos são atóxicos, biodegradáveis, e não imunogênicos (Lasic, 1995).

2. Fundamentação Teórica

2.1. Processos Fotofísicos e fotoquímicos

2.1.1. Processos Fotofísicos

A interação da luz com a matéria é a base dos processos fotofísicos, que ocorrem após a absorção de fótons por moléculas fotoativas, promovendo elétrons do orbital HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) para o LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), transição do estado fundamental para o excitado. Os processos moleculares que envolvem a absorção de fótons e as transições no estado excitado são representados pelo diagrama de Jablonski (Figura 2). As moléculas no estado excitado podem retornar ao estado fundamental por transições não radiativas (conversão interna – CI e conversão intersistema – CIS) e radiativas (fluorescência e fosforescência) (Wardle, 2009).

Quando uma molécula é excitada para o segundo estado singlete excitado (S_2) ou para níveis vibracionais de maior energia do primeiro estado singlete excitado (S_1) ela rapidamente relaxa vibracionalmente por CI para o primeiro estado excitado de menor energia vibracional. A conversão interna é uma transição muito rápida, na ordem de $10^{-12} - 10^{-10}$ s, entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin (permitida por spin). Em solução, o excesso de energia vibracional pode ser transferido para o solvente durante colisões da molécula fotoativa excitada com o solvente. A eficiência da CI de S_2 para S_1 é maior do que de S_1 para S_0 , devido a maior diferença de energia entre S_1 e S_0 . Assim, a CI $S_1 \rightarrow S_0$ compete com outros processos de desativação, como emissão de fótons (fluorescência) e conversão intersistema para o

estado triplete, a partir do qual pode haver a emissão de fótons (fosforescência) (Valeur, 2002).

A fluorescência é uma transição radiativa, na qual a molécula excitada retorna ao estado fundamental pela emissão de um fóton. Essa transição ocorre entre estados de mesma multiplicidade de spin (permitida por spin) e ocorrem na escala de tempo de $10^{10} - 10^{-7}$ s. Normalmente, a emissão de fluorescência ocorre do primeiro estado excitado para o estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), mesmo para as moléculas que vão para o segundo estado excitado ao absorver radiação. Isso ocorre devido ao processo de conversão interna ($S_2 \rightarrow S_1$) antes da emissão. A menor energia de emissão ($S_1 \rightarrow S_0$ que ocorre a partir do nível vibracional de menor energia do estado S_1) em relação à absorção ($S_0 \rightarrow S_1$) deve-se à perda de energia do estado excitado por relaxação vibracional. Essa diferença de energia, dependente do meio e, pode ser avaliada pelo deslocamento de Stokes dado pela diferença entre os máximos de absorção ($S_0 \rightarrow S_1$) e emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$), em número de onda (Valeur, 2002).

A conversão intersistema é um processo não radiativo entre dois níveis vibracionais de mesma energia e estados eletrônicos de diferentes multiplicidades. Nesse processo a molécula no primeiro estado singlete excitado pode sofrer conversão intersistema para o estado triplete (T_n). A conversão intersistema pode ser rápida o suficiente ($10^{-7} - 10^{-9}$ s) para competir com outros processos de relaxação do primeiro estado excitado singlete (fluorescência e CI). A conversão entre estados de diferentes multiplicidades é proibida por spin, contudo o acoplamento spin-órbita (acoplamento entre o momento magnético orbital e o momento magnético spin) torna a transição possível. O decaimento do estado triplete para o fundamental singlete S_0 pode ocorrer tanto por emissão fosforescente quanto por colisões (Michl, 2006). Em solução à temperatura ambiente os processos não radiativos de relaxação do estado triplete são

predominantes, isso porque a transição $T_1 \rightarrow S_0$ é proibida por spin ($10^{-6} - 1$ s) (Valeur, 2002).

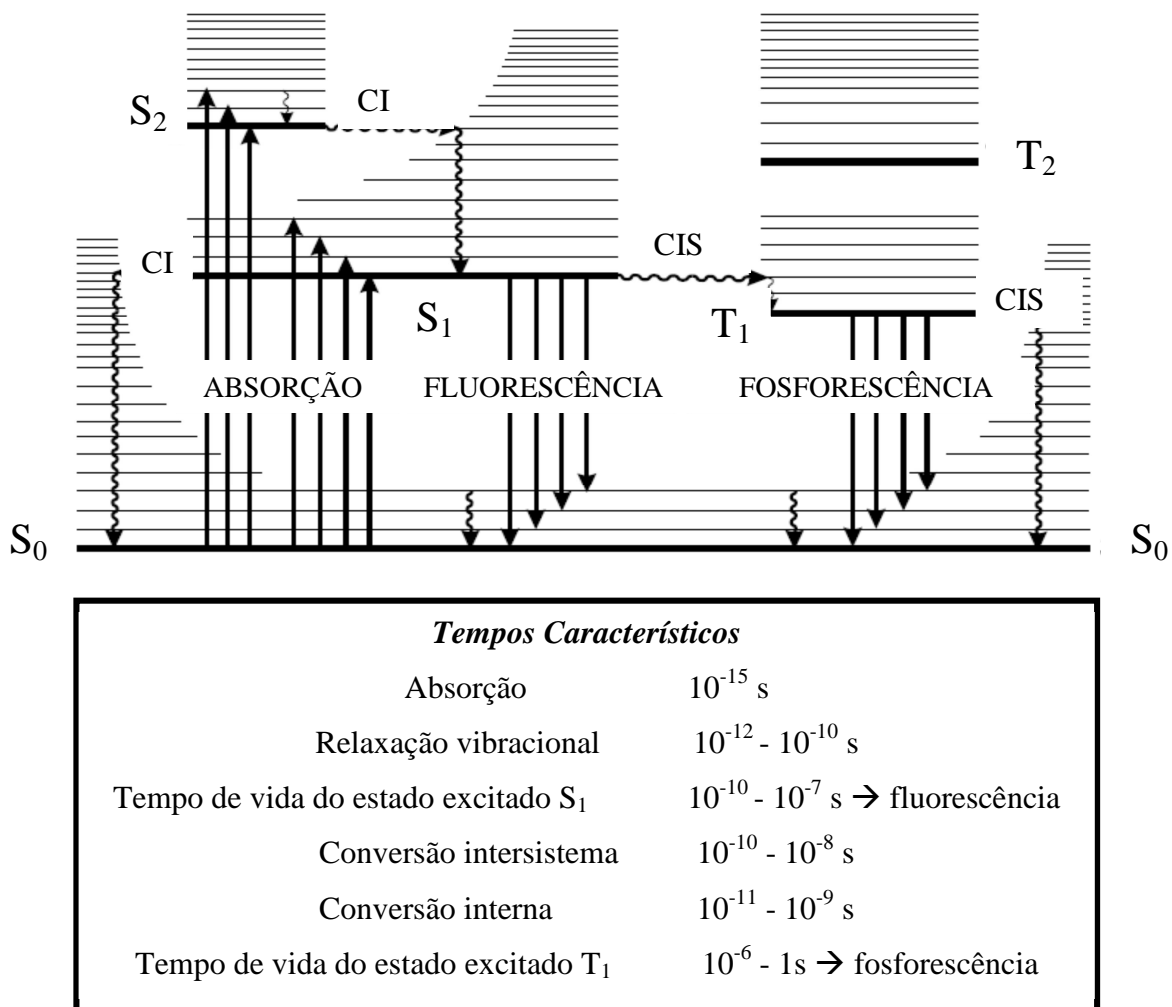


Figura 2. Digrama de Jablonski, representação esquemática do processo de absorção e caminhos para desativação do estado excitado e dos tempos característicos dos processos envolvidos.

Outros mecanismos de desativação do estado excitado são: transferência de carga intramolecular, mudança conformacional, e interação no estado excitado com outras moléculas (transferência de elétron, transferência de próton, transferência de energia, formação de excímeros e excíplexos) (Valeur, 2002).

2.1.2. Processos Fotoquímicos

“Nos primórdios da Terra a radiação do Sol era a única fonte de energia. Moléculas gasosas simples, como metano, amoníaco e dióxido de carbono devem ter reagido fotoquimicamente para sintetizar moléculas orgânicas complexas tais como proteínas e ácidos nucleicos. Através dos tempos, a natureza aperfeiçoou-se para utilizar a energia solar para todos os fenômenos fotobiológicos e fornecer alimentos para a propagação da vida.”

(Rohatgi-Mukherjee, 1978)

Os processos fotoquímicos envolvem alterações químicas iniciadas por moléculas excitadas pela absorção de radiação adequada. A fotoquímica tem uma ampla aplicabilidade na ciência e na tecnologia, além de atuar de maneira primordial nos processos naturais, onde o sol é a figura central (Rohatgi-Mukherjee, 1978).

2.1.3. Rendimentos quânticos de processos fotofísicos e fotoquímicos

Moléculas excitadas podem perder a sua energia por processos químicos (reação após absorver fótons) ou físicos (fluorescência, fosforescência, CI e CIS). A eficiência desses processos, ou rendimento quântico (Φ), é definida como:

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

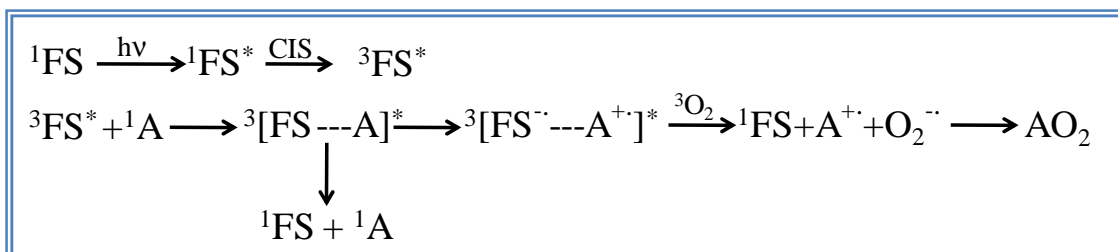
onde k é a constante de velocidade dos diferentes processos (Valeur, 2002;

Rohatgi-Mukherjee, 1978).

2.2. Terapia Fotodinâmica

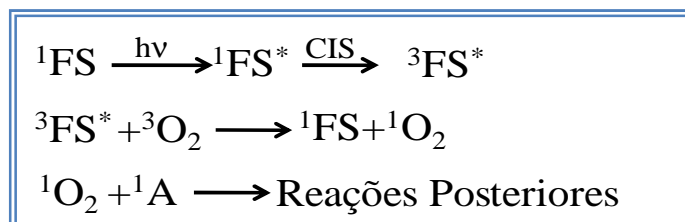
A ativação de determinadas moléculas fotossensíveis por radiação de energia adequada, na presença de oxigênio molecular, é o princípio básico da Terapia Fotodinâmica (TFD) (Kennedy, 2006; Simplicio et al., 2002), modalidade médica utilizada no ataque fotoinduzido a biomoléculas componentes de células tumorais, vírus, fungos e bactérias, por espécies reativas geradas *in situ*. A exposição do fotossensibilizador (FS) à luz sob a região alvo promove o fármaco ao seu estado eletrônico excitado singlete ($^1\text{FS}^*$), que pode sofrer CIS passando para o estado excitado tripleto ($^3\text{FS}^*$). O longo tempo de vida deste estado permite ao composto interagir com substratos biológicos *via* dois mecanismos principais: tipo I e II (Dolmans et al., 2003):

- No processo fotoquímico do tipo I a foto-oxidação ocorre pela transferência de elétron entre o $^3\text{FS}^*$ e o substrato (^1A). Esse processo leva a formação de íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em espécies radicalares de oxigênio (EROs), como é mostrado no Esquema 1 (Machado, 2000).



Esquema 1. Representação do mecanismo de foto-oxidação de substrato (A) do tipo I - transferência de elétron.

- Os processos que envolvem a transferência de energia do $^3\text{FS}^*$ para o oxigênio molecular, com a geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$ - espécie altamente reativa), são classificados como do tipo II (Esquema 2).



Esquema 2. Mecanismo fotoquímico do tipo II, com transferência de energia e formação de oxigênio singlete (agente fortemente oxidante).

Os mecanismos envolvendo as reações do tipo I e II ocorrem simultaneamente e a razão entre ambos depende de diversos parâmetros, principalmente em relação às características e propriedades físico-químicas do FS em solução, concentração de substrato e oxigênio, assim como a afinidade de ligação do FS com o substrato (Dolmans et al., 2003). Contudo, o mecanismo comumente assumido como principal para a TFD passa pela geração do oxigênio singlete (Macdonald e Dougherty, 2001).

Devido à alta reatividade e pequeno tempo de vida das EROs e do $^1\text{O}_2$ somente os substratos biológicos que estão próximos a área de produção dessas espécies são diretamente afetados pela TFD. Dessa forma, a localização do FS torna-se um fator primordial em estudos de liberação de fármaco para os tecidos doentes, resultando na importância dos sistemas carregadores. A localização de um composto é conhecidamente determinada pela permeabilidade vascular e difusão intersticial, que depende do tamanho molecular, configuração, carga e propriedades hidrofílicas ou lipofílicas dos mesmos, bem como propriedades fisiológicas dos vasos sanguíneos. Além disso, a ligação dos FS com vários componentes biológicos pode influenciar em seu transporte, tempo de permanência em circulação na corrente sanguínea e retenção

em tumores. Considerando-se que o sítio de ação na célula é outro fator que contribui para a eficácia da TFD, tem-se desenvolvido FS em formulados que se localizam preferencialmente na mitocôndria, na membrana plasmática, em lisossomos e no núcleo. A mitocôndria é proposta como o sítio celular mais efetivo para fotodestruição (Dolmans et al., 2003).

Normalmente as reações de foto-oxidação de biomoléculas pelo oxigênio singlete são irreversíveis, acarretando assim na diminuição de oxigênio no alvo celular, variável que compromete a eficácia da técnica (Zhu e Finlay, 2006).

Adicionalmente, os dois fatores, focalização da radiação no tecido doente durante a aplicação da TFD e localização preferencial do FS, contribuem para a seletividade característica dessa técnica em relação a outras terapias citotóxicas (Perussi, 2007).

2.3. Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos (PDI)

A destruição de micro-organismos como bactérias, fungos, leveduras, protozoários e vírus pela ativação de um fotossensibilizador com luz é denominado Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos (PDI - *Photodynamic Inactivation*) ou Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT - *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*). A PDI tem sido aplicada na esterilização do sangue, periodontia, desinfecção da água, aplicação sobre parasitas patogênicos humanos e no tratamento antimicrobiano de alimentos (Perussi, 2007).

O princípio fotoquímico da PDI e da TFD é o mesmo, a diferença entre ambas as técnicas consiste nas estruturas dos FS e alvos celulares. Os FS utilizados na Terapia Fotodinâmica do câncer são principalmente os tetrapirrólicos (porfirinas, clorinas,

bacterioclorinas e ftalocianinas) devido à baixa toxicidade intrínseca em células de mamíferos e pelas características específicas de localização. Enquanto, na inativação de micro-organismos os fotossensibilizadores que têm sido mais estudados pertencem a diferentes grupos de compostos, como os xantênicos, fenotiazínicos, acridínicos e conjugados de clorina (e6). Em relação aos alvos celulares na TFD em células de mamíferos ressaltam-se principalmente lisossomos, mitocôndrias e membranas plasmáticas, enquanto na PDI um sítio preferencial a ser atacado é a membrana externa das células microbianas, que atua como uma barreira protetora impedindo a danificação do DNA (Perussi, 2007).

Quando a destruição/inativação de micro-organismos ocorre por mecanismo do tipo I inicialmente ocorre a abstração de hidrogênios alílicos de moléculas insaturadas como fosfolipídios presentes na membrana plasmática pelo FS, iniciando-se outras reações redox onde espécies reativas são formadas próximo ao alvo biomolecular. Na presença de oxigênio em ambiente microbial (ou citoplasma) formam-se os radicais superóxido e hidroxil (HO[•]) que podem reagir com biomoléculas ou combinar-se para dar peróxido de hidrogênio *in situ*, levando a eventos citotóxicos, com formação de hidroperóxido lipídico. A peroxidação de lipídeos tem efeito determinante na integridade da membrana, levando a diminuição de sua fluidez e aumento na permeabilidade de íons. No mecanismo do tipo II, o oxigênio singlete atua como espécie oxidante das moléculas envolvidas na manutenção e estruturação da parede/membrana celular como peptídeos, fosfolipídios, esteróis e outras (Wainwright, 2002).

O balanço entre comportamentos farmacológicos e o sítio de ação de agentes fotodinâmicos são governados pelo fator estérico e propriedades físico-químicos como caráter lipofílico, grau e tipo de ionização, planaridade estrutural, etc. (Wainwright,

2002). Além disso, acrescentam-se as propriedades intrínsecas da própria membrana, tais como carga superficial, fluidez, permeabilidade, etc.

A importância da PDI na erradicação de bactérias é devido ao aumento significativo observado de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Não se tem notícia de desenvolvimento de resistência microbiana a PDI e é improvável que seja desenvolvida (Hamblin e Hasan, 2004). Em relação ao sucesso da PDI sobre microorganismos, é conhecido que bactérias Gram-positivas, como a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), normalmente são mais susceptíveis à fotodestruição do que as Gram-negativas, como a *Escherichia coli* (*E. coli*); essa diferença é associada à complexidade da parede celular constituída de peptidoglicano e estruturas ligadas. Nas bactérias Gram-negativas existe uma camada externa atuando como uma barreira de proteção física e funcional, enquanto nas bactérias Gram-positivas a camada de peptidoglicano (polímero poroso e insolúvel de grande resistência) assume essa função (Figura 3A e 3B).

O peptidoglicano é um heteropolissacarídeo formado por ácido *N*-acetilmurâmico (NAM) e *N*-acetilglucosamina (NAG) e alguns aminoácidos. O NAM e a NAG estão ligados entre si por uma ligação glicosídica ($\beta 1 \rightarrow 4$), enquanto as moléculas de NAM são ligadas entre si por oligopeptídeos. Em consequência das ligações que ocorrem entre as cadeias de glicano e de aminoácidos, a molécula do peptidoglicano possui a forma de uma rede. O peptidoglicano de bactérias Gram-negativas possui as extremidades livres do NAM ligadas a oligopeptídeos, em que o peptídeo terminal é a *D*-alanina, embora possam estar presentes outros aminoácidos. As bactérias Gram-positivas possuem também um pentapeptídeo de glicina, inexistente nas Gram-negativas (Nelson e Cox, 2004).

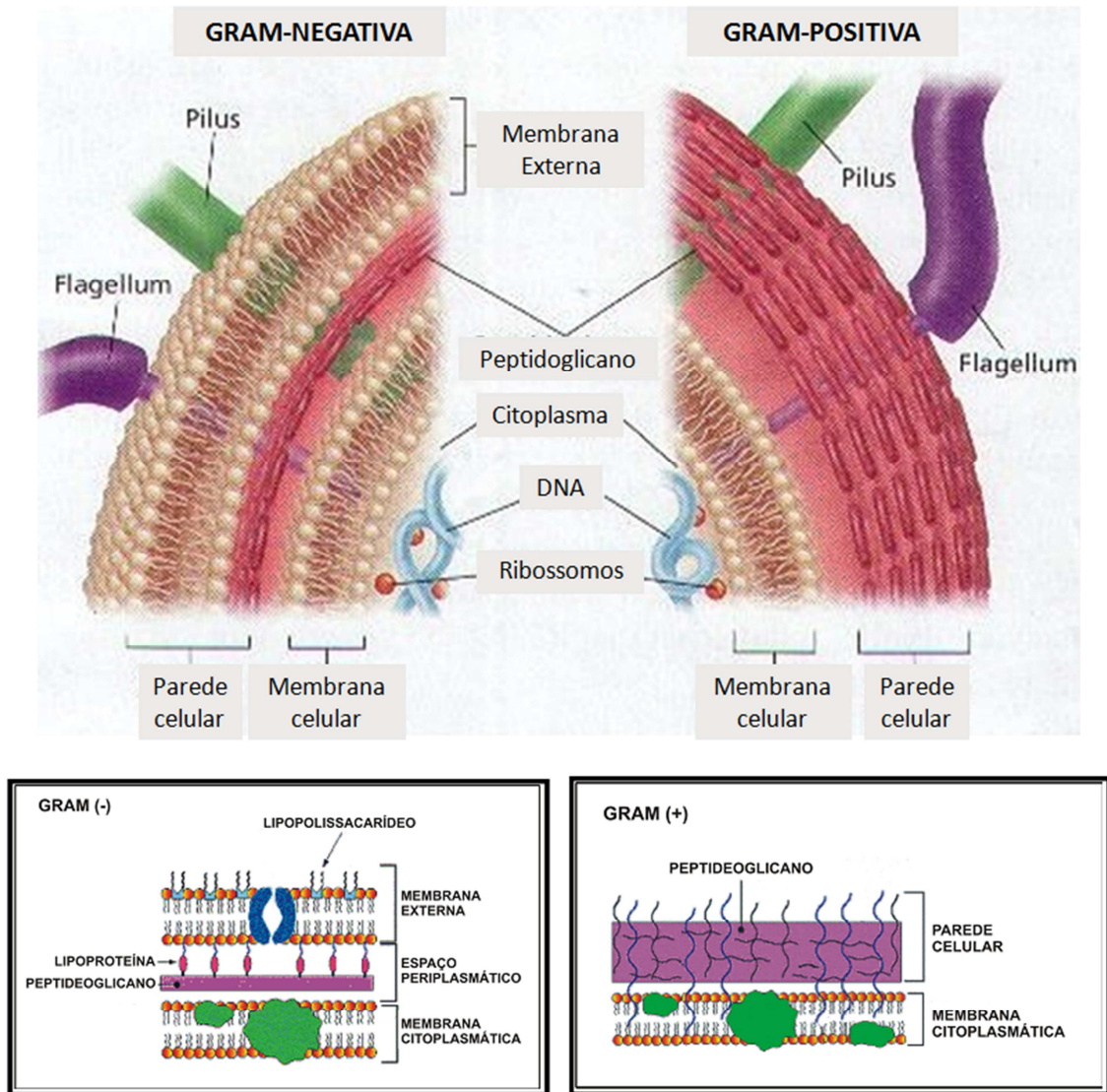


Figura 3. Representação esquemática de bactéria Gram-positiva (+) e Gram-negativa (-).

Imediatamente abaixo da parede celular tem-se a membrana citoplasmática, composta principalmente de fosfolipídios (20 a 30%) e proteínas (50 a 70%). Os fosfolipídios formam uma bicamada na qual a maioria das proteínas estão inseridas (Figura 3). A membrana citoplasmática atua como uma barreira para muitas moléculas solúveis em água e atua em processos essenciais para a célula. Essa membrana possui enzimas envolvidas na produção de energia e síntese da parede celular (Pelczar et al., 1993). A membrana citoplasmática de células procarióticas delimita a área

citoplasmática, que contém em torno de 80% de água, ácidos nucleicos, proteínas, carboidatos, lipídeos, íons inorgânicos e outros compostos de baixa massa molar. Os ribossomos são partículas densas e são sítios de síntese de proteínas. No citoplasma de células procarióticas alguns ribossomos são encontrados livres no citoplasma e outros encontram-se associados à superfície interna da membrana citoplasmática, especialmente os envolvidos na síntese de proteínas. O material nuclear das células bacterianas, responsável pela informação genética, é conhecido como nucleóide e não possui uma membrana delimitante. Em microscopia eletrônica o nucleóide aparece como uma área luminosa (Pelczar et al., 1993).

Na erradicação de bactérias a membrana citoplasmática deve ser danificada, assim os fármacos que se localizam no interior das células normalmente são mais eficientes. Como nas bactérias Gram-negativas os FS de carga zero e aniônicos não são eficientemente incorporados, o processo inicial de erradicação fotodinâmica é devido ao dano a membrana externa da célula, que permite que o fármaco se incorpore em sítios celulares internos onde a ação fotodinâmica é mais eficaz.

As superfícies da maioria das células bacterianas possuem carga eletrostática líquida negativa em pH fisiológico devido à presença de grupos fosforilo e carboxilato ionizados em macromoléculas da parede celular. O grau de eletronegatividade da superfície bacteriana influencia a polaridade dessa superfície e pode ser estimada pelo potencial zeta (Wilson et al., 2001) ($\zeta = -30$ mV para *S. aureus* (Kim et al., 1999) e $\zeta = -60$ mV para *E. coli*) (Komaromy et al., 2009). A superfície externa negativamente carregada das bactérias ajuda a prevenir a adsorção e/ou captação de corantes aniônicos. Conhecidamente, FS com carga positiva normalmente são mais eficientes sobre bactérias e agem em concentrações menores que FS não-iônicos e aniônicos (Wainwright, 2002).

Para contornar o problema de baixa incorporação dos FS não-iônicos e aniônicos em micro-organismos tem-se utilizado de conjugados de FS com polímeros catiônicos ou por coadministração de peptídeos permeabilizantes. A natureza catiônica de sistemas de liberação tem sido associada como fator primordial na interação do material com a superfície da parede celular bacteriana carregada negativamente e conseqüentemente na penetração e permeação nessas membranas, aumentando o efeito antimicrobiano (Sadeghi et al., 2008; Wilson et al., 2001).

Além disso, o tamanho e a configuração dos princípios ativos são fatores importantes na interação com componentes celulares. Grupos pequenos são usualmente mais compactos e possuem menor impedimento estérico em comparação com grupos grandes (Sadeghi et al., 2008).

2.4. Fotossensibilizadores em processos fotodinâmicos

Os FS que são estudados para aplicação em TFD são divididos em três gerações. A primeira engloba derivados de hematoporfirinas (HpD) e análogos, na segunda têm-se compostos estruturalmente distintos com absorção em comprimentos de onda na região do vermelho do espectro eletromagnético (ftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas), enquanto a terceira geração abrange FS da segunda geração modificados (Lutex[®], Foscan[®], etc.) (Allison et al., 2004).

Os FS utilizados em TFD devem apresentar algumas características específicas como: baixa toxicidade no escuro; rápido acúmulo no tecido doente sem apresentação de fotossensibilidade prolongada; formulação simples, reprodutível e alta estabilidade do formulado; propriedades farmacocinéticas favoráveis; facilidade de manuseio sintético e obtenção a custos reduzidos; além de alta afinidade e seletividade.

Além das características citadas, os FS devem possuir algumas propriedades fotofísicas particulares (Allison et al., 2004; Simplicio et al., 2002):

- Coeficiente de absorvidade molar elevado em comprimentos de onda maiores que 650 nm do espectro eletromagnético, faixa conhecida como janela terapêutica, na qual se tem menor absorção e espalhamento de luz pelos tecidos biológicos.

- Alto rendimento quântico de estado triplete, que resulta em um alto rendimento de oxigênio singlete e de EROs.

- Baixo rendimento quântico de reações de fotobranqueamento dos FS. O fotobranqueamento é evidenciado pelas mudanças nos espectros de absorção, interferindo na eficiência de processos relativos à TFD. Uma mesma molécula de FS fotoestável pode formar inúmeras moléculas da espécie citotóxica responsável pela ação curativa. Contudo, tem-se além das reações com substratos biológicos, a possibilidade de destruição fotoinduzida do próprio FS (fotobranqueamento), levando a diminuição da concentração da molécula fotoativa e assim comprometendo a quantidade dos processos envolvidos na oxidação de biomoléculas (Zhu e Finlay, 2006). Por outro lado, os processos de fotobranqueamento dos FS são favoráveis à aplicação terapêutica quando se pensa em eliminação do FS do organismo e diminuição de efeitos colaterais prolongados.

Estudos físico-químicos de fármacos fotossensíveis e seus efeitos em TFD nos sistemas *in vivo* e *in vitro*, têm mostrado que a fotoatividade da maioria desses compostos é dependente de inúmeros fatores relacionados à associação preferencial com as membranas biológicas, estado de agregação, difusão, seletividade, que são influenciados por solvente, eletrólitos, temperatura, micelas, vesículas, pH, etc.

A importância da difusão do medicamento pelo organismo e a seletividade deve-se ao fato de que a alta eficiência na entrega seletiva diminui os efeitos colaterais, permitindo ainda uso de doses menores de composto ativo mantendo-se a eficácia.

O grau de hidrofobicidade de fármacos utilizados em TFD está diretamente relacionado com características necessárias à técnica como seletividade e afinidade com tecidos doentes. Os FS com caráter hidrofóbico acentuado possuem a vantagem de se acumular preferencialmente em células em neoplasia; essa seletividade é decorrente da associação do fotossensibilizador a lipoproteínas do plasma, e conhecidamente células tumorais possuem inúmeros receptores de lipoproteínas de baixa densidade, devido à grande demanda por colesterol. A localização e associação preferencial dos FS com as membranas biológicas, nas quais seus principais componentes, os lipídeos e as proteínas, são os principais alvos da destruição fotoinduzida, são de importância fundamental para o sucesso da TFD (Jori, 1996). Nesse sentido, os efeitos investigados nos trabalhos com porfirinas e derivados têm sido relacionados principalmente com as suas propriedades estruturais e de solubilidade (Kessel et al., 2003; Ricchelli, 1995). Assim a alta hidrofobicidade é uma característica favorável já que auxilia na incorporação dos FS às membranas biológicas, mas por outro lado, é responsável pela sua autoagregação em meio aquoso, processo indesejável à TFD. A autoagregação em ambientes aquosos leva a menor solubilidade do fármaco, precipitação, diminuição do tempo de vida de seu estado tripleto e consequentemente diminuição do rendimento de $^1\text{O}_2$ (Ricchelli et al., 1993).

Adicionalmente, a variação de pH em alguns tecidos influencia o grau de protonação dos FS que possuem grupos ácido-base e dessa maneira determina a espécie predominante em um determinado ambiente. Esse processo afeta propriedades importantes tais como solubilidade, lipofilicidade, estabilidade da formulação,

transporte passivo e autoagregação. Uma vez que a espécie do FS predominante no meio controla a carga das mesmas, espécies ionizadas favorecem a sua solvatação e as mantém afastadas entre si, inclusive por repulsão de carga, enquanto as espécies não-iônicas são mais suscetíveis à autoagregação formando dímeros, trímeros e outros agregados (Waterbeemd, 2004). Acrescente-se que tecidos tumorais possuem pH microlocal inferiores aos sadios (Bonneau et al., 2004; Cunderlikova et al., 1999), enquanto na boca e no estômago o meio é consideravelmente ácido. Além disso, nas superfícies de membranas e sistemas coloidais como micelas e lipossomos tem-se uma acentuada variação de pH local (ao redor de 1 a 2 unidades) (Previdello et al., 2006).

A tarefa de direcionar o princípio ativo à região alvo, de maneira eficiente e rápida, apresentando maior solubilização, prevenção da agregação, manutenção de suas propriedades fotofísicas e para que possam ser adequadamente absorvidas e incorporadas pelos sistemas celulares com menor toxicidade e efeitos colaterais, pode ser efetuada por sistemas carregadores de fármacos. Esses geralmente são constituídos por sistemas coloidais aquosos, tais como lipossomos, micelas, ciclodextrinas, polímeros, etc. (Malmsten, 2002).

2.4.1. Derivados de Clorofila como Fotossensibilizadores

A clorofila *a* (Mg-Chl) é encontrada em abundância na natureza e atua como pigmento “antena” na fotossíntese capturando energia luminosa, juntamente com pigmentos acessórios como carotenóides, bacterioclorofilas e xantofilas. A radiação capturada é convertida em energia química e armazenada como carboidratos e outros constituintes dos tecidos vegetais, liberando oxigênio como resíduo. Dentro da classe das clorofilas têm-se as clorofilas *a*, *b*, *c* e *d*, e bacterioclorofilas *a* e *b*. Nas plantas

superiores a proporção de clorofilas *a* e *b* é 3:1. As clorofilas *a* e *b* diferem entre si pelos substituintes do carbono C-3; na clorofila *a* tem-se um grupo metil e na clorofila *b* um grupo aldeído, esses grupos alteram as duas principais faixas de absorção de luz pela mudança na distribuição eletrônica (Fennema, 1985). As clorofilas *c* e *d* são encontradas em algas associadas às clorofilas *a*.

A estrutura molecular da clorofila *a* consiste num anel porfirínico com um dos anéis pirrólicos reduzido, sendo um composto da classe das clorinas. Possui um íon Mg^{2+} coordenado aos nitrogênios e uma cadeia fitílica longa e apolar que promove alta hidrofobicidade à molécula (Figura 1A). Nas células vegetais a cadeia fitílica atua como uma âncora no posicionamento das moléculas de clorofila para orientação correta nas lamelas dos cloroplastos durante o processo de fotossíntese. Vários estudos têm mostrado a importância dessa cadeia na agregação e/ou interação com ambientes hidrofóbicos (Proll et al., 2006; Fiedor et al., 2003; Agostiano et al., 2000), enquanto o tipo de metal complexado ao anel porfirínico afeta propriedades fotofísicas e a sua estabilidade, além de favorecer a formação de interações com sítios específicos (Limantara et al., 2006).

A estabilidade de diferentes metaloclorofilas pode ser explicada pela teoria de ácidos e bases duros e moles de Pearson (Dujardin, 2003). Segundo essa teoria os ácidos duros (pequenos, alta densidade de carga positiva, não contém pares de elétrons desemparelhados em sua camada de valência) preferem ligar-se com bases duras (alta eletronegatividade, baixa polarizabilidade, difícil de oxidar). Enquanto ácidos moles preferem ligar-se às bases moles. Essa teoria aplica-se muito bem para explicar a estabilidade dos complexos de clorofila. Quando em moléculas saturadas o nitrogênio é uma base dura, nos sistemas insaturados das clorofilas a presença de uma intensa deslocalização eletrônica, permite suficiente polarizabilidade para que o nitrogênio

torne-se mole, mudando para a categoria intermediária. Por outro lado, o Mg^{2+} (pequeno, possui duas cargas positivas) é classificado como ácido duro. O complexo Mg^{2+} (ácido duro) e anel clorínico (base intermediária) é suficientemente estável para existir, porém outras metaloclorofilas cujos íons centrais são ácidos intermediários, como Cu^{2+} ou Zn^{2+} , formam complexos mais estáveis. Por isso o íon Mg^{2+} da clorofila é facilmente removido e dificilmente realocado (Dujardin, 2003), enquanto a remoção de íons como Zn^{2+} e Cu^{2+} (ácidos intermediários) é mais difícil.

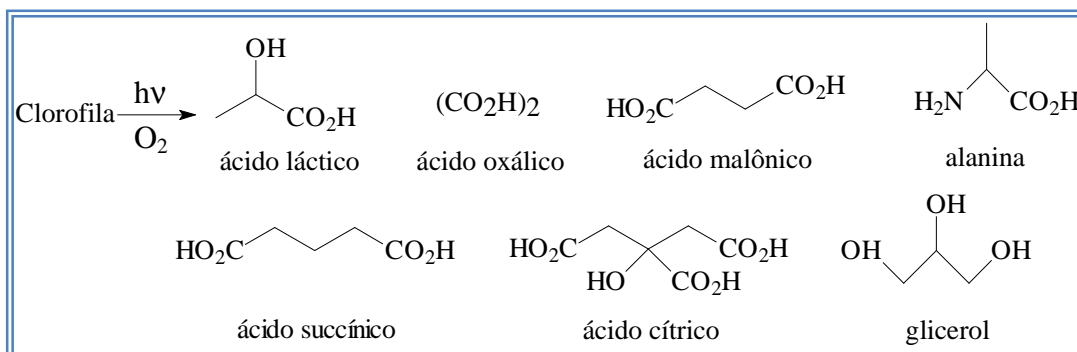
Em relação à estabilidade de metaloclorofilas outro fator importante a se considerar é o raio iônico do metal central. Para o Mg^{2+} o raio iônico é 0,65 Å, assim espera-se que outros íons de tamanhos similares caibam na cavidade clorínica e formem complexos estáveis. Por exemplo, o Zn^{2+} e o Cu^{2+} cujos tamanhos são 0,74 e 0,69 Å, respectivamente, podem ser inseridos no anel clorínico. A maior estabilidade das clorofilas de cobre seguida pelas clorofilas de zinco e magnésio mostra que a teoria ácido-base tem maior influência na estabilidade das metaloclorofilas do que o efeito do tamanho do íon (Dujardin, 2003).

Adicionalmente, a presença de íons metálicos complexados ao anel clorínico leva ao efeito do átomo pesado, que favorece o acoplamento spin-órbita. Esse acoplamento causa uma mistura de estados de diferentes multiplicidades de spin que possibilita a ocorrência de transições proibidas por spin. Além disso, o efeito do átomo pesado afeta as velocidades de CIS dos estados excitados singlete para triplete, e a relaxação do último para o estado fundamental singlete, levando a mudanças na dinâmica de decaimento e no rendimento de formação do estado triplete (Drzewiecka-Matuszek et al., 2005). A formação do estado triplete é fundamental para a formação do oxigênio singlete. Nesse contexto, complexos metálicos de clorofilas tornam-se altamente atrativas como FS de terceira geração (Drzewiecka-Matuszek et al., 2005).

A substituição do íon Mg^{2+} da clorofila por dois átomos de hidrogênio resulta na feofitina (Pheo), com caráter mais hidrofóbico do que seu precursor. Os átomos de hidrogênio ligados covalentemente aos nitrogênios do anel tetrapirrólico da Pheo são facilmente substituídos pelos íons Zn^{2+} e Cu^{2+} formando as metaloclorofilas, denominadas como clorofila de zinco (Zn-Chl) e de cobre (Cu-Chl), respectivamente. Esses compostos possuem alta estabilidade fotoquímica e em meio ácido quando comparadas a Mg-Chl (Limantara et al., 2006; Dujardin et al., 2003), principal forma encontrada na natureza. Derivados mais hidrofílicos das clorofilas são obtidos pela retirada da cadeia fitílica por hidrólise ácida controlada, obtendo-se o feoforbídeo (Pheid), que por sua vez pode ser metalado à clorofilida de zinco (Zn-Chld), por exemplo (estruturas na Figura 1A).

A Mg-Chl é conhecidamente instável na presença de ácido, agentes oxidantes e luz (Scheer, 2006). Nas células vegetais as clorofilas estão protegidas da destruição pela radiação durante a fotossíntese pelos carotenóides e outros lipídeos, proteínas e lipoproteínas que as rodeiam. Uma vez que se perde essa proteção, as clorofilas estão sujeitas à fotodegradação, na presença de luz e oxigênio essa reação é irreversível. A importância dos carotenos para a fotoestabilidade da clorofila é relacionada ao fato dos mesmos serem eficientes supressores de oxigênio singlete (Huie e Neta, 2002). A fotodegradação das clorofilas resulta na abertura do anel tetrapirrólico e a fragmentação em compostos de massa molecular menor. Tem-se sugerido que a degradação começa com a abertura do anel em uma das pontes metino para formar tetrapirróis lineares oxidados. Sabe-se que oxigênio singlete e radicais hidroxil são produzidos durante a exposição de clorofilas à luz na presença de oxigênio. Uma vez formados, o oxigênio singlete e os radicais hidroxilas reagem com os tetrapirróis formando peróxidos e mais radicais livres, os quais levam a destruição da estrutura porfirínica (Fennema, 2000). O

glicerol é o principal produto de fotodegradação das clorofilas e em quantidades menores têm-se ácido láctico, cítrico, succínico, malônico, alanina e metiletilmaleimida (Esquema 3). O glicerol e a alanina são formados pela clivagem do anel porfirínico, visto que podem ser também isolados da fotodecomposição da feofitina e do feoforbídio (sem a cadeia fitílica) (Bonnett e Martinez, 2001).



Esquema 3. Compostos/fragmentos formados na fotodecomposição da clorofila (Bonnett e Martinez, 2001).

As clorofilas possuem propriedades características, como alta absorção de luz no visível (incluindo a região do vermelho, 600 a 800 nm) e longo tempo de vida do estado excitado, que implica num alto rendimento quântico de oxigênio singlete (¹O₂). Essas propriedades, como já citado anteriormente, são apropriadas para a terapia fotodinâmica (Brandis et al., 2006). Por outro lado, o grande caráter hidrofóbico das moléculas de clorofila responsável pelo fenômeno de autoagregação em meio aquoso é um fator limitante de sua aplicação na técnica (Scheer, 2006).

2.4.1.1. O Espectro Eletrônico de Absorção de Porfirinas e Clorinas (Clorofilas)

As porfirinas possuem a característica de absorver luz na região do visível (Figura 4). As bandas observadas são resultantes das transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ no

anel porfirínico. A banda Soret na região do azul advém da transição $S_0 - S_2$, enquanto a banda Q na região do vermelho da transição $S_0 - S_1$ (Weiss, 1978).

Os espectros eletrônicos de absorção de porfirinas, no visível e UV próximo são explicados pela teoria dos quatro orbitais de fronteira, modelo de Gouterman (1961), no qual as bandas são originadas pelas transições $\pi-\pi^*$ entre os dois orbitais HOMO e os dois LUMO. Essas transições são polarizadas ao longo dos eixos x e y do anel porfirínico assimétrico. Das transições envolvidas, duas são x-polarizadas, e duas são y-polarizadas.

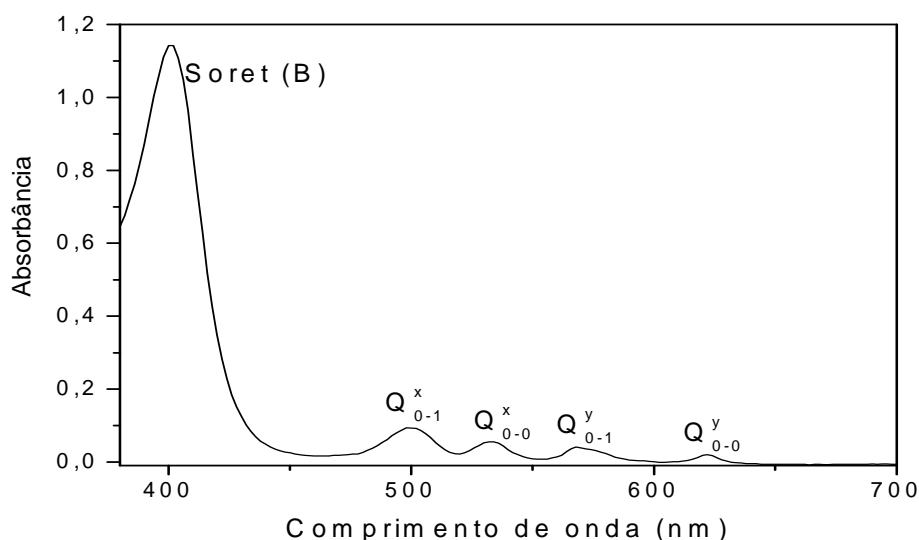


Figura 4. Aspecto geral do espectro de absorção de uma porfirina base livre em etanol.

A metalação das porfirinas base livre causa alterações radicais do comportamento em todos os níveis de energia, sendo essas alterações fortemente dependentes do metal a elas complexadas. Na maioria dos casos a estrutura porfirínica deixa de ser planar (dependendo do metal, ligante e do meio). Essa alteração estrutural se reflete na simetria da molécula, que passa de D_{2h} devido aos dois hidrogênios em posições opostas no centro do anel, para D_{4h} em que todos os átomos de nitrogênio são equivalentes. O processo de protonação dos nitrogênios não protonados causa as

mesmas alterações de simetria decorrentes da metalação. Essas alterações levam a reorientação dos orbitais moleculares da porfirina e são responsáveis pelas modificações observadas nos seus espectros de absorção e de emissão (Gurinovich, 1963).

As porfirinas base livre e desprotonadas possuem quatro bandas Q (Figura 4), enquanto para as porfirinas que sofrem alterações no centro do anel porfirínico, devido à metalação ou protonação, esse número é reduzido normalmente para duas. Todas as bandas Q são referentes às transições do estado fundamental para dois níveis vibracionais (0,0) e (0,1) do estado excitado S_1 . A alteração do número de bandas Q no caso das porfirinas base livre resulta da diminuição da simetria destas moléculas, indicada anteriormente, e que irá originar um desdobramento destas transições segundo duas direções de polarização. Assim, as bandas I, II, III e IV correspondem as designações $Q_{y,0-0}$, $Q_{y,0-1}$, $Q_{x,0-0}$, $Q_{x,0-1}$, respectivamente (Gurinovich, 1963). No diagrama da Figura 5 são apresentados os diversos níveis energéticos das moléculas de porfirina com simetrias D_{4h} e D_{2h} .

A redução do anel porfirínico com formação de clorinas altera as energias dos orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas. A interação das configurações não produz desdobramentos exatamente degenerados dos dois pares, um permitido e outro altamente proibido. Dos quatro estados resultantes dois são fortemente permitidos, referentes à banda Soret. Dos outros dois, o de energia menor (Q_y) é fracamente permitido, sendo muito mais permitido que a banda Q_y de porfirinas, praticamente proibidas por paridade, enquanto o de energia maior (Q_x) é quase proibido devido à similaridade que cancela os estados da porfirina. O eixo y é perpendicular à ligação reduzida e então tem caminho de conjugação maior. Para as clorofilas o comprimento de onda de máxima absorção da banda Q_y apresenta um deslocamento para o vermelho devido ao aumento do sistema conjugado ao longo do eixo y, estendido

na direção do substituinte $\text{CH}_2=\text{CH}-$ na posição 3 e carbonil na posição 13 do anel tetrapirrólico (Bjorn et al., 2009).

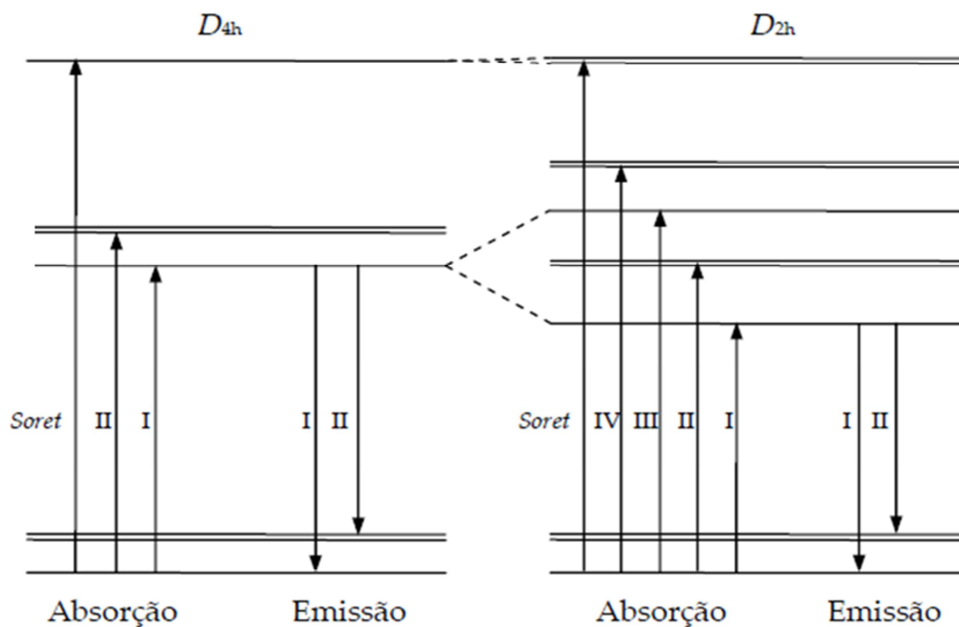


Figura 5. Diagrama dos níveis energéticos das moléculas de porfirina (Gurinovich, 1963).

A interpretação do espectro de absorção eletrônica das clorofilas tem sido explicada principalmente pelo modelo de Gouterman, 1961. Contudo, estudos teóricos mostraram que a interpretação do espectro das clorofilas requer modelos mais sofisticados considerando a presença do metal e o efeito vibracional do anel (Sundholm, 1999). Esses estudos mostraram que a clorofila *a* e a feofitina *a* possuem mais de 20 estados excitados diferentes e a presença de cadeia fitílica tem pequena influência nos espectros de absorção. A banda Soret é composta de mais de 10 transições eletrônicas com diferentes orientações e tamanhos dos momentos de dipolo (Eichwurz et al., 2000). Adicionalmente os espectros de absorção da clorofila e da feofitina foram similares e a diferença observada origina-se principalmente das diferenças na força do oscilador em relação às diferenças nas energias de transição (Sundholm, 2000).

Para a feofitina e o feoforbídeo a presença do anel isocíclico, a redução de um dos anéis pirrólicos e diferentes substituintes ligados ao macrociclo fazem que a molécula tenha baixa simetria molecular (C_{2v}). A simetria C_{2v} destes é responsável pela separação das duas bandas Q em quatro bandas (Eichwurz et al., 2000). Para a clorofila, a otimização geométrica da estrutura molecular resulta em um sistema distorcido e não planar como forma estável da estrutura clorínica diminuindo a simetria molecular para C_1 (Erkoç e Erkoç, 2002). Como resultado as atribuições do espectro total são incertas (Lin et al., 1996).

Adicionalmente, as energias das bandas de absorção das clorofilas são dependentes da eletronegatividade do metal central. Isso porque o nível de energia das transições eletrônicas é determinado pelas interações eletrostáticas entre as densidades eletrônicas dos nitrogênios centrais e do metal central. Assim o efeito do metal central é relacionado com sua eletronegatividade. A presença do Zn^{2+} (eletronegatividade = 2,3) causa um deslocamento para o azul no espectro de absorção em relação ao Mg^{2+} (eletronegatividade = 1,7) (Drzewiecka-Matuszek et al., 2005).

A absorção e emissão de porfirinas e clorinas são pouco dependentes do meio em relação à forma do espectro e aos comprimentos de onda de seus máximos devido ao baixo momento dipolar dessas moléculas. As porfirinas e clorinas metaladas são exceções a esse fato, devido à coordenação axial de moléculas de solvente ao átomo central (Ballschmiter e Katz, 1969). Já para as porfirinas e clorinas base livre, mesmo sendo seus espectros pouco dependentes do solvente, observam-se grandes alterações dependendo das condições de acidez/basicidade do meio. Como discutido anteriormente, com a protonação dos dois átomos de nitrogênio ocorre alterações nos espectros de absorção e nos de emissão de luz, com desvios consideráveis da banda Soret e alteração do número de bandas Q fazendo com que o seu espectro se assemelhe

ao de porfirinas metaladas. Essas alterações são resultantes do fato de que os nitrogênios protonáveis localizam-se no centro do anel conjugado, perturbando a nuvem eletrônica π conjugada do anel com alterações na sua simetria.

2.5. Luz em TFD

O sucesso da TFD é altamente dependente de fatores relacionados à luz utilizada na ativação do FS, dentre os quais se tem o comprimento de onda de fotoativação, a dose de luz aplicada no sítio alvo, a intensidade da luz, e o tempo de espera entre a injeção do fármaco e a iluminação (Kennedy, 2006).

Os fótons da radiação aplicada devem ser eficientemente absorvidos pelas moléculas de FS, contudo, algumas radiações têm comprimentos de onda cujos fótons são absorvidos pelo sangue ou outros pigmentos do corpo, ou são espalhados por células ou materiais particulados, fato que diminui a penetração em tecidos biológicos. Fótons na região do visível de baixa energia, ou seja, de comprimentos de onda maiores (vermelho do espectro eletromagnético) são os mais efetivos para essa penetração, enquanto as radiações de comprimentos de onda menores apresentam baixas penetrações. A luz azul, por exemplo, é efetiva somente para tratamento de lesões superficiais (Krammer et al., 2006).

Em relação à dose de luz aplicada deve-se atentar a alguns aspectos; quando a intensidade é baixa as células danificadas podem ser regeneradas durante o processo. Por outro lado, com a utilização de doses elevadas de luz a concentração de oxigênio começa a ser limitante, pois a reposição deste por circulação e difusão no tecido é restrita. Assim a eficácia da terapia pode ter uma diminuição progressiva (Dolmans et al., 2003), uma vez que a velocidade de reposição do oxigênio não acompanha a sua

taxa de consumo. Para contornar esse problema utiliza-se de alguns artifícios como a aplicação controlada de radiação em pulsos com intervalos no escuro. Além do que doses elevadas de luz podem levar ao aquecimento do tecido, principalmente a vermelha. Porém um ligeiro aquecimento deve ser benéfico devido à dilatação de artérias aumentando o fluxo de sangue e conseqüentemente o teor de oxigênio local. Adicionalmente, alguns compostos são fotobranqueados muito rapidamente durante o tratamento, processo potencializado por alta intensidade de radiação (Zhu e Finlay, 2006).

Várias fontes de luz podem ser utilizadas na fotossensibilização de fármacos em TFD, por exemplo, luz pulsada, luzes incoerentes (projektor de slides), lâmpada de xenônio, entre outras, todas com filtros específicos que permitem selecionar o comprimento de onda de maior penetração nos tecidos e de absorção máxima do fármaco. No tratamento que envolve a TFD, a radiação utilizada geralmente é fornecida por um sistema LASER que é direcionada ao local do tratamento através de fibras óticas. Uma variedade de LASER pode ser utilizada dependendo da característica e da fase em que se encontra a lesão, sendo usualmente três tipos os usados na TFD: Nd YAG (neodymium yttrium-aluminiumgarnet), argônio, e o LASER de diodo, sendo este mais barato e fornece luz de potência considerável com precisão sobre o tecido a ser irradiado; em 2000 foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA/EUA) o uso deste para a ativação do Photofrin[®] visando aplicação em lesões malignas no esôfago e pulmão (Mang, 2004).

O desenvolvimento do LASER de diodo fez com que o custo de aparelhagem fosse diminuído, mas ainda assim é alto inviabilizando a maior difusão da técnica, principalmente em países em desenvolvimento. Uma alternativa possível é o uso do LED, *diodo emissor de luz* (Mang, 2004), dispositivo de luz policromática. As fontes à

base de LED, apesar de apresentarem potência muito inferior ao LASER, são muito mais baratas, podendo em muitos casos serem utilizados conjuntos de LEDs para tratamento de lesões grandes na superfície corpórea.

2.6. Oxigênio Singlete

O oxigênio molecular no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais antiligantes duplamente degenerados, π_x^* e π_y^* . Esses elétrons possuem o mesmo spin, resultando em uma multiplicidade máxima, e assim o estado de mais baixa energia do oxigênio (estado fundamental) é o tripleto, cujo termo espectroscópico é $^3\Sigma_g$. O estado excitado do oxigênio que possui todos os elétrons da camada de valência emparelhados é o oxigênio singlete. A representação da distribuição eletrônica nos orbitais antiligantes para o oxigênio molecular e os estados excitados singlete é apresentada na Tabela 1 (Machado, 2000; Kearns, 1971).

Tabela 1. Ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio.

Estado	Orbital molecular antiligante	Energia*, kJ mol ⁻¹
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow]\pi_x^* [\uparrow]\pi_y^*$	0
$^1\Delta_x$	$[\uparrow\downarrow]\pi_x^* []\pi_y^*$	92,4
$^1\Delta_y$	$[]\pi_x^* [\uparrow\downarrow]\pi_y^*$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow]\pi_x^* [\downarrow]\pi_y^*$	159,6

* Relativa ao estado fundamental

O oxigênio singlete possui duas formas com simetrias distintas, uma de menor energia $^1\Delta_g$, duplamente degenerada ($^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$; 92,4 kJ mol⁻¹), e outra de energia mais alta ($^1\Sigma$; 159,6 kJ mol⁻¹). Este último estado excitado do oxigênio possui tempo de vida curto, uma vez que a transição para o estado $^1\Delta_g$ é permitida por spin. A simetria diferente da espécie $^1\Delta_g$ em relação ao estado fundamental e a proibição por spin da transição $^1\Delta_g - ^3\Sigma_g$ garantem à espécie $^1\Delta_g$ tempo de vida elevado, tempo suficiente para permitir a oxidação de moléculas orgânicas (DeRosa e Crutchley, 2002). O tempo de vida (τ) do oxigênio singlete é altamente dependente do ambiente e em solução varia com a natureza do solvente. Em água τ está em torno de 4 μ s, já em água deuterada está ao redor de 70 μ s. Para solventes que não possuem ligações C-H e grupos hidroxila os valores são maiores, como exemplo, em tetracloreto de carbono o tempo de vida do oxigênio singlete está ao redor de 30 ms, e de 250 μ s em clorofórmio. Por outro lado, em sistemas biológicos, o oxigênio singlete apresenta tempos de vida extremamente baixos, inferiores a 0,04 μ s (Ochsner, 1997), o que reduz o raio de ação da espécie para aproximadamente 0,02 μ m (Dougherty et al., 1998). A supressão do oxigênio singlete por certos grupos funcionais ou átomos é associada à possibilidade de transferência de energia entre os níveis vibracionais das espécies envolvidas (Machado, 2000).

Os substratos, cuja maioria é encontrada como singlete no estado fundamental, normalmente não reagem com o oxigênio triplete devido à proibição por spin, entretanto para o oxigênio singlete essa restrição é rompida, propiciando-lhe grande reatividade. Além do que o orbital molecular vazio no estado $^1\Delta_g$ aumenta o caráter eletrofílico do oxigênio, potencializando seu poder oxidante, principalmente frente a substratos com sítios de alta densidade eletrônica, como duplas ligações presentes em lipídeos insaturados, proteínas e ácidos nucleicos (DeRosa e Crutchley, 2002; Ryter e Tyrrell, 1998). O oxigênio singlete tem efeito de deterioração do corpo humano, por exemplo,

ele está envolvido nos danos causados à pele por exposição ao sol. A grande reatividade dessa forma de oxigênio é um fator primordial para TFD, resultando na morte de células no tratamento de tumores ou outras patologias.

Dentre os inúmeros métodos utilizados para determinação de oxigênio singlete tem-se a quantificação direta da fosforescência deste em 1270 nm, metodologia resolvida no tempo. Embora a intensidade de fosforescência seja muito pequena na maioria dos solventes, a utilização de detectores de alta sensibilidade, algumas vezes resfriados a 77 K, possibilita a determinação de τ com precisão através de seu decaimento. A geração de $^1\text{O}_2$ também pode ser detectada indiretamente pelo decaimento do estado triplete do β -caroteno. Contudo, essas medidas exigem equipamentos altamente sofisticados e caros que dificultam o uso da técnica (Wilkinson et al., 1993).

Medidas no estado estacionário têm sido amplamente utilizadas como métodos alternativos pela oxidação de substratos específicos (sensor químico), que reagem prontamente com o oxigênio singlete. A análise quantitativa dessas reações de foto-oxidação é monitorada pela variação da concentração do sensor e relacionada à quantidade formada de oxigênio singlete.

2.7. Micelas e lipossomos na Formulação de Fármacos

Sistemas lipossomais e de micelas poliméricas tem sido extensamente aplicados na indústria, particularmente na farmacêutica para a formulação de fármacos. Atualmente, o estudo da associação de moléculas de atividade farmacológica com membranas tem encontrado sua principal aplicação no planejamento racional de medicamentos, e nos sistemas carregadores/liberadores, por exemplo, através do

encapsulamento de vetores transportadores de fármacos, específicos para liberação controlada nas regiões (tecidos e órgãos) a serem tratadas (Kwon, 2005).

O uso de surfactantes é conhecidamente efetivo na estabilização de moléculas hidrofóbicas em meio aquoso, tais como fotossensibilizadores mantidos na forma de monômeros. Para aplicações clínicas/farmacêuticas é interessante utilizar surfactantes poliméricos não-iônicos, como os polímeros em bloco do tipo oxi-alquílicos. Em relação ao último, tem-se especial interesse nos tribloco da classe dos Pluronic, devido às suas baixas toxicidades comparadas aos surfactantes convencionais. Assim micelas poliméricas e lipossomos têm sido extensamente estudados como sistema de liberação de fármacos anticâncer, no qual a localização e a interação fármaco/micela são de importância fundamental (Liu et al., 2008).

2.7.1. Micelas Poliméricas

As micelas poliméricas de Pluronic constituídas por copolímeros em três blocos possuem grupos poli(óxido de propileno) (PPO) na parte interna mais hidrofóbica (core) e poli(óxido de etileno) nas extremidades mais hidrofílicas (corona) (Figura 6) (Riess, 2003). Essas micelas possuem ampla aplicabilidade na solubilização de moléculas lipofílicas ligadas covalentemente ao bloco hidrofóbico das micelas formadas, ou os substratos são mantidos na micela por interações hidrofóbicas e de van der Waals. O balanço de hidrofobicidade das micelas poliméricas é controlado pela combinação da quantidade de monômeros hidrofílicos (EO) e hidrofóbicos (PO), resultando em grande versatilidade desses compostos devido ao número de copolímeros comercialmente disponíveis para usos distintos em diferentes áreas, que incluem a solubilização de fármacos e a liberação controlada (Kabanov e Zhu, 2005).

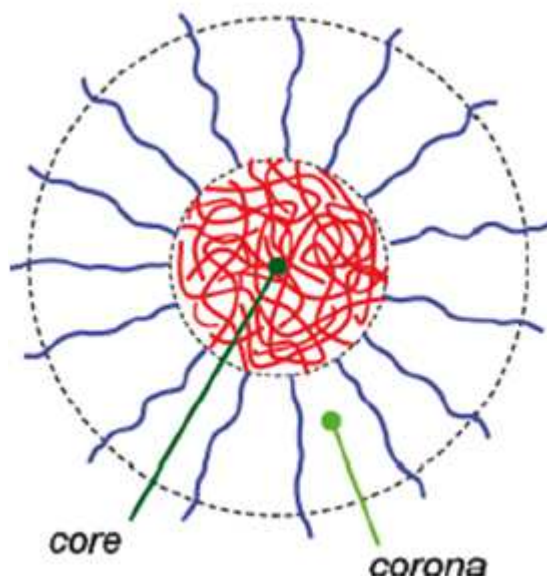


Figura 6. Representação esquemática de uma micela esférica de copolímeros em bloco (Pluronic[®]).

Em ambientes aquosos as micelas poliméricas são compostas por uma camada interna, constituída principalmente pelos blocos hidrofóbicos dos copolímeros contendo algumas moléculas de água (Liu, 2008), estabilizados pela camada externa de blocos hidrofílicos hidratados. A micelização é governada por duas forças opostas de atração e repulsão. As forças hidrofóbicas favorecem a expulsão das cadeias hidrofóbicas do ambiente aquoso, com a formação de uma região interna hidrofóbica que constitui o core da micela, enquanto os grupos polares voltam-se para o meio aquoso a partir do core e formam a coroa. A força de repulsão entre as cadeias hidrofílicas limita a autoassociação dos copolímeros para agregados relativamente pequenos. Assim, a principal força dirigente para micelização em ambiente aquoso é a interação efetiva entre as partes hidrofóbicas das moléculas de surfactantes, enquanto as interações repulsivas são as forças opostas a micelização. Por exemplo, o aumento da porção hidrofóbica favorece a micelização pelo aumento das interações hidrofóbicas e diminui a concentração micelar crítica (CMC). Por outro lado, o aumento de grupos polares em

surfactantes não-iônicos aumenta a repulsão osmótica entre as cadeias polares vizinhas e tende a distribuí-las nos agregados micelares, resultando em micelas menores e mais esféricas. O número de unidades EO tem pequeno efeito na CMC dos copolímeros (Liu et al., 2008). Assim, as forças que dirigem a micelização envolve um balanço delicado entre essas forças atrativas e repulsivas, e são afetadas por fatores como tamanho da região hidrofóbica, natureza do grupo polar, co-solutos (compostos hidrofóbicos – favorecem a micelização, sal, álcool, etc.), pH e temperatura (Biswas et al., 2013).

A micelização é termodinamicamente favorável em água, pois diminui a energia livre do sistema devido à remoção dos fragmentos hidrofóbicos do meio aquoso com a formação do agregado micelar (Biswas et al., 2013).

Dentre os fatores que afetam a micelização, e conseqüentemente sua capacidade de solubilização, tem-se a concentração de surfactante e a temperatura (Figura 7). A uma dada temperatura, a micelização de copolímeros em solução aquosa depende de sua concentração. Portanto, a aplicação de micelas poliméricas como sistema carreador leva a questão fundamental sobre sua estabilidade durante a dissolução pelos fluidos do corpo. A CMC pode servir como parâmetro termodinâmico para caracterizar a estabilidade das micelas durante a dissolução (Biswas et al., 2013, Liu, 2008).

A temperatura pode afetar a CMC bem como outros parâmetros termodinâmicos como o número de agregação e o tamanho da micela. Com o aumento da temperatura a CMC diminui e a fração de moléculas poliméricas na forma micelar aumenta, assim como o número de agregação médio e o raio hidrodinâmico da micela (tamanho). Isso porque o aumento da temperatura diminui a solubilidade do copolímero pelo aumento da hidrofobicidade dos blocos PO (principal fator) e diminui a repulsão dos grupos polares, favorecendo a micelização (Biswas et al., 2013).

A temperatura acima da qual se tem a formação de micelas é denominada temperatura micelar crítica (TMC) (Figura 7). Abaixo da TMC, ambos os blocos PO e EO são hidratados e dissolvidos em solução, o copolímero existe como unímero (Shiraishi et al., 2010). Em temperaturas maiores do que a TMC a desidratação dos blocos PO diminui a solubilidade e promove a agregação dos blocos, enquanto os grupos EO mantêm-se solúveis, favorecendo a micelização; nesse caso as micelas formadas coexistem com os unímeros. Isto resulta em micelas cujos núcleos são dominados por blocos PO desidratados e as coronas dominadas por blocos EO hidratados (Biswas et al., 2013).

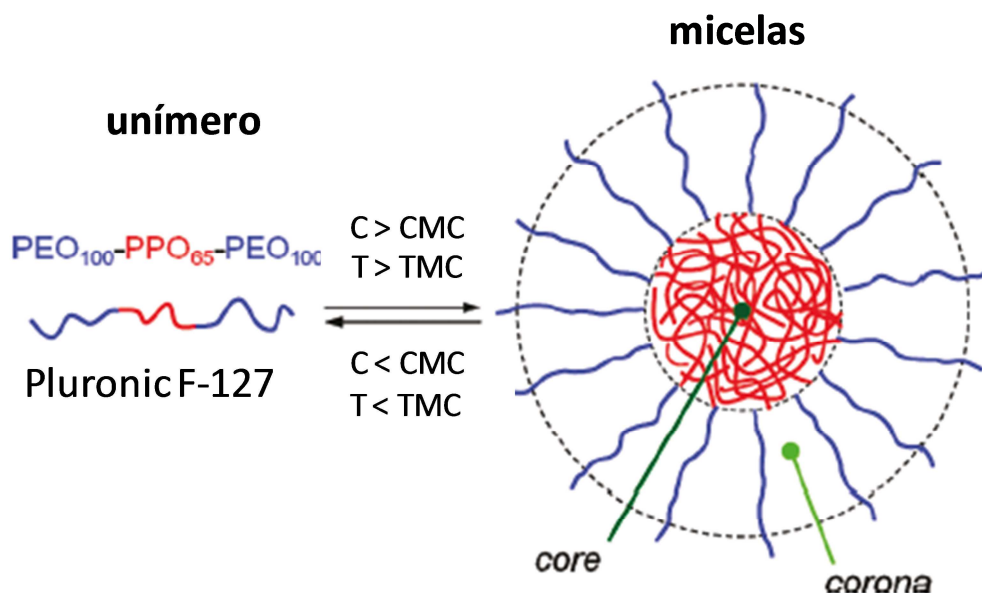


Figura 7. Mudança estrutural de unímero para micela esférica para o copolímero F-127 (Shiraishi et al., 2010).

Os valores de TMC são altamente dependentes da concentração do copolímero. O aumento da concentração diminui a TMC e favorece a formação de micelas grandes com elevado número de agregação. Além disso, os valores de TMC para as micelas poliméricas (em uma concentração de copolímero) diminuem com o aumento do número de segmentos PO, indicando que os copolímeros com maior domínio

hidrofóbico formam micelas em menores temperaturas (a micelização é favorável) (Liu et al., 2008).

A solubilidade aquosa desses copolímeros é atribuída às ligações hidrogênio entre os oxigênios éter das cadeias de PEO e moléculas de água. Quando a temperatura é aumentada, estas ligações hidrogênio são quebradas e a hidrofobicidade dos grupos PEO é reduzida, tornando o surfactante menos solúvel e assim a micelização ocorre em menor concentração. Assim o aumento do tamanho da micela com a elevação da temperatura pode ser explicado em parte pelo aumento da hidrofobicidade do monômero e considerações geométricas. Isto sugere que a solubilização do soluto pode ocorrer em menor concentração de surfactante, e a capacidade de solubilização aumenta com a diminuição da CMC causada pelo aumento da temperatura. Em geral, o aumento da temperatura aumenta a capacidade de solubilização micelar para o soluto devido ao aumento do número de agregação em altas temperaturas levando a formação de micelas grandes, capazes de incorporar mais moléculas (Liu et al., 2008)..

Além disso, em micelas poliméricas pode haver a formação de agregados micelares acima da LCST (Lower Critical Solution Temperature). Abaixo da LCST as micelas formadas são estáveis e relativamente pequenas; com a elevação da temperatura acima da LCST tem-se o aumento do tamanho do agregado micelar. Isso porque a camada externa das micelas torna-se mais hidrofóbica, acarretando na associação hidrofóbica intermicelar. Esse processo pode ser revertido com o abaixamento da temperatura abaixo da LCST (Liu et al., 2005).

Além disso, estudos de micropolaridade do meio utilizando pireno como sonda fluorescente mostraram que em temperaturas abaixo da LCST, o microambiente é pouco polar, devido à localização do pireno na parte interna da micela (hidrofóbica). Aumentando a temperatura acima da LCST, o pireno é exposto a um ambiente mais

polar. Isso porque em temperaturas acima da LCST, a camada hidrofílica das micelas torna-se mais hidrofóbica, induzindo a deformação da estrutura da micela. Esta deformação possibilita a exposição do pireno à fase aquosa externa, aumentando a polaridade do microambiente. A reversibilidade da mudança de microambiente do pireno em função da T foi examinada diminuindo a temperatura e retornou ao nível inicial abaixo da LCST. Este fato indica que a camada externa da micela torna-se hidratada e a estrutura micelar é reformada (Liu et al., 2005).

Os microambientes das micelas poliméricas possuem propriedades (como polaridade e viscosidade) específicas em cada região e dependentes de fatores como a concentração do copolímero e temperatura. Por exemplo, estudos da literatura reportaram que a polaridade do core das micelas de F-127 é similar à do etanol, enquanto a polaridade da camada externa é maior do que a da camada interna (Pandit et al., 2000; Grant et al., 2005). Além disso, a micropolaridade da corona torna-se menor em direção ao centro da micela (Caragheorgheopol et al., 1997). A polaridade das micelas poliméricas é menor do que a da solução. Com o aumento da temperatura acima da TMC a polaridade dos microambientes diminui pela desidratação dos blocos EO e PO. Em altas concentrações de copolímero, o aumento da razão PEO/moléculas de água acarreta na diminuição das micropolaridades (Shiraishi et al., 2010).

A microviscosidade dos diferentes ambientes é outra propriedade importante para as micelas poliméricas, ainda que a formação de micela não altere a viscosidade da solução. Estudos mostraram que a viscosidade do core e da corona é maior do que da solução (Nivaggioli et al., 1995) e a viscosidade da corona é menor do que a do core (Dutt, 2005; Grant et al., 2005b). A viscosidade do core depende do número de blocos PO e independe da quantidade de grupos EO. A viscosidade da região interna da corona é maior do que a da parte externa. Isso porque as cadeias de PEO tornam-se mais densas

em direção ao centro da micela, fazendo com que o movimento rotacional das moléculas localizadas na parte interna da corona seja reprimido mais significativamente devido às cadeias de PEO estar condensadas (altamente viscosas). Com o aumento da temperatura acima da TMC a viscosidade do core e da corona aumenta atingindo um máximo. Em temperaturas elevadas a microviscosidade diminui devido ao aumento da fluidez induzido pelo calor aumentando a mobilidade das cadeias poliméricas e das moléculas de água (Shiraishi et al., 2010).

Com o aumento da concentração do copolímero a viscosidade do core aumenta devido ao maior número de agregação. A concentração de copolímero também afeta a viscosidade da corona. Em altas concentrações de copolímero os blocos EO tornam-se condensados, o que aumenta a viscosidade da corona. Além disso, essa condensação das cadeias PEO faz que parte interna da corona torne-se mais viscosa do que a região periférica (Shiraishi et al., 2010).

Em relação à estrutura os agregados dos copolímeros em bloco podem assumir uma variedade de formas como esferas, cilindros e bicamadas, incluindo vesículas (Nagarajan, 2003). Cálculos mostram que agregados lamelares são favorecidos quando a razão de PEO/PPO é pequena, enquanto micelas esféricas são favorecidas quando a razão PEO/PPO é grande. Tipicamente, para copolímeros em bloco contendo pelo menos 40 % de PEO, somente agregados esféricos são formados em água a 25 °C. Para copolímeros em bloco contendo 30% de PEO, agregados cilíndricos são possíveis. Enquanto, copolímeros em bloco menos de 20 % de PEO geram lamelas. Isto é análogo ao comportamento de moléculas pequenas onde a redução na repulsão no grupo cabeça pode causar uma transição de micelas esféricas para micelas bastonetes e então para bicamadas (Nagarajan, 2003).

Os pluronics possuem muitas propriedades de interesse para carregadores de fármacos (Yokoyama, 2005). Dentre as vantagens dessa classe de surfactantes têm-se:

- Tamanho pequeno (10 a 100 nm), que possibilita escapar do sistema de excreção, aumentando o tempo de circulação na corrente sanguínea. O tamanho das micelas poliméricas também facilita o processo de esterilização com a utilização de filtros estéreis.

- Alta estabilidade estrutural – estática e dinâmica *in vitro* e *in vivo*. A estabilidade termodinâmica é relacionada aos baixos valores de concentração micelar crítica. Mesmo em situações abaixo da CMC, ao efetuar-se diluição, as micelas são mantidas por determinados períodos de tempo devido à sua velocidade de dissolução lenta. A estabilização de fármacos em ambiente coloidal mesmo abaixo da CMC é importante do ponto prático devido à diluição para um grande volume de sangue, evitando a precipitação do fármaco na corrente sanguínea, ao menos em curtos intervalos de tempo.

- Alta solubilidade em água, solvente mais comumente empregado em formulações de medicamentos.

- Baixa toxicidade, comparativamente a micelas iônicas.

- Funcionalidades distintas atribuídas à presença de duas camadas (interna e externa), cada uma apresentando funções diferentes na liberação de fármacos. A camada externa é responsável pela interação com biocomponentes, ou seja, biodistribuição e farmacocinética, enquanto a camada interna atua na atividade farmacológica. As propriedades de ambas as fases são livremente e independentemente controladas pela seleção da cadeia polimérica.

- Habilidade para evitar adsorção de proteínas como as imunoglobulinas e habilidade para prevenir adsorção sobre a superfície dos fagócitos, o que também aumenta o tempo de circulação no organismo (Liu et al., 2008).
- Solubilização de grande variedade de agentes farmacêuticos pouco solúveis, que se acumulam eficientemente em áreas do corpo com vasculatura comprometida (infartos e tumores), e podem ser vetorizadas por adição de ligantes específicos em sua superfície (Kwon, 2005).

A localização da molécula solubilizada na micela é dependente das propriedades do fármaco, como seu balanço hidrofóbico/hidrofílico, que influencia a permeabilidade na membrana e assim a absorção e distribuição. Os fármacos podem ser localizados em diferentes compartimentos micelares, apresentando variação de afinidade ao associar-se com a micela. As moléculas mais lipofílicas localizam-se preferencialmente na parte interna da micela. Outra propriedade importante na solubilização de um fármaco em micelas é o volume molar da espécie solubilizada, uma vez que o tamanho do composto dificulta a solubilização. Em relação à estrutura do copolímero na estabilização de fármacos hidrofóbicos tem-se que um aumento de blocos hidrofóbicos e massa molar da micela favorecem a capacidade de solubilização (Torchilin, 2001).

Adicionalmente, a incorporação de fármacos que possuem grupos ácido-base em micelas poliméricas é dependente do pH, uma vez que o grau de protonação das moléculas fotoativas determina a carga eletrostática da mesma e influencia diretamente na sua incorporação na micela bem como a velocidade e quantidade de fármaco liberado nos sítios alvo (Tong e Wen, 2008).

A eficiência de encapsulação de fármacos em micelas poliméricas é afetada por vários parâmetros, incluindo temperatura de preparação, concentração de polímero e

concentração de fármaco inicial. Alta concentração de polímero leva a grande eficiência de encapsulação, contudo o tamanho da micela é aumentado (Liu et al., 2005).

2.7.2. Lipossomos

Os lipossomos foram descobertos por Alec Bangham em 1961. Ao dispersar fosfolipídios em meio aquoso Alec observou a formação de estruturas tipo células em microscópio (Hoogevest et al., 2013). Os fosfolipídios se estruturam em bicamadas espontaneamente em meio aquoso, de maneira que as cadeias hidrofóbicas são protegidas da água pelas cabeças polares formando os lipossomos, que são vesículas esféricas de dimensões coloidais, nas quais as bicamadas fosfolipídicas armazenam no centro uma cavidade aquosa (Liu et al., 2008b).

A força motriz por trás da formação de lipossomos é a interação hidrofílica entre a cabeça polar dos fosfolipídios, que tem caráter anfifílico, e a água. Por um lado, as cadeias hidrocarbônicas hidrofóbicas preferem interagir com outras cadeias lipídicas pelas interações hidrofóbicas, fugindo do meio aquoso. Esta interação hidrofóbica leva a grande diminuição do potencial químico dos lipídios ao sair de um ambiente aquoso para a fase lipídica. A grande variação de energia livre explica a preferência de fosfolipídios para formar bicamadas (Liu et al., 2008b).

O tamanho da vesícula é um parâmetro determinante para o tempo de circulação dos lipossomos. Baseado no número de membranas por lipossomo e seu tamanho médio, os lipossomos são classificados como Vesículas Unilamelares Pequenas (SUVs) (tamanho c.a. 15-100 nm), Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs) (tamanho c.a. 100-1000 nm), e Vesículas Multilamelares (MLV) (tamanho c.a. 1-5 μm) (Figura 8). Em lipossomos unilamelares, a vesícula tem uma única bicamada lipídica esférica ao redor

do núcleo aquoso. Em lipossomos multilamelares, as vesículas têm uma estrutura de cebola. Nesse caso, formam-se vesículas de tamanho menor no interior de outra vesícula de tamanho maior, obtendo-se uma estrutura multilamelar de fosfolipídios, de esferas concêntricas separadas por camadas de água (Hoogevest et al., 2013).

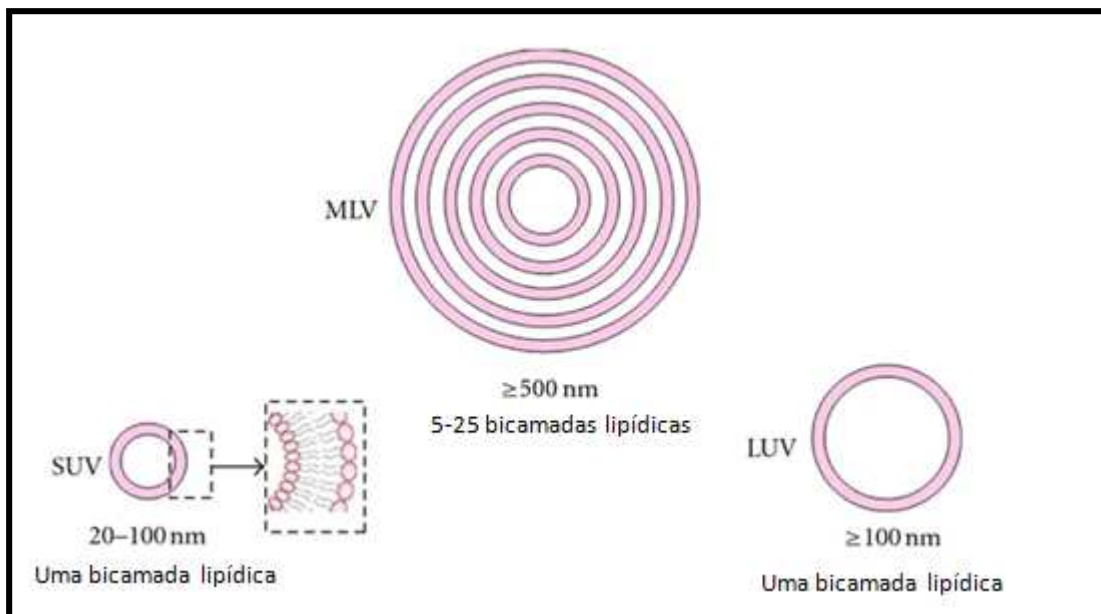


Figura 8. Esquemática dos diferentes tipos de lipossomos. Vesículas unilamelares pequenas (SUVs), Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs), e Vesículas Multilamelares (MLV) (Periyasamy et al., 2012).

Inicialmente, os lipossomos foram estudados principalmente como sistema modelo de membranas biológicas, devido à estrutura da bicamada fosfolipídica do lipossomo ser muito parecida com a estrutura da bicamada fosfolipídica das membranas celulares. Posteriormente, os lipossomos passaram a ser usados em sistemas de liberação. Devido a sua composição físico-química os lipossomos podem carrear compostos solúveis em água em sua fase aquosa interna e compostos lipofílicos nos domínios de ácidos graxos da membrana lipossomal e moléculas anfifílicas na interface hidrofílica-lipídica (Hoogevest et al., 2013; Torchilin, 2005). Além disso, os lipossomos

possuem muitas características biológicas especiais, incluindo interações específicas com membranas biológicas e várias células (Lasic, 1998; Akbarzadeh et al., 2013).

Os métodos de preparação dos lipossomos envolvem as etapas de remoção do solvente orgânico do lipídeo e dispersão do lipídeo em meio aquoso. Para a incorporação de fármacos em lipossomos têm-se duas alternativas: passiva e ativa. Na incorporação passiva o fármaco é encapsulado durante a formação do lipossomo, enquanto na ativa a incorporação é realizada após a formação do lipossomo. Por exemplo, fármacos hidrofóbicos podem ser incorporados diretamente dentro do lipossomo durante a formação da vesícula, e a quantidade de ligação e retenção é governada pela interação fármaco-lipídeo. Frequentemente, obtém-se uma eficiência de incorporação de 100%, contudo essa eficiência é dependente da solubilidade do fármaco na membrana do lipossomo. Na encapsulação passiva de fármacos solúveis em água a eficiência de incorporação depende do volume de fase aquosa (contendo o fármaco dissolvido) presa no núcleo da vesícula e da solubilidade do fármaco; nesta a eficiência de encapsulação normalmente é menor de 30%. Por outro lado, fármacos solúveis em água que tem funções aminas ionizáveis podem ser eficientemente incorporadas por gradiente de pH, resultando em eficiência de incorporação de aproximadamente 100% (Akbarzadeh et al.; 2013).

Os fosfolipídios são encontrados em todas as células vivas e constituem cerca de metade da massa das membranas plasmáticas de células animais. A capacidade dos fosfolipídios formarem bicamadas num ambiente aquoso possibilita a utilização dos mesmos na formação de vesículas endógenas para transporte de fármacos com menos efeitos adversos em pacientes em comparação com as moléculas sintéticas veiculares de fármacos (Liu et al., 2008 b).

Uma formulação lipossomal estável com um fármaco insolúvel em água é muitas vezes possível, sem precipitação por diluição, possibilitando a entrega de uma dose muito maior do que a solubilidade em água. Formulados lipossomais podem atingir os sítios de inflamação, infecção e neoplasia. Isto porque nesses sítios, a doença leva ao aumento dos espaços entre as células endoteliais que revestem os capilares locais. Assim, a encapsulação de fármacos em lipossomas resulta em um aumento dos níveis do fármaco nos locais alvos, quando comparado com as formulações convencionais. Essa ação sítio-específico reduz a toxicidade de medicamentos, sem perda das suas eficiências, e tem sido utilizada para melhorar os índices terapêuticos de várias classes de fármacos. Os lipossomos possuem outras vantagens como sistemas carreadores, dentre as quais, o aumento da estabilidade via encapsulação, são não-tóxicos, flexíveis, biocompatíveis, completamente biodegradáveis, não-imunogênicos e aumentam a penetração de fármacos em tecidos (Torchilin, 2005). Por outro lado, os lipossomos podem ser desvantajosos devido à baixa solubilidade, pequeno tempo de vida, alguns fosfolipídios sofrem oxidação e reações tipo hidrólise, possuem alto custo de produção e são pouco estáveis com perdas de lotes de fabricação (Akbarzadeh et al.; 2013).

Adicionalmente, a limitação e os benefícios dos lipossomos como carreadores dependem da interação do lipossomo com as células e seu destino após administração *in vivo*. Entre os mecanismos postulados pelos quais os lipossomas podem interagir com as células do sistema reticuloendotelial (RES), acredita-se que a adsorção, a endocitose, a troca de lipídio e a fusão são as mais importantes (Figura 9) (Liu et al., 2008 b).

No mecanismo de adsorção, os lipossomos podem ser adsorvidos na membrana de uma célula, em condições adequadas, por exemplo, por atração eletrostática (interação específica com componentes da superfície celular) ou por forças hidrofóbicas

(interações não específicas). Durante a adsorção de lipossomos em células, os fármacos encapsulados são lentamente liberados para o fluido extracelular, e algumas moléculas do fármaco podem penetrar através da membrana celular para dentro da célula. A endocitose (pela fagocitose celular do sistema reticuloendotelial) é um dos mais importantes entre todos os mecanismos propostos, mas apenas alguns tipos de células podem realizar esse mecanismo eficientemente. As células derivadas da medula óssea tais como os monócitos, macrófagos e outras células brancas do sangue, são eficientes no processo de endocitose de lipossomos. O terceiro tipo de interação de lipossomas com as células é a troca lipídica que envolve a transferência de moléculas de lipídios individuais dos lipossomas para a membrana plasmática da célula. Uma vez que as moléculas de fármacos lipofílicas são aprisionadas nas bicamadas lipídicas dos lipossomos, durante o processo de troca de lipídeo as moléculas de fármaco podem penetrar na célula. Troca de lipídios também pode ocorrer entre lipossomas e lipoproteínas circulantes e as moléculas de fármacos lipofílicos podem ser transferidos dos lipossomas para lipoproteínas. O último tipo de interação, muito raro, é a fusão, onde se tem a intercalação de membrana externa do lipossomo dentro da membrana celular, com simultânea liberação do conteúdo lipossomal dentro do citoplasma (Liu et al., 2008; Torchilin, 2005).

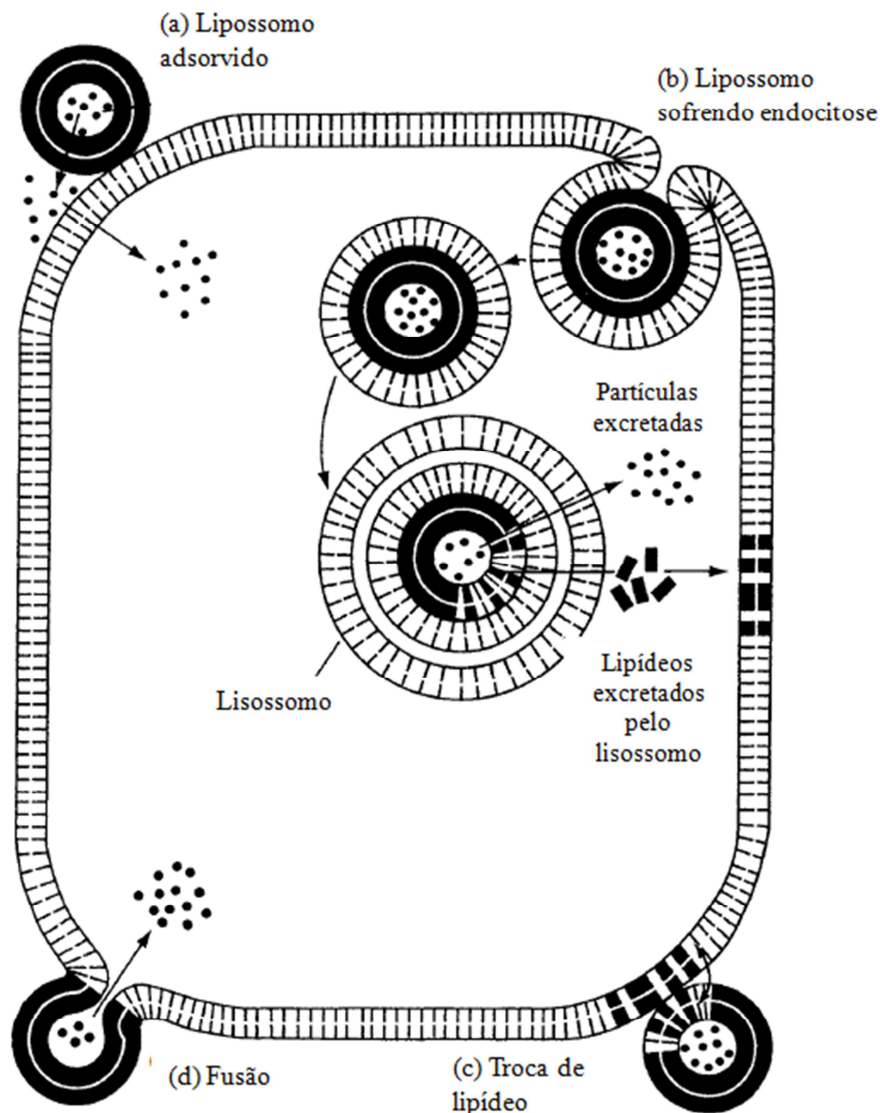


Figura 9. Esquema dos mecanismos de interação propostos de lipossomos com células: (a) adsorção, (b) endocitose, (c) troca de lipídeo, e (d) fusão (Liu et al., 2008 b).

2.8. Utilização de Sistemas Modelo na Mimetização de Membranas Biológicas

Ambientes micelares e lipossomais (Figura 10), constituídos por uma região interna hidrofóbica e uma externa hidrofílica em meio aquoso, são modelos razoáveis de ambientes celulares e fornecem informações úteis sobre as moléculas de FS frente a sistemas organizados, biomimetismo. Lipossomos são modelos mais adequados do

microambiente da parede celular. Neste tipo de sistema a localização e a interação dos FS com ambas as fases podem ser utilizadas como modelos para fusão e divisão celular, permeação em membranas, etc., devido à semelhança química entre os componentes dos sistemas. Dessa forma é interessante a realização desses estudos com sistemas biomimetizadores incluindo micelas que são modelos bastante simples da interface de membranas biológicas.

A localização do sítio de ligação do fármaco com micelas/membranas pode ser estimada *via* supressão de fluorescência, por exemplo. Essa técnica apresenta inúmeras aplicações em estudos bioquímicos, como determinação da acessibilidade de sondas a supressores solúveis em água e lipídeos para estimativa da localização em membranas, estimativa de coeficiente de difusão lateral e partição dentro das membranas. A supressão requer o contato molecular entre o fluoróforo e o supressor. Assim, quando o fluoróforo está ligado na região externa (mais hidrofílica) desses sistemas a utilização de um supressor solúvel em água permite o contato entre as espécies levando ao fenômeno de supressão de estados excitados, enquanto para os compostos ligados na parte interna necessita-se de supressores pouco solúveis em água (Lakowicz, 2006).

Estudos recentes com sistemas modelo têm mostrado que através da adsorção preferencial de sensibilizadores nos domínios micro-heterogêneos de micelas aquosas, reversas ou lipossomos unilamelares, os equilíbrios de estado fundamental podem ser deslocados, favorecendo ou desfavorecendo a formação de dímeros ou pares iônicos dos sensibilizadores, sendo possível também direcionar processos de sensibilização (Gabrielli, 2004).

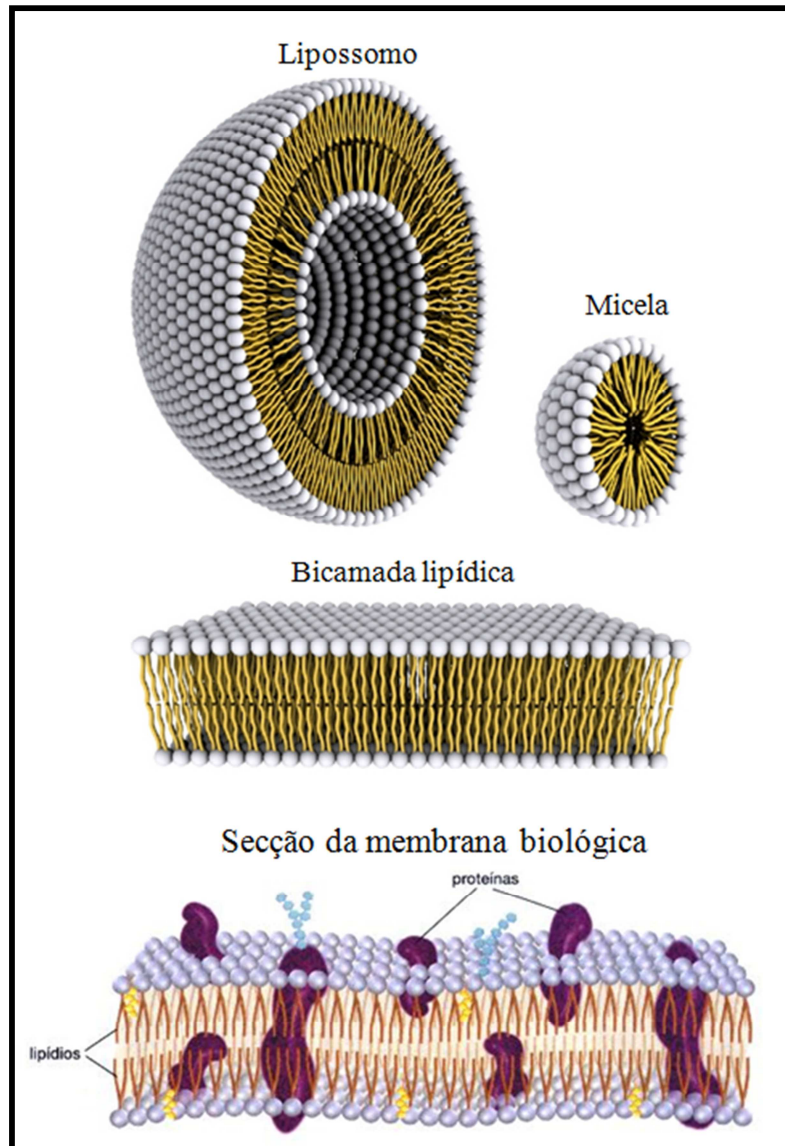


Figura 10. Vista em corte de duas estruturas formadas por fosfolipídios autoassociados (lipossomos e bicamadas lipídicas). Representação esquemática de uma micela formada por anfifílicos. Representação esquemática de uma secção da membrana biológica com seus principais constituintes.

3. Objetivos

Geral:

➤ Investigar as propriedades físico-químicas da clorofila e seus derivados formulados em lipossomo e micelas poliméricas, buscando possíveis fotossensibilizadores para aplicações fotodinâmicas.

Específicos:

➤ Obter e caracterizar formulados de clorofilas (Chls) em micelas poliméricas de pluronics[®] P-123 e F-127 e sistemas lipossomais constituídos de DPPC.

➤ Investigar a estabilidade e propriedades fotofísicas dos formulados de Chls, tais como rendimento quântico de fotobranqueamento, oxigênio singlete e fluorescência.

➤ Avaliar a ação fotodinâmica das Chls sobre *Staphylococcus aureus*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Mg-Chl foi extraída de espinafre de acordo com a metodologia descrita por Dolphin (1978). Os derivados Pheo, Pheid, Zn-Chl e Zn-Chld foram sintetizados a partir da Mg-Chl pura pelas metodologias descritas na literatura (Dolphin, 1978; Wasielewski e Svec, 1980; Hynninen e Lotjomen, 1980; Nonomura et al, 1997; Kupper et al, 2000). Todas as clorofilas foram caracterizadas pelos seus espectros de absorção eletrônica (UV-Vis Varian, Cary 50) e ^1H NMR (Varian, Gemini 300 MHz). Os surfactantes poliméricos da classe dos pluronic P-123 (MM= 5800 g mol $^{-1}$) e F-127 (MM= 12600 g mol $^{-1}$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e o fosfolipídio dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) da Avanti Polar Lipids Co. (Alabama). Todos os materiais (solventes, surfactantes e reagentes) foram de grau analítico (P.A.).

4.1.1. Sistema de iluminação

Sistemas de LED ($\lambda_{\text{max}}= 666$ nm) foram utilizados nos experimentos de fotobranqueamento enquanto um LASER de diodo (LASER Line, $\lambda_{\text{max}}= 659$ nm) foi usado como fonte de luz nos ensaios sobre micro-organismos. Os espectros de emissão das fontes de iluminação foram registrados em um espectrofluorímetro (Cary Eclipse, Varian), e as potências medidas através de um Handheld Laser Power Meter (Edmund Optics Inc., EUA) no comprimento de onda de máxima emissão (λ_{max}) da fonte.

4.2. Obtenção e caracterização de formulados de Chls em micelas poliméricas e DPPC

4.2.1. Incorporação e monomerização dos derivados de clorofila em sistemas micro-heterogêneos constituídos de micelas poliméricas e DPPC

Utilizou-se do método da adição direta de uma solução estoque de FS em DMSO a soluções de surfactante 2% (m/v) e de DPPC (2,0 mg mL⁻¹), teor final de DMSO < 1% (v/v), para avaliar a estabilidade das clorofilas na forma monomérica em sistemas micro-heterogêneos. Os espectros de absorção eletrônica (Espectrofotômetro DU 800 Beckman) foram obtidos a 30,0 °C.

4.2.2. Formulação dos derivados de clorofila em micelas poliméricas

A incorporação das Chls (4,0 µmol L⁻¹) em F-127 (2%, m/v; 1,59x10⁻³ mol L⁻¹) e P-123 (2%, m/v; 3,45x10⁻³ mol L⁻¹) foi realizada através do método da dispersão sólida (Zhang et al., 1996). Este método consiste, primeiramente, na cosolubilização do FS e do surfactante em clorofórmio, seguida da rotaevaporação do solvente, com a formação de um filme Surfactante/Chl. Este foi deixado em repouso sob pressão reduzida no dessecador durante 24 horas para a evaporação do solvente residual. Em seguida, realizou-se a hidratação do filme com tampão PBS, pH 7,4, à 60°C sob agitação constante. Após a solubilização total do filme, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL e completado com água destilada. Os formulados

obtidos foram caracterizados por espectroscopia de absorção eletrônica e de fluorescência, a 30,0 °C. O comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) foi 411 nm.

O deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) foi calculado para todas as clorofilas em etanol, P-123 e F-127 pela Equação 1:

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

onde, $\lambda_{abs,max}$ e $\lambda_{emi,max}$ são os comprimentos de onda de máxima absorção e emissão, respectivamente.

4.2.2.1. Determinação do coeficiente de absortividade molar (ϵ) em sistemas micelares

Para a determinação do coeficiente de absortividade molar das clorofilas formuladas em P-123 e F-127 (2%, m/v), realizou-se a diluição desses formulados com soluções aquosas dos respectivos surfactantes (2%, m/v). Após cada diluição registrou-se os espectros eletrônicos de absorção a 30,0 °C. O valor do coeficiente de absortividade molar foi obtido pela lei de Lambert-Beer - Equação 2 (Skoog et al., 1992):

$$Abs = b c \epsilon \quad (2)$$

onde, Abs é a absorbância, b é o caminho óptico (cm) e c a concentração do FS (mol L^{-1}).

4.2.2.2. Estabilidade dos formulados de clorofilas em surfactantes poliméricos

A estabilidade dos formulados hidratados com o tempo de armazenamento foi investigada durante 15 dias, à temperatura ambiente, acompanhando-se a quantidade de FS presente no formulado. Os espectros de absorção eletrônica foram registrados em intervalos de 24 h. Os formulados foram mantidos no escuro para evitar possíveis reações de fotobranqueamento do FS.

O efeito da temperatura na estabilidade do formulado em micelas poliméricas foi investigado na região de 30,0 a 12,0 °C, monitorando os espectros de absorção eletrônica e de emissão de fluorescência. Paralelamente, registraram-se os espectros de espalhamento de luz ressonante (RLS) - modo sincrônico com $\Delta\lambda = 0$ em espectrofluorímetro.

4.2.3. Formulação dos derivados de clorofila em lipossomos de DPPC

As clorofilas (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram incorporadas em lipossomos de DPPC (2,0 mg mL^{-1} - $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pelo método do filme fino descrito por Lee (Lee, 1975). Para isso, as Chls e o DPPC foram cosolubilizados em clorofórmio em um tubo de ensaio e o solvente evaporado por fluxo de N_2 , formando um filme DPPC/Chl no fundo do tubo, que foi deixado em repouso no dessecador para eliminar solventes residuais. A hidratação foi realizada com tampão PBS, pH 7,4, com aquecimento, a mistura foi agitada em um vortex mixer levando a formação de vesículas multilamelares. Os lipossomos unilamelares foram preparados pelo método de extrusão de multilamelas (Martin e Lasic, 1995; Lasic, 1993). Espectros de absorção e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 411 \text{ nm}$) dos formulados obtidos foram registrados a 30,0 °C.

4.2.3.1. Estudos de supressão de fluorescência em micelas poliméricas e lipossomo

Investigou-se a supressão de fluorescência das Chls nos formulados de surfactantes poliméricos (P-123 e F-127) e de lipossomo (DPPC) pela adição de KI (3,0 mol L⁻¹). A constante de Stern-Volmer (K_{SV}) foi calculada pela equação 3 (Lakowicz, 2006):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [I^-] \quad (3)$$

onde, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor respectivamente e, $[I^-]$ é a concentração de iodeto.

4.3. Determinação do potencial zeta (ζ) dos formulados micelares e lipossomais

As cargas totais de superfície das partículas micelares e lipossomais foram medidas usando um Nanoplus Zeta Potential. O potencial zeta foi determinado por Electrophoretic Light Scattering (ELS) pelo menos duas vezes para cada amostra preparada em água Mille-Q. As medidas foram realizadas a 30,0 °C.

As partículas carregadas, positiva ou negativamente, quando expostas a campos elétricos de cargas opostas migram em direção às cargas opostas. Quando às partículas em migração são irradiadas e dispersam luz, ocorre o efeito Doppler em função da mobilidade eletroforética dessas partículas. A partir da determinação do deslocamento

Doppler (Equação 4) e da mobilidade eletroforética (Equação 5), determinou-se o potencial zeta (Equação 6).

$$\Delta\nu = 2Vn\sin(\theta/2)/\lambda \quad (4)$$

Onde, $\Delta\nu$ é o deslocamento Doppler, V é a velocidade da partícula, n é o índice de refração, θ é o ângulo de detecção e λ é o comprimento de onda de excitação da luz.

$$U = V/E \quad (5)$$

onde, U é a mobilidade eletroforética e E é o campo elétrico aplicado.

Os valores de potencial zeta foram automaticamente calculados pelo aparelho usando a equação de Smoluchowski abaixo:

$$\zeta = \eta U/\xi \quad (6)$$

onde, η é a viscosidade e ξ é a permissividade (constante dielétrica).

4.4. Investigação de propriedades fotofísicas e fotodinâmicas das Chls formuladas em micelas poliméricas e lipossomo

4.4.1. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)

Para a determinação do Φ_F utilizou-se a Mg-Chl em éter etílico como padrão, $\Phi_F = 0,35$ (Nyman e Hynninen, 2004). Os espectros de absorção e emissão das amostras

foram obtidos a 30°C. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 411 nm e a emissão foi registrada na faixa de 600 a 800 nm. Os valores de Φ_F foram calculados a partir da equação 7 (Valeur, 2002):

$$\Phi_F = \frac{Abs_P F_C n_P^2}{Abs_C F_P n_C^2} \Phi_P \quad (7)$$

onde, P é o padrão, C as clorofilas, n é o índice de refração e F a área do espectro de emissão.

4.4.2. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ)

Os valores de Φ_Δ das clorofilas formuladas em micelas poliméricas e DPPC foram determinados pela medida direta da luminescência do oxigênio singlete em 1270 nm. As amostras foram excitadas em 355 nm com Laser de bombeamento (Nd:YAG) pulsado a 10 Hz com pulsos de 5 ns. A radiação emitida pelo 1O_2 em 1270 nm foi detectada em ângulo reto por uma fotomultiplicadora (Hamamatsu R5509) resfriada em nitrogênio líquido (-80°C). As absorvâncias no comprimento de onda de excitação da amostra e do padrão (Pheid em D₂O/1% Tritonx100/5% etanol, $\Phi_\Delta= 0.49$) (Redmond and Gamlin, 1999) foram registradas em um espectrofotômetro (Cary 50, Varian). O valor do rendimento quântico de oxigênio singlete das clorofilas nos sistemas microheterogêneos foi calculado pela equação 8 (Mathai et al., 2007):

$$\Phi_\Delta = \frac{Abs_P I_C \tau_P}{Abs_C I_P \tau_C} \Phi_P \quad (8)$$

onde, P é o padrão, C as clorofilas, I é a intensidade de fosforescência de $^1\text{O}_2$ em 1270 nm, Abs é a absorbância no λ_{exc} , τ é o tempo de vida do oxigênio singlete, e Φ_P é o rendimento quântico de oxigênio singlete do padrão.

4.4.3. Processos de fotobranqueamento

O fotobranqueamento (FB) das clorofilas formuladas em micelas poliméricas e sistemas lipossomais foi estudado com iluminação contínua utilizando-se LED como fonte de luz (30 mW), à temperatura ambiente. As constantes de velocidade de degradação (k_{FB}) foram calculadas pela equação 9:

$$\ln \frac{(A-A_\infty)}{(A_0-A_\infty)} = -k_{FB}t \quad (9)$$

onde A , A_∞ , e A_0 são as absorbâncias no tempo (t), no infinito, e no tempo inicial, respectivamente.

O rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{FB}) foi determinado pela equação 10, adaptada de Hadjur et al., 1998:

$$\phi_{FB} = \frac{(A_0 - A) V_S N_A h c}{\epsilon l \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P_{(\lambda)} \cdot I_0 (1 - 10^{-bc\epsilon}) e^{-k_{FB}t} d\lambda dt} \quad (10)$$

onde, l é o caminho óptico (cm), ϵ é a absorvidade molar do FS no comprimento de onda de análise ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), V_S é o volume da amostra (L), h é a constante de Planck ($h = 6,626 \times 10^{-34}$ Js), c a velocidade da luz no vácuo ($c = 2,997 \times 10^8$

ms^{-1}), N_a o número de Avogadro ($N_a = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), P é a potência da fonte (mW) e $I_0(1 - 10^{-bc\epsilon})$ é a intensidade de luz absorvida.

4.4.4. Ensaio sobre micro-organismos

Experimentos com *Staphylococcus aureus* (ATCC 26923) foram realizados em caldo Tryptic Soy Broth (TSB) segundo a metodologia descrita por Pelloi et al., 2008. O inóculo foi calibrado a 10^8 UFC mL^{-1} (Unidades formadoras de colônia por mL) e posteriormente diluído a 5×10^5 UFC mL^{-1} em formulados de micelas poliméricas e lipossomal; em seguida 500 μL foram transferidos para placas de cultura celular de 4 cavidades. Os experimentos foram realizados em dois grupos: um com exposição à luz durante 5, 10 e 15 min (dose de energia aplicada de 153, 306 e 459 J cm^{-2} , respectivamente) e o outro no escuro. O controle positivo foi preparado pela mistura de 50 μL de inóculo (10^8 UFC mL^{-1}) com 950 μL de surfactante ou lipossomo multilamelar, e o controle negativo de 950 μL de surfactante mais 50 μL de solução fisiológica (sem micro-organismos). Nos grupos testes as concentrações dos FS foram 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em micelas poliméricas e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em lipossomo. O LASER de diodo (Laser Line, $P = 100$ mW e $\lambda_{\text{max}} = 658$ nm) foi colocado verticalmente sobre as soluções nas placas de cultura a temperatura ambiente. Após a iluminação as amostras foram diluídas e semeadas em Tryptic Soy Agar (TSA) e incubadas por 24h a 37 °C. Em seguida, o número de UFC foi contado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.4.1. Ensaios de adsorção de FS pelas células bacterianas

A quantidade de clorofilas adsorvidas pelas bactérias foi quantificada de acordo com o método de Demidova e Hamblin (2005). Os inóculos calibrados (10^7 UFC mL⁻¹) foram incubadas durante 1 hora com as clorofilas formuladas em micelas poliméricas e DPPC, no escuro à temperatura ambiente (aproximadamente 30 °C). As moléculas de clorofilas não ligadas foram separadas por centrifugação durante 10 min a 4000 rpm e os micro-organismos foram lavadas com solução tampão PBS, centrifugada e o sobrenadante descartado. Para os micro-organismos restantes, adicionou-se dodecil sulfato de sódio (SDS, 2% m/v). A suspensão foi mantida em repouso durante 24 h à temperatura ambiente. A concentração de clorofila absorvida pelas bactérias foi determinada por espectroscopia de emissão de fluorescência; o comprimento de onda de excitação foi 411 nm para todos os compostos. Obtiveram-se as curvas de calibração das clorofilas puras dissolvidas em SDS 2% (m/v), a partir das quais se determinou a concentração de FS ligadas às bactérias pelas intensidades de emissão. Os valores relacionados à quantidade de FS ligado às bactérias foram obtidos pela divisão do número de moléculas de Chl dissolvida pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC) a partir da equação 11:

$$U_p v = \frac{[FS].N_a}{1000.UFC} \quad (11)$$

onde, $U_p v$ é o valor de clorofilas ligadas por UFC, $[FS]$ é a concentração do FS (mol L⁻¹), N_a é o número de Avogrado ($6,022 \times 10^{23}$ mol⁻¹), 1000 é o fator de conversão de unidades volumétricas, e UFC são as unidades formadoras de colônias / mL.

4.4.4.2. Microscopia de fluorescência e Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC)

Após a inativação fotodinâmica de *S. aureus* usando Pheid e Pheo formulados em DPPC e F-127 como FS, a integridade funcional da membrana celular bacteriana foi avaliada por microscopia de fluorescência. Utilizou-se um marcador de membrana celular danificada - iodeto de propídio (PI) segundo o procedimento descrito por Kranz e colaboradores (Kranz et al, 2011). Após incubação de 10 min, as amostras foram analisadas por Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC), também conhecida como contraste de interferência de Nomarski (NIC) ou Microscopia de Nomarski. Trata-se de uma técnica utilizada para aumentar o contraste nas amostras a partir de princípios de interferometria para obtenção de informações sobre a densidade óptica da amostra. Em seguida, analisou-se a mesma amostra por microscopia de fluorescência (Olympus bx51) usando uma lente Fluor 100/1,30 Oil Ph 4DL (Nikon, Kanagawa, Japan) e uma câmera digital (Digital Sight-DS 2 Mv; Nikon).

4.4.4.3. Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM)

As suspensões de células de *S. aureus* (10^7 UFC mL⁻¹) em PBS foram tratadas com FS (4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em micelas poliméricas e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em DPPC) no escuro e durante 10 min de iluminação. As suspensões bacterianas foram centrifugadas e as células foram submetidas à fixação primária em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L⁻¹ durante 24 h a 4 °C. Em seguida as células foram lavadas três vezes com tampão cacodilato e realizou-se a pós-fixação com tetróxido de

ósmio 2%, em tampão cacodilato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ferrocianeto de potássio 1,6% e cloreto de cálcio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (v/v), a temperatura ambiente durante 40 min. Posteriormente as bactérias foram lavadas com tampão cacodilato de sódio e desidratadas com soluções de acetona 50, 70, 90 e 100%. O tempo de contato em cada adição foi de aproximadamente 10 min, a temperatura ambiente. Após a desidratação as células bacterianas foram infiltradas em resina de EPON. Para isso uma mistura de EPON e acetona (1:2) foi transferida para o frasco contendo as bactérias e mantido em repouso durante 12 horas. Em seguida a mistura EPON/acetona (1:2) foi substituída por EPON/acetona (1:1) e novamente mantida em repouso durante 12 horas. O mesmo procedimento foi realizado para substituição da última mistura por EPON/acetona (2:1), e posteriormente por EPON puro. Para o EPON puro o tempo de contato a temperatura ambiente foi de 6h. Para polimerização da resina o material foi colocado em forma contendo as amostras nas extremidades e incubadas a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 h. Seções finas foram cortadas com o auxílio de uma lamina de diamante em um ultramicrótomo sobre grades de cobre. As amostras foram coradas com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo. Finalmente as amostras foram examinadas e fotografadas em um microscópio de transmissão eletrônica JEOL JEM-1400, operado a uma tensão de aceleração de 100 kV.

5. Resultados e discussão

5.1. Caracterização espectroscópica de derivados de clorofilas

As clorofilas, clorinas substituídas, apresentaram as bandas características na região do visível, uma na região do azul (banda Soret) e outra na do vermelho (banda Q), ambas com alta absorvidade molar (Figura 11). Para as clorinas, a elevada absorvidade molar da banda Q (janela terapêutica) deve-se à perda de simetria advinda da hidrogenação (redução) de um dos anéis pirrólicos. Outra característica relevante de clorinas para TFD é o deslocamento batocrômico em relação às porfirinas, isso porque a energia necessária para excitar o elétron de um estado de menor energia para um de energia mais alta aumenta com o número de elétrons no anel porfirínico; dessa forma, clorinas com 20 elétrons π absorvem em comprimentos de onda maior do que as porfirinas com 22 (Macdonald e Doughert, 2001).

Adicionalmente, as clorofilas possuem outras bandas advindas da assimetria do anel porfirínico para os compostos de base livre, enquanto para as moléculas metaladas as bandas são relacionadas às transições metal-ligante (Figura 11). Assim, a presença de metais coordenados ao anel tetrapirrólico é de importância fundamental para a determinação das características espectrais, como máximo e intensidade de absorção. Como pode ser visto nos espectros, a intensidade de absorção da banda Q de clorofilas complexadas com Zn^{2+} e Mg^{2+} são maiores do que para as de base livre, característica relevante afetando diretamente a quantidade de fótons absorvidas pelo FS e consequentemente os processos fotoquímicos. Por outro lado, a cadeia fitílica pouco afeta os espectros eletrônicos de absorção, como visto para Pheo e Pheid que têm espectros iguais entre si (Figura 11), bem como para Zn-Chl e Zn-Chld, com variações

nas intensidades. Considerando-se que a diferença estrutural (Figura 1A) entre esses compostos é a cadeia fitílica que não está diretamente envolvida na parte cromofórica da molécula, as alterações de intensidade e de energia observadas são atribuídas à estabilização em um determinado meio.

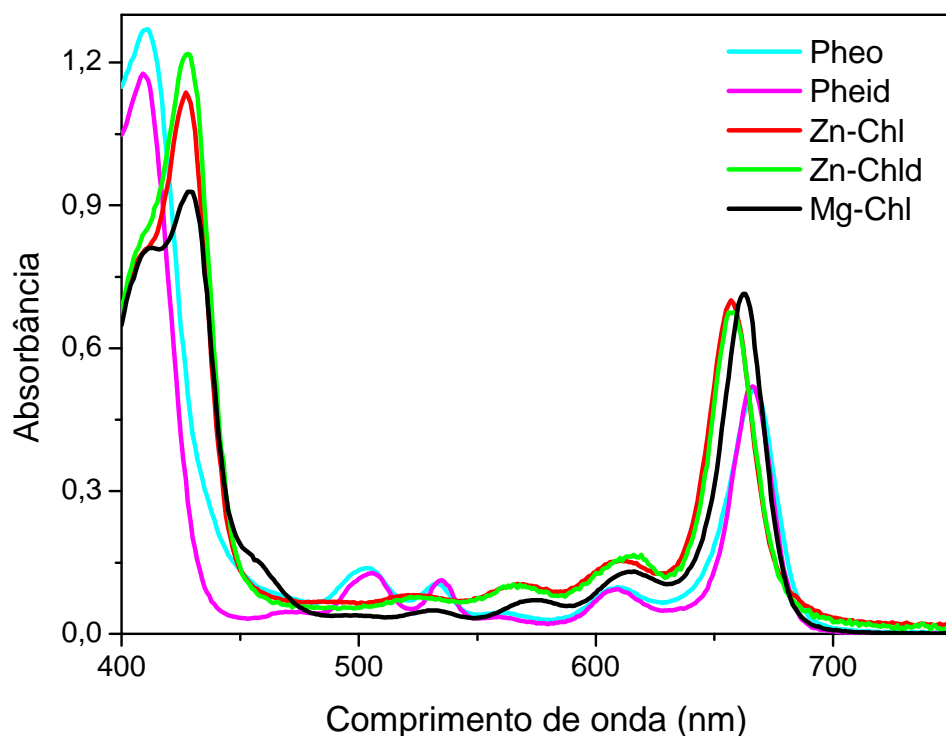


Figura 11. Espectros eletrônicos da clorofila e seus derivados em acetona, a 30,0 °C.

As características espectrais de moléculas são dependentes de alguns fatores do solvente, dentre os quais se podem citar, a constante dielétrica, a polarizabilidade e a polaridade, além de propriedades do FS como estado de agregação, grau de protonação, etc.. Dessa maneira, propriedades específicas de FS em diferentes meios são estudadas e relacionadas com sítios de ligação de sondas a macromoléculas em pesquisas bioquímicas (Lakowicz, 2006).

5.2. Formulação das clorofilas em micelas poliméricas de P-123 e F-127

Inicialmente, optou-se pela adição direta de uma solução estoque de FS em DMSO a uma solução de surfactante 2% (m/v), teor final de DMSO < 1% (v/v), para solubilização das clorofilas em micelas. Os espectros eletrônicos de absorção da Pheo em P-123 e F-127 são apresentados na Figura 12A, juntamente com o espectro em etanol, meio no qual o FS encontra-se monomerizado (Moreira et al., 2009). Em sistemas micelares observou-se um pico adicional, comparativamente ao meio homogêneo (etanol), característico de FS autoagregado em torno de 700 nm (Eichwurz et al., 2000). Além disso, analisando-se a Figura 12B verificou-se desvio negativo da linearidade da lei de Beer, igualmente característico do processo de autoagregação. Esses fatos evidenciam que a metodologia de adição direta não foi eficaz na obtenção das clorofilas no estado monomérico.

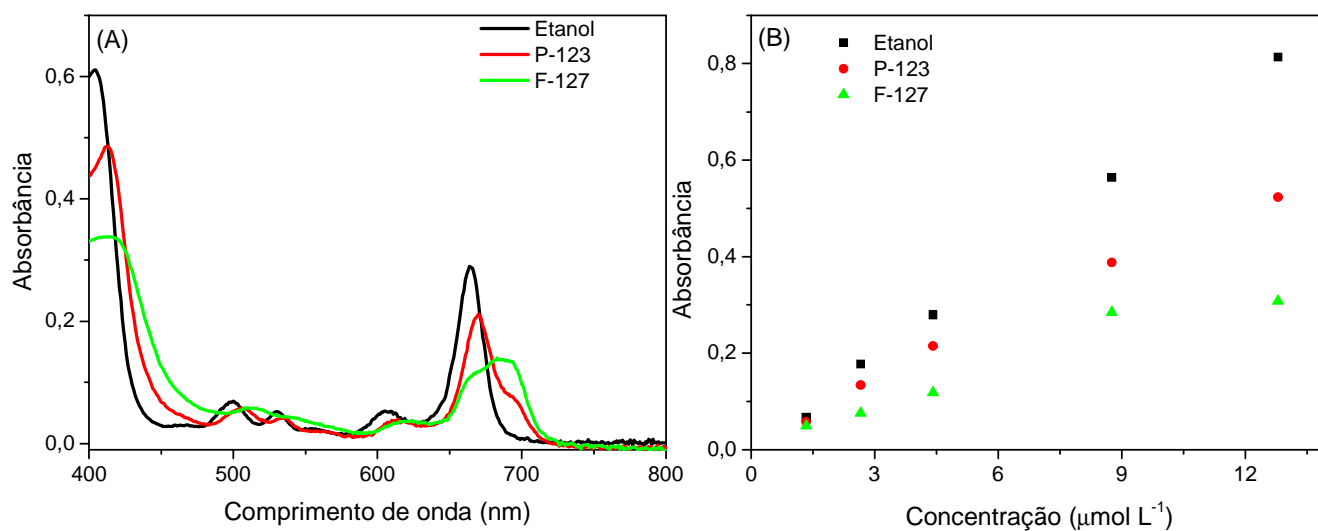


Figura 12. (A) Espectros de absorção eletrônica da Pheo 4,0 μmol L⁻¹ adicionada diretamente às soluções de P-123 e F-127 2% (m/v) e em etanol, a 30,0 °C. (B) Variação da absorbância (λ= 668 nm) em função da concentração de Pheo em P-123, F-127 e etanol.

Diante da ineficácia do método de adição direta na monomerização dos FS optou-se pela formulação das clorofilas em micelas poliméricas pelo método da dispersão sólida (Zhang et al., 1996). Como mostrado na Figura 13 os formulados micelares mantiveram as características espectrais das Chls monoméricas, com a manutenção da banda Soret na região do azul ($S_0 \rightarrow S_2$) e da banda Q na região do vermelho ($S_0 \rightarrow S_1$) (Weiss, 1978). Além disso, não se observou características espectrais das clorofilas autoagregadas, como diminuição da intensidade de absorção, alargamento, deslocamento e aparecimento de bandas adicionais, confirmando a incorporação das clorofilas monomerizadas em micelas de F-127 e P-123.

Os valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) das Chls formuladas em surfactantes poliméricos obtidos a partir da Equação 2 são mostrados na Tabela 2. Observou-se que os formulados obtidos mantiveram a alta capacidade de absorção, inclusive na região do vermelho (em torno de 660 nm de maior interesse à TFD) para todas as clorofilas. Os valores de ϵ foram próximos aos obtidos em etanol, meio no qual as clorofilas estão monomerizadas.

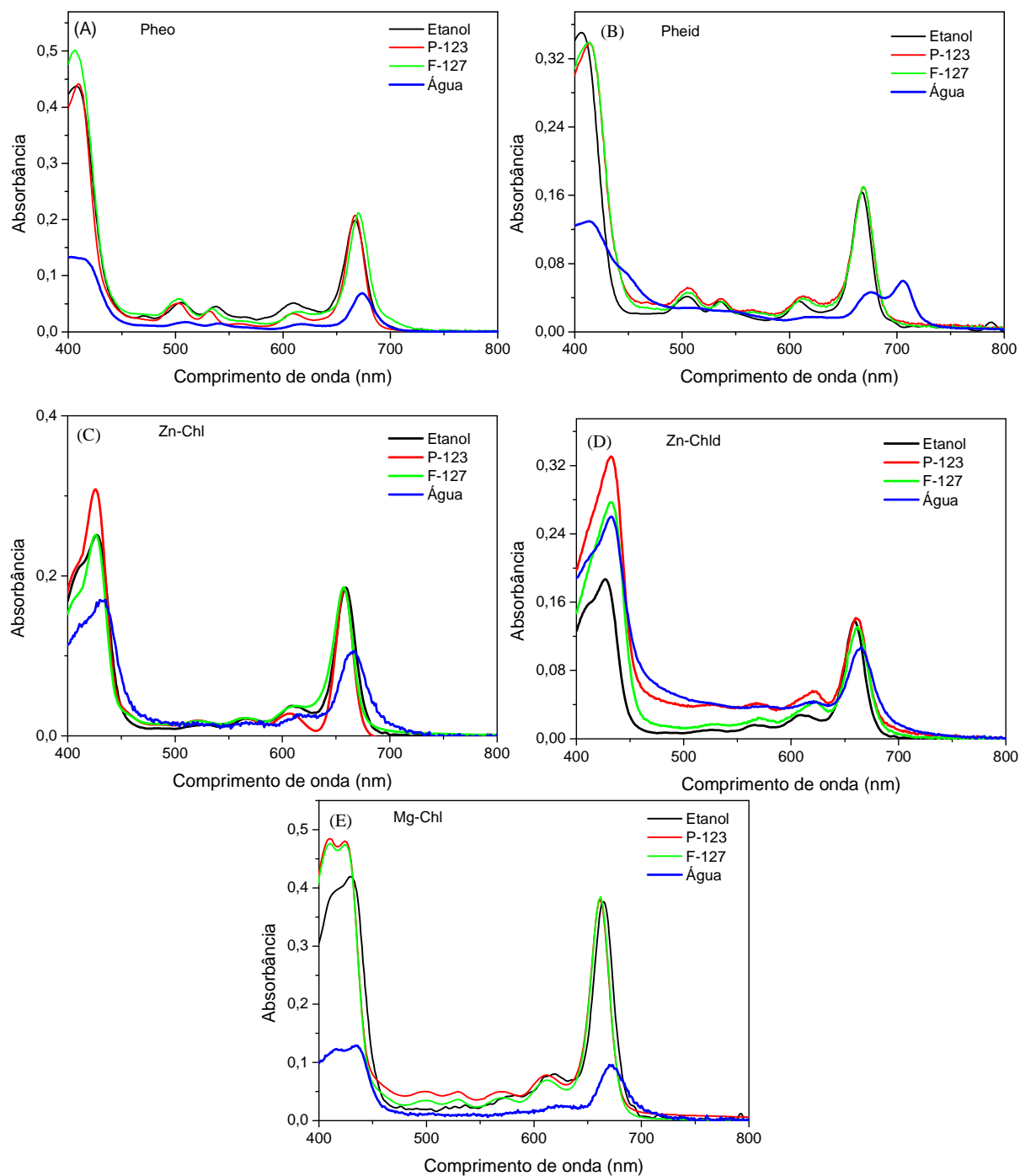


Figura 13. Espectros de absorção eletrônica das clorofilas em P-123 e F-127 (2%, m/v), água e etanol a 30,0 °C. [FS]= 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. Os formulados foram obtidos pelo método da dispersão sólida.

Tabela 2. Coeficiente de absorvidade molar das Chls em etanol e formuladas em P-123 e F-127 (2%, m/v) pelo método da dispersão sólida, a 30,0 °C.

FS	λ (nm)	ϵ (10^3 L mol ⁻¹ cm ⁻¹)		
		Etanol	F-127	P-123
Pheo	402	169 ± 1,1	190,8 ± 1,9	146,6 ± 3,7
	498	17,9 ± 0,9	21,4 ± 0,8	18,9 ± 0,5
	667	69,3 ± 1,0	78,0 ± 0,7	74,7 ± 1,8
Pheid	409	133 ± 0,8	116,9 ± 1,2	116,6 ± 0,3
	502	15,0 ± 0,9	13,4 ± 1,1	18,0 ± 0,7
	667	57,3 ± 0,7	57,5 ± 0,6	56,7 ± 0,2
Zn-Chl	426	147 ± 0,9	150,7 ± 1,2	157,6 ± 0,9
	610	19,2 ± 1,1	16,8 ± 0,5	9,1 ± 0,7
	658	93,3 ± 0,8	105,0 ± 0,8	108,4 ± 0,7
Zn-Chld	428	116 ± 1,2	110,7 ± 1,0	130,6 ± 1,6
	616	16,0 ± 1,3	18,3 ± 0,2	24,2 ± 0,3
	658	65,3 ± 1,1	52,9 ± 0,2	57,9 ± 0,3
Mg-Chl	425	124 ± 0,9	113,0 ± 0,7	118,9 ± 1,0
	613	16,7 ± 0,5	17,1 ± 0,2	18,2 ± 0,2
	662	93,3 ± 0,7	92,6 ± 0,5	90,4 ± 0,1

Os espectros de emissão de fluorescência das clorofilas em água, etanol e formuladas em P-123 e F-127 (2%, m/v) são mostrados na Figura 14. Esses apresentam apenas uma banda característica de emissão relativa à transição $S_1 \rightarrow S_0$. A emissão de fluorescência não é dependente do comprimento de onda de excitação, uma vez que ao excitar um fluoróforo na banda Soret, transição $S_0 \rightarrow S_2$, ela decai rapidamente ao primeiro estado excitado por conversão interna. Em água a intensidade de emissão dos FS é praticamente nula, devido ao processo de autoagregação das clorofilas que leva à autossupressão de energia do estado excitado e consequente diminuição da intensidade de emissão (Agostiniano et al., 2003; Èunderlíková et al., 2004). Com a formulação das clorofilas em micelas poliméricas houve um grande aumento na intensidade de emissão, que é relacionada à monomerização do FS nesses meios.

Os espectros de emissão das clorofilas formuladas em P-123 e F-127 apresentaram perfis idênticos (Figura 14) com diferenças na intensidade de emissão decorrente das diferentes absorvidades em cada sistema (Tabela 2).

O ombro adicional observado em torno de 720 nm no espectro de emissão das clorofilas é devido às transições referentes aos níveis de energia vibracionais (Dolphin, 1978).

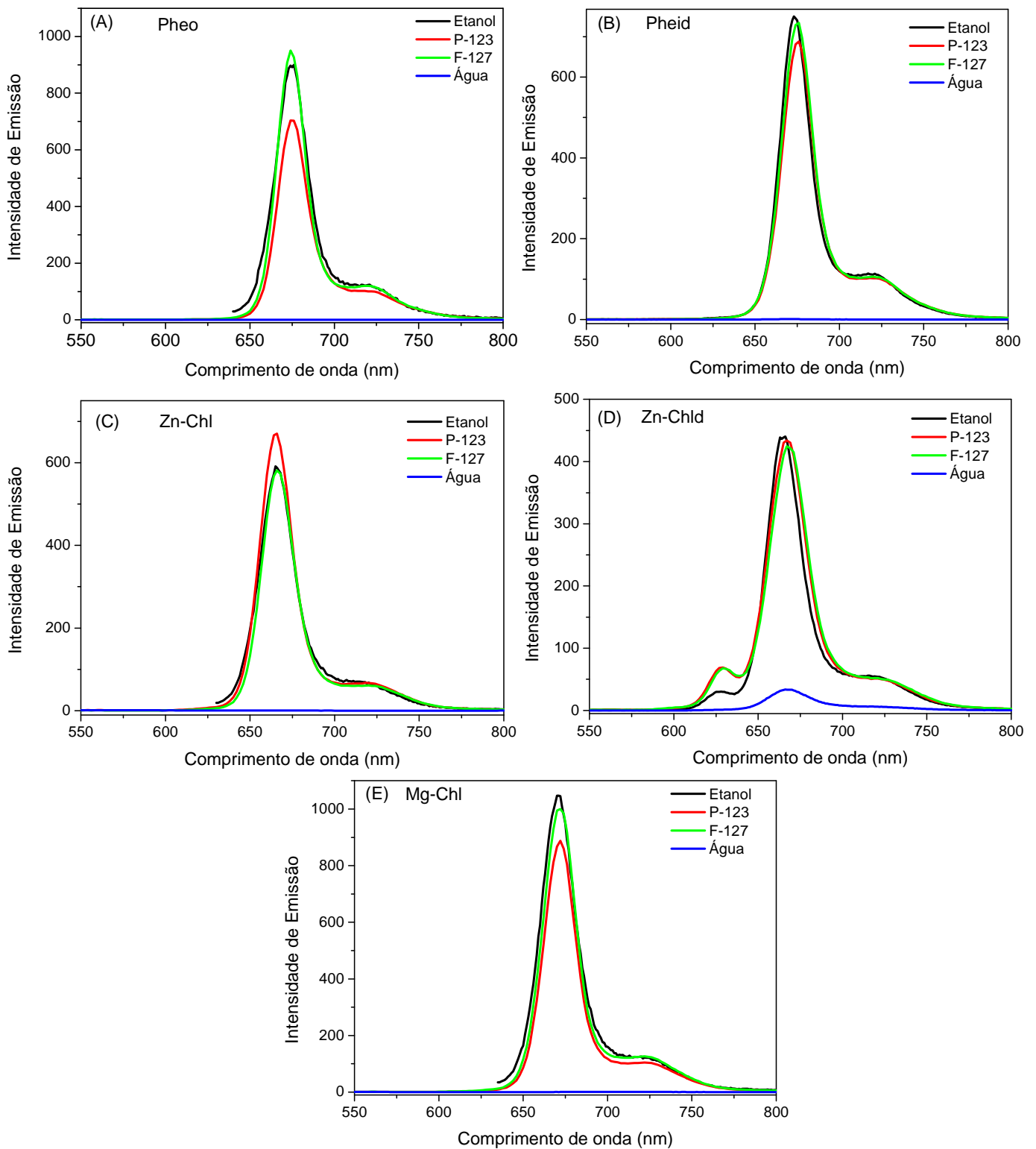


Figura 14. Espectros de emissão de Chls em água, etanol e sistemas micelares de P-123 e F-127 (2%, m/v), a 30,0 °C e $\lambda_{exc}=411$ nm. Os formulados micelares foram obtidos pelo método da dispersão sólida.

A energia de emissão de fluoróforos é tipicamente um pouco menor do que a energia de absorção, que resulta no deslocamento espectral batocrômico da transição $S_1 \rightarrow S_0$, deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$), resultante da relaxação vibracional no nível de energia S_1 . Assim, os máximos de absorção e emissão e o deslocamento de Stokes dos FS em etanol e nos formulados micelares são apresentados na Tabela 3. Os valores de $\Delta\nu$ para Pheo, Mg-Chl e Zn-Chl foram praticamente idênticos ao valor em etanol, mostrando que a polaridade do microambiente micelar no qual essas moléculas estão incorporadas é similar a do etanol. Estudos de micropolaridade dessas micelas mostraram que o seu core possui polaridade próxima ao etanol (Pandit et al., 2000). Assim, pode-se inferir que essas clorofilas são alocadas na camada interna das micelas. Esse resultado está em concordância com estudos de localização realizados anteriormente (Gerola et al., 2011). Para os derivados forbídicos (Pheid e Zn-Chld) o valor de $\Delta\nu$ obtido em sistemas micelares foi maior do que os valores em etanol, indicando que essas moléculas estão em um microambiente mais polar, provavelmente a camada externa da micela (Gerola et al., 2011).

Tabela 3. Deslocamento de estoques ($\Delta\nu$) e comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{emi}) das clorofilas em P-123, F-127 e etanol.

	λ_{abs} (nm), banda Q			λ_{emi} (nm)			$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)		
	Etanol	F-127	P-123	Etanol	F-127	P-123	Etanol	F-127	P-123
Mg-Chl	664	662	662	670	668	668	135	137	137
Pheo	667	667	667	675	675	675	178	178	178
Pheid	668	667	667	673	676	677	111	200	221
Zn-Chl	659	659	659	665	665	665	137	137	137
Zn-Chld	659	658	658	668	669	669	204	250	250

5.2.1. Estabilidade dos formulados de Chls em surfactantes poliméricos

Para verificar a estabilidade dos formulados de clorofila em formulados micelares monitoraram-se os espectros eletrônicos dos compostos encapsulados pelo método da dispersão sólida, durante 15 dias em F-127 (Figura 15) e P-123 (Figura 16). A partir desses espectros de absorção, montou-se o perfil cinético no λ_{max} da banda Q (Figura 17) para todas as clorofilas. Verificaram-se apenas pequenas variações na intensidade de absorção com o tempo em ambos os surfactantes e manutenção das propriedades espectroscópicas, mostrando que os formulados permaneceram estáveis.

Adicionalmente, esses estudos permitem avaliar possíveis cinéticas de liberação do FS do sistema carreador. Devido ao fato das clorofilas serem insolúveis em água, a liberação dessas moléculas para o meio aquoso leva a agregação e/ou precipitação com alterações nos perfis espectrais (Moreira et al., 2009; Moreira et al.; 2010). Uma vez que as variações espectrais foram pequenas pode-se dizer que as moléculas fotossensíveis não foram liberadas do sistema carreador nas condições em que os formulados foram armazenados (temperatura ambiente e pH fisiológico). Esse fato pode ser explicado pela forte interação dessas moléculas com o sistema carreador estudado, como mostrado em estudos anteriores (Gerola et al., 2011).

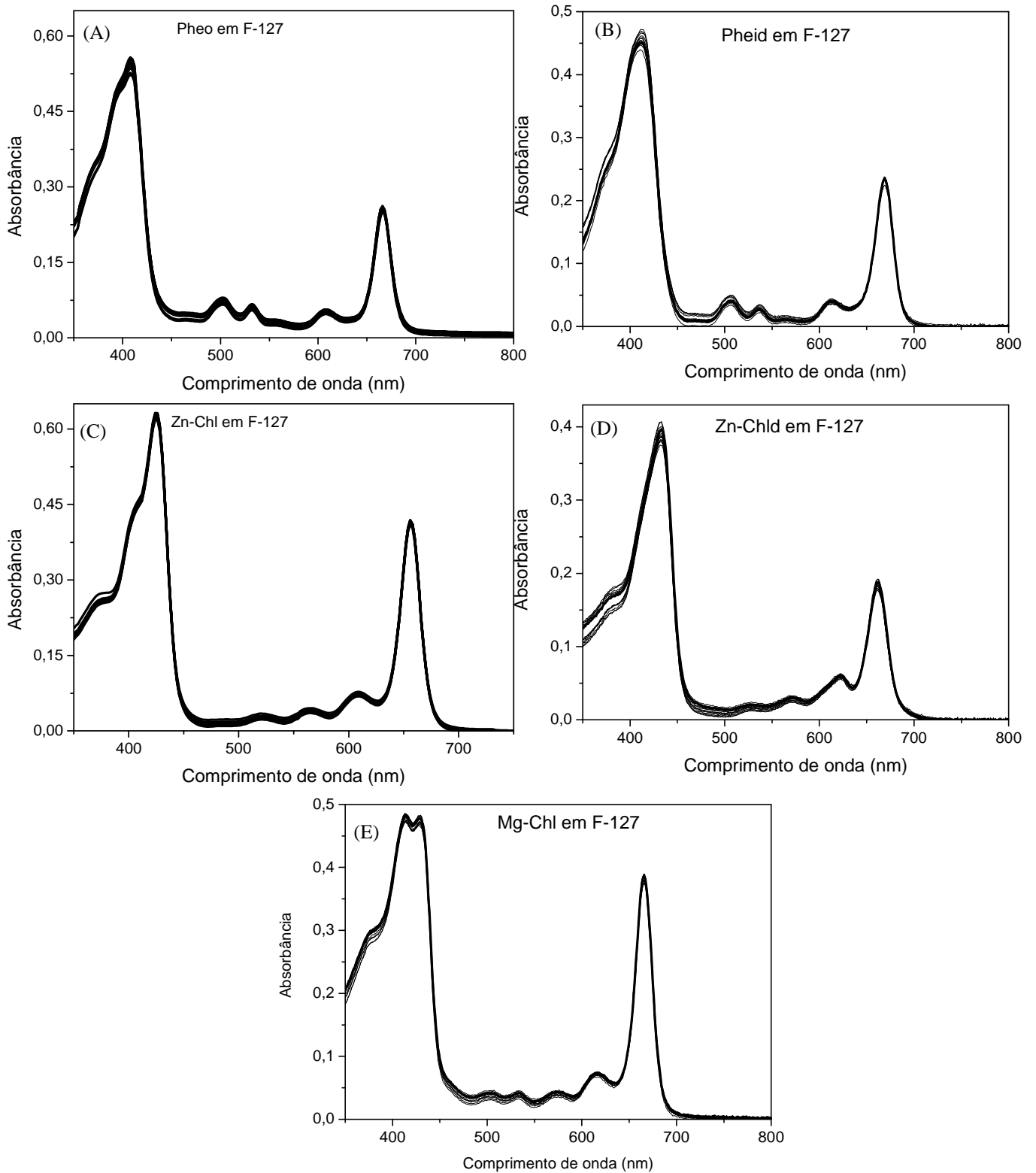


Figura 15. Sobreposição espectral das clorofilas formuladas em F-127 2% (m/v) durante 15 dias, a temperatura ambiente.

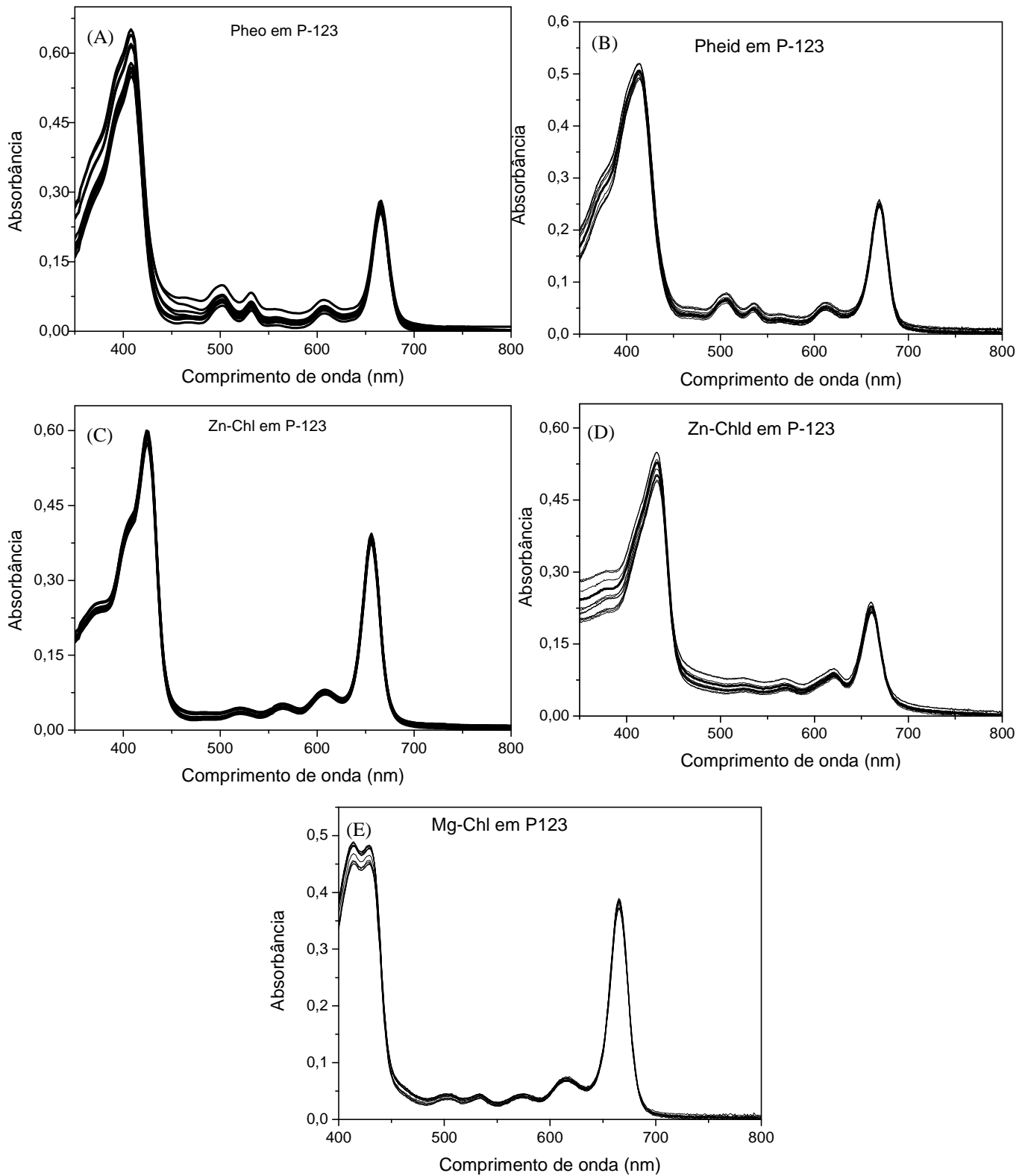


Figura 16. Sobreposição espectral das clorofilas formuladas em P-123 2% (m/v) durante 15 dias, a temperatura ambiente.

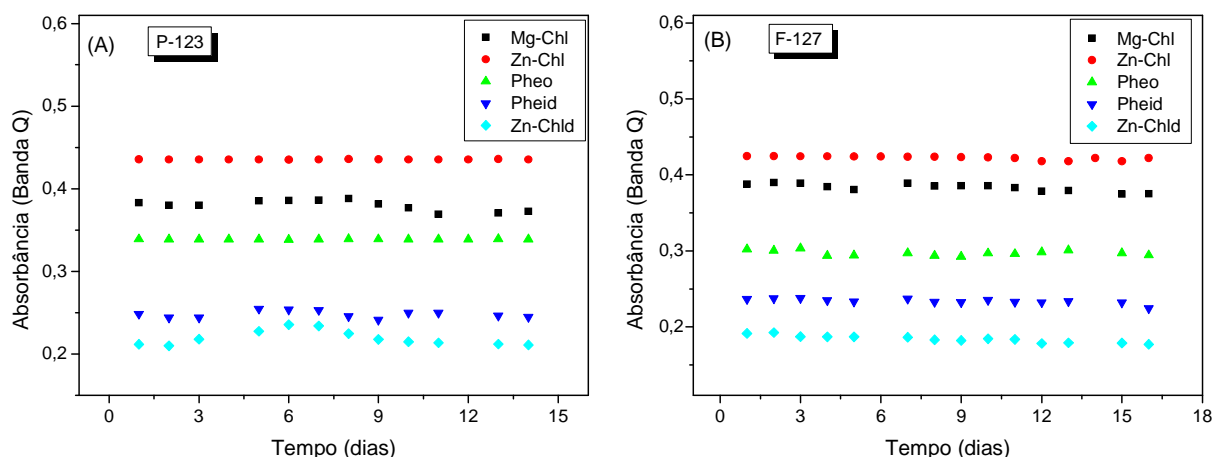


Figura 17. Cinéticas de estabilidade das clorofilas formuladas em P-123 e F-127 (2%, m/v), a temperatura ambiente.

5.2.2. Estabilidade térmica dos formulados de Chls em surfactantes poliméricos

Adicionalmente, investigou-se o efeito térmico na estabilidade das Chls formuladas em micelas de P-123 e F-127, uma vez que existe dependência das propriedades de organização estrutural dos Pluronicos[®] com a temperatura (Caragheorghopol et al., 1997; Grant et al., 2005; Shiraishi et al., 2010; Liu et al., 2008). O efeito térmico foi avaliado por sucessivas diminuições na temperatura e posterior retorno à temperatura inicial (volta). A presença de micelas dos copolímeros na ausência de FS foi avaliada por espalhamento de luz ressonante (RLS) que possibilita averiguar a presença de agregados grandes, como exemplificado para o F-127 e o P-123 na Figura 18A e 18C, respectivamente. A intensidade de espalhamento em função da temperatura é apresentada na Figura 18B e 18D para os sistemas de F-127 e P-123, respectivamente. Com a diminuição da temperatura verificou-se a diminuição na intensidade do sinal de espalhamento, até o seu total desaparecimento em baixas temperaturas ($< TMC$), onde se tem apenas unímeros. Nas regiões intermediárias de

temperatura 20 - 30 °C para o F-127 e 15 - 25 °C para o P-123, a diminuição da intensidade de espalhamento com a diminuição da temperatura é devido a diminuição do número de agregação das micelas poliméricas, mantendo constante a concentração de surfactante (Liu et al., 2008). Conhecidamente, a diminuição da temperatura em sistemas micelares de copolímeros em bloco leva a diminuição do número de agregação e conseqüentemente do tamanho das micelas, podendo comprometer a capacidade de solubilização de compostos.

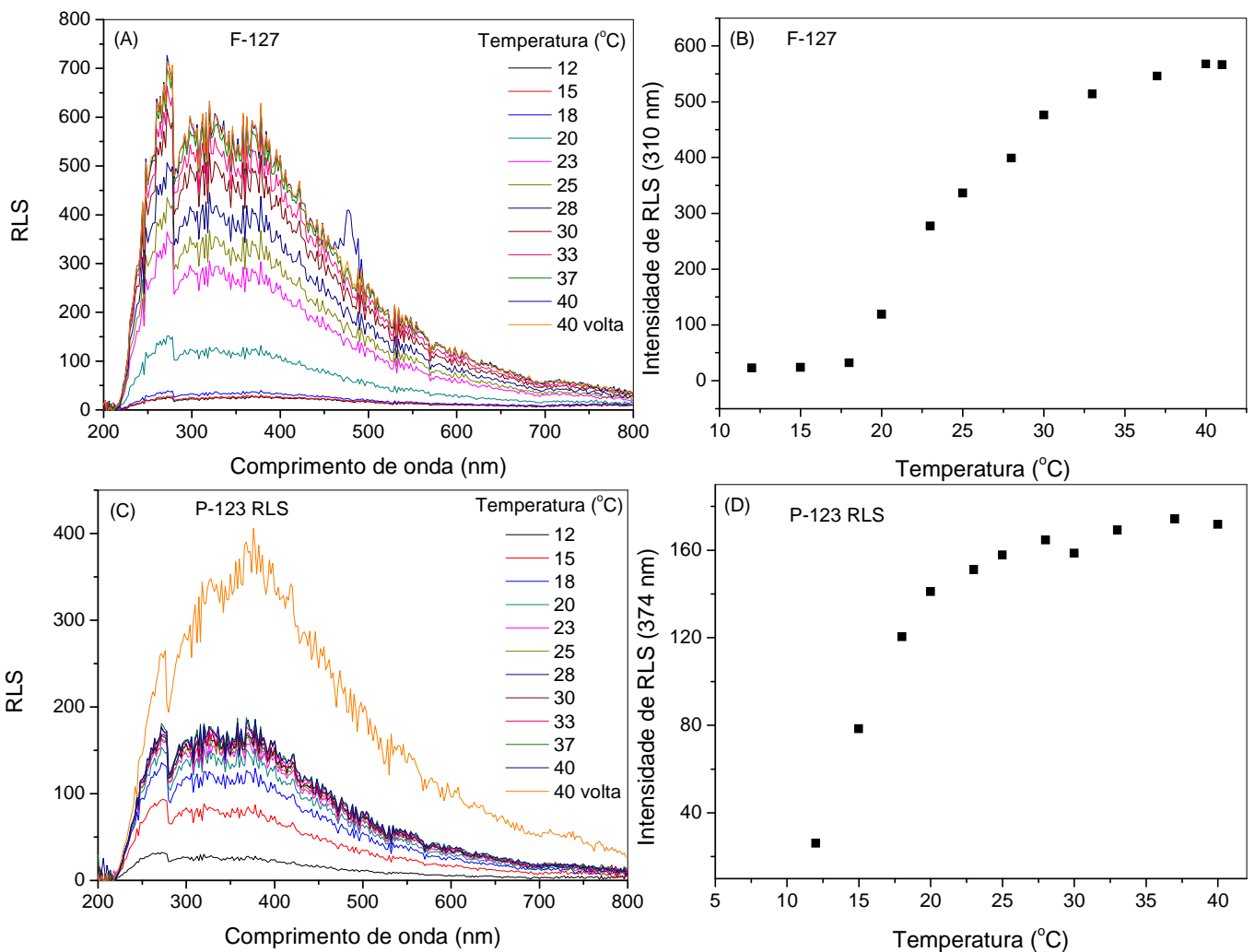


Figura 18. Espalhamento de luz ressonante (RLS) em diferentes temperaturas para (A) F-127 2% (m/v) e (C) P-123 2% (m/v). Intensidade do sinal de RLS em função da temperatura para (B) F-127 2% (m/v) e (D) P-123 2% (m/v). A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial.

Após a incorporação das clorofilas nos sistemas micelares pelo método da dispersão sólida, avaliou-se a estabilidade térmica dos formulados obtidos por espectroscopias de absorção eletrônica e de emissão de fluorescência. As clorofilas foram utilizadas como sondas espectrofotométricas, simultaneamente às análises de espalhamento de luz ressonante.

Inicialmente, investigaram-se as variações nos espectros de absorção das clorofilas formuladas em micelas poliméricas de F-127 (2% m/v) com a variação da temperatura (Figura 19), visto que a diminuição do número de agregação e consequentemente do tamanho da micela, devido à diminuição da temperatura, podem reduzir a solubilização de solutos hidrofóbicos como as clorofilas. Além disso, em temperaturas abaixo da TMC, onde apenas os unímeros estão presentes pode ocorrer o processo de autoagregação do FS. No presente trabalho, verificou-se a manutenção das características espectroscópicas das clorofilas monomerizadas e ausência de picos de agregados em toda região de temperatura estudada. Contudo, o abaixamento da temperatura levou à redução nas intensidades de absorção, além de causar um pequeno deslocamento nos máximos de absorção para as principais bandas das clorofilas, principalmente na banda Soret, com exceção da Zn-Chld, cujo espectro de absorção manteve-se praticamente constante (Figuras 19D e 19F).

O deslocamento do máximo de absorção para o vermelho (deslocamento batocrômico) com a diminuição da temperatura é associado à mudança do microambiente no qual as clorofilas são localizadas, ou seja, com o abaixamento da temperatura os FS são expostos a microambientes mais polares. Esse fato é condizente com os estudos anteriores que mostram que a diminuição da temperatura aumenta a polaridade dos microambientes micelares devido a maior hidratação das micelas (Pandit et al., 2000).

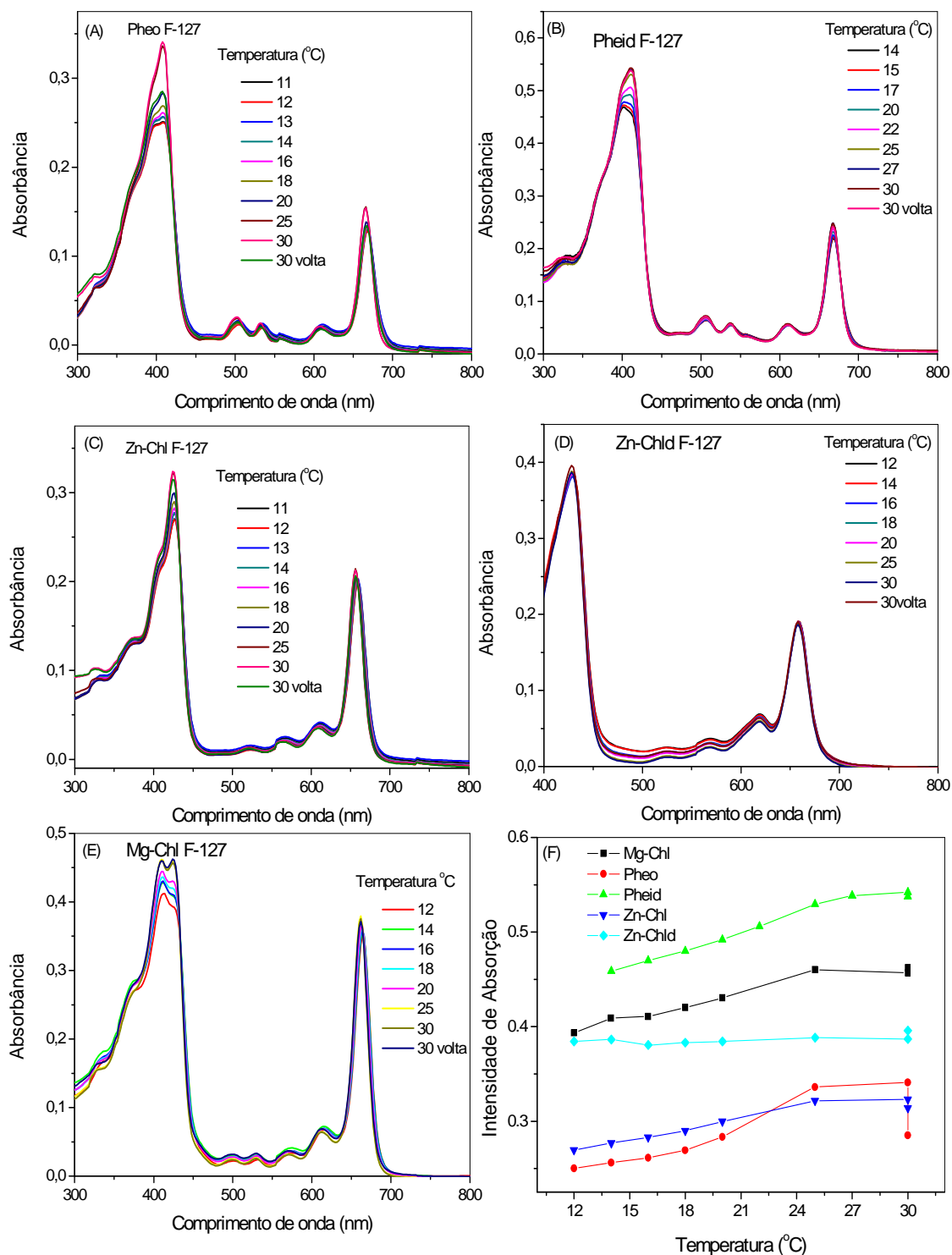


Figura 19. Espectros de absorção eletrônica dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em F-127 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de absorção da banda Soret dos FS em F-127 em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial.

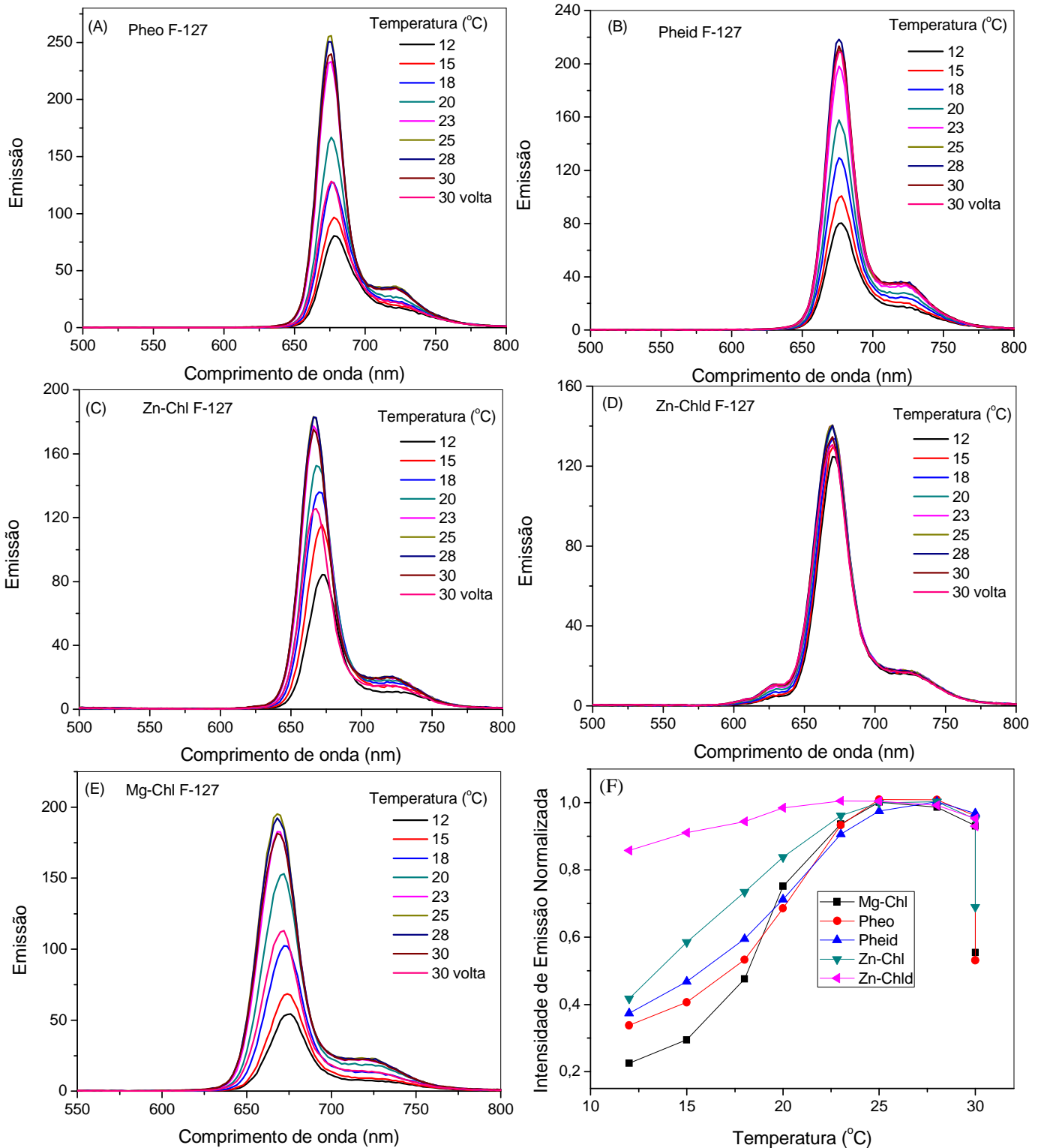


Figura 20. Espectros de emissão dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em F-127 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de emissão normalizada dos FS em F-127 em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial.

Adicionalmente, avaliaram-se os efeitos térmicos nas clorofilas em micelas de F-127 por espectroscopia de emissão de fluorescência (Figura 20). Diferentemente do que foi observado nos estudos de absorção eletrônica obteve-se uma grande diminuição na intensidade de emissão com o abaixamento da temperatura, com exceção novamente da Zn-Chld, cuja intensidade de absorção manteve-se praticamente inalterada e a intensidade de emissão apresentou uma variação de emissão muito menor do que para as demais clorofilas.

A diminuição na intensidade de emissão não pode ser explicada diretamente pela diminuição da temperatura, uma vez que o estado de menor agitação térmica leva a diminuição de processos de desativação não radiativos tais como colisão com moléculas de solvente, vibrações intramoleculares e rotacionais, o que aumentaria o rendimento quântico de fluorescência (Valeur, 2002). Uma possibilidade para explicar os resultados obtidos é a formação de espécies autoagregadas, que reduzem drasticamente a capacidade dos FS emitirem. Contudo nos espectros de absorção não há indícios de FS autoagregados (cujos espectros normalmente são bem característicos). Diante dos fatos expostos, a variação na intensidade de emissão pode ser justificada pela mudança de microambiente no qual as clorofilas estão localizadas. Essa modificação foi verificada nos estudos espectroscópicos de absorção eletrônica com a diminuição da temperatura, cujos espectros apresentaram um deslocamento batocrômico, indicando o aumento da polaridade do meio. Para melhor avaliar a diferença de microambientes das micelas poliméricas com a diminuição da temperatura determinou-se a diferença das energias de absorção e emissão das clorofilas, deslocamento de Stokes (Figura 21), que está relacionado com a micropolaridade do ambiente. Com o abaixamento da temperatura as clorofilas com a cadeia fitílica apresentaram um aumento do deslocamento de Stokes em temperaturas próximas a TMC, indicando o aumento da polaridade do

microambiente em baixas temperaturas, ou seja, os FS são expostos a um ambiente mais polar (com maior quantidade de água). Por outro lado, os derivados forbídeos não apresentaram modificações no deslocamento de Stokes mesmo abaixo da TMC devido à localização desses FS na camada externa de maior micropolaridade e contendo quantidade de água mais elevada.

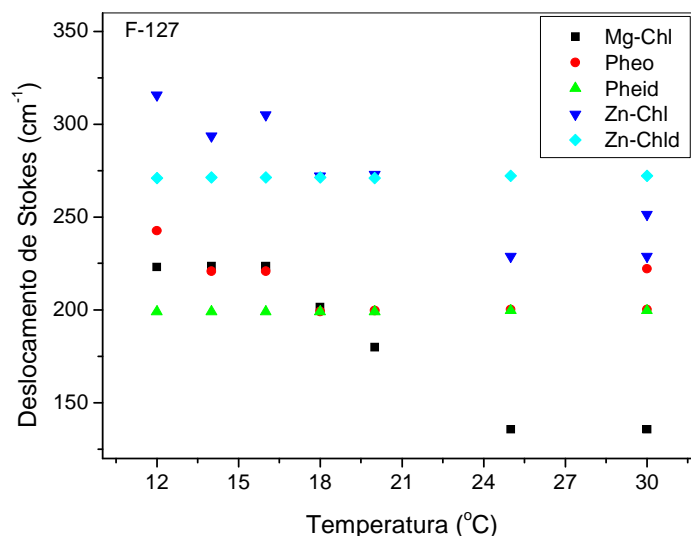


Figura 21. Deslocamento de Stokes para as clorofilas formuladas em F-127 com a diminuição da temperatura.

Além disso, com a diminuição da temperatura há uma redução no número de agregação dos copolímeros (aumento da quantidade de água no core) e no entrelaçamento das cadeias do copolímero diminuindo a rigidez do microambiente e consequentemente a microviscosidade local do core micelar, contribuindo para a diminuição da intensidade de emissão. Estudos realizados por Shiraishi e colaboradores mostraram que a diminuição da microviscosidade é o principal fator na diminuição da intensidade de emissão com a diminuição da temperatura (Shiraishi et al., 2010). Por outro lado, a diminuição da rigidez do microambiente aumenta a suscetibilidade do FS ao ambiente aquoso polar e possibilidade de choques com moléculas de água. Conhecidamente, a água pode atuar como agente supressor (Graceto et al., 2010)

diminuindo a intensidade de emissão do fotossensibilizador. Assim a maior suscetibilidade ao agente supressor leva a menor intensidade de emissão das clorofilas com a diminuição da temperatura.

Simultaneamente às análises espectroscópicas de absorção e emissão, analisou-se a estabilidade térmica dos formulados micelares por espalhamento de luz ressonante (Figura 22). Verificou-se a presença da banda residual de emissão das clorofilas em torno de 660 nm, características das clorofilas monomerizadas (Paula et al., 1995). Com a diminuição da temperatura a intensidade dessa banda diminuiu, devido a menor capacidade das clorofilas emitirem em baixas temperaturas nesses formulados, como discutido anteriormente. Além disso, alterações nos perfis de espalhamento das micelas foram observadas com a incorporação das clorofilas (Figura 22) em relação às micelas puras (ausência de clorofila) (Figura 18), o que novamente demonstra a interação das clorofilas com as micelas poliméricas. O sinal de espalhamento adicional em torno de 500 nm é atribuído às micelas e não a presença de autoagregados de clorofila, pois com a diminuição da temperatura o sinal diminuiu, enquanto sinais de espalhamentos de FS autoagregados aumentam.

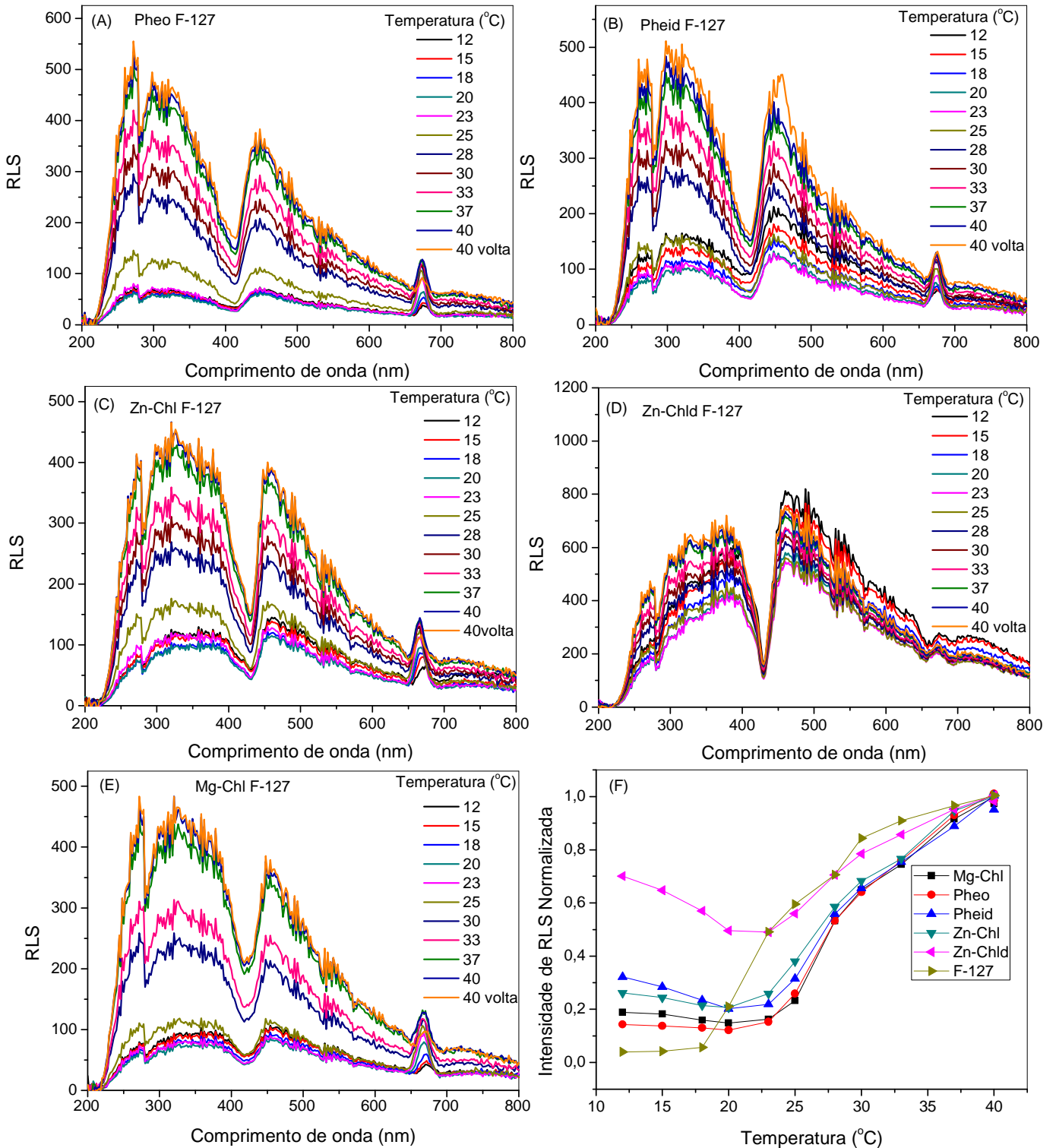


Figura 22. Espectros de RLS dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em F-127 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de RLS em 310 nm normalizada em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial.

Nos espectros de RLS dos formulados micelares de F-127 contendo FS, observou-se um sinal de espalhamento mesmo em baixas temperaturas (até 10 graus, Figura 22F), enquanto para a micela de F-127 na ausência de FS a intensidade de espalhamento chegou a zero em temperaturas menores que 18 °C. Essa diferença no perfil de espalhamento com a incorporação das clorofilas indica que a presença destas moléculas aumentou a estabilidade térmica das micelas de F-127. Esse resultado pode ser explicado pela estabilização das micelas pela presença de aditivos (clorofila) reportada na literatura (Biswas et al., 2013). Nesse caso, a interação das clorofilas, moléculas altamente hidrofóbicas, com os grupos PO hidrofóbicos devem ser um fator importante na estabilização das micelas. A estabilização térmica das micelas poliméricas foi mais acentuada com a incorporação da Zn-Chld (Figura 22D e 22F) e apresentou a maior intensidade de espalhamento em relação às demais clorofilas, sugerindo uma interação muito forte e específica entre esse fotossensibilizador e os copolímeros. Sabe-se de estudos anteriores que a Zn-Chld é localizada na camada externa das micelas poliméricas e possui uma forte ligação com esses copolímeros (Gerola et al., 2011), o que pode justificar a grande estabilização térmica causada por essa molécula nas micelas de F-127. Adicionalmente, o aumento na estabilidade térmica das micelas de F-127 contendo Zn-Chld justifica as pequenas variações observadas nos espectros de absorção e emissão, discutidos anteriormente.

Após o abaixamento da temperatura, retornou-se a temperatura inicial. Os experimentos de RLS mostraram que a intensidade de espalhamento foi recuperada, indicando que as micelas de F-127 retornaram ao tamanho original. O mesmo procedimento foi efetuado nos experimentos de absorção e emissão. Os espectros de absorção das clorofilas retornaram a mesma intensidade de absorção, com exceção da Pheo. Já nos experimentos de emissão apenas os derivados forbídeos (Pheid e Zn-Chld)

recuperaram a intensidade inicial de emissão. Dessa maneira, as observações feitas indicam que a reconstituição das micelas ao tamanho original ocorre arrastando moléculas de água junto aos blocos de EO e PO, aumentando a micropolaridade dos ambientes. As clorofilas fitílicas localizadas no core da micela sofreram maior influencia, enquanto os derivados forbídicos localizados na corona, constituída principalmente de PEO (ambiente com maior micropolaridade – rico em água), tiveram suas características iniciais recuperadas.

Os estudos de estabilidade térmica dos formulados de clorofilas em P-123 mostraram a manutenção dos FS monomerizados (Figura 23) com uma pequena diminuição da intensidade de absorção, principalmente para a banda Soret; exceção é a Zn-Chld (Figura 23D e 23F) que mostrou uma variação menor na intensidade de absorção com a temperatura, assim como observado em F-127.

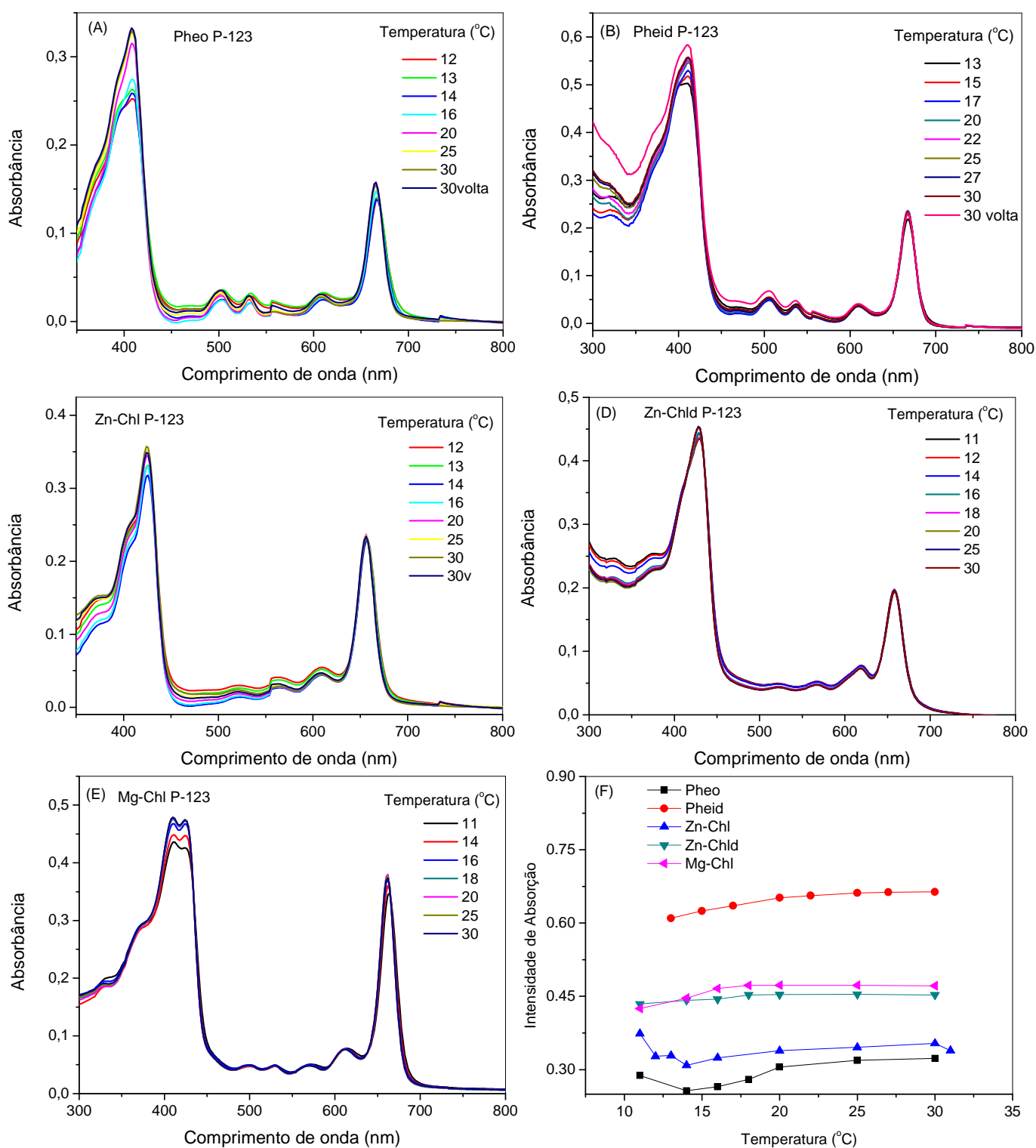


Figura 23. Espectros de absorção eletrônica dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em P-123 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de absorção da banda Soret dos FS em P-123 em função da temperatura.

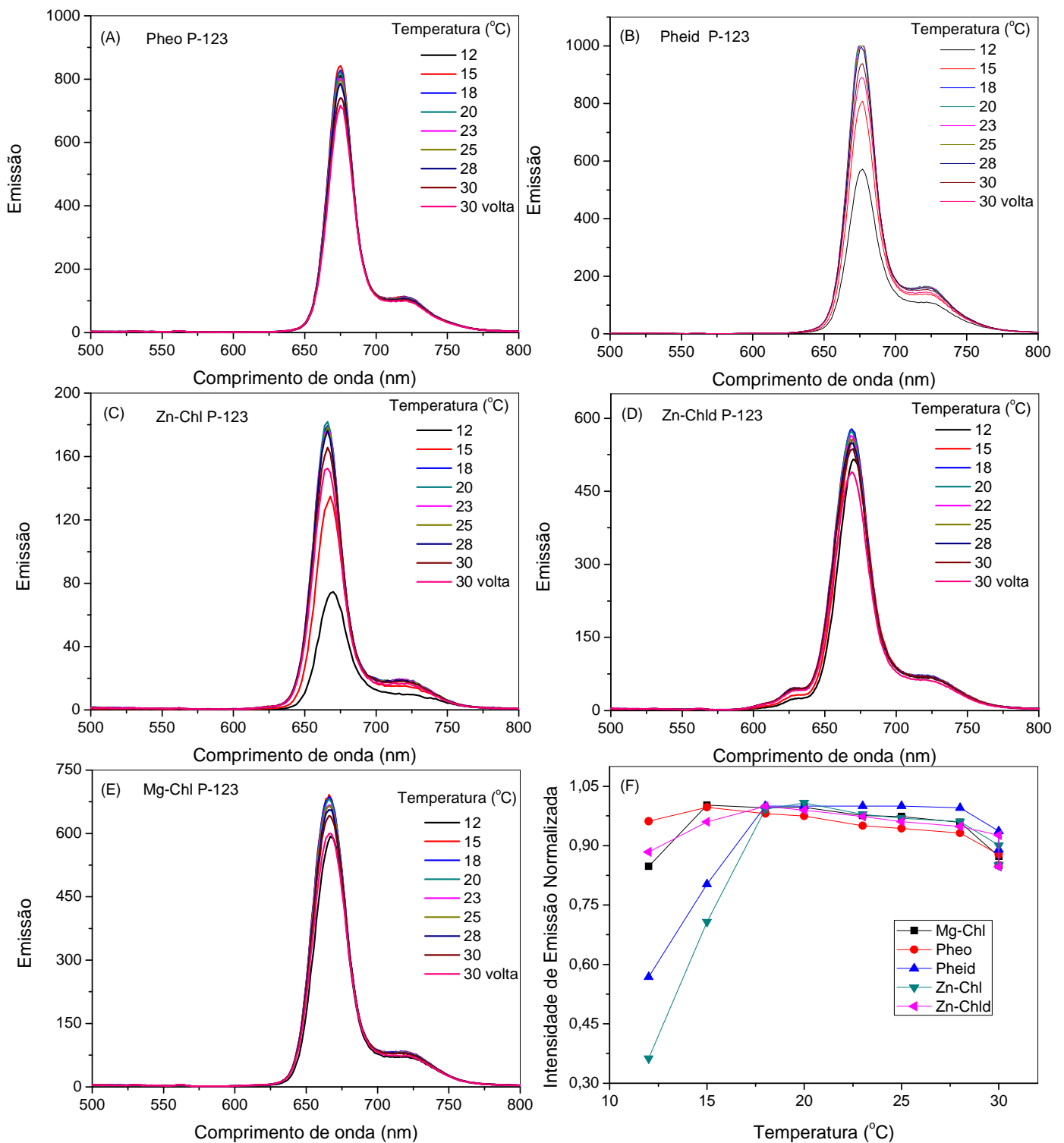


Figura 24. Espectros de emissão dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em P-123 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de emissão normalizada dos FS em P-123 em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial.

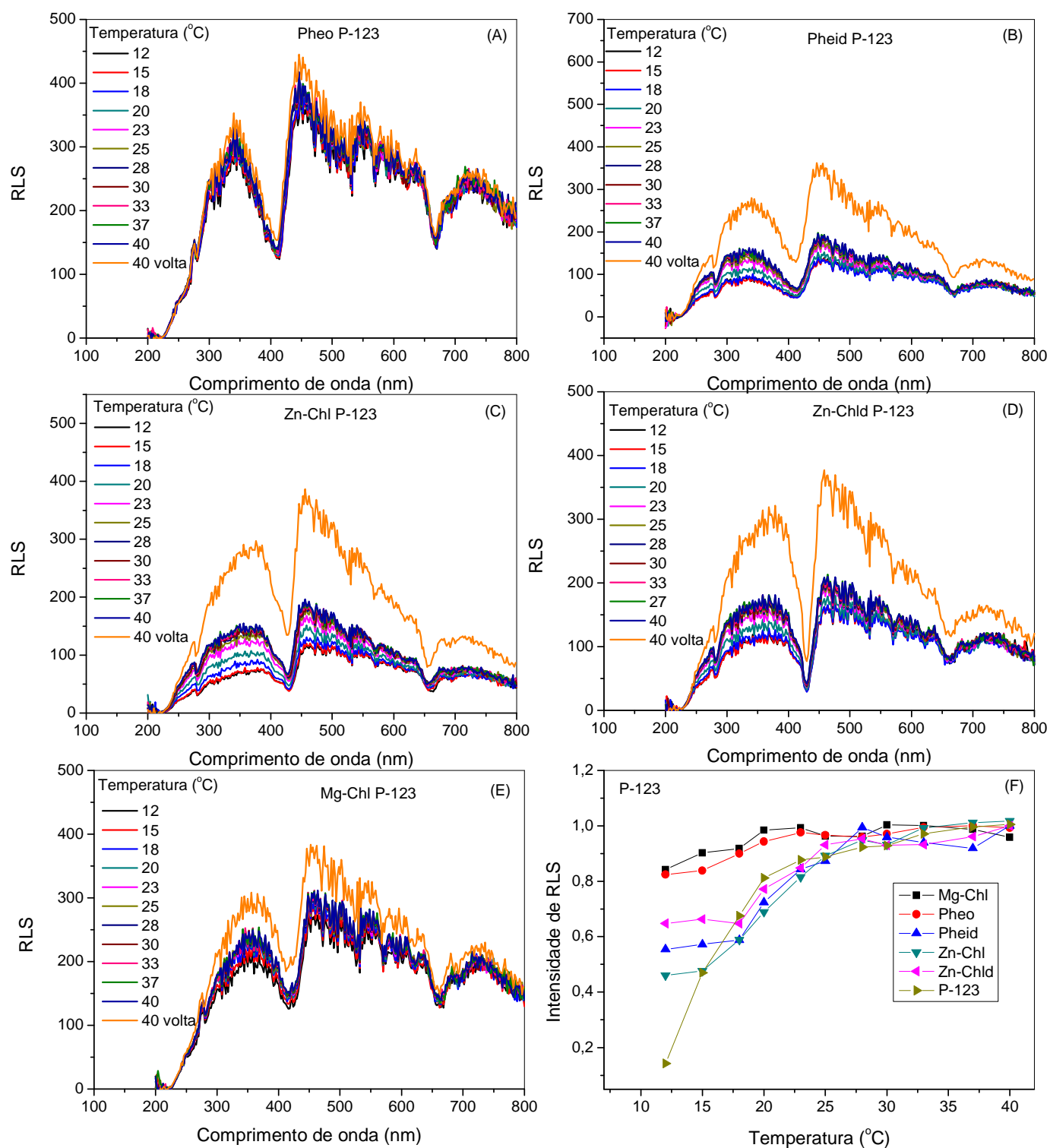


Figura 25. Espectros de RLS dos FS ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em P-123 (2%, m/v) com a variação da temperatura: (A) Pheo; (B) Pheid; (C) Zn-Chl; (D) Zn-Chld e; (E) Mg-Chl. (F) Intensidade de RLS em 374 nm normalizada em função da temperatura. A “volta” refere-se ao retorno à temperatura inicial

Nos estudos térmicos com P-123 verificou-se uma intensa diminuição da intensidade de emissão para o Pheid e a Zn-Chl, e uma pequena variação para as demais clorofilas (Figura 24). Esses resultados podem ser relacionados aos experimentos de RLS (Figura 25) que mostraram maior estabilidade térmica para as micelas poliméricas de P-123 contendo Mg-Chl, Pheo e Zn-Chld. Mesmo assim, pode-se verificar que todas as clorofilas influenciaram o perfil de estabilidade térmica das micelas (Figura 25F).

Para as micelas de P-123 houve um menor efeito da temperatura na diminuição do número de agregação, tamanho da micela, e nos entrelaçamentos entre as cadeias de copolímero e conseqüentemente no aumento da micropolaridade do meio, favorecendo a manutenção das características espectroscópicas das clorofilas. Como exemplo, os deslocamentos de Stokes determinados para as clorofilas formuladas em P-123 (Figura 26) foram constantes com a variação da temperatura, com pequenas variações para a Zn-Chl e a Zn-Chld em baixas temperaturas.

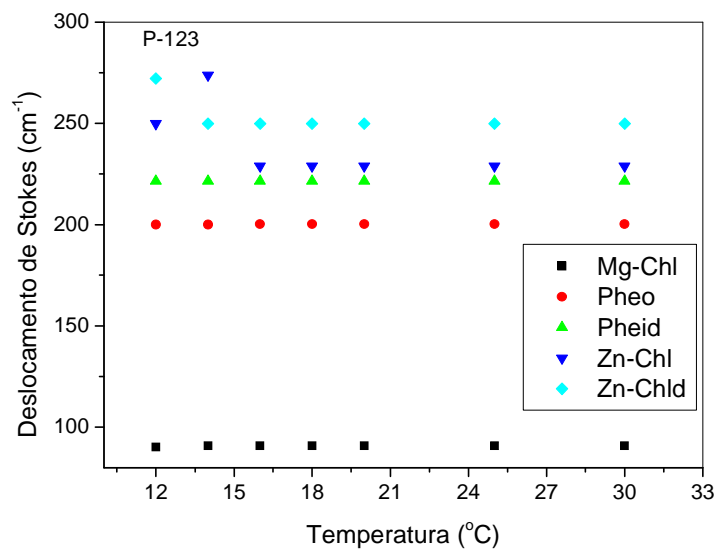


Figura 26. Deslocamento de Stokes para as clorofilas formuladas em P-123 com a diminuição da temperatura.

As intensidades de absorção das clorofilas voltaram aos valores iniciais ao retornar a temperatura de partida, contudo, as intensidades de emissão foram reduzidas,

o que indica a mudança das propriedades do microambiente micelar. Salienta-se que essas alterações foram menores do que as observadas em F-217. Além disso, as intensidades de espalhamento das micelas aumentaram significativamente ao retornar a temperatura inicial, principalmente para os sistemas cujas clorofilas apresentaram maior variação na intensidade de emissão, ou seja, as clorofilas que sofreram maior variação do meio. O aumento do tamanho micelar ao retornar a temperatura original pode ser explicado pela hidratação principalmente dos grupos EO com a diminuição da temperatura, que arrastam as moléculas de água na reorganização das micelas. Com a hidratação dos grupos EO há uma redução da repulsão entre as cadeias hidrofílicas do copolímero, fator limitante na autoassociação dos copolímeros e limitante para a formação de agregados relativamente pequenos, possibilitando a formação de micelas maiores (Biswas et al., 2013).

A maior estabilidade das micelas de P-123 em relação às micelas de F-127 pode ser associada a diferentes fatores envolvidos na formação das micelas. Por exemplo, um fator importante é a fração de grupos hidrofóbicos responsáveis pelas interações hidrofóbicas que promovem a micelização. Estudos reportam que o aumento da fração hidrofóbica diminui os valores de CMC e TMC de micelas poliméricas, ou seja, as favorecem termodinamicamente. Assim, a maior estabilidade térmica das micelas de P-123 pode ser associada a maior razão PPO/PEO em relação às micelas de F-127.

5.2.3. Estudos de supressão de fluorescência em sistemas micelares

A localização aproximada das Chls nas micelas poliméricas foi avaliada por experimentos de supressão de fluorescência com iodeto (supressor "aquo-solúvel") (Lakowicz, 2006), nos quais substratos localizados na parte interna da micela não são afetados, enquanto os FS expostos (parte externa) sofrem supressão de energia com consequente diminuição da intensidade de emissão. Nos sistemas micelares de P-123 e F-127 as clorofilas com a cadeia fitílica (Pheo, Mg-Chl e Zn-Chl) não sofreram supressão, indicando uma localização mais interna na região hidrofóbica. Enquanto as clorofilas sem a cadeia fitílica, Pheid e Zn-Chld, foram suprimidas pelo iodeto, como ilustrado para o Pheid na Figura 27. Essas observações indicam uma localização mais externa dos derivados forbídeos nas micelas em relação às clorofilas com a cadeia fitílica, devido à maior hidrofiliicidade dos primeiros. Os valores das constantes de Stern-Volmer determinados pela equação 3 (Figura 27B) para os derivados forbídeos são apresentados na Tabela 4.

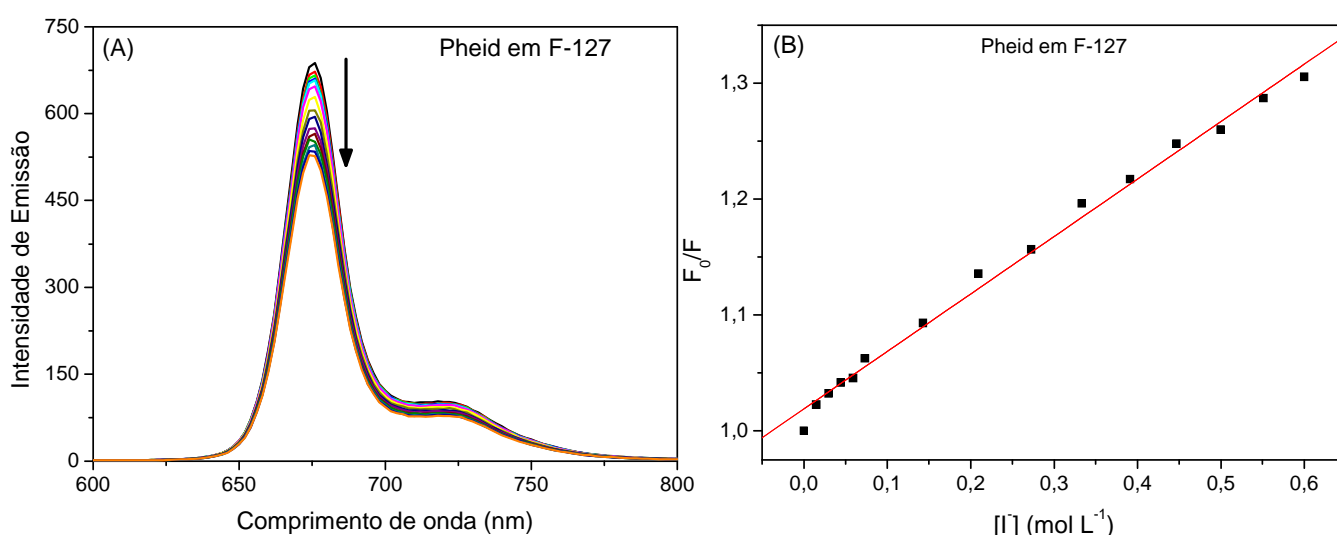


Figura 27. (A) Espectros de emissão de fluorescência do Pheid em F-127 (2%, m/v) com a adição de I^- . (B) Plot de Stern-Volmer do Pheid em F-127 (2%, m/v). Experimentos realizados a $30,0\text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc}} = 411\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emi}} = 675\text{ nm}$.

Tabela 4. Valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) das clorofilas em micelas poliméricas, a 30,0 °C.

FS	K_{SV} (L mol ⁻¹)	
	P-123	F-127
Pheid	0,31 ± 0,02	0,50 ± 0,01
Zn-Chld	0,17 ± 0,01	0,28 ± 0,01

O maior valor de K_{SV} obtido para o Pheid (Tabela 4) em ambos os sistemas micelares indica que esse fotossensibilizador possui a localização mais externa, seguido da Zn-Chld. A localização externa do Pheid nos sistemas micelares pode ser explicada pela presença de um grupo ácido-base negativamente carregado no pH de trabalho, o que inviabiliza a incorporação do Pheid na região hidrofóbica. Por outro lado, a Zn-Chld é a molécula mais hidrofílica dentre os estudados, como mostrado pelos dados de coeficiente de partição em água/octanol (Gerola et al., 2011), e assim o esperado seria que ela fosse localizada mais externamente em micelas em relação às demais clorofilas. Uma explicação pode ser a estrutura complexa da Zn-Chld onde o grupo carboxilato estaria coordenado ao metal (Gerola et al., 2011) o que poderia atenuar parcialmente a carga e favorecer uma maior quantidade do FS incorporado à micela, mesmo este ficando localizado mais externamente comparado aos compostos com cadeia fitílica.

Adicionalmente, a localização das clorofilas em micelas poliméricas pode ser confirmada pelos deslocamentos de Stokes mostrados na Tabela 3. Esses resultados possibilitaram estimar que as clorofilas com cadeia fitílica são localizadas na parte interna da micela, enquanto os forbídios estão na parte externa através da comparação dos valores de $\Delta\nu$ em micelas poliméricas e etanol. Além disso, a maior variação do valor de $\Delta\nu$ para o Pheid em micelas e etanol em comparação a Zn-Chld sugerem a

localização do Pheid em um ambiente mais polar. Esse resultado está em concordância com os estudos de supressão.

Os maiores valores de K_{SV} nos formulados de F-127 em relação aos formulados em P-123 (Tabela 4) podem ser explicados pela maior quantidade de grupos EO no primeiro, o que possibilita a maior difusão de supressores aquo-solúveis (Kabanov e Zhu, 2005) nesta camada externa das micelas, onde os FS estão localizados.

5.3. Formulação das clorofilas em sistemas lipossomais de DPPC

Assim como nos sistemas micelares, investigou-se inicialmente a monomerização das clorofilas em sistema lipossomal constituído de DPPC (estrutura na Figura 1C) pelo método da adição direta. De maneira similar aos fatos observados nos surfactantes poliméricos, os espectros de absorção eletrônica em DPPC apresentaram características de clorofilas autoagregadas, com alargamento das bandas e aparecimento de picos de agregados (não mostrado). Diante da ineficácia na monomerização dos FS pela adição direta em DPPC, optou-se pela formulação utilizando o método do filme fino (Lee, 1975). Os espectros de absorção eletrônica obtidos são apresentados na Figura 28A e mostraram a manutenção das propriedades espectroscópicas das clorofilas monoméricas (sem a presença de picos adicionais de autoagregados).

Os espectros de emissão de fluorescência dos derivados de clorofila formulados em DPPC são apresentados na Figura 28B. Observam-se picos intensos característicos dos FS no estado monomérico.

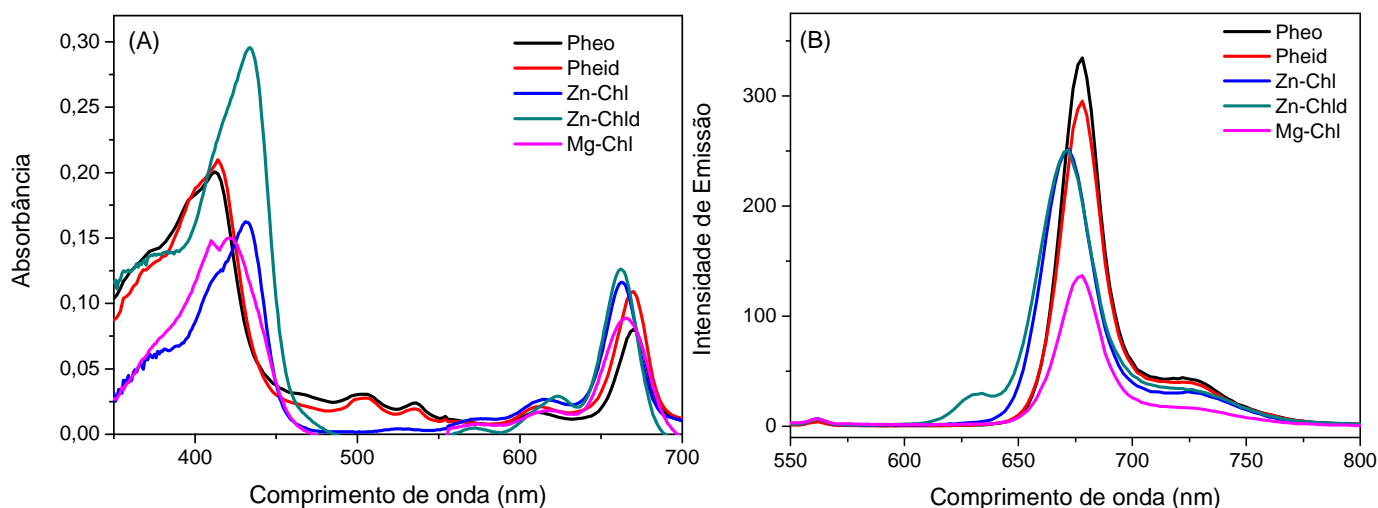


Figura 28. Espectros das clorofilas $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ formuladas em DPPC (2mg mL^{-1}) pelo método do filme fino: (A) Espectros de absorção eletrônica e (B) Espectros de emissão de fluorescência, a $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.3.1. Estudos de supressão de fluorescência em formulados lipossomais

Diferentemente dos resultados de supressão obtidos em micelas poliméricas, verificou-se para os formulados lipossomais de clorofilas contendo a cadeia fitílica uma queda inicial da intensidade de emissão relacionada à supressão, seguida de um aumento na intensidade de emissão com a adição de iodeto. Esse aumento pode ser explicado pela complexação do agente supressor I^- com as clorofilas. A coexistência desses processos nos formulados lipossomais inviabiliza a determinação da constante de Stern-Volmer. Ainda assim, pode-se concluir que mesmo as clorofilas com a cadeia fitílica estavam suscetíveis ao agente supressor e, portanto, possuem uma localização mais externa. Essa suposição é confirmada por estudos da literatura de localização de clorofilas em modelos de membrana (Lee, 1975) que reportam que o anel clorínico das clorofilas está na região limitante da bicamada lipídica, próximo da cabeça polar e a cadeia fitílica inserida na região hidrocarbônica apolar da bicamada lipídica em uma conformação estendida (Hurley and Tollin, 1982). Uma vez que o anel clorínico está

próximo a parte polar e rodeado pela fase aquosa, este pode interagir com moléculas de água (Murata e Sato, 1978) e/ou supressores aquo-solúveis.

Os valores de K_{SV} determinados para os derivados forbídicos (Pheid e Zn-Chld) formulados em DPPC (Tabela 5) foram próximos. Isto indica que ambos são localizados em regiões similares na bicamada lipídica, próximo à cabeça polar do fosfolípido (Yang et al., 1999) e, portanto, provavelmente tem uma posição similar às clorofilas com a cadeia fitílica. Esses resultados estão de acordo com estudos de localização da clorofilida (derivado de clorofila sem a cadeia fitílica) que mostraram uma localização próxima a cabeça polar da bicamada lipídica e similar ao precursor fitílico (Stillwell e Karimi, 1980). Ainda assim, o maior valor de K_{SV} para o Pheid sugere uma localização mais externa desse em relação a Zn-Chld.

Tabela 5. Valores da constante de supressão (K_{SV}) das clorofilas em DPPC por íons iodeto, a 30,0 °C.

FS	K_{SV} (L mol ⁻¹)
Pheid	1,40 ± 0,16
Zn-Chld	1,60 ± 0,05

Além disso, a localização mais externa das clorofilas nos lipossomos em relação às micelas poliméricas é confirmada pelo deslocamento batocrômico da banda Q para todas as clorofilas (incluindo as fitílicas) (Tabela 6). Esse deslocamento é reportado na literatura para clorofila em sistemas lipossomais (Chapman e Fast, 1968) e, é explicado pela localização do anel clorínico em ambientes polares, ou seja, próximo a cabeça polar do fosfolípido e possivelmente exposto ao ambiente aquoso (Murata e Sato, 1978).

Tabela 6. Comprimentos de onda de máxima absorção da banda Q das clorofilas em etanol e formuladas em DPPC.

	λ_{\max} (nm)	
	Etanol	DPPC
Mg-Chl	664	665
Pheo	667	670
Pheid	668	670
Zn-Chl	659	662
Zn-Chld	659	662

5.4. Determinação do potencial zeta

Os valores de potencial zeta (ζ) relacionados às cargas superficiais das partículas coloidais são apresentados na Tabela 7. Todas as partículas constituídas de micelas poliméricas de P-123 e F-127 na presença e ausência de FS apresentaram potencial de superfície negativa a 30 °C em água Mille-Q. Resultados similares foram observados em outros trabalhos envolvendo formulações a partir de copolímeros em bloco (Liu et al., 2005). Esse potencial negativo de superfície é devido a grande densidade eletrônica decorrente da presença dos oxigênios nos blocos EO, principais constituintes das superfícies desses tipos de micelas.

Tabela 7. Potencial zeta (ζ) das partículas constituídas de micelas poliméricas (P-123 e F-127) e de lipossomos (DPPC) na ausência (branco) e presença de FS, a 30 °C em água Mille-Q.

	Potencial zeta (mV)		
	F-127	P-123	DPPC
Branco	-28,0 ± 1,0	-17,4 ± 0,5	5,10 ± 0,1
Mg-Chl	-6,40 ± 0,6	-0,70 ± 0,5	0,86 ± 0,1
Pheo	-7,70 ± 0,3	-0,90 ± 0,7	1,44 ± 0,8
Pheid	-8,60 ± 0,2	-1,23 ± 0,5	-0,77 ± 0,4
Zn-Chl	-3,60 ± 0,1	-0,50 ± 0,2	0,58 ± 0,2
Zn-Chld	-12,3 ± 0,6	-1,60 ± 0,4	-2,10 ± 0,4

Os valores de potencial zeta obtidos mostraram que as micelas de F-127 possuem uma superfície com maior densidade de carga negativa do que as micelas de P-123 para todos os casos avaliados. Esse fato pode ser justificado pela maior quantidade de grupos EO na primeira micela, que apresentaram papel importante na densidade de carga superficial, mesmo essas micelas podendo assumir conformações e geometrias diferentes.

A incorporação das clorofilas nas micelas poliméricas diminuiu o caráter negativo da superfície das micelas. Essa variação encontrada é um indicativo de que as clorofilas influenciam diretamente nas propriedades das micelas. Isso porque a incorporação do FS às micelas modifica as interações presentes na formação e estabilização das mesmas devido à presença de interações adicionais entre FS e sistemas micelares.

Para as micelas de P-123 com a incorporação dos FS o potencial zeta foi aumentado de -17,4 mV (P-123 2% m/v) a valores próximos a zero, principalmente para os derivados com cadeia fitólica. Essa variação foi um pouco menos intensa para as

micelas contendo os derivados forbidos. A mesma tendência foi observada com a incorporação dos FS nas micelas de F-127. Esses resultados podem ser justificados pelo fato de que os derivados forbidos contendo uma densidade de carga negativa são localizados na camada externa das micelas.

A diminuição do potencial negativo da superfície das micelas com a incorporação dos FS pode ser um fator importante quando se pensa em aplicações biológicas, uma vez que as camadas celulares possuem uma densidade de carga negativa. Este efeito diminui a repulsão eletrostática entre micelas e biomembranas. Contudo as cargas presentes são um requisito para a estabilidade do formulado, de maneira que para o P-123 o potencial zeta de praticamente zero na presença dos derivados com cadeia fitilica pode levar a junção das micelas e conseqüentemente aumentar o tamanho do colóide bem como modificar suas propriedades. Esse fato pode ser associado à maior estabilidade térmica observada para os formulados de clorofila em P-123 na seção anterior.

Por outro lado, para os lipossomos constituídos de DPPC obteve-se uma densidade de carga superficial positiva (5,1 mV). Isso pode ser uma vantagem para o DPPC como sistema carreador em relação às micelas poliméricas, uma vez que o potencial positivo pode favorecer a sua interação com membranas biológicas. Assim como para as micelas poliméricas, a incorporação das clorofilas em lipossomos alterou os valores de potencial zeta. Com a incorporação dos FS o potencial zeta diminuiu tornando-se menos positivo. Essa variação foi mais acentuada para os derivados forbidos chegando a valores negativos, o que pode ser relacionado em parte à densidade de carga negativa do FS, além da possibilidade de mudanças conformacionais na cabeça polar do fosfolípido (Makino et al.; 1991).

5.5. Propriedades fotofísicas e fotodinâmicas das clorofilas formuladas em micelas poliméricas e lipossomo

5.5.1. *Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)*

A determinação do rendimento quântico de fluorescência de fotossensibilizadores é importante, uma vez que moléculas altamente fluorescentes não são eficientes para TFD. Isso ocorre porque a emissão de fluorescência é um processo concorrente à formação de oxigênio singlete conforme ilustrado na Figura 2. Assim, o rendimento quântico de fluorescência dos formulados de Chls foram determinados através da equação 7 e são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) das Chls em etanol, DPPC, P-123 e F-127.

Φ_F				
FS	DPCC	F-127	P-123	Etanol
Mg-Chl	0,07	0,16	0,16	0,06
Pheo	0,10	0,11	0,11	0,07
Pheid	0,15	0,16	0,16	0,30
Zn-Chld	0,10	0,16	0,16	0,11
Zn-Chl	0,15	0,12	0,12	0,18

Em etanol o valor de Φ_F para o Pheid monomérico é 0,30, enquanto para o Pheid agregado (dímero) esse valor é menor que 10^{-4} (Eichwurz et al., 2000). Como citado anteriormente, a autoagregação leva a diminuição da intensidade de fluorescência a

praticamente zero. Assim os valores obtidos de Φ_F , relativamente altos indicam que as clorofilas encontram-se formuladas na forma monomérica. Este resultado está em concordância com os discutidos anteriormente.

Os valores de Φ_F foram idênticos para todas as Chls em ambos os surfactantes estudados, o que indica que as mesmas estão localizadas em microambientes micelares similares. Além disso, pode-se inferir que ambas as micelas tiveram eficiências similares na monomerização das clorofilas quando preparadas pela técnica de dispersão sólida. Por outro lado, em sistemas lipossomais de DPPC o rendimento quântico de fluorescência das clorofilas (Mg-Chl e Zn-Chld) foi menor do que para os formulados micelares. Uma vez que as clorofilas apresentaram características espectrais de espécies monoméricas, em lipossomos pode-se ter o favorecimento de outros mecanismos de desativação do estado excitado, concorrente à emissão, como formação de oxigênio singlete e reações de fotobranqueamento. Adicionalmente, outro mecanismo de desativação do estado excitado é a supressão por colisões com a água (Lakowicz, 2006; Gracetto et al., 2010), sendo que o menor valor de Φ_F em lipossomos é consistente com a localização dos FS na região polar do fosfolipídio onde se tem altos teores de água.

5.5.2. *Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ)*

Os rendimentos quânticos de oxigênio singlete dos formulados de clorofila em micelas poliméricas ([FS]= 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e DPPC ([FS]= 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram determinados pela emissão do oxigênio singlete em torno de 1270 nm, utilizando-se o Pheid em D₂O/1% Triton X100/5% Etanol como padrão. Os valores de Φ_Δ obtidos (Tabela 9) foram elevados em todos os formulados estudados e relativamente próximos aos valores em etanol (Redmond e Gamlin, 1999) onde as clorofilas encontram-se monomerizadas.

Assim como para o Φ_F os valores de Φ_{Δ} foram similares para os formulados micelares.

Os altos valores de Φ_{Δ} reforçam o interesse desses sistemas para a TFD e PDI.

Tabela 9. Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) usando D₂O/1% Triton X100/5% Etanol como padrão.

FS	DPCC	F-127	P-123	Etanol
Mg-Chl	0,40	0,56	0,54	0,44
Pheo	0,49	0,53	0,50	0,60
Pheid	0,56	0,49	0,56	0,51
Zn-Chl	0,39	0,54	0,55	0,45
Zn-Chld	0,52	0,50	0,46	0,46

5.5.3. Processos de fotobranqueamento das clorofilas

As fontes de iluminação utilizadas nos ensaios de fotobranqueamento (LED, $\lambda_{\text{max}} = 663 \text{ nm}$, $P = 30 \text{ mW}$) apresentaram intensa sobreposição com todas as clorofilas estudadas (Gerola et al, 2011b).

Nos ensaios de fotobranqueamento das clorofilas formuladas em micelas poliméricas e lipossomos a Pheo e o Pheid mantiveram-se estáveis frente à radiação emitida pelo LED, enquanto a Mg-Chl, Zn-Chl e Zn-Chld foram rapidamente degradadas, como exemplificado para Zn-Chl em F-127 (Figura 29). Conhecidamente as clorofilas metaladas com Zn^{2+} e Mg^{2+} possuem alta tendência em sofrer fotobranqueamento (Gerola et al, 2011b). A decomposição dos FS quando expostos à luz pode ser uma vantagem quando se pensa em longos períodos para eliminação do corpo em aplicações *in vivo*. Por outro lado, os processos de fotobranqueamento levam

a redução da concentração do princípio ativo no sistema, e conseqüentemente, a diminuição da ação fotodinâmica com o tempo.

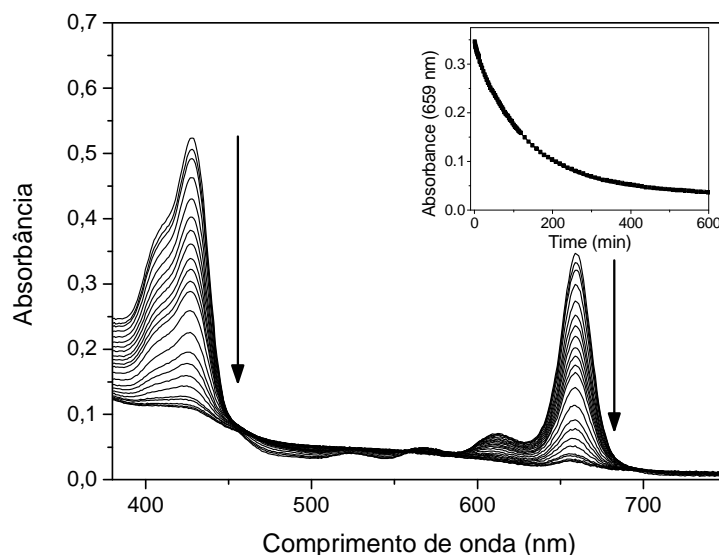


Figura 29. Sobreposição espectral da Zn-Chl ($4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em F-127 (2%, m/v) com iluminação contínua, a temperatura ambiente. As setas indicam a diminuição das bandas com a exposição à luz. O inserte apresenta a cinética de fotobranqueamento da Zn-Chl em F-127.

As cinéticas de fotobranqueamento foram monitoradas no máximo da banda Q (inserte na Figura 29). As constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) foram calculadas pelo ajuste das cinéticas ao modelo exponencial de primeira ordem apresentado na equação 9 e são mostradas na Tabela 10. A velocidade de fotobranqueamento dos FS seguiu a seqüência: Mg-Chl > Zn-Chld > Zn-Chl \gg Pheo \approx Pheid. A mesma tendência foi observada em etanol (Gerola et al, 2011b). Um dos mecanismos de fotobranqueamento de FS é a reação com o oxigênio singlete formado durante a iluminação (Bonnet e Martinez, 2001). Todas as clorofilas estudadas apresentam um alto rendimento quântico de oxigênio singlete, assim as maiores velocidades de degradação observadas para as clorofilas metaladas podem ser

explicadas pela maior interação destas com o $^1\text{O}_2$ em relação às clorofilas desmetaladas (Bonnet e Martinez, 2001). Isso porque o oxigênio pode ligar-se axialmente aos metais e a proximidade da espécie reativa de oxigênio ao FS pode aumentar sua oxidação. Adicionalmente, a menor estabilidade dos derivados forbídicos (Zn-Chld) sob irradiação em relação a seus precursores deve ser devido à diminuição do fator estérico advindo da ausência da cadeia fitílica próxima ao anel porfirínico, o que facilita a aproximação de espécies reativas.

Tabela 10. Constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) das clorofilas em etanol e sistemas micro-heterogêneos.

$k_{FB} (10^{-4} \text{ s}^{-1})$				
FS	F-127	P-123	DPPC	Etanol
Mg-Chl	$7,12 \pm 0,20$	$7,18 \pm 0,18$	$11,8 \pm 0,58$	$1,60 \pm 0,06$
Zn-Chl	$1,93 \pm 0,05$	$2,32 \pm 0,02$	$5,1 \pm 0,65$	$0,39 \pm 0,01$
Zn-Chld	$5,65 \pm 0,14$	$5,00 \pm 0,17$	$8,17 \pm 0,29$	$0,45 \pm 0,01$

Outro fator relevante nas velocidades de fotobranqueamento foi o meio no qual as clorofilas foram formuladas. A tendência dos FS sofrerem fotobranqueamento em relação aos meios foi DPPC > F-127 \approx P-123. Essa maior tendência das clorofilas em sofrer fotobranqueamento em DPPC pode ser explicada pela localização mais externa dos fotossensibilizadores nesse meio. O efeito da localização de FS em lipossomos na fotoestabilidade foi estudado por Sekher and Garbo que mostraram que um fotossensibilizador incorporado na bicamada lipídica (ambiente aprótico e apolar) é mais fotoestável do que os FS expostos à região polar da matriz lipídica (Sekher e

Garbo, 1993). Assim, nas micelas poliméricas a localização mais interna dos FS atua na fotoproteção do FS.

Estudos adicionais de fotobranqueamento das clorofilas em água foram realizados, sendo que nesse meio as clorofilas com a cadeia fitílica (Mg-Chl e Zn-Chl) não sofreram fotodecomposição (Gerola et al., 2011b) devido ao processo de autoagregação, que desfavorece processos fotoquímicos como a foto-oxidação do FS. Já a Zn-Chld sofreu fotodegradação em meio aquoso, cuja constante de velocidade foi $1,77 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. O maior valor de k_{FB} da Zn-Chld em água em relação aos formulados micelares e lipossomal mostra mais uma vez que a incorporação do FS no sistema carreador aumenta a estabilidade da clorofila frente à luz (Sekher e Garbo, 1993). Estudos da literatura têm reportado que a fotoestabilidade de porfirinas apresenta uma correlação com a constante dielétrica do meio (Spike, 1992); por exemplo, Reddi et al. mostraram que a velocidade de fotobranqueamento da protoporfirina de Sn (IV) em água é maior do que em metanol (Reddi et al., 1991), enquanto a incorporação de FS na região hidrofóbica de lipossomos protege o FS do fotobranqueamento em relação à fase aquosa (Handa et al., 1988).

Uma vez que a constante de velocidade de fotobranqueamento do FS é dependente da quantidade de luz absorvida pelo FS, para melhor avaliar a tendência das clorofilas sofrerem fotobranqueamento determinou-se o rendimento quântico de fotobranqueamento pela equação 10 (Tabela 11). Neste leva-se em consideração a potência e o grau de sobreposição da luz emitida pela fonte com a absorvida pelo FS. A ordem encontrada foi Zn-Chld > Mg-Chl > Zn-Chl. Apesar da Mg-Chl apresentar as reações de fotobranqueamento mais rápida, a Zn-Chld mostrou o maior rendimento quântico de fotobranqueamento. Uma vez que o valor de Φ_{FB} é dado pela razão de moléculas de FS degradadas pelo número de fótons absorvidos, tem-se que dentre os

compostos utilizados a Zn-Chld utiliza a menor quantidade de fótons para degradar o mesmo número de moléculas dentre as clorofilas estudadas.

Tabela 11. Valores de potência absorvida (P_{abs}), número de fótons absorvidos (N_{abs}) e de rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{FB}) das clorofilas formuladas em diferentes meios.

		P_{abs} (mW)	N_{abs} (10^{-9} mol)	Φ_{FB}
	Mg-Chl	10,6	89,7	0,05
F-127	Zn-Chl	10,9	138	0,02
	Zn-Chld	7,08	66,8	0,08
	Mg-Chl	10,9	92,0	0,07
P-123	Zn-Chl	12,3	151	0,02
	Zn-Chld	6,70	66,5	0,06
	Mg-Chl	9,60	60,0	0,31
DPPC	Zn-Chl	2,23	22,0	0,14
	Zn-Chld	4,95	39,0	0,24
	Mg-Chl	12,9	168	0,020
Etanol	Zn-Chl	11,9	173	0,005
	Zn-Chld	11,9	172	0,008

5.5.4. Inativação Fotodinâmica

5.5.4.1. Sistema de iluminação

O espectro de emissão do LASER utilizado como sistemas de iluminação nos ensaios sobre micro-organismos é apresentado na Figura 30. Uma alta sobreposição de emissão da fonte em relação à banda de absorção das Chls na região do vermelho (banda Q) foi observada, como exemplificado para os formulados em F-127 (Figura 30). Essa sobreposição é um requisito básico para eficiência de processos fotodinâmicos, uma vez que apenas a luz absorvida por um sistema pode causar alterações químicas (Rohatgi-Mukherjee, 1978).

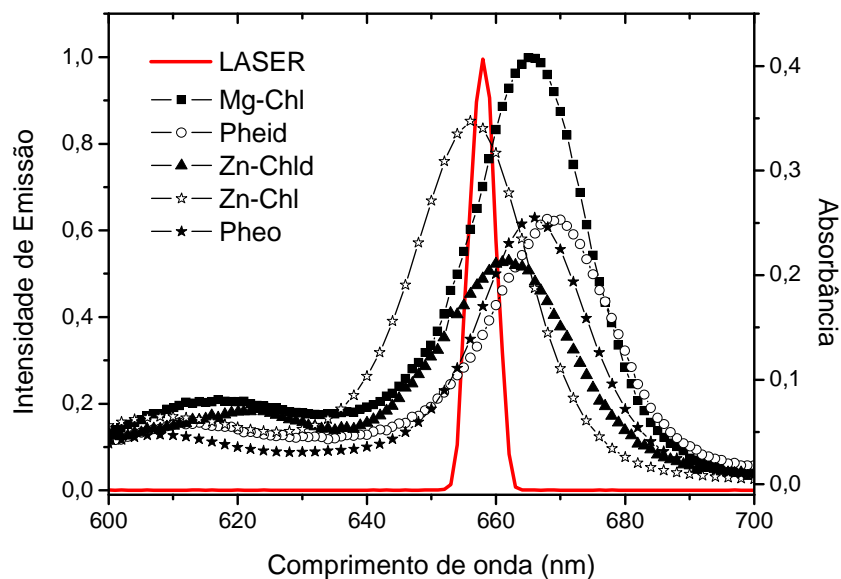


Figura 30. Espectros de absorção dos derivados de clorofila em F-127 e espectro de emissão do LASER utilizado nos ensaios fotodinâmicos.

Para efeito de comparação apresenta-se na Figura 31 a sobreposição espectral de absorção das clorofilas em F-127 com a emissão dos LEDs utilizados nos experimentos de fotobranqueamento. Os LEDs apresentaram uma sobreposição muito maior com a

banda Q das clorofilas do que o LASER. Entretanto, a potência do último (100 mW) é bem maior do que a potência dos LEDs (5 mW).

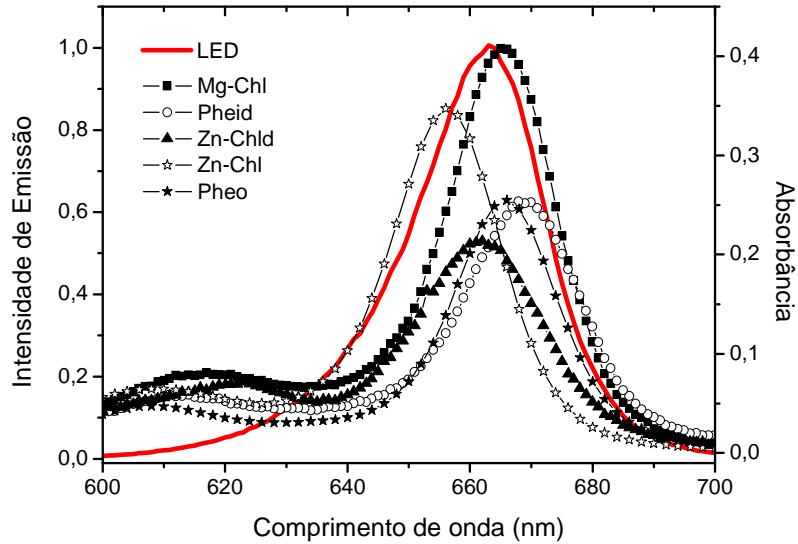


Figura 31. Espectros de absorção dos derivados de clorofila em F-127 e espectro de emissão do LED utilizado nos experimentos de fotobranqueamento.

Para avaliar a melhor fonte a ser utilizada nos ensaios fotodinâmicos, considerou-se a sobreposição espectral de emissão da fonte e absorção dos FS, o coeficiente de absorvidade molar das clorofilas e a potência das fontes. Assim, determinou-se a potência absorvida para todas as clorofilas, utilizando as duas fontes de iluminação a partir da equação 12.

$$P_{Abs} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P(\lambda) \cdot I_0(1 - 10^{-bc\epsilon}) d\lambda \quad (12)$$

onde, $I_0(1 - 10^{-bc\epsilon})$ é a intensidade de luz absorvida e P é a potência da fonte (mW).

Os valores de potência absorvida determinados foram maiores para o LASER como sistema de iluminação para todas as clorofilas (Tabela 12), devido ao prevailecimento da maior potência de emissão dessa fonte. Assim, optou-se pela utilização do LASER nos ensaios fotodinâmicos subsequentes.

Tabela 12. Potência absorvida pelas clorofilas em F-127 utilizando LED e LASER como fonte de iluminação.

	P_{abs} (mW)	
	LASER	LED
Mg-Chl	47,8	2,0
Pheid	27,9	1,4
Zn-Chld	35,9	1,4
Zn-Chl	53,0	1,7
Pheo	31,7	1,4

5.5.4.2. *Ensaios fotodinâmicos sobre S. aureus em sistema micelar e lipossomal*

A ação fotodinâmica das Chls formuladas em micelas poliméricas (F-127 e P-123) e lipossomos (DPPC) foi avaliada sobre a bactéria *S. aureus*. Na ausência de luz as clorofilas não apresentaram efeito tóxico intrínseco do composto sobre o micro-organismo. Experimentos controle dos surfactantes e lipossomos na ausência e presença de irradiação mostraram que os mesmos não são bactericidas.

Em sistemas micelares de F-127 e P-123 as clorofilas contendo a cadeia fitólica (Mg-Chl, Zn-Chl e Pheo) não apresentaram ação fotodinâmica sobre *S. aureus* com iluminação de 10 min (306 J cm^{-2}), como exemplificado para os formulados em F-127 na Figura 10. Uma vez que todas as clorofilas estudadas apresentam um alto rendimento quântico de oxigênio singlete, a ineficácia dessas clorofilas na inativação de *S. aureus* pode ser explicada pela localização interna dessas moléculas no core hidrofóbico das micelas poliméricas (Gerola et al., 2011). Isso ocorre porque as Chls com a cadeia fitólica no core da micela não interagem com as células alvo. Além disso, como o oxigênio singlete possui um tempo de vida relativamente curto em meio aquoso, e o mesmo foi formado no core da micela, onde o FS está alojado, o $^1\text{O}_2$ precisaria percorrer uma distancia relativamente grande para alcançar a célula alvo; possivelmente este sofre reações/desativações antes de alcançar o alvo.

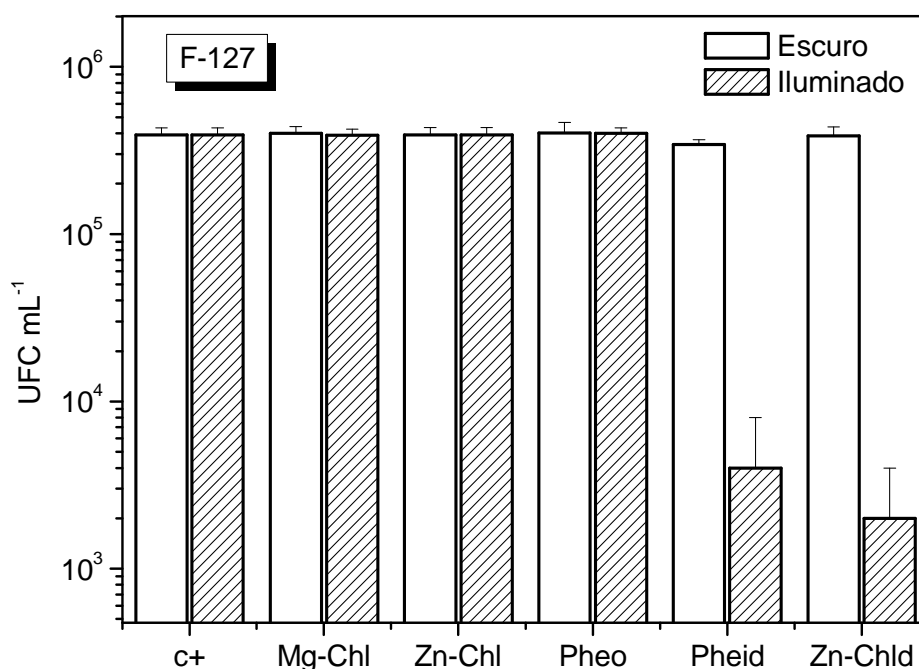


Figura 32. Taxa de mortalidade para diferentes Chls iluminadas com LASER sobre *S. aureus*. Amostras tratadas com FS $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em F-127 2 % (m/v) mantidas no escuro ou com iluminação de 10 min. C+ é o controle na ausência de FS. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão das medidas em triplicata.

Por outro lado os formulados micelares dos derivados forbídeos (Pheid e Zn-Chld) - sem a cadeia fitílica, foram eficientes na inativação fotodinâmica de *S. aureus* com redução de *c.a.* 2 ciclos logarítmicos de UFC mL⁻¹, com iluminação de 10 min (Figura 32). A grande eficiência desses na inativação de *S. aureus* demonstra à proximidade do FS com as células alvo, de maneira que o oxigênio singlete formado reage prontamente com a camada celular das bactérias. Este resultado novamente indica que os derivados forbídeos, mais hidrofílicos, se localizam na corona hidrofílica das micelas poliméricas (camada externa) (Gerola et al., 2011).

Microscopias de fluorescência dos ensaios utilizando Pheo e Pheid (4,0 μmol L⁻¹) formuladas em F-127 2% (m/v), sob iluminação de 20 min (612 J cm⁻²) e na ausência de luz foram realizadas utilizando-se o iodeto de propídio (PI) como sonda para avaliar a integridade funcional da membrana celular da bactéria (Figura 33 e 34). O marcador fluorescente utilizado (PI), com emissão no vermelho, somente penetra nas bactérias que apresentam a membrana danificada.

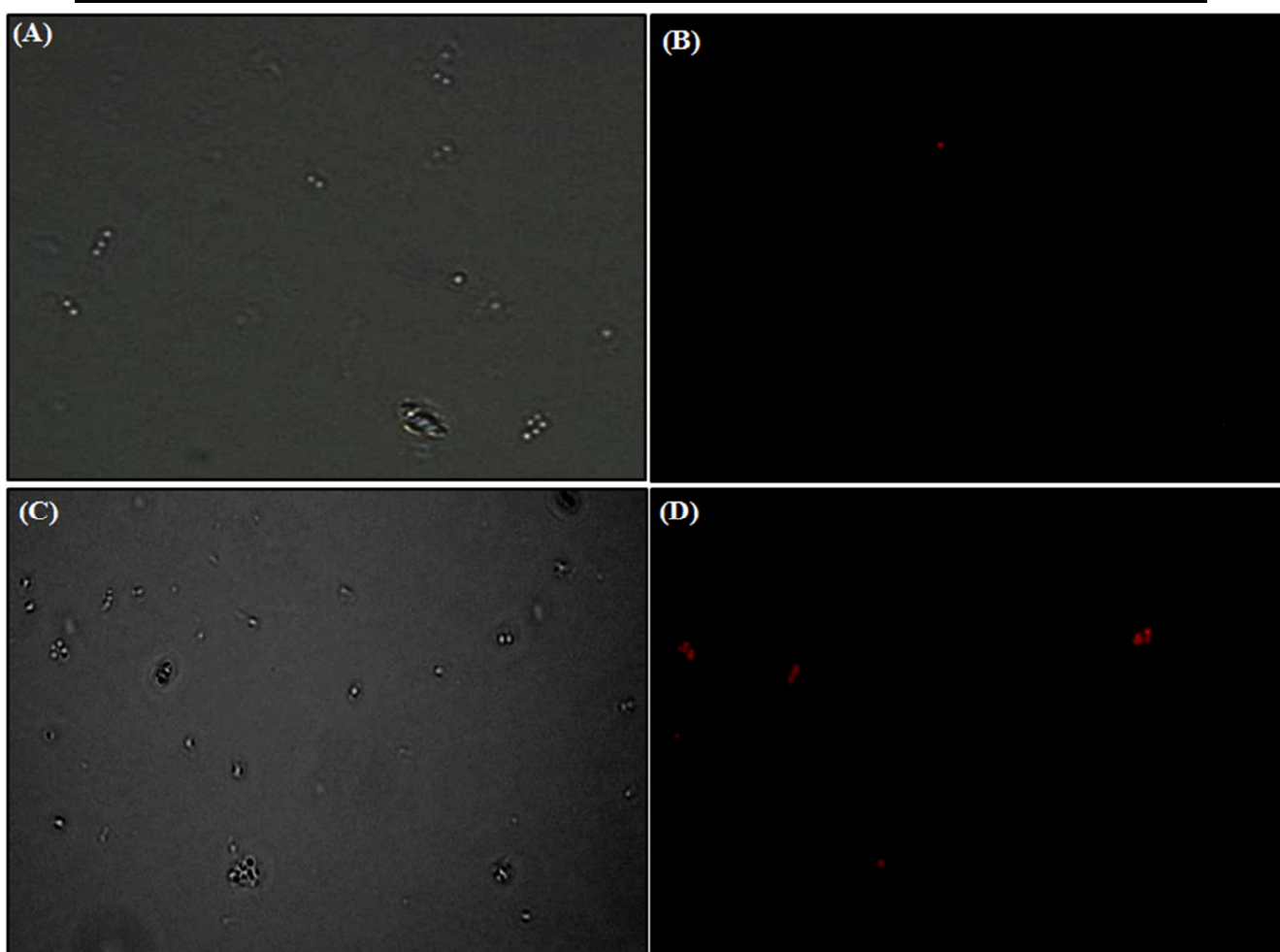


Figura 33. Imagens DIC (à esquerda) e suas correspondentes imagens de microscopias de fluorescência (à direita) de células de *S. aureus* com PI (vermelho). (A) e (B) Pheo em F-127 no escuro; (C) e (D) Pheo em F-127 após iluminação de 20 min (612 J cm^{-2}).

As imagens à esquerda nas Figuras 33 e 34 são referentes ao DIC e mostram as bactérias vivas e mortas; as imagens de microscopia de fluorescência correspondentes são apresentadas à direita. Na ausência de luz o marcador não penetrou na bactéria (Figuras 33B e 34B) para ambos os FS, ou seja, no escuro a integridade da membrana celular é mantida. O mesmo resultado foi observado para o controle na ausência de FS (não mostrado). Já as amostras tratadas com Pheo e Pheid formuladas em F-127 e submetidas à iluminação mostraram fluorescência vermelha demonstrando o dano à membrana e morte das células (Figuras 33D e 34D). Na comparação entre os dois FS

com iluminação de 20 min verifica-se que a inativação fotodinâmica do Pheid/F-127 levou a 100% de mortalidade das bactérias no campo da amostra analisado (Figuras 34C e 34D), enquanto a Pheo/F-127 matou uma fração das bactérias. O maior efeito da Pheo observado nos experimentos de microscopia de fluorescência em relação aos estudos anteriores é decorrente da maior dose de luz aplicada.

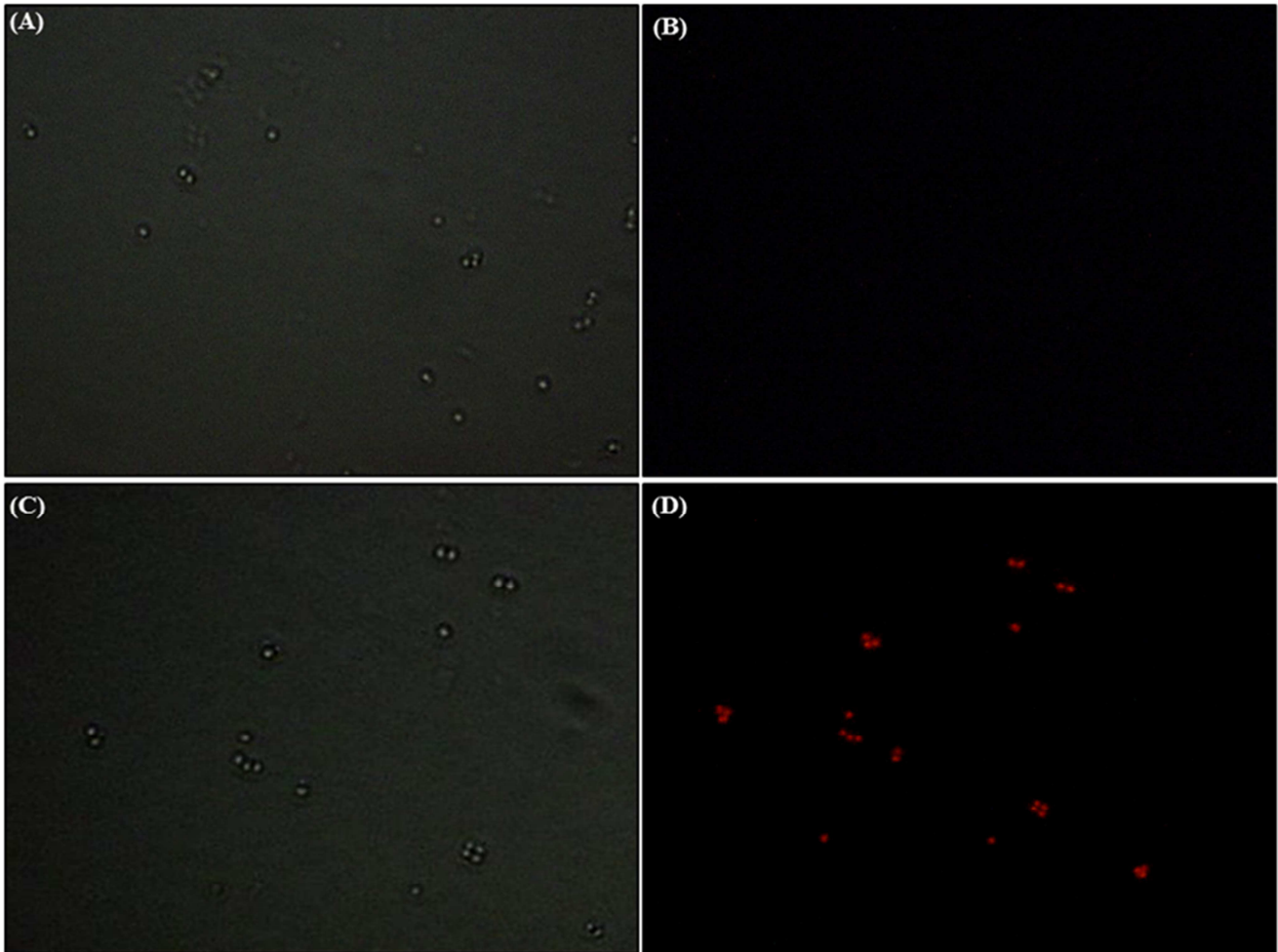


Figura 34. Imagens DIC (à esquerda) e suas correspondentes imagens de microscopias de fluorescência (à direita) de células de *S. aureus* com PI (vermelho). (A) e (B) Pheid em F-127 no escuro; (C) e (D) Pheid em F-127 após iluminação de 20 min (612 J cm^{-2}).

Assim como nos formulados micelares, a Mg-Chl formulada em DPPC não apresentou ação fotodinâmica significativa (Figura 35) sobre a bactéria *S. aureus*. Por outro lado, a Zn-Chl e a Pheo apresentaram ação, sendo esta potencializada com o

tempo de iluminação (Figura 35). A eficiência da inativação fotodinâmica sobre *S. aureus* em DPPC foi Pheo > Zn-Chl > Mg-Chl, cuja ordem pode ser relacionada ao rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) e processos de fotobranqueamento, uma vez que a Mg-Chl e a Zn-Chl apresentam os menores valores de Φ_{Δ} em DPPC (Tabela 9) e os maiores Φ_{FB} (Tabela 11). A ação fotodinâmica mais eficaz da Zn-Chl em relação à Mg-Chl pode ser explicada em parte pelo menor Φ_{FB} deste FS (Tabela 11). Como discutido anteriormente, reações de fotobranqueamento diminuem a concentração do FS e conseqüentemente reduz a capacidade de absorção de fótons (processo primário a TFD), comprometendo a geração de oxigênio singlete ou de outras espécies reativas de oxigênio. Assim a maior ação fotodinâmica da Pheo é creditada ao maior Φ_{Δ} em DPPC associado à maior estabilidade frente à luz.

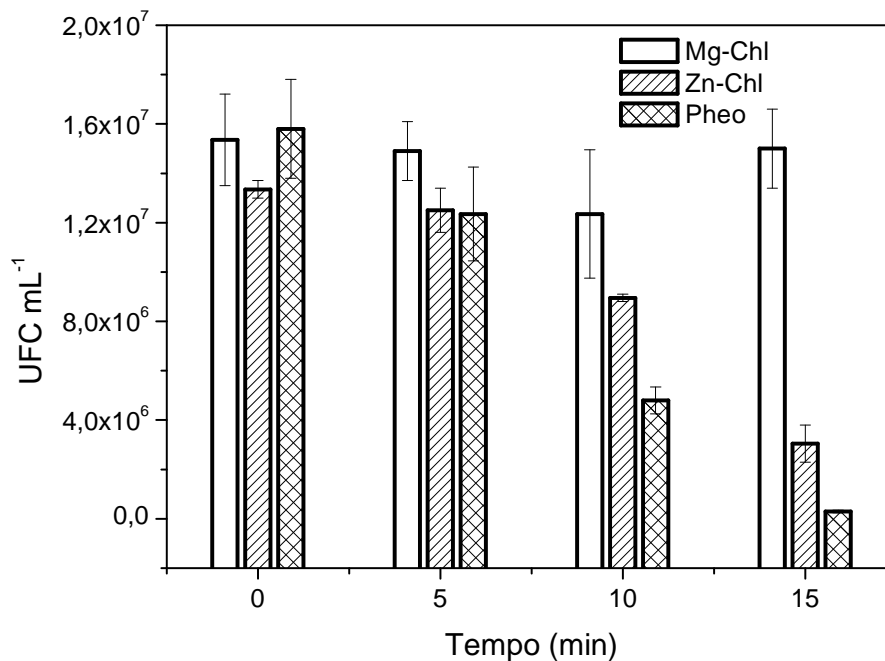


Figura 35. Taxa de mortalidade para Mg-Chl, Zn-Chl e Pheo ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DPPC (multilamelar) sobre *S. aureus* em diferentes tempos de iluminação com LASER (5, 10 e 15 min). Cada ponto representa a média \pm desvio padrão das medidas em triplicata.

Para avaliar a ação da Pheo formulada em DPPC sobre a integridade das membranas da bactéria foram realizadas microscopias de fluorescência como descrito anteriormente. As imagens de DIC apresentaram além das bactérias, as vesículas multilamelares de DPPC (Figura 36A). Como pode ser visto na Figura 36B a Pheo em DPPC matou todas as bactérias presentes na amostra analisada com a iluminação de 20 min (612 J cm^{-2}) (Figura 36A e 36B). Confirmando a maior ação desse FS formulado em DPPC em relação ao mesmo FS formulado em micelas poliméricas (Figura 33C e 33D).

Estudos de localização das clorofilas em sistemas lipossomais mostraram que a cadeia fitílica das clorofilas é intercalada as cadeias dos fosfolípidios presentes no lipossomo, enquanto o anel porfirínico se volta à cabeça polar da vesícula. Assim, a grande diferença observada para os derivados com a cadeia fitílica em micelas poliméricas, deve-se ao fato de que nesses sistemas essas clorofilas são incorporadas no core hidrofóbico das micelas dificultando a interação efetiva entre o FS e a membrana celular alvo, enquanto nos lipossomos essa interação é favorecida pela localização externa do anel porfirínico (responsável pela ação fotodinâmica). Além do que enquanto a membrana no lipossomo tem dimensão curta, as micelas poliméricas possuem camadas maiores (PPO e PEO).

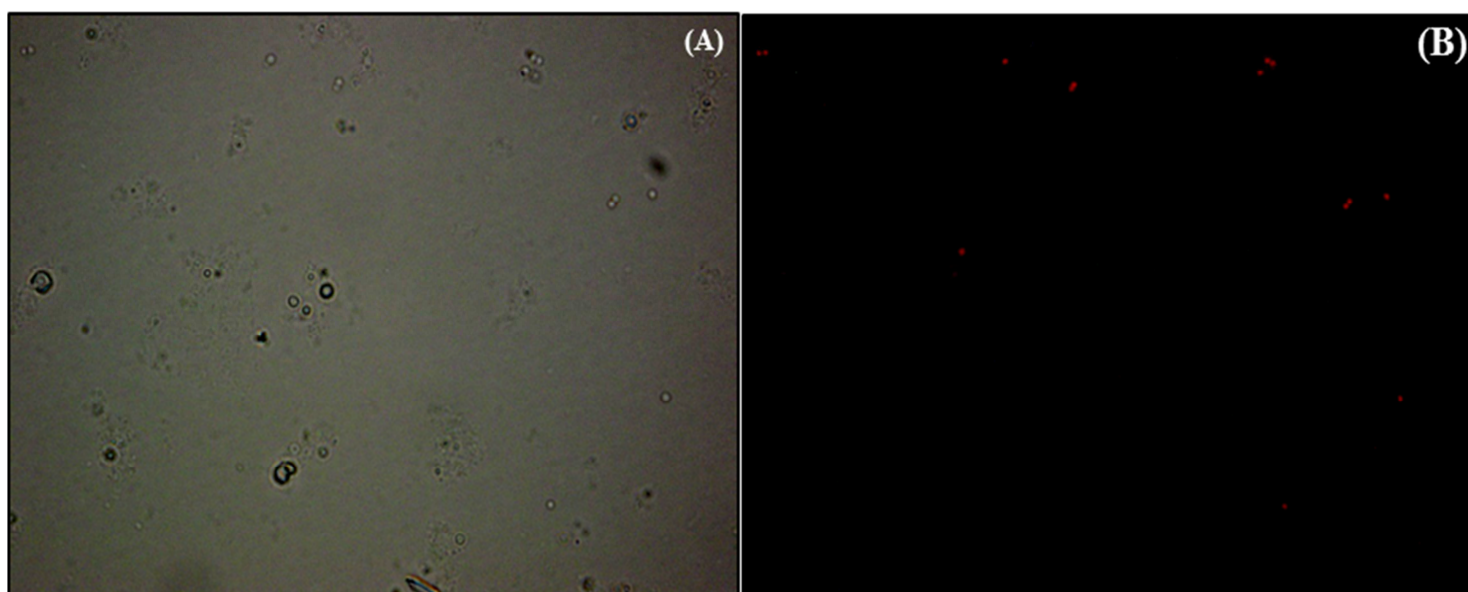


Figura 36. Imagem DIC (A) e sua correspondente imagem de microscopia de fluorescência (B) de células de *S. aureus* com PI (vermelho). Pheo ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em DPPC (multilamelar) após iluminação de 20 min (612 J cm^{-2}).

Assim como nos sistemas micelares, os derivados forbídeos formulados em DPPC foram os mais eficazes na inativação fotodinâmica de *S. aureus*. A diferença dos efeitos fotodinâmicos encontrada para os derivados forbídeos em diferentes sistemas de formulação pode ser averiguada na Figura 37. A ação fotodinâmica em micelas poliméricas de P-123 e F-127 foi estatisticamente igual, devido à similaridade estrutural da camada externa dessas micelas constituídas de grupos PEO, onde esses derivados provavelmente são localizados. Um aumento drástico da inativação fotodinâmica foi observado para as clorofilas formuladas em sistemas lipossomais de DPPC. Para o Pheid e a Zn-Chld a diminuição de UFC mL^{-1} foi de *c.a.* 2 ciclos logarítmicos em micelas poliméricas e de *c.a.* 3 ciclos logarítmicos em DPPC. A maior eficiência fotodinâmica dos FS formulados em lipossomos pode ser explicada pela tendência natural desses sistemas carreadores ligarem-se a determinados tipos de tecidos e células, uma vez que os lipossomos são química e biologicamente similares às células (Akbarzadeh et al., 2013). Além disso, estudos de localização dos derivados forbídeos

em DPPC usando iodeto (supressor solúvel em água) mostraram uma localização mais externa desses FS em lipossomo em relação aos sistemas micelares. Essa localização mais externa favorece a interação do FS com as membranas da bactéria, e consequentemente a maior eficiência fotodinâmica.

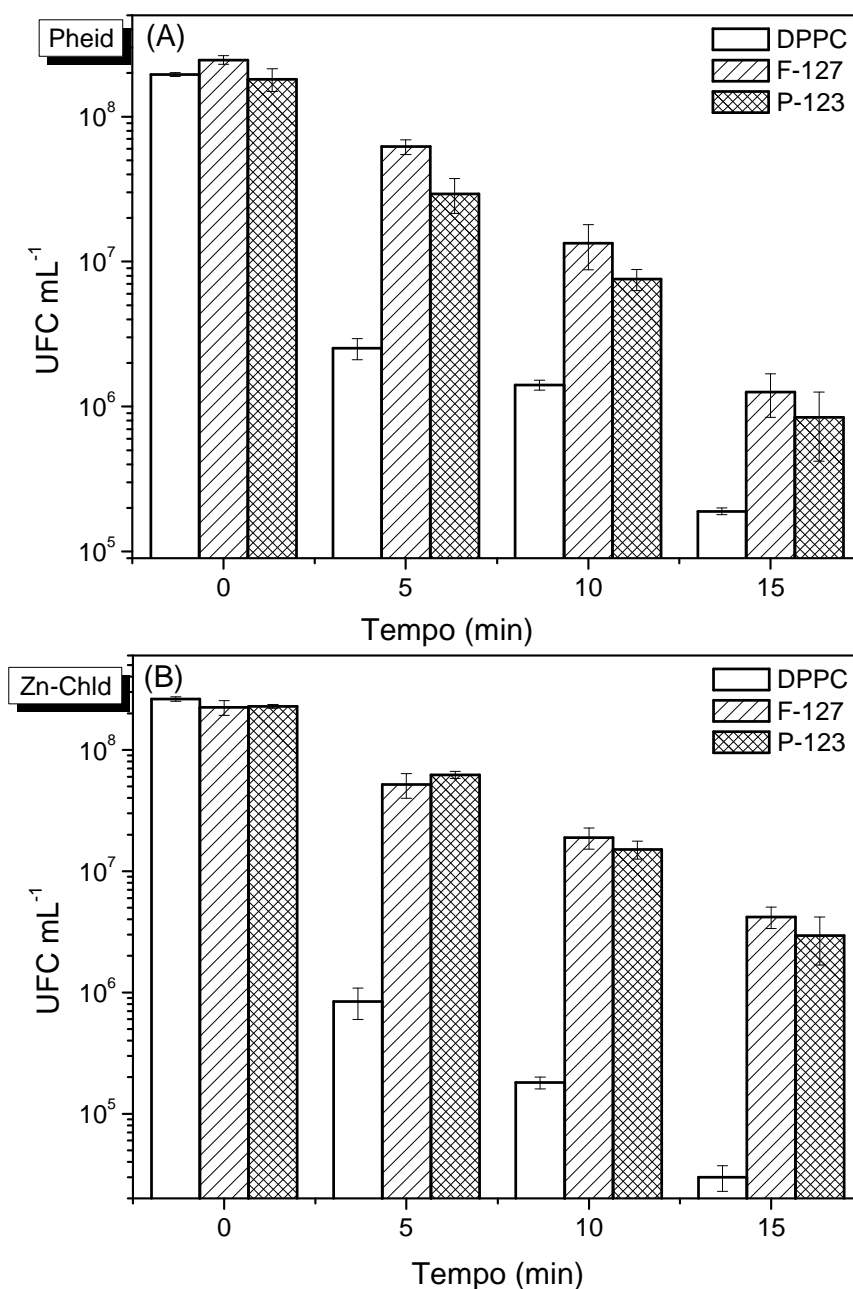


Figura 37. Inativação fotodinâmica do Pheid (A) e da Zn-Chld (B) em diferentes sistemas de formulação sobre *S. aureus* em função do tempo de iluminação. A concentração de FS foi de 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em P123 e F-127, e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em DPPC.

5.5.4.2.1. *Efeitos de PDI na ultraestrutura bacteriana por microscopia de transmissão eletrônica (TEM)*

A estrutura celular de *S. aureus* foi analisada por microscopia de transmissão eletrônica (TEM) para avaliar o efeito fotodinâmico em nível morfológico. Para isso, amostras de *S. aureus* (10^7 UFC mL⁻¹) foram preparadas em soluções contendo Pheid formulado em F-127 (2% m/v, [FS]= 4,0 μmol L⁻¹) e em DPPC (2 mg mL⁻¹, [FS]= 2,0 μmol L⁻¹). As amostras submetidas à iluminação (10 min) e mantidas no escuro foram analisadas por TEM, os resultados obtidos são apresentados na Figura 38 para o F-127 e na Figura 39 para o DPPC, respectivamente.

Análises morfológicas do controle, sem iluminação, (Figura 38A) apresentou a morfologia de "cocos" característica desse tipo de organismo, com ótima definição da parede celular e da membrana citoplasmática. A aplicação de PDI levou a diferentes efeitos na ultraestrutura do micro-organismo. Nas Figuras 38B e 38C verifica-se claramente a formação de lamelas e multilamelas tipo mesossomos, indicando alterações na membrana citoplasmática, instrumento na síntese da parede celular. Uma perturbação dessa membrana pode afetar a integridade da parede celular (Spesia e Durantini, 2013; Valduga et al., 1993). Além disso, obteve-se a formação de regiões elétron-transparente contendo alto teor de ácidos nucleicos (Valduga et al., 1993) nas Figuras 38A, 38B e 38C. Estudos de inativação fotodinâmica mostraram que a formação dessas regiões ocorreu antes do tempo necessário de iluminação para formação das lamelas tipo mesossomo. Além disso, na Figura 38D observou-se a ruptura da membrana citoplasmática e variabilidade na espessura da parede celular. Adicionalmente, as células sofreram alteração em sua morfologia com diminuição da densidade eletrônica no citoplasma. Pequenas alterações foram observadas nas células

controle (Figura 38A), provavelmente devido ao processamento ao qual as amostras foram submetidas, porém essas alterações não são comparáveis ao efeito causado pelas aplicações fotodinâmicas.

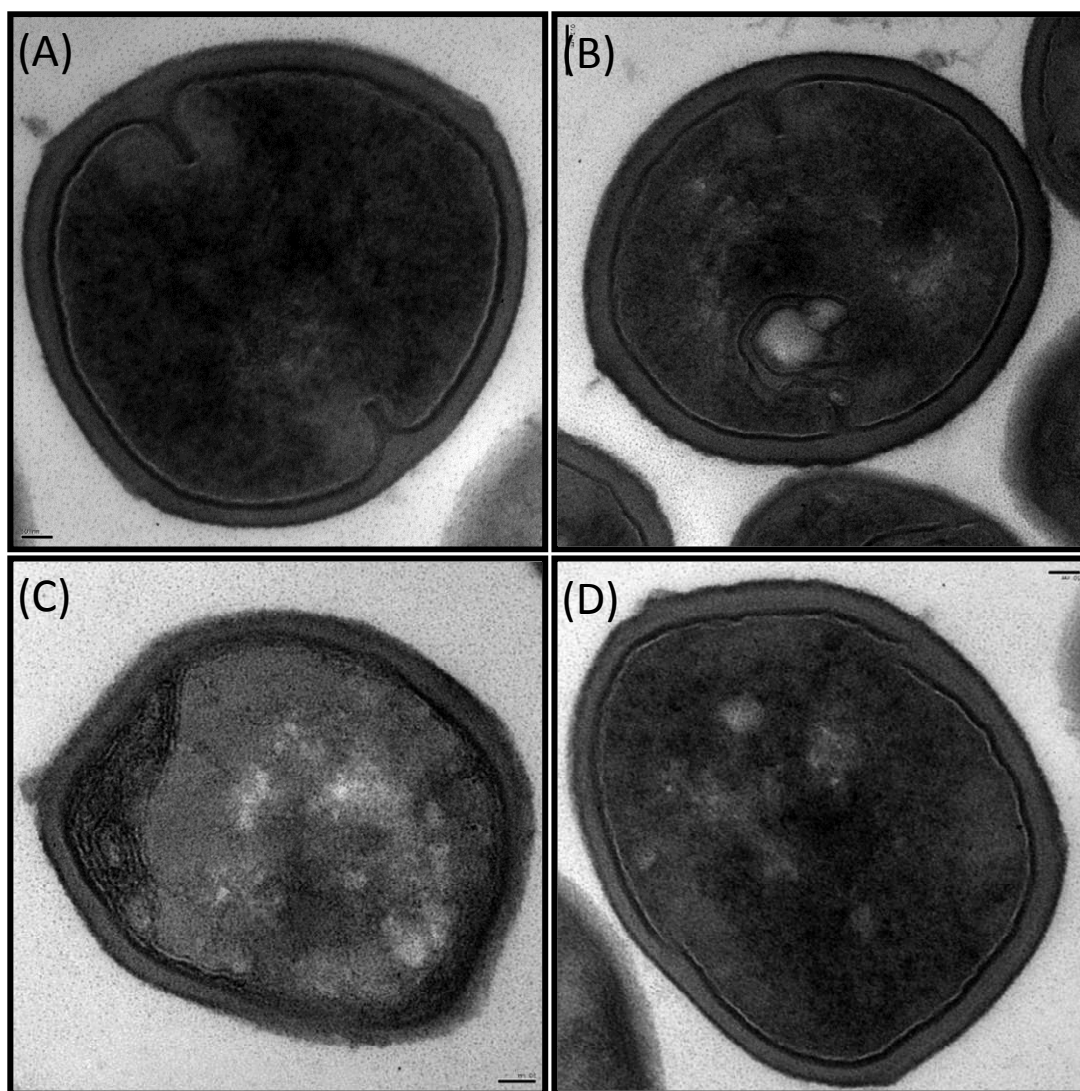


Figura 38. Análise ultraestrutural de *S. aureus*. (A) Controle sem iluminação; (B), (C) e (D) após PDI com Pheid em F-127 (2% m/v, [FS]= 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 10 min de iluminação.

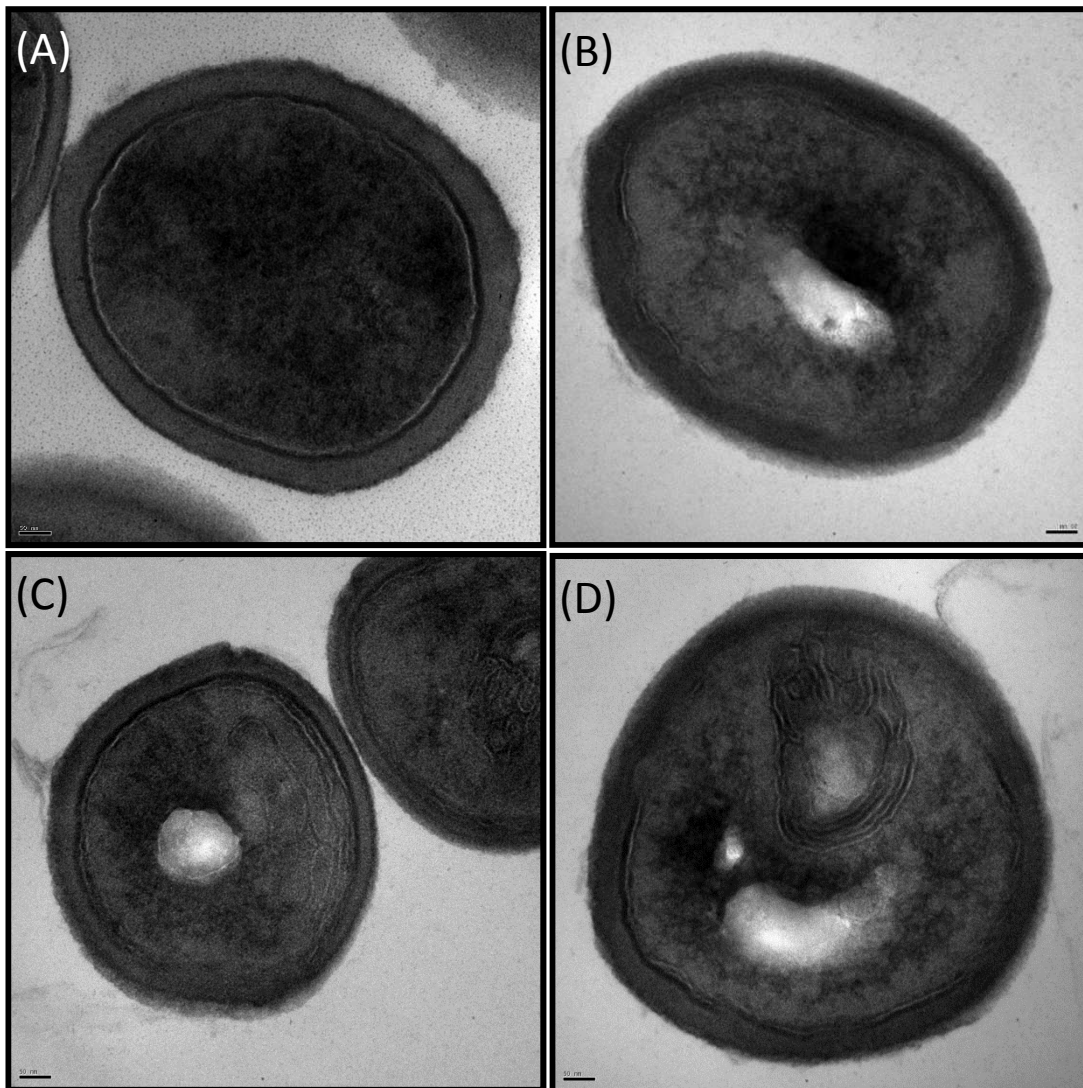


Figura 39. Análise ultraestrutural de *S. aureus*. (A) Controle sem iluminação; (B), (C) e (D) após PDI com Pheid em DPPC (2 mg mL^{-1} , $[\text{FS}] = 2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e 10 min de iluminação.

Os efeitos morfológicos causados sobre *S. aureus* usando Pheid em DPPC como FS (Figura 39) foram similares aos observados em micelas de F127, com formação de lamelas tipo mesossomos e regiões elétron-transparentes. As células controle assim como em F-127 apresentaram boa definição da parede celular e da membrana citoplasmática. Contudo após a aplicação da TFD a região citoplasmática e a parede celular apresentaram uma aparência mais homogênea, indicando danos à membrana citoplasmática.

Portanto, mudanças ultraestruturais analisadas por TEM mostraram que a PDI interfere nas funções da membrana podendo afetar sítios de biossíntese de membranas estimulando o acúmulo de macromoléculas e levando a alterações na estrutura da membrana celular. Isto pode levar a inabilidade para multiplicar e produzir bactérias viáveis. Portanto, pode-se estimar que os principais alvos de ação fotodinâmica desses formulados sobre *S. aureus* são a membrana citoplasmática e os ácidos nucleicos.

5.5.4.2.2. *Adsorção das clorofilas pelas células bacterianas*

Determinou-se a quantidade de FS adsorvido pelas bactérias em todos os sistemas de formulação avaliados (Tabela 13). A quantidade de clorofila ligada às bactérias foram maiores quando o sistema carreador utilizado foi constituído de DPPC, mesmo partindo-se de uma menor concentração de FS em DPPC em relação às micelas poliméricas.

Analisando os resultados em DPPC verifica-se que a quantidade de moléculas/UFC foi praticamente constante para todas as clorofilas. Ressalta-se o fato desses FS apresentarem uma localização similar no lipossomo, o que pode justificar a similaridade de concentração adsorvida independentemente da estrutura das clorofilas. Associa-se à maior concentração de FS adsorvida nas bactérias a maior ação fotodinâmica das clorofilas formuladas em DPPC. Os menores efeitos observados para os derivados com a cadeia fitílica sobre as bactérias deve-se provavelmente a fatores estéricos, que podem dificultar a distribuição do FS a sítios específicos.

A concentração de clorofilas adsorvidas pelos micro-organismos foi praticamente idêntica para os sistemas carreadores de F-127 e P-123. Fato que justifica a similaridade nos ensaios fotodinâmicos. Em micelas a adsorção dos derivados

forbidos pelo micro-organismo foram maiores do que dos derivados com a cadeia fitilica, fato que justifica a maior atividade dos primeiros. A menor ação da Zn-Chld em relação ao Pheid em micelas vai ao encontro com a menor concentração de FS adsorvido. A pequena ação fotodinâmica dos derivados fitílicos em micelas poliméricas é decorrente além dos fatores estéricos pela baixa concentração de FS junto ao micro-organismo.

Tabela 13. Moléculas de FS adsorvidas pelos micro-organismos.

	FS adsorvido (10^5 moléculas/célula)		
	DPPC	F-127	P-123
Mg-Chl	$9,9 \pm 0,8$	$0,2 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,4$
Zn-Chl	$11,5 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,3$
Pheo	$12,0 \pm 0,7$	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
Pheid	$12,9 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,2$
Zn-Chld	$12,7 \pm 0,9$	$2,8 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,1$

5.5.4.2.3. *Determinação do valor D*

O tempo necessário para inibição de 90 % dos micro-organismos (valor D) foi calculado para as clorofilas formuladas em micelas poliméricas e vesículas multilamelares de DPPC. Os valores D obtidos para os derivados forbidos em micelas poliméricas de P-123 e F-127 foram estatisticamente iguais (Tabela 14). Os mesmos FS formulados em DPPC precisaram de menor tempo de iluminação para erradicação de 90% das bactérias, mesmo utilizando-se uma concentração de FS 2 vezes menor nesses formulados.

Tabela 14. Valores D (min) obtidos para as clorofilas formuladas em F-127, P-123 ([FS]= 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e DPPC ([FS]= 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) frente a *S. aureus*. Utilizando Laser de diodo (100 mW, $\lambda_{\text{max}}= 658 \text{ nm}$) como fonte de iluminação.

FS	DPPC	F-127	P-123
Mg-Chl	-	-	-
Zn-Chl	23 \pm 3,8	-	-
Pheo	13 \pm 2,0	-	-
Pheid	5,1 \pm 0,2	6,63 \pm 0,1	6,53 \pm 0,1
Zn-Chld	3,7 \pm 0,4	8,88 \pm 0,1	7,95 \pm 0,1

A inativação fotodinâmica do Pheid em micelas poliméricas foi maior do que a da Zn-Chld, como pode ser visto na Tabela 14 pelo menor tempo necessário para erradicação de 90% dos micro-organismos. Uma vez que os derivados forbídicos apresentam rendimento quântico de oxigênio singlete muito próximos (Tabela 9), a diferença observada pode ser explicada pela localização mais externa do Pheid em relação à Zn-Chld em micelas poliméricas (Gerola et al., 2011) e maior estabilidade frente à luz. Além disso, estudos de ligação de Chls às bactérias mostraram a maior adsorção do Pheid em formulados micelares do que da Zn-Chld (Tabela 13). Por outro lado, em sistemas lipossomais a ação fotodinâmica da Zn-Chld sobre *S. aureus* foi maior do que a do Pheid, mesmo o primeiro composto sofrendo reações de fotobranqueamento. Estudos de localização realizados em lipossomo mostraram que a Zn-Chld possui a localização mais externa em relação ao Pheid. Essa localização mais externa da Zn-Chld provavelmente favorece a interação do FS com as membranas da bactéria, levando a inativação mais eficiente para esse FS.

Os valores D obtidos para as clorofilas formuladas em micelas poliméricas (P-123 e F-127) e sistemas lipossomais de DPPC (Tabela 14) foram promissores, com baixas concentrações de FS e tempo de iluminação relativamente curto para erradicação das bactérias. Além disso, estudos futuros devem ser realizados com diferentes linhagens de células e organismos, com boas perspectivas.

6. Conclusões

A formulação da clorofila *a* (Mg-Chl) e seus derivados Pheo, Pheid, Zn-Chl e Zn-Chld em micelas poliméricas (P-123 e F-127) e sistemas lipossomais de DPPC levou à monomerização das clorofilas e manutenção das propriedades espectroscópicas e fotofísicas (rendimento quântico de fluorescência e oxigênio singlete) das mesmas, o que possibilitou a aplicação desses FS em ensaios fotodinâmicos.

Os formulados micelares apresentaram alta estabilidade temporal e térmica. A estabilidade térmica desses formulados foi dependente de interações específicas entre o FS e o copolímero. As micelas poliméricas apresentaram uma densidade de carga superficial negativa, enquanto os lipossomos apresentaram um potencial de superfície positivo, indicando que os últimos são sistemas carreadores mais promissores para aplicação em membranas celulares, com densidade de carga negativa. A incorporação dos FS afetaram os potenciais de superfície dos sistemas carreadores, aproximando-se de zero e diminuindo a estabilidade das suspensões.

Nos formulados micelares as clorofilas com a cadeia fitílica (Mg-Chl, Zn-Chl e Pheo) localizaram-se no core hidrofóbico da micela enquanto os derivados forbídeos (Pheid e Zn-Chld) na camada externa hidrofílica. Por outro lado, as clorofilas com a cadeia fitílica nos formulados lipossomais organizaram-se de maneira que o anel clorínico foi localizado na região limitante da bicamada lipídica, próximo da cabeça polar e a cadeia fitílica inserida na região hidrocarbônica apolar da bicamada. Já os derivados forbídeos foram incorporados na monocamada externa do lipossomo próximo à cabeça polar do fosfolipídio.

As clorofilas desmetaladas Pheo e Pheid mantiveram-se estáveis frente à luz, enquanto as clorofilas metaladas com Zn^{2+} e Mg^{2+} sofreram fotobranqueamento. A

ordem de velocidade de degradação das clorofilas foi Mg-Chl > Zn-Chld > Zn-Chl em todos os formulados estudados, mesma ordem obtida em etanol. O processo de fotobranqueamento das clorofilas foi dependente do meio no qual as moléculas foram incorporadas. A sequência da velocidade de degradação obtida foi DPPC > F-127 > P-123.

Os derivados de clorofila levaram à erradicação da bactéria *S. aureus*. O sistema carreador constituído de lipossomo DPPC potencializou a ação fotodinâmica dos FS, que foi dependente de processos de fotobranqueamento, localização Φ_{Δ} e adsorção das clorofilas nas células bacterianas. Adicionalmente, mudanças ultraestruturais analisadas por TEM mostraram que os principais alvos de ação fotodinâmica desses formulados sobre *S. aureus* são a membrana citoplasmática e os ácidos nucleicos.

Assim, a inativação fotodinâmica da bactéria *S. aureus* mostrou que os derivados de clorofila são potenciais FS para PDI, principalmente os derivados forbídeos (Pheid e Zn-Chld) formulados em lipossomos.

7. Referências

Agostiano, A.; Catucci, L.; Colofemmina, G.; Della Monica, M. e Scheer, H. Relevance of the chlorophyll phytyl chain on lamellar phase formation and organisation. *Biophysical Chemistry*, **2000**, 84, 189-194.

Agostiano, A.; Catucci, L.; Cosma, P. e Fini, P. Aggregation processes and photophysical properties of chlorophyll a in aqueous solutions modulated by the presence of cyclodextrins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2003**, 5, 2122-2128.

Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Samiei, M.; Kouhi, M. e Nejati-Koshki, K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, **2013**, 8(1), 102-111.

Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X. H.; Childs, C. e Sibata, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 27-42.

Ballschmiter, K. e Katz, J. J. An Infrared Study of Chlorophyll-Chlorophyll and Chlorophyll-Water Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, **1969**, 91 (10), 2661-2677.

Biswas, S.; Vaze, O.S.; Movassaghian, S. e Torchilin, V.P. Polymeric Micelles for the Delivery of Poorly Soluble Drugs. Em: *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*. Editado por: Douroumis, D. e Fahr, A., JohnWiley & Sons, Ltd., **2013**, 411-455.

Bjorn, L. O.; Papageorgiou, G. C.; Blankenship, R. E. e Govindjee. A viewpoint: Why chlorophyll a? *Photosynthesis Research*, **2009**, 85-98.

Bonneau, S.; Maman, N. e Brault, D. Dynamics of pH-dependent self-association and membrane binding of a dicarboxylic porphyrin: a study with small unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2004**, 1661, 87-96.

Bonnett, R. e Martínez, G. Photobleaching of Sensitizers used in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron*, **2001**, 57 (591), 9513-9547.

Brandis, A.S.; Salomon, Y. e Scherz, A. Chlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy. Em: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*. Editado por: Grimm, B.; Porra, R.J.; Rüdiger, W. e Scheer, H. Springer, Illinois, **2006**, 461.

Caragheorgheopol, A.; Caldararu, H.; Dragutan, I.; Joela, H. e Brown, W. Micellar structure of a poly (ethylene oxide)/poly (propylene oxide)/poly (ethylene oxide) triblock copolymer in water solution, as studied by the spin probe technique. *Langmuir*, **1997**, 13, 6912–6921.

Chapman, D. e Fast, P.G. Studies of chlorophyll-lipid-water systems. *Science*, **1968**, 160, 188–189.

Cunderlikova, B.; Gangeskar, L. e Moan, J. Acid-base properties of chlorin e₆: relation to cellular uptake. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1999**, 53, 81-90.

Čunderlíková, B.; Kaalhus, O.; Čunderlík, R.; Mateasik, A.; Moan, J. e Kongshaug, M. pH-Dependent modification of lipophilicity of porphyrin-type photosensitizers. *Photochemistry and Photobiology*, **2004**, 79(3), 242–247.

DeRosa, M. C. e Crutchley, R. J. Photosensitized Singlet Oxygen and its Applications. *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**, 233-234, 351-371.

Demidova, T.N. e Hamblin, M.R. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2005**, 2329-2335.

Dolmans, D. E.; Fukumura, D. e Jain, R. Photodynamic therapy for cancer. *Nature*, **2003**, 3, 380-387.

Dolphin, D. *The porphyrins. Physical Chemistry. Part A (vol. III)*. Academic Press Inc., New York, **1978**, 463.

Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J. e Peng, Q. Photodynamic Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, **1998**, 90, 889-905.

Drzewiecka-Matuszek, A.; Skalna, A.; Karocki, A.; Stochel, G. e Fiedor, L. Effects of heavy central metal on the ground and excited states of chlorophyll. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **2005**, 10(5), 453–462.

Dujardin, E.; Laszlo, P. e Sacks, D. The Chlorophylls. *Journal of Chemical Education*, **2003**, 52 (11), 742-744.

Dutt, G. B. How critical micelle temperature influences rotational diffusion of hydrophobic probes solubilized in aqueous triblock copolymer solutions. *The journal of physical chemistry. B*, **2005**, 109(11), 4923–4928.

Eichwurzel, I.; Stiel, H. e Röder, B. Photophysical studies of the pheophorbide a dimer. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, **2000**, 54, 194–200.

Erkoç, Ş. e Erkoç, F. Structural and electronic properties of porphyrin skeleton of chlorophyll. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, **2002**, 579, p. 41–44.

Fennema, O. R. *Food Chemistry*, 2^a ed., Marcel Dekker, Inc., New York, **1985**.

Fennema, O. R. *Química de los Alimentos*, Acribia, Zaragoza, **2000**.

Fiedor, L.; Stasiek, M.; Mysliwa-Kurdziel, B. e Strzalka, K. Phytol as one of the Determinants of Chlorophyll Interactions in Solution. *Photosynthesis Research*, **2003**, 78, 47-57.

Gabrielli, D.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A. J. e Baptista, M. S. Binding, Aggregation and Photochemical Properties of Methylene Blue in Mitochondrial Suspensions. *Photochemistry and Photobiology*, **2004**, 79 (3), 227-232.

Gerola, A.P.; Tsubone, T.M.; Santana, A.; de Oliveira, H.P.M.; Hioka, N. e Caetano, W. Properties of chlorophyll and derivatives in homogeneous and microheterogeneous systems. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2011**, 115, 7364-7373.

Gerola, A. P.; Santana, A.; França, P. B.; Tsubone, T.M.; de Oliveira, H.P.M.; Caetano, W.; Kimura, E. e Hioka, N. Effects of metal and the phytyl chain on chlorophyll derivatives: physicochemical evaluation for photodynamic inactivation of microorganisms. *Photochemistry and photobiology*, **2011b**, 87, 884–894.

Gouterman, M. Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*, **1961**, 6, 138-163.

Gracetto, A.C.; Batistela, V.R.; Caetano, W.; de Oliveira, H.P.M.; Santos, W.G.; Cavalheiro, C.C.S. e Hioka, N. Unusual 1, 6-Diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH) Spectrophotometric Behavior in Water/Ethanol and Water/DMSO Mixtures. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2010**, 21(8), 1497–1502.

Grant, C.D.; Deritter, M.R.; Steege, K.E.; Fadeeva, T.A. e Castner, E.W. Fluorescence probing of interior, interfacial, and exterior regions in solution aggregates of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers. *Langmuir*, **2005**, 21(5), 1745–52.

Grant, C.D.; Steege, K. E.; Bunagan, M. R. e Castner, E. W. Microviscosity in multiple regions of complex aqueous solutions of poly(ethylene oxide)-poly(propylene

oxide)-poly(ethylene oxide). *The journal of physical chemistry. B*, **2005b**, 109(47), 22273–22284.

Gurinovich, G.P.; Sevchenko, A.N. e Solovev, K.N. The Spectroscopy of the Porphyrins. *Soviet Physics Uspekhi*, **1963**, 6 (1), 67-105.

Hadjur, C.; Lange, N.; Rebstein, J.; Monnier, P.; van den Bergh, H. e Wagnièreset, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1998**, 45, 170–178.

Hamblin M. R. e Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical Photobiology Science*, **2004**, 3(5), 436-450.

Handa, T.; Takeuchi, H.; Takagi, H.; Toriyama, S.; Kawashima, Y.; Komatsul, H. e Nakagaki, M. Reactivity of singlet oxygen generated by the photosensitization of tetraphenylporphyrin in liposomes. *Colloid and Polymer Science*, **1988**, 266(8), 745–752.

Hoogevest, P.V.; Leigh, M. e Fahr, A. Liposomes as Intravenous Solubilizers for PoorlyWater-Soluble Drugs. Em: *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*. Editado por Douroumis, D. e Fahr, A., JohnWiley & Sons, Ltd., **2013**, 36.

Huie, R. E. e Neta, P. Chemistry of Reactive Oxygen Species. Em: *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. Editado por: Gilbert, D. L. e Colton, C. A., Kluwer Academic Publishers, New York, **2002**, 33-63.

Hurley, J. e Tollin, G. Photochemical energy conversion in chlorophyll-containing lipid bilayer vesicles. *Solar Energy*, **1982**, 28(3), 187-196.

Hynninen, P. H. e Lotjomen, S. Preparation of Phorbin Derivatives from Chlorophyll Mixture Utilizing of Selective Hydrolysis. *Communications*, **1980**, 539-541.

Jori, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1996**, 36, 87-93.

Kabanov, A.V. e Zhu, J. Pluronic Block Copolymers for Drug and Gene Delivery. Em: *Polymeric Drug Delivery Systems*, Editado por: Kwon, G. S., Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2005**, 577-613.

Kearns, D. R. Physical and Chemical Properties of singlet molecular oxygen. *Chemical Reviews*, **1971**, 4, 395-427.

Kennedy, J. C. Introduction. Em: *Photodynamic Therapy with ALA A Clinical Handbook*. Editado por: Pottier, R.; Krammer, B.; Stepp, H. e Baumgartner, R. RSC Publishing, Cambridge, **2006**, 1-14.

Kessel, D.; Luguya, R. e Vicente, M. G. H. Localization and Photodynamic Efficacy of Two Cationic Porphyrins Varying in Charge Distribution. *Photochemistry and Photobiology*, **2003**, 78 (5), 431-435.

Kim, H.; Gias, E. M. e Jones, M. The adsorption of cationic liposomes to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Colloids and Surfaces A: A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1999**, 149, 561-570.

Komaromy, A.; Boysen, R. I.; Zhang, H.; McKinnon, I.; Fulga, F.; Hearn, M.T.W. e Nicolau, D.V. Micro-structures modulate bacterial cell viability and attachment. *Microelectronic Engineering*, **2009**, 86, 1431-1434.

Krammer, B.; Malik, Z.; Pottier, R. e Stepp, H. Basic Principles. Em: *Photodynamic Therapy with ALA A Clinical Handbook*. Editado por: Pottier, R.; Krammer, B.; Stepp, H. e Baumgartner, R. RSC Publishing, Cambridge, **2006**, 30-67.

Kranz, S.; Guellmar, A.; Völpel, A.; Gitter, B.; Albrecht, V. e Sigusch, B.W. Photodynamic suppression of *Enterococcus faecalis* using the photosensitizer mTHPC. *Lasers in surgery and medicine*, **2011**, 43, 241-248.

Kwon, G. L. *Polymeric Drug Delivery Systems*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2005**.

Küpper, H.; Spiller, M. e Küpper, F. C. Photometric Method for the Quantification of Chlorophylls and their derivatives in Complex Mixtures: Fitting with Gauss-Peak Spectra. *Analytical Biochemistry*, **2000**, 286, 247-256.

Küpper, H.; Džedić, R.; Svoboda, A.; Hála, J. e Kroneck, P.M.H. Kinetics and efficiency of excitation energy transfer from chlorophylls, their heavy metal-substituted derivatives, and pheophytins to singlet oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2002**, 1572, 107-113.

Lasic, D.D. *Liposomes: from physics to applications*, D.D. Lasic., 1 ed. Amsterdam, **1993**.

Lasic, D. Applications of liposomes. Em: *Handbook of Biological Physics*. Editado por: Lipowsky, R. e Sackmann, E. California: Elsevier Science B.V. **1995**, 491–519.

Lasic, D.D. Novel applications of liposomes. *Trends in biotechnology*, **1998**, 16, 307–21.

Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3^a ed., Springer, New York, **2006**.

Lee, A.G. Segregation of chlorophyll a incorporated into lipid bilayers. *Biochemistry*, **1975**, 14(20), 4397–4402.

Limantara, L.; Koehler, P.; Wilhelm, B.; Porra, R. J. e Scheer, H. Photostability of Bacteriochlorophyll a and Derivatives: Potential Sensitizers for Photodynamic Tumor Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, **2006**, 82, 770-780.

Lin, C.; Mcglashen, M.; Hu, S.; Shim, Y. Smith, K.M. e Spiro, T.G. Modeling the bonding changes in chlorophyll cation radicals: resonance Raman spectroscopy of nickel (II) methyl pyropheophorbide *a*. *Inorganica Chimica Acta*, **1996**, 252, 179–184.

Liu, S. Q.; Tong, Y. W. e Yang, Y. Y. Thermally sensitive micelles self-assembled from poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide) for controlled delivery of paclitaxel. *Molecular BioSystems*, **2005**, 1, 158–65.

Liu, R. *Water-Insoluble Drug Formulation*, 2^a Ed., Taylor & Francis Group, New York, **2008**, 307.

Liu, R.; Forrest, M.L. e Kwon, G.S. Micellization and Drug Solubility Enhancement Part II: Polymeric Micelles. Em: *Water-Insoluble Drug Formulation*, Editado por: Liu, R., 2^a Ed., Taylor & Francis Group, New York, **2008**, 307.

Liu, R.; Cannon, J.B. e Paspal, S.Y.L. Liposomes in Solubilization. Em: *Water-Insoluble Drug Formulation*. Editado por: Liu, R. 2^a ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2008b**, 375.

Macdonald, I.J. e Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5, 105-129.

Machado, A. E. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Química Nova*, **2000**, 23 (2), 237-243.

Makino, K.; Yamada, T.; Kimura, M.; Oka, T.; Ohshima, H. e Kondo, T. Temperature-and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophysical Chemistry*, **1991**, 41, 175–183.

Malmsten, M. *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*. Marcel Dekker, Inc., New York, **2002**.

Mang, T. S. LASER and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 1, 43-48.

Martin, F. e Lasic, D.D. *Stealth Liposomes*, Editado por: Martin, F. e Lasic, D.D., CRC Press, New York, **1995**.

Mathai, S.; Smith, T. A e Ghiggino, K. P. Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy. *Photochemical & photobiological sciences*, **2007**, 6, 995–1002.

Michl, J. Photophysics of Organic Molecules in Solution. Em: *Handbook of Photochemistry*. Editado por: Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L. e Gandolfi, M. T., 3^a Ed, Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2006**, 1-45.

Murata, N. e Sato, N. Studies on the absorption spectra of chlorophyll a in aqueous dispersions of lipids from the photosynthetic membranes. *Plant and Cell Physiology*, **1978**, 19(3), 401–410.

Moreira, L.; Lima, A.; Soares, R. Vagner R. Batistela, Gerola, A.P.; Hioka, N.; Bonacin, J.A.; Severino, D.; Baptista, M.S.; da Hora, A.E.M.; Rodrigues, M.R.; Codognoto, L. e de Oliveira, H.P.M. Metallochlorophylls of magnesium, copper and zinc: evaluation of the influence of the first coordination sphere on their solvatochromism and aggregation. *Journal of Brazilian Chemical Society*, **2009**, 20(9), 1653–1658.

Moreira, L.M.; Rodrigues, M.R.; de Oliveira, H.P.M.; Lima, A.; Soares, R.R.S.; Batistela, V.R.; Gerola, A.P.; Hioka, N.; Severino, D.; Baptista, M.S. e Machado, A.E.H. Influência de diferentes sistemas de solvente água-etanol sobre as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila α . *Química Nova*, **2010**, 33(2), 258–262.

Nagarajan, R. Theory of Micelle Formation: Quantitative Approach to Predicting Micellar Properties from Surfactant Molecular Structure. Em: *Structure-Performance relationships in Surfactants*. Editado por: Kunio, E. e Minoru, U., 2^a ed., Taylor & Francis Group, New York, **2003**.

Nelson, D. L. e Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4^a ed. Freeman, New York, **2004**.

Nivaggioli, T.; Tsao, B.; Alexandridis, P. e Hatton, T. Microviscosity in pluronic and tetronic poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles. *Langmuir*, **1995**, 11, 119–126.

Nonomura, Y.; Igarashi, S.; Yoshioka, N. e Inoue, H. Spectroscopic properties of chlorophylls and their derivatives. Influence of molecular structure on the electronic state. *Chemical Physics*, **1997**, 220, 155-166.

Nyman, E.S. e Hynninen, P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2004**, 73, 1–28.

Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1997**, 39, 1-18.

Pandit, N.; Trygstad, T.; Croy, S.; Bohorquez, M. e Koch, C. Effect of Salts on the Micellization, Clouding, and Solubilization Behavior of Pluronic F127 Solutions. *Journal of colloid and interface science*, **2000**, 222(2), 213–220.

Paula, J.C.; Robblee, J.H. e Pasternack, R.F. Aggregation of chlorophyll *a* probed by resonance light scattering spectroscopy. *Biophysical journal*, **1995**, 68(1), 335–41.

Pelczar Jr., M.J.; Chan, E.C.S. e Krieg, N.R.; *Microbiology Concepts and Applications*, McGraw-Hill: New York, **1993**.

Peloi, L.S.; Soares, R.R.S.; Biondo, C.E.G.; Souza, V.R.; Hioka, N. e Kimura, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. *Journal of biosciences*, **2008**, 33(2), 231–237.

Periyasamy, P.C.; Leijten, J.C.H.; Dijkstra, P.J.; Karperien, M. e Post, J.N. Nanomaterials for the Local and Targeted Delivery of Osteoarthritis Drugs. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, 2012, 1–13.

Perussi, J. R. Inativação Fotodinâmica de Micro-organismos. *Química Nova*, **2007**, 30 (4), 988-994.

Previdello, B. A.; Carvalho, F. R.; Tessaro, A. L.; Souza, V. R. e Hioka, N. O pKa de Indicadores Ácido-Base e os Efeitos de Sistemas Coloidais. *Química Nova*, **2006**, 29 (3), 600-606.

Proll, S.; Wilhelm, B.; Robert, B. e Scheer, H. Myoglobin with Modified Tetrapyrrole Chromophores: Binding Specificity and Photochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1757, 750-763.

Reddi, E.; Jori, G. e Rubaltelli, F. F. Photochemical and photosensitizing properties of monomeric and dimeric Sn(IV)-protoporphyrin. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, **1991**, 8, 159–167

Redmond, R. e Gamlin, J. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and photobiology*, **1999**, 70(4), 391–475.

Ricchelli, F.; Gobbo, S.; Jori, G.; Moreno, G.; Vinzens, F. e Salet, C. Photosensitization of mitochondria by liposome-bound porphyrins. *Photochemistry and Photobiology*. **1993**, 58, 53-58.

Ricchelli, F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1995**, 29 (2-3), 109-118.

Riess, G. Micellization of block copolymers. *Progress in Polymer Science*, **2003**, 28, 1107–1170.

Ryter, S. W. e Tyrrell, R. M. Singlet Molecular Oxygen ($^1\text{O}_2$): A Possible Effector of Eukaryotic Gene Expression. *Free Radical Biology & Medicine*, **1998**, 24 (9), 1520–1534.

Rohatgi-Mukherjee, K.K. *Fundamentals of photochemistry*, Wiley, New York, **1978**.

Sadeghi, A.M.M.; Amini, M.; Avadi, M.R.; Siedi, F.; Rafiee-Tehrani, M. e Junginger, H.E. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Effects of Trimethylated and Triethylated 6-NH₂-6-Deoxy Chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **2008**, 23(3), 262–275.

Scheer, H. An Overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. Em: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*. Editado por: Grimm, B., Porra, R.J., Rüdiger, W. e Scheer, H., Springer, Illinois, **2006**, 1.

Sekher, P. e Garbo, G. Spectroscopic studies of tin ethyl etiopurpurin in homogeneous and heterogeneous systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1993**, 20, 117–125.

Shiraishi, Y.; Inoue, T. e Hirai, T. Local viscosity analysis of triblock copolymer micelle with cyanine dyes as a fluorescent probe. *Langmuir*, **2010**, 26(22), 17505–17512.

Simplicio, F. I.; Maionchi, F. e Hioka, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações, e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. *Química Nova*, **2002**, 25 (5), 801-807.

Skoog, D.A.; West, D.M. e Holler, F.J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 6ª Ed., Saunders College Pub., Fort Worth, **1992**.

Spesia, M. B. e Durantini, E. N. Photodynamic inactivation mechanism of *Streptococcus mitis* sensitized by zinc(II) 2,9,16,23-tetrakis[2-(N,N,N-trimethylamino)ethoxy] phthalocyanine. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, **2013**, 125, 179–187.

Spikes, J. D. Quantum yields and kinetics of the photobleaching of hematoporphyrin, Photofrin II, tetra(4-sulfonatophenyl)-porphine and uroporphyrin. *Photochemistry and Photobiology*, **1992**, 55(6), 797–808.

Stillwell, W. e Karimi, S. Effect of various water-soluble components of phospholipids on the photooxidation of chlorophyllin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1980**, 95(3), 1049–1055.

Sundholm, D. Density functional theory calculations of the visible spectrum of chlorophyll *a*. *Chemical physics letters*, **1999**, 302, 480–484.

Sundholm, D. Comparison of the electronic excitation spectra of chlorophyll *a* and pheophytin *a* calculated at density functional theory level. *Chemical Physics Letters*, **2000**, 317, 545–552.

Tong, W. Q. e Wen, H. Preformulation Aspects of Insoluble Compounds. Em: *Water-Insoluble Drug Formulation*. Editado por: Liu, R., 2^a ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2008**, 61-90.

Torchilin, V.P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, **2001**, 73, 137–172.

Torchilin, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews. Drug discovery*, **2005**, 4(2), 145–160.

Valduga, G.; Bertoloni, G.; Reddi, E. e Jori, G. Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, **1993**, 21, 81–86.

Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. WILEY, Weinheim, **2002**.

Wainwright, M. The emerging chemistry of blood product disinfection. *Chemical Society Reviews*, **2002**, 31, 128–136.

Wardle, B. *Principles and applications of photochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, **2009**.

Wasielewski, M.R. e Svec, W.A. Synthesis of Covalently Linked Dimeric Derivatives of Chlorophyll *a*, Pyrochlorophyll, Chlorophyll *b*, and Bacteriochlorophyll *a*. *The Journal of Organic Chemistry*, **1980**, 45, 1969-1974.

Waterbeemd, H. Physico-chemical Approaches to Drug Absorption. Em: *Drug Bioavailability Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*.

Editado por: Waterbeemd, H. Lennernas, H. e Artursson, P. WILEY, Weinheim, **2004**, 3-14.

Weiss, C. Optical spectra of chlorophylls. Em: *The Porphyrins, Physical Chemistry*. Part A (vol. III). Editado por: Dolphin, D., Academic Press, New York, **1978**, 211–224.

Wilkinson, F. W.; Helman, W. P. e Ross, A. B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **1993**, 22, 113–262.

Wilson, W.; Wade, M.; Holman, S.C. e Champlin, F.R. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, **2001**, 43, 153–164.

Yang, H.; Li, M.; Zhang, W.; Zhao, H. e Zhang, Z. Characteristics of photosensitization of Pheophorbide *a* in liposomal media. *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences*, **1999**, 42(5), 471–80.

Yokoyama, M. Polymeric Micelles for the Targeting of Hydrophobic Drugs. Em: *Polymeric Drug Delivery Systems*. Editado por: Kwon, G. S., Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2005**, 533-575.

Zhang, X.; Jackson, J. e Burt, H. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *International journal of pharmaceutics*, **1996**, 132, 195–206.

Zhu, T. C. e Finlay, J. C. Prostate PDT Dosimetry. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2006**, 3, 234-246.