



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDOS DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FOTODINÂMICAS DA FTALOCIANINA DE ALUMÍNIO CLORO (AlPcCl) EM SISTEMAS HOMOGÊNEOS E ENCAPSULADA EM COPOLÍMEROS MICELARES PLURÔNICOS® P-123 E F-127.

Dissertação apresentada por
Bruno Henrique Vilsinski 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 Mestre em Química.



MARINGÁ, Junho/2013.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDOS DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FOTODINÂMICAS DA
FTALOCIANINA DE ALUMÍNIO CLORO (AlPcCl) EM SISTEMAS HOMOGÊNEOS E
ENCAPSULADA EM COPOLÍMEROS MICELARES PLURÔNICOS® P-123 E F-127.**

Mestrando: Bruno Henrique Vilsinski

Orientador: Prof. Dr. Wilker Caetano

Maringá, Junho/2013.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, criador de todas as coisas.

Aos meus pais Valdenício e

Rosângela e ao meu irmão Jonathan,

pelo apoio mesmo nas horas mais complicadas.

À Manuela, minha amiga e namorada por tudo

que representa em minha vida: amo você.

Aos companheiros do BAC (Bagarai Atlético Clube) pelo companheirismo e aos queridos

e demais amigos

por todos os momentos de felicidade e tristeza!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, o criador de todas as coisas.

À minha família que sempre esteve comigo, em especial meu pai Valdenício Vilsinski, minha mãe Rosângela Maria Dantas Vilsinski e meu irmão Jonathan Henrique Vilsinski. Também não podiam faltar meu vô José Dantas e tios (as) e primos: Solange, Renato, Lucas, Celso, Rômulo, Rodolfo e tantos outros. Mais especial ainda meus agradecimentos ao já falecido Tio Beto (Carlos Roberto Dantas), que tão cedo nos deixou e minha grande vó que infelizmente partiu no final do ano de 2012, Dejair Marques Dantas (Vó Di).

À minha companheira e querida Manuela Ribeiro Panice, por me aguentar em tantos momentos difíceis. Obrigado por existir!

Aos meus companheiros de casa Paulo Cesar de Souza Pereira (Paulete) e Jesse Bertolo (Jessão) por tantas risadas.

Ao grande professor doutor Wilker Caetano por ter aceitado a orientação, pelos ensinamentos (que não foram poucos) e, principalmente, pelo companheirismo nos momentos difíceis.

Aos professores Noboru Hioka, Elza Kimura, Hueder Paulo, Expedito Leite, Marcos Kunita e Edvani Curti Muniz pelos conhecimentos compartilhados.

Aos alunos de iniciação científica pela ajuda no trabalho e pela amizade construída: Patrícia Barbosa, Junior Enumo (Juniera), Tayana Tsubone (Tsuba) e Evelin Lemos.

Aos amigos membros, ex-membros e agregados do grupo NUPESF (Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos): Diogo Pellosi (Diogueira), Renatinha, Bianca (Bibis), Jader, Cristiane Chaves, André Tessaro (Andrezão), Ana Tessaro, Fernando, Vagner, Camila (Colega), Douglas Vanzim, Douglas RU, Flávia, Guilherme, Ítalo Calori, Ju, Paulo Fernando, Augusto Graceto, Andrezza, João Paulo, Ítalo Japonês, João Raul, Heveline, Alessandro Campos, Eduardo Japonês e Dani. Desde já minhas desculpas a quem eventualmente tenha esquecido.

Aos amigos orientandos do Wilker pela ajuda, amizade e companheirismo: Jader Leandro Aparício, Gabriel Batista Cesar (Bodão), Gustavo Braga, Layane Santos, Renato Sonchini, Bruno Ribeiro Rabello, Katieli Souza (Katichatelli; Paula Fernandes) e Adriana Cristina Wenceslau (Wences).

À todos os amigos de tantas horas do Bagarai Atlético Clube (BAC): Anderson Vargas, Alex Ortiz, Mariana Lopes, Vinicius Nissin, Lucas Augusto, Tiago Pai, Marcos Gato, Miriane, João Paulo, Bruno (Jojô), Caio Lazari, Daniel, Papito, Rooney, Léo, José Miguel, Jean Mitsunaga, Alessandro (Rosca), Ricardo, Rafael (Mão), Jean e Dan Rech, Rafinha, Bruno Rauptman entre tantos outros.
Aos também amigos Régis Martins, Michel Mareze, Leonardo (Gordão), Felipe Paulo Vaz, irmãos Moura, Juninho, Roberta Borges e etc.

À minha amiga, irmã, professora e parceira de artigos/patentes Adriana Passarela Gerola (Driquinha) por tudo.

À todos os demais técnicos/funcionários e amigos feitos na Universidade Estadual de Maringá e também à Rede nBionet.

A CAPES pela bolsa de estudo.

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, pela disponibilidade para concretização deste trabalho.

*“Quero a certeza dos loucos
que brilham. Pois se o louco persistir
na sua loucura, acabará sábio.”*

Raul Seixas

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Processos Fotoquímicos	1
1.2. Terapia fotodinâmica.....	3
1.3. Oxigênio Singlete	6
1.4. Ftalocianinas.....	8
1.5. Ftalocianina de Alumínio-Cloro.....	10
1.6. Micelas poliméricas em formulação de diversos fotossensibilizadores	12
1.7. Inativação Fotodinâmica de Microorganismos (IFDMO).....	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Materiais.....	20
3.1.1. Principais equipamentos utilizados nos estudos.....	20
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Propriedades espectroscópicas e de solubilidade da AlPcCl em meio homogêneo: estudos de absorção eletrônica e fluorescência.....	21
3.2.2. Caracterização da agregação da AlPcCl em meio homogêneo: Estudos Espectroscópicos da AlPcCl em misturas Água-etanol	22
3.2.3. Estudo das propriedades fotofísicas da AlPcCl em meio homogêneo: Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e de oxigênio singlete (Φ^1O_2).....	22
3.2.3.1. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da AlPcCl em meio homogêneo	22
3.2.3.2. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ^1O_2) da AlPcCl em meio homogêneo	24
3.2.4. Estudo das propriedades físico-químicas da AlPcCl em sistemas micro-heterogêneos copolímeros nano-estruturados: micelas poliméricas de P-123 e F-127.....	26

3.2.4.1. Isotermas de ligação da AlPcCl nos sistemas micelares copolímeros de P-123 e F-127.....	26
3.2.4.2. Estudos cinéticos do processo de incorporação da AlPcCl nos sistemas micelares poliméricos P-123 e F-127.....	27
3.2.5. Encapsulamento da AlPcCl nos sistemas micelares-copoliméricos F-127 e P-123: estabilidade do fotossensibilizador encapsulado e sua organização molecular em função da temperatura.....	27
3.2.5.1. Técnica de preparação de formulações contendo AlPcCl encapsulada com poloxâmeros.....	27
3.2.5.2. Propriedades fotofísicas da AlPcCl encapsulada em micelas poliméricas de P-123 e F-127.....	29
3.2.5.3. Estudo da estabilidade dos formulados contendo AlPcCl encapsulada em micelas poliméricas de P-123 e F-127: Processos de auto-agregação e liberação do fotossensibilizador com o decorrer do tempo.....	30
3.2.5.4. Influência da temperatura na auto-agregação da AlPcCl incorporada em P-123 e F-127.....	32
3.2.5.5. Estudo da estabilidade da AlPcCl encapsulada em P-123 frente à liofilização/reidrataçã.....	32
3.2.6. Estudos de inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) utilizando os formulados AlPcCl/poloxâmeros.....	33
3.2.6.1. Quantificação dos efeitos sobre a morte dos microorganismos por análise quimiométrica.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Propriedades espectroscópicas e de solubilidade da AlPcCl em meio homogêneo: Estudos de absorção eletrônica e fluorescência.....	35
4.1.1. Estudos dos processos de auto-agregação da AlPcCl utilizando-se de espectroscopia de absorção eletrônica e de fluorescência em meio homogêneo de misturas monofásicas água/etanol.....	47
4.1.2. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da AlPcCl em etanol....	54
4.1.3. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ^1O_2) da AlPcCl em etanol.....	55
4.2. Estudos das propriedades da AlPcCl em meio micro-heterogêneo: interação ftalocianina/copolímeros micelares de P-123 e F-127.....	59

4.3. Estudos cinéticos de incorporação da AlPcCl em micelas poliméricas de P-123 e F-127	68
4.3.1. Influência da temperatura nas propriedades de ligação da AlPcCl às micelas poliméricas de P-123 e F-127	73
4.4. Encapsulamento da AlPcCl nos sistemas micro-heterogêneos constituídos de micelas poliméricas de P-123 e F-127: Estudos das propriedades físico-químicas.....	78
4.4.1. Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da AlPcCl encapsulada em micelas poliméricas de P-123 e F-127	79
4.4.2. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) AlPcCl nas micelas poliméricas	87
4.5. Características espectroscópicas e estabilidade da AlPcCl encapsulada nas micelas poliméricas de F-127 e P-123	88
4.5.1. Estudo espectroscópico da AlPcCl encapsulada nos copolímeros P-123 e F-127: dependência da estabilidade e grau de liberação com a razão $[AlPcCl]/[Copolímero_{mic}]$	89
4.6. Efeito da temperatura na agregação da AlPcCl encapsulada em P-123 e F-127: Estudos de absorção eletrônica.....	106
4.7. Estudos espectroscópicos da AlPcCl solubilizada em P-123 durante processo liofilização/reidratação.....	113
5. Estudos das propriedades fotodinâmicas dos formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 e F-127: efeito da concentração de AlPcCl e do tempo de iluminação na inativação fotodinâmica de microorganismos.....	116
5.1. Efeito da concentração de AlPcCl encapsulada nos copolímeros P-123 e F-127 na inativação fotodinâmica de microorganismos.....	116
5.1.1. Efeito do tempo de iluminação sobre a inativação fotodinâmica de microorganismos utilizando-se da AlPcCl encapsulada aos copolímeros P-123 e F-127.....	120
5.2. Quantificação dos efeitos por análise quimiométrica	121
6. CONCLUSÕES	123
7. REFERÊNCIAS	125

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade médica relativamente nova cujo princípio básico é a interação entre um composto fotossensível (denominado fotossensibilizador; FS), luz e oxigênio molecular gerando oxigênio singlete e/ou espécies reativas de oxigênio (EROS), que provocam destruição celular. As ftalocianinas são uma classe de compostos que possuem características favoráveis a serem utilizadas como compostos fotossensibilizadores. No entanto, as moléculas desta classe como, por exemplo, a ftalocianina de alumínio-cloro (AlPcCl), possuem a desvantagem de sofrer o processo de auto-agregação em meio aquoso, efeito este que causa mudanças drásticas nas propriedades fotofísicas importantes do FS, inviabilizando seu uso em terapia fotodinâmica. Contudo, a utilização de sistemas solubilizadores/transportadores minimiza este problema. Desta forma, neste trabalho, estudou-se as propriedades físico-químicas entre a AlPcCl e os copolímeros micelares plurônicos[®] P-123 e F-127, visando obter formulações que possam ser aplicadas em TFD e em Inativação Fotodinâmica de Microorganismos (IFDMO).

Os estudos prévios envolvendo a interação primária entre a AlPcCl com F-127 e P-123 (isotermas de ligação), mostraram um perfil complexo envolvendo a interação entre este FS e os copolímeros, provavelmente decorrentes de complexos perfis de organização estrutural da AlPcCl (monomerizada/auto-agregada). Estes estudos também mostraram uma maior interação entre a AlPcCl e o copolímero P-123 em comparação ao F-127. A cinética de interação entre a AlPcCl e os copolímeros, por sua vez, corroboraram com os resultados obtidos nas isotermas, mostrando uma maior interação entre a AlPcCl e o P-123, além de uma maior estabilização da AlPcCl neste copolímero, apresentando-se inclusive em um menor grau de agregação em maiores concentrações de P-123 (menores razões $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$).

Após estes complexos resultados envolvendo a interação primária AlPcCl/copolímeros, partiu-se para o encapsulamento da AlPcCl nos copolímeros, utilizando-se do método de dispersão sólida. Nos formulados obtidos através deste método, verificou-se que a AlPcCl é incorporada com sucesso nos copolímeros. No entanto, enquanto a AlPcCl se incorpora na forma auto-agregada em F-127, no copolímero P-123 verificou-se que este FS pode ser incorporado na forma monomerizada dependendo da concentração de P-123 ou da razão $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$.

Esta maior interação entre a AlPcCl e o copolímero P-123 observada nos estudos prévios e também na AlPcCl encapsulada pelo método de dispersão sólida decorre das diferenças existentes no grau de hidrofobicidade entre os copolímeros, no qual o P-123 possui uma quantidade

relativamente maior de sítios hidrofóbicos, capazes de estabilizar melhor a AlPcCl na forma monomérica.

Adicionalmente, os formulados da AlPcCl monomerizada em P-123 mantiveram-se estáveis por um longo período de tempo, além de manterem suas principais propriedades espectroscópicas frente ao processo de liofilização/reidratação. Estes formulados também mostraram resultados promissores nos estudos envolvendo inativação fotodinâmica *in vitro* contra a bactéria *S. aureus* bem como contra o fungo *C. albicans*, sem apresentarem toxicidade no escuro, mostrando-se viáveis para a aplicação em IFDMO e em futuros estudos envolvendo TFD.

Palavras chave: ftalocianina, ftalocianina de alumínio-cloro, micelas poliméricas, plurônicos P-123 e F-127, inativação fotodinâmica de microorganismos.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a relatively new medical modality whose basic principle is the interaction between a photosensitive compound (photosensitizer, PS), light and molecular oxygen generating singlet oxygen and/or reactive oxygen species (ROS), which cause destruction cell. Phthalocyanines are a class of compounds which possess favorable characteristics for use as photosensitizing compounds. However, the molecules of this class such as, for example, aluminum phthalocyanine chloride (AlPcCl) have the disadvantage of suffering the process of self-aggregation in an aqueous medium, an effect that causes drastic changes in photophysical properties important FS invalidating their use in photodynamic therapy. However, the use of solubilizing systems/carriers minimizes this problem. Thus, in this work, we studied the physicochemical properties between AlPcCl copolymers and micellar Pluronic[®] P-123 and F-127, to obtain formulations that can be applied in PDT and photodynamic inactivation of microorganisms (PDI).

Initially, studies were performed in homogeneous with AlPcCl in solvents with different polarities (water, ethanol, acetone and DMSO) calculating the coefficient of molar absorptivity (ϵ) of the main absorption bands of AlPcCl (Soret, Q_I, Q_{II} and Q_{III}), aiming to understand the spectroscopic properties and also obtain the best solvent for studies involving the encapsulation of the FS. The AlPcCl presented soluble in ethanol, suffering minimal effect of self-aggregation as there is a lower solubility and more drastic formation of self-aggregates in acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO), chloroform, and especially in water. Additionally, the hydrophobic FS showed reasonable values of fluorescence quantum yield and singlet oxygen in ethanol, showing it feasible for application in PDT and IFDMO, being necessary to the encapsulation in this monomeric form in a solubilizer/suitable system carrier.

Initial studies involving the primary interaction between the AlPcCl with F-127 and P-123 (binding isotherms), showed a profile involving complex interaction between this PS and the copolymers, probably due to complex profiles of structural organization (monomeric/self – aggregate forms). These studies also showed a greater interaction between AlPcCl and copolymer P-123 compared to F-127. The kinetics of interaction between AlPcCl and copolymers, corroborated with the results obtained from the isotherms, showing greater interaction between AlPcCl and P-123, in addition to further stabilize AlPcCl this copolymer, including presenting a lower level of aggregation at higher concentrations of P-123 (lowest ratios [AlPcCl]/[P-123_{mic}]).

After these results involving the complex primary interaction AlPcCl/copolymers, became for the encapsulation of AlPcCl in this copolymers, using the method of solid dispersion. In formulated obtained by this method, it was found that the AlPcCl is incorporated successfully in the copolymer. However, while AlPcCl is incorporated in a self-aggregated form in F-127, in the copolymer P-123 was verified that this PS can be incorporated in the monomeric form depending on the concentration of P-123 or the ratio $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$.

This higher interaction between the AlPcCl and the copolymer P-123, observed in previous studies and also in AlPcCl encapsulated by the method of solid dispersion is due to differences in the degree of hydrophobicity between copolymers, in which the P-123 has a relatively greater amount of sites hydrophobic better able to stabilize the AlPcCl in monomeric form.

Additionally, the formulation of monomeric AlPcCl in P-123 remained stable for a long period of time, maintaining their main spectroscopic properties after the lyophilization/ rehydration. The formulated the AlPcCl encapsulated in P-123 also showed promising results in studies involving photodynamic inactivation in vitro against bacteria *S. aureus* as well the fungus *C. albicans*, showing no toxicity in the dark, being feasible for application in PDI and future studies involving PDT.

Keywords: phthalocyanines, aluminium phthalocyanine chloride, polymeric micelles, pluronics® P-123 e F-127, photodynamic inactivation of microorganisms.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação esquemática da ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio.	06
Tabela 2. Constantes para a equação 1 para os poloxâmeros estudados (Wanka et al, 1995).	16
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2 ²	34
Tabela 4. Valores de eficiência, k_1 e rendimento quântico de oxigênio singlete da AlPcCl em etanol a 25°C.	60
Tabela 5. Coeficientes de absorvidade molar (ϵ) para as principais bandas de absorção da AlPcCl encapsulada em P-123 4% (m/V) a 30 °C.	87
Tabela 6. Valor D ₉₀ em função da concentração de AlPcCl para <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> a 25°C.	124
Tabela 7. Influência dos efeitos tempo de iluminação e concentração de AlPcCl calculados por análise quimiométrica frente a <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i>	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação Esquemática de um Diagrama de Jablonski (Lakowicz, 2006).	4
Figura 2. Representação esquemática dos principais mecanismos de ação citotóxica presentes na terapia fotodinâmica (Setúbal, 2007).	5
Figura 3. Representação da estrutura do macrociclo central presente nas ftalocianinas e estrutura molecular da ftalocianina de alumínio-cloro (AlPcCl).	9
Figura 4. a) Representação esquemática para a formação de um sistema micelar a partir de copolímeros em água e da incorporação de uma molécula (fármaco), por exemplo, paclitaxel, doxorubicina e etc (Miyata et al, 2011) em seu interior hidrofóbico b) Fórmula estrutural geral de um copolímero da classe dos Plurônicos [®] , para o P-123; x=z=20 e y=70 e F-127; x=z= 106 e y=70.	14
Figura 5. a) Representação da <i>Cândida albicans</i> (célula eucariótica) e b) Representação esquemática da parede de um fungo, como a <i>Cândida albicans</i>	17
Figura 6. Representação esquemática da parede celular de uma bactéria gram-negativa, como a <i>E. coli</i>	18
Figura 7. Representação esquemática da parede celular de uma bactéria gram positiva, como a <i>S. aureus</i>	19
Figura 8. Representação esquemática do método de dispersão sólida, utilizado para a incorporação da AlPcCl em micelas poliméricas constituídas de P-123 e F-127.	28
Figura 9. Esquema mostrando-se as regiões do tubo nas quais foram retiradas alíquotas de 15 mL contendo o formulado AlPcCl-copolímero para a análise de homogeneidade.	29
Figura 10. Espectro UV-Vis da AlPcCl em etanol ($4,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) e em meio aquoso ($7,6 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$; pH=7,0) a 30 °C.	35
Figura 11. Orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas da AlPcCl (Figura obtida levando-se em consideração o Modelo dos quatro orbitais, desenvolvido por Gouterman).	36
Figura 12. Espectros UV-Vis da AlPcCl em etanol em diferentes concentrações obtidas por diluições ($1,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) a 30 °C, pH=7,0.	37

Figura 13. Gráficos de Abs <i>versus</i> [AlPcCl] para a banda Soret e bandas Q da AlPcCl em etanol a 30 °C.	38
Figura 14. a) Espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl em etanol em diferentes concentrações ($4,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-7}$ molL ⁻¹), $\lambda_{exc} = 604$ nm; $\lambda_{emis} = 620-850$ nm a 25°C, pH=7,0; b) Gráfico da intensidade de emissão em 680 nm <i>versus</i> [AlPcCl]. No inserto ilustra-se a região linear entre a intensidade de emissão e a [AlPcCl].	39
Figura 15. Espectros de absorção eletrônica da AlPcCl em a) acetona e b) DMSO em diferentes concentrações (diluições) a partir de uma solução estoque de AlPcCl $1,1 \times 10^{-5}$ molL ⁻¹ a 30 °C, pH=7,0. Gráficos de Abs vs. [AlPcCl] para bandas Q em acetona (c-e) e em DMSO (f-i) a 30 °C.	42
Figura 16. Espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl em diferentes concentrações em a) acetona e c) DMSO. $\lambda_{exc} = 604$ nm e $\lambda_{emis} = 620-850$ nm a 30 °C, pH=7,0. Intensidade de emissão <i>versus</i> [AlPcCl] em b) acetona d) DMSO a 30°C.	44
Figura 17. Espectros de RLS da AlPcCl em diferentes concentrações obtidas por diluições ($3,6 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-7}$ molL ⁻¹) em a) etanol, b) acetona e c) DMSO a 30 °C (obtidos com $\Delta\lambda = 0$), pH=7,0. A seta indica a diminuição do sinal à medida que se diminui a [AlPcCl].	45
Figura 18. a) Espectros de absorção eletrônica da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6}$ molL ⁻¹) em diferentes porcentagens de água/etanol (V/V). b) variação do espectro na região referente à banda Q _{III} (650-700 nm). c) Absorvância normalizada da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6}$ molL ⁻¹) em etanol e em 90% de água (V/V) d) Variação da absorvância em 672, 353 e 384 nm com o aumento do teor de água. As setas em a e b mostram a variação da absorvância com o aumento do teor de água. T = 30 °C, pH=7,0.	48
Figura 19. a) Espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹) em diferentes % água/etanol (V/V); $\lambda_{exc} = 604$ nm; $\lambda_{emis} = 620-850$ nm a 30°C, pH=7,0. b) intensidade de emissão <i>versus</i> porcentagem de água monitoradas em 680 nm. As setas indicam as alterações com a adição de água.	49
Figura 20. a) Intensidade normalizada da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6}$ molL ⁻¹) em função do teor de água monitoradas para a absorção ($\lambda_{m\acute{a}x} = 672$ nm) e emissão de fluorescência ($\lambda_{m\acute{a}x} = 680$ nm) e b) Comprimentos de onda de máxima absorção e emissão da AlPcCl pela porcentagem de água à 30° C.	50

Figura 21. Energia das transições eletrônicas permitidas dos monômeros e agregados em função do ângulo formado entre dipolos de transição e a linha de referência que conecta as unidades. A exemplificação foi feita apenas para dímeros (Kasha, 1963; Severino et al., 2003).	52
Figura 22. Espectros de RLS da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em diferentes porcentagens de água, a 30 °C (obtidos com $\Delta\lambda = 0$), pH=7,0.	53
Figura 23. Espectros de a) absorção de AlPcCl e ZnPc $1,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ e b) emissão de fluorescência da AlPcCl e ZnPc em etanol, $\lambda_{\text{exc}} = 604 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emis}} = 620\text{-}850 \text{ nm}$ a 30 °C, pH=7,0.	54
Figura 24. Sobreposição (normalizada) dos espectros de a) absorção da AlPcCl ($1,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em etanol na região da banda Q _{III} ($\lambda_{\text{máx}} = 672 \text{ nm}$) e b) emissão do LASER de diodo ($\lambda_{\text{máx}} = 663 \text{ nm}$) a 30 °C.	56
Figura 25. Espectros de absorção UV-Vis da solução contendo a) AlPcCl ($4,1 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$; $\lambda_{\text{máx}} = 272 \text{ nm}$) e AU ($1,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$; $\lambda_{\text{máx}} = 293 \text{ nm}$) monitorados em função do tempo de irradiação a 30°C, pH=7,0 e b) Perfil da cinética de decaimento da banda do ácido úrico ($\lambda_{\text{máx}} = 293 \text{ nm}$) e de surgimento do intermediário formado ($\lambda_{\text{máx}} = 315 \text{ nm}$) em função do tempo de irradiação.	57
Figura 26. Relação entre k_1 e o número de fótons absorvidos para a AlPcCl para estimativa da eficiência (γ_{Δ}) do processo de geração de $^1\text{O}_2$	58
Figura 27. Espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em função de adição de copolímero: a) F-127 (região de concentração variando de 0 a $6,5 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$) e b) P-123 (0 a $1,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) a 25°C, $\lambda_{\text{exc}} = 604 \text{ nm}$, pH = 7,0. A seta indica o aumento de emissão da ftalocianina com a concentração dos copolímeros.	60
Figura 28. Intensidade de emissão de fluorescência da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em função da concentração de copolímeros para os sistemas com adições de a) [F-127] (0 a $6,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$; no insert da Figura encontra-se uma ampliação da região de baixas concentrações, entre 0 e $1,5 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) e b) [P-123] (variando de 0 a $1,2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$). Medidas realizadas a 25°C, pH = 7,0.	61
Figura 29. Espectros de absorção eletrônica da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) na presença de a) [F-127] (variando de 0 a $6,4 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$) e b) [P-123] (variando de 0 a $1,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), pH = 7,0 a 25 °C. As setas indicam as variações com o aumento da concentração dos copolímeros.....	63
Figura 30. Espectros de RLS da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em função da concentração de F-127 (variando de 0 a $6,4 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$) a 25°C ($\Delta\lambda = 0$), pH=7,0. A seta indica a variação do sinal de RLS com o aumento da concentração do copolímero.	64

Figura 31. Espectros de RLS da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em função da concentração de P-123 em distintas faixas: a) 0 a $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ e b) 2×10^{-4} a $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ a 25°C (obtidos com $\Delta\lambda = 0$). No inserto da Figura é apresentada uma ampliação da região próxima a 680 nm que mostra o crescimento da banda de emissão residual da AlPcCl com o aumento da concentração de P-123. As setas indicam a variação do sinal com o aumento da concentração.	65
Figura 32. Isotermas de ligação da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em função da [F-127] e [P-123] monitoradas através de fluorescência da AlPcCl, obtidas imediatamente após a adição de copolímero ($t = 0$) e após o equilíbrio (> 48 horas), a 25°C ; $\text{pH} = 7,0$	67
Figura 33. Espectros de absorção da AlPcCl ($2,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em diversas razões [AlPcCl]/[F-127 _{mic}] (na ausência de micelas à 0,15 e [F-127] de 0 a $6,2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$), 25°C , $\text{pH} = 7,0$	69
Figura 34. Espectros de absorção da AlPcCl ($2,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em F-127 ($6,2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$; razão [AlPcCl]/[F-127 _{mic}] 0,15) em diferentes tempos a 25°C , $\text{pH} = 7,0$. As setas indicam as mudanças do perfil espectral da AlPcCl com o decorrer do tempo.	70
Figura 35. Variação temporal da absorvância da AlPcCl ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) monitorados na banda Q _{III} ($\lambda_{\text{máx}} = 677 \text{ nm}$) em diferentes razões [AlPcCl]/copolímero _{mic}] para: a) F-127 (0 a $6,2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$) e b) P-123 (0 a $1,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) a 25°C , $\text{pH} = 7,0$	71
Figura 36. Isotermas de ligação da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) na presença de diferentes concentrações de a) [F-127] e b) [P-123] obtidas a 40°C e 25°C ; $\text{pH} = 7,0$. No insert da Figura 36-a é apresentado o comportamento das isotermas a 25°C e a 40°C na região de baixas concentrações de F-127 ($< 6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$).	74
Figura 37. Isotermas de ligação da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) na presença de diferentes concentrações de a) [F-127] e b) [P-123] obtidas ambas a 15 e 25°C , respectivamente; $\text{pH} = 7,0$	77
Figura 38. Espectros de absorção eletrônica de soluções obtidas por diluições da AlPcCl ($3,5$ - $0,3 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 4% (m/V) ($7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), $T = 30^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 7,0$	81
Figura 39. Gráficos de absorvância versus [AlPcCl] para a banda Soret a) e c), d) e e) bandas Q da AlPcCl solubilizada nos copolímeros micelares P-123.	82
Figura 40. a) Espectros de emissão da AlPcCl (variando entre $3,5$ - $0,3 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 4% (m/V) a 30°C , $\text{pH} = 7,0$ e $\lambda_{\text{exc}} = 604 \text{ nm}$. b) Gráfico da intensidade de emissão ($\lambda_{\text{máx}} = 686 \text{ nm}$) versus [AlPcCl].....	83

Figura 41. Espectros de RLS da AlPcCl ($0,3-3,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) incorporada em micelas poliméricas de P-123 obtidos através de diluições de uma solução estoque de AlPcCl em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$; e razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ inicial=0,1) a 30 °C, pH = 7,0 ($\Delta\lambda = 0$).	84
Figura 42. Espectros de absorção normalizadas da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em etanol e AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em F-127 4% (m/V) ($3,2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) a 30 °C, pH = 7,0.	86
Figura 43. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ formulada em P-123 0,5% m/V ($8,6 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$), pH=7,0. As Figuras 4d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação monitorados na região da banda Q _{III} (677 nm). A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl do interior da micela.	90
Figura 44. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ incorporada em P-123 2% (m/V); $3,4 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), pH = 7,0. As Figuras 44-d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação monitorados na região da banda Q _{III} (677 nm). A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl do interior da micela.	91
Figura 45. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ formulada em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), pH = 7,0. As Figuras 45-d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados na região da banda Q _{III} (677 nm). A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl do interior da micela.	92
Figura 46. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ formulada em P-123 8% (m/V; $1,4 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$), pH = 7,0. As Figuras 46 d-e apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados na região da banda Q _{III} (677 nm). A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl do interior da micela.	93
Figura 47. Representação esquemática da AlPcCl encapsulada em P-123 a 30°C. O número de monômeros da AlPcCl no micro ambiente micelar pode variar de 1 (AlPcCl desagregada) a $n > 1$ (AlPcCl encapsulada na forma auto-agregada: formação de dímeros, trímeros e etc). Na Figura há a representação apenas de auto-agregados diméricos.	96
Figura 48. Representação esquemática do aumento do diâmetro do “core” e do número de agregação (N_{ag}) dos copolímeros com o aumento da concentração.	98

Figura 49. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão [AlPcCl]/[F-127mic] encapsulada em F-127 0,5% (m/V; $3,9 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$), pH=7,0. As Figuras 49-d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados no comprimento de onda de 646 nm. A direção das setas indicam a diminuição da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl da micela.....**99**

Figura 50. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão [AlPcCl]/[F-127mic] encapsulada em F-127 2% (m/V); $1,6 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), pH = 7,0. As Figuras 49 d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados no comprimento de onda de 646 nm. A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl da micela.....**100**

Figura 51. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão [AlPcCl]/[F-127mic] formulada em F-127 4% (m/V); $3,2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), pH=7,0. As Figuras 50 d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados no comprimento de onda de 646 nm. A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl da micela.**101**

Figura 52. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão [AlPcCl]/[F-127mic] formulada em F-127 8% (m/V); $6,3 \times 10^{-1} \text{ molL}^{-1}$), pH=7,0. As Figuras 51 d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados no comprimento de onda de 646 nm. A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl do interior da micela.....**102**

Figura 53. Gráfico de concentração de AlPcCl monomerizada *versus* concentração de P-123 para a tentativa de determinação do coeficiente de solubilidade a 30°C (Aparício, 2011).....**105**

Figura 54. Variação do espectro de absorção eletrônica da a) AlPcCl ($7,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) em F-127 4% (m/V; $3,2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e razão [AlPcCl]/[F-127_{mic}]=1,3) e b) AlPcCl ($3,5 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) em F-127 8% (razão [AlPcCl]/[F-127_{mic}] de 0,4).em função da diminuição da temperatura de 30 °C para 13 °C, pH=7,0.....**107**

Figura 55. Espectro UV-Vis da a) AlPcCl ($3,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e b) AlPcCl ($7,0 \times 10^{-6}$) em P-123 8% (m/V; $1,4 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$) em função da diminuição da temperatura de 30 para 13 °C. Ambos formulados possuem e razão [AlPcCl]/[P-123_{mic}]= 0,1 a 30°C, pH=7,0.....**109**

Figura 56. Mecanismo simplificado do processo de auto-agregação da AlPcCl solubilizada em surfactantes poliméricos para as temperaturas abaixo da TMC em a) P-123 e b) F-127.	111
Figura 57. Espectro de absorção eletrônica da AlPcCl ($7.5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) solubilizada em micelas poliméricas de P-123 8% ($1,3 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$; com razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] = 0,1$) antes e após a liofilização, $T=30 \text{ }^{\circ}\text{C}$	114
Figura 58. Efeito da concentração de AlPcCl encapsulada em P-123 4% ($7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e razões $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] < 0,1$ a 25°C) na inativação fotodinâmica de <i>S. aureus</i> . Todos os pontos representam medidas em triplicata. A $[\text{AlPcCl}] = 0,11 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ (denotado como *) refere-se à amostra de ftalocianina dispersa diretamente em meio aquoso.	117
Figura 59. Efeito da concentração de AlPcCl encapsulada em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e razões $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] < 0,1$ a 25°C) na inativação fotodinâmica de <i>C. albicans</i> . Todos os pontos representam medidas em triplicata. A $[\text{AlPcCl}] = 0,11 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ (denotado como *) refere-se à amostra de ftalocianina dispersa diretamente em meio aquoso.	119
Figura 60. Efeito do tempo de iluminação sobre a inativação de a) de <i>S. aureus</i> e b) <i>C. albicans</i> , com AlPcCl ($0,36$ e $0,64 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$; $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] < 0,1$) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada ponto representa a média dos experimentos em triplicata.	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ϵ	Coefficiente de absorvidade molar
$\lambda_{\text{emissão}}$	Comprimento de onda de emissão
$\lambda_{\text{excitação}}$	Comprimento de onda de excitação
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de cetil trietilamônio
RLS	Espalhamento de luz ressonante
FS	Fotossensibilizador
AlPcCl	Ftalocianina de Alumínio-Cloro
IFDMO	Inativação Fotodinâmica de microorganismos
ISC	Inter System Crossing
N_{ag}	Número de agregação do surfactante polimérico P-123 ou F-127 em determinada temperatura (Wanka et al, 1994)
$[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$	Razão entre a concentração de AlPcCl por micela de P-123 no sistema
$[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$	Razão entre a concentração de AlPcCl por micela de F-127 no sistema
F-127	Surfactante polimérico da classe dos Pluronic [®]
P-123	Surfactante polimérico da classe dos Pluronic [®]
PAAC	Porcentagem de água agregacional crítica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TMC	Temperatura micelar crítica
TFD:	Terapia fotodinâmica
UV-Vis	Ultravioleta-visível
Φ_{fl}	Rendimento quântico de fluorescência
$\Phi^1\text{O}_2$	Rendimento quântico de oxigênio singlete
UFC	Unidades formadoras de colônia
Z_{90}	Concentração necessária para a inativação de 90% da carga inicial de microorganismos
D_{90}	Tempo necessário para a inativação de 90% da carga inicial de microorganismos

1. INTRODUÇÃO

1.1. Processos Fotoquímicos

A interação da luz com a matéria é a base dos processos fotoquímicos, que ocorrem após a absorção de fótons por moléculas fotoativas, promovendo um elétron do orbital mais baixo em energia denominado HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) para o LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), transições estas que ocorrem do estado fundamental para o excitado (Lakowicz, 2006). Os processos que ocorrem através da interação da luz com a matéria são simplificada e esquematizados pelo diagrama de Jablonski, ilustrado na Figura 1. Este diagrama expressa as transições eletrônicas entre os diferentes níveis eletrônicos de uma molécula, juntamente com as transições entre os níveis vibracionais e rotacionais da mesma. Os estados singlete fundamental, primeiro estado excitado e segundo estado excitado são representados por S_0 , S_1 e S_2 , respectivamente. Os estados tripletes são representados por T_1 e T_2 . As transições que envolvem processos radiativos, ou seja, com emissão de luz, são mostradas pelas setas retas, enquanto que aquelas que ocorrem sem emissão de luz (não radiativas) estão representadas por setas com linhas onduladas.

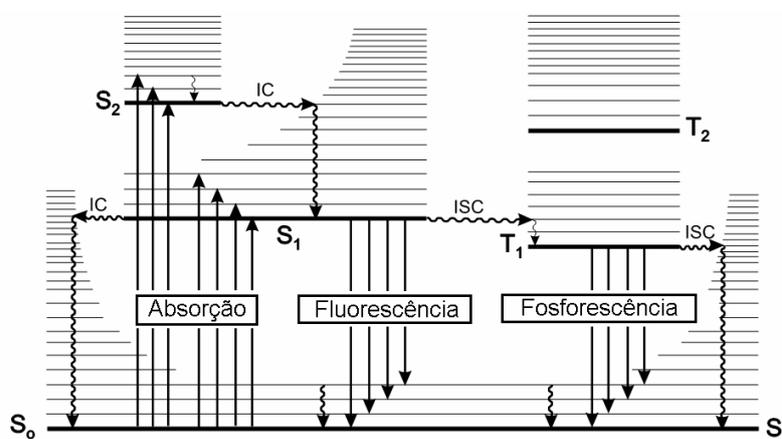


Figura 1. Representação Esquemática de um Diagrama de Jablonski (Lakowicz, 2006).

Após a absorção de luz pelo composto em um comprimento de onda específico, diversos processos podem ocorrer. Primeiramente, a molécula pode ser excitada a qualquer nível vibracional de estados eletrônicos superior (S_1 ou S_2). No caso da molécula ir para o estado excitado S_2 ou superior, a mesma relaxa rapidamente até o estado S_1 no nível vibracional zero em um processo

conhecido como conversão interna (IC). Este processo ocorre em um tempo aproximado de 10^{-12} s através da desativação do estado excitado por meio de processos que envolvem rotação, translação e vibração das moléculas até o nível vibracional zero em S_1 , sendo este o nível energético considerado o ponto de partida para os principais processos fotoquímicos que ocorrem (Gracetto, 2010). A partir do estado S_1 (que possui um tempo de vida de cerca de 10^{-9} s), a perda de energia pode ocorrer através de emissão de luz por fluorescência ou ainda por perdas através de conversão interna. Uma vez nos estados vibracionais do nível eletrônico S_0 , a molécula tende preferencialmente a relaxar para o nível vibracional zero deste estado. Isso faz com que o espectro de absorção e de emissão seja imagem um do outro, com algumas desigualdades referentes a mudanças nas estruturas moleculares em ambos os estados. Essa similaridade ocorre porque a excitação eletrônica não altera a geometria nuclear. Por isso, o espaçamento entre os níveis energéticos do estado excitado são similares aos do estado fundamental. Como resultado, a estrutura vibracional vista no espectro de absorção e emissão são similares (Lakowicz, 2006).

Todos os processos mostrados até o presente momento ocorrem sem mudanças na multiplicidade do spin do elétron, que na extensa maioria das moléculas no estado fundamental é singlete. Porém, outro processo competitivo de desativação do estado excitado que pode ocorrer é o cruzamento inter-sistemas (ISC). Este processo se caracteriza por uma transição não radiativa envolvendo níveis vibracionais de mesma energia de estados eletrônicos com multiplicidades diferentes (no caso, $S_1 \rightarrow T_1$). Embora esta transição seja proibida por spin, sua ocorrência pode ser verificada na presença de acoplamento spin-órbita (Lakowicz, 2006). Uma vez no estado triplete excitado, a molécula pode perder energia por colisões até o nível fundamental S_0 sem emissão de luz ou até mesmo emitindo-se luz até o estado fundamental através de um fenômeno denominado fosforescência. O tempo de vida de emissão de fosforescência é maior que o de emissão de fluorescência, uma vez que se trata de uma transição eletrônica proibida por spin, cuja constante de velocidade de decaimento é várias ordens de magnitude menor do que a de fluorescência (Lakowicz, 2006). Grande parcela das reações fotoquímicas é iniciada a partir de moléculas que se encontram em seu estado triplete, fato justificado pelo maior tempo de vida deste estado excitado em detrimento aos outros estados energéticos.

Outros mecanismos de desativação do estado excitado que podem ser citados também incluem: 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).

1.2. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) vem, nos últimos anos, sendo amplamente conhecida e difundida para o tratamento de infecções causadas por vírus, bactérias e fungos bem como, diversas doenças cardiovasculares, dermatológicas e outras relativas ao crescimento anormal de células como o câncer (Lee et al, 2009). A base de funcionamento da TFD envolve o uso de um composto fotossensibilizador (FS) que possua uma relativa afinidade pela célula/tecido doente, sob a ação de luz de comprimento de onda específico. A irradiação por luz faz com que o fotossensibilizador seja capaz de reagir através de transferência de elétrons com substratos biológicos, ou por transferência de energia para o oxigênio molecular para gerar o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) ou mesmo outras espécies reativas, que podem causar a morte celular por apoptose ou necrose (Castano e Demidova, 2005).

Desde a antiguidade são conhecidos os benefícios da utilização da luz solar para o tratamento de diversos males. No século VI a.C, o filósofo Herodotus relatou o uso da luz solar para o crescimento ósseo. O uso da helioterapia (terapia a base da luz do sol) foi defendida ferrenhamente por Hipócrates, entre os anos de 460-435 a.C para diversas doenças, paralelamente demonstrando a importância e a eficácia do tratamento. No Egito antigo, é reportado o uso de ervas que continham psoralenos e banhos de sol para tratar vitiligo e psoríase.

Em 1900, Oscar Raab descreveu a ação do corante acridina na presença de luz sobre um protozoário (*paramécia*), causador da malária, demonstrando sua eficiente propriedade fotossensibilizadora. Em 1903, por sua vez, Tappeiner e Jesionek utilizaram do corante eosina, na presença de luz, para o tratamento do câncer de pele. Após a exposição deste corante à luz, verificou-se que havia uma diminuição do tumor ao término do processo. Em 1975, houve a descoberta, por Dougherty, que um derivado de hematoporfirina sendo irradiado com luz de comprimento de onda na região do vermelho promovia a inibição do crescimento de células mamárias tumorais em ratos (Dougherty et al, 1975). Posteriormente, também foram realizados diversos ensaios clínicos com este derivado de hematoporfirina para tratar pacientes com câncer de bexiga (Kelly e Snell, 1976).

O efeito fotodinâmico de porfirina, em seres humanos, começou a ser estudado no ano de 1912 por Meyer-Betz. Betz aplicou em si mesmo cerca de 200 mg de hematoporfirina (HP). A exposição dessas regiões de seu braço à luz visível fez com que houvesse a formação de eritema solar, o que indica que a HP possui um efeito fotodinâmico. Ainda na década de 60, derivados de hematoporfirinas (HPD) foram extensivamente estudados na TFD por Lipson e Baldes (Lipson e Baldes, 1960). A partir da década de 70, houve a tentativa de elucidação dos efeitos citotóxicos da

terapia fotodinâmica e, mais recentemente, alguns estudos demonstraram a eficiência da meso-tetra-hydroxifenil-clorina (mTHPC) em tratamento com pacientes com carcinoma (Andersen e Ogilby, 2001).

Em 1993, a primeira aprovação do Photofrin[®], um medicamento composto por derivados de hematoporfirina (HPD) para o tratamento do câncer superficial de bexiga, foi aprovada pela Canadian Health Protection Branch. Posteriormente houve sua aprovação pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos da América e também por outros países como Holanda, Japão, Alemanha e Reino Unido (Vicente, 2001). Os análogos comerciais do Photofrin[®]: Photosan, Photocan também surgiram e, da mesma forma que o Photofrin[®], foram obtidos através da purificação e manipulação de derivados da hematoporfirina.

Em 1999 a FDA aprovou o uso do Levulan[®] Kerastic, um fármaco utilizado para lesões de pele, câncer de bexiga, acne entre outros (Simplício et al, 2002). Mais recentemente houve a aprovação de um medicamento cujo princípio ativo é o composto BPDMA (Derivado de Benzoporfirina Monoácida), Visudyne[®], desenvolvido pela empresa QLT Phototherapeutics Inc (Castano e Demidova, 2005). No ano de 2003, por sua vez, o fotossensibilizador Lasephyrin[®] (talaporfina de sódio, NPe6, mono-Laspartilclorina e6, MACE) foi aprovado no Japão para o tratamento de câncer de pulmão (Usuda et al, 2006).

No Brasil, por sua vez, a terapia fotodinâmica começou a ser estudada através de uma parceria entre físicos da Universidade de São Paulo (São Carlos/SP) e médicos da cidade de Jaú, a partir do ano de 1995. A partir disso, a TFD se difundiu para diversos outros grupos de pesquisa ligados à universidades em conjunto com outros profissionais da medicina (Setubal, 2007).

O ponto de partida para os processos fotodinâmicos é o estado triplete excitado (T_1 , Figura 2), obtido após o cruzamento inter-sistemas ($S_1 \rightarrow T_1$) que ocorre depois da excitação do composto fotossensibilizador por luz de determinado comprimento de onda (seção 1.1). Uma vez no estado triplete excitado, o fotossensibilizador causa a oxidação de substratos biológicos levando à inativação de vírus, bactérias e fungos bem como a morte celular através de dois principais mecanismos: mecanismo do tipo I e mecanismo do tipo II (Ochsner, 1997).

No mecanismo do tipo I (Figura 2), o fotossensibilizador (FS) pode reagir com um substrato que pode ser desde componentes da membrana celular como, por exemplo, biomoléculas, ou moléculas como o peróxido de hidrogênio, por transferência de elétrons formando-se radicais livres ou íons radicalares. A maioria destes radicais, por sua vez, reagem prontamente com o oxigênio levando a formação de uma variedade de intermediários amplamente reativos

denominados EROS (espécies reativas de oxigênio) (H_2O_2 , OH^\cdot , O_2^\cdot , RCO_2^\cdot , entre outros) que são os principais agentes responsáveis pela morte celular através deste mecanismo (Machado, 2000).

No mecanismo do tipo II (Figura 2), por sua vez, o FS no estado triplete excitado pode reagir através de transferência de energia para o oxigênio molecular (O_2) gerando, por sua vez, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é o agente responsável pelo dano celular através deste mecanismo.

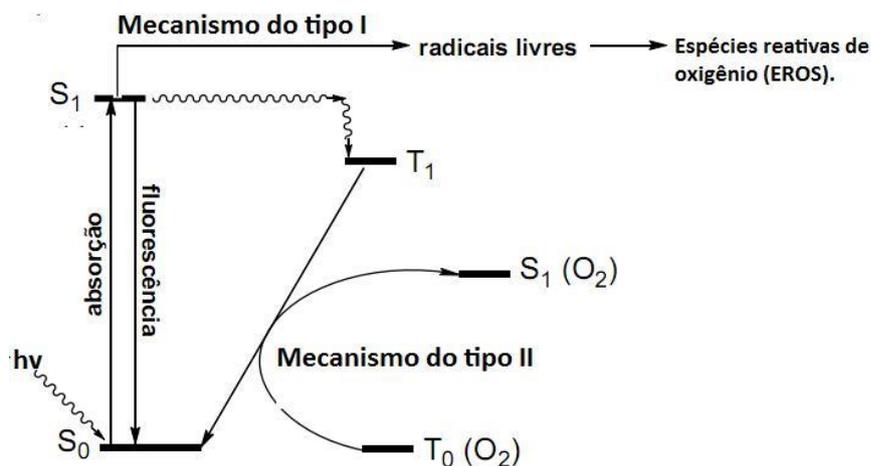


Figura 2. Representação esquemática dos principais mecanismos de ação citotóxica presentes na terapia fotodinâmica (Setúbal, 2007).

Estudos recentes têm mostrado que o mecanismo do tipo II é o maior responsável pela destruição das células cancerígenas (Castano et al 2005). No entanto, ambos os mecanismos também podem ocorrer simultaneamente, e a razão de ocorrência de um ou outro dependerá do tipo de fotossensibilizador usado, concentração do substrato biológico e do oxigênio molecular no sistema (Castano et al, 2005).

As características que um composto deve ter para que seja considerado um fotossensibilizador ideal incluem baixa toxicidade no escuro e baixa incidência de toxicidade administrativa (efeitos colaterais gerados após a administração), absorção de luz na região do vermelho ($>650\text{nm}$), entre outros (Tapajós et al, 2008). Também é citado como requisito mínimo para um composto ser um bom FS os altos valores de absorvidade molar em suas bandas de absorção de interesse, ($>20,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e alto rendimento quântico de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) para minimizar a dose necessária do composto de modo a obter resultados mais favoráveis na terapia (Allison e Sibata, 2010).

A vantagem do uso da TFD para o tratamento de doenças é sua alta especificidade e seletividade para as células doentes, embora que mesmo assim possam causar danos mínimos para os tecidos adjacentes (Strom et al, 1995). Diversas classes de compostos fotossensibilizadores são utilizados na TFD como, por exemplo, os derivados porfirínicos, clorinas, ftalocianinas, etc (Setúbal, 2007). Neste trabalho, por sua vez, serão estudadas as propriedades da ftalocianina de Alumínio-Cloro (AlPcCl) em meio homogêneo e em micelas poliméricas formadas por moléculas dos copolímeros F-127 e P-123, que são utilizadas como biotransportadores nano-estruturados uma vez que, embora apresentando a princípio características favoráveis à TFD, o presente fármaco é insolúvel em meio aquoso, restringindo/inviabilizando seu uso em TFD e IFDMO, por exemplo.

1.3. Oxigênio Singlete

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é a principal espécie reativa responsável pela destruição da célula em terapia fotodinâmica (Castano et al. 2005). Isso se deve aos subsequentes processos fotoquímicos que ocorrem quando o oxigênio é excitado para o seu estado singlete a partir do estado fundamental triplete (Kearns, 1971). A molécula de oxigênio fornece dois estados singletes excitados (com denotação espectroscópica $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g$, respectivamente) a partir de seu estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g$). Em particular, reações envolvendo o primeiro estado excitado, são importantes em muitos processos fotoquímicos e fotobiológicos, como a fotodegradação e processos de envelhecimento, incluindo a fotocarcinogênese (DeRosa e Crutchley, 2002). As reações envolvendo o oxigênio singlete são aplicadas em diversas áreas do conhecimento, que incluem terapia fotodinâmica e síntese orgânica, com muitas inovações em tais áreas (Kearns, 1971). A Tabela 1 mostra uma representação esquemática da ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio, (na Tabela a energia* de transição é referente ao estado fundamental da molécula).

Tabela 1. Representação esquemática da 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

A denominação oxigênio singlete é definida como sendo os três estados eletronicamente excitados do oxigênio molecular, com notação espectroscópica $^1\Delta_x$, $^1\Delta_y$ e $^1\Sigma_g$. O oxigênio possui, segundo a teoria do orbital molecular, dois elétrons desemparelhados nos orbitais π_x^* e π_y^* , sendo que os dois possuem o mesmo spin, o que lhe rende uma multiplicidade máxima, classificando-o como triplete no estado fundamental. No primeiro estado excitado, por sua vez, o oxigênio está duplamente degenerado $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ (92,4 kJmol⁻¹). Este estado possui uma energia menor e é representado comumente como $^1\Delta_g$. O segundo estado excitado ($^1\Sigma_g$; 159,6 kJmol⁻¹) possui um tempo de vida muito curto e, por essa razão, não tem chance de reagir, sendo desativado rapidamente para o primeiro estado excitado (Foote et al, 1995). A desativação do primeiro estado excitado singlete para o estado fundamental triplete é proibida por spin, o que confere um longo tempo de vida para este estado. Desta forma o estado $^1\Delta_g$ pode ser considerado o principal responsável pela reatividade do oxigênio singlete (Machado, 2000).

O tempo de vida do 1O_2 varia de acordo com a polaridade do solvente: em meio aquoso o tempo de vida desta molécula é de aproximadamente 3 μ s, enquanto que em alguns solventes orgânicos o mesmo está em torno de 10-100 μ s (Tessaro, 2010). Em sistemas biológicos, por sua vez, o tempo de vida é menor que em solventes orgânicos: de 100 ns em regiões lipídicas das membranas a 250 ns no citoplasma (Oscher, 1997). O tempo de vida menor em meio aquoso deve-se à alta frequência de vibração H-O (3600cm⁻¹) da água que promove uma relaxação mais efetiva da molécula. Desta forma, o raio de ação do oxigênio singlete também irá depender do tempo de vida do mesmo nos meios em questão. Em solventes orgânicos esse raio se encontra restrito a um volume esférico com 10 nm de diâmetro. 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).

Como mencionado anteriormente, o oxigênio singlete é a principal espécie reativa responsável pelo dano celular em TFD. O mecanismo de ação do oxigênio singlete levando à inativação fotodinâmica de microorganismos ou à destruição de células cancerígenas envolve a reação rápida entre esta espécie com as duplas ligações existentes entre os carbonos presentes em biomoléculas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, bem como reações entre o oxigênio singlete com ânions, nucleófilos (sulfetos e aminas) entre outros (Oschner, 1997). Quase todos os

constituintes celulares podem reagir com o oxigênio singlete. Em proteínas, por exemplo, o alvo biológico do $^1\text{O}_2$ são os aminoácidos cisteína, triptofano entre outros. Por sua vez, em ácidos nucléicos esta molécula reage preferencialmente com guanina e em lipídeos nas ligações insaturadas (Setúbal, 2007).

Existem na literatura diversas metodologias visando à determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete. Um destes métodos é a quantificação direta através da verificação da emissão de fosforescência do oxigênio singlete no comprimento de onda de 1270 nm, metodologia resolvida no tempo (Gerolla, 2010). Outro método bastante utilizado é a determinação indireta através do decaimento do estado triplete do β -caroteno (Wilkson et al, 1993) . No entanto, essas técnicas requerem a utilização de aparelhagens com detectores bastante sensíveis e o custo desses sistemas é bastante elevado (Wilkinson et al., 1993). Hoje em dia, no entanto, medidas no estado estacionário têm sido pesquisadas como métodos alternativos que envolvem a oxidação de substratos específicos (“armadilha química”) que reagem prontamente com o oxigênio singlete. Este método é mais simples e barato que os citados anteriormente e é baseado na verificação de reações de foto-oxidação que ocorrem com o substrato através de reações com o oxigênio singlete. A concentração do substrato diminui devido à reação com o oxigênio singlete e esta degradação é, geralmente, medida por quedas na intensidade de absorvância deste substrato com o decorrer destas reações (Gerola et al, 2012).

1.4. Ftalocianinas

Ftalocianinas (tetraazotetrazobenzoporfirinas) são compostos heterocíclicos planares em sistemas aromáticos considerados fotossensibilizadores de segunda geração (Tapajós et al, 2008). Foram descobertas acidentalmente por Braun e Tcherniac no ano de 1907 como subproduto durante a preparação da orto-cianobenzamida, através de uma reação entre a ftalamida em acetona (Braun e Tcherniac, 1907). No entanto, nenhuma atenção foi dada à descoberta nesse período. Posteriormente, em 1924, houve a descoberta por Diesbach e van der Weid de um composto azul insolúvel em meio aquoso, a ftalocianina de cobre durante a cianação do orto-dibromobenzeno com cianeto de cobre (I) em uma tentativa de se sintetizar uma ftalonitrila (Diesbach e von der Weid, 1927). Na década de 30 Scottish Dyes Ltda obtiveram a ftalocianina de ferro através de algumas mudanças realizadas na síntese da ftalamida através de anidrido ftálico e acetona. Linstead foi o primeiro pesquisador a utilizar-se do termo “ftalocianina”, palavra derivada do grego e que significa *naphtha* (óleo rock) e *cyanine* (azul). Nos anos seguintes, utilizando-se de uma variedade de técnicas

de análise, a estrutura das ftalocianinas, bem como diversos procedimentos para a obtenção de outras ftalocianinas complexadas com metais, foram descobertos (Linstead, 1934). Robertson, mais tarde, comprovou a informação sobre a estrutura das ftalocianinas antes descrita por Linstead, de que as mesmas possuíam estruturas planares, ao invés de tridimensionais (Robertson, 1935). Na Figura 3 encontra-se comparativamente a estrutura do macrociclo de uma ftalocianina e a ftalocianina de Alumínio-Cloro, a ftalocianina estudada neste trabalho.

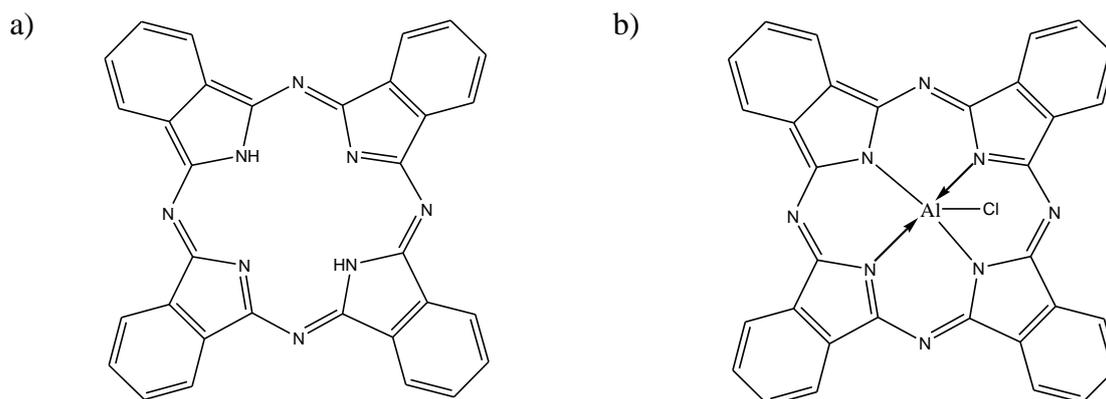


Figura 3. (a) representação da estrutura do macrociclo central presente nas ftalocianinas e (b) estrutura molecular ftalocianina de alumínio-cloro (AlPcCl).

As ftalocianinas possuem forte absorção em região de comprimentos de onda maiores (em torno de 672 nm), região de elevada absorção de luz pelos tecidos, ao contrário dos derivados hematoporfíricos, fotossensibilizadores de primeira geração, que não possuem banda de grande intensidade nesta região. As ftalocianinas podem ter diferentes íons metálicos complexados em sua estrutura química, o que faz com que possam ser observadas diferenças significativas nas suas propriedades fotoquímicas/fotofísicas (Nunes et al, 2004). Geralmente, ftalocianinas contendo zinco ou alumínio (metais diamagnéticos) como íons centrais, possuem características favoráveis para o uso em terapia fotodinâmica, como alto tempo de vida do estado singlete excitado (3-8ns) bem como maiores tempos de vida do estado triplete excitado (>500ns), que faz com que haja o aumento do rendimento quântico de formação de $^1\text{O}_2$ ($\Phi^1\text{O}_2$), agente diretamente responsável pelo dano celular (Nunes et al, 2004). Estudos também têm mostrado que o alumínio possui uma efetividade ainda maior do que o zinco na morte celular de retrovírus (vírus de RNA que se multiplica na célula hospedeira), como mostrado nos trabalhos desenvolvidos por Ben-Hur e colaboradores, onde a substituição do metal no macrociclo da ftalocianina de alumínio para zinco acarreta uma diminuição

no efeito citotóxico do composto fotossensibilizador em um fator considerável (Ben-Hur e Hosenthal, 1986; Ben-Hur et al, 1992).

Por sua alta estabilidade térmica e boas propriedades fotoquímicas, as ftalocianinas estão sendo extensivamente estudadas para a TFD no tratamento de diversos tipos de câncer (Ribeiro, 2003; Bıyıklıođlu et al, 2011). Adicionalmente, esta classe de moléculas também são estudadas em nanoeletrônica e na fabricação de materiais orgânicos para aplicações em dispositivos óptico-eletrônicos, incluindo sensores de gás, células solares e dispositivos emissores de luz (Chen, 2008).

1.5. Ftalocianina de Alumínio-Cloro

Além de todas as características já citadas nesse trabalho, que conferem às ftalocianinas propriedades desejáveis para bons fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica, é também considerado que as mesmas possuem uma boa compatibilidade com sistemas biotransportadores, por exemplo, como os sistemas lipossomais (Kyriazi et al, 2007; Tapajós et al 2008).

A ftalocianina de alumínio cloro (AlPcCl) (Figura 3-b), tem mostrado inúmeros resultados eficientes que viabilizam sua utilização contra diversos tipos de células via TFD e também contra microorganismos de diferentes estruturas de suas paredes celulares via IFDMO. Estes resultados se devem, entre outras características, por esta molécula apresentar bons valores das principais propriedades fotofísicas necessárias para um bom FS, como discutido anteriormente.

Apesar das características favoráveis para o uso da AlPcCl em terapia fotodinâmica, a mesma possui a desvantagem inicial de ser praticamente insolúvel em meio aquoso. Desta forma as ftalocianinas de modo geral tendem a sofrer o processo de auto-agregação neste meio (Ogunsipe et al, 1994). Sabe-se, por sua vez, que a auto-agregação é um fenômeno indesejável para a terapia fotodinâmica, uma vez que este processo causa modificações nas principais propriedades fotoquímicas dos compostos como a diminuição do rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ^1O_2), principal agente citotóxico na terapia fotodinâmica (Graceto et al, 2010; Chang et al., 2011).

Desta forma, muitos estudos envolvem a síntese de AlPcCl sulfonado-substituídas, havendo assim, um aumento na solubilização destas moléculas em meio aquoso devido ao aumento na polaridade desta decorrente da adição de grupos sulfonados (Ben Hurt e Rosenthal, 1986; Brasseur et al, 1999). No entanto, apesar de serem mais solúveis em água, as ftalocianinas de alumínio-cloro sulfonadas (grafadas como AlPcClSn, onde n é o número de grupos sulfonados na molécula) não apresentam resultados superiores de atividade fotodinâmica em células em relação à

ftalocianina de alumínio-cloro não substituída tanto em estudos *in vitro* (Ben Hurt e Rosenthal, 1986), quanto *in vivo* (Brasseur et al, 1999). Isto se deve à maior permeabilidade à membrana celular de moléculas mais apolares, em comparação às mais polares uma vez que as interações existentes entre a membrana celular e os compostos fotossensibilizadores são hidrofóbicas (Castano, 2005).

Neste sentido, é interessante a pesquisa envolvendo o desenvolvimento de sistemas transportadores/solubilizadores visando à aplicação da AlPcCl em TFD sem que haja perda de suas principais propriedades fotoquímica/fotofísicas devido à auto-agregação desta em meio aquoso. Estudos adicionais reportados na literatura mostram ação fotodinâmica da AlPcCl ($5,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) *in vitro* incorporada em lipossomos (dimiristoil fosfatidilcolina) contra um tipo de tumor de língua (Longo et al, 2009). Estes estudos mostraram que a AlPcCl induz a morte de cerca de 90% das células doentes por necrose sem o comprometimento das células saudáveis (Longo et al, 2009). Também foi estudada a eficácia da AlPcCl em solução aquosa constituída de misturas com DMSO e Tween 80 frente a células cancerígenas da pele (não-melanoma) em camundongos (Kyriazi et al, 2007). Estes estudos também evidenciaram a seletividade da AlPcCl frente às células doentes neste sistema, que mostraram que células cancerígenas absorveram 40 vezes mais composto foto-ativo que as células normais vizinhas, além dos observados efeitos citotóxicos apreciáveis da AlPcCl observados frente a este tipo de células (Kyriazi et al, 2007).

Outro estudo importante feito por Longo e colaboradores foi o ensaio *in vivo* envolvendo a AlPcCl ($5,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em lipossomos catiônicos contra bactérias causadoras de lesões de cárie. Estes estudos mostraram que nos pacientes (dez pessoas, incluindo adultos e crianças) tratados com TFD, a AlPcCl promoveu redução de cerca de 82% da carga inicial destes microorganismos sem serem observados efeitos adversos durante e após o tratamento (Longo et al, 2012). Finalmente, estudos recentes também mostraram alta capacidade citotóxica da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) complexada à ciclodextrinas em ensaios contra linhagens de células cancerígenas localizadas em um músculo do rato (linhagem J774A.1) (Silva, 2010).

Além do tratamento contra células cancerígenas, um trabalho desenvolvido por Dutta e colaboradores, mostrou ação fotodinâmica da AlPcCl dissolvida inicialmente em dimetilformamida (DMF) no tratamento contra a Leishmaniose, uma doença de pele causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. Estes estudos, por sua vez, mostraram atividade da AlPcCl em concentrações baixas deste fotossensibilizador ($10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) contra as formas amastigotas e promastigotas do protozoário causador desta doença sem apresentar toxicidade às células saudáveis (Dutta et al, 2005). No entanto, não há relatos na literatura de trabalhos que envolvam a incorporação da AlPcCl em

micelas poliméricas de P-123 e F-127. Portanto, neste trabalho o enfoque será o estudo das propriedades físico-químicas da AIPcCl em micelas poliméricas, um novo sistema solubilizador/bio-transportador que pode ser utilizado no carregamento de fármacos.

1.6. Micelas poliméricas em formulação de diversos fotossensibilizadores

Devido à auto-agregação de uma grande gama de fotossensibilizadores em meio aquoso, há a necessidade de incorporação destas moléculas em sistemas nano-estruturados visando o biotransporte e proteção das mesmas contra degradação e/ou eliminação pelo organismo, diminuição de efeitos colaterais (toxicidade) e como meio de obter a liberação controlada nas regiões (tecidos e órgãos) a serem tratados (Kataoka et al, 2001). Neste sentido, diversos sistemas transportadores estão sendo amplamente estudados como micelas formadas por copolímeros, micro/nano esferas, conjugados polímeros-fotossensibilizador, lipossomos, complexos polímero-DNA (poliPLEXOS), nanogéis e outros materiais em nano-escala para uso médico que, por sua vez, são coletivamente chamados nanomedicinais (van Nostrum, 2004; Batrakova e Kabanov, 2008 ; Aparício, 2011).

Os carreadores coloidais são amplamente utilizados como sistemas transportadores de drogas. Comparando-se com outros tipos de carregadores, possuem características únicas como a considerável biocompatibilidade bem como uma melhor entrega do fármaco em sítios específicos (van Nostrum, 2004; Miyata et al, 2011). O uso de micelas formadas por moléculas de copolímeros na solubilização/transporte de fármacos hidrofílicos foi inicialmente proposta em 1984 por Bader e colaboradores e desde então vem sendo amplamente utilizadas (Jones e Leroux, 1999).

Até o presente momento, diversas moléculas hidrofóbicas foram incorporadas com sucesso nas micelas poliméricas formadas por copolímeros. Por exemplo, a molécula doxorubicina (DOX) foi incorporada (por aprisionamento físico) de modo eficiente em micelas do copolímero F-68. Esses resultados demonstraram maior atividade antitumoral desta molécula contra células carcinomas de pulmão humano (linhagem A-549) *in vitro* quando incorporada nas micelas de copolímeros em comparação à molécula não incorporada (livre; Zhao et al, 2011). Outro estudo foi realizado utilizando-se do fármaco Paclitaxel incorporado em copolímeros micelares derivados de poli(etilenoglicol-co-metacrilato de metila) metil metacrilato contra células cancerígenas do fígado humano (Jiang et al., 2011). Estes estudos também mostraram uma maior eficiência antitumoral desta molécula incorporada às micelas poliméricas em comparação às não encapsuladas.

Adicionalmente, este sistema mostrou uma relativa facilidade de incorporação, alta capacidade de carregamento da molécula e alta estabilidade (Jiang, 2011 et al., 2011).

As micelas poliméricas formadas por moléculas de copolímeros possuem mais vantagens sobre outros carreadores, tais como microesferas e algumas formulações lipossomais, devido ao seu menor tamanho e uniformidade de suas partículas. Em geral, o tamanho das micelas poliméricas é da ordem de várias dezenas de nanômetros (10 a 100nm) com uma distribuição bastante estreita, o que faz com que as mesmas não penetrem nas paredes dos vasos normais da corrente sanguínea e não sejam facilmente eliminadas pelo sistema renal e reticuloendotelial, permitindo uma maior acumulação em tecidos tumorais (Harada et al,2011; Miyata et al, 2011). Este tamanho também é ideal para a estabilidade da micela polimérica e aumenta o tempo de circulação destes sistemas no corpo (Li et al, 2011). É interessante mencionar que esta faixa de tamanho compreende a de diversos sistemas como vírus, lipoproteínas e muitos outros sistemas mesoscópicos naturais (Kataoka et al, 2001). Isso faz com que as drogas sejam preferencialmente acumuladas nos locais do tumor através de uma maior retenção e permeabilidade (Li et al, 2011). Outras vantagens atribuídas à incorporação de diversos tipos de fármacos em micelas copoliméricas advêm de sua liberação controlada e proteção das substâncias encapsuladas da degradação e outros danos relacionados ao metabolismo.

De modo geral, as micelas formadas por copolímeros (Figura 4) são constituídas de uma parte hidrofílica que é responsável pela estabilização do copolímero via ligação de hidrogênio com moléculas de água e contra o reconhecimento por certos tipos de proteínas e macrófagos, e um “core” hidrofóbico, responsável pelo confinamento do fármaco por interações hidrofóbicas (van der Walls) ou por ligação covalente entre o fármaco com o bloco que compreende o domínio hidrofóbico (Kedar et al, 2010).

Para finalidades de incorporação, os núcleos relatados (parte hidrofóbica) das micelas formadas por moléculas de copolímero podem ter, por exemplo, sua estrutura formada por poli (β -benzil-L-aspartato), poli (DL-ácido láctico), poliésteres, poli (amino-ácidos), poli (met) acrilatos e poli (acrilamida). A corona, parte hidrofílica, é composta preferencialmente de polietilenoglicol (PEG) (Jones e Leroux, 1999; Neradovic et al, 2001; van Nostrum, 2004).

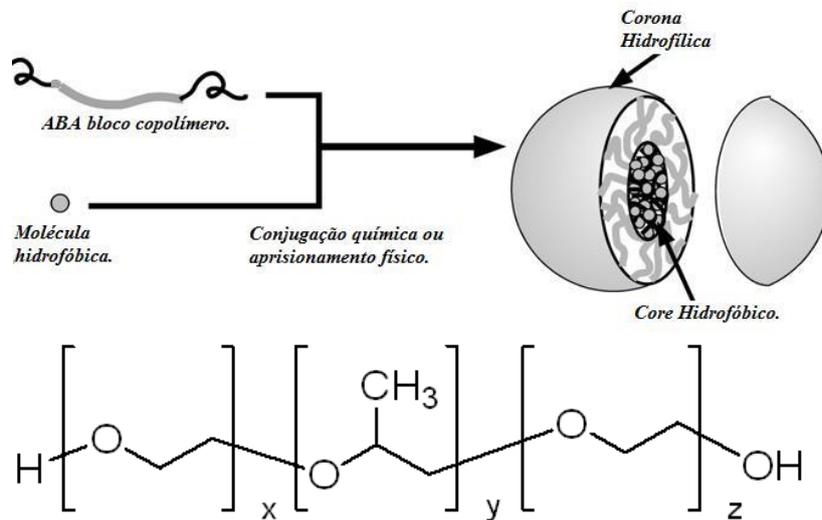


Figura 4. a) Representação esquemática para a formação de uma micela polimérica a partir de copolímeros em água e da incorporação de uma molécula (fármaco), por exemplo, paclitaxel, doxorubicina e etc (Miyata et al, 2011) em seu interior hidrofóbico **b)** Fórmula estrutural geral de um copolímero da classe dos Plurônicos[®], para o P-123; x=z=20 e y=70 e F-127; x=z= 106 e y=70.

Na classe dos copolímeros se destacam os poloxâmeros, em especial os comercializados com a denominação Pluronic[®], mais precisamente o F-127 e P-123, que são surfactantes triblocos, onde há duas extremidades hidrofílicas constituídas de polióxido de etileno (PEO) e um centro hidrofóbico, constituído de polióxido de propileno (PPO) em diferentes proporções (Figura 4-b), nos quais estudos recentes tem mostrado eficiência destes sistemas como biotransportadores de moléculas hidrofóbicas em estudos reportados na literatura (Kataoka et al, 2001; Hioka et al 2002).

Os poloxâmeros são classificados através de um sistema numérico de três dígitos, no qual, considerando um unímero (monômero de um poloxâmero), os dois primeiros multiplicados por 100 dá o valor aproximado da massa molecular do centro hidrofóbico, enquanto o último dígito significa a fração em peso de grupos hidrofílicos PEO em um unímero desta micela (Alexandridis e Hatton, 1995). Neste sentido, para o P-123 tem-se uma massa molecular molecular de aproximadamente 1200 para sua unidade hidrofóbica enquanto que há 30% de unidades hidrofílicas em um unímero deste copolímero. Para o F-127, por sua vez, tem-se o mesmo valor de massa molecular de unidades hidrofóbicas porém há a presença de 70% de unidades hidrofílicas em sua estrutura, ou seja, o surfactante polimérico tribloco F-127 possui uma natureza mais hidrofílica que o P-123 (Alexandridis e Hatton, 1995; Chowdary et al, 2003). O estado físico dos copolímeros da classe dos plurônicos[®] a temperatura ambiente é conhecido através da primeira letra que compõe seu nome, onde F é relativo à flocos, P pasta e L líquido. Neste sentido tem-se que o F-127 está em sua forma flocular (nas condições normais de temperatura e pressão) e o P-123 em forma de pasta (Alexandridis e Hatton, 1995; Hioka, 2002).

Os surfactantes poliméricos da classe dos plurônicos[®] também são bastante versáteis, uma vez que pode-se alterar a hidrofobicidade da sua micela variando-se o número de unidades repetitivas das cadeias hidrofílicas ou hidrofóbicas destes surfactantes. Um aumento na cadeia hidrofílica favorece a um aumento na capacidade de solubilização de moléculas menos hidrofóbicas, que tendem a se acumular na região interfacial da micela (Torchilin, 2001).

Tais poloxâmeros possuem baixa toxicidade em comparação aos surfactantes presentes nos sistemas micelares tradicionais, além de uma concentração micelar crítica relativamente baixa (em torno de 10^{-6} M) em comparação aos mesmos, os tornando mais resistentes aos efeitos de diluição do formulado no plasma quando, por exemplo, *in vivo* (Aparício, 2011). No entanto, tão importante que o fator CMC, a temperatura micelar crítica (TMC) também tem sua importância (Hecht et al., 1995). A temperatura micelar crítica é a temperatura na qual abaixo da mesma a micela do copolímero estará presente no sistema sob a forma de monômeros (unímeros), e acima as mesmas do copolímero se organizam (auto-associam) na forma de micelas, e pode, por exemplo, ser estimada através de estudos de espalhamento dinâmico de luz (DLS; Zhou e Chu, 1988), emissão de fluorescência utilizando-se de sondas fluorescentes como o DPH (Alexandridis et al, 1994), micro DSC (microcalorimetria diferencial de varredura; Zhou e Chu, 1998; Hecht et al., 1995), onde neste último, é definida como a interseção da tangente no primeiro ponto de inflexão do pico-térmico com a linha base (Hecht et al., 1995).

A TMC é fortemente dependente da concentração de copolímero no sistema, de acordo com a equação 1, obtida através de estudos de micro DSC e DLS (Wanka, 1995).

$$TMC = TMC^{\circ} - A(w) \quad \text{(equação 1)}$$

TMC° : valor da TMC à diluição infinita, w : concentração do surfactante em (%m/V), A : coeficiente angular do gráfico de TMC versus concentração do surfactante ($^{\circ}\text{C}/\text{m}\%$; válida para poloxâmeros que estejam em concentrações abaixo de 30%; Wanka et al, 1995).

A Tabela 2 mostra os valores de $A(w)$ aplicadas através da equação 1 para os poloxâmeros estudados neste trabalho (Wanka et al, 1994). Estes valores foram utilizados neste trabalho para cálculos de TMC em diferentes regiões de concentrações de poloxâmeros para os estudos conduzidos no decorrer desta dissertação.

Tabela 2. Constantes utilizadas para a determinação da TMC dos poloxâmeros estudados utilizando-se da equação 1 (Wanka et al, 1994).

Poloxâmero	TMC° (°C)	A (°C/%m)
P-123	17,8	0,38
F-127	20,4	0,59

Devido a maior complexidade dos copolímeros estes tem sido extensivamente estudados como sistemas transportadores de fármacos (Wanka et al, 1994; Jones e Leroux, 1999; Myiata et al, 2011) e também, de modo geral, na indústria farmacêutica como emulsificantes, agentes umectantes e revestimento (Alexandridis e Hatton, 1995; Riess, 2003).

1.7. Inativação Fotodinâmica de Microorganismos (IFDMO)

A crescente resistência dos microorganismos frente a ação de antibióticos ou compostos antifúngicos tem levado a busca por alternativas para tratamentos antimicrobianos nos últimos anos (Perussi, 2007; Spesia et al, 2010). Os novos antibióticos desenvolvidos incluem bacteriófagos, modificação fenótipo-bacteriano, biblioteca genômica, dentre outros (Taylor et al, 2002; Ribeiro et al, 2013). Uma alternativa para os tratamentos antimicrobianos que vêm sendo extensivamente estudada é a inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO). A IFDMO utiliza-se do mesmo princípio da TFD (mecanismos do tipo I e II), sendo que a morte celular é causada pelo oxigênio singlete e/ou radicais livres tornando improvável que os microorganismos manifestem naturalmente uma resistência a este tipo de tratamento com o passar do tempo, como usualmente observado para alguns tipos de medicamentos tradicionais, como os antibióticos (O' Riordan et al, 2005). Quando ocorre a inativação de microorganismos através do mecanismo do tipo I (ver seção 1.2), por exemplo, inicialmente tem-se a abstração de hidrogênios alílicos de moléculas insaturadas como fosfolipídeos presentes na membrana plasmática iniciando algumas reações redox, que geram espécies reativas perto do alvo biomolecular. Uma vez com a presença de oxigênio neste ambiente microbial (citoplasma) há a formação de espécies reativas de oxigênio como os radicais superóxido e hidroxil que podem reagir com biomoléculas ou gerar peróxido de hidrogênio por combinação levando a efeitos citotóxicos, com formação de hidroperóxido lipídico (Wainwright, 2002). A integridade da membrana é comprometida através desta peroxidação de lipídeos, levando à uma diminuição de sua fluidez e aumento na permeabilidade de alguns tipos de íons (Gerola, 2010). Já

no mecanismo do tipo II, o oxigênio no estado singlete atua como agente oxidante de algumas moléculas envolvidas na manutenção e estruturação da membrana celular como fosfolipídeos, esteróis e peptídeos entre outras (Wainwright, 2002). A IFDMO também é utilizada na esterilização do sangue, periodontia, desinfecção da água, aplicação sobre parasitas humanos e no tratamento antimicrobiano de alimentos, entre outros (Perussi, 2007).

No presente trabalho foram estudados os efeitos citotóxicos da AlPcCl com diferentes tipos de microorganismos: *E. coli* (bactéria gram negativa), *S. aureus* (gram positiva) e *C. albicans* (fungo).

A *Cândida albicans* (Figura 5) é um fungo que está entre os muitos microorganismos que vivem na boca e no sistema digestivo humano. É um microorganismo assexual diplóide de forma arredondada ou ovalada de 3 a 5 µm, gram positiva apresentando um metabolismo principalmente aeróbio (Radford, et al 1999; Ureña 1995). Usualmente este fungo está presente em cerca de 80% da espécie humana. Porém, quando em excesso este microorganismo causa a candidíase oral, uma infecção que acomete pacientes que estão sendo tratados com quimioterapia ou radioterapia contra o câncer ou àqueles que possuem imunodeficiência devido à infecção através do vírus da AIDS. A candidíase ocorre com cerca 48% dos pacientes que possuem HIV, sendo que esta taxa se eleva para 90% quando estes estão em um estágio avançado da doença. Também é sabido que este fungo pode causar lesões superficiais na pele, cavidade oral, do trato gastrointestinal e vagina (Gelis et al, 2012).

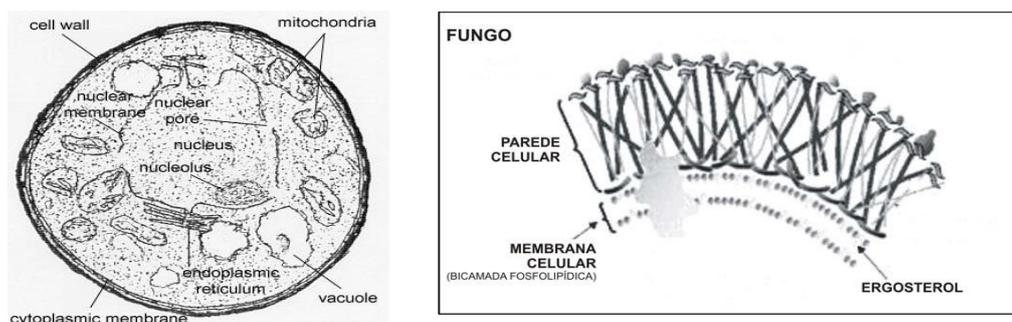


Figura 5. a) Representação da *Cândida Albicans* (célula eucariótica) e b) Representação esquemática da parede de um fungo, como a *Cândida Albicans*.

A *Escherichia coli* (*E. coli*) trata-se de uma bactéria gram-negativa (em sua camada externa há a presença de lipopolissacarídeos, Figura 6) que costuma viver dentro da flora intestinal dos mamíferos de modo geral (Ribeiro et al, 2013). No homem esta bactéria é responsável por metabolizar vitaminas e possui o papel importante de reprimir a multiplicação de outras bactérias

indesejáveis à saúde (Peloi, 2007). No entanto, a *E. coli* também representa um dos mais importantes patógenos bacterianos em bacteriologia médica, sendo causador de infecções intestinais ou extra-intestinais (meningite, septicemia, infecções no trato, entre outras) principalmente em mulheres e crianças (Peloi, 2007). Ao contrário das usualmente presentes na flora intestinal dos organismos superiores, estas bactérias causam patogenicidade em outros órgãos dos seres humanos, daí a sua implicação negativa (Garcia, 1996).

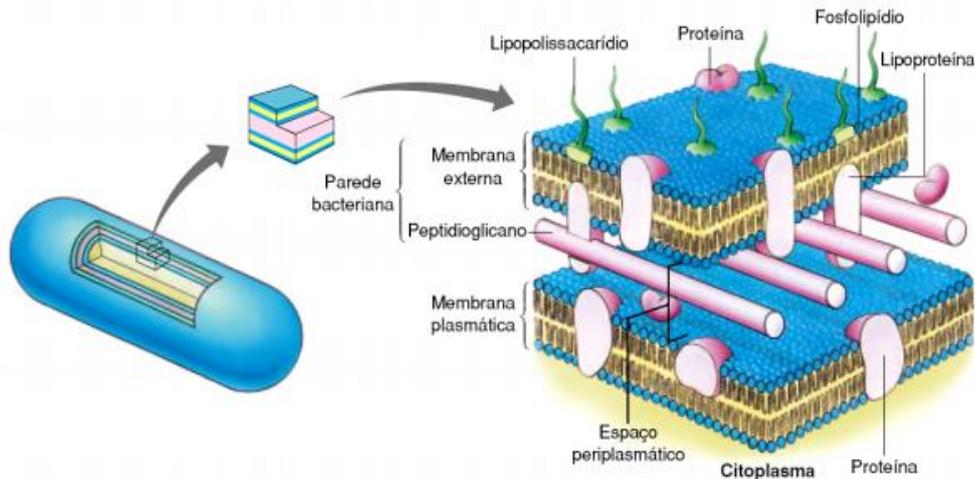


Figura 6. Representação esquemática da parede celular de uma bactéria gram-negativa, como a *E. coli*.

A bactéria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) juntamente com a *E. coli* são consideradas as mais antigas bactérias simbiotes do homem, estando também presente na pele e na nasofaringe (Gagliotti et al, 2011). Porém, em grandes quantidades pode ser prejudicial levando a infecções, sendo que este microorganismo é o maior responsável pelas infecções hospitalares devido à facilidade de colonização da mesma nestes ambientes (Santos, 2009). Estima-se que 25% da população humana seja hospedeira permanente deste microorganismo, sendo que os fatores mais comuns que predispõe o hospedeiro a essa infecção são as micoses de pele e mucosas, infecções virais, anormalidades metabólicas, como por exemplo, diabetes, e em outras condições como em caso de má nutrição e idade avançada. Uma vez presente em seu hospedeiro, esta bactéria pode causar uma enorme variedade de sintomas clínicos, afetando a pele, pulmões, coração, sistema nervoso central, ossos e articulações, corrente sanguínea e trato gastrointestinal (Bachert, 2002). Além disso, sua presença em alimentos causa intoxicação devido à sua alta capacidade de produzir toxinas (Livermore, 2000). A *S. aureus* não possui uma membrana externa, uma camada de peptidoglicano assume esta função (Figura 7), sendo mais susceptíveis à TFD do que outros microorganismos.

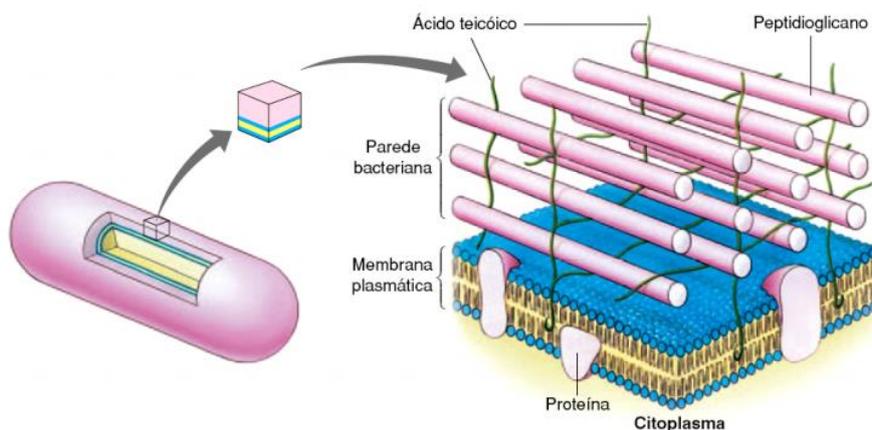


Figura 7. Representação esquemática da parede celular de uma bactéria gram positiva, como a *S. Aureus*.

Portanto, devido à importância destes microorganismos, e considerando crescente a resistência dos mesmos a medicamentos antimicrobianos e antifúngicos, neste trabalho foram estudadas as propriedades citotóxicas da AlPcCl encapsulada nos copolímeros P-123 e F-127 através da IFDMO.

2. OBJETIVOS

Estudar as propriedades físico-químicas e fotodinâmicas da ftalocianina de Alumínio-Cloro (AlPcCl) em meio homogêneo e em sistemas micro-heterogêneos constituídos de micelas poliméricas de Pluronic[®] P-123 e F-127, como as propriedades de associação, solubilização (encapsulamento), organização molecular e estabilidade da AlPcCl a partir de seus formulados mistos AlPcCl/Poloxâmeros, nos quais os polímeros estudados apresentam diferentes graus de hidrofobicidade. Neste trabalho também se pretende avaliar a atividade fotodinâmica microbicida dos formulados obtidos em microorganismos como bactérias as *S. aureus*, *E. coli* e o fungo *C. albicans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

A ftalocianina de Alumínio-Cloro [Alumínio (29H, 31H – ftalocianato) Cloro] (AlPcCl 95%; MM=574,96 gmol⁻¹; Figura 3) e os surfactantes poliméricos P-123 e F-127 (Figura 4) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O etanol, utilizado para a preparação das soluções e no processo de incorporação nos sistemas poliméricos foi de alto grau de pureza (P.A). Outros solventes (acetona, dimetilsulfóxido e clorofórmio) foram utilizados nos estudos espectroscópicos em meio homogêneo. Os compostos foram utilizados como adquiridos.

3.1.1. Principais equipamentos utilizados nos estudos

- Evaporador Rotativo modelo Alpax 9009.
 - Banho do tipo Dubnoff com agitação MA-093, Marconi Ltda.
 - Liofilizador Micromodulyo 115 da Thermo Fisher Scientific.
 - LASER de diodo (100mW; $\lambda_{\text{máx}}$: 663 nm) LASER line.
- Medidas de absorção na região do UV-Vis.**

Usou-se o espectrofotômetro UV-Vis DU-800 com controlador de temperatura de alto-desempenho do tipo peltier da Beckman/Coulter Electronics. As cubetas utilizadas são de quartzo com 1,00 cm de caminho óptico.

- Medidas de fluorescência e RLS.

Usou-se o Espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian/Agilent Technologies acoplado a um controlador de temperatura (banho termostático Varian/ Agilent). Os experimentos de fluorescência foram executados fixando-se o comprimento de onda de excitação em 604 nm e varrendo-se a emissão de 620 a 850 nm.

Para os experimentos de espalhamento de luz ressonante (RLS), o espectrofluorímetro foi operado no modo sincrônico, isto é, os comprimentos de onda de excitação e emissão variando simultaneamente ($\Delta\lambda= 0$ nm).

3.2. Métodos

3.2.1. Propriedades espectroscópicas e de solubilidade da AlPcCl em meio homogêneo: estudos de absorção eletrônica e fluorescência

Foram realizados estudos das propriedades espectroscópicas da AlPcCl em solventes de diferentes polaridades (etanol, acetona, água, dimetilsulfóxido e clorofórmio) através de espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis e emissão de fluorescência (estática). Os espectros de absorção eletrônica UV-Vis e fluorescência da AlPcCl foram obtidos a 30°C nos diferentes solventes para diferentes concentrações de AlPcCl obtidas originalmente a partir de uma solução estoque de AlPcCl em etanol ($1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$). Neste caso, como se observou que a solubilidade da AlPcCl era menor nos demais solventes, e até mesmo quase insolúvel em alguns deles, as soluções de AlPcCl estoque nos demais solventes ($1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) foram obtidas a partir da solução de AlPcCl previamente preparada em etanol. Entretanto deve ser mencionado que devido à baixíssima solubilidade da AlPcCl em água e clorofórmio, seus espectros (absorção eletrônica, fluorescência e RLS) foram estimados apenas nas concentrações de $1,1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ e $7,6 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ para constatação deste efeito associado ao processo interno auto-agregacional da AlPcCl.

A partir dos espectros UV-Vis nas diferentes concentrações de AlPcCl nos diferentes solventes, foi estimado o valor do coeficiente de absortividade molar (ϵ) para as principais bandas de absorção da AlPcCl através do gráfico de absorvância vs [AlPcCl] nos diferentes sistemas, utilizando-se da Lei de Lambert Beer (Equação 2; Ruifrok e Johnston, 2001; Valeur, 2002;):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{equação 2})$$

A: absorvância, ϵ : coeficiente de absortividade molar, l: caminho óptico (1 cm) e c: concentração (molL^{-1}).

Os espectros de emissão de fluorescência, excitação e RLS também foram monitorados nos mesmos sistemas AlPcCl-solventes estudados através de espectroscopia de absorção eletrônica utilizando um espectrofluorímetro modelo Varian Cary 50. É de conhecimento que a grande maioria dos auto-agregados não emitem por fluorescência, uma vez que sofrem auto-supressão de energia (Gerola et al, 2010). Através deste experimento é possível, portanto, verificar possíveis processos de auto-agregação da AlPcCl nesses solventes em função de sua concentração. Adicionalmente, a técnica espalhamento de luz ressonante (RLS) pode ser simultaneamente utilizada para se obter

informações a respeito da existência de agregados relativamente maiores que absorvem/espalham luz (Pasternack e Colings, 1995). Uma das vantagens dessa técnica nos experimentos que envolvem a existência de agregados advém do fato da absorção e do RLS do sistema dependerem da concentração e do tamanho do agregado de modo diferenciado (Pasternack, 1993). Na espectroscopia de absorção eletrônica a intensidade do sinal depende da concentração, como proposto pela Lei de Lambert Beer. O sinal de RLS, por sua vez, depende fortemente do tamanho do agregado, por exemplo, o sinal de espalhamento sendo proporcional ao quadrado do seu volume (Colings e Pasternack; 1995; Colings et al, 1999). Desta forma, mesmo nos casos em que a absorção é pequena, se o agregado for de tamanho grande, o sinal de RLS será considerável. Nesse sentido, os sinais de RLS também foram monitorados para que se pudesse ter ciência da dimensão relativa das possíveis formas auto-agregadas da AIPcCl nos diferentes sistemas estudados.

3.2.2. Caracterização da agregação da AIPcCl em meio homogêneo: Estudos Espectroscópicos da AIPcCl em misturas Água-etanol

Foram conduzidos estudos de absorção eletrônica e fluorescência para a AIPcCl no sistema misto monofásico água-etanol ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ para medidas de UV-Vis e $3,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ para medidas de fluorescência), obtidos a partir de diluições com misturas água-etanol de uma solução estoque $3,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ de AIPcCl em etanol. Através destes estudos pretende-se dar continuidade à investigação das características espectroscópicas das possíveis formas auto-agregadas da AIPcCl presentes nos sistemas homogêneos induzida pela adição de um co-solvente imiscível de maior polaridade. Os espectros de absorção eletrônica (UV-Vis), emissão de fluorescência e de RLS foram registrados para cada sistema. As amostras utilizadas no experimento de emissão de fluorescência foram preparadas diluindo-se uma alíquota de 30 μL de uma solução de AIPcCl ($3,0 \mu\text{mol/L}$) em 3000 μL de etanol e outra diluída em 3000 μL de água, obtendo-se uma concentração final de $3,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ de AIPcCl em ambas as soluções.

3.2.3. Estudos das propriedades fotofísicas da AIPcCl em meio homogêneo: Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2$)

3.2.3.1. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da AIPcCl em meio homogêneo

O rendimento quântico de fluorescência é dado pelo número de fótons emitidos relativos ao número de fótons que foram absorvidos pelo fluoróforo. A medida do rendimento quântico de fluorescência pode ser realizada através do método absoluto ou relativo (Lakowicz, 2006; Eaton, 1998; Rurack e Spieles, 2011). A determinação absoluta do rendimento quântico de fluorescência pode ser realizada diretamente através de métodos ópticos medindo a quantidade de fótons absorvidos em unidades radiométricas absolutas ou indiretamente através de métodos calorimétricos, avaliando-se a energia canalizada através de vias não radiativas (Rurack e Spieles, 2011). Nas medidas envolvendo emissão de fluorescência resolvida no tempo, por exemplo, o rendimento quântico de fluorescência do fluoróforo é obtido analisando-se o tempo de vida de fluorescência do mesmo no meio em questão, uma vez é conhecido que o rendimento quântico de fluorescência é proporcional ao tempo de vida (Lakowicz, 2006). No entanto, as medidas absolutas do rendimento quântico de fluorescência não são triviais exigindo instrumentação especial como, por exemplo, no caso de medidas de emissão de fluorescência resolvida no tempo, na qual são necessários equipamentos com detectores de alto desempenho (Lakowics, 2006; Rurack e Spiekles, 2011). Também utilizado é o método relativo do padrão secundário que consiste no uso de substâncias que possuam Φ_f conhecido e que comumente, é mais utilizado que o método anterior devido à sua simplicidade e relativo custo baixo (Eaton, 1988; Chidawanyika, 2010; Rurack e Spieles, 2011). Através desse método para determinações do rendimento quântico de fluorescência no estado estacionário, é necessário que haja uma correção do espectro de emissão da AIPcCl ou o uso de um padrão que apresente propriedades semelhantes à da espécie que possui um rendimento quântico de fluorescência desconhecido (ou seja, é necessário que o espectro de emissão do padrão esteja na mesma faixa de emissão da espécie que se quer determinar o rendimento quântico de fluorescência) (Eaton, 1988; Chidawanyika, 2010; Ribeiro, 2003; Rurack, 2011). Para a determinação do Φ_f , considera-se alguns fatores interferentes que podem estar presentes no meio sob estudo, como: efeitos de filtro interno, grande diferença entre os comprimentos de onda de emissão e de excitação, índices de refração, efeitos de polarização/anisotropia, temperatura, impurezas e estabilidade fotoquímica (Ribeiro, 2003).

Neste sentido, a determinação do Φ_f da AIPcCl em etanol foi realizada, utilizando-se a equação 3 como parâmetro:

$$\phi_{Fluo,x} = \left\{ \frac{\text{área}_x \cdot A_p \cdot n_p^2}{\text{área}_p \cdot A_x \cdot n_x^2} \right\} \cdot \phi_p \quad \text{(equação 3)}$$

Onde o subíndice x indica respectivamente a área integrada do espectro de emissão ($área_x$), absorvância (A_x) e índice de refração (n_x) da AlPcCl, bem como o subíndice p indica os mesmos termos aplicado ao padrão, respectivamente, utilizando-se em nosso caso a ftalocianina de Zinco (ZnPc). A concentração do padrão e da AlPcCl foi de $1,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ para todos os experimentos que, por sua vez, foram realizados em triplicata.

3.2.3.2. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2$) da AlPcCl em meio homogêneo

Foram realizados experimentos (medidas no estado estacionário) para determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2$) da AlPcCl em meio homogêneo (etanol) utilizando o ácido úrico (A.U) como sensor químico ou substrato específico (Gerola et al, 2012, Rabello et al, 2012). Este método indireto se baseia na análise quantitativa das reações de foto-oxidação, determinada pelo método que considera o consumo de $^1\text{O}_2$ durante o processo de foto-oxidação do AU. Neste caso o decaimento da concentração do substrato pode estar diretamente relacionado com a quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado, permitindo uma estimativa do valor de $\Phi^1\text{O}_2$. Portanto, neste estudo, AU foi utilizado como sensor químico para a determinação indireta de $^1\text{O}_2$ produzido pela irradiação da AlPcCl em uma determinada concentração em solução etanólica, a 25°C , utilizando-se de um sistema de LASER diodo (100 mW, policromático; $\lambda_{\text{máx}}$: 663nm). Através desta metodologia, os efeitos de fotobranqueamento do fotossensibilizador também são considerados (Gerola et al, 2012).

Nos experimentos realizados foram utilizados 3,00 mL de soluções contendo AlPcCl em etanol supostamente no estado monomerizado ($5,0, 7,0$ e $9,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) e ácido úrico em uma concentração fixa de $1,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$. As amostras foram adicionadas em cubetas de quartzo com 1 cm de largura e sob borbulhamento de ar utilizando um pequeno compressor (Big Air Super Pump A320). A solução contendo AlPcCl e AU foi irradiada por um LASER de diodo ($\lambda_{\text{máx}}=663\text{nm}$) acoplado ao espectrofotômetro UV-Vis modelo Cary 50 até o fim do experimento (consumo total do AU monitorado entre 5 e 20 minutos). Tal equipamento trabalha no modo de radiação-fase, no qual a luz externa não interfere na análise (Gerola, 2012).

Os espectros de absorção eletrônica da amostra (200 a 800nm) foram obtidos no modo de varredura cinética, monitorando-se a foto-oxidação do AU através da diminuição da banda de absorção do ácido úrico em $\lambda_{\text{máx}}$: 293 nm e do crescimento da banda do intermediário monitorada em 315 nm (Rabello et al, 2012). Simultaneamente à diminuição da banda de absorção do ácido

úrico (AU) com o tempo de irradiação da solução etanólica contendo AlPcCl, foi necessário o acompanhamento da intensidade da banda de absorção da AlPcCl (banda Q; $\lambda_{\text{máx}}=672\text{nm}$) de modo a se verificar um possível efeito paralelo de fotobranqueamento, que deve ser considerado nos cálculos para a determinação de $\Phi^1\text{O}_2$ (Gerola et al, 2012).

O decréscimo na banda de absorção do ácido úrico foi ajustado segundo um modelo bi-exponencial (equação 4), proporcionando dois valores de constante de fotodegradação do substrato: k_1 e k_2 . B_1 e B_2 é a amplitude de decaimento da absorção do ácido úrico monitorado na primeira e segunda etapas da curva de decaimento do substrato, respectivamente; t é o tempo de irradiação e A é a absorvância, na região do visível.

$$A = A_0 + B_1 \cdot e^{-k_1 t} + B_2 e^{-k_2 t} \quad \text{(equação 4)}$$

Posteriormente, foi estimada a quantidade de fótons absorvido pela AlPcCl (N_{abs}) utilizando-se a equação 5 (Gerolla et al, 2012).

$$N_{\text{Abs}} = \frac{1}{N_a \cdot h \cdot c} \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P(\lambda) \cdot I_0 (1 - 10^{-b \cdot c \cdot \epsilon}) \cdot e^{-k_{PB} t} d\lambda dt \quad \text{(equação 5)}$$

. N_{Abs} : é o número de fótons absorvidos pela AlPcCl;

. N_a : constante de Avogadro; h : constante de Planck;

. c : velocidade da luz;

. $e^{-k_{PB} t}$: termo que considera reações de fotodegradação do fotossensibilizador (fotobranqueamento);

. $I_0(1-10^{-bc\epsilon})$ refere-se à fração de luz incidente absorvida pela AlPcCl em cada comprimento de onda;

. P é a potência em cada comprimento de onda;

Adicionalmente, esta equação permite o cálculo da eficiência (γ_{Δ}) dos processos considerando as reações fotoquímicas observadas para os fotossensibilizadores estáveis e instáveis sob irradiação luminosa. A eficiência de formação de oxigênio singlete γ_{Δ} é, portanto, estimada pela equação 6:

$$\gamma_{\Delta} \propto \frac{k_1}{N_{\text{Abs}}}$$

(equação 6)

γ_{Δ} é a eficiência de formação de oxigênio singlete e k_1 a constante de fotodegradação do substrato. Finalmente, o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ} ou ϕ_{1O_2}) é obtido através da equação 7:

$$\phi_{\Delta} = \frac{\phi_{\Delta}^S}{\gamma_{\Delta}^S} \gamma_{\Delta} \quad (\text{equação 7})$$

onde: Φ_{Δ} : rendimento quântico de oxigênio singlete da AlPcCl; Φ_{Δ}^S : rendimento quântico do padrão de rendimento quântico conhecido (ftalocianina de zinco ZnPc); γ_{Δ}^S : eficiência de formação de oxigênio singlete do padrão; γ_{Δ} : eficiência de formação de oxigênio singlete da AlPcCl.

3.2.4. Estudo das propriedades físico-químicas da AlPcCl em sistemas micro-heterogêneos copoliméricos nano-estruturados: micelas poliméricas de P-123 e F-127

3.2.4.1. Isotermas de ligação da AlPcCl nos sistemas micelares copoliméricos de P-123 e F-127

Este estudo foi realizado com o intuito de se estudar a interação primária entre a AlPcCl e os sistemas micelares poliméricos e relacionar estes resultados com os obtidos com a AlPcCl incorporada pelo método de dispersão nestes sistemas. Para a determinação das isotermas de ligação da AlPcCl nos surfactantes poliméricos da classe dos plurônicos[®] F-127 e P-123, realizou-se uma titulação da AlPcCl na concentração de $8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ em uma mistura água/etanol 99,1 % (porcentagem esta que não interfere na estabilidade das micelas), com adição de alíquotas de P-123 ou F-127 (variando-se de 0 a 1,51mM em P-123 e 0 a 0,7mM para F-127), a partir de uma solução estoque 2% (m/V) destes surfactantes (1,6 mM para F-127 e 3,4mM para P-123), monitorando-se os espectros de absorção eletrônica, emissão de fluorescência ($\lambda_{exc}=604 \text{ nm}$, medindo-se o espectro de emissão entre 620 a 850 nm) e RLS ($\Delta\lambda=0$), a 25°C. As medidas foram realizadas imediatamente após a adição dos surfactantes e são, portanto, experimentos realizados aproximadamente no tempo

t=0 para cada adição de copolímero. No intuito de se verificar uma possível reorganização estrutural da AlPcCl nas micelas poliméricas com o passar do tempo, também foi analisada a isoterma de ligação da AlPcCl aos poloxâmeros no tempo de equilíbrio, aproximadamente 48 horas (tempo suficiente para a verificação dos possíveis efeitos de reorganização estrutural do FS) após a adição das mesmas alíquotas dos copolímeros na temperatura de 25°C.

Estes experimentos também foram realizados no intervalo de temperatura entre 15 e 40 °C, com o objetivo de se avaliar o perfil de interação da AlPcCl com estes poloxâmeros dependentemente da organização estrutural dos polímeros micelares, uma vez que este é dependente da temperatura (Alexandridis et al, 1993) .

3.2.4.2. Estudos cinéticos do processo de incorporação da AlPcCl nos sistemas micelares poliméricos P-123 e F-127

Os perfis cinéticos de incorporação da AlPcCl nos poloxâmeros foi obtido para os mesmos sistemas de adições de poloxâmeros do item 3.2.4.1 monitorando-se (por espectroscopia de absorção eletrônica) as variações na intensidade de absorção na banda Q_{III} da AlPcCl ($\lambda_{\text{máx}}=677\text{nm}$) para as soluções de AlPcCl na concentração de $2,4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ com diferentes concentrações de copolímeros (que variaram de 0 a $1,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ em P-123 e 0 a $0,7 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ para F-127) resultando em diferentes razões $[\text{AlPcCl}]/[\text{copolímero}_{\text{mic}}]$, que variaram desde sem a presença de micelas no meio a 10 indicando, neste último, a presença de dez moléculas de AlPcCl por micela, levando-se em conta o número de agregação dos copolímeros a 30°C (Wanka et al, 1994). A cinética foi monitorada durante 48 horas.

3.2.5. Encapsulamento da AlPcCl nos sistemas micelares-copoliméricos F-127 e P-123: estabilidade do fotossensibilizador encapsulado e sua organização molecular em função da temperatura

3.2.5.1. Técnica de preparação de formulações contendo AlPcCl encapsulada com poloxâmeros

Para a incorporação da AlPcCl nos copolímeros micelares F-127 e P-123 utilizou-se do método de dispersão sólida (Zhang et al., 1996). Foram utilizadas concentrações finais de copolímeros de 0,5, 2, 4 e 8% (%m/V) (P-123 MM=5800 g/mol ; F-127 MM = 12600 g/mol), que

correspondem às massas de 0,125, 0,500, 1,000 e 2,000g, respectivamente (região de concentração de $0,39$ a $6,8 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ para F-127 e $0,86$ a $13 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ para P-123) no volume de 25 mL. Para a obtenção da massa de AlPcCl a ser incorporada em cada formulação, partiu-se inicialmente de soluções de AlPcCl ($8,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em uma solução estoque de etanol. A quantidade final de AlPcCl dissolvida variou de 0,1 a 1,7mg, dependendo da concentração do copolímero utilizada e também da razão final $[\text{AlPcCl}]/[\text{copolímero}_{\text{mic}}]$ (variando de 10 até 0,1) desejada na temperatura de 25°C (Wanka et al, 1994).

O método de dispersão sólida consiste na co-solubilização da AlPcCl e o poloxâmero (P-123 ou F-127) em um solvente com baixo ponto de ebulição que solubilize tanto o composto foto-ativo quanto o copolímero, neste trabalho o etanol. Em seguida, o solvente é evaporado através de um evaporador rotativo por 20 minutos a 50°C em um balão de fundo chato de 50,00 ou 100,00 mL, obtendo-se uma matriz sólida de AlPcCl/poloxâmero. Possíveis resíduos de solvente foram retirados deixando-se o sistema sob dessecador à pressão reduzida durante 24 horas. Posteriormente, foi realizada a hidratação da matriz sólida AlPcCl/copolímero aquecendo-se o sistema a 60°C , seguida de agitação (Banho do tipo Dubnoff com agitação MA-093, Marconi Ltda), de 22 mL de água, também a 60°C até sua solubilização (aproximadamente 10 horas). Após, o volume do formulado foi completado para 25 mL obtendo-se formulações micelares com a AlPcCl incorporada na concentração desejada. As etapas do processo podem ser melhores visualizadas através da Figura 7.

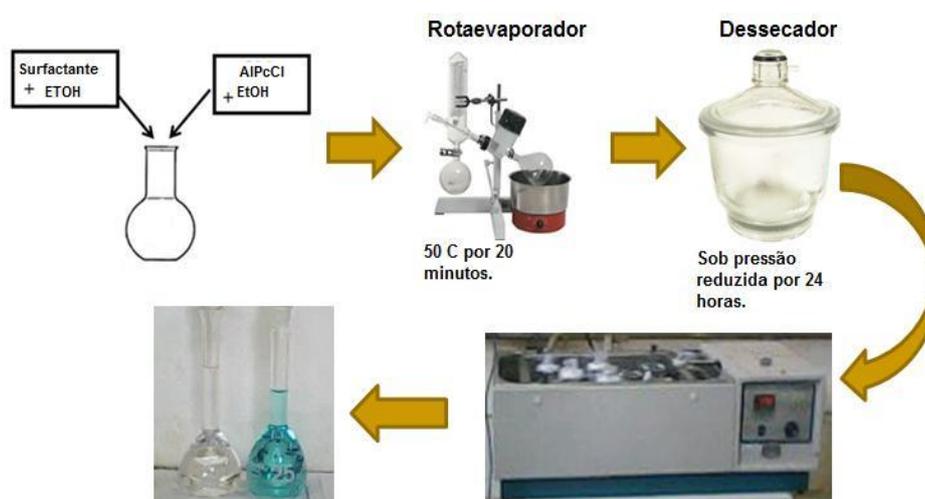


Figura 8. Representação esquemática do método de dispersão sólida, utilizado para a incorporação da AlPcCl em micelas poliméricas constituídas de P-123 e F-127.

De maneira semelhante, foram preparadas soluções de poloxâmeros na mesma concentração (% massa/volume) na ausência de AlPcCl, porém utilizando o mesmo método, para que pudessem ser utilizadas como referências “branco” nas medidas espectroscópicas efetuadas no decorrer deste trabalho.

Posteriormente, as soluções foram transferidas para tubos de ensaio de 15,00 mL (15 cm de altura e 5 cm de diâmetro) e avaliadas quanto a seu estado agregacional retirando-se 3 alíquotas de partes distintas do tubo (Figura 9), medindo-se os espectros de absorção UV-Vis destas referidas alíquotas em diferentes tempos (item 3.2.5.3).

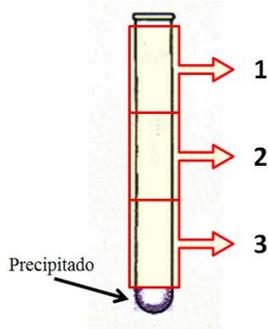


Figura 9. Esquema mostrando-se as regiões do tubo nas quais foram retiradas alíquotas de 15 mL contendo o formulado AlPcCl-copolímero para a análise de homogeneidade.

3.2.5.2. Propriedades fotofísicas da AlPcCl encapsulada em micelas poliméricas de P-123 e F-127

a) Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da AlPcCl encapsulada em P-123 e F-127

Para a quantificação da AlPcCl encapsulada nas micelas, fez-se necessário a determinação do coeficiente de absorvidade molar ϵ “aparente” da AlPcCl no microambiente micelar. Para isso, procedeu-se conforme descrito na seção 3.2.1 utilizando-se de uma massa muito pequena de fotossensibilizador (5×10^{-5} g) para a concentração de copolímero na qual o experimento foi realizado (6,9mM) no intuito de se garantir uma total incorporação/solubilização da AlPcCl nas micelas poliméricas e com a menor contribuição da presença de auto-agregados da AlPcCl. Nesse sentido, foi obtido um formulado de concentração de AlPcCl $3,5 \times 10^{-6}$ molL⁻¹ em P-123 4% (m/V; 6,9mM), resultando na razão [AlPcCl]/[P-123_{mic}]: 0,1, ou seja, com a presença de aproximadamente 10 micelas de P-123 para cada molécula de AlPcCl presente no sistema, uma vez que na

temperatura de 30°C o número de monômeros do copolímero na micela P-123 é aproximadamente 222 (Wanka et al, 1994) .

A diluição da amostra foi realizada com a solução micelar sem a presença da AlPcCl. O valor de ϵ foi obtido respeitando-se a Lei de Beer (equação 2), determinando-se o valor do coeficiente angular da reta entre a absorção *versus* a concentração. O mesmo procedimento foi realizado para a AlPcCl ($3,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em F-127 3,2 mM e $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ de 0,05, ou seja, com a presença aproximada de 20 micelas de F-127 para cada molécula do fotossensibilizador, uma vez que o número de monômeros de F-127 que compõe uma micela nesta temperatura é aproximadamente 67 (Wanka et al, 1994).

b) Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da AlPcCl em P-123

Para a determinação do rendimento quântico de fluorescência da AlPcCl em P-123, utilizou-se um formulado contendo AlPcCl ($2,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 8% ($1,3 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$; $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ 0,04 a 25°C). Esta pequena concentração de fotossensibilizador (ou baixa $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$) foi utilizada visando obter um formulado com a AlPcCl totalmente monomerizada neste sistema. Para a obtenção deste valor utilizou-se da metodologia descrita no item 3.2.3-b. A determinação do rendimento quântico de fluorescência da AlPcCl encapsulada em F-127 não foi possível, uma vez que a mesma se encontra auto-agregada neste copolímero, praticamente não emitindo por fluorescência, como será discutido neste trabalho.

Adicionalmente tentou-se a determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\phi_{^1\text{O}_2}$) da AlPcCl encapsulada em P-123 e F-127 utilizando-se da metodologia que envolve a foto-oxidação do AU via $^1\text{O}_2$ descrita no item 3.2.3-b, porém esta determinação é complicada por um problema envolvendo a localização distinta entre o oxigênio singlete formado e a sonda (ácido úrico) (Rabello et al, 2012), como será discutido em detalhes.

3.2.5.3. Estudo da estabilidade dos formulados contendo AlPcCl encapsulada em micelas poliméricas de P-123 e F-127: Processos de auto-agregação e liberação do fotossensibilizador em função do tempo

É necessário a avaliação das propriedades da AlPcCl encapsulada nas micelas poliméricas dos copolímeros micelares quanto às características espectroscópicas, estabilidade e processos que

podem ocorrer com o decorrer do tempo. Estes estudos são necessários visando o desenvolvimento de formulados com possibilidade comercial.

Com o intuito de se obter informações acerca da solubilidade e possíveis informações sobre a organização estrutural da AIPcCl e sua dependência com a razão $[AIPcCl]/[copolímero_{mic}]$ (ou concentração de copolímero), foram feitas incorporações de diversas massas do fotossensibilizador (variando de 0,1 a 1,7 mg e razão $[AIPcCl]/[copolímero_{mic}]$ variando de $0,01 \times 10^{-2}$ a 5,0 considerando o número de agregação do F-127 e P-123 como sendo 37 e 86, respectivamente a 25°C; Wanka et al, 1994) nas diversas concentrações de copolímeros (0,5, 2, 4 e 8%; m/V; que correspondem a faixa de concentrações de 0,39 – 6,8mM para F-127 e 0,86 – 13,2 mM para P-123) estudando-se os perfis espectrais da AIPcCl encapsulada nestes sistemas.

Destes formulados, tentou-se determinar a capacidade de solubilização máxima da AIPcCl monomerizada nos copolímeros, com base na equação geral de solubilização micelar (equação 8 - Rangel e Yagui, 2007; Aparício, 2011).

$$S_{total} = S_w + \chi C_{s,mic} \quad (\text{equação 8})$$

onde: S_{total} é a solubilidade total da AIPcCl no copolímero

S_w a solubilidade da AIPcCl em água (praticamente zero nestas condições)

$C_{s,mic}$ é a concentração molar do copolímero na forma micelar, dada pela equação C_s -CMC, onde a CMC para os poloxâmeros é extremamente pequena (Wanka et al, 1994), sendo então $C_{s,mic} = C_s$.

χ corresponde à razão entre a concentração de AIPcCl encapsulada nos copolímeros e a concentração dos mesmos.

Adicionalmente, os processos envolvendo a auto-agregação e/ou liberação do fotossensibilizador nas micelas poliméricas com o passar o tempo, por sua vez, foi monitorado espectroscopicamente retirando-se, diariamente, uma alíquota de 2 mL de cada formulado na região central do tudo (Figura 8, região 2), tomando-se cuidado para que ocorresse uma perturbação mínima do sistema e, posteriormente, os espectros de absorção dessas alíquotas foram obtidos. Logo após, as referidas alíquotas retiradas eram cuidadosamente recolocadas nos tubos de origem. Desta forma, uma possível auto-agregação da AIPcCl nas micelas com o passar do tempo pode ser determinada através de mudanças no espectro de absorção da mesma (mudanças nos comprimentos de onda de máxima absorção, aparecimento e/ou surgimento de novas bandas e etc) (West e Pearce, 1965).

Adicionalmente, a liberação da AlPcCl das micelas foi monitorada verificando-se possíveis mudanças na absorvância da AlPcCl com o decorrer do tempo. Deste modo, a absorvância foi monitorada nos comprimentos de onda específicos relativos à principal banda de absorção da AlPcCl nestes formulados (646nm em F-127 e 677 nm em P-123) pelo período entre 20 e 30 dias.

3.2.5.4. Influência da temperatura na auto-agregação da AlPcCl incorporada em P-123 e F-127

Para este estudo foram utilizadas formulações de AlPcCl incorporadas em P-123 e F-127 a 4% e a 8% (3,2, 6,3 mM para F-127 e 6,9, 13mM em P-123, respectivamente). Em F-127 foram realizados experimentos com os seguintes formulados: AlPcCl $7,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em F-127 4% (m/V) ($[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]: 1,5$) e AlPcCl $3,5 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ($[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]: 0,4$) em F-127 8%. Em P-123: AlPcCl $3,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ em P-123 4% e $7,1 \times 10^{-6}$ em P-123 8%. Ambos formulados em P-123 possuem a mesma $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ a 25°C (0,1).

As variações no espectro UV-Vis da AlPcCl em função do tempo e em diferentes temperaturas, acima e abaixo da TMC dos poloxâmeros (30, 25, 20 e 13°C) foram registrados no espectrofotômetro DU 800. As medidas dos espectros de absorção eletrônica para os formulados citados foram obtidas em intervalos de tempos (levando-se aproximadamente 30 minutos entre cada medida) até que o equilíbrio fosse atingido.

3.2.5.5. Estudo da estabilidade da AlPcCl encapsulada em P-123 frente à liofilização/reidratação

Processos de liofilização/reidratação foram realizados em formulados para o monitoramento da estabilidade da AlPcCl encapsulada. Inicialmente um volume de 10 mL dos formulados contendo AlPcCl ($7,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$; razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]=0,1$) e AlPcCl ($8,3 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$; razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]=1,3$) encapsulada em P-123 8% ($1,3 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$), foram transferidos para balões de 25 mL, e em seguida, o material foi congelado em nitrogênio líquido durante 5 min e posteriormente liofilizado durante 48h. O sólido obtido foi então reidratado com água a 60°C , sendo o volume novamente completado para 10 mL em balão volumétrico. Os espectros UV-Vis das soluções foram registrados antes do processo de liofilização e imediatamente após os procedimentos

3.2.6. Estudos de inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) utilizando os formulados AlPcCl/poloxâmeros

Experimentos biológicos foram realizados conforme metodologia descrita por Peli e colaboradores (Peli et al, 2008) utilizando-se culturas de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 26963), *Escherichia coli* (ATCC 26962) e do fungo *Cândida Albicans* (ATCC 90028) em caldo Mullen Hinton (MHB).

A partir de um inóculo, suspensão de microorganismos de concentração conhecida, calibrado em 108 UFC mL⁻¹ para bactérias e 10⁷ para levedura, um volume de 50 uL foi transferido para um eppendorf contendo formulados AlPcCl/P-123 e AlPcCl/F-127 a 4% (m/V) dos poloxâmeros, em diferentes concentrações de AlPcCl 0,14, 0,36, 0,64 e 3,12 µmol L⁻¹ em P-123 4% (6,9 mM) ([AlPcCl]/[P-123_{mic}] 0,005, 0,01, 0,02 e 0,10 respectivamente, a 30°C; Wanka et al, 1994). Em F-127, as concentrações de AlPcCl utilizada foram 0,12, 0,74 e 3,12 µmol L⁻¹ (razão [AlPcCl]/[F-127_{mic}] de 0,0025, 0,015 e 0,070 a 30°C, respectivamente; Wanka et al, 1994).

Alíquotas de 50 uL de cada suspensão foram transferidas para poços (de 15 mm de diâmetro) de uma placa que contém quatro poços para a exposição da luz LASER e os 500 uL restantes foram utilizados como amostras não iluminadas. O LASER foi colocado verticalmente bem acima de cada poço que contém a amostra a ser iluminada.

Em um dos experimentos as amostras foram iluminadas pelo tempo de 10 minutos (área de 1,5 cm² e potência de 6 Jcm⁻²) a 30°C e com agitação. O mesmo experimento foi realizado com grupos de controle utilizando-se a mesma quantidade de inóculo e 4,0% de solução P-123 e F-127 aquosa sem AlPcCl. A concentração de AlPcCl necessária para a inibição de 90% (Z₉₀) dos microorganismos foi calculada para a exata correlação entre a concentração de AlPcCl e o número de colônias mortas.

Também calculou-se o tempo em minutos requerido para a inativação de 90% da carga inicial de microorganismos (valor D₉₀) utilizando-se da AlPcCl nas concentrações de 0,36 e 0,64 x10⁻⁶ mol L⁻¹, variando-se o tempo de exposição das placas frente a iluminação em 5, 10 a 15 min.

3.2.6.1. Quantificação dos efeitos sobre a morte dos microorganismos por análise quimiométrica

Para verificar se o efeito da concentração, tempo de iluminação bem como a interação entre ambos foi significativo para a inativação fotodinâmica de microorganismos utilizando-se da AlPcCl

encapsulada em P-123 e F-127 utilizou-se também do método quimiométrico de análise. Para isso partiu-se da matriz planejamento (Tabela 3) e utilizou-se do programa Stat-ease (Design-expert 6.0.6 Trial). O tempo de iluminação foi avaliado em dois níveis: inferior (-), sem iluminação e superior (+), com tempo de dez minutos de iluminação, respectivamente. A concentração de AlPcCl foi de 0,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no nível inferior (-) e 0,64 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no nível superior (+). Estas concentrações foram escolhidas para uma melhor quantificação dos efeitos trabalhados. A resposta analisada foi o número de unidades formadoras de colônias viáveis após os experimentos de microorganismos.

Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial 2^2 .

Fatores	-	+
A: Tempo de iluminação (min)	0	10
B: Concentração de AlPcCl ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,14	0,64
Ensaio	A	B
1	-	-
2	-	+
3	+	-
4	+	+

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Propriedades espectroscópicas e de solubilidade da AlPcCl em meio homogêneo: Estudos de absorção eletrônica e fluorescência

Nos estudos iniciais em meio homogêneo observou-se que a AlPcCl é praticamente insolúvel em solução aquosa, apresentando-se com precipitados nesse meio. Em etanol notou-se que a AlPcCl apresentou significativo aumento de solubilidade, sendo solúvel até concentrações ao redor de $8,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. Na Figura 10 são apresentados os espectros da AlPcCl em etanol ($4,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) e em solução aquosa ($7,6 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$).

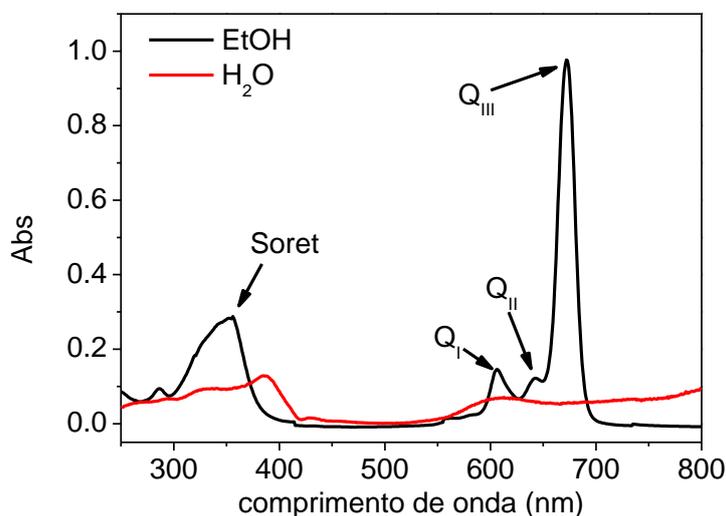


Figura 10. Espectros UV-Vis da AlPcCl em etanol ($4,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) e em meio aquoso ($7,6 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$; pH 7,0) a 30 °C.

Na Figura 10 é possível verificar que o espectro de absorção da AlPcCl ($4,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) solubilizada em etanol é característico de ftalocianinas no estado monomérico (Ough et al, 1991; Pereira, 2004; Sehlotho, 2007). O espectro mostra uma banda Soret (ou B) em $\lambda_{\text{máx}} = 353 \text{ nm}$ referente à transição $S_0 \rightarrow S_2$ isto é $a_{2u}/b_{2u} \rightarrow e_g$, LUMO (Figura 10). A banda B se deve à sobreposição das bandas relativas às transições B_1 ($a_{2u}\pi \rightarrow e_g\pi^*$) e B_2 ($b_{1u} \rightarrow e_g\pi^*$), respectivamente (Figura 10; Sehlotho, 2007). No entanto, apesar de ser relatado que as transições B_1 e B_2 são de caráter $\pi \rightarrow \pi^*$, alguns autores ainda consideram a existência de uma transição adicional de caráter $n-\pi^*$, nomeada nestes trabalhos como B_3 (Simon, 2002). Desta forma, como comprovado por Rosa

e Baerends através de estudos envolvendo cálculos de densidade funcional a banda Soret seria uma mistura de transições de caráter $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ (Rosa e Baerends, 1994).

A AlPcCl possui mais três bandas nos comprimentos de onda máximos de 606, 640 e 672 nm, denominadas Q_I, Q_{II} e Q_{III}, respectivamente. Destas, a de maior absorção ocorre em $\lambda_{\text{máx}} = 672$ nm (Q_{III}) e é atribuída a transições permitidas $S_0 \rightarrow S_1$ ($\pi \rightarrow \pi^*$, $a_{1u} \rightarrow e_g$, ou seja do HOMO para o LUMO, Figura 11), e as bandas de 606 e 640 são relacionadas às transições vibracionais Q(1,0) e Q(2,0), respectivamente (Ough et al, 1991; Chidawanyika, 2010).

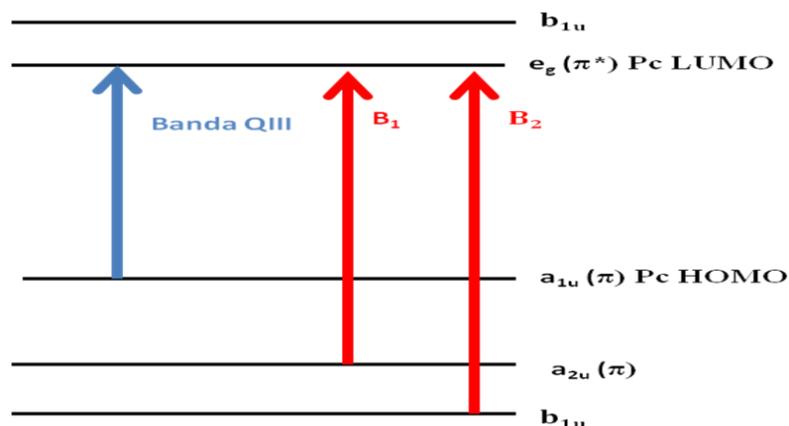


Figura 11. Orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas da AlPcCl (Figura obtida levando-se em consideração o Modelo dos quatro orbitais, desenvolvido por Gouterman).

Ftalocianinas metaladas, como a AlPcCl, possuem a banda de absorção Q_{III} centralizada por volta de 672 nm, enquanto que em ftalocianinas sem o metal no centro do macrociclo, esta banda é duplamente dividida (Sehlotho, 2007). Isto ocorre porque há um decréscimo de simetria quando se compara as ftalocianinas metaladas, cuja simetria é D_{2h} para as não metaladas, D_{4h} . Essa alteração de simetria ocorre devido à diferença existente entre o LUMO das ftalocianinas metaladas em comparação às não-metaladas. O orbital e_g das ftalocianinas não-metaladas é não degenerado, permitindo duas transições eletrônicas a partir do nível a_{1u} e a metalação leva a uma degeneração destes orbitais; assim apenas uma transição eletrônica do nível a_{1u} passa a ocorrer (Sehlotho, 2007). Adicionalmente, o alumínio presente no macrociclo desta molécula faz com que haja mudança na intensidade e na posição das bandas de absorção em comparação às ftalocianinas não metaladas, também devido às mudanças na simetria com a introdução do metal no centro do macrociclo (Sehlotho, 2007; Neto, 2010).

Entretanto, observa-se que o espectro da AlPcCl em meio aquoso (Figura 10) apresentou um completo alargamento com mínima resolução espectral, fato atribuído à total formação de auto-

agregados (Sessler et al 2006). Este efeito também foi observado para outros solventes com diferentes polaridades na seguinte ordem de alteração espectral $\text{CHCl}_3 > \text{acetona} > \text{DMSO} > \text{ETOH}$. Por esse motivo, as soluções de AlPcCl ($1,1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) preparadas nos demais solventes (com exceção da água) foram obtidas a partir da solução da AlPcCl previamente preparada em etanol.

Desta forma, após a preparação das soluções de AlPcCl em diferentes solventes obteve-se os espectros de absorção eletrônica UV-Vis de amostras preparadas por diluições dos estoques. A partir destes foram estimados os valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para as principais bandas através do gráfico de absorvância *versus* [AlPcCl], ajustando-se através da Lei de Lambert-Beer (equação 2; Ruifrok e Johnston, 2001).

Na Figura 12 são apresentados os espectros UV-Vis da AlPcCl em etanol em diferentes concentrações, preparadas através da diluição de uma solução inicial contendo AlPcCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$.

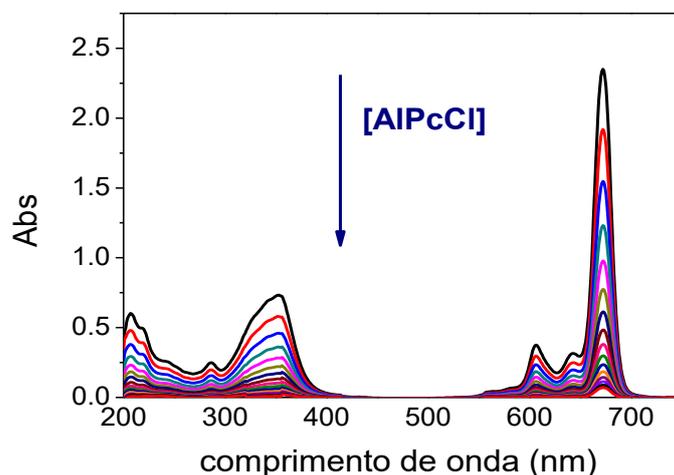


Figura 12. Espectros UV-Vis da AlPcCl em etanol em diferentes concentrações obtidas por diluições ($1,0 \times 10^{-5}$ a $4,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) a 30°C , $\text{pH}=7,0$.

Na Figura 13 são apresentados os gráficos de absorvância *versus* [AlPcCl] em cada um dos comprimentos de onda mencionados (Soret e Q_{III} a Q_I) da AlPcCl em etanol.

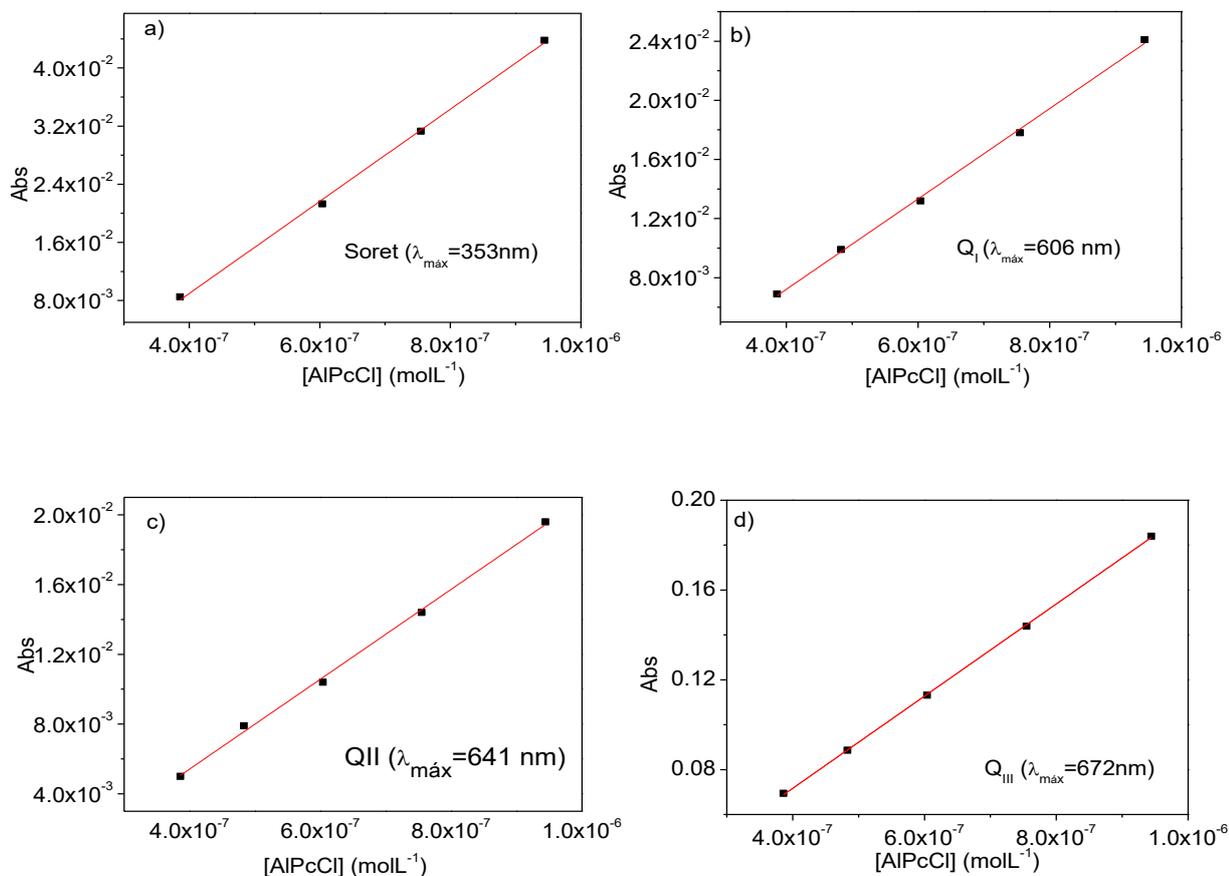


Figura 13. Gráficos de Abs *versus* [AlPcCl] para a banda Soret e bandas Q da AlPcCl em etanol a 30 °C.

Apesar das linearidades observadas na Figura 13, antes de calcular o ϵ deve-se identificar a faixa de concentrações na qual a AlPcCl estaria realmente monomerizada, pois a simples obediência da Lei de Beer não implica necessariamente na ausência de espécies FS auto-agregadas. Essa faixa de concentração foi proposta pelos dados de fluorescência da AlPcCl nas mesmas amostras usadas na determinação do ϵ por absorvância (Figura 12), estando a intensidade de absorvância menor que 0,1 no comprimento de onda de excitação, de modo a se contornar o efeito de filtro interno (Dhami et al, 1995; Lakowicz, 2006).

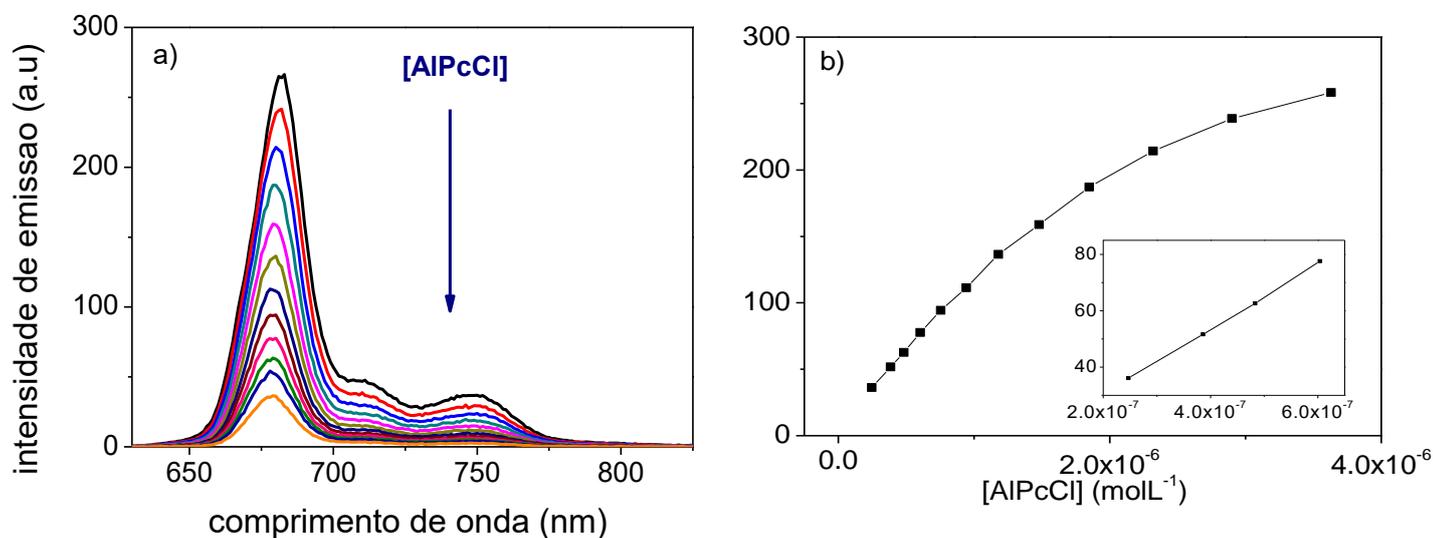


Figura 14. a) Espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl em etanol em diferentes concentrações ($4,0 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-7}$ molL⁻¹), $\lambda_{exc} = 604$ nm; $\lambda_{emis} = 620-850$ nm a 25°C, pH=7,0; b) Gráfico da intensidade de emissão em 680 nm *versus* [AlPcCl]. No inserto ilustra-se a região linear entre a intensidade de emissão e a [AlPcCl].

Nota-se através da Figura 14-a que o espectro de emissão da AlPcCl em etanol mostra um máximo de emissão no comprimento de onda de 680 nm, referente à transição $S_1 \rightarrow S_0$ e duas outras bandas adicionais de menor intensidade nos comprimentos de onda de 713 e 748 nm, referentes a transições a partir de estados vibracionais (Dolphin, 1978). O perfil do espectro de emissão de fluorescência não é dependente do comprimento de onda de excitação, uma vez que mesmo excitando-se a AlPcCl na banda Soret, transição $S_0 \rightarrow S_2$, esta molécula primeiramente retorna ao primeiro estado excitado (S_1) por conversão interna, emitindo somente a partir deste fenômeno. Adicionalmente sabe-se que a energia relativa à emissão de fluorescência é relativamente menor que a energia de absorção, o que resulta no deslocamento espectral batocrômico do espectro de emissão em relação ao espectro de absorção, denominado deslocamento de Stokes, resultante da relaxação vibracional do nível S_1 na transição $S_1 \rightarrow S_0$ (Lakowics, 2006).

Pelo gráfico de intensidade de emissão *versus* [AlPcCl] em etanol monitorado no comprimento de onda de máxima emissão em 680 nm e apresentado na Figura 14-b, verifica-se uma relação linear até a concentração de aproximadamente $0,6 \times 10^{-6}$ molL⁻¹ (ver inserto na Figura 14-b).

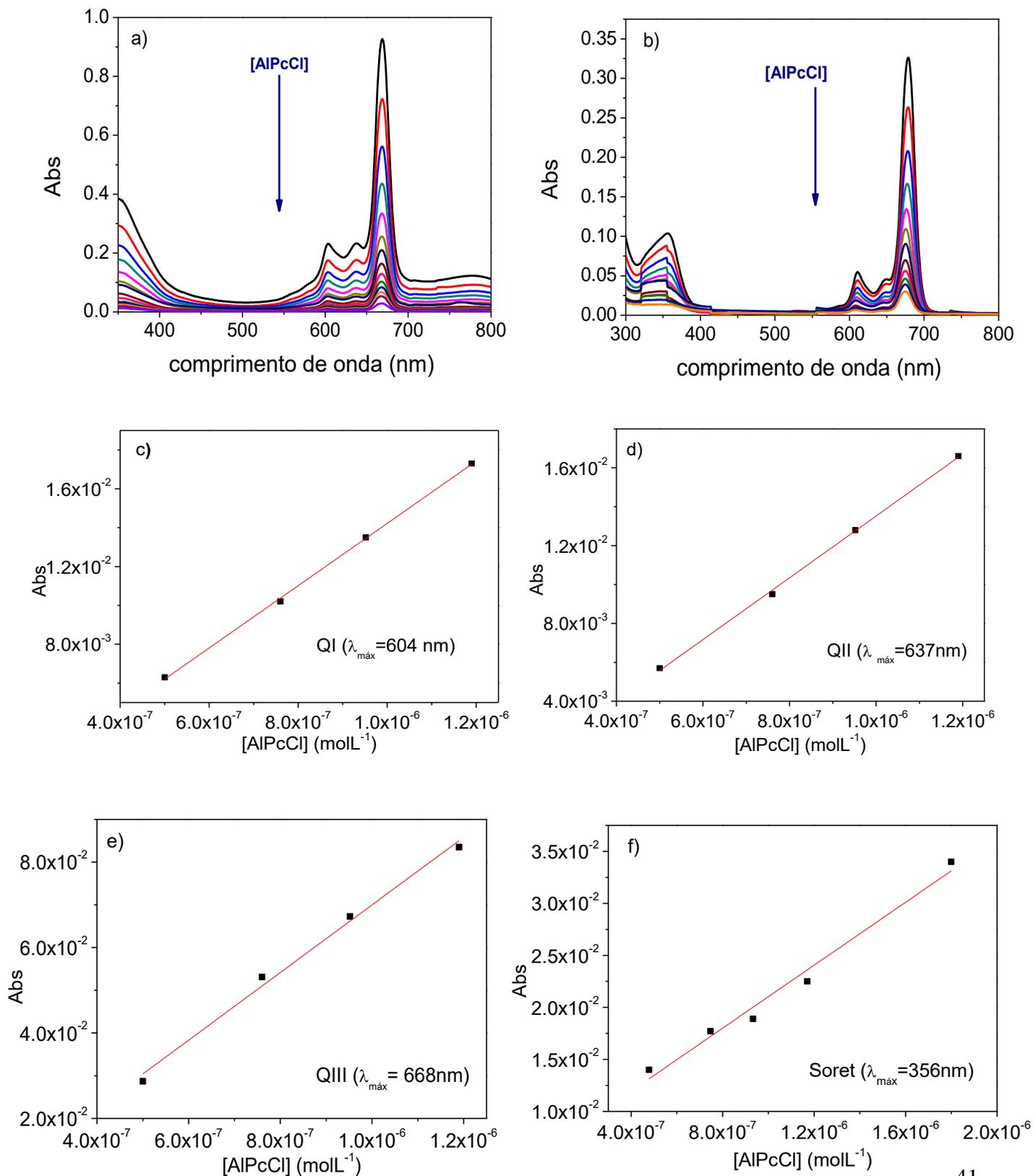
A partir dessa concentração observa-se um desvio negativo da linearidade, ou seja, o aumento relativo da intensidade de fluorescência é menor com o aumento da concentração de AlPcCl no meio etanólico, o que sugere a formação de auto-agregados moleculares de AlPcCl, uma vez que é conhecido que usualmente espécies auto-agregadas de ftalocianinas normalmente não emitem por fluorescência devido ao efeito de auto-supressão de energia do estado excitado causado principalmente uma eficiente conversão interna (Rabinowitch e Epstein, 1941; Kessel e Rossi, 1982; Khairutdinov e Sherpone, 1999; Li e Ng, 2001; Gracetto et al, 2011).

Tais auto-agregados podem ser formados pelas interações de van der Waals entre duas ou mais moléculas de AlPcCl, formando-se dímeros ou agregados maiores (multímeros) (Dhami et al, 1995). É conhecido que a interação entre dímeros, por exemplo, ocorre essencialmente pela nuvem de elétrons π que se deslocalizam ao longo do anel central da AlPcCl resultando em interações do tipo de van der Waals, de energia mais baixa quando comparada à energia das ligações químicas covalentes ou iônicas (Atkins, 2006) ou até mesmo através de acoplamentos entre elétrons π - π , denominados complexos de transferência de carga (Bertoncello e Peruffo, 2008; Chidawanyika, 2010). Tais acoplamentos resultam em mudanças significativas nos espectros de absorção (Bertoncello e Peruffo, 2008; Chidawanyika, 2010). Na emissão, juntamente com o acoplamento, as moléculas podem sofrer supressão de energia dos seus estados excitados por colisões desativantes das próprias unidades monoméricas que compõem o agregado (auto-supressão; Eaton, 1988; Bertoncello e Peruffo, 2008; Gracetto, 2010). Por sua vez, os resultados mostraram que devido à auto-supressão de energia verificada nestes auto-agregados, não se verifica uma relação linear entre a intensidade de emissão pela [AlPcCl] em concentrações acima de $0,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. Porém, mesmo utilizando-se de amostras com concentração de AlPcCl dentro da faixa linear nos dados de intensidade de fluorescência, não pode ser descartado totalmente a existência de auto-agregados.

Para definição da faixa a ser trabalhada na determinação do ϵ foi analisado o conjunto dos dados. Assim considerou-se que abaixo de $0,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ não há a formação de auto-agregados e os coeficientes de absorvidade molar da AlPcCl em suas principais bandas em etanol foram estimados. Os valores de ϵ para a AlPcCl em etanol foram: Soret ($63,4 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - $\lambda_{\text{máx}}=353\text{nm}$), Q_I ($30,5 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - $\lambda_{\text{máx}}=606\text{nm}$), Q_{II} ($25,7 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - $\lambda_{\text{máx}}=641\text{nm}$) e Q_{III} ($205 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ - $\lambda_{\text{máx}}=672\text{nm}$). Os valores de ϵ obtidos para a AlPcCl em etanol foram semelhantes aos que são comumente encontrados para as ftalocianinas na literatura (Mørkved et al, 2009; Farag et al, 2012).

Experimentos similares foram realizados com acetona e DMSO, onde se partiu inicialmente de uma solução estoque de AlPcCl em etanol na concentração de $1,1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ (o etanol foi

previamente retirado através do uso de um fluxo de $N_{2(g)}$). Os espectros de absorção UV-Vis e os gráficos de absorvância *versus* concentração de AlPcCl nestes dois sistemas são mostrados na Figura 15.



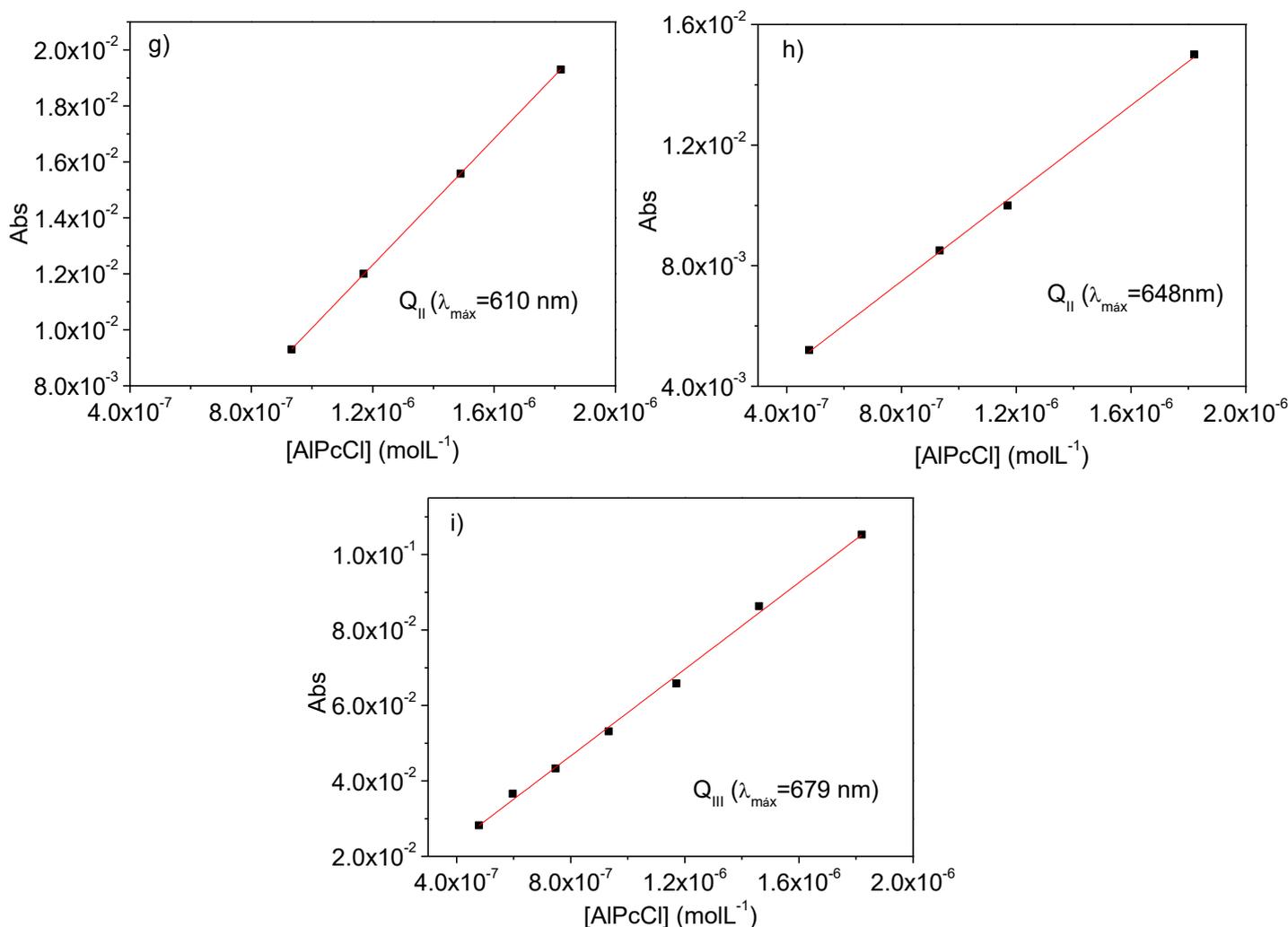
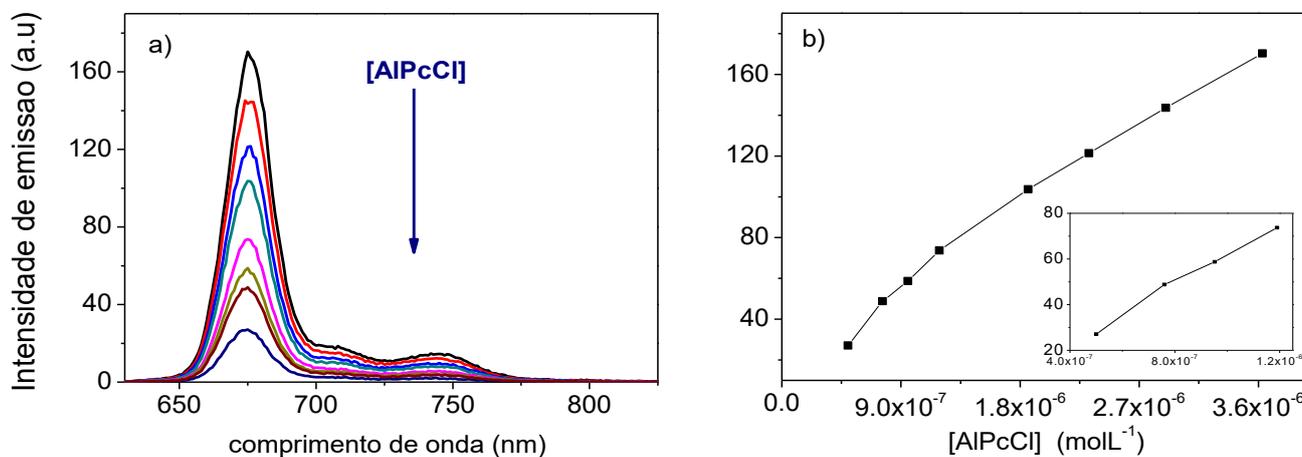


Figura 15. Espectros de absorção eletrônica da AlPcCl em **a)** acetona e **b)** DMSO em diferentes concentrações (diluições) a partir de uma solução estoque de AlPcCl $1,1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Gráficos de Abs vs. [AlPcCl] para bandas Q em acetona (**c-e**) e em DMSO (**f-i**) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH=7,0.

O valor de ϵ da AlPcCl na região da banda Soret em acetona não foi determinado pelo fato deste solvente absorver na região de 280 nm. Observando-se espectro de absorção da AlPcCl em acetona (Figura 15-a) pode ser verificada pequenas mudanças da forma espectral na região das bandas Q (Q_I, Q_{II} e Q_{III}), além do deslocamento no comprimento de onda de máxima absorção das bandas relativas à forma monomérica da AlPcCl, um aumento da linha base; fatores estes que são indicativos da auto-agregação da AlPcCl neste sistema (Pasternack et al, 1993). Em DMSO (Figura 15-b) também são verificadas mudanças similares, apesar de serem em menor escala.

A literatura descreve que a formação de auto-agregados pode se manifestar através da diminuição do pico relativo a monômeros, alargamento de bandas e surgimento de picos adicionais nos espectros de absorção eletrônica UV-Vis (Karns et al, 1979; Potma e Wiersma, 1998; Song et al, 2000 e Gracetto, 2010). Como já citado, na fluorescência a agregação de fluoróforos provoca a diminuição da intensidade de emissão (Rabinowitch e Epstein, 1941; Khairutdinov e Serpone, 1999; Valeur, 2002; Simplício, 2004). Por exemplo, pode ser verificado diferenças razoáveis nos espectros de absorção eletrônica da AlPcCl em acetona e DMSO (Figuras 15-a e 15-b) em comparação ao etanol (Figura 12). Dentre estas pode ser observado o menor valor de absorvância para as principais bandas da AlPcCl quando comparados aos valores obtidos para o etanol e deslocamento dos máximos de absorção, sugerindo a presença de auto-agregados da mesma nestes sistemas.

Aliado aos desvios espectrais citados acima, em DMSO não houve um bom ajuste linear dos dados experimentais da absorção em função da concentração de AlPcCl (Figura 15-f a 15-i), mesmo para regiões de baixa concentração deste fotossensibilizador, indicando significativa formação de auto-agregados nesse solvente. Igualmente à estratégia utilizada em etanol, estudou-se a emissão da AlPcCl em acetona e DMSO a diferentes concentrações (Figura 16).



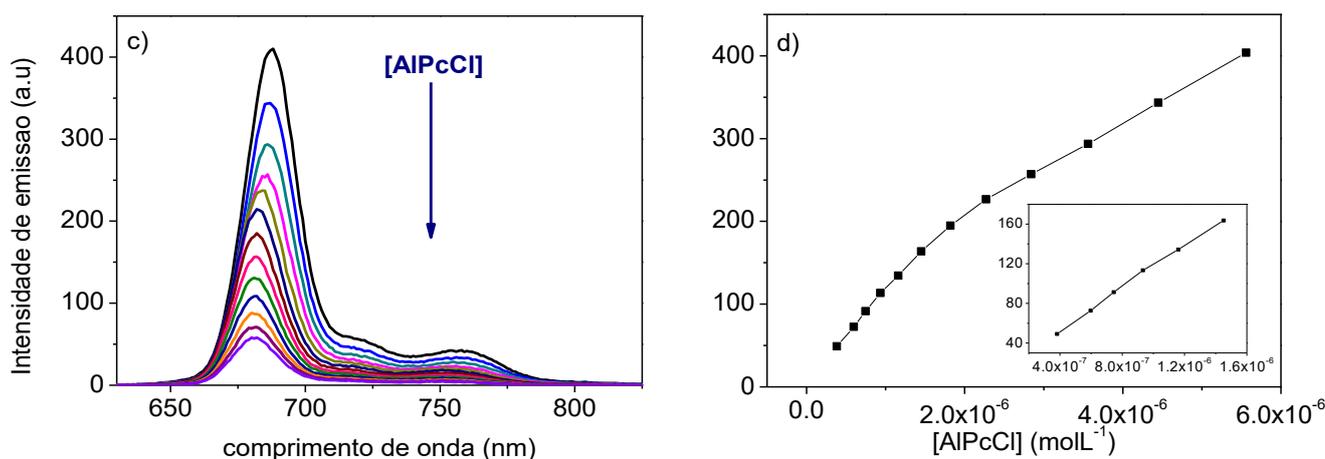


Figura 16. Espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl em diferentes concentrações em **a)** acetona e **c)** DMSO. $\lambda_{exc} = 604$ nm e $\lambda_{emis} = 620-850$ nm a 30°C , $\text{pH}=7,0$. Intensidade de emissão *versus* [AlPcCl] em **b)** acetona **d)** DMSO a 30°C .

Para a acetona (Figura 16-b) é possível observar certa linearidade na sua emissão até aproximadamente $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e em DMSO até $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 16-d), limites maiores do que o observado para etanol ($0,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, Figura 12). Interessantemente a fenda utilizada para a obtenção dos espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl em acetona e DMSO foram maiores (5-5) em comparação à obtida em etanol (2,5-2,5), uma vez que a emissão de fluorescência da AlPcCl em acetona (Figura 16-a) e em DMSO (Figura 16-c) foi significativamente menor nestes solventes. Este resultado pode indicar que parte das moléculas do FS se encontram auto-agregadas em uma associação que não impede total emissão fluorescente ou que o equilíbrio monômero - agregado, mantém uma relação estritamente linear de aumento de monômeros à medida que se aumenta a [FS]. De qualquer forma a linearidade está presente em uma faixa de concentração relativamente pequena. É importante ressaltar que os auto-agregados formados podem não ser de uma única espécie, podendo envolver dímeros, trímeros e outros, além do que, mesmo possuindo idêntico número de agregação, podem ter diferentes estruturas geométricas.

Outro fator que confirma uma auto-agregação da AlPcCl em DMSO e em acetona foi a considerável diferença nos valores de ϵ do FS nestes solventes em comparação aos obtidos em etanol, com destaque a banda Soret (valores não mostrados). Em acetona e em DMSO os valores de ϵ para as principais bandas foram cerca de 60% do que a AlPcCl em etanol, confirmando a hipótese de que a AlPcCl se encontra parcialmente agregada nesses solventes.

A fim de comprovar a existência de formas auto-agregadas da AIPcCl nas concentrações em estudo monitorou-se as amostras por RLS. A técnica postula que o espalhamento ressonante é proporcional ao quadrado do volume do auto-agregado, isto é, o sinal aumenta com o aumento do tamanho do agregado (Pasternack e Colings, 1993; Gracetto, 2011). Na Figura 17 são apresentados os espectros de RLS para os sistemas AIPcCl/etanol, AIPcCl/acetona e AIPcCl/DMSO.

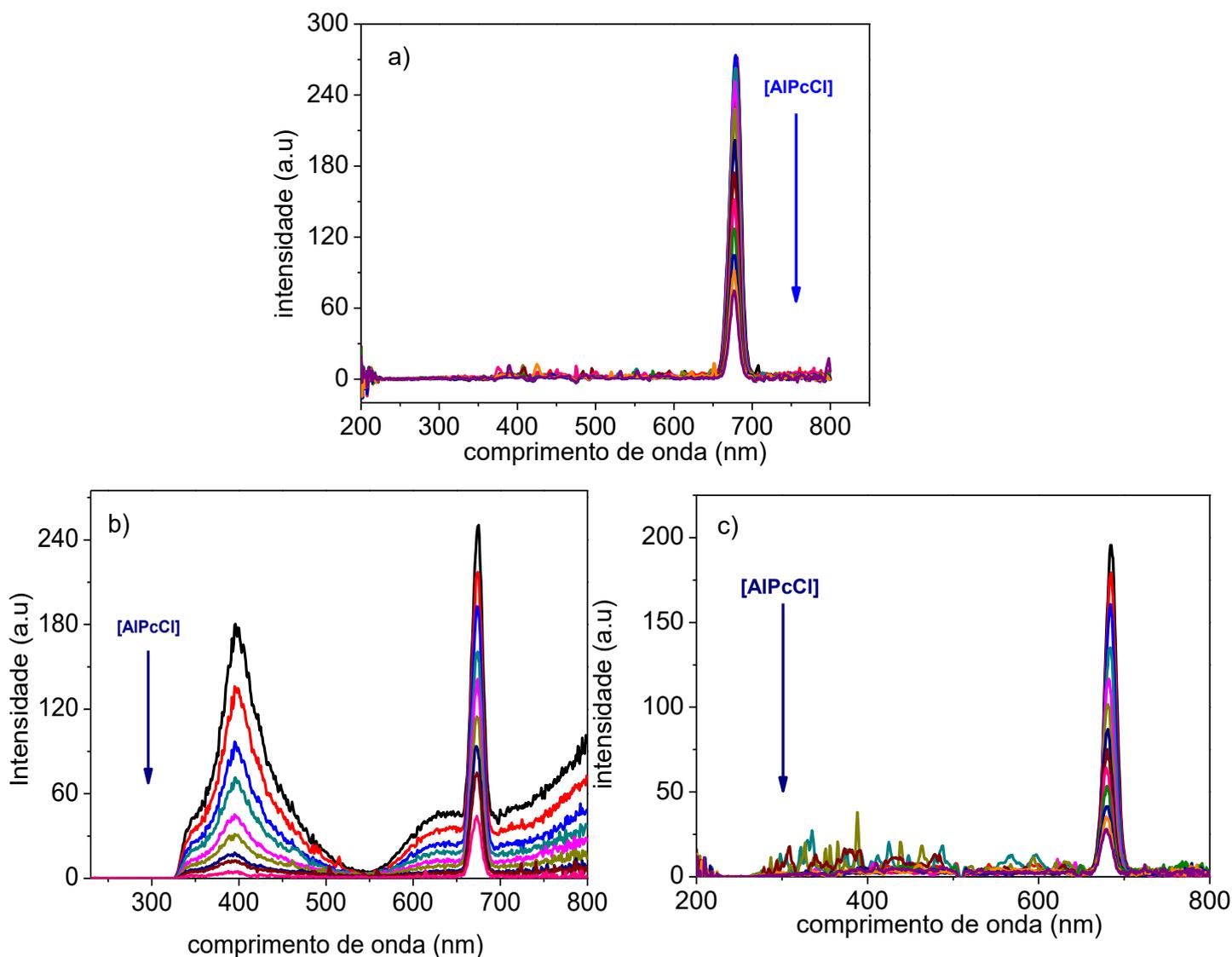


Figura 17. Espectros de RLS da AIPcCl em diferentes concentrações obtidas por diluições ($3,6 \times 10^{-6}$ a $4,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em **a)** etanol, **b)** acetona e **c)** DMSO a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (obtidos com $\Delta\lambda=0$), $\text{pH}=7,0$. A seta indica a diminuição do sinal à medida que se diminui a $[\text{AIPcCl}]$.

Observa-se nos espectros obtidos para a AlPcCl nos três solventes a presença de um sinal intenso na região de comprimento de onda entre 670-685 nm. Entretanto, acredita-se que este sinal não corresponda a sinal de espalhamento, o que denotaria a formação de auto-agregados. Por sua vez, este sinal é proveniente da própria emissão de fluorescência da AlPcCl, emissão residual, ocasionada pela excitação sincrônica de sua banda Q (Pasternack et al., 1995).

Na região de comprimento de onda compreendida entre 300 e 500 nm, no entanto, não deve haver sinais referentes à emissão de fluorescência para as ftalocianinas. Isso porque após a excitação eletrônica dessas moléculas nesta região de comprimento de onda ($S_0 \rightarrow S_2$), a desexcitação da molécula por efeitos de conversão interna (IC) ocorre imediatamente até o primeiro estado singlete excitado ($S_2 \rightarrow S_1$). Desta forma apenas a transição $S_1 \rightarrow S_0$ é responsável pelo fenômeno de fluorescência (Pasternack et al, 1995; Chang et al, 2012). Portanto, ao se analisar o espectro de RLS na Figura 17-a, verifica-se que não há sinal aparente de espalhamento resultante da formação de agregados no sistema AlPcCl em etanol. Isto pode ocorrer devido a duas possibilidades distintas: a primeira é a inexistência de auto-agregação da AlPcCl na região de concentração utilizada; a segunda, os agregados formados neste solvente seriam relativamente pequenos e, portanto, não detectados pela técnica de RLS. Inclusive considera-se que auto-agregados diméricos, por exemplo, não são suficientemente volumosos a produzirem sinais (Pasternack et al, 1993). Inclusive os dados mostraram ausência de sinal de RLS em amostras de AlPcCl/etanol mesmo em concentrações superiores a $0,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. Provavelmente este fato seja devido à presença de auto-agregados moleculares muito pequenos.

No entanto, para a acetona (Figura 17-b), foi observado no espectro de RLS um intenso espalhamento da AlPcCl em toda faixa espectral, principalmente na região entre 350 a 500 nm. O sinal obtido pelo modo sincrônico nesta região evidencia a presença de auto-agregados com tamanhos relativamente grandes (Pasternack et al 1995; Colings et al, 1999).

Nos estudos das soluções de AlPcCl em DMSO por RLS (Figura 17-c) não foi observado sinal de espalhamento, apesar do comportamento não linear apresentado pelos espectros de emissão de fluorescência com a concentração (Figura 16-c). Neste resultado, semelhante ao observado em etanol a altas concentrações, não se descarta a presença de auto-agregados de tamanhos relativamente pequenos.

Assim, em virtude de algumas propriedades físico-químicas mais favoráveis aos estudos em etanol, tais como: a solubilidade da AlPcCl (e com pouca alteração do seu perfil espectral, sugerindo a formação mínima de auto-agregados); valores de ϵ condizente para as ftalocianinas de maneira geral (Ribeiro, 2003; Sehlotho, 2007); razoável solubilidade dos poloxâmeros; relativo

baixo ponto de ebulição do etanol para sua remoção do sistema necessário nos processos de encapsulamento (Zhang et al, 1996), tornam este solvente, a princípio, o mais apropriado a ser utilizado nos procedimentos de formulação do composto fotoativo nos copolímeros micelares. Por essa razão os estudos em meio homogêneo serão complementados, primariamente em sistemas envolvendo a AlPcCl solubilizada em etanol.

4.1.1. Estudo dos processos de auto-agregação da AlPcCl utilizando-se de espectroscopia de absorção eletrônica e de fluorescência em meio homogêneo de misturas monofásicas água/etanol

Este estudo foi realizado com o objetivo de se obter informações mais detalhadas acerca das características espectroscópicas das possíveis formas auto-agregadas da AlPcCl em meio homogêneo e para que haja uma posterior comparação com os fenômenos de auto-agregação que ocorrem em meio micro-heterogêneo (estudos com micelas poliméricas de P-123 e F-127, apresentados adiante). Nos experimentos envolvendo estudos de absorção eletrônica e de fluorescência, a AlPcCl foi mantida em uma concentração constante ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ na absorção eletrônica e $3,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ na fluorescência). O perfil espectral foi analisado com base no aumento da concentração de água (% V/V) em uma solução inicialmente etanólica pura.

Na Figura 18 são apresentados os espectros de absorção eletrônica da AlPcCl à temperatura de 30°C em diferentes proporções água/etanol (V/V). A Figura 18-b apresenta em detalhes a variação do espectro de absorção na região entre 650 e 700 nm e a Figura 18-c mostra em detalhes o espectro normalizado da AlPcCl em etanol e em 90% de água. A Figura 18-d, por sua vez, mostra a variação na absorvância em três comprimentos de onda (672, 352 e 384) conforme a adição de água.

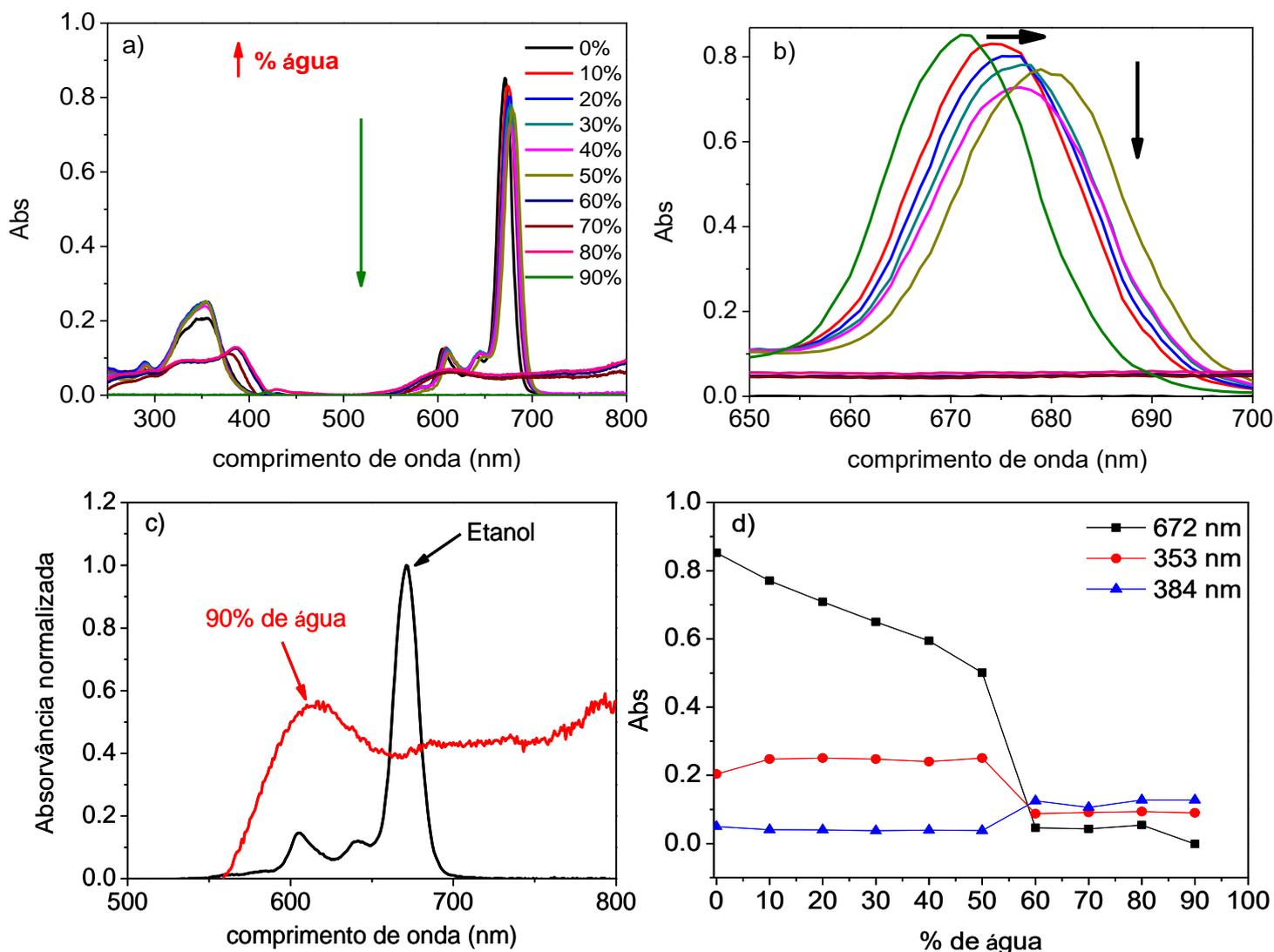


Figura 18. a) Espectros de absorção eletrônica da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em diferentes porcentagens de água/etanol (V/V), pH=7,0. b) variação do espectro na região referente à banda Q_{III} (650-700 nm). c) Absorvância normalizada da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em etanol e em 90% de água (V/V). d) Variação da absorvância em 672, 353 e 384 nm com o aumento do teor de água. As setas em a e b mostram a variação da absorvância com o aumento do teor de água. T= 30°C.

Como pode ser visto na Figura 18-a, conforme se adiciona água, é verificada uma diminuição da banda referente a monômero (três bandas Q e Soret) da AlPcCl com deslocamento batocrômico, efeitos que podem ser atribuídos ao processo de auto-agregação da ftalocianina (Martin et al, 1991; Reichardt, 1988; Ribeiro, 2003; Bertoncello e Peruffo, 2008). Em quantidades maiores de água (>50% V/V), por sua vez, verifica-se mudanças drásticas no espectro de absorção

da AlPcCl, caracterizadas pelo desaparecimento das três bandas Q (672, 641 e 606nm), como melhor visualizado pela variação da banda Q_{III} na Figura 18-b e também mostrado por um deslocamento do comprimento de onda de absorção da banda Soret da AlPcCl de 353 para 384 nm. Adicionalmente pode ser verificado o surgimento de uma banda em 610 nm, referente a formas auto-agregadas da AlPcCl (Sakakibara et al, 2001), como mostrado pela Figura 18-c. A Figura 18-d complementa os dados mostrando a variação da absorvância com o aumento do teor de água, onde revelantes mudanças são observadas na região da banda Q_{III} (672nm) e Soret (353nm).

De fato, a presença ou ausência de bandas de absorção pode ser explicada pela Teoria do Éxciton. A queda intensa na banda Q e Soret pode ser atribuída à organização molecular da AlPcCl no éxciton formado (Kasha et al, 1965; Nitta et al, 2006). Esta teoria será discutida em maiores detalhes adiante.

O mesmo fenômeno foi constatado através dos espectros de emissão de fluorescência. Na Figura 19 inicialmente são apresentados os espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes teores de água.

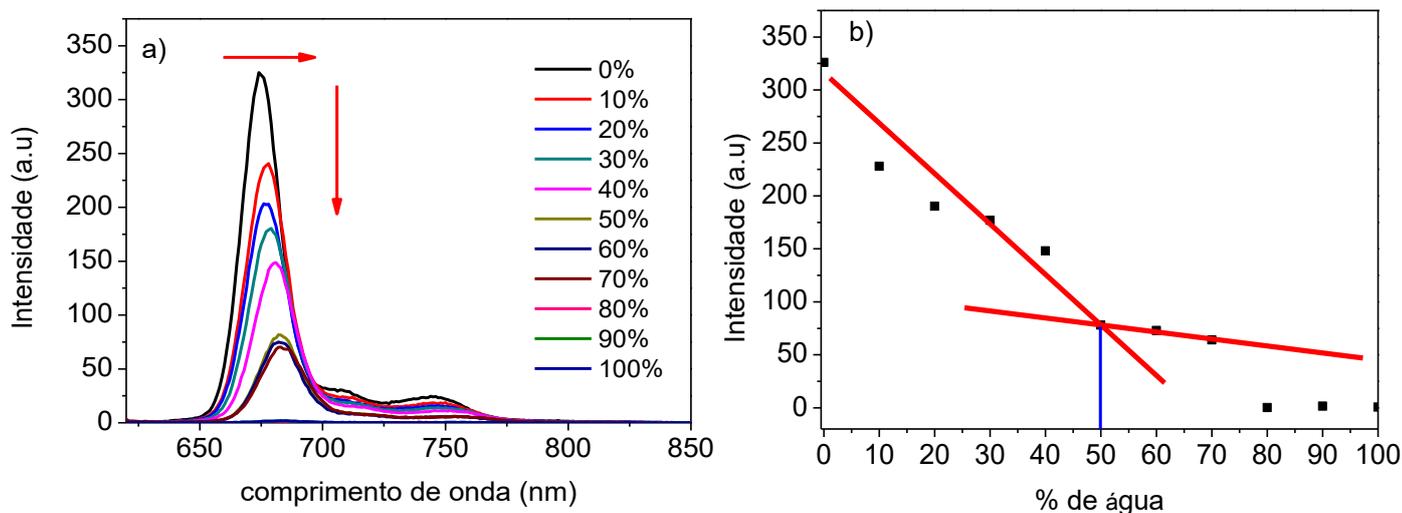


Figura 19. a) Espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes % água/etanol (V/V); $\lambda_{exc} = 604 \text{ nm}$; $\lambda_{emis} = 620\text{-}850 \text{ nm}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,0$. **b)** intensidade de emissão *versus* porcentagem de água monitoradas em 680 nm. As setas indicam as alterações com a adição de água.

A Figura 19-a mostra que em meio aquoso a AlPcCl não apresenta emissão de fluorescência. Este fato deve-se a auto agregação da ftalocianina nestas condições (como descrito no item 4.1). A Figura também mostra a alta intensidade de emissão em etanol, onde a AlPcCl se encontra em sua

forma supostamente monomérica (seção 4.1). Na medida em que se aumenta o teor de água, mesmo em baixos teores é observada uma diminuição sistemática da intensidade de emissão (Figura 19-b). Essa queda é decorrente da água atuando como supressor de fluorescência do FS (Lakowicz, 2006; Gracetto et al, 2010). Paralelamente a este processo poderia se ter a formação de agregados de AlPcCl desde as primeiras adições de água (Reichardt, 1988; Endo et al, 1999). Além disso, como observados nos espectros eletrônicos (Figura 18-a) pode-se notar um deslocamento do máximo de emissão para maiores comprimentos de onda, fenômeno este indicativo de mudança na micro-polaridade do meio com a adição de água.

Para uma melhor visualização e análise juntou-se resultados de absorção e emissão de fluorescência (Figura 20), que contém a intensidade normalizada *versus* a porcentagem de água monitorados nos comprimentos de onda de 672 e 680 nm para a absorção e emissão, respectivamente, e a variação do comprimento de onda de máxima absorção e emissão em razão da porcentagem de água.

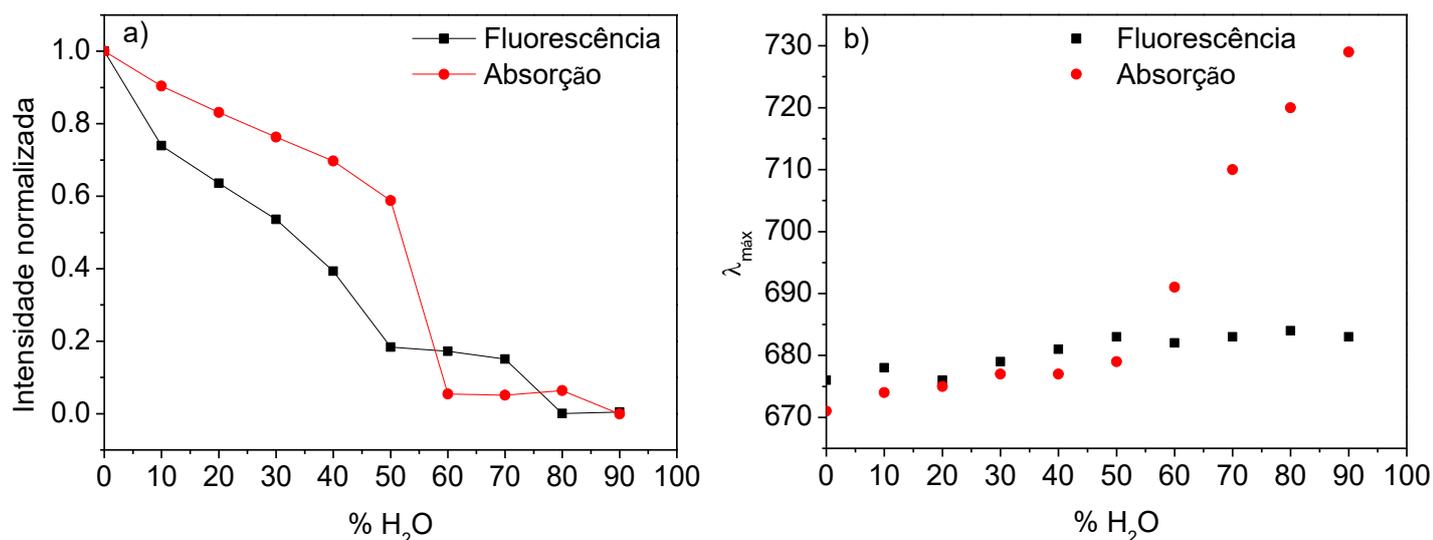


Figura 20. a) Intensidade normalizada da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em função do teor de água monitoradas para a absorção ($\lambda_{\text{máx}}=672 \text{ nm}$) e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{máx}}=680 \text{ nm}$) e b) Comprimentos de onda de máxima absorção e emissão da AlPcCl pela porcentagem de água à 30°C.

Observa-se na Figura 20-a que a absorção decresce quase que linearmente com o aumento da porcentagem de água até a região de 50% (V/V). A partir desta porcentagem a queda é mais brusca, denotando uma região chamada de Porcentagem de Água Agregacional Crítica (PAAC), região esta onde há uma evidente formação de auto-agregados da AlPcCl (Tessaro, 2010; Gracetto

et al, 2011). A intensidade normalizada de fluorescência também mostra sucessivas quedas de intensidade, que também são atribuídas à formação de agregados moleculares da AlPcCl, aliado a efeitos de supressão de energia por moléculas de água. De modo geral esses efeitos são mais intensamente observados ao redor de 50% (V/V), região da PAAC.

Na Figura 20-b é mostrado o deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção e emissão monitoradas na medida em que se aumenta a porcentagem de água. Abaixo da PAAC verifica-se um pequeno deslocamento da banda de absorção que aumenta significativamente acima deste ponto crítico. Ao mesmo tempo o deslocamento da banda de emissão é pequeno e independente da PAAC já que, a princípio, espécies agregadas não são emissoras de luz. Esta diferença nas variações entre os espectros de absorção e emissão decorre da fluorescência refletir somente alterações de micro-polaridade do meio sobre o fluoróforo no estado monomérico (Miranda, 2001; Lakowics, 2006), enquanto que o espectro de absorção eletrônica reflete adicionalmente alterações de reorganização estrutural da AlPcCl nas suas espécies auto-agregadas (acarretando em alargamento, deslocamento, surgimento de novas bandas e diminuição de intensidades (Karns e col 1979; Miranda, 2001; Takahashi et al, 2005)).

O deslocamento espectral com o surgimento de bandas relativas à auto-agregados de AlPcCl pode ser explicado pela teoria do éxciton molecular, proposta por Kasha (Kasha, 1963; Kasha, 1965; Simon, 2002; Tessaro et al, 2005), que discute a orientação relativa dos momentos dipolares de transição individual de cada monômero quando este compõe um auto-agregado molecular. Todas as unidades monoméricas possuem uma resultante vetorial no eixo de polarização decorrente de suas transições eletrônicas individuais, o chamado momento dipolar de transição (μ). Durante o processo de agregação, cada monômero pode se unir apresentando diferentes orientações do momento dipolar de transição. Os dipolos de transição podem estar alinhados em perpendicular ou em paralelo segundo a linha de referência que liga os centros das moléculas. Quando os momentos dipolares se encontram alinhados em paralelo (Figura 21, geometria A), duas configurações são possíveis: dipolos de transição alinhados em fase e em fora de fase resultando em estados excitados com maior e menor energia, respectivamente, devido à repulsão eletrostática entre eles. Porém a transição para o vetor fora de fase é considerada proibida, uma vez que estas se anulam, de modo que a absorção se dá apenas aos vetores em fase (Kasha et al, 1963; Simon, 2002). Logo, no espectro de absorção haverá um deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda de máxima absorção quando na presença destes auto-agregados que são denominados do tipo H.

Por sua vez, quando os momentos dipolares estão alinhados em série (Figura 21, geometria B) os dipolos de transição fora de fase também se anulam e a única transição que ocorre é com os

dipolos em fase. Porém, neste caso como o arranjo em fase é o de menor energia, ocorre o deslocamento para comprimentos de onda maiores (deslocamento batocrômico). Estes auto-agregados são denominados agregados do tipo J (Kasha et al, 1963; Spitz e Daehne, 1998 e Severino et al.,2003).

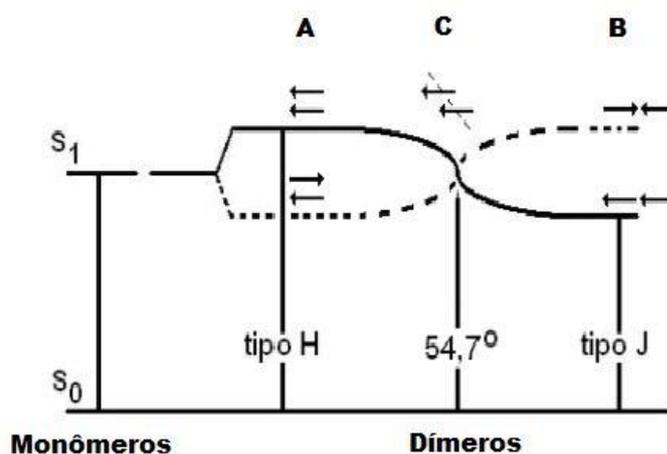


Figura 21. Energia das transições eletrônicas permitidas dos monômeros e agregados em função do ângulo formado entre dipolos de transição e a linha de referência que conecta as unidades. A exemplificação foi feita apenas para dímeros (Kasha, 1963; Severino et al.,2003).

Os alinhamentos em série e em paralelo são considerados geometrias extremas, uma vez que os auto-agregados podem assumir geometrias de diversos ângulos intermediários. Desta forma, outras configurações são possíveis entre as configurações [A e C] e [B e C], levando a auto-agregados com bandas posicionadas em comprimentos de onda intermediários. Sabe-se, portanto, que a geometria assumida pelo dímero depende da minimização das forças repulsivas e maximização das atrativas entre as unidades monoméricas que compõem o agregado. Desta forma, a diferença de energia da transição dependerá do ângulo entre os momentos dipolares de transição dos monômeros no auto-agregado. Inclusive, quando o ângulo resultante é exatamente $54,7^\circ$ (Figura 21, geometria C) há uma diferença de energia nula e a banda de absorção do dímero coincide com a do monômero. (Kasha et al, 1963; Simon, 2002; Severino et al, 2003).

Portanto o deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção para comprimentos de onda maiores para a AlPcCl (Figura 20-b) quando a mesma está presente em um ambiente com altos teores de água aponta a predominância de agregados do tipo J.

Com o intuito de se obter maiores informações sobre a natureza destes auto-agregados realizou-se o mesmo experimento utilizando-se RLS, cujos resultados são apresentados na Figura 22. Primeiramente, observa-se o sinal resultante da emissão residual da fluorescência da AIPcCl através da excitação sincrônica da banda Q em 680 nm, como já descrito anteriormente (Seção 4.1). Este sinal é verificado principalmente nas porcentagens de água mais baixas. Com o aumento do teor de água no sistema, por sua vez, é observado a queda deste sinal até seu total desaparecimento na região da PAAC, em torno de 50% (V/V). Este fato reforça a proposta da ocorrência de auto-agregados em altos teores de água.

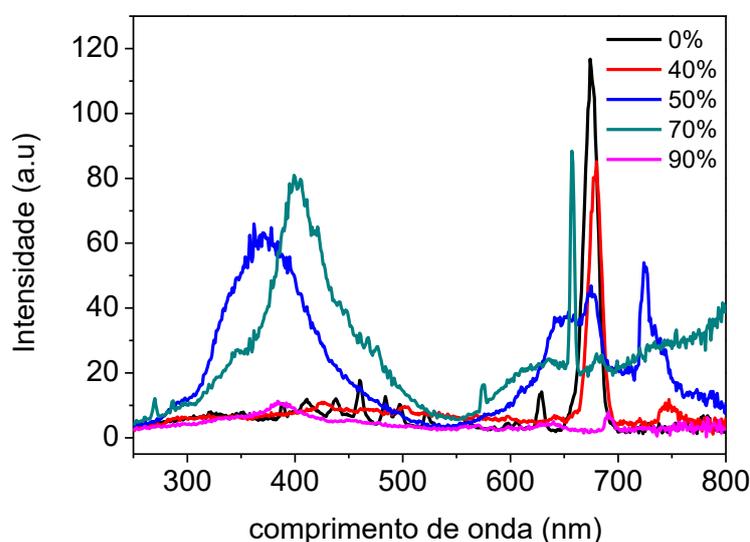


Figura 22. Espectros de RLS da AIPcCl ($3,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em diferentes porcentagens de água, a 30°C (obtidos com $\Delta\lambda = 0$), $\text{pH}=7,0$.

A Figura 22 também mostra entre 300 a 500 nm a menor intensidade de espalhamento em baixos teores de água (0 a 40% V/V). Isto ocorre, provavelmente, devido à pequena taxa de formação de auto-agregados da AIPcCl nesses meios e seus relativamente pequenos tamanhos tais como dímeros, que não são identificáveis pela técnica (Pasternack et al., 1993). Conforme se aumenta a proporção de água no meio (50-70% de água), a intensidade do sinal de RLS é aumentada consideravelmente, apontando a formação de auto-agregados maiores de AIPcCl, como mostrado na Figura 22.

Aumentando-se o teor de água para 90% é verificada uma queda da intensidade do sinal de RLS, efeito que pode ser atribuído à precipitação da AIPcCl devido ao considerável aumento do teor de água no sistema e, portanto, a diminuição efetiva de sua concentração na solução. Mesmo

sendo a concentração baixa (10^{-7} molL⁻¹) e apesar de não observar-se visualmente tal precipitação, o espectro de absorção e emissão para a amostra com 90% de água/etanol indica ausência de cromóforos/ fluoróforos no meio (Figura 18-a e 19-a, respectivamente).

A auto-agregação da AlPcCl verificada pelos espectros de emissão, absorção eletrônica e RLS com o aumento do teor de água pode ser atribuída ao desbalanço hidrofílico/hidrofóbico do sistema alterada pela presença de água, que tende a favorecer interações hidrofóbicas entre as moléculas de AlPcCl, fenômeno que tem sido observado para outros compostos na literatura (Simplício, 2004; Gracetto, 2011; Tessaro, 2011). O fato de espécies auto-agregadas não produzirem ¹O₂ faz com que a aplicação da AlPcCl como fotossensibilizador em TFD a princípio, seja inviável em água. Portanto, há a necessidade de um sistema aquoso "*drug delivery system*" que seja solubilizador, biotransportador e monomerizador da AlPcCl.

4.1.2. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da AlPcCl em etanol

Pelo fato de ter seu rendimento quântico de fluorescência conhecido na literatura e por ter propriedades espectroscópicas semelhantes à da AlPcCl (Ribeiro, 2003), a ftalocianina de Zinco (ZnPc) foi escolhida como padrão para a medida do rendimento quântico de fluorescência da AlPcCl, utilizando-se do método relativo do padrão secundário (discutido na seção 3.2.3-a). Na Figura 23 pode-se verificar a similaridade entre os espectros de absorção e de emissão da AlPcCl e ZnPc (ambas em $1,5 \times 10^{-6}$ molL⁻¹) em etanol a 30°C.

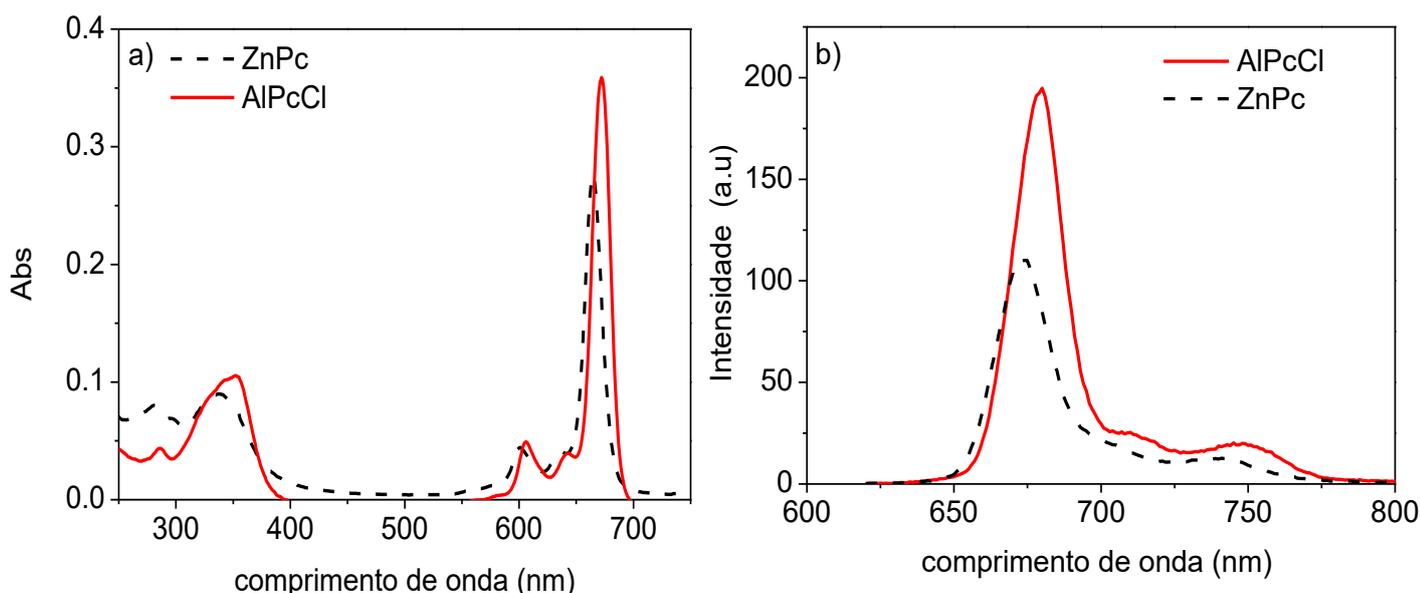


Figura 23. Espectros de **a)** absorção de AlPcCl e ZnPc $1,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ e **b)** emissão de fluorescência da AlPcCl e ZnPc em etanol, $\lambda_{\text{exc}} = 604 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emis}} = 620\text{-}850 \text{ nm}$ a 30°C , $\text{pH} = 7,0$.

Para os estudos realizados, os valores de absorvâncias da AlPcCl e da ZnPc foram mantidos no valor de 0,05 junto ao comprimento de onda de excitação ($\lambda_{\text{exc}} = 604 \text{ nm}$), para se minimizar efeitos de filtro interno (Dhami et al, 1995; Lakowics, 2006). Desta forma, utilizou-se a equação 3 para se determinar o Φ_f da AlPcCl ($1,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em meio homogêneo (etanol), utilizando-se o valor de $\Phi_f = 0,28$ para a ZnPc (Ricci-Júnior e Marchetti, 2005; Oliveira, 2006).

A baixa concentração de AlPcCl e ZnPc minimizaram os efeitos relacionados à auto-agregação do FS, pois sabe-se que este fenômeno afeta diretamente o rendimento quântico de fluorescência (Bonnet, 2000). Desta forma, utilizando-se os valores da área (integradas) dos espectros de emissão e absorção, o valor de Φ_f da AlPcCl foi estimado em etanol como sendo 0,41. Este valor, maior do que o da ftalocianina de Zinco indica que, comparativamente à ZnPc, a AlPcCl apresenta uma menor taxa de despopulação do seu estado excitado via processos não radiativos (ISC, colisões e etc; Eaton, 1988).

4.1.3. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2$) da AlPcCl em etanol

É de importância fundamental se quantificar a geração de oxigênio singlete por determinado fotossensibilizador em estudos envolvendo terapia fotodinâmica (Andrade, 1995). Medidas envolvendo tempo de vida são utilizadas, porém o aparato experimental envolvido nessa quantificação apresenta um custo relativamente elevado (Rabello et al, 2012). Tem-se, por exemplo, a detecção de $^1\text{O}_2$ através da medida da fosforescência do mesmo em 1270 nm. A fosforescência do oxigênio singlete na maioria dos solventes é relativamente baixa, deste modo é necessário o uso de detectores de alta sensibilidade (fotodiodos de germânio, por exemplo), capazes de detectar sinais da ordem de microssegundos ou menos, resfriados sob temperaturas relativamente baixas (77 K), para que seja possível a detecção (Wilkinson et al 1993; Andrade, 1995). Uma alternativa com menor custo envolve a reação entre o oxigênio singlete produzido após a foto-excitação de um fotossensibilizador e o ácido úrico (AU), sendo esse uma sonda química para $^1\text{O}_2$. Uma das vantagens do uso do ácido úrico como substrato para a quantificação de formação de oxigênio singlete no meio é que a sua absorção eletrônica se situa na região do UV (comprimento de onda

menor que 350 nm), apresentando um máximo de absorção em 293 nm, portanto, muitas vezes fora da região de absorção do fotossensibilizador (Gerola et al, 2012).

O processo de fotodegradação indireta do ácido úrico via $^1\text{O}_2$, produzido pela foto-excitação do FS leva à formação de produtos como a triuréia, a alantoxaidina, o íon oxanato e dióxido de carbono (Matsuura e Saito, 1968; George e Bhat, 1979; Rabello et al, 2012).

Para estas reações fotoquímicas ocorrerem, no entanto, é necessário que haja uma sobreposição entre o espectro de absorção da AlPcCl com o espectro de emissão do sistema óptico de excitação fotônica (LASER, LED, lâmpadas e etc) visando, portanto, um maior rendimento de absorção de fótons, Lei de Grotthus-Draper (Rohatgi-Mukherjee, 1978). Portanto, é de extrema importância se quantificar o número de fótons absorvidos durante um processo fotoquímico. Para isto, realizou-se o cálculo do número de fótons que foram absorvidos no processo através da equação 5, que leva em consideração o tipo de fonte utilizada na irradiação (poli ou monocromática), potência da fonte, tempo de exposição, grau de sobreposição espectral, capacidade absorptiva da AlPcCl e ainda, se o composto é foto estável (passivo de sofrer fotobranqueamento) quando exposto à radiação. A Figura 24 mostra a sobreposição espectral (normalizada) entre o espectro de absorção da AlPcCl em etanol e o de emissão da fonte de LASER utilizada nos experimentos envolvendo a quantificação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2$) da AlPcCl.

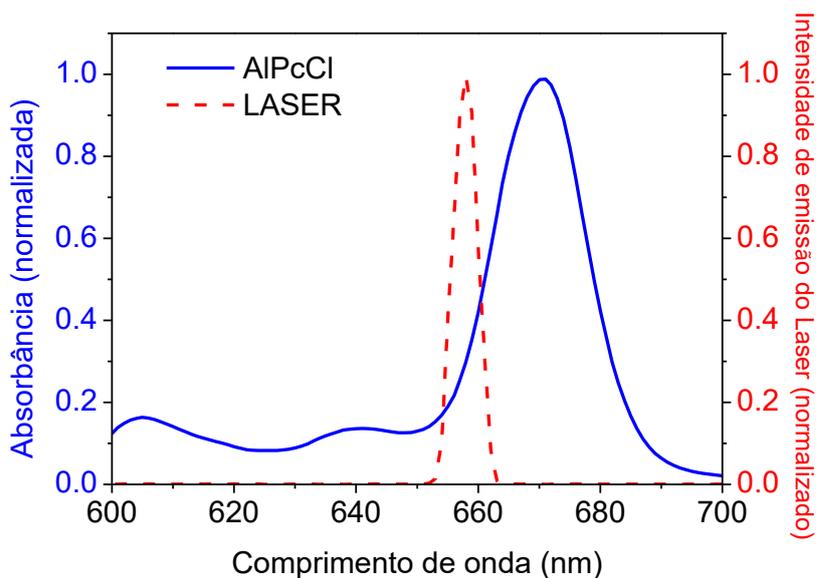


Figura 24. Sobreposição (normalizada) dos espectros de **a**) absorção da AlPcCl ($1,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em etanol na região da banda Q_{III} ($\lambda_{\text{máx}}=672 \text{ nm}$) e **b**) emissão do LASER de diodo ($\lambda_{\text{máx}}=663 \text{ nm}$) a 30 °C.

Verifica-se através da Figura 24, que ocorre uma relativa sobreposição espectral entre os espectros de absorção da AIPcCl com o de emissão do LASER ($\lambda_{\text{máx}} = 663\text{nm}$). Neste caso, segundo a equação 5, deve-se mencionar que não é necessária uma completa sobreposição espectral para a ocorrência dos processos fotoquímicos. A dependência temporal da reação do AU com $^1\text{O}_2$ observada (cinética), por sua vez, irá depender principalmente da potência do LASER (energia fornecida pelo seu fluxo de fótons). A potência de máxima emissão do LASER medida é de 100 mW, suficiente para a observação da reação do consumo total do ácido úrico no experimento. Na Figura 25 são apresentados os espectros de absorção UV-Vis da solução contendo AU ($1,0 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$) e AIPcCl ($4,1 \times 10^{-7} \text{molL}^{-1}$) em função do tempo de iluminação.

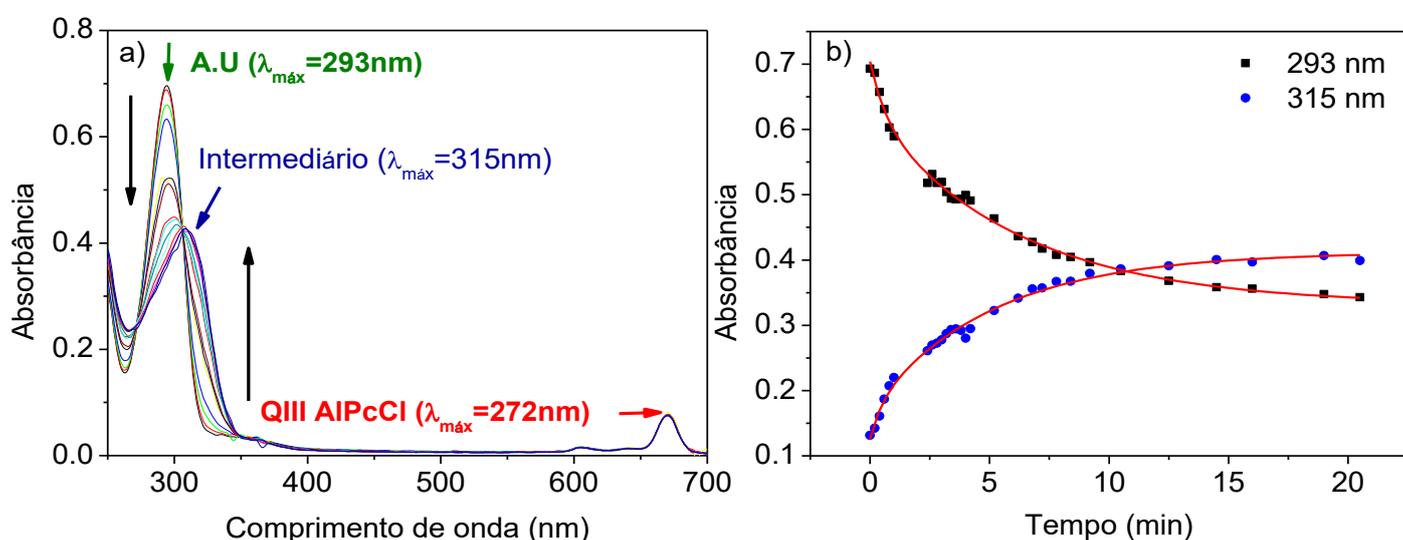


Figura 25. Espectros de absorção UV-Vis da solução contendo a) AIPcCl ($4,1 \times 10^{-7} \text{molL}^{-1}$; $\lambda_{\text{máx}} = 272 \text{ nm}$) e AU ($1,0 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$; $\lambda_{\text{máx}} = 293 \text{ nm}$) monitorados em função do tempo de irradiação a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,0$ e b) Perfil da cinética de decaimento da banda do ácido úrico ($\lambda_{\text{máx}} = 293 \text{ nm}$) e de surgimento do intermediário formado ($\lambda_{\text{máx}} = 315 \text{ nm}$) em função do tempo de irradiação.

Primeiramente, pode-se observar que não houve alteração no perfil espectral da AIPcCl nos experimentos (manutenção da banda Q_{III}), evidenciando que não ocorre o fenômeno de fotobranqueamento, que se caracteriza pela degradação do composto fotossensibilizador pela interação com a luz, levando a um decréscimo no número total de fótons efetivamente absorvidos durante a irradiação (Gerola et al 2012; Swan et al 2012). Ainda pode ser observado na Figura 25-a o aparecimento da banda referente ao intermediário da reação do ácido úrico em 315 nm. Na Figura 25-b pode ser visto o decréscimo no máximo de absorção do ácido úrico (monitorado em

$\lambda_{\text{máx}}=293\text{nm}$), simultâneo à formação do intermediário, porém não se apresentou a sequência espectral posterior das iluminações, onde se tem uma etapa lenta relacionada ao consumo deste intermediário (Gerola et al, 2012; Rabello et al, 2012). Apenas a primeira constante de velocidade (k_1) é relacionada com o consumo/degradação do AU ($\lambda_{\text{máx}}= 293\text{nm}$) e deve ser considerada na análise dos dados. A segunda constante (k_2) é relativa ao consumo do intermediário e independe da luz (Rabello et al, 2012). Através da Figura 26 pode-se verificar que há uma relação linear entre o k_1 e o número de fótons absorvidos pelo sistema, assim como apresentado anteriormente pela equação 6. Desta relação obtém-se o valor da eficiência do processo de geração de $^1\text{O}_2$ (γ_Δ).

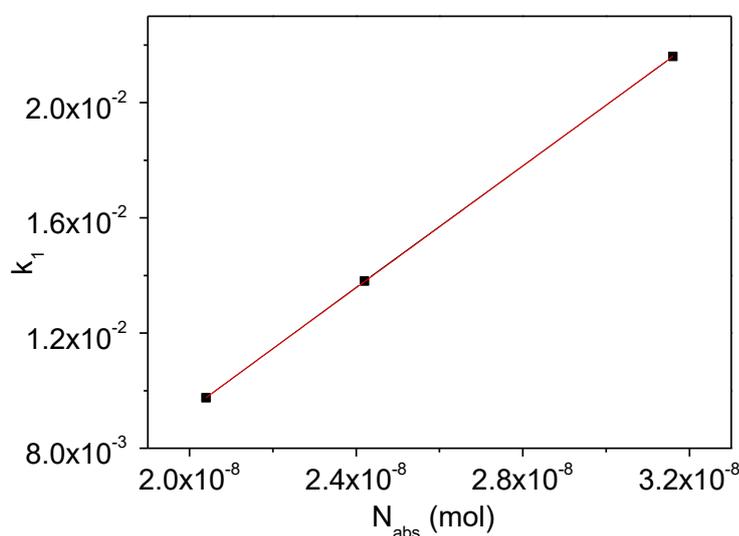


Figura 26. Relação entre k_1 e o número de fótons absorvidos para a AlPcCl para estimativa da eficiência (γ_Δ) do processo de geração de $^1\text{O}_2$.

Finalmente, uma vez conhecido o γ_Δ , obtém-se o valor de $\Phi^1\text{O}_2$ do fotossensibilizador, através da equação 6. Na Tabela 4, por sua vez, são apresentados os valores estimados para a eficiência (γ_Δ) e rendimento quântico de formação de oxigênio singlete ($\Phi^1\text{O}_2$) obtidos para a AlPcCl utilizando a ftalocianina de zinco (ZnPc) como padrão ($\Phi^1\text{O}_2$ de 0,53; Redmond et al, 1999).

Tabela 4. Valores de eficiência, k_1 e rendimento quântico de oxigênio singlete da AlPcCl em etanol a 25 °C.

[AlPcCl] (10^7 molL^{-1})	$k_1(10^{-3} \text{ s}^{-1})$	$\gamma \text{ } ^1\text{O}_2$ (10^6)	$\Phi \text{ } ^1\text{O}_2$
5,9	9,75		
7,27	13,8	1,05±0,003	0,43 (±0,01)
9,02	21,6		

O valor de $\Phi \text{ } ^1\text{O}_2$ obtido para a AlPcCl (0,43) é relativamente satisfatório para aplicações fotodinâmicas, uma vez que fotossensibilizadores amplamente conhecidos e utilizados em TFD podem apresentar valores de rendimento quântico de oxigênio singlete similares ou mesmo menores do que a AlPcCl em etanol, como por exemplo, a ftalocianina de zinco (0,53; Redmond et al, 1999), ftalocianina de cobalto (0,55; Redmond et al, 1999), ftalocianina de níquel (0,52; Pop, 2010), hipericina (0,39; Roslaniec et al, 2000), azul de metileno (0,55; Glusko et al, 2011).

4.2. Estudos das propriedades da AlPcCl em meio micro-heterogêneo: interação ftalocianina/copolímeros micelares de P-123 e F-127

Com base nos resultados anteriores, que mostraram a auto-agregação da AlPcCl em meio aquoso, efetuou-se os estudos que envolvem a interação deste fotossensibilizador com P-123 e F-127, que são sistemas nanoestruturados solubilizadores/transportadores. Antes do encapsulamento, foram realizados os estudos prévios de interação AlPcCl/copolímeros, utilizando-se das técnicas de emissão de fluorescência, absorção eletrônica e RLS. Estes estudos são importantes para obter-se uma maior compreensão das propriedades físico-químicas (ligação, solubilização, cinética de incorporação/liberação/estabilização, localização e organização estrutural) dos formulados AlPcCl/copolímeros que forem desenvolvidos.

Desta forma, a interação (associação) da AlPcCl com estes copolímeros foi inicialmente monitorada através de experimentos envolvendo titulações espectrofotométricas da AlPcCl com diferentes volumes destes copolímeros (a partir de uma solução estoque, item 3.2.4.1) visando obter as isotermas de ligação fármaco-copolímero (Liu et al, 2007). Deste modo nas titulações partiu-se da adição de alíquotas das soluções estoques de P-123 e F-127 2% (m/V; equivalente a $3,5 \times 10^{-3}$ e $1,6 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, respectivamente) em uma solução pré-preparada de AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em meio aquoso com 1% de etanol (V/V). Os espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl em

função do aumento da concentração de ambos copolímeros são apresentados nas Figuras 27-a e 27-b para F-127 e P-123, respectivamente.

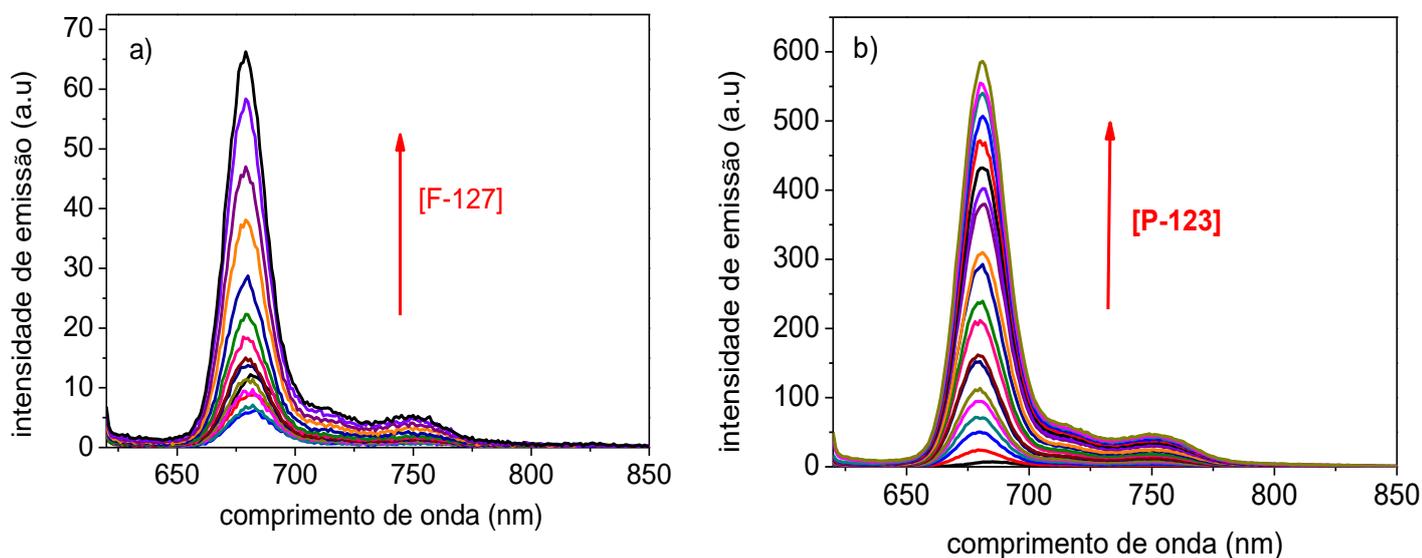


Figura 27. Espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em função de adição de copolímero: **a)** F-127 (região de concentração variando de 0 a $6,5 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$) e **b)** P-123 (0 a $1,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc}} = 604 \text{ nm}$ pH = 7,0. A seta indica o aumento de emissão da ftalocianina com a concentração dos copolímeros.

Analisando-se a Figura 27, observa-se que inicialmente a intensidade de emissão da AlPcCl em meio aquoso, na ausência do copolímero, é extremamente pequena (próxima a zero), fato atribuído principalmente ao efeito de auto-agregação da AlPcCl em meio aquoso e/ou a um efeito de supressão da fluorescência da AlPcCl pelas moléculas de água (Eaton, 1988; Lakowicz, 2006). Posteriormente, verifica-se o aumento da intensidade de emissão de fluorescência conforme a adição dos copolímeros. Este aumento da fluorescência com o aumento da concentração dos copolímeros indica que a AlPcCl se associa aos mesmos (na forma monomérica e micelar polimérica). Dois fatores distintos podem levar a este aumento de fluorescência: (i) diminuição da supressão de fluorescência pelas moléculas de água em solução devido ao distanciamento destas ao fluoróforo que ficaria “protegido” dentro da micela e (ii) a associação com a micela leva a um efeito de desagregação e redistribuição da AlPcCl no microambiente micelar durante este processo primário de ligação (Alexandridis e Hatton, 1995). A complexidade destes efeitos dificulta uma análise mais aprofundada dos mesmos, entretanto estas hipóteses serão discutidas a partir dos resultados dos experimentos complementares apresentados adiante (item 3.2).

Uma diferença visível observada na comparação entre os dois gráficos da Figura 27 consiste no aumento da intensidade de emissão de fluorescência no sistema AIPcCl/P-123 ser cerca de 10 vezes maior que o observado para o AIPcCl/F-127. Este aumento para o sistema P-123 pode ser atribuído a um efeito de desagregação da AIPcCl paralelamente ao processo de associação com a micela favorecido pela existência de um microambiente mais hidrofóbico para o copolímero na sua forma micelar (ver Figura 2; Wanka et al, 1994; Croy et al, 2006). Este copolímero possibilita que o FS se estabilize na forma monomerizada solubilizada no “core” hidrofóbico de sua micela mais eficientemente que para o F-127 (Alexandridis et al 1994; Croy et al, 2006).

As Figura 28-a e 28-b apresenta os gráficos da intensidade de emissão da AIPcCl ($\lambda_{\text{máx}} = 681$ nm) *versus* concentração de P-123 e F-127 adicionados ao sistema, respectivamente. O inserto apresenta em evidência a região de baixas concentrações para F-127 (entre 0 e $1,5 \times 10^{-5}$ molL⁻¹).

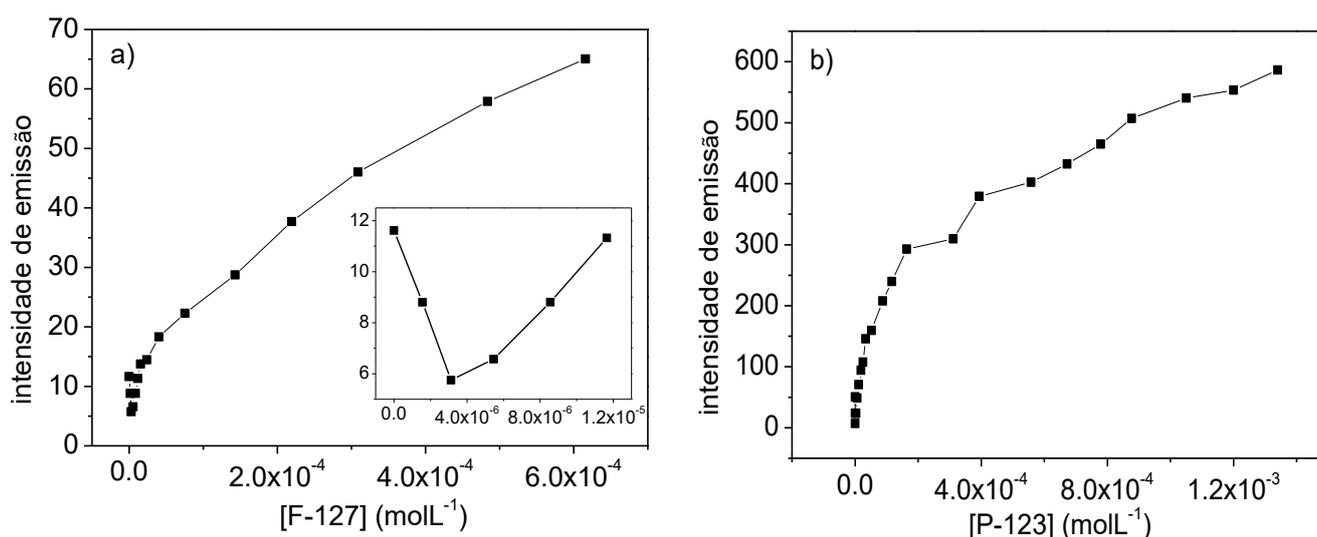


Figura 28. Intensidade de emissão de fluorescência da AIPcCl ($8,0 \times 10^{-7}$ molL⁻¹) em função da concentração de copolímeros para os sistemas com adições de **a)** [F-127] (0 a $6,0 \times 10^{-4}$ molL⁻¹; no insert da Figura encontra-se uma ampliação da região de baixas concentrações, entre 0 e $1,5 \times 10^{-5}$ molL⁻¹) e **b)** [P-123] (variando de 0 a $1,2 \times 10^{-3}$ molL⁻¹). Medidas realizadas a 25 °C, pH = 7,0.

As curvas experimentais da Figura 28 mostram comportamentos similares aos usualmente observados para as isotermas de ligação, a princípio com uma etapa simples de associação com uma tendência à saturação na interação da ftalocianina com o copolímero (Moore et al, 2007; Hosseinzadeh, 2007). Entretanto, com a utilização de modelos simples de ajustes para a interação fármaco-membrana, conclui-se que estes sistemas são intrinsecamente mais complexos, uma vez

que consideram a interação entre a molécula de um fotossensibilizador a princípio monomerizado em solução com o sistema micelar (Caetano e Tabak, 1999, Du et al, 2012.).

Analisando-se a Figura 28, verifica-se que tanto para os sistemas P-123 e F-127 parece haver mais de uma etapa no processo de associação entre a AIPcCl com as micelas poliméricas, principalmente no caso da Figura 28-a, para F-127. Para as isotermas extraídas da titulação espectrofotométrica com F-127 (Figura 28-a) verifica-se nitidamente uma primeira etapa que mostra uma queda da intensidade inicial de emissão da AIPcCl até aproximadamente $5,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ de F-127 (inserto da Figura 28-a). Vale mencionar que esta é uma região de concentração abaixo da CMC deste surfactante nesta temperatura (Bakshi e Sachar, 2006). Este comportamento é atribuído a um aumento da auto-agregação da AIPcCl decorrente da quantidade relativamente menor de sítios disponíveis na micela adequados a monômeros deste FS. Há de se considerar ainda as diferenças de um monômero (unímero) de um copolímero surfactante em relação a um monômero de surfactante usual (SDS, CTAB e etc). Mesmo estando abaixo de sua “CMC”, sabe-se que apenas um unímero de um copolímero por si só pode se auto-organizar em um sistema com uma determinada estrutura definida (Liu, 2008). Neste sentido esta diminuição na intensidade de emissão seria resultado de um aumento da auto-agregação da AIPcCl decorrente da localização destas nos poucos e relativamente pequenos micro-ambientes no unímero.

Por sua vez, a partir de $5,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ de F-127 (portanto acima da CMC deste copolímero) tem-se o início de uma segunda etapa (até aproximadamente $5,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) onde se supõe uma tendência de redistribuição das moléculas de AIPcCl neste sistema, entretanto não é descartada a associação concorrente das espécies desagregadas no copolímero (Liu, 2008). Para concentrações maiores, por sua vez, a isoterma apresenta um comportamento mais lento e contínuo, no entanto, sem atingir a completa saturação.

Analisando-se a isoterma para o sistema AIPcCl/P-123 (Figura 28-b) observa-se que neste caso não se verificou a etapa inicial de queda da emissão nas mais baixas concentrações de P-123, como observado para o sistema AIPcCl/F-127. Interessantemente, o intervalo da concentração de P-123 estudada no sistema, se encontra acima de sua CMC, nesta temperatura (25°C; Alexandridis e Hatton 1995). Assim o comportamento da isoterma se mostrou semelhante ao obtido no sistema AIPcCl/F-127 (Figura 28-a). Até a concentração de P-123 de aproximadamente $2,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ foi observada uma tendência da ligação da AIPcCl (nas formas desagregadas e auto-agregadas) com as micelas poliméricas. A partir desta concentração, há uma etapa que apresenta um comportamento mais contínuo, com variação mais lenta na emissão da AIPcCl, sem verificação da saturação. Estes complexos perfis de ligação observados nas isotermas para ambos os copolímeros sugerem que

diferentes formas auto-agregadas da AlPcCl, poderiam se reorganizar (e/ou se estruturar) durante a associação com o microambiente micelar. Para se complementar os estudos realizaram-se as mesmas titulações, acompanhadas através de espectros de absorção eletrônica.

Na Figura 29 são apresentados os espectros de absorção UV-Vis obtidos para as titulações da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) na presença de ambos os copolímeros e nas mesmas condições estudadas anteriormente ($\text{pH}=7,0$; $T=25^\circ\text{C}$).

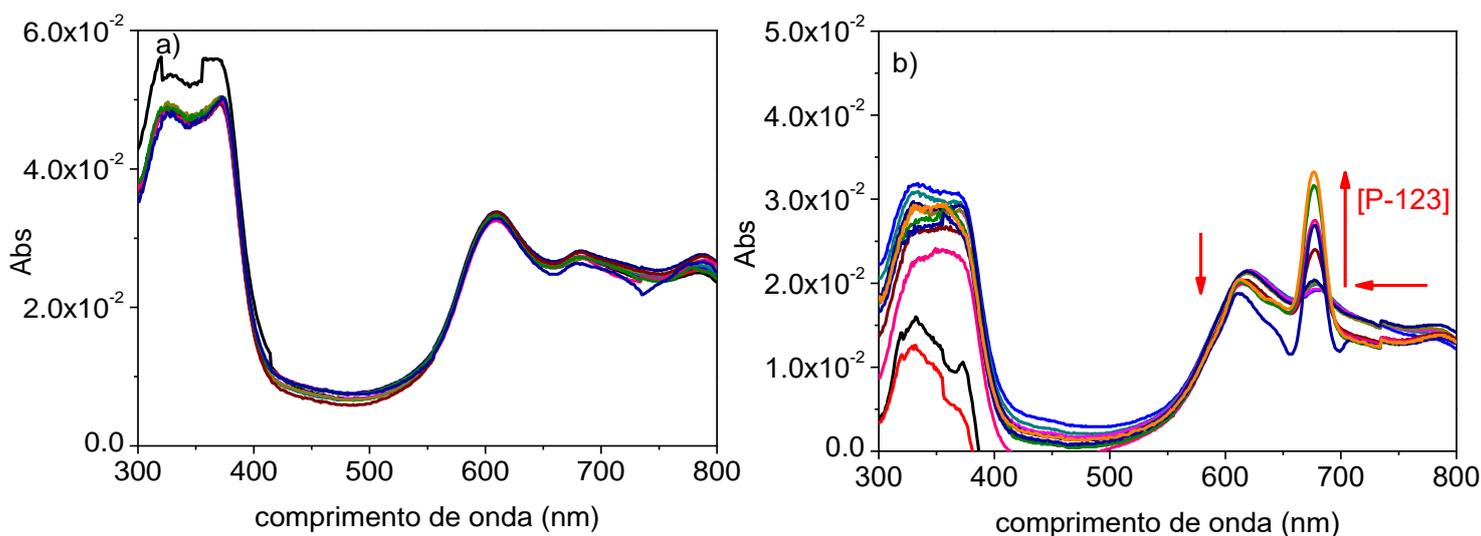


Figura 29. Espectros de absorção eletrônica da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) na presença de a) [F-127] (variando de 0 a $6,4 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$) e b) [P-123] (variando de 0 a $1,5 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), $\text{pH} = 7,0$ a 25°C . As setas indicam as variações com o aumento da concentração dos copolímeros.

Sem adição dos copolímeros, observa-se o perfil espectral usual da AlPcCl auto-agregada, já observados para o sistema $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$, principalmente pela presença da banda característica de auto-agregados em 610 nm (ver seção 4.2, Figura 18-c). Observa-se que os espectros de absorção eletrônica evidenciaram pequenas diferenças ainda menos significativas entre as titulações realizadas com F-127 e P-123, de modo geral. Enquanto não foram observadas variações espectrais significativas para o sistema AlPcCl/F-127 (Figura 29-a), para o sistema AlPcCl/P-123 verificou-se uma pequena recuperação da absorvidade da banda referente a monômeros da AlPcCl ($\lambda=675\text{nm}$) (Figura 29-b) e uma diminuição da banda referente à auto-agregados em $\lambda=610 \text{ nm}$ com a adição deste copolímero. Adicionalmente, o aumento da concentração de P-123 induz um deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda de máxima absorção da banda inicialmente em 675 nm de aproximadamente de 7 nm. O que se pode inferir é que a interação das moléculas de AlPcCl com P-123 induz um efeito de desagregação do FS durante sua interação com o copolímero (na forma

micelar) quando comparados aos resultados observados com o F-127 pelos estudos de fluorescência (Figura 28; item 4.2).

Portanto, assume-se que este efeito de recuperação simultânea observada para a banda da AlPcCl em 675 nm com adições de P-123 (Figura 29-b) possa estar associado à desagregação da AlPcCl e/ou subsequente reorganização estrutural dos auto-agregados da ftalocianina, uma vez que neste último caso, estes podem absorver inclusive numa região de comprimento de onda muito próxima à da analisada na Figura 29-b (Pasternack et al 1995). Esta discussão será complementada na próxima seção onde é analisado o perfil cinético da incorporação da AlPcCl nos sistemas estudados (seção 4.3.2). Até o presente momento, pode-se inferir que no sistema é possível observar a presença de diferentes tipos de agregados de AlPcCl nos dois poloxâmeros, o que pode explicar a complexidade e diferenças observadas entre as isotermas de ligação apresentadas anteriormente na Figura 28.

Para uma maior compreensão dos processos envolvidos na interação AlPcCl/poloxâmero e análise qualitativa da reorganização estrutural das formas auto-agregadas da AlPcCl durante o processo de associação ftalocianina/copolímero foram realizadas medidas de espalhamento de luz ressonante (RLS). Na Figura 30 são apresentados inicialmente os espectros de RLS para a AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em função do aumento da concentração de F-127.

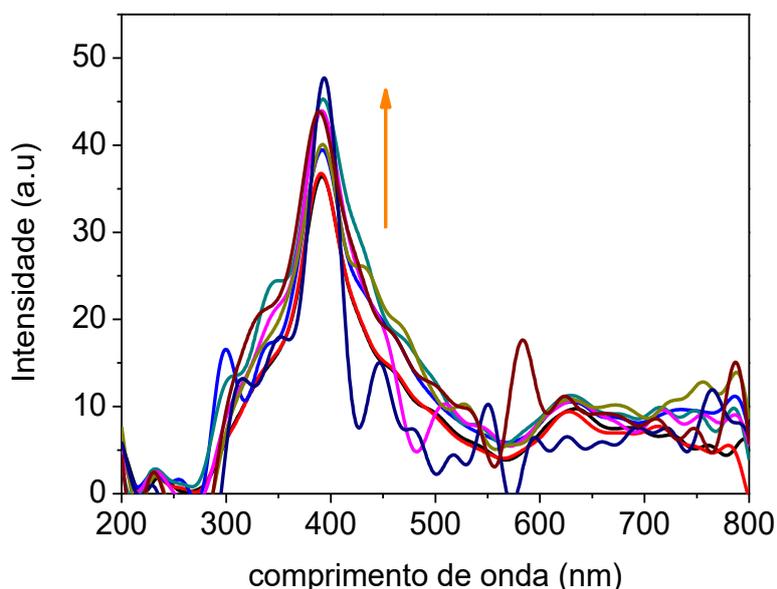


Figura 30. Espectros de RLS da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em função da concentração de F-127 (variando de 0 a $6,4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta\lambda = 0$). A seta indica a variação do sinal de RLS com o aumento da concentração do copolímero.

Observa-se, primeiramente para a solução de AlPcCl na ausência de micelas poliméricas, a existência de um sinal na região de 400 nm observado desde as primeiras adições de F-127 com perfil similar aos obtidos para o RLS em altos teores de água em etanol (Figura 22, seção 4.2). Este sinal aumenta fracamente com o aumento da concentração de F-127, evidenciando que a AlPcCl mantém-se majoritariamente na sua forma auto-agregada neste micro-ambiente e mesmo com a associação AlPcCl-micela, não se verifica desagregação efetiva do fotossensibilizador. Também pode ser verificado, a ausência da banda referente à emissão residual da AlPcCl em 680 nm, o que confirma a hipótese da AlPcCl presente na forma auto-agregada neste meio. Provavelmente a molécula não se encontra solubilizada no interior hidrofóbico da micela polimérica, mas na região interfacial mais hidrofílica entre as fases aquosa e o interior hidrofóbico da micela.

Por outro lado, os sinais de RLS para o sistema AlPcCl/P-123, mostraram variações distintas no sinal de RLS que dependem da faixa de concentração de P-123 empregada, como mostrado pela Figura 31-a e 31-b.

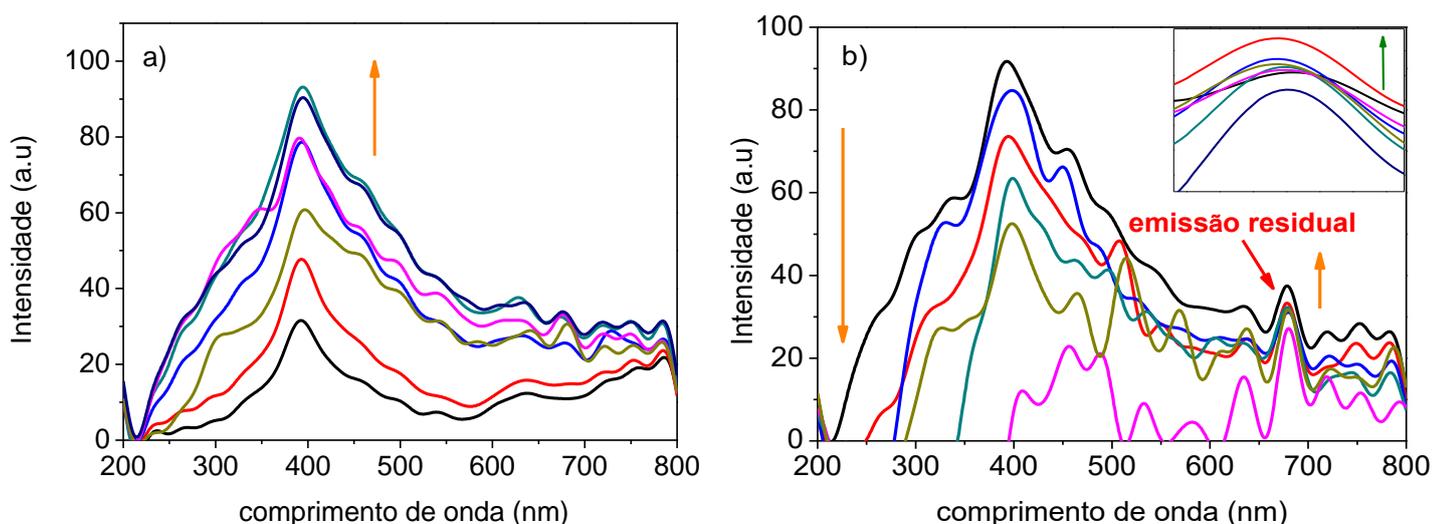


Figura 31. Espectros de RLS da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em função da concentração de P-123 em distintas faixas: **a)** 0 a $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ e **b)** 2×10^{-4} a $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (obtidos com $\Delta\lambda = 0$). No inserto da Figura é apresentada uma ampliação da região próxima a 680 nm que mostra o crescimento da banda de emissão residual da AlPcCl com o aumento da concentração de P-123. As setas indicam a variação do sinal com o aumento da concentração.

Na Figura 31-a, com o aumento da concentração de P-123 a partir de 0 a $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ na solução de AlPcCl, o sinal de RLS monitorado em 400 nm (associado à auto-agregados da AlPcCl;

seção 4.1) aumenta com a concentração deste copolímero. Por outro lado, na Figura 31-b, acima de $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ é observada a diminuição deste sinal e, simultaneamente, o surgimento da banda atribuída à emissão residual da AIPcCl na região de 680 nm. Portanto, os resultados mostrados pelo RLS em P-123 nesta temperatura mostram a existência de pelo menos duas etapas no processo de associação entre a AIPcCl e P-123, similar ao verificado através dos espectros de absorção eletrônica monitorados durante a ligação da mesma neste copolímero e das isotermas de ligação da AIPcCl monitoradas por fluorescência (Figura 28-b). O aumento do sinal de RLS na faixa menor de [P-123] indica ainda a associação primária da AIPcCl auto-agregada com a micela. Interessantemente com o aumento da concentração de P-123 há o início de uma segunda etapa de associação na qual há uma reorganização estrutural da AIPcCl, provavelmente havendo uma desagregação, observada através do aparecimento da banda de emissão residual em 680 nm (inseto Figura 31-b), diminuição do sinal referente a auto-agregados em 400 nm (Figura 31-b), juntamente com o surgimento da banda de absorção em 675 nm (Figura 29-b) e também na análise das isotermas de ligação (Figura 28-b).

A complexidade observada na interação entre a AIPcCl e os copolímeros através da análise das isotermas de ligação monitoradas pela fluorescência da AIPcCl (Figura 28), dos espectros de absorção UV-Vis (Figura 29) e também dos sinais de RLS (Figuras 30 e 31) indicam que provavelmente o sistema ainda não se encontra em equilíbrio. Desta forma possíveis mudanças na organização estrutural da AIPcCl ligada no microambiente micelar poderiam estar ocorrendo com o decorrer do tempo. Em razão disto, estudos complementares do processo de associação entre a AIPcCl e os copolímeros foi monitorada também próximo ao equilíbrio realizando-se as mesmas medidas cerca de 48 horas após as adições de F-127 e P-123 nas soluções aquosas contendo AIPcCl.

A comparação entre as isotermas registradas no tempo $t=0$ e no tempo de equilíbrio (> 48 horas) da AIPcCl são mostradas em conjunto nas Figuras 32-a e 32-b para os sistemas AIPcCl/[F-127] e AIPcCl/[P-123].

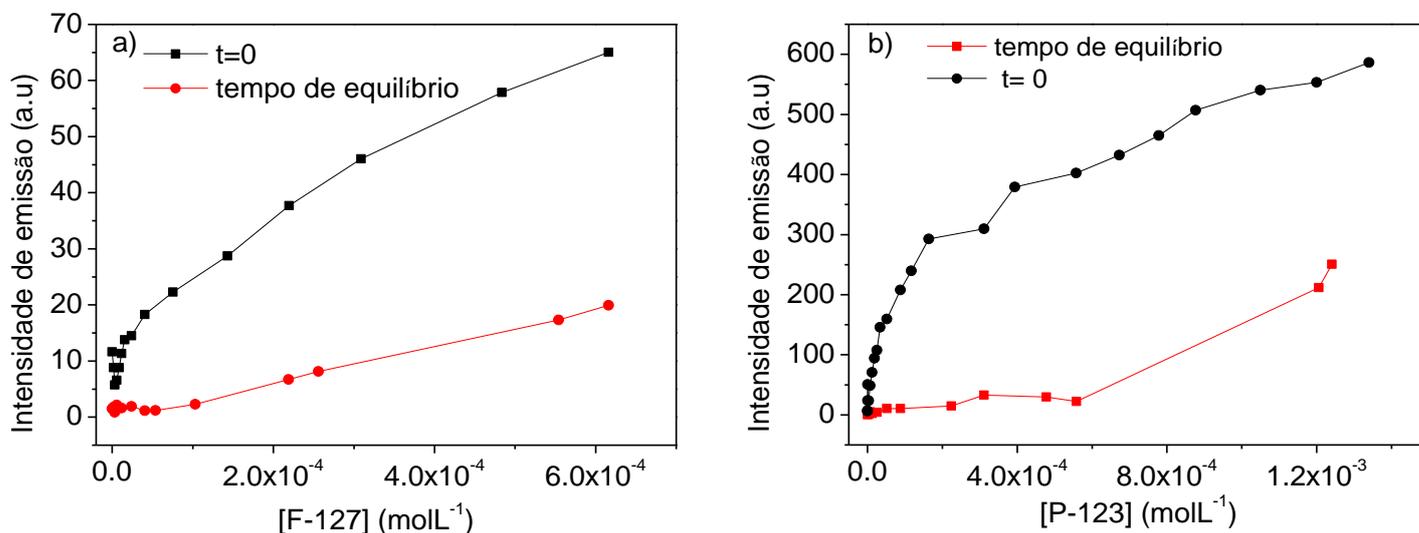


Figura 32. Isotermas de ligação da AlPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em função da [F-127] e [P-123] monitoradas através de fluorescência da AlPcCl, obtidas imediatamente após a adição de copolímero ($t = 0$) e após o equilíbrio (> 48 horas), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$.

Primeiramente observa-se que as isothermas obtidas no tempo de equilíbrio possuem intensidades de emissão relativamente menores do que as obtidas para as medidas realizadas no tempo $t=0$ para ambos os sistemas. Esse fato evidencia uma reorganização estrutural adicional da AlPcCl com o decorrer do tempo no micro-ambiente micelar.

Pode ser observado também, através da Figura 32, que a intensidade de emissão da AlPcCl no decorrer da adição do copolímero é praticamente a mesma para ambos os copolímeros no tempo de equilíbrio, quando comparado às medidas em $t=0$. No entanto, para os estudos da associação AlPcCl/P-123, a diminuição da intensidade dos pontos experimentais apresentados nas isothermas entre $t=0$ e o tempo de equilíbrio foi menor. O perfil relativo e similar observado nas intensidades de emissão da AlPcCl no tempo de equilíbrio para os dois copolímeros mostra que, independentemente do grau de hidrofobicidade do mesmo, a AlPcCl sempre sofre um processo de reorganização estrutural de seus auto-agregados com o decorrer do tempo. Os efeitos distintos observados no processo de interação da AlPcCl com os copolímeros micelares monitorados pelos espectros de absorção eletrônica (Figura 29), emissão de fluorescência (Figura 27) bem como os espectros de RLS da ftalocianina (Figuras 30 e 31) evidenciam a influência da complexidade do micro-ambiente micelar polimérico no processo de reorganização estrutural dos auto-agregados da AlPcCl em comparação ao verificado nas micelas formadas por surfactantes usuais (Akter et al, 2012). Deste modo, processos difusionais das moléculas de AlPcCl nos micro-ambientes complexos das micelas poliméricas poderiam estar correlacionados com os processos de reorganização deste FS verificados nas isothermas do tempo de equilíbrio (Figura 32).

Também foram obtidos os sinais de RLS para a AlPcCl com a adição dos copolímeros no tempo de equilíbrio que, apesar de aparentemente evidenciarem um comportamento distinto do verificado nos sinais no tempo $t = 0$ (Figuras 30 e 31), não forneceram subsídios suficientes para qualquer análise acerca da reorganização estrutural da AlPcCl.

A dependência temporal da interação da AlPcCl com os copolímeros micelares durante o processo de associação FS/micelas poliméricas motivou a investigação mais detalhada de seu perfil cinético de auto-agregação. Neste sentido, estes espectros irão contribuir para a interpretação da estabilidade da AlPcCl incorporada nestes copolímeros após os procedimentos de encapsulamento descritos adiante (seção 4.4.1).

4.3. Estudos cinéticos de incorporação da AlPcCl em micelas poliméricas de P-123 e F-127

Baseados nas isotermas de ligação AlPcCl/[copolímero] (Figura 28), numa primeira análise serão verificados os perfis espectrais da AlPcCl em função da concentração dos copolímeros ([F-127] e [P-123]) para, posteriormente, proceder à análise dos perfis cinéticos obtidos em razões específicas AlPcCl/[copolímero]_{mic}. Neste caso, entretanto, como observado nas Figuras 33 e 34, são apresentados espectros de absorção eletrônica da AlPcCl na presença dos copolímeros para a AlPcCl em concentração na ordem de $2,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, cerca de 3 vezes maior do que a utilizada nas isotermas de ligação apresentadas na Figura 28 ($[\text{AlPcCl}] = 8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$), objetivando-se um melhor acompanhamento das variações do perfil cinético de auto-agregação monitorados por UV-Vis. Para uma análise mais completa dos resultados, as concentrações de F-127 e P-123 adicionadas na solução aquosa contendo AlPcCl correspondem a pontos experimentais que fazem parte de diversas regiões das isotermas de ligação (início, meio e fim) apresentadas na Figura 28.

A Figura 33 mostra os espectros de absorção obtidos no tempo $t=0$ para diversas razões $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}]_{\text{mic}}$ (e/ou concentração de F-127) ($[\text{AlPcCl}]$ fixa) onde $[\text{F-127}]_{\text{mic}}$ foi calculada levando-se em conta o número de agregação deste copolímero na temperatura de 25°C (Wanka et al, 1994).

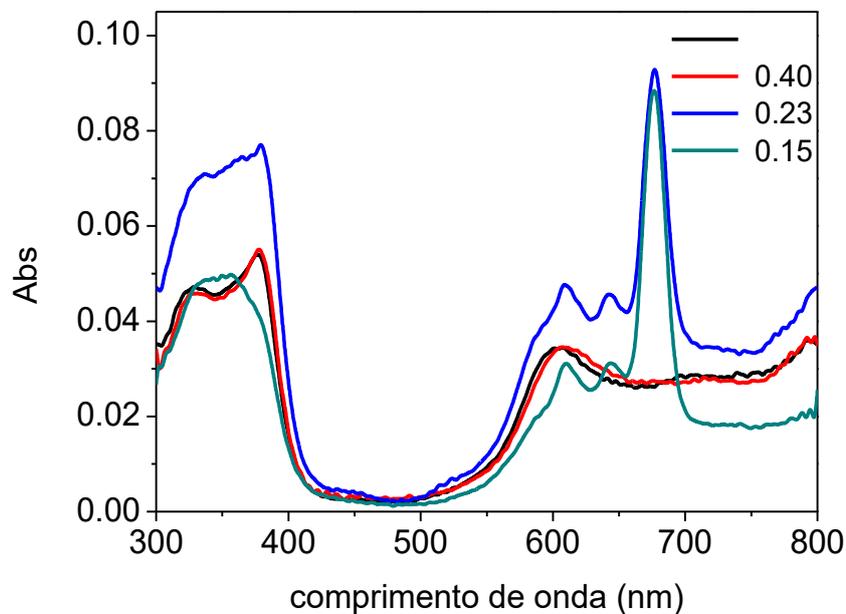


Figura 33. Espectros de absorção da AlPcCl ($2.5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em diversas razões $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ (na ausência de micelas à 0,15 e $[\text{F-127}]$ de 0 a $6,2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$), $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,0$.

A partir da Figura 33 é possível observar que a organização estrutural da AlPcCl (desagregada *versus* auto-agregada) em F-127 foi dependente da razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ ou concentração do copolímero no tempo $t=0$. Para o espectro de absorção obtido no tempo $t=0$, na razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ de 0,40 que corresponde a aproximadamente 3 micelas poliméricas (considerando N_{ag} de 37 a 25°C ; Wanka et al, 1994) por molécula de fotossensibilizador, pode ser verificado um perfil espectral com bandas alargadas indicando que a AlPcCl se encontra majoritariamente na sua forma auto-agregada. Já na razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ de 0,2 (ou menor), que corresponde a aproximadamente 6 micelas por FS (Wanka et al, 1994) o espectro revela a presença de AlPcCl na forma monomerizada nestas condições. Entretanto, a elevada característica alargada juntamente com intensa banda Soret e Q, mesmo nas amostras onde se têm altas quantidades de micelas, indica ainda a presença de formas auto-agregadas da AlPcCl neste copolímero. Igualmente, para o sistema em P-123 no tempo $t=0$, observou-se a mesma dependência, isto é, quanto menor a razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$, mais monômeros estão presentes. No entanto, comparado ao sistema em F-127 (Figura 33) a região acima de 500 nm resultou em menor grau de alargamento das bandas sendo o espectro mais assemelhado ao da AlPcCl no estado monomérico (não mostrado). Este resultado indica uma maior estabilização dos monômeros da AlPcCl no tempo $t=0$ em P-123 e estão em concordância com os obtidos anteriormente nos estudos envolvendo a interação primária da AlPcCl com este copolímero, apresentado anteriormente na seção 4.3.1.

Na Figura 34 são apresentados os espectros de absorção eletrônica da AlPcCl ($2,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em F-127 ($6,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$; razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}] = 0,15$) obtidos em diferentes tempos. Observa-se através desta Figura que no tempo $t=0$, a característica espectral da AlPcCl se

assemelha mais à ftalocianina no estado monomérico (Figura 10, seção 4.1 em etanol) com a presença da banda Soret e das três bandas Q. Com o passar do tempo, no entanto, é verificada a diminuição destas bandas e o surgimento de uma banda alargada em 610 nm, que como visto anteriormente é relativa às formas auto-agregadas da AIPcCl (Figuras 18-a e 18-c; seção 4.3.1). Os perfis espectrais de absorção eletrônica da AIPcCl em P-123 monitorados em função do tempo (não mostrados) foram semelhantes aos registrados para F-127, porém como discutido adiante com mais detalhes, o processo de auto-agregação da AIPcCl foi consideravelmente mais lento neste copolímero.

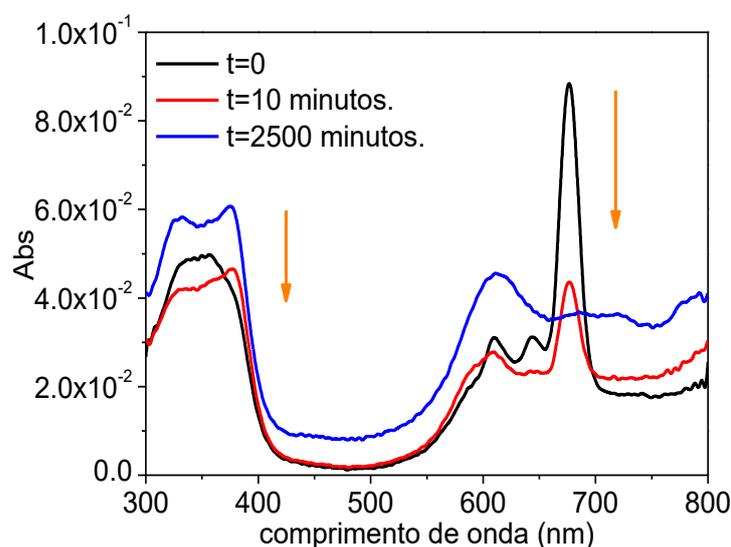


Figura 34. Espectros de absorção da AIPcCl ($2,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em F-127 ($6,2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$; razão $[\text{AIPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ 0,15) em diferentes tempos a 25 °C, pH = 7,0. As setas indicam as mudanças do perfil espectral da AIPcCl com o decorrer do tempo.

Para melhor visualização deste efeito de variação temporal dos espectros da AIPcCl nos dois copolímeros em função do tempo, na Figura 34 são apresentados os perfis cinéticos de diminuição da banda Q_{III} ($\lambda_{\text{máx}}=677\text{nm}$) da AIPcCl com ambos copolímeros em diferentes razões $[\text{AIPcCl}]/[\text{copolímero}_{\text{mic}}]$ ($[\text{AIPcCl}]$ fixa) em 25°C, pH=7,0.

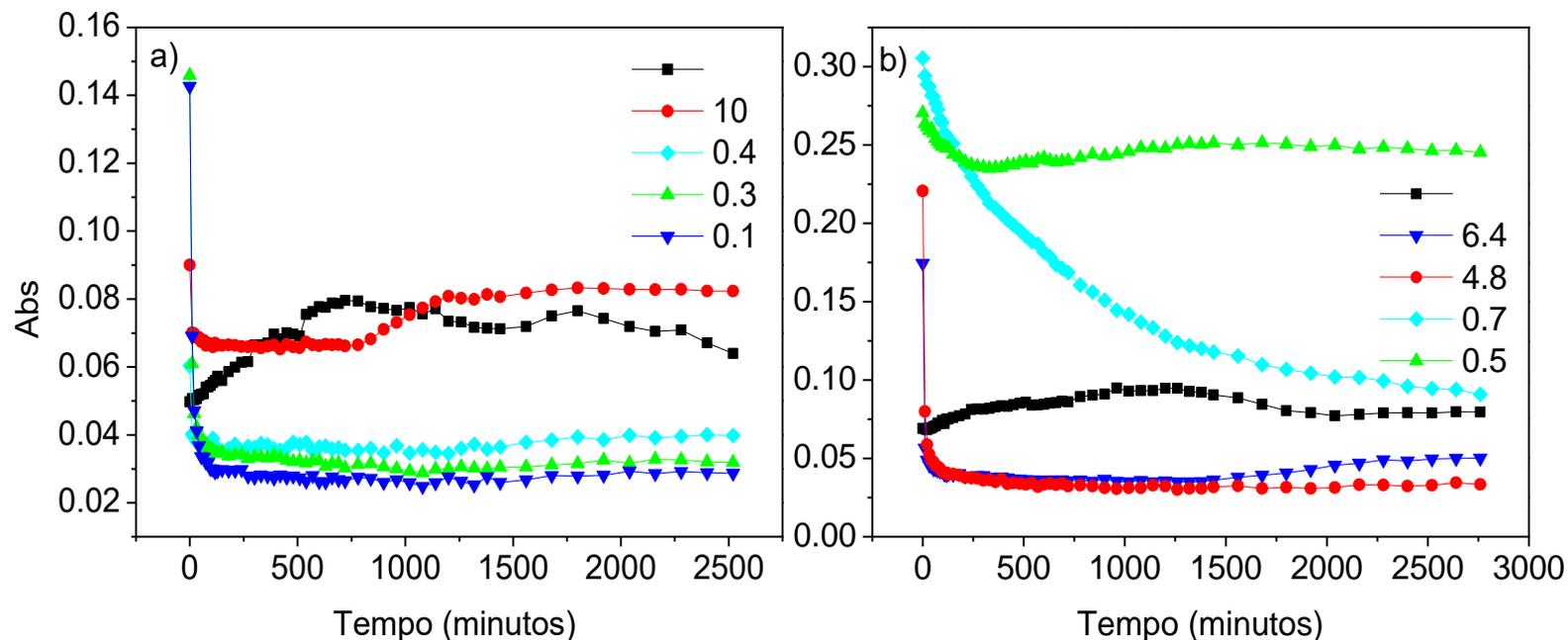


Figura 35. Variação temporal da absorvância da AlPcCl ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) monitorados na banda Q_{III} ($\lambda_{\text{máx}}=677 \text{ nm}$) em diferentes razões [AlPcCl]/copolímero_{mic} para: **a)** F-127 (0 a $6,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e **b)** P-123 (0 a $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) a 25°C , $\text{pH} = 7,0$.

Anteriormente mencionou-se que o grau de alargamento dos espectros de absorção de eletrônica da AlPcCl foi menor em P-123 comparativamente ao F-127. De forma semelhante, pode-se observar na Figura 35 que a intensidade da banda Q_{III} da AlPcCl é de fato maior no P-123 (dobro em média) confirmando o menor grau de agregação da ftalocianina na interação com o copolímero mais hidrofóbico (P-123) em $t=0$. Primeiramente, a Figura 35-a mostra que praticamente não houve mudança significativa na absorvância da AlPcCl com o passar do tempo sem adição de copolímero, devido ao intenso grau de auto-agregação do fotossensibilizador nesta condição. Para a menor razão [AlPcCl]/[F-127_{mic}] estudada (0,1), por sua vez, foi detectada uma queda relativamente mais rápida da absorvância em relação ao sistema AlPcCl/P-123 (Figura 35-b). Neste caso observa-se que em menos de 20 minutos a AlPcCl já exibe uma significativa auto-agregação, monitorada pela variação da absorvância na respectiva Figura, atingindo um equilíbrio em aproximadamente 50 minutos, mantendo-se constante durante todo o tempo da medida. O mesmo efeito ocorre com as outras razões, como pode ser verificado pela Figura 35-a.

Para o perfil cinético de auto-agregação da AlPcCl em P-123 apresentado na Figura 35-b verificou-se que o processo agregacional, no geral, é mais lento comparativamente ao F-127 (Figura 35-a). Adicionalmente, em relação ao sistema contendo F-127, onde praticamente não se detectou uma dependência temporal entre a queda da absorvância da AlPcCl com a concentração de micelas poliméricas, em P-123 observou-se que à medida que a razão [AlPcCl]/[P-123_{mic}] diminui (aumento da concentração de P-123) o processo agregacional se tornou mais lento. Por exemplo, para [AlPcCl]/[P-123_{mic}]=0,5 (Figura 35-b; razão que corresponde à existência de duas micelas por

molécula de AIPcCl, considerando $N_{ag}=85$ a 25°C ; Wanka et al, 1994) o sistema praticamente atinge um estado de equilíbrio (constância nos valores de absorvância) em cerca de $t>250$ minutos, apresentando ainda uma elevada absorvância (0,25), sugerindo um menor grau de auto-agregação nestas condições. No entanto, para as maiores razões (4,8 e 6,4) há uma queda intensa e relativamente rápida da absorvância (até praticamente zero) por volta de $t>60$ minutos, similar ao observado para baixas razões no sistema AIPcCl/F-127 (razão 0,1, por exemplo; Figura 35-a), sugerindo um elevado grau de auto-agregação da AIPcCl neste sistema. Adicionalmente podem ser observadas pequenas flutuações nas intensidades de absorção da AIPcCl para tempos longos ($t>500$ minutos, em diversas razões AIPcCl/copolímero nas Figuras 35-a e 35-b) que, apesar de relativamente pequenas, podem ainda indicar processos de reorganização entre diferentes formas auto-agregadas da AIPcCl ligada nos micro-ambientes existentes na micela polimérica.

A estabilização relativamente mais rápida do perfil cinético da AIPcCl/F-127 (Figura 35-a), juntamente com os resultados apresentados (estudos espectroscópicos) discutidos/relacionados com a interação da ftalocianina com as micelas poliméricas (isotermas de ligação e RLS), evidenciam a dependência desta interação FS-poloxâmero com a natureza/estrutura da micela polimérica formada pelo copolímero específico, ou seja, o F-127, que possui uma região interfacial relativamente maior e mais hidrofílica, formada pela organização dos grupos PEO na interface com a fase aquosa do sistema, estabilizando de uma forma relativamente mais rápida a AIPcCl num estado de maior grau de auto-agregação, em comparação ao poloxâmero com maior caráter hidrofóbico (P-123). Por sua vez, além do tamanho absoluto das micelas poliméricas, há de se considerar ainda que os dois copolímeros possuem número de agregação (número de unímeros do copolímero por micela) distintos a 25°C ($N_{ag/F-127}=67$ e $N_{ag/P-123}=87$ a 25°C ; Wanka et al, 1994), decorrentes de diferenças na TMC modulada pela estrutura química distinta entre ambos copolímeros (Figura 4). Este maior número de agregação do P-123 faz com que a micela apresente um micro-ambiente hidrofóbico relativamente maior neste copolímero comparativamente a micela de F-127, capaz de solubilizar o FS, justificando assim uma maior interação da AIPcCl neste copolímero. Os efeitos cinéticos observados na interação AIPcCl-copolímeros (Figura 35), reforçam a hipótese da existência de processos difusionais diretamente associados à interação de diferentes formas auto-organizadas da AIPcCl (e dependentes da razão $[AIPcCl]/[micela]$ e da $[micela]$) nos micro-ambientes de diferentes naturezas da micela polimérica.

4.3.1. Influência da temperatura nas propriedades de ligação da AIPcCl às micelas poliméricas de P-123 e F-127

Foram realizados estudos complementares das propriedades de interação da AIPcCl com os sistemas micelares copolímeros F-127 e P-123, através da observação do comportamento de suas respectivas isotermas de ligação, variando-se a temperatura dos sistemas em estudo, uma vez que é conhecida a dependência térmica da organização estrutural dos poloxâmeros em meio aquoso decorrentes de variações no número de agregação micelar (N_{ag}) (Alexandridis et al, 1993; Wanka et al, 1994). Por exemplo, o F-127 sofre uma alteração de seu número de agregação em meio aquoso, de 37 a 25°C, para aproximadamente 79 a 40°C. Para o P-123, este aumento no número de agregação varia de 86 a 25°C para 237 a 40°C (Wanka et al, 1994); portanto, o aumento foi de respectivamente cerca de 2 e 3 vezes para F-127 e P-123, nesta faixa de temperatura. Deve-se mencionar, que o aumento no número de agregação micelar para estes sistemas poliméricos com a elevação de temperatura, pode ser explicado por efeitos entrópicos no sistema modulados pelo processo de desenovelamento e reorganização estrutural das cadeias PEO e PPO dos unímeros do copolímero. Este desenovelamento, detectado inicialmente com o aumento da temperatura, faz com que os grupos PEO e PPO em diferentes proporções nos diferentes copolímeros fiquem expostos à solvatação por moléculas de água da solução, situação energeticamente desfavorável em contrapartida à formação da micela polimérica, onde os grupos PPO mais hidrofóbicos ficam “protegidos” desta solvatação, fazendo parte do “core” (núcleo) micelar. A tendência, deste modo, é a segregação destes grupos de micro-polaridades distintas, por sua vez formando-se as micelas poliméricas em meio aquoso, no geral, levando a um aumento da entropia do sistema, uma vez que estes grupos hidrofóbicos nas cadeias poliméricas ficariam mais protegidos das moléculas de água do que quando desenoveladas (Alexandridis et al, 1994; Guo et al, 2006; Errico et al, 2011).

Portanto, o aumento da temperatura faz com que se verifique um aumento no número de moléculas do copolímero na micela, aumentando-se desta forma o volume da mesma. Por outro lado, com a diminuição da temperatura, o número de agregação dos surfactantes poliméricos tende a diminuir e, conseqüentemente, o tamanho da micela polimérica também diminui até a temperatura micelar crítica (TMC). Portanto, abaixo da TMC, o copolímero se apresenta praticamente na forma unimérica em solução (Wanka et al, 1994; Roux et al, 2004; Nishiyama e Kataoka, 2006).

Desta forma, este estudo visa complementar a análise da influência da temperatura no perfil de interação AIPcCl-micela, resultante de alterações nas propriedades de auto-organização micelar como o N_{ag} , uma vez que as alterações no número de agregação dos copolímeros, por sua vez,

afetam diretamente o tamanho e o volume das micelas poliméricas podendo modular a interação fármaco-micela (Nishiyama e Kataoka, 2006).

As Figuras 36-a e 36-b apresentam o comportamento das isotermas da AIPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) em função da concentração F-127 e P-123 a 40°C , respectivamente, comparando-se com os resultados experimentais obtidos a 25°C estimados no tempo $t=0$ (espectros coletados imediatamente após a adição dos copolímeros, como já discutido previamente na Figura 28).

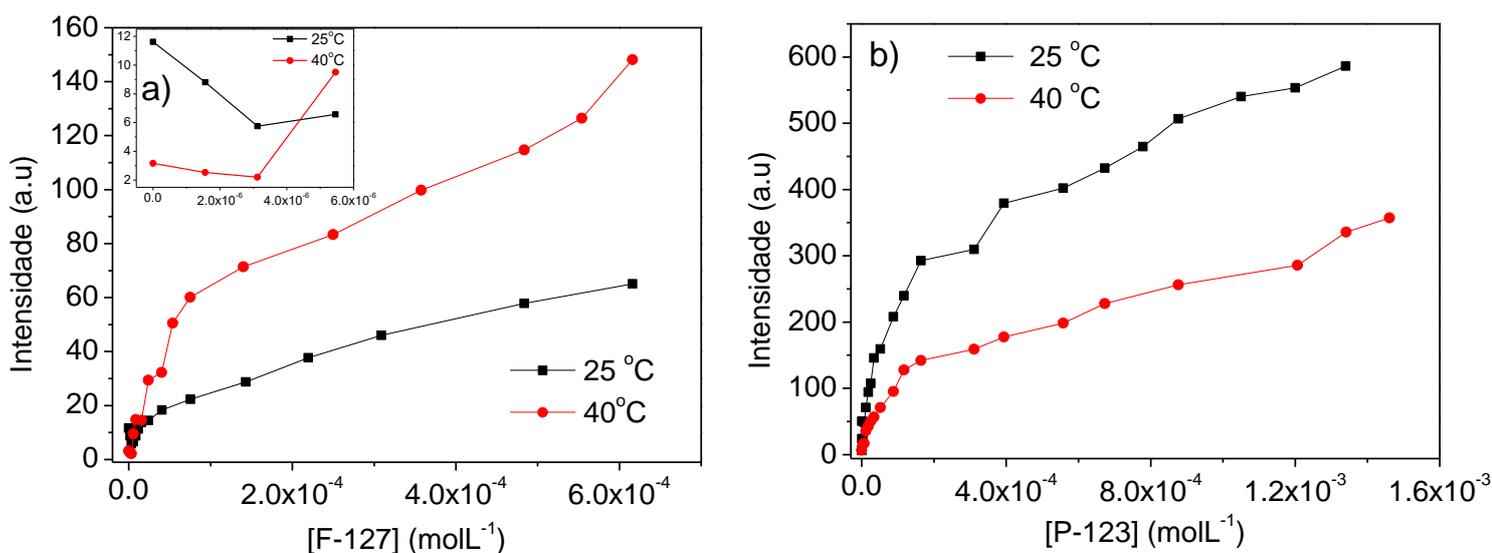


Figura 36. Isotermas de ligação da AIPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) na presença de diferentes concentrações de a) [F-127] e b) [P-123] obtidas a 40°C e 25°C ; $\text{pH} = 7,0$. No insert da Figura 36-a é apresentado o comportamento das isotermas a 25°C e a 40°C na região de baixas concentrações de F-127 ($< 6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$).

Primeiramente, pode ser observado que os perfis (forma) das isotermas envolvendo a interação AIPcCl/copolímeros com o aumento da temperatura para 40°C , ilustradas nas Figuras 36-a e 36-b, demonstram pequenas diferenças quando comparadas às isotermas obtidas a 25°C em cada sistema, diferindo principalmente na variação da intensidade de emissão com o aumento da temperatura para os dois tipos de copolímeros.

Para o sistema AIPcCl/F-127 em baixas concentrações deste copolímero a 25°C e a 40°C (insert da Figura 36-a), é observada inicialmente uma queda de pequena magnitude na intensidade de emissão da AIPcCl nestas condições, mais evidente a 25°C . Como já discutido previamente (seção 4.2), este resultado sugere um efeito primário de auto-agregação da AIPcCl observado na presença de baixas concentrações de copolímero (altas razões $[\text{AIPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$) (Pellosi, 2012).

No entanto, a partir das menores razões $[AlPcCl]/[F-127_{mic}]$ no sistema (adições subsequentes de copolímero), verifica-se através da isoterma a 40°C (Figura 36-a), que o aumento da temperatura favorece o aumento da intensidade de emissão de fluorescência da AlPcCl, indicando um possível efeito de desagregação da ftalocianina concomitantemente com a sua associação à micela polimérica reestruturada com o aumento da temperatura (Alexandridis, 1993). Este efeito também pode ser verificado através dos espectros de absorção eletrônica da AlPcCl para este caso (não mostrados), que apresentaram um pequeno aumento da absorvidade na região da banda Q_{III} da AlPcCl ($\lambda=677nm$) aliada a uma aparente diminuição da banda referente à auto-agregados ($\lambda=610 nm$) (similarmente ao observado na Figura 29-b, seção 4.2). Adicionalmente, os espectros de RLS para a AlPcCl em F-127 a 40°C (não mostrados) também indicaram (como anteriormente apresentada na Figura 31, seção 4.2) dois comportamentos distintos, onde nas mais baixas concentrações de F-127 ($<2,0 \times 10^{-4} molL^{-1}$) é observado um aumento na intensidade do sinal de espalhamento atribuído à presença de auto-agregados da AlPcCl, e posteriormente, nas concentrações maiores do copolímero, foi observada a diminuição deste sinal indicando um efeito posterior de desagregação do FS com a associação com um maior número de micelas.

Interessantemente, para o sistema AlPcCl/P-123 (Figura 36-b), as intensidades de emissão de fluorescência da AlPcCl em 40°C apresentaram um comportamento oposto ao observado para o sistema AlPcCl/F-127, ou seja, a intensidade de emissão da isoterma para o sistema AlPcCl/P-123 a 40°C foi menor comparativamente às intensidades obtidas a 25°C. Adicionalmente, os espectros de absorção eletrônica UV-Vis a 40°C para este sistema (não mostrados), apesar de serem semelhantes (em forma) aos obtidos a 25°C (Figura 29-b seção 4.3.2), característico de um composto auto-agregado, apresentaram uma diminuição adicional de cerca de 30% na intensidade, principalmente na absorvidade na região da banda Q_{III} da AlPcCl ($\lambda \sim 677nm$), evidenciando um aumento na auto-agregação da AlPcCl com o aumento da temperatura. Os espectros de RLS para este sistema, por sua vez, foram semelhantes aos obtidos a 25°C (Figura 30-a e 30-b, seção 4.3.2), apresentando aparentemente no mínimo dois efeitos no processo de associação AlPcCl/P-123, dependentes da concentração deste copolímero, diferenciando apenas na ausência da banda de emissão residual ($\lambda=680nm$), relativa a monômeros da AlPcCl (seção 4.1), também sugerindo este aumento da auto-agregação da AlPcCl na presença de P-123 com o aumento da temperatura.

Os efeitos observados são discutidos principalmente em termos da reorganização estrutural das micelas dos diferentes copolímeros modulando a interação do fotossensibilizador com o aumento da temperatura, bem como, com o mecanismo de associação da ftalocianina com estes sistemas no tempo $t=0$. Durante o relativo curto intervalo de tempo entre a adição do copolímero na

solução aquosa contendo AIPcCl (tempo $t=0$), este FS provavelmente está localizado na região que compreende o limite entre a cadeia PEO-água e PEO-PPO, ou seja, na região interfacial hidrofílica das micelas poliméricas ou até mesmo na própria região interfacial hidrofílica micelar (ver ítem 3.2), não havendo tempo suficiente para a estabilização do FS na região mais interna contendo os microdomínios mais hidrofóbicos formados pela reorganização das cadeias PPO nestas micelas. Por outro lado, considerando a reorganização estrutural dos dois tipos de copolímeros na sua forma micelar, o comprimento da cadeia PEO hidrofílica do P-123 é cerca de 5 vezes menor em comparação à do F-127, uma vez que o número de unidades repetitivas PEO no P-123 é de 20, enquanto no F-127 é 106, apesar dos distintos valores de N_{ag} numa determinada temperatura para os dois casos (Figura 4, seção 1.6; Wanka et al, 1994). Como consequência, isso faz com que o volume interfacial e a área superficial da corona hidrofílica da micela polimérica do F-127 sejam maiores neste copolímero em comparação ao P-123, apesar do aumento do número de agregação decorrente do aumento da temperatura ser maior neste copolímero mais hidrofóbico (aumento de 3 e 2 vezes para o P-123 e F-127, respectivamente), nesta faixa de temperatura. (Alexandridis et al, 1993), que torna o “core” hidrofóbico formado pelas cadeias PPO relativamente maior na micela de P-123 em comparação a de F-127.

Deste modo, o maior efeito de auto-agregação da AIPcCl no sistema AIPcCl/P-123, verificadas através do comportamento das isotermas a 40°C no tempo $t=0$, comparativamente a 25°C é provavelmente atribuído à uma distribuição das moléculas do fotossensibilizador em uma área superficial e volume menores na região da corona hidrofílica deste copolímero na sua forma micelar em relação a F-127.

De fato, nas menores concentrações de P-123 adicionadas, com razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]$ em torno de 15:1 (Wanka et al, 1994), há uma associação do composto inclusive na sua forma auto-agregada com a micela. Com o aumento da concentração de P-123, no entanto, a tendência é a ligação com redistribuição da AIPcCl nas micelas. No entanto, como o volume e a área superficial da mesma é relativamente menor em comparação à micela de F-127 nestas condições, seria observada uma menor desagregação do FS (Riess et al, 2003). Adicionalmente, devido a estas diferenças no tamanho e volume da corona hidrofílica dos dois copolímeros no estado micelizado, com o aumento da temperatura, é possível que as moléculas de AIPcCl estejam mais próximas entre si neste copolímero, favorecendo esta maior agregação. No F-127, por sua vez, as moléculas do FS teriam uma menor acessibilidade das moléculas de água, favorecendo a desagregação. De fato, como mostrado por Zhou e Chu através de estudos envolvendo espalhamento dinâmico de luz, investigando-se o microambiente e o processo de micelização de copolímeros, a cadeia PEO dos

poloxâmicos é normalmente hidratada por grandes quantidades de água, devido à ligação de hidrogênio entre o oxigênio dos grupos PEO e o hidrogênio das moléculas de água e também devido ao aprisionamento físico destas no microambiente micelar (Zhou e Chu, 1987; Alexandridis et al, 1994).

O estudo do processo de interação também foi realizado em 15°C, temperatura abaixo da TMC para ambos os copolímeros em toda faixa de concentração utilizada (Riess, 2003). Ou seja, nesta temperatura as moléculas do copolímero estão presentes em sua forma unimérica em solução (Nishiyama e Kataoka, 2006). As Figuras 37-a e 37-b apresentam a comparação entre as isotermas AIPcCl/F-127 e AIPcCl/P-123 obtidas a 25°C com o perfil de associação entre a AIPcCl e os copolímeros a 15°C (coletados no tempo zero, imediatamente após a adição dos copolímeros).

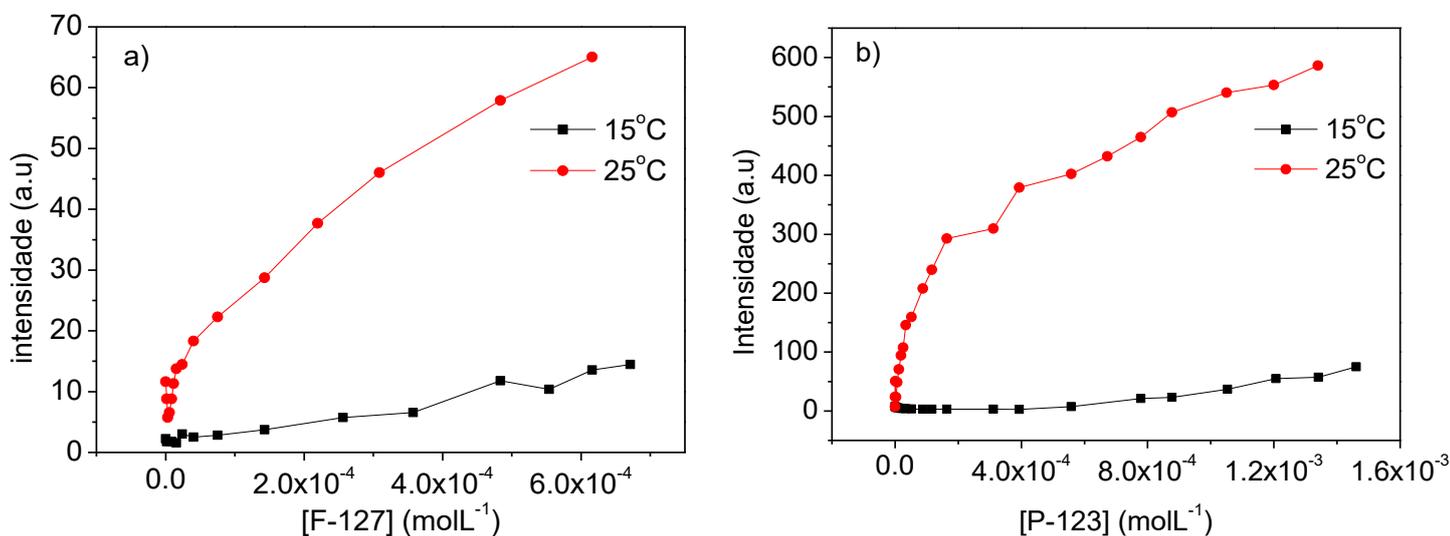


Figura 37. Isotermas de ligação da AIPcCl ($8,0 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$) na presença de diferentes concentrações de **a)** [F-127] e **b)** [P-123] obtidas ambas a 15 e 25°C, respectivamente; pH = 7,0.

Primeiramente, pode ser observado para o sistema AIPcCl/copolímeros obtidos a 15°C (Figuras 37-a e 37-b, para F-127 e P-123, respectivamente) que a variação da intensidade de emissão da ftalocianina em função da concentração dos copolímeros não representa um comportamento claro de uma isoterma de ligação ou similar, que mostram diferentes etapas de associação entre o FS e os copolímeros, dependentes da concentração dos mesmos (e/ou razão $[AIPcCl]/[copolímero_{mic}]$). Pode ser observado através do perfil de associação do sistema AIPcCl/poloxâmicos a 15°C, uma variação pequena de intensidade de emissão da AIPcCl com o aumento da concentração de ambos copolímeros, relacionada a uma ligação fraca entre a AIPcCl e

os unímeros dos copolímeros em solução nesta temperatura mais baixa, diferente do perfil de associação existente entre a AlPcCl e as micelas, uma vez que estas possuem micro-ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos definidos, possibilitando que o FS interaja mais significativamente. Também pode ser observado para o comportamento da AlPcCl/P-123 a 15°C (Figura 37-b), principalmente nas concentrações mais elevadas deste copolímero, que a intensidade de emissão deste sistema é cerca de 5 vezes maior do que a obtida nas maiores condições de concentração para o sistema AlPcCl/F-127. Este fato se deve a uma maior interação entre a AlPcCl e os unímeros do P-123, que possui mais domínios hidrofóbicos em relação ao F-127 (Chen et al, 2007).

Adicionalmente, os espectros de absorção da AlPcCl em ambos os copolímeros a 15°C (não mostrados), se mantiveram praticamente inalterados com o aumento da concentração dos copolímeros, apresentando um espectro típico da AlPcCl no seu estado auto-agregado (semelhante à Figura 29-a, seção 4.3.2). Adicionalmente os sinais de RLS da AlPcCl a 15°C (não mostrados) apresentaram o sinal de espalhamento referente à auto-agregados da AlPcCl ($\lambda \sim 400\text{nm}$) independentemente da concentração de ambos copolímeros. Estes resultados sugerem que durante a interação fraca da AlPcCl com os unímeros dos copolímeros F-127 e P-123 não se verifica alteração do estado de auto-agregação do FS nesta menor temperatura.

Portanto, estes efeitos distintos observados na análise do perfil de interação AlPcCl/copolímeros em temperaturas acima e abaixo da TMC, evidenciam a interação entre a AlPcCl e os copolímeros é modulada também por alterações na estrutura do copolímero em solução decorrente de variações na temperatura (Su et al, 2001).

Desta forma, uma vez conhecido o perfil de interação entre a AlPcCl e os copolímeros a diferentes temperaturas, através das isotermas de ligação, bem como os estudos relacionados à cinética de interação AlPcCl/copolímeros, prosseguiu-se com os estudos de preparação formulações da AlPcCl nestes copolímeros através de procedimentos de encapsulamento, que será discutida na próxima seção.

4.4. Encapsulamento da AlPcCl nos sistemas micro-heterogêneos constituídos de micelas poliméricas de P-123 e F-127: Estudos das propriedades físico-químicas

Os estudos físico-químicos prévios relacionados à ligação, envolvendo isotermas de ligação, e cinética de incorporação/auto-agregação entre a AlPcCl e os copolímeros (seção 4.3) forneceram subsídios para uma maior compreensão do processo de solubilização da AlPcCl nestes sistemas, bem como das propriedades físico-químicas dos formulados preparados. Os estudos prévios (seção 4.3) mostraram um perfil de interação complexo entre a AlPcCl e estes sistemas, provavelmente

envolvendo diferentes formas auto-agregadas, dependentes da concentração do copolímero no sistema, além de um efeito temporal de associação e estabilização do FS no sistema micelar copolimérico (ver seções 4.3.2 e 4.3.3). Desta forma prosseguiu-se com os estudos envolvendo inicialmente o encapsulamento da AIPcCl nestes copolímeros utilizando uma metodologia específica (Aparício, 2011), visando a solubilização da mesma numa forma preferencialmente desagregada nestes sistemas.

Primeiramente, tentou-se realizar adições diretas de AIPcCl ($3,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em soluções já preparadas de copolímeros (4% m/V; $3,1 \times 10^{-3}$ e $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ para F-127 e P-123, respectivamente, resultando em uma razão $[\text{AIPcCl}]/[\text{copolímero}_{\text{mic}}]$ de aproximadamente 0,1, ou seja, com a presença de 10 micelas de cada tipo de poloxâmero por molécula de AIPcCl (Wanka et al, 1994). No entanto, mesmo deixando o sistema submetido à agitação por até 10 horas a 60°C , não observou-se uma solubilização eficiente e homogênea da AIPcCl, incluindo-se a presença dos efeitos significativos de auto-agregação do fotossensibilizador, observados através da análise dos espectros de absorção eletrônica obtidos para estes formulados (não mostrados), mesmo nesta baixa razão $[\text{AIPcCl}]/[\text{copolímero}_{\text{mic}}]$. Desta forma, procedeu-se com a tentativa de solubilização da AIPcCl utilizando-se do método de dispersão sólida (seção 3.2.5.1; Zhang et al., 1996; Aparício, 2011). Os formulados obtidos através desta técnica algumas vezes mencionados neste trabalho como sistemas encapsulados ftalocianina-copolímero, mostraram que a AIPcCl foi solubilizada de uma forma mais homogênea, principalmente para um dos copolímeros como será discutido adiante.

Considerando a baixíssima solubilidade da AIPcCl em meio aquoso e sua deposição no fundo dos tubos de preparação, para a constatação da incorporação da AIPcCl nos copolímeros sem a existência de regiões de separação de fase, realizou-se a medida dos espectros de absorção eletrônica deste FS em soluções pertencentes às três regiões do tubo de ensaio (ver Figura 8; seção 3.2.5.1), para todos formulados preparados. Estes espectros (não apresentados) mostraram uma similaridade na forma e intensidade nas três regiões analisadas para um determinado formulado, evidenciando o encapsulamento da AIPcCl com o mesmo estado agregacional. As características macroscópicas do formulado, os perfis espectrais, bem como a estabilidade da AIPcCl nestes copolímeros serão discutidas nas próximas seções.

4.4.1. Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da AIPcCl encapsulada em micelas poliméricas de P-123 e F-127

Previamente aos estudos de solubilidade e/ou capacidade de incorporação da AIPcCl nas micelas poliméricas, fez-se necessária a determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da AIPcCl nestes copolímeros para quantificação nos estudos de solubilização, uma vez que estes dados não constam na literatura e, desta forma, não se tem certeza de sua variação em comparação aos valores de ϵ obtidos anteriormente em outros solventes (DMSO, acetona e etanol; seção 4.1). Para determinação do ϵ da AIPcCl encapsulada nos copolímeros P-123 e F-127, partiu-se para a incorporação do FS nos mesmos através do método de dispersão sólida (ver seção 3.2.5.1; Zhang et al., 1996; Aparício, 2011). Para isso, utilizou-se de uma massa pequena de fotossensibilizador (5×10^{-5} g), resultando em uma concentração final de AIPcCl de $3,5 \times 10^{-6}$ molL⁻¹ em P-123 4% ($7,0 \times 10^{-3}$ molL⁻¹) - solução com razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}] = 0,1$, portanto com aproximadamente 10 micelas de P-123 por molécula de AIPcCl, considerando o valor de $N_{ag} = 222$ a 30°C (Wanka et al., 1994). O fator determinante na escolha da concentração de AIPcCl foi a obtenção de uma amostra com uma menor razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]$ (maior número de micelas por molécula de AIPcCl) a fim de obter o composto desagregado, conforme verificado nos estudos prévios de cinética de incorporação (seção 4.2), que mostraram uma aparente maior estabilização da AIPcCl em P-123 quanto menor a razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]$, ou maior concentração deste copolímero (seção 4.2). Adicionalmente, a absorvância da AIPcCl na sua principal banda de absorção (Q_{III}) nesta concentração, possibilita a realização de diversas diluições no intervalo de absorvância aonde a Lei de Lambert Beer é mais confiável (0,8-0,2), diminuindo-se assim os erros experimentais associados à medida (Valeur, 2002).

Para a determinação do ϵ , utilizou-se do mesmo procedimento descrito em meio homogêneo (ver seção 4.1), efetuando-se diversas diluições a partir da solução inicial de AIPcCl encapsulada com uma solução aquosa de P-123 4% (m/V) ($7,0 \times 10^{-3}$ molL⁻¹). Os espectros de emissão de fluorescência e RLS também foram obtidos em cada diluição, a fim de se verificar a faixa de concentração na qual a AIPcCl estaria a princípio desagregada, como discutido anteriormente (seção 4.1). Na Figura 38 são apresentados os espectros de absorção eletrônica utilizados para a determinação dos principais valores de ϵ da AIPcCl encapsulada em P-123 através da Lei de Lambert Beer.

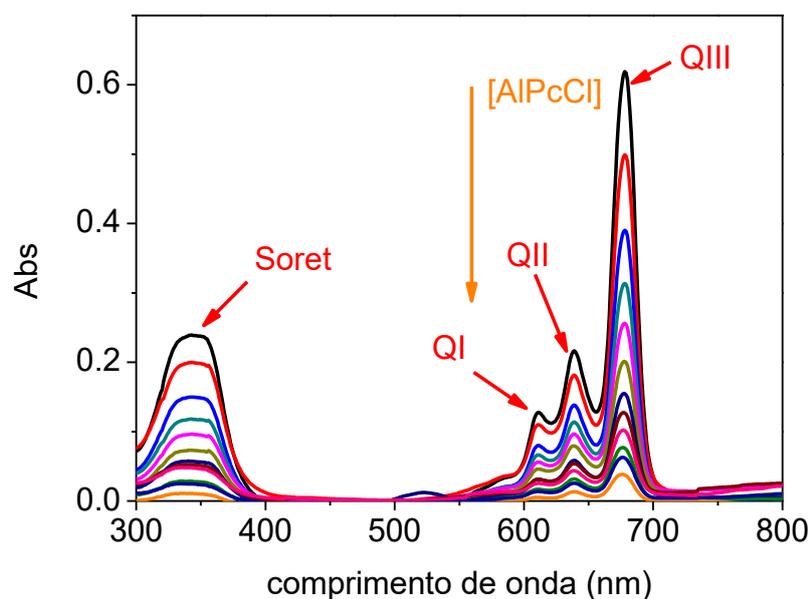


Figura 38. Espectros de absorção eletrônica de soluções obtidas por diluições da AlPcCl ($3,5\text{-}0,3 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 4% (m/V) ($7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), $T = 30^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 7,0$.

Observa-se primeiramente, através da análise da Figura 38, que houve o encapsulamento eficiente da AlPcCl na sua forma monomerizada nestas condições de baixa concentração de fotossensibilizador encapsulado (resultando em pequenas razões $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$), apresentando um espectro semelhante ao obtido em etanol (Figura 10; seção 4.1). Adicionalmente, pode ser verificado que não há mudanças significativas no perfil dos espectros de absorção da AlPcCl com a sua concentração. No entanto, constatou-se um deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção com relação aos espectros da AlPcCl obtidos em etanol para as principais bandas deste fotossensibilizador encapsulado (Figura 10, seção 4.1). A principal banda da AlPcCl no ambiente micelar (Q_{III}), por exemplo, sofreu um deslocamento batocrômico de 6 nm em comparação à em etanol ($\lambda_{\text{máxEtOH}}=672 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{máxP-123}}=678 \text{ nm}$). Nas outras bandas Q a tendência de deslocamento foi a mesma. Do mesmo modo, os espectros de emissão de fluorescência da AlPcCl encapsulada em P-123 também mostraram um deslocamento de aproximadamente 6 nm do comprimento de onda de máxima emissão em comparação ao etanol, como será discutido posteriormente.

O deslocamento batocrômico do comprimento de onda de máxima absorção de determinado cromóforo ocorre porque a energia entre os dois estados envolvidos nas transições $\pi \rightarrow \pi^*$, quando um cromóforo passa de um meio mais apolar para polar diminuem, sendo que a diminuição no estado π^* é mais acentuada, por interação mais significativa entre este estado e as moléculas do solvente (Silverstein et al, 1994; Novaki e Soud, 1997; Caetano, 2001; Damasceno, 2009). Isto sugere, portanto, que o micro-ambiente que a AlPcCl se encontra na micela polimérica de P-123 possui uma maior polaridade do que o observado em etanol.

Na Figura 39, por sua vez, estão apresentados os gráficos de intensidade de absorção *versus* concentração de AlPcCl utilizados para a determinação do valor de ϵ .

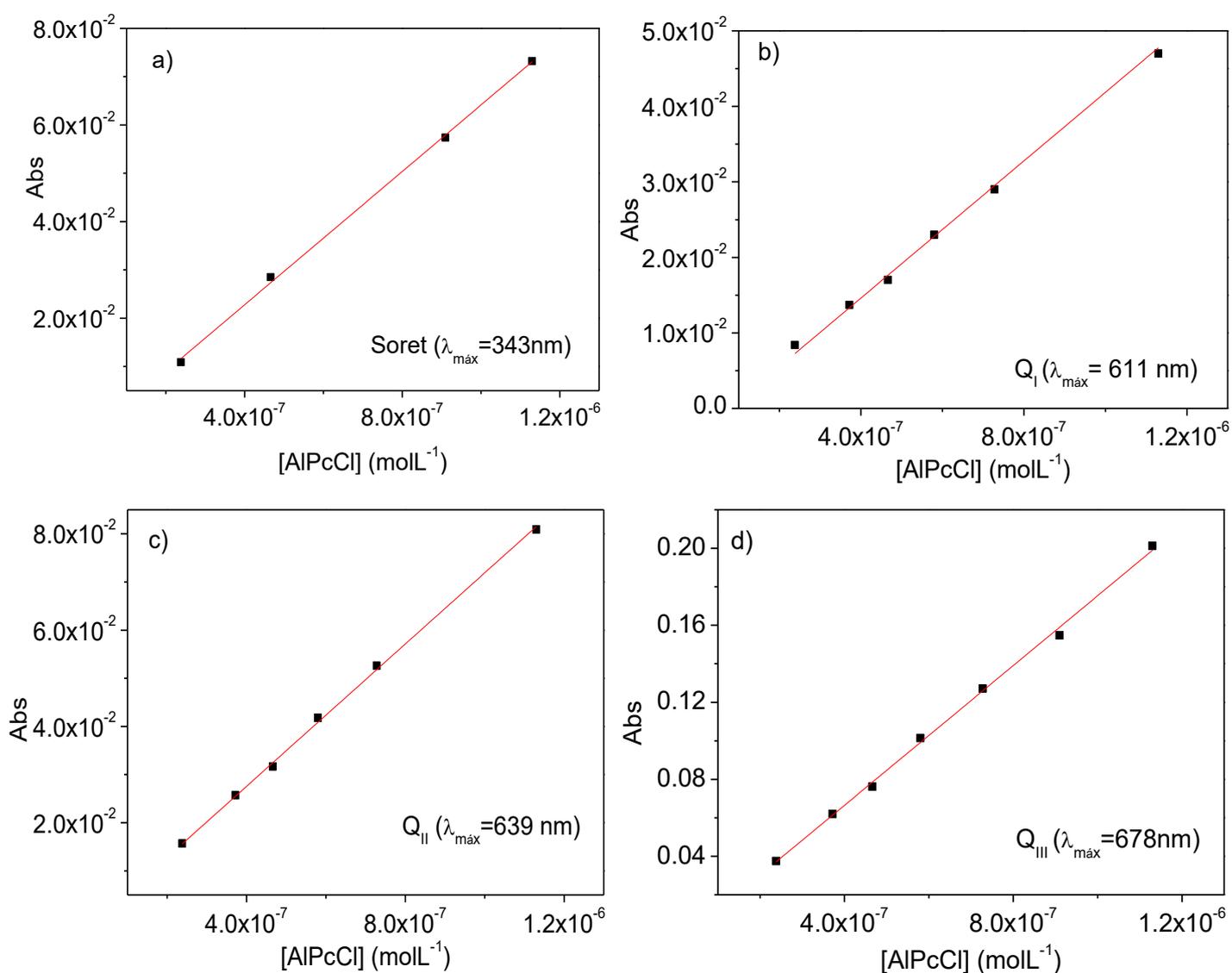


Figura 39. Gráficos de absorvância versus $[AlPcCl]$ para a banda Soret **a)** e bandas Q (**c-e**) da AlPcCl solubilizada no copolímero micelar P-123.

Os valores do coeficiente de absorvância molar (ϵ) da AIPcCl encapsulada foram obtidos através do coeficiente angular da reta do gráfico de absorvância *versus* concentração de AIPcCl, utilizando-se da Lei de Lambert Beer (equação 2; seção 3.2.1), respeitando-se a faixa de concentração onde o mesmo estaria aparentemente desagregado. Para delimitar essa região de concentração, utilizou-se complementarmente da técnica de fluorescência e RLS. Os espectros de emissão de fluorescência da AIPcCl encapsulada em P-123 em diferentes concentrações de AIPcCl, bem como os gráficos de intensidade de emissão *versus* [AIPcCl], monitorados no comprimento de onda de máxima emissão ($\lambda_{\text{máx}}=686\text{nm}$), estão apresentados na Figura 40.

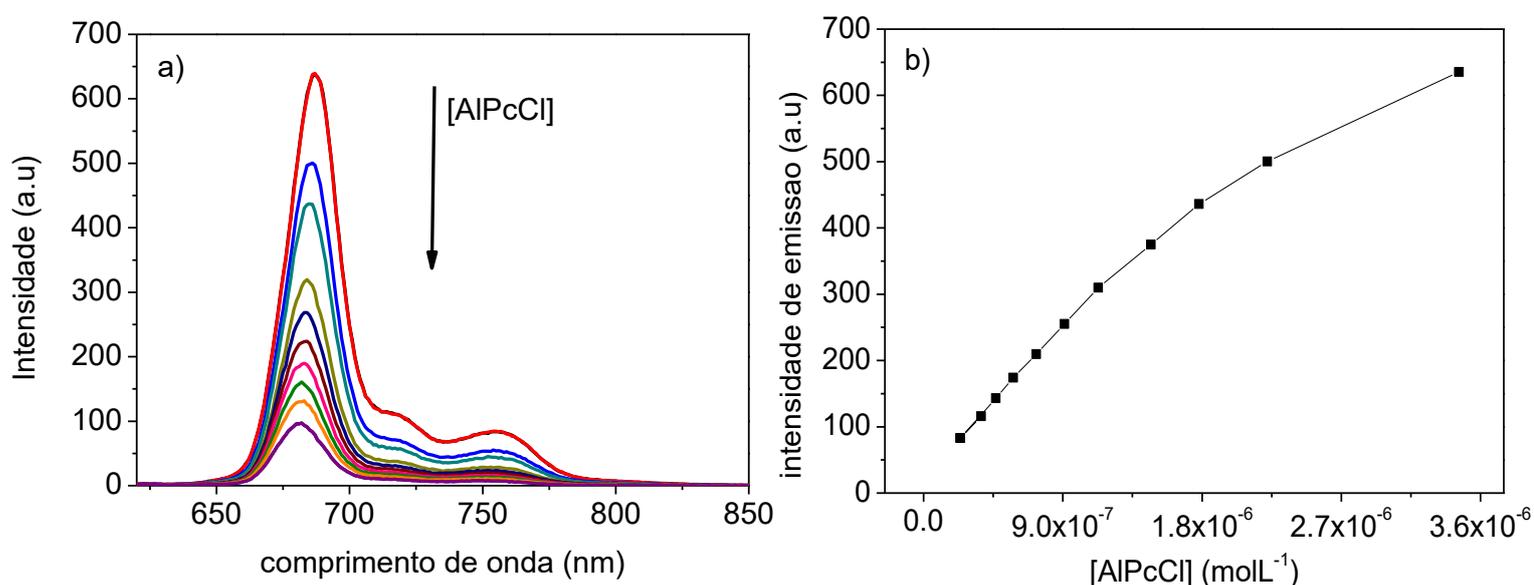


Figura 40. a) Espectros de emissão da AIPcCl (variando entre $3,5-0,3 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 4% (m/V) a 30 °C, pH = 7,0 e $\lambda_{\text{exc}}=604\text{nm}$. b) Gráfico da intensidade de emissão ($\lambda_{\text{máx}} = 686 \text{ nm}$) *versus* [AIPcCl].

Primeiramente, observa-se através dos espectros de emissão AIPcCl em diferentes concentrações de P-123, que o perfil espectral é semelhante ao observado para a AIPcCl monomerizada em etanol (Figura 10, seção 4.1), apenas com deslocamento de 6 nm do comprimento de onda de máximo de emissão em relação ao etanol ($\lambda_{\text{emEtOH}}=680\text{nm}$ e $\lambda_{\text{emP-123}}=686\text{nm}$), devido à mudança da micro-polaridade do meio (Lakowics et al, 1999). Adicionalmente, pode ser observado uma pequena mudança no comprimento de onda de máxima emissão da AIPcCl encapsulada em P-123, através das diluições consecutivas da solução inicial do copolímero ($\lambda_{\text{em}}=686\text{nm} \rightarrow \lambda_{\text{em}}=684\text{nm}$), provavelmente devido a uma reorganização estrutural das espécies inicialmente auto-agregadas do fotossensibilizador em concentrações maiores do mesmo.

Na Figura 40-b, por sua vez, verifica-se uma relação linear entre a intensidade de emissão e a concentração de AlPcCl até aproximadamente $1,2 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. A partir desta concentração têm-se o início do desvio desta linearidade que, como observado e discutido anteriormente na seção 4.1, indica a formação de auto-agregados da AlPcCl.

A presença de espécies auto-agregadas da AlPcCl em P-123 foi monitorada através da técnica de RLS, cujos espectros são apresentados na Figura 41 para as mesmas razões concentrações de AlPcCl da Figura 38.

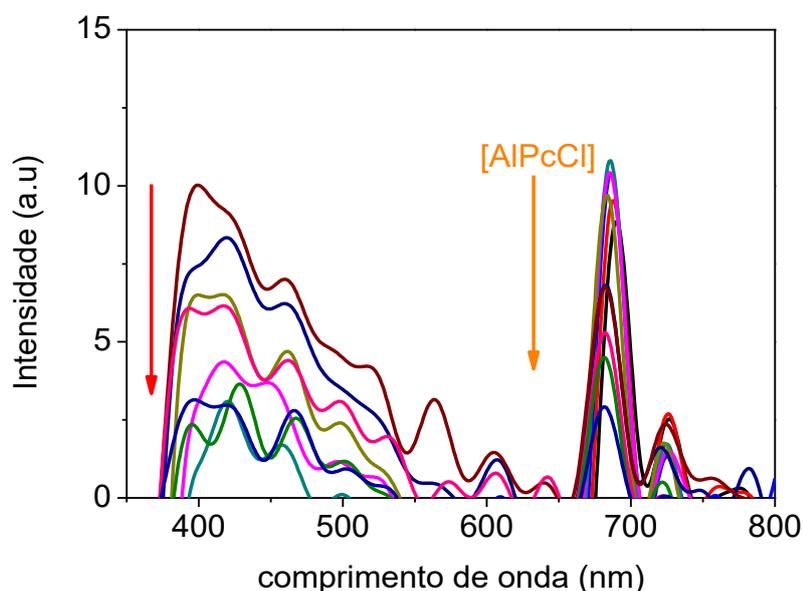


Figura 41. Espectros de RLS da AlPcCl ($0,3\text{-}3,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) incorporada em micelas poliméricas de P-123 obtidos através de diluições de uma solução estoque de AlPcCl em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$; e razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ inicial = 0,1) a 30°C , $\text{pH} = 7,0$ ($\Delta\lambda = 0$).

Através da análise dos sinais de RLS da AlPcCl em diferentes concentrações encapsulada em P-123, apresentados na Figura 41, primeiramente observa-se a presença de uma banda em $\lambda = 686 \text{ nm}$, atribuído à emissão residual da AlPcCl. Um sinal de espalhamento na região de 400 nm, anteriormente atribuído a espécies auto-agregadas de AlPcCl (ver seção 3.2.4), também pode ser observado, apesar da intensidade ser relativamente baixa. Este sinal diminui com a diluição da AlPcCl e desaparece em concentrações abaixo de $1,2 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, interessante na região de concentração a partir da qual há o início do desvio da relação linear entre a intensidade de emissão e a concentração da AlPcCl, detectados através da análise dos espectros de emissão de fluorescência (Figura 40-b), desta forma confirmando a região válida para a determinação de ϵ . Acredita-se,

portanto, que na faixa de concentração abaixo de $1,2 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ a AlPcCl estaria a princípio na forma monomérica, uma vez que os valores de ϵ foram obtidos abaixo desta região de concentração. Os valores de ϵ obtidos para a AlPcCl encapsulada em P-123, por sua vez, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficientes de absorvidade molar (ϵ) para as principais bandas de absorção da AlPcCl encapsulada em P-123 4% (m/V) a 30°C.

Banda	λ (nm)	ϵ ($10^5 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Soret	343	$0,7 \pm 0,1$
Q _I	611	$0,5 \pm 0,1$
Q _{II}	639	$0,7 \pm 0,1$
Q _{III}	678	$1,8 \pm 0,1$

Através da Tabela 6, pode ser observado que os valores de ϵ da AlPcCl encapsulada em P-123 são em média 10% menores que os obtidos em etanol em todas as bandas (ver seção 4.1), dentro das incertezas.

De modo semelhante ao realizado com a AlPcCl encapsulada em P-123, procedeu-se com a determinação do ϵ da AlPcCl encapsulada em F-127. A massa de AlPcCl utilizada para a incorporação foi de $5,0 \times 10^{-5} \text{ g}$, resultando em uma concentração final de AlPcCl de $3,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ levando a uma solução com razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}] = 0,05$, portanto com aproximadamente 20 micelas de F-127 por molécula de AlPcCl [considerando $N_{\text{ag}} = 67$ a 30°C; (Wanka et al, 1994)], ou seja, uma concentração de FS relativamente baixa com o objetivo de se ter certeza da incorporação total deste FS nas micelas poliméricas. Adicionalmente, pode ser observado que a razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{copolímero}_{\text{mic}}]$ utilizada no formulado da AlPcCl em F-127 ($[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}] = 0,05$) foi menor do que a do sistema utilizado em P-123 ($[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}]_{\text{mic}} = 0,1$), uma vez que a AlPcCl possui uma menor interação com este copolímero mais hidrofílico (F-127), como investigado anteriormente na seção 4.2).

A Figura 42 apresenta o espectro de absorção da AlPcCl encapsulada em F-127 em comparação ao obtido a etanol a 30°C.

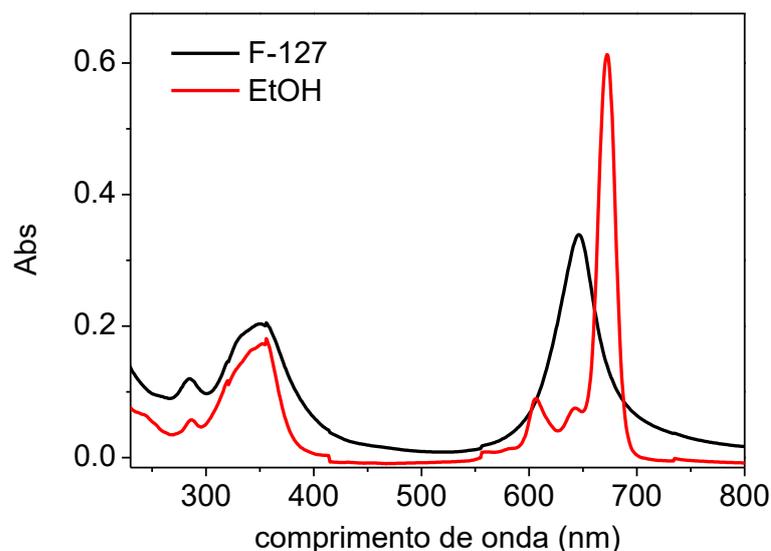


Figura 42. Espectros de absorção normalizadas da AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em etanol e AlPcCl ($3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em F-127 4% (m/V) ($3,2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) a 30°C , $\text{pH} = 7,0$.

Através da Figura 42, pode ser observado que o espectro de absorção da AlPcCl encapsulada em F-127 apresenta um pequeno aumento da linha base e, comparativamente ao espectro da AlPcCl em etanol, não se verifica a presença da principal banda Q da AlPcCl (Q_{III} , $\lambda_{\text{máxEtOH}} = 672 \text{ nm}$) bem como a Q_{II} e Q_{III} , referentes às transições vibracionais deste FS, que em etanol estão localizadas em 641 e em 606 nm, respectivamente (Figura 10; seção 4.1). Por sua vez verifica-se apenas a presença de uma única banda alargada com máximo em torno de 646 nm.

Também pode ser verificado na Figura 42 que o espectro de absorção da AlPcCl encapsulada em F-127 possui uma menor intensidade do que o obtido em etanol. Adicionalmente, deve ser mencionado que este perfil espectral permanece mesmo com as diluições com a solução de F-127 (branco) no experimento.

Estes resultados fornecem fortes indícios de que a AlPcCl se incorpora às micelas de F-127 num estado com maior auto-agregação, mesmo nesta baixa razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ (Lavorel, 1957; West e Pearce, 1965; Arbeloa e Ojeda 1992; Brown e col. 1976; Karns e col 1979; Micali e col; 1998 e Hioka e col. 2002). Outro fator que evidencia esta auto-agregação é a intensidade de emissão extremamente baixa (próxima a zero) da AlPcCl apresentada quando comparada a formulados deste FS encapsulada em P-123, uma vez que, como já discutido anteriormente, auto-agregados não emitem fluorescência, pois a energia dos seus estados excitados é suprimida (Margalit e col. 1983; Khairutdinov e Serpone, 1999 e Simplicio e col. 2004). Os sinais de RLS

para formulados da AlPcCl encapsulada em F-127 (não mostrados), por sua vez, também evidenciam esta auto-agregação, apresentando um intenso sinal elevado de espalhamento na região de 400 nm, quando comparados à Figura 41, atribuída à formas auto-agregadas deste FS.

Adicionalmente, o valor de ϵ obtido para a principal banda de absorção da AlPcCl neste copolímero mostrou-se extremamente menor ($\epsilon_{646\text{nm}} = 81 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) do que o obtido em etanol ou encapsulada em P-123 para a banda Q_{III} da AlPcCl [$\epsilon_{672\text{nm}} = 205 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em etanol (seção 4.1) e $\epsilon_{678\text{nm}} = 180 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em P-123] evidenciando a incorporação na forma auto-agregada neste copolímero. Esta auto-agregação pode fazer com que haja flutuações na intensidade de absorvância da AlPcCl, além de não se influir ao certo sobre seu estado de organização molecular, de modo que o valor de ϵ obtido neste sistema não pode ser utilizado para a quantificação do FS encapsulado neste sistema.

4.4.2. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) AlPcCl nas micelas poliméricas

Após a preparação e caracterização dos formulados da AlPcCl encapsulada nos copolímeros P-123 e F-127, partiu-se para a determinação do rendimento quântico de fluorescência da AlPcCl encapsulada nestes sistemas. O rendimento quântico de fluorescência é uma propriedade espectroscópica importante do estado singlete, que depende da interação entre o FS com o micro-ambiente micelar. Inclusive, tem-se mostrado em estudos envolvendo a interação de porfirinas com DNA e também com sistemas micelares usuais, que há um aumento no Φ_f com o aumento da concentração de micelas no meio, indicando um aumento da ligação das porfirinas nos sistemas estudados (Krieg, 1992; de Paoli et al, 2002; Chauke, 2008).

Devido ao fato já mencionado de que a AlPcCl incorpora-se em F-127 na sua forma auto-agregada, não foi possível a sua obtenção de Φ_f neste copolímero, uma vez que é conhecido que a auto-agregação diminui consideravelmente as propriedades fotofísicas dos FS, como o tempo de vida de emissão de fluorescência e o rendimento quântico de oxigênio singlete (Fakis et al, 2006). Inclusive, como mencionado anteriormente, os formulados da AlPcCl encapsulada em F-127 apresentaram espectros de emissão com intensidade extremamente baixa (próxima a zero), levando a acreditar que o rendimento quântico do FS neste sistema seja desprezível.

Para a determinação do Φ_f da AlPcCl em P-123, por sua vez, utilizou-se da metodologia descrita no item 3.2.5.2-b, utilizando-se da AlPcCl em etanol como padrão ($\Phi_f = 0,41$) (seção 4.1.2). A concentração da AlPcCl utilizada foi de $2,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ em P-123 8% (m/V) ($1,3 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$)

resultando em uma solução com razão $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$ de 0,04, portanto com aproximadamente 20 micelas poliméricas por molécula de AlPcCl, considerando $N_{ag}=222$ a 30°C (Wanka et al, 1994). Esta baixa concentração de AlPcCl e elevada concentração do copolímero foram utilizadas de modo a garantir a presença do FS totalmente monomerizado nestas condições.

O rendimento quântico de fluorescência obtido para a AlPcCl incorporada em micelas poliméricas de P-123 foi 0,43. Este valor se mostrou próximo ao obtido em etanol (0,41; seção 4.1.2) e maior do que o observado para a AlPcCl encapsulada em outros sistemas carregadores, como em β -ciclodextrina ($\Phi_f=0,38$) (Silva, 2010), hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β CD; $\Phi_f=0,10$) (Silva, 2010) e em lipossomos constituídos de fosfatidilcolina de ovo ($\Phi_f=0,35$) (Barbugli, 2010).

Adicionalmente partiu-se para a determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\phi_{^1O_2}$) da AlPcCl encapsulada em P-123 e F-127 utilizando-se da metodologia que envolve a foto-oxidação do AU via 1O_2 , descrita no item 3.2.3-b, porém esta determinação é complicada, devido a uma diferença de localização entre o oxigênio singlete e o ácido úrico. Esta diferença de localização ocorre porque o oxigênio singlete é formado internamente à micela após a foto excitação do FS encapsulado, enquanto o ácido úrico se localiza na região externa da mesma, ou seja, esta molécula não sofreria oxidação via 1O_2 , uma vez que não haveria encontro entre estas espécies. Adicionalmente, o curto tempo de vida do oxigênio singlete não permite que o mesmo alcance regiões externas à micela. Estes fatores resultariam em valores baixos ou até mesmo negativos do rendimento quântico de oxigênio singlete (Rabello et al 2012).

Também deve ser citado que o tempo de vida do 1O_2 e a distância até atingir o AU dependem diretamente da localização dos compostos na micela polimérica. Desta forma, devido à complexidade deste sistema solubilizador, é complicado se confiar em valores que possam ser utilizados como padrão para estas medidas (Rabello et al, 2012).

4.5. Características espectroscópicas e estabilidade da AlPcCl encapsulada nas micelas poliméricas de F-127 e P-123

Após a determinação dos valores de ϵ e do Φ_f da AlPcCl encapsulada em P-123, e das dificuldades encontradas na determinação destes valores em F-127 (item 4.4.1) - devido a um efeito maior de auto-agregação do FS verificado neste copolímero - prosseguiu-se com os estudos de

solubilização para se determinar as razões de máxima incorporação do fotossensibilizador com a concentração e o tipo de poloxâmero.

Deste modo, com o intuito de se obter informações acerca da solubilidade e possíveis informações sobre a estabilidade e mudanças na organização estrutural da AlPcCl e sua dependência com a razão $[AlPcCl]/[copolímero_{mic}]$ (ou concentração de copolímero), foram feitas incorporações de diversas concentrações molares do fotossensibilizador (com a massa variando entre 0,1 e 1,7 mg) nos formulados cujas concentrações de copolímeros variaram entre 0,39 – 6,8mM para F-127, e 0,86 – 13,2 mM para P-123 (equivalentes a 0,5,2,4 e 8%; m/V nos dois casos – Figuras 43 a 49), com o intuito de se avaliar a dependência da solubilização da AlPcCl decorrente do aumento da concentração dos mesmos (Zheng et al, 2009). Estas condições possibilitaram a obtenção de formulados com diferentes graus de incorporação da AlPcCl, resultando em diferentes razões $[AlPcCl]/[copolímero_{mic}]$, que variaram de $0,01 \times 10^{-2}$ a 5.0 considerando a princípio o número de agregação do F-127 e P-123 como sendo 67 e 222 a 30°C (Wanka et al, 1994).

4.5.1. Estudo espectroscópico da AlPcCl encapsulada nos copolímeros P-123 e F-127: dependência da estabilidade e grau de liberação com a razão $[AlPcCl]/[Copolímero_{mic}]$

Inicialmente, são apresentados nas Figuras 43-46 (página 92-95) os espectros de absorção eletrônica da AlPcCl encapsulada em P-123, os quais foram monitorados por vários dias em três formulados preparados com diferentes massas de FS e concentrações deste copolímero (diferentes razões $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$).

Primeiramente, pode ser observado que os formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 0,5% (Figura 43) apresentaram espectros com acentuado alargamento das principais bandas de absorção, bem como aumento da linha base. Por exemplo, na Figura 43-a não se observa as principais bandas de absorção da AlPcCl localizadas em 606,641 e 672 nm (bandas Q_I, Q_{II} e Q_{III} , respectivamente – Figura 10) verificadas em meio homogêneo.

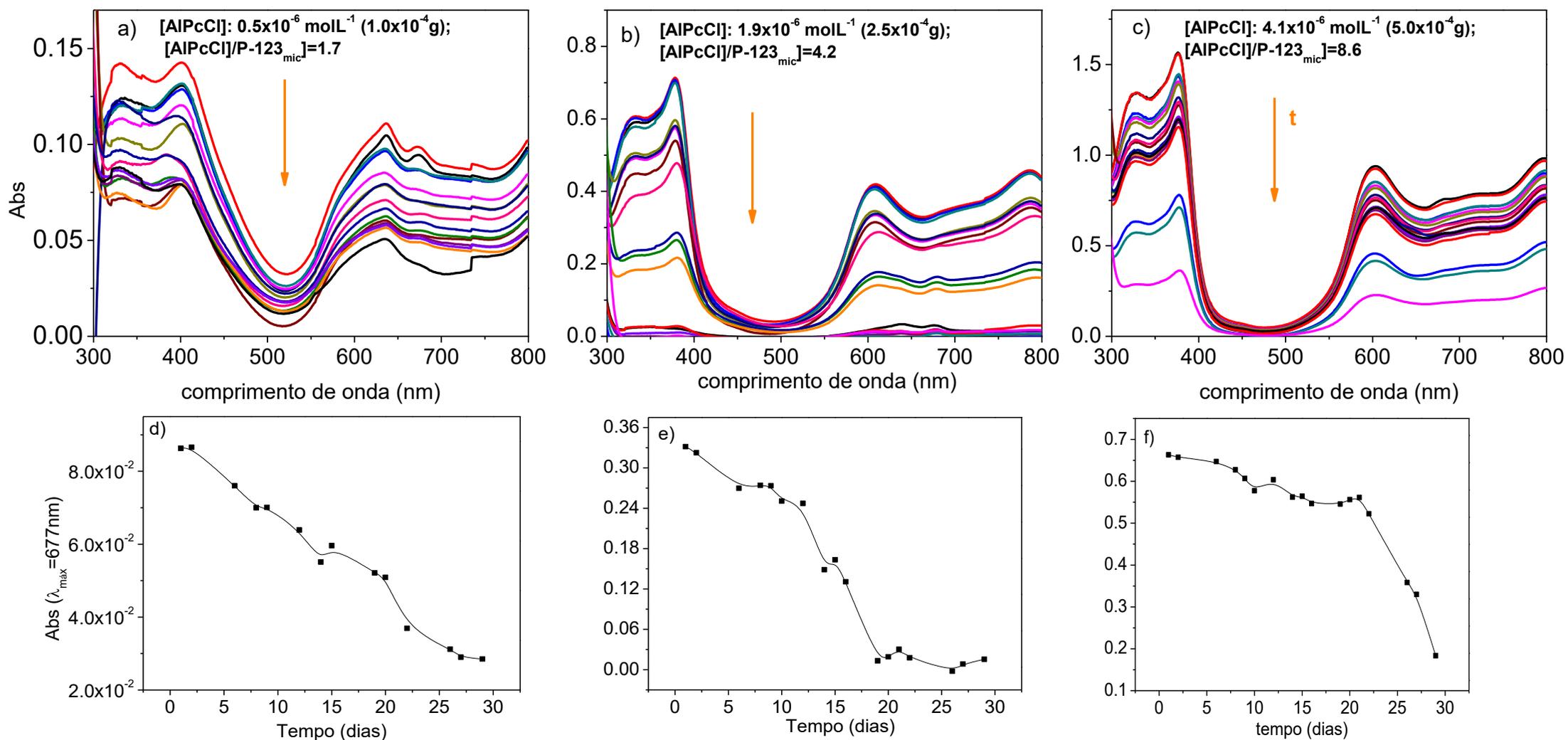


Figura 43. Espectros de absorção UV-Vis da AIPcCl em diferentes concentrações e razão [AIPcCl]/[P-123_{mic}] formulada em P-123 0,5% m/V ($8,6 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$), pH = 7,0. As Figuras 4d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AIPcCl monitorados na região da banda Q_{III} (677 nm). A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AIPcCl do interior da micela.

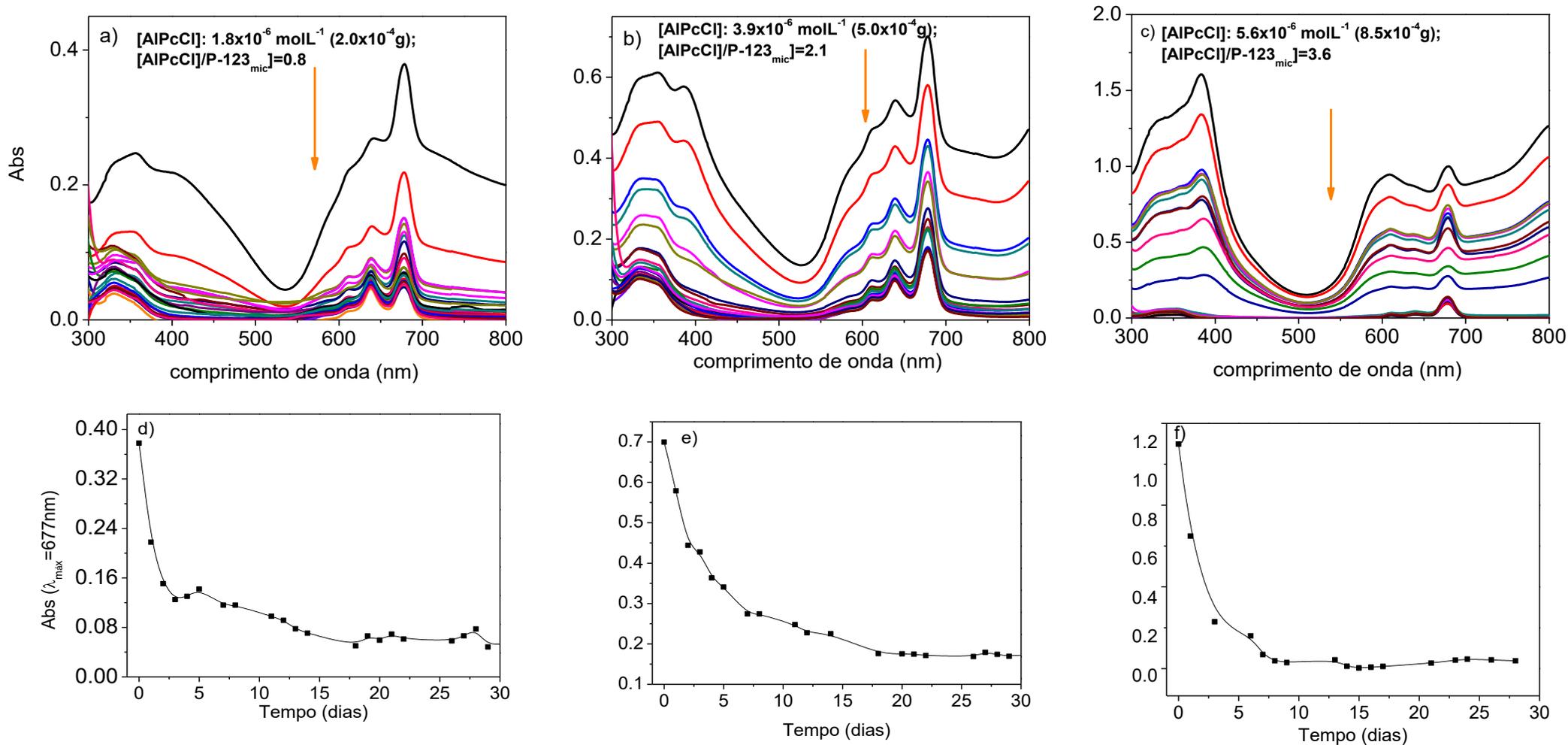


Figura 44. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$ incorporada em P-123 2% (m/V); $3,4 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, pH=7,0. As Figuras 44-d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados na região da banda Q_{III} (677nm). A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl do interior da micela.

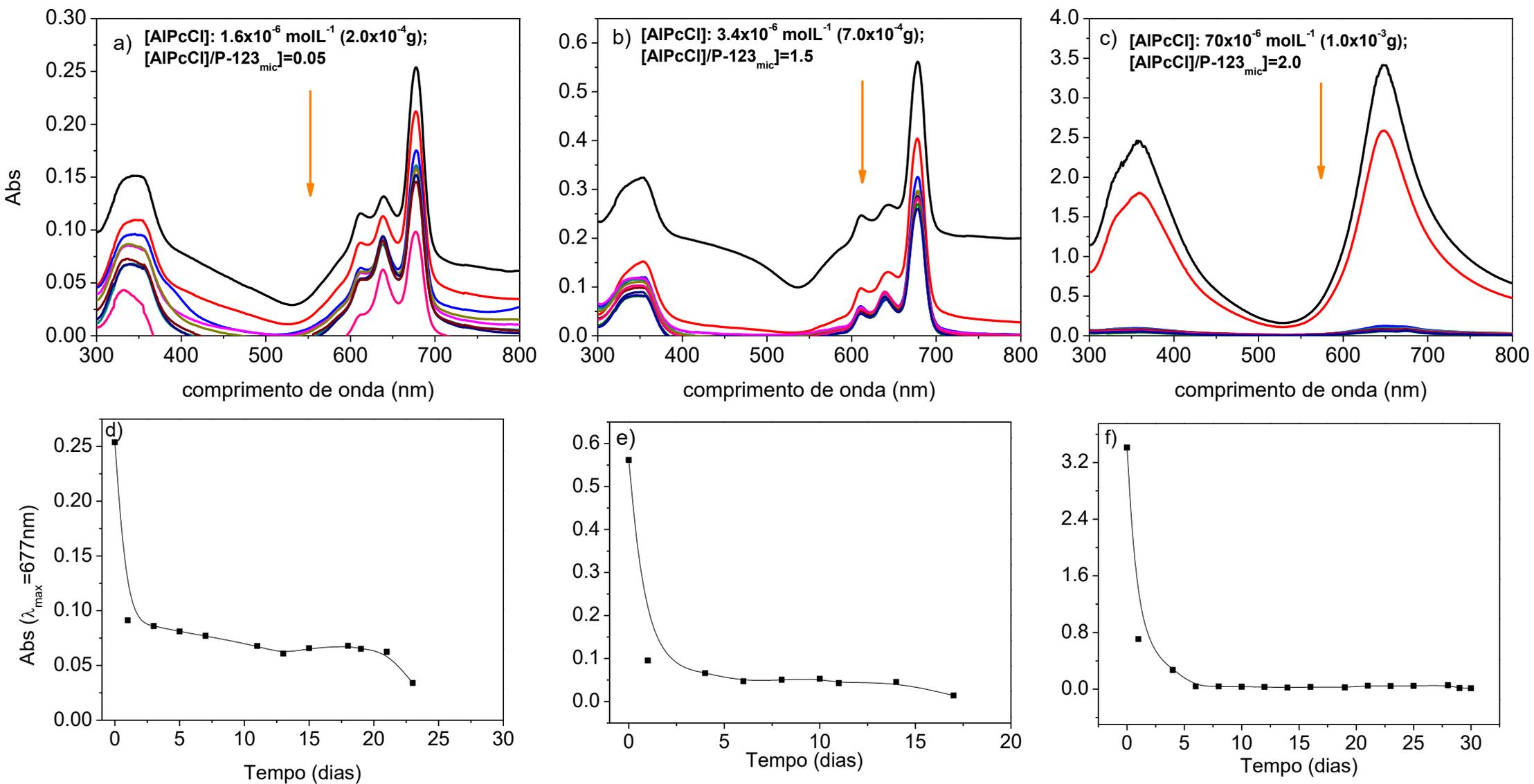


Figura 45. Espectros de absorção UV-Vis da AIPcCl em diferentes concentrações e razão [AIPcCl]/[P-123_{mic}] formulada em P-123 4% (m/V; $6,9 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), pH=7,0. As Figuras 45-d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AIPcCl monitorados na região da banda Q_{III} (677 nm). A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AIPcCl do interior da micela.

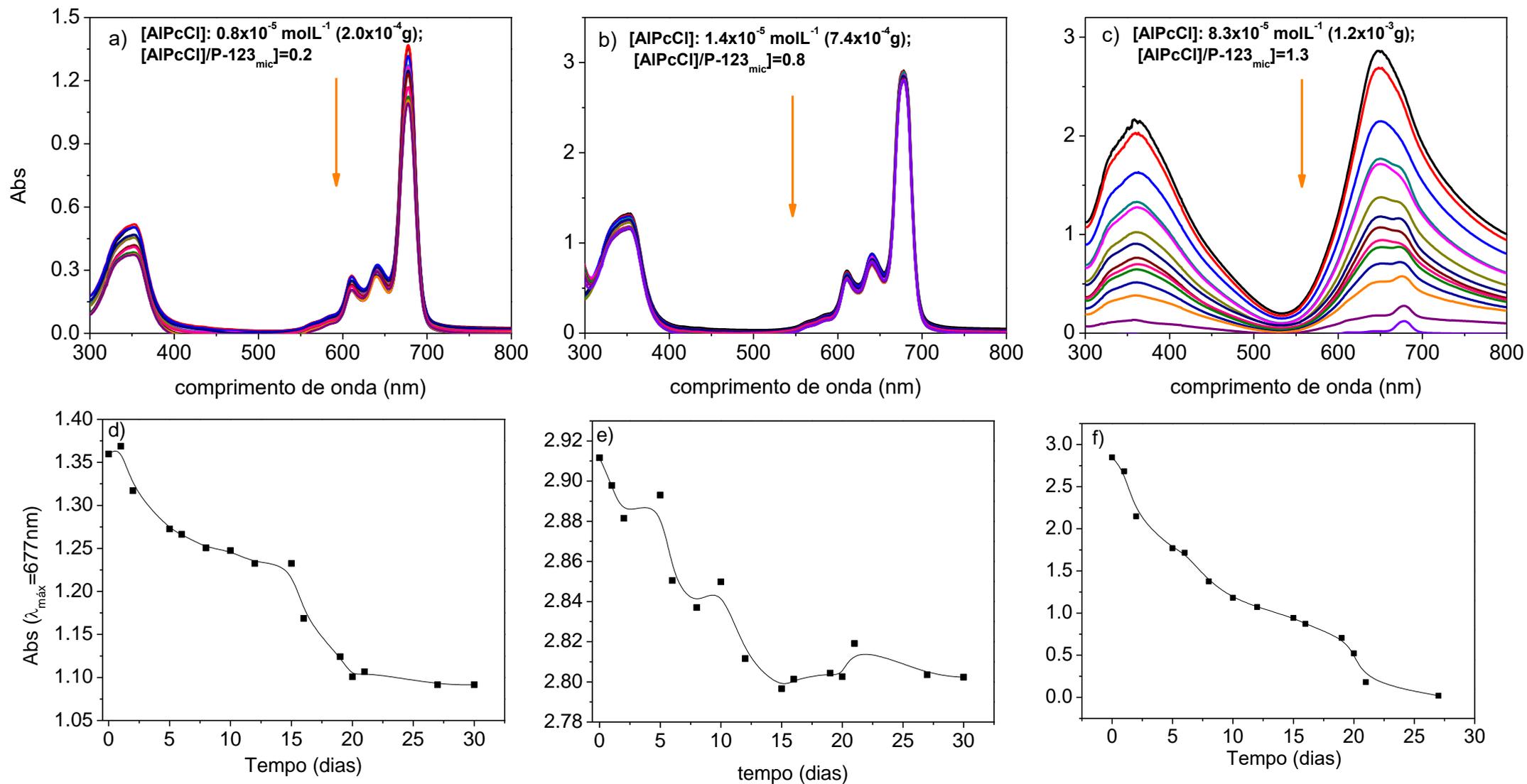


Figura 46. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$ formulada em P-123 8% (m/V; $1,4 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$), pH = 7,0. As Figuras 46 d-e apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados na região da banda Q_{III} (677 nm). A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl do interior da micela.

Por sua vez, verifica-se que os espectros de absorção eletrônica da AlPcCl encapsulada em P-123 de 0,5% apresentam apenas duas bandas alargadas com comprimento de onda máximo na região de 600-700nm. A banda Soret sofre uma distorção considerável, apresentando um pico de maior absorção por volta de 404 nm. Com o aumento na razão $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$ de 1,7 a 8,6 (Figura 43-a-c), os picos das bandas alargadas se deslocam para o azul em 350 e 590 nm, respectivamente.

Acompanhando-se o perfil da estabilidade da AlPcCl solubilizada nos formulados, por sua vez, verifica-se (Figura 43-d-f) uma variação da estabilidade do FS com o passar do tempo, também verificado através da diminuição da intensidade da absorção que tende a cair para zero entre 25-30 dias aproximadamente, sem mudança significativa no perfil espectral da AlPcCl. Esta variação temporal está relacionada com a liberação de diferentes tipos de auto-agregados de ftalocianina no meio aquoso, não sendo possível estabelecer uma correlação direta com modelos cinéticos usuais de liberação, como os de ordem zero, primeira e segunda ordem, modelo de Baker- Lonsdale (que comumente é utilizado como modelo de liberação de diversos tipos de drogas, principalmente em formulações a base de microcapsulas e micro-esferas), Higuchi (usado em sistemas que se utilizam de sistemas bio-transportadores de diferentes tamanhos e características, inclusive em formulados com micelas poliméricas) e etc (Dash et al, 2010). A falta de correlação deve-se provavelmente à complexidade estrutural destes agregados aliados às variações do ϵ dos mesmos durante a sua reorganização no “core” micelar e no meio aquoso, simultaneamente. No entanto é possível qualitativamente em cada caso, ao menos descrever relativamente os perfis (tendência) de liberação destes multi-agregados *versus* razão $[AlPcCl]/[copolímero_{mic}]$. Provavelmente, para obter-se informações complementares acerca do real perfil de liberação da AlPcCl encapsulada em P-123 seria necessário um estudo utilizando uma metodologia complementar, por exemplo, envolvendo cromatografia ou outra técnica, através de um método previamente validado.

Com o aumento da concentração de P-123 para 2% (Figura 44), por sua vez, observa-se, principalmente para as menores razões $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$, o aparecimento de um pico sobre uma banda mais alargada por volta de 680 nm. Com o decorrer do tempo, por sua vez, o perfil espectral da AlPcCl se torna semelhante ao verificado no estado monomérico, apresentando a banda Q_{III} e Q_{II} em 678 e 640 nm, respectivamente, bem como a banda Soret menos alargada em 353 nm, com uma recuperação mais visível da linha base (Figuras 44-a e 44-b). O perfil de variação da estabilidade curiosamente sofre uma mudança em comparação ao observado na Figura 43-d-f para os formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 0,5%, apresentando em 2% uma rápida diminuição da absorvância da AlPcCl até os 5 primeiros dias de monitoramento. Após este período é verificada uma

estabilização do sistema caracterizado por pequenas variações na absorvância, quando o perfil espectral da ftalocianina se assemelha ao estado monomérico (a partir de 10-15 dias em média).

Para os formulados da AlPcCl em P-123 4% (Figura 45-a e 45-b), verifica-se o aparecimento da banda adicional Q_I ($\lambda_{\text{máx}}=611\text{nm}$), anteriormente não evidente nos formulados contendo 0,5 e 2% deste copolímero (Figuras 43 e 44, respectivamente). A banda Soret, por outro lado, também se torna mais definida. Observando-se a variação da estabilidade destes formulados (Figuras 44-d e 44-e), pode ser observado uma liberação relativamente rápida da AlPcCl até os 2 primeiros dias, seguida por uma estabilização do sistema a partir de 5 dias.

Por sua vez, analisando-se os formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 8% (Figuras 46-a e 46-b), observa-se que o perfil espectral da AlPcCl apresenta características da espécie em um maior grau de desagregação nas duas menores concentrações de AlPcCl ($0,8$ e $1,4 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$), semelhante ao observado em etanol (Figura 10; seção 4.1). Ou seja, estes espectros mostram a intensa banda Q_{III} da AlPcCl em 678 nm bem como da Q_I , Q_{II} e Soret em 611 , 639 e 343 nm , respectivamente sem alargamento de banda ou aumento da linha base.

Adicionalmente, o perfil cinético de liberação dos formulados com a AlPcCl monomerizada em P-123 8% (Figura 46-d e 46-e, respectivamente) mostram um comportamento envolvendo pequena variação da absorvância com o passar dos dias (com queda de menos de 10% da absorvância inicial em 30 dias). De modo geral, observando-se a estabilidade para os formulados apresentados (Figura 46-d e 46-e) chega-se a conclusão que quanto mais monomerizada a AlPcCl estiver, o grau de liberação é menor e maior é a estabilidade da AlPcCl na forma monomerizada, uma vez que o custo energético para a estabilização dos multi-agregados de natureza hidrofóbica na região hidrofílica micelar é maior que na forma monomerizada. Para reforçar esta hipótese, verifica-se que no formulado da Figura 46-f, onde a AlPcCl se encontra em seu estado auto-agregado (razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]>1,5$), novamente a desestabilização envolve uma considerável variação da absorvância. De fato, embora nas Figuras 46-d e 46-e o perfil de liberação seja diferente da sequencia explicada anteriormente, na verdade a queda da absorvância da AlPcCl é ínfima (46-a e 46-b, respectivamente) mostrando que a AlPcCl se encontra mais estabilizada na forma monomerizada e a liberação da ftalocianina da micela polimérica ocorre em um menor grau que nas demais porcentagens de P-123.

Vale a pena mencionar, por sua vez, que a razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]<1,5$, no qual geralmente tem-se um perfil espectral mais semelhante ao da AlPcCl no estado monomerizado, é justamente quando se tem a maior probabilidade de se encontrar uma única molécula do FS por micela

polimérica. Acima desta condição, a probabilidade de se encontrar mais de uma molécula do FS por micela polimérica é maior, aumentando-se a probabilidade de auto-agregação, como representado pela Figura 47.

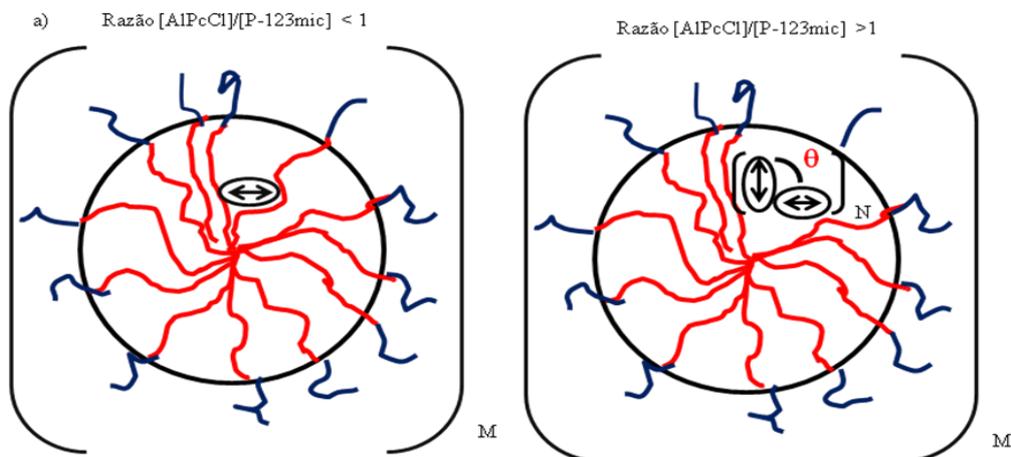


Figura 47. Representação esquemática da AlPcCl encapsulada em P-123 a 30°C. O número de monômeros da AlPcCl no micro ambiente micelar pode variar de 1 (AlPcCl desagregada) a $n > 1$ (AlPcCl encapsulada na forma auto-agregada: formação de dímeros, trímeros e etc). Na Figura há a representação apenas de auto-agregados diméricos.

Analizando-se novamente os perfis espectrais das Figuras 43 a 46, através das observações dos deslocamentos dos picos de máxima absorção da AlPcCl para menores comprimentos de onda nos formulados com menores concentrações de P-123 (Figura 43-a-c), verifica-se que os auto-agregados que são formados no sistema AlPcCl/P-123 podem ser do tipo H (ver Figura 21). Outro fator que indica claramente a presença de espécies auto-agregadas no meio em estudo é a presença de bandas alargadas (Karns et al, 1979; Sakibara et al, 2001; Liu et al, 2007). Com o aumento da concentração do copolímero, por sua vez há a desagregação da ftalocianina, principalmente evidenciada através da recuperação da forma das bandas originais da mesma na forma monomerizada.

Conseqüentemente, comparando-se o perfil espectral da AlPcCl em alguns formulados com razões $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$ semelhantes, mas com diferentes concentrações do copolímero, verificam-se diferentes perfis espectrais do FS. Por exemplo, os formulados da AlPcCl $1,8 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ em P-123 2% (Figura 44-a) e AlPcCl $1,4 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em P-123 8% (Figura 46-b) possuem a mesma razão $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$ (0,8), no entanto o espectro da ftalocianina encapsulada em 8% é mais definido e apresenta um menor grau de agregação. Fica claro, portanto, através da análise

destes resultados, que a concentração de P-123 modula a interação entre a AIPcCl e a micela polimérica formada por este copolímero, no qual para a razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}] < 1,5$.

Portanto, o aumento na desagregação da AIPcCl observado com a concentração de P-123 pode estar associado a um efeito de aumento do número de agregação dos surfactantes poliméricos com a sua concentração, fato anteriormente não levado em consideração neste trabalho. A literatura diverge consideravelmente em se tratando do efeito da concentração dos copolímeros no número de agregação dos mesmos, inclusive alguns autores defendem que N_{ag} não possui uma dependência com a concentração (Wanka et al, 1994 e Alexandridis e Hatton, 1995). Lam e Grigorieff, por sua vez, em estudos envolvendo a utilização de cálculos computacionais via simulação molecular através do programa Synthia, que se utiliza de correlações pré-definidas para avaliar propriedades de polímeros (como tamanho, disposição no espaço, bem como parâmetros termodinâmicos) mostraram que o N_{ag} do F-127, como um exemplo, aumenta cerca de 6 vezes na concentração de 10% (m/V) em comparação a concentrações menores que 5% ($N_{ag}=18$ para 5% e 108 para 10% de solução de F-127 - Lam et al, 1999; Shiraishi et al, 2010). Associado ao aumento do número de agregação também há um aumento de aproximadamente 2 vezes no “core” micelar (6,0 a 3% e 10,8 nm a 10% - Lam et al, 1999).

Ruthstein, utilizando-se da técnica espectroscópica Double Electron Electron Resonance (DEER), cujo principio básico da técnica envolve a medida da interação entre spins de elétrons a curta distância (1,5 a 7 nm), objetivando-se determinar algumas propriedades estruturais dos copolímeros como tamanho e número de agregação das micelas, também foi verificado o aumento do N_{ag} micelar com a concentração dos copolímeros. Por exemplo, um N_{ag} de 60 foi determinado para o P-123 a 3% ($5,7 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) e 128 a 6% ($1,0 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$), um aumento relativo de cerca de 2 vezes do N_{ag} com o aumento da concentração do copolímero. Para o F-127, por sua vez, o N_{ag} varia de 17 a 3% ($2,4 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) para 59 a 7,5% ($5,9 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$), um aumento portanto de 3,5 (Ruthstein, 2007). Ou seja, o aumento no N_{ag} micelar do F-127 com o aumento da concentração deste copolímero é maior em comparação ao P-123. Adicionalmente, estes estudos também mostraram um aumento do raio do “core” micelar do copolímero P-123 de 9,1 nm a 3% para 11,7 nm a 6%; Para o F-127, por sua vez, o raio do “core” micelar foi de 5,7 nm a 3% para 9,1nm a 7,5% (Ruthstein, 2007). Ou seja, um aumento relativo no raio do “core” micelar com o aumento da concentração de ambos copolímeros foi de cerca de 1,2 e 1,6% para o F-127 e P-123, respectivamente.

Portanto, o aumento da solubilidade da AIPcCl estaria também associado ao aumento do número de agregação do copolímero com a sua concentração, como esquematizado na Figura 47.

Esse fator contribui para o aumento da solubilização da AIPcCl nos micro-ambientes hidrofóbicos da micela polimérica.

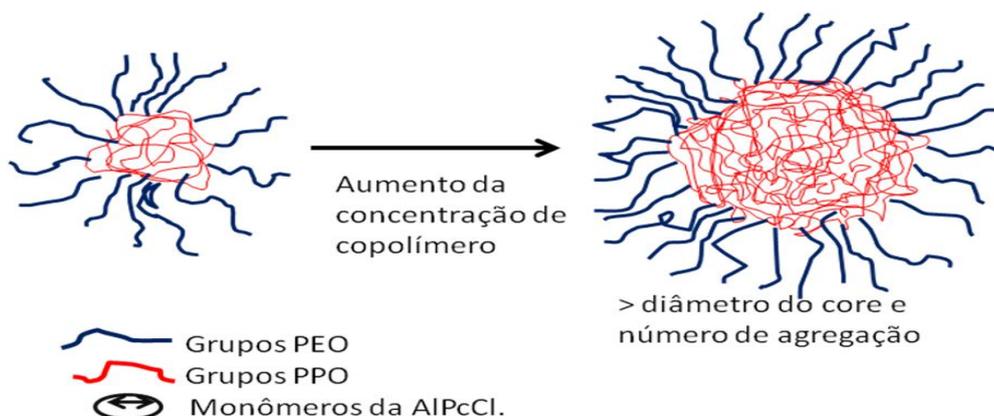


Figura 48. Representação esquemática do aumento do diâmetro do “core” e do número de agregação (N_{ag}) dos copolímeros com o aumento da concentração.

Nas Figuras 49-52 (página 101-104), por sua vez, são mostrados os espectros de absorção eletrônica de três formulados da AIPcCl encapsulada em F-127 preparados com diferentes massas de FS e copolímero com distintas razões $[AIPcCl]/[F-127_{mic}]$ como feito para o P-123 (visto anteriormente nas Figuras 43 a 46).

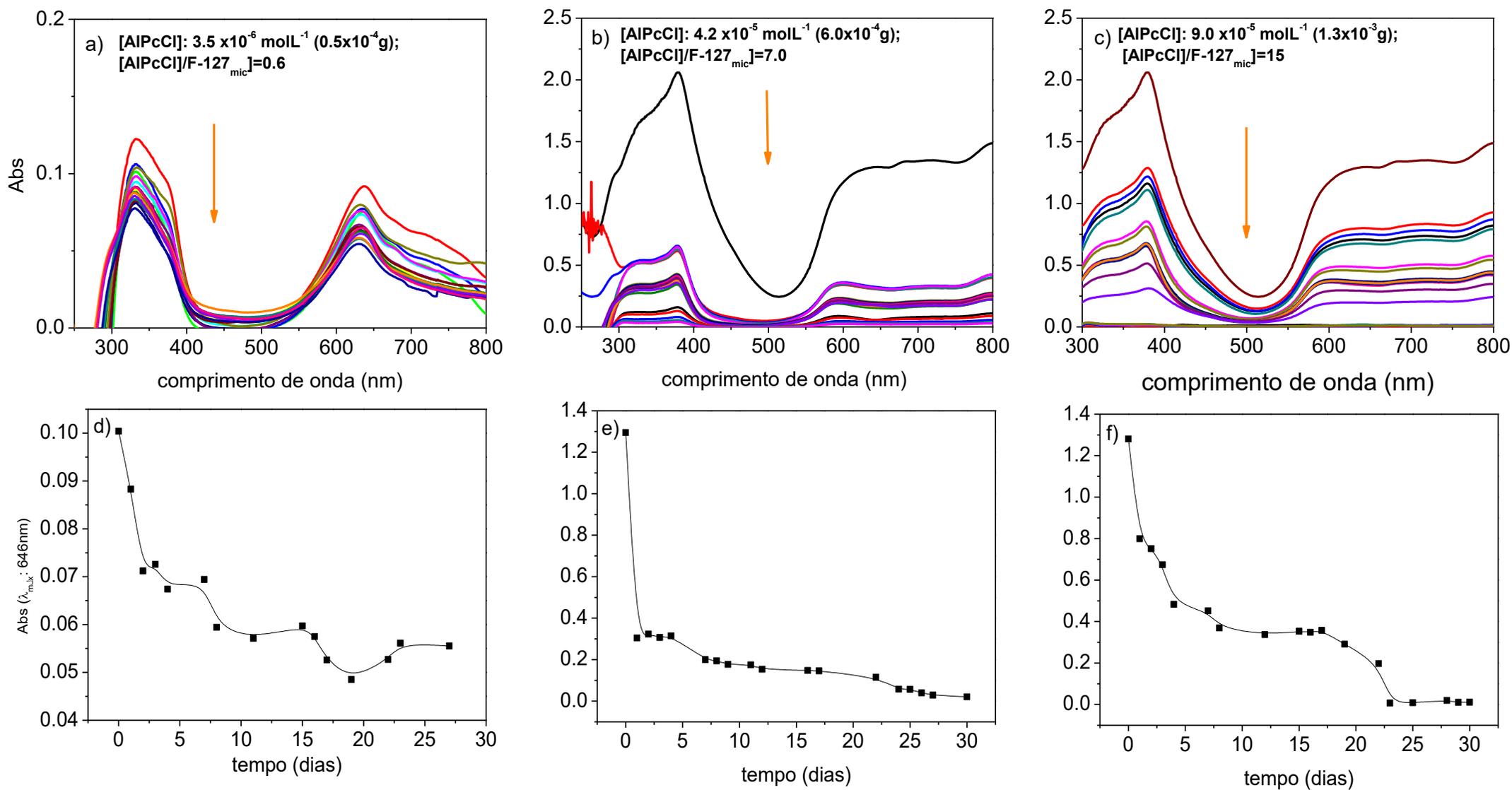


Figura 49. Espectros de absorção UV-Vis da AIPcCl em diferentes concentrações e razão $[AIPcCl]/[F-127_{mic}]$ encapsulada em F-127 0,5% (m/V; $3,9 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$), pH=7,0. As Figuras 49-d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AIPcCl monitorados pela variação da absorvância no comprimento de onda de 646 nm. A direção das setas indicam a diminuição da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AIPcCl da micela.

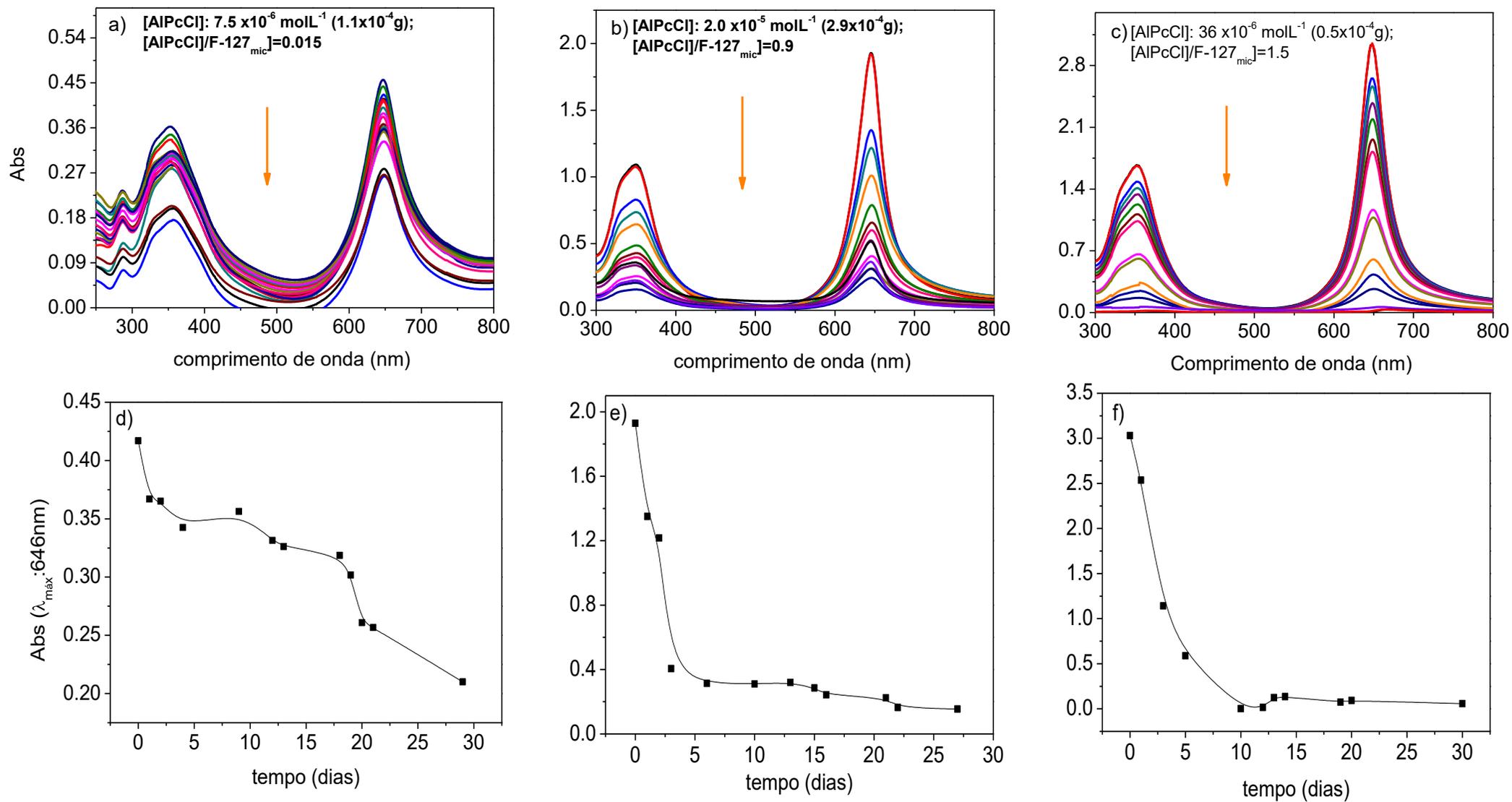


Figura 50. Espectros de absorção UV-Vis da AIPcCl em diferentes concentrações e razão $[AIPcCl]/[F-127_{mic}]$ encapsulada em F-127 2% (m/V); $1,6 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, pH=7.0. As Figuras 50 d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AIPcCl monitorados no comprimento de onda de 646 nm. A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AIPcCl da micela.

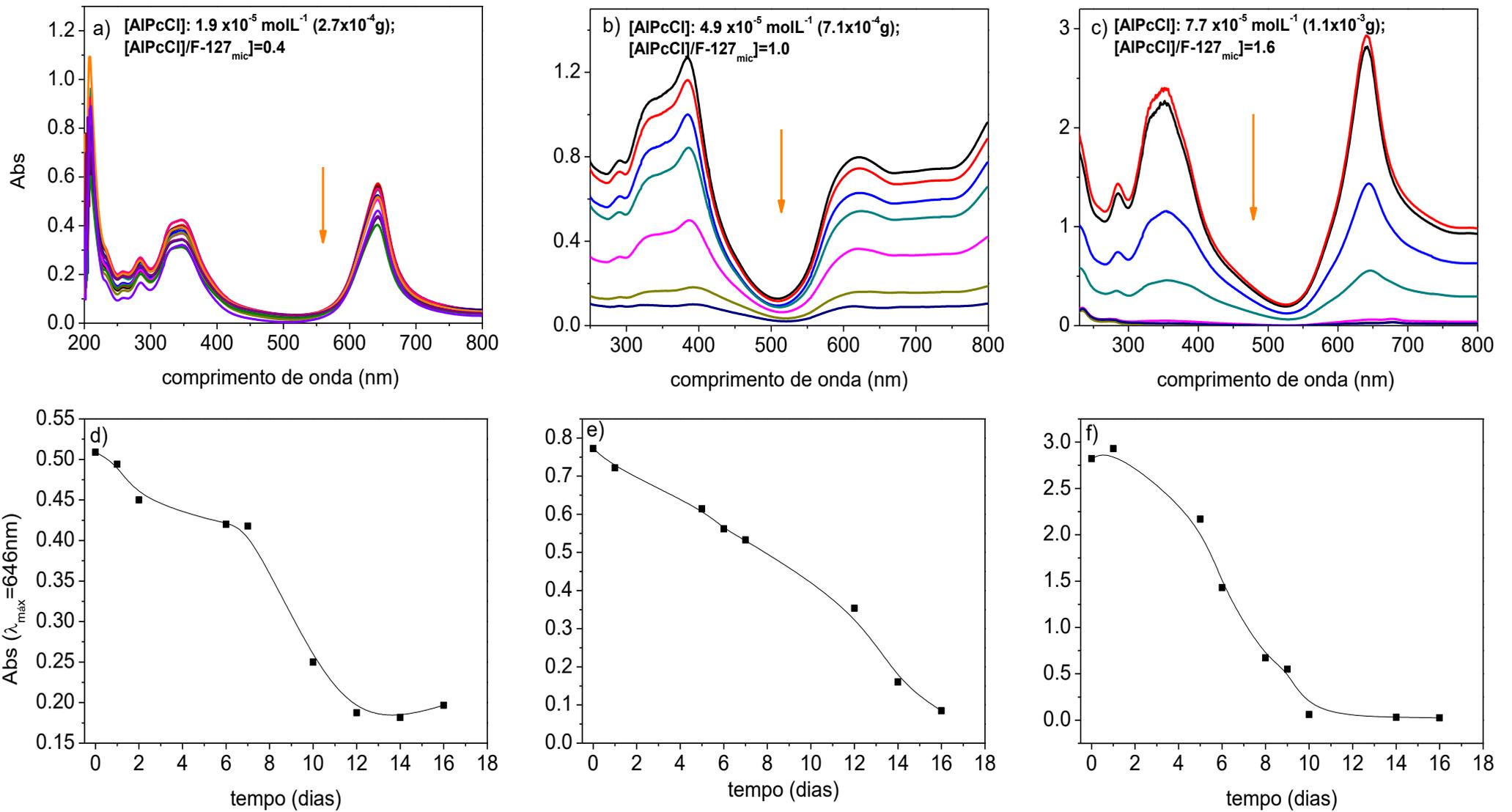


Figura 51. Espectros de absorção UV-Vis da AIPcCl em diferentes concentrações e razão [AIPcCl]/[F-127_{mic}] formulada em F-127 4% (m/V); $3,2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$, pH=7,0. As Figuras 51 d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AIPcCl monitorados no comprimento de onda de 646 nm. A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AIPcCl da micela.

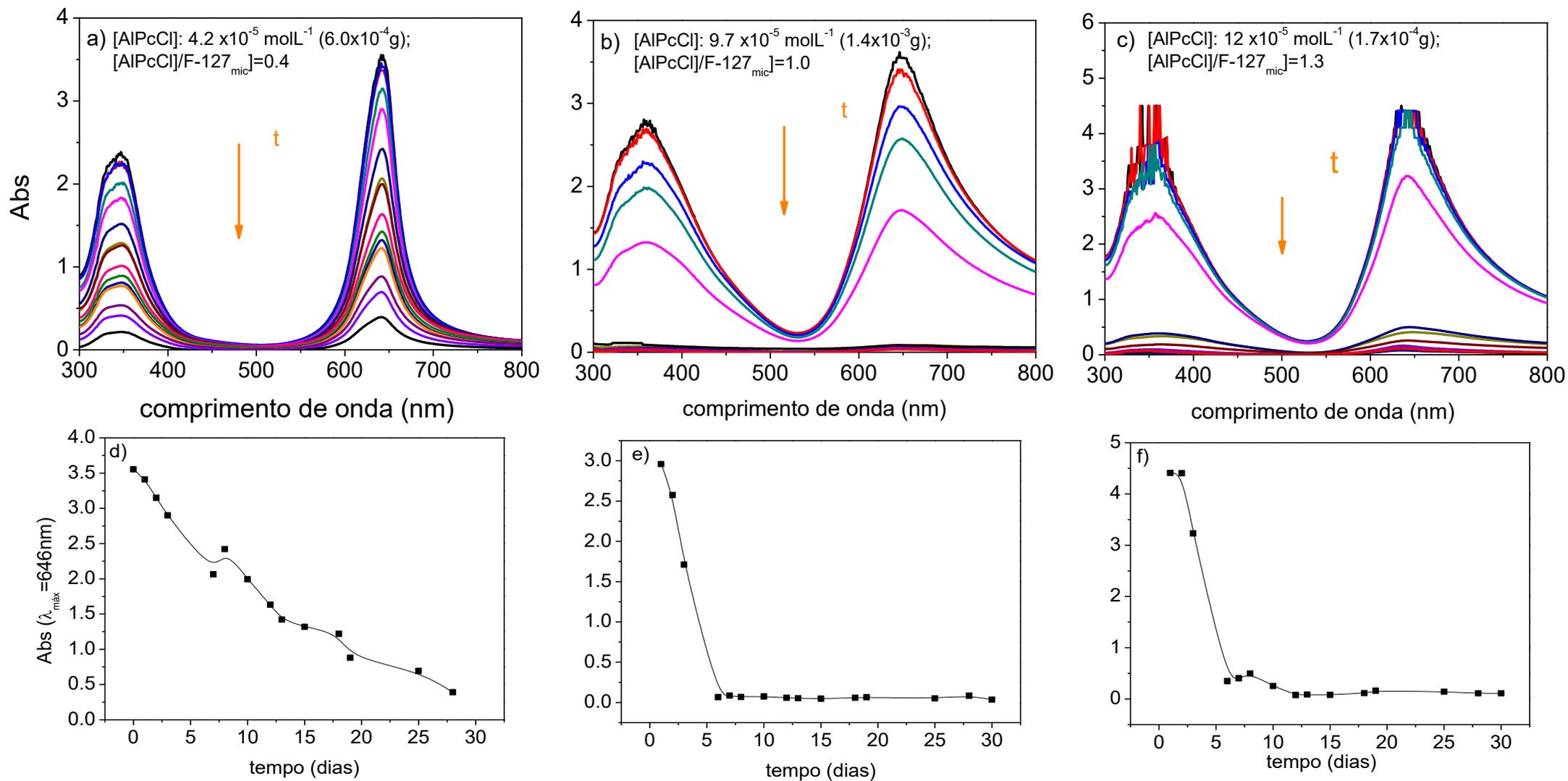


Figura 52. Espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl em diferentes concentrações e razão [AlPcCl]/[F-127_{mic}] formulada em F-127 8% (m/V); $6,3 \times 10^{-1} \text{ molL}^{-1}$, pH=7,0. As Figuras 52 d-f apresentam os perfis cinéticos de liberação da AlPcCl monitorados no comprimento de onda de 646 nm. A direção das setas indicam a queda da absorvância para os formulados com o decorrer do tempo, relativo à liberação da AlPcCl do interior da micela.

Pode ser observado, para todos os formulados da AlPcCl encapsulada em F-127 a ausência do perfil espectral relacionado à forma monomérica da AlPcCl (Figura 9, seção 4.1 em etanol e Figura 38 seção 4.4.1 encapsulada em P-123), indicando que este FS se incorpora na forma auto-agregada, independentemente da razão $[AlPcCl]/[F-127_{mic}]$ ou concentração deste copolímero.

Adicionalmente, da análise do perfil da estabilidade dos formulados da AlPcCl encapsulada em F-127 (abaixo dos espectros de absorção de cada formulado) verifica-se uma rápida liberação do FS com o tempo para todos os formulados, independentemente da concentração de copolímero. As curvas apresentadas mostraram, em média, uma diminuição total da absorvância em um período menor do que 5 dias. É conhecido que a velocidade de liberação de um fármaco do interior das micelas poliméricas é função, em grande parte, da sua localização na micela. Ou seja, quanto mais externamente o FS estiver localizado, a liberação é mais rápida, uma vez que a corona formada pela interface água-PEO na micela polimérica possui uma maior mobilidade (Parmar et al, 2013). Desta forma, com base na rápida liberação da AlPcCl em F-127 independentemente da concentração do mesmo, pode-se inferir que o FS provavelmente estaria interagindo nas regiões mais externas da corona hidrofílica nestas condições (Parmar et al, 2013). Isso também explicaria o ínfimo grau de liberação da AlPcCl nas condições em que a mesma estaria monomerizada em P-123, como visualizado anteriormente nas Figuras 46-d-f, onde provavelmente a AlPcCl estaria, neste caso, interagindo mais internamente na micela deste copolímero, talvez até mesmo no “core” hidrofóbico formado pelos grupos PPO na micela.

A auto-agregação da AlPcCl independentemente da concentração do F-127 utilizada, portanto, se deve à maior camada hidrofílica formada pelos grupos PEO deste copolímero. A ftalocianina não se incorpora desagregada neste copolímero mesmo nas maiores concentrações do mesmo (comportamento distinto do observado para o sistema AlPcCl/P-123), devido provavelmente a um maior aumento no N_{ag} deste em comparação ao P-123, com o aumento de sua concentração (Ruthstein, 2007). Como já citado anteriormente, o N_{ag} do F-127 a 7% é 3,5 vezes maior do que na concentração de 3%. No P-123, por sua vez, o aumento do N_{ag} nesta faixa de concentração é de 2 vezes (Ruthstein, 2007). Isso faz com que o volume e a área superficial da corona hidrofílica do F-127 sejam maiores que a do P-123, tanto pelo maior aumento no número de agregação em função da concentração, quanto pela maior quantidade de grupos PEO num unímero do F-127. Este maior volume e área superficial, por sua vez, explicariam a interação da AlPcCl na forma auto-agregada mesmo nas maiores concentrações deste copolímero. Outros resultados da literatura também mostram diferentes graus de solubilização de moléculas hidrofóbicas na comparação entre copolímeros com contituição química distinta. Por exemplo, Parmar e col em estudos envolvendo a

solubilização da Nimesulida em copolímeros com praticamente a mesma quantidade de unidades repetitivas PPO, porém com diferentes porcentagens de grupos PEO em sua estrutura (P-103, P-104 e P-105 com 30, 40 e 50% de PEO, respectivamente), mostraram que houve uma maior solubilização desta droga em P-103, copolímero com menor porcentagem de unidades hidrofílicas PEO (Parmar et al, 2013). Neste trabalho, verificou-se que a maior solubilidade da Nimesulida em P-103 estaria associada a uma menor área superficial e volume da cadeia hidrofílica deste copolímero, que possibilita uma interação maior da Nimesulida hidrofóbica nas regiões mais internas do “core” micelar (Parmar et al, 2013).

Interessantemente, a dependência da incorporação da AlPcCl desagregada em micelas de P-123 com a concentração e a razão $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$, bem como a associação majoritária de diferentes formas auto-agregadas) do FS em F-127, independentemente da concentração deste copolímero, estão de acordo com os resultados envolvendo os estudos prévios de ligação (isotermas de ligação e cinética de auto-agregação; seção 4.3.2 e 4.3.3). Por exemplo, os estudos envolvendo as isotermas de ligação da AlPcCl em P-123 (Figura 28-b) mostraram uma dependência da organização estrutural da AlPcCl com a concentração do copolímero, onde foi observado que quanto maior a concentração de micelas no sistema, maior a intensidade de emissão no tempo zero e menor foi a queda observada para esta intensidade em comparação ao tempo de equilíbrio (espectros medidos 48 horas após; Figura 32-b), aparentemente indicando uma maior desagregação e estabilização do FS na micela polimérica quanto maior a concentração de P-123.

Os estudos cinéticos de incorporação, por sua vez, evidenciaram a dependência temporal no processo de associação dos complexos auto-agregados com a concentração e o tipo de copolímero. Por exemplo, para o F-127, os resultados mostraram um menor efeito de desagregação do FS independentemente da concentração deste copolímero, em comparação ao copolímero P-123, durante o processo difusional da ftalocianina no “core” micelar até sua completa estabilização (seção 4.3.3).

Estes resultados, que mostram diferentes perfis de interação do FS com os copolímeros tanto nos estudos prévios de interação quanto nos estudos envolvendo AlPcCl encapsulada, reforçam a dependência da interação FS-copolímero com a natureza/estrutura da micela polimérica e razão $[AlPcCl]/[Copolímero_{mic}]$. Como já discutido, o P-123 é um copolímero que se auto-organiza apresentando uma região interfacial menos hidrofílica em comparação ao F-127. Além disso, o P-123 possui um número de agregação micelar 3 vezes maior em comparação ao F-127 nesta temperatura ($N_{agP-123} = 222$ e $N_{agF-127} = 67$ a $30^{\circ}C$ – Wanka et al, 1994) . Estes fatores combinados fazem com que o P-123 possua um micro-ambiente hidrofóbico relativamente maior, capaz de

estabilizar mais eficientemente a AlPcCl num estado organizacional majoritariamente monomerizada em comparação ao F-127.

A Figura 53, por sua vez, apresenta um gráfico da solubilidade média da AlPcCl monomerizada *versus* concentração de P-123 no sistema, visando-se obter os parâmetros relacionados à capacidade de solubilização da AlPcCl neste copolímero.

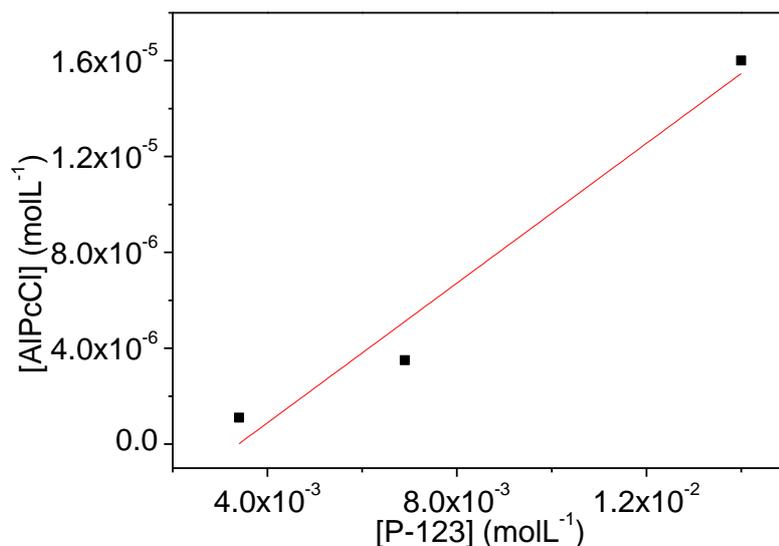


Figura 53. Gráfico de concentração máxima de AlPcCl incorporada na forma monomérica *versus* concentração de P-123, para a tentativa de determinação do coeficiente de solubilidade a 30°C (Aparício, 2011). Em vermelho encontra-se a reta obtida da tentativa de ajuste dos dados experimentais com a equação 8, objetivando-se determinar os parâmetros de solubilidade da AlPcCl neste copolímero.

Através do ajuste dos pontos experimentais da figura 53 por meio da equação 8, considerando que a solubilidade da AlPcCl monomerizada em água é praticamente zero, como observado anteriormente nos estudos em meio homogêneo água/etanol (seção 4.4.1), obteve-se um valor de constante de solubilidade da AlPcCl em P-123 como $0,00146n_{\text{AlPcCl}}/n_{\text{P-123}}$, o que fornece aproximadamente 1 molécula de AlPcCl por 684 moléculas do copolímero P-123. Considerando N_{ag} do P-123 como 222 a 25°C (Wanka et al., 1994), supõe-se que haja aproximadamente uma molécula de AlPcCl monomerizada por micela de P-123 no sistema. Este resultado é próximo ao determinado pelos estudos espectroscópicos que mostraram que em razões $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ menores que 1,5 haveria uma maior probabilidade da incorporação da AlPcCl desagregada neste copolímero. Mesmo assim, no entanto, tem de ser considerado o efeito claro do aumento do N_{ag} do P-123 com a sua

concentração, que faz com que haja um aumento na solubilidade da AIPcCl em maiores concentrações deste copolímero devido ao aumento no número de sítios hidrofóbicos capazes de solubilizar o FS na sua forma monomérica. Inclusive na figura 53 verifica-se uma maior solubilidade da AIPcCl na maior concentração de P-123 ($1,2 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$), promovendo até mesmo um aparente desvio da linearidade no gráfico da máxima concentração da AIPcCl monomerizada por concentração do P-123.

Por sua vez, apesar do sistema complexo observado na interação entre a AIPcCl e o P-123, os formulados obtidos nas condições citadas acima (baixas razões $[\text{AIPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ e maiores concentrações de P-123) se mostraram viáveis e, adicionalmente, apresentaram algumas vantagens frente a outros sistemas AIPcCl/micela polimérica encontrados na literatura. A maior concentração de AIPcCl ($2,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada na forma monomerizada em P-123 8%, como um exemplo, mostrou-se ser cerca de 6 vezes maior do que a quantidade máxima deste FS encapsulado em micelas poliméricas formadas de uma mistura de copolímeros pelo método de diálise (formado por N-isopropilacrilamida, ácido metacrílico e octadecil acrilato - Taillefer et al, 2000). Em outro trabalho, Leroux e colaboradores estudaram a incorporação da AIPcCl em micelas poliméricas sensíveis ao pH constituídas de N-iso-propilacrilamida (NIPAM) também pelo método de diálise. Estas micelas foram carregadas com 3% (m/V) de AIPcCl apresentando uma eficiência de encapsulamento de aproximadamente 60% (máximo de solubilização de $3,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$). O formulado obtido apresentou resultados satisfatórios contra células mamárias do rato (EMT-6), promovendo a inativação de cerca de 90% das células cancerígenas na concentração máxima de AIPcCl encapsulada quando da iluminação do tumor utilizando-se de uma lâmpada de Tungstênio/halogênio (Leroux et al, 2001), sem apresentar efeitos colaterais.

Estes resultados abrem caminho para o estudo envolvendo os efeitos da inativação fotodinâmica de microorganismos dos formulados da AIPcCl em P-123, como será discutido adiante.

4.6. Efeito da temperatura na agregação da AIPcCl encapsulada em P-123 e F-127: Estudos de absorção eletrônica

Devido às mudanças na organização estrutural dos copolímeros (Guo et al, 2006), as possíveis mudanças na organização do fotossensibilizador encapsulado em P-123 e F-127 também foram monitoradas em função de variações na temperatura. A dependência do processo agregacional da AIPcCl com a temperatura foi monitorado nos seguintes formulados em F-127:

AlPcCl $7,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em F-127 4% (razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ de 1,4) e AlPcCl $3,5 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em F-127 8% (razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ de 0,4). Em P-123: APcCl $3,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ em P-123 4% e AlPcCl $7,0 \times 10^{-6}$ em P-123 8% (ambos com razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ de 0,1, de modo que a AlPcCl estaria monomerizada em P-123 nestas condições) a 30°C . O experimento foi conduzido diminuindo-se a temperatura dos sistemas em estudo partindo-se de 30°C para 20°C e 13°C (temperatura esta abaixo da TMC de ambos copolímeros nestas concentrações, considerando $\text{TMC}_{\text{F-127}}=18,04^\circ\text{C}$ e $\text{TMC}_{\text{P-123}}=16,3$ a 4% (m/V) e $\text{TMC}_{\text{F-127}}=15,7$ e $\text{TMC}_{\text{P-123}}=14,8$ a 8% (m/V); Alexandridis et al., 1994), respectivamente. Em seguida, de modo a se verificar um possível efeito reversível após a diminuição da temperatura, aumentou-se a mesma novamente para 30°C .

Primeiramente, pode ser verificado na Figura 54-a, os espectros de absorção UV-Vis da AlPcCl ($7,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em F-127 4% ($3,2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$; razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ de 1,4, considerando o $N_{\text{ag}}=67$ em 30°C), após diminuições sucessivas da temperatura.

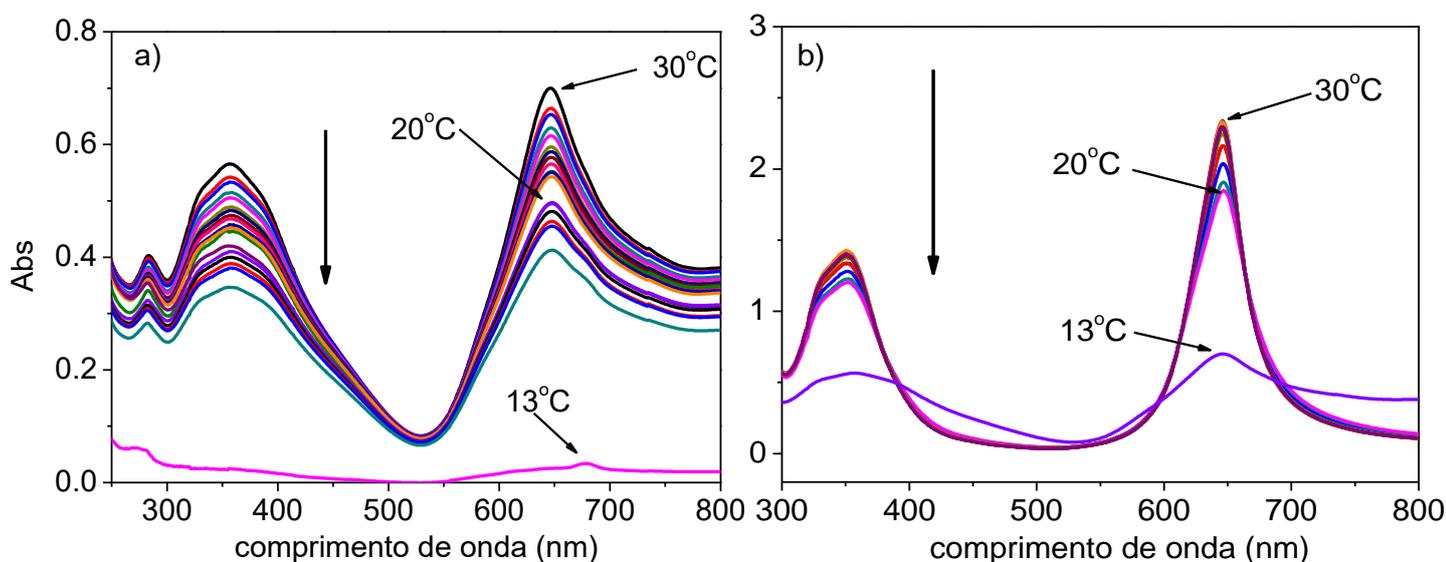


Figura 54. Variação do espectro de absorção eletrônica da a) AlPcCl ($7,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) em F-127 4% (m/V; $3,2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]=1,3$) e b) AlPcCl ($3,5 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) em F-127 8% (razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ de 0,4) em função da diminuição da temperatura de 30°C para 13°C , $\text{pH}=7,0$.

Verifica-se, através da análise da Figura 54-a que com a diminuição da temperatura do sistema de 30 para 20°C , a absorvância da AlPcCl já sofre uma diminuição sem alteração do perfil espectral, mesmo com a temperatura do sistema ainda estando acima da TMC deste copolímero ($\text{TMC}_{\text{F-127}}=18,04^\circ\text{C}$, Alexandridis et al., 1994), evidenciando o aumento da formação dos auto-agregados complexos da AlPcCl nesta razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ (1,4 moléculas de AlPcCl por

micela do copolímero), efeito aliado à redução do volume da micela através da diminuição da temperatura (Guo et al, 2006). Em 13°C, por sua vez, foi observada uma queda mais intensa da absorvância da AlPcCl, até a total variação espectral, caracterizada pelo desaparecimento da banda Soret em 353 e também da banda referente a auto-agregados em 646 nm (Figura 54-a). Os mesmos efeitos podem ser observados para os espectros de absorção do formulado da AlPcCl $3,5 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ em F-127 8% (razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ de 0,4, considerando o $N_{\text{ag}} = 67$ em 30°C - Figura 54-b). Ou seja, analisando-se a Figura 43-b verifica-se que mesmo para este formulado com menor razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$ (0,4) há uma considerável mudança no espectro da AlPcCl diminuindo-se a temperatura para 13°C.

Estes resultados entram em concordância com os obtidos através dos estudos envolvendo a estabilidade dos formulados da AlPcCl encapsulada em F-127, apresentados na seção 4.5, onde foi verificado uma rápida diminuição da absorvância da AlPcCl com o decorrer do tempo, independentemente da concentração de F-127 ou razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$. A instabilidade da AlPcCl neste copolímero estaria associada à rápida liberação deste FS, atribuída à interação do mesmo na região interfacial mais hidrofílica nas micelas deste copolímero. Portanto, estas consideráveis mudanças espectrais decorrentes da diminuição da temperatura para 13°C, independentemente da $[\text{AlPcCl}]/[\text{F-127}_{\text{mic}}]$, também estaria relacionada à interação da AlPcCl na região interfacial mais hidrofílica do copolímero F-127, região esta incapaz de manter o FS estabilizado.

Adicionalmente, é necessário mencionar que as mudanças espectrais dos formulados da AlPcCl em F-127 com a diminuição da temperatura estão relacionadas a uma mudança estrutural dos multi-agregados da AlPcCl, inclusive levando-se à formação de precipitados, observados visualmente. Após a precipitação do FS, o retorno da temperatura dos sistemas até 30°C não fez com que os multi-agregados do FS remanescentes no “core” micelar restaurassem, mostrando que o processo foi irreversível para estes casos. O processo de total mudança espectral dos formulados da Figura 54-a e 54-b com a diminuição da temperatura foi considerado lento, sendo necessário cerca de 9 horas para atingir o equilíbrio.

De modo similar ao procedimento realizado em F-127, partiu-se à análise do perfil da AlPcCl formulada em P-123 em função a diminuição da temperatura. Os espectros UV-Vis da AlPcCl ($3,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$; razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] = 0,1$, considerando $N_{\text{ag}} = 222$ a 30°C (Wanka et al, 1994), em função de variações na temperatura do sistema de 30 para 13°C estão apresentados na Figura 55-a.

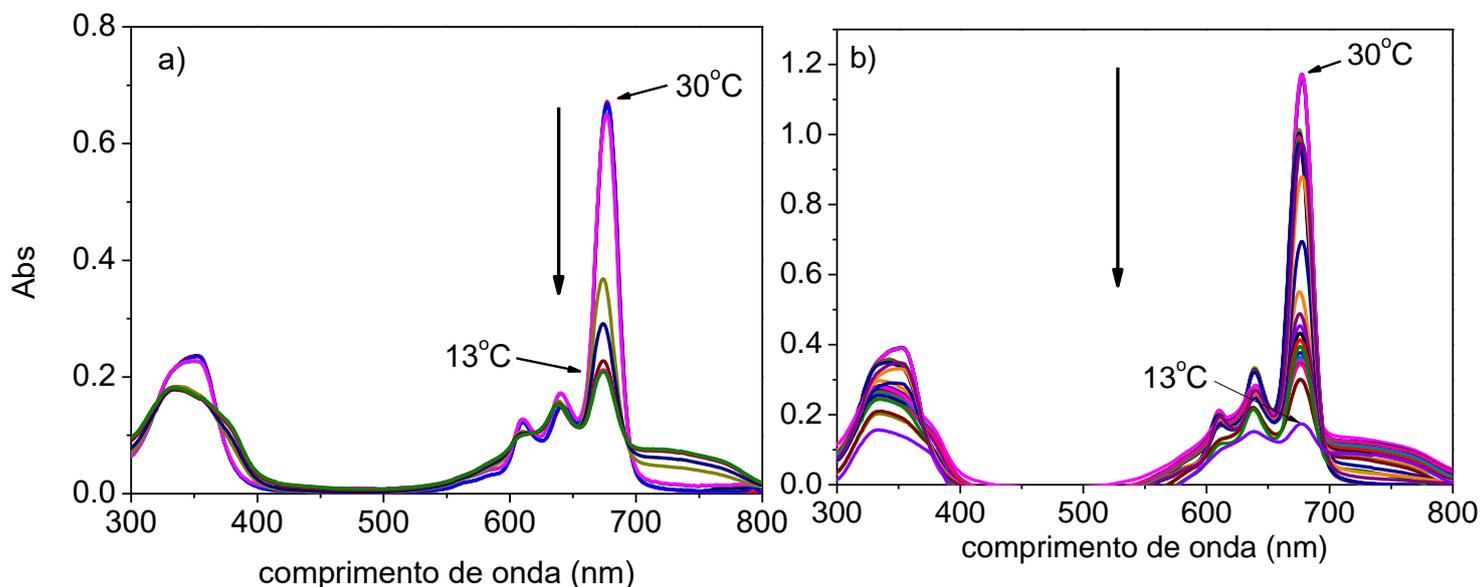


Figura 55. Espectro UV-Vis da **a)** AlPcCl ($3,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e **b)** AlPcCl ($7,0 \times 10^{-6}$) em P-123 8% (m/V; $1,4 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$) em função da diminuição da temperatura de 30 para 13 °C. Ambos formulados possuem e razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] = 0,1$ a 30 °C.

Acima da TMC do P-123 4% (16,3 °C nesta concentração; Alexandridis et al, 1994) não foram observadas variações significativas no espectro de absorção da AlPcCl. No entanto, ao se diminuir a temperatura para 13°C (portanto abaixo da TMC neste copolímero), mudanças espectrais começaram a ser observadas (Figura 55-a). Essas mudanças no espectro da AlPcCl encapsulada em P-123 com a diminuição da temperatura caracterizam-se pela diminuição e alargamento das principais bandas relativas a monômeros (Soret, Q_I , Q_{II} e Q_{III}), indicando a auto-agregação da AlPcCl (Akinbulu et al, 2010). Outro fator que indica a auto-agregação é um pequeno deslocamento hipsocrômico das principais bandas da AlPcCl com a diminuição da temperatura de 30 para 13°C.

É necessário lembrar que o deslocamento hipsocrômico das principais bandas de absorção da AlPcCl também foi observado nos perfis espectrais dos formulados da AlPcCl encapsulada nas menores concentrações do copolímero P-123 (seção 4.5). Os resultados evidenciam a formação de auto-agregados preferencialmente do tipo H no sistema AlPcCl/P-123.

Em cerca de 170 minutos, por sua vez, o sistema entra em equilíbrio, sem apresentar uma completa diminuição de absorvância ou desaparecimento das bandas (Figura 55-a). Resultados semelhantes podem ser observados para os formulados da AlPcCl $7,0 \times 10^{-6}$ em P-123 8% apresentado na Figura 55-b. Ou seja, mesmo na maior concentração do copolímero, ocorreram alterações espectrais na temperatura abaixo da TMC (13°C). O processo de formação das espécies auto-agregadas da AlPcCl também se mostrou irreversível para ambos os casos aumentando-se novamente a temperatura até 30°C.

Por sua vez, em formulados com menores razões $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$ ($[AlPcCl] < 1,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$; razão $[AlPcCl]/[P-123_{mic}] < 0,04$, considerando $N_{ag}=222$ a 30°C (Wanka et al, 1994) encapsulados em concentrações maiores de P-123, por sua vez, não foram observadas variações significativas na absorvância da AlPcCl com a diminuição da temperatura até 13°C , indicando que nestas condições, as mudanças estruturais nas micelas poliméricas não provocaram uma reorganização estrutural do FS. Adicionalmente, é necessário se lembrar que abaixo da TMC (13°C) têm-se as moléculas do copolímero na forma unimérica, que podem manter o FS no estado de monômeros; adicionalmente pela presença do FS hidrofóbico, podem-se ter micelas induzidas (pré-micelas) pela manutenção de mais de um unímero do copolímero ao redor do FS (Bilski e Chignell, et al, 1997; Xiao et al, 2012; Pellosi, 2012).

Os resultados obtidos através do estudo do efeito da diminuição da temperatura nos formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 entram em concordância com os estudos envolvendo os perfis espectrais e a estabilidade dos formulados da AlPcCl nestes copolímeros, apresentados na seção 4.5. Tais estudos evidenciaram uma maior tendência para a solubilização da AlPcCl em sua forma monomérica neste copolímero em relação ao F-127. A estabilidade da AlPcCl desagregada nos formulados envolvendo este FS encapsulado em menores $[AlPcCl]/[P-123_{mic}]$ ($< 1,5$) ou maiores concentrações de copolímero, mostraram uma mínima variação da absorvância com o passar dos dias em alguns formulados (Figuras 46-d e 46-e). Esta estabilização se deve à existência de uma maior quantidade micro-ambientes hidrofóbicos neste copolímero, capazes de estabilizar o FS em seu estado desagregado nestas condições.

Apesar da verificação da auto-agregação da AlPcCl com a diminuição da temperatura verificados nos formulados, também deve ser levado em consideração, por sua vez, que o efeito relacionado à diminuição da absorvância dos formulados da AlPcCl em P-123 e em F-127, principalmente na temperatura de 13°C , também pode estar associado a um efeito concorrente relacionado à liberação da AlPcCl decorrente da desestabilização do ambiente micelar com relação à diminuição da temperatura.

O provável mecanismo relacionado com o processo de auto-agregação e reorganização estrutural da AlPcCl em F-127 e P-123 em decorrência da diminuição da temperatura estão esquematizados na Figura 56, tomando-se por base os resultados apresentados pelas variações dos perfis espectrais dos formulados em função da temperatura apresentados anteriormente nas Figuras 54 e 55. A Figura 56-a representa o processo de auto-agregação em P-123, onde é verificada a presença do FS no estado monomérico acima da TMC e, posteriormente, com a diminuição da

temperatura é verificada a formação de auto-agregados preferencialmente do tipo H neste copolímero.

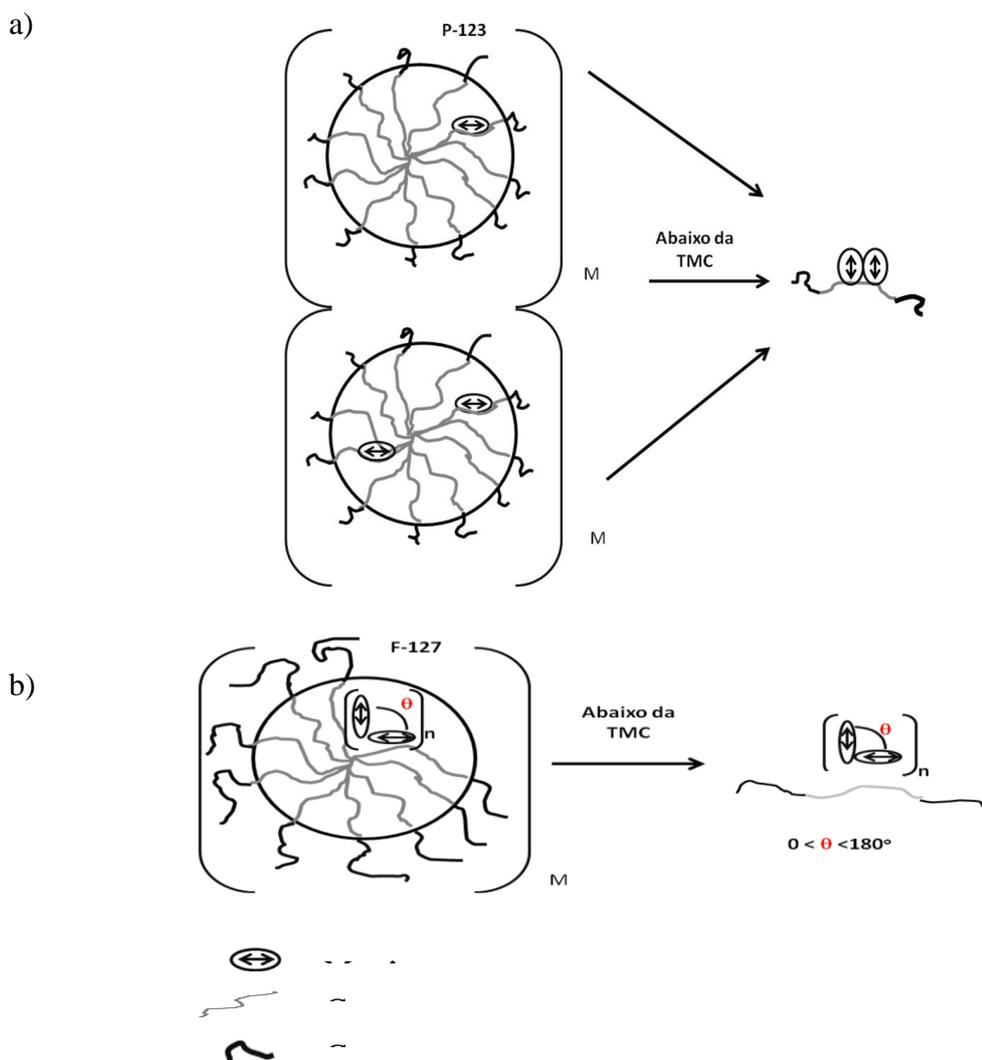


Figura 56. Mecanismo simplificado do processo de auto-agregação da AIPcCl solubilizada em surfactantes poliméricos para as temperaturas abaixo da TMC em **a)** P-123 e **b)** F-127.

Na Figura 56-b, por sua vez, verifica-se a reorganização estrutural dos multi-agregados previamente existentes da AIPcCl em F-127 com a diminuição da temperatura. Observa-se inicialmente um complexo perfil de interação entre a AIPcCl no ambiente micelar como avaliado nos estudos prévios de interação (seção 4.2) e encapsulamento (4.5.1-a), provavelmente envolvendo a interação de formas auto-agregadas da AIPcCl neste sistema. Com a desmicelização e diminuição gradual do volume da micela polimérica, através da diminuição da temperatura, provavelmente

ocorre uma reorganização estrutural da AlPcCl em outros tipos de auto-agregados ainda mais complexos.

Como mencionado anteriormente, o processo de mudança nos auto-agregados da AlPcCl em F-127 foi lento, levando-se cerca de 9 horas para a estabilização. O processo de alteração espectral da AlPcCl em P-123, por sua vez, foi considerado mais rápido (cerca de 2 horas), sem haver total auto-agregação do FS mesmo na temperatura mais baixa (13°C). Este fato reforça novamente a capacidade maior de estabilização da AlPcCl na forma desagregada em P-123, como explorado anteriormente nos estudos envolvendo as propriedades de solubilização da AlPcCl nos copolímeros (seção 4.5).

Estas variações espectrais da AlPcCl encapsulada em P-123 e F-127 com a diminuição da temperatura corroboram com os experimentos prévios envolvendo a determinação das isotermas de ligação deste FS em 15°C para ambos copolímeros (seção 4.3.3, Figura 37-a e 37-b para F-127 e P-123, respectivamente). Estes estudos mostraram uma associação mais fraca da AlPcCl frente aos copolímeros devido à reorganização estrutural dos unímeros dos poloxâmeros com a diminuição da temperatura. Entretanto, mesmo com a forma unimérica dos copolímeros, foi observado uma maior interação entre a AlPcCl e o P-123 nesta temperatura mais baixa (Figura 37), com a isoterma mostrando uma intensidade de emissão cinco vezes maior neste copolímero mais hidrofóbico nestas condições. Esta maior afinidade entre a AlPcCl e o P-123 em comparação ao F-127 a 15°C, explica a fraca mudança do perfil espectral da AlPcCl, seguida de uma maior estabilização do sistema no copolímero mais hidrofílico.

Adicionalmente, a localização da AlPcCl na micela polimérica foi investigada por experimentos de supressão da fluorescência com íons iodeto, um conhecido supressor hidrofílico que tem acesso às áreas hidratadas da micela (Lakowicz, 2006; Gerola, 2010; Pellosi, 2012). No entanto foi observado que este íon complexa-se com o alumínio presente na molécula de AlPcCl (Mondolfo, 1976; Hatch, 1984), inclusive verifica-se uma mudança da coloração de azul para verde conforme iodeto é adicionado para os formulados da AlPcCl encapsulada em P-123. Esta complexação envolve uma diminuição na intensidade de emissão nos formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 com o aumento da concentração de iodeto (espectros não mostrados). Por sua vez, nos espectros de absorção eletrônica é verificada uma diminuição das bandas Q_I , Q_{II} e Q_{III} da AlPcCl localizadas em 611, 639 e 678 nm, respectivamente, bem como um aumento de intensidade de absorção na região da banda Soret por volta de 360 nm (espectros não mostrados). No entanto, mesmo não se obtendo sucesso nos experimentos de supressão, supôs-se que a

ftalocianina esteja acessível pela aproximação do iodeto para a complexação neste copolímero, provavelmente indicando uma localização deste FS na interface PEO-PPO nas micelas poliméricas.

4.7. Estudos espectroscópicos da AlPcCl solubilizada em P-123 durante processo liofilização/reidratação

Este experimento foi realizado com a finalidade de verificar a estabilidade, basicamente monitorada pelas propriedades espectroscópicas (absorção eletrônica) da AlPcCl encapsulada em P-123 frente ao processo de liofilização (que inclui variações bruscas de temperatura) com posterior reidratação do formulado. Neste aspecto, este estudo também se mostra importante quando se faz uma comparação das alterações da organização molecular da AlPcCl (nas formas auto-agregada/monomerizada) incorporada nas micelas de P-123, através da diminuição lenta e gradual temperatura realizada em estudos anteriores (seção 4.6), com o congelamento instantâneo do formulado na liofilização. Desta forma pode-se inferir se o tempo associado principalmente à diminuição da temperatura e posteriormente a liofilização podem influir nos processos de organização molecular da AlPcCl.

Para isto analisou-se os espectros de absorção eletrônica do formulado da AlPcCl ($7,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 8% (m/V; $1,3 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$; razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] = 0,1$ a 30°C (cerca de 10 micelas por molécula de AlPcCl; Wanka et al, 1994). Esta baixa razão $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$ foi utilizada de modo a se ter o FS monomerizado, com base nos estudos anteriores.

Na Figura 57 verifica-se o espectro de absorção deste formulado em particular antes e após o procedimento de liofilização.

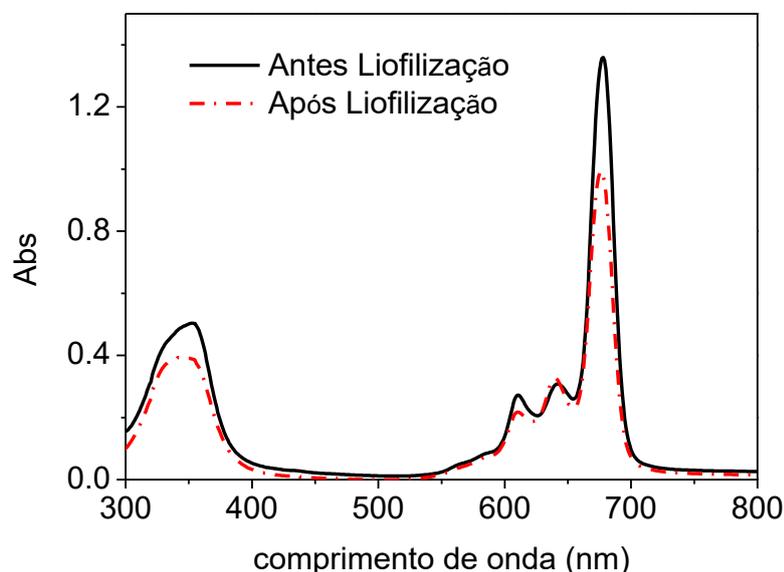


Figura 57. Espectro de absorção eletrônica da AIPcCl ($7,5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) solubilizada em micelas poliméricas de P-123 8% ($1,3 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$; com razão $[\text{AIPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] = 0,1$) antes e após a liofilização, $T=30 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Verifica-se através dos espectros de absorção da AIPcCl antes e após a liofilização na Figura 57 que há uma diminuição na absorvância (em cerca de 30%, sem alargamento de banda) para as principais bandas da AIPcCl durante o processo de liofilização do formulado. Ou seja, este processo seguido de ressuspensão do formulado afetou a estabilidade da AIPcCl, em termos da quantidade de moléculas encapsuladas, nesta baixa razão $[\text{AIPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]$. O mesmo estudo foi realizado em um formulado com a AIPcCl no estado de maior auto-agregação ($\text{AIPcCl } 8,3 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ e $[\text{AIPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}]=1,3$), onde se observou também uma queda de 30% no valor da absorvância (espectros não mostrados). Adicionalmente, submetendo os formulados a um segundo processo de liofilização/reidratação, há novamente a diminuição de 30% no valor de absorvância (espectros não mostrados). Este resultado evidencia que o formulado deve ser aplicado após a ressolubilização, não sendo viáveis novos processos de liofilização-reidratação subsequentes.

O processo de liofilização do formulado AIPcCl/P-123 é composto basicamente de duas etapas principais: congelamento inicial e instantâneo (em nitrogênio líquido) e desidratação. O congelamento é a etapa na qual a solução aquosa é rapidamente congelada em nitrogênio líquido e a secagem envolve a sublimação dos cristais de gelo formados. A etapa do congelamento é a mais crítica no processo, uma vez que pode fazer com que ocorra uma separação de fase, aumento do raio hidrodinâmico da micela, distribuição de tamanho heterogêneo e até mesmo a ruptura da micela polimérica (Di Tommaso et al, 2010). Outro parâmetro particularmente importante para a estabilidade do liofilizado é o teor de água residual. Moléculas de água não removidas podem desestabilizar o sistema liofilizado e, em alguns casos, também contribuem para a degradação dos produtos liofilizados.

De modo geral, quanto mais rápida a etapa do congelamento mais homogêneo é o tamanho da micela polimérica e melhor é o processo de liofilização (Di Tommaso et al, 2010). Apesar do congelamento com nitrogênio líquido ser rápido (<20 segundos) a diminuição do valor de absorvância da AlPcCl após o processo de liofilização pode ser influenciado pelas alterações de temperatura do sistema implicando em mudanças no perfil de liberação do formulado mesmo considerando o tempo relativamente rápido entre o processo de ressuspensão do formulado liofilizado até a aquisição do espectro de absorção eletrônica (Di Tommaso et al, 2010; Lee e Lin, 2011).

Apesar da queda no valor de 30% absorvância, o processo de liofilização/reidratação não causou mudanças significativas no espectro de absorção da AlPcCl quanto ao perfil espectral e deslocamento/aparecimento de novas bandas, que sugerem a formação de auto-agregados do FS (como os observados através da diminuição gradual e lenta da temperatura na seção 4.6). Isso evidencia a influência do congelamento instantâneo do formulado da AlPcCl na diminuição da reorganização/reestruturação do FS.

Adicionalmente, verificou-se que em menos de cinco minutos as amostras liofilizadas eram ressolubilizadas, ao contrário das 10 horas necessárias para o processo de hidratação da matriz AlPcCl/copolímero. O tempo menor para a ressolubilização do formulado pode ser explicado pelo fato de que no material liofilizado a AlPcCl já está incorporada nas micelas ao contrário do processo de hidratação inicial com o método de dispersão sólida (Aparício, 2011). Adicionalmente a estrutura do material liofilizado possui pequenos poros, que são formados quando a água é sublimada, e estes acabam facilitando a reidratação posterior do formulado.

Outros trabalhos reforçam a eficiência dos copolímeros na estabilização de algumas drogas/proteínas frente ao processo de liofilização/reidratação. Por exemplo, Lee e Lin mostraram que o copolímero tribloco F-68 protege a proteína cacitonina do “estress” térmico e desidratação causada pelo processo de liofilização (Lee e Lin, 2011). Além da proteção, este copolímero possibilita que não haja alterações na estabilidade conformacional desta proteína associado ao processo (Lee e Lin, 2011).

Desta forma, os resultados espectroscópicos associados à liofilização do formulado da AlPcCl encapsulada em P-123, mostraram-se importantes, pois possibilitam o armazenamento do FS no formulado liofilizado durante um longo período de tempo, maiores que em solução líquida, podendo ser prontamente ressolubilizado. Outra vantagem associada ao processo refere-se à manutenção das propriedades espectroscópicas e fotoquímicas do FS, sem a verificação de processos de reorganização molecular do mesmo. Isso possibilita que o formulado liofilizado da

AlPcCl encapsulada em P-123 possa ser manipulado conservando suas principais propriedades físico-químicas.

5. Estudos das propriedades fotodinâmicas dos formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 e F-127: efeito da concentração de AlPcCl e do tempo de iluminação na inativação fotodinâmica de microorganismos

Após os estudos das propriedades físico-químicas (ligação/solubilização, estabilização e propriedades fotofísicas) da AlPcCl encapsulada em P-123 e F-127, que forneceram subsídios para a obtenção de formulados desejáveis para os estudos de IFDMO/TFD, estudou-se o efeito fotodinâmico dos formulados da AlPcCl encapsulada nos copolímeros contra culturas de bactérias com diferentes estruturas na parede celular. Estes estudos são importantes visando-se verificar a potencialidade dos formulados obtidos quanto à inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO).

Nestes estudos foram avaliados os efeitos da concentração de AlPcCl encapsulada e também do tempo de iluminação nas bactérias *S. aureus* e *E. coli* bem como o fungo do gênero *C. albicans*.

5.1. Efeito da concentração de AlPcCl encapsulada nos copolímeros P-123 e F-127 na inativação fotodinâmica de microorganismos

Nos ensaios *in vitro* com os formulados AlPcCl encapsulada em F-127 não foi observada qualquer ação fotodinâmica sobre os microorganismos estudados (*S.aureus*, *E. coli* e *C. albicans*), independentemente da concentração de AlPcCl ou de copolímero utilizada (razão [AlPcCl]/[F-127_{mic}]). A ineficácia desses formulados pode ser explicada pelo fato de que a AlPcCl é incorporada na sua forma auto-agregada neste copolímero (seção 4.5). Como já citado, a presença de espécies auto-agregadas pode resultar na supressão de energia do estado excitado da molécula e, conseqüentemente, à diminuição de formação de oxigênio singlete (Sternberg, 1998; Rossetti et al, 2011). Adicionalmente, durante a filtração para esterilização do formulado, uma grande parte do FS ficou retido no filtro, diminuindo-se a quantidade de princípio ativo (AlPcCl) no sistema. Para a AlPcCl encapsulada em P-123, por sua vez, não houve problemas durante o processo de esterilização, porém, ainda assim, a concentração do FS foi confirmada por medidas de absorção eletrônica dos formulados antes da realização dos experimentos.

Primeiramente serão apresentados os resultados obtidos com a bactéria *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), um microorganismo gram-positivo que não possui membrana externa, uma camada de peptidoglicano (Figura 7; seção 1.7) assume esta função sendo, por isso, mais suscetível aos efeitos de fotossensibilização do que outros microorganismos, que possuem camadas de proteção adicionais fora da membrana do citoplasma, que dificultam a penetração do fotossensibilizador bem como a difusão do oxigênio singlete (Peloi et al., 2008; Gerolla et al, 2011). Os efeitos tóxicos e fototóxicos da AlPcCl neste microorganismo são apresentados na Figura 58.

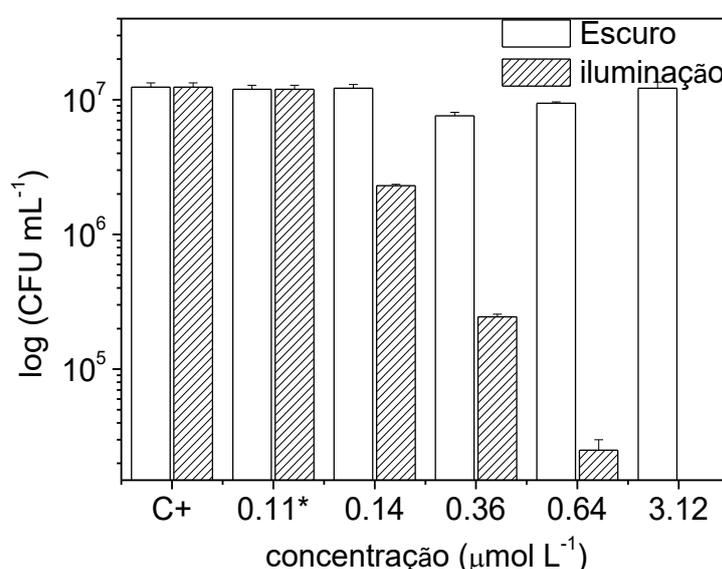


Figura 58. Efeito da concentração de AlPcCl encapsulada em P-123 4% ($7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e razões $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] < 0,1$ a 25°C) na inativação fotodinâmica de *S. aureus*. Todos os pontos representam medidas em triplicata. A $[\text{AlPcCl}] = 0,11 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ (denotado como *) refere-se à amostra de ftalocianina dispersa diretamente em meio aquoso, $\text{pH} = 7,0$.

Pode ser observado, primeiramente, que nos ensaios de inativação sem luz (no escuro; barras claras em todas as concentrações de AlPcCl mostradas na Figura 58) não houve danos às colônias, mesmo na maior concentração de AlPcCl utilizada ($3,1 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$). A baixa toxicidade no escuro (mínima citotoxicidade) é uma característica favorável para um FS principalmente quando aplicado em TFD na inativação de células e microorganismos (Lambrechts, 2005 e Costa et al. 2010). O efeito fotodinâmico sobre estas bactérias foi somente observado para as amostras dos formulados encapsulados através do método de dispersão sólida. Para a amostra com $[\text{AlPcCl}] = 0,11 \mu\text{molL}^{-1}$, que continha o FS adicionado diretamente às soluções de copolímeros, ou seja, sem o processo

adequado de encapsulamento para a otimização de suas propriedades fotofísicas onde, além de não promover boa solubilização, obteve-se um sistema que apresentava a AIPcCl auto-agregada, como consequência não verificando-se qualquer atividade fotodinâmica contra *S. aureus*. Este resultado evidencia a importância da metodologia aplicada na incorporação da AIPcCl monomerizada nas micelas poliméricas de P-123 (dependendo da razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]$; seção 4.5.1-b) sem o comprometimento das propriedades fotofísicas da mesma para a efetividade do tratamento via IFDMO.

A Figura 58 apresenta o efeito do aumento da concentração sobre a inibição da *S. aureus*. Observa-se a diminuição das unidades formadoras de colônia mesmo em concentrações muito baixas de AIPcCl encapsulada ($[AIPcCl]=0,14 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ e razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]=0,01$, ou seja, com aproximadamente 100 micelas poliméricas por moléculas de AIPcCl no sistema, considerando $N_{ag}=222$ a 25°C ; Wanka et al, 1994). O aumento da concentração da AIPcCl potencializou o efeito, levando à diminuição de dois ciclos logarítmicos em uma concentração menor do que $0,8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ($[AIPcCl]/[P-123_{mic}]=0,02$ a 25°C). O valor de Z_{90} , referente à morte de 90% da carga inicial de microorganismos foi de $0,24 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ para este sistema.

Os estudos envolvendo inativação fotodinâmica da AIPcCl incorporada em P-123 contra *Escherichia coli* (*E.coli*) não apresentaram efeitos mensuráveis, mesmo na concentração de AIPcCl mais elevada ($3,1 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$; razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]=0,1$, ou seja, com a presença de aproximadamente 10 micelas poliméricas por molécula de AIPcCl a 25°C ; Wanka et al, 1994). Esta ineficácia pode ser explicada em parte pela complexidade na parede celular das bactérias gram-negativas (Jori, 2006; Gerolla et al, 2011), formada por uma camada externa à de peptidoglicano (Figura 6; seção 1.7). Essa camada externa possui uma superfície carregada negativamente devido à presença de lipopolissacarídeos que atuam como uma barreira de permeabilidade, dificultando a incorporação de fármacos neutros ou negativamente carregados (Pelo et al., 2000; Soncin et al., 1995). Adicionalmente, a eficácia da ação fotodinâmica é dependente de inúmeros fatores como formação de oxigênio singlete e proximidade deste das células alvo. Isso porque o tempo de vida do oxigênio singlete é muito curto em sistemas biológicos ($<0,04 \mu\text{s}$) (Ochsner, 1997) e os danos às células específicas são dependentes da migração do $^1\text{O}_2$ durante o seu curto tempo de vida (Macdonald, 2001). Assim a ineficácia da AIPcCl sobre a bactéria *E. coli* também pode ser um problema de localização, ou seja, há a possibilidade de que o oxigênio singlete não se aproximasse o suficiente do alvo biológico para a efetividade do dano celular.

Sobre a levedura *Cândica albicans* (*C. albicans*), no entanto, o efeito do aumento da concentração de AIPcCl potencializou a inativação fotodinâmica deste microorganismo, como pode ser verificado pela Figura 59.

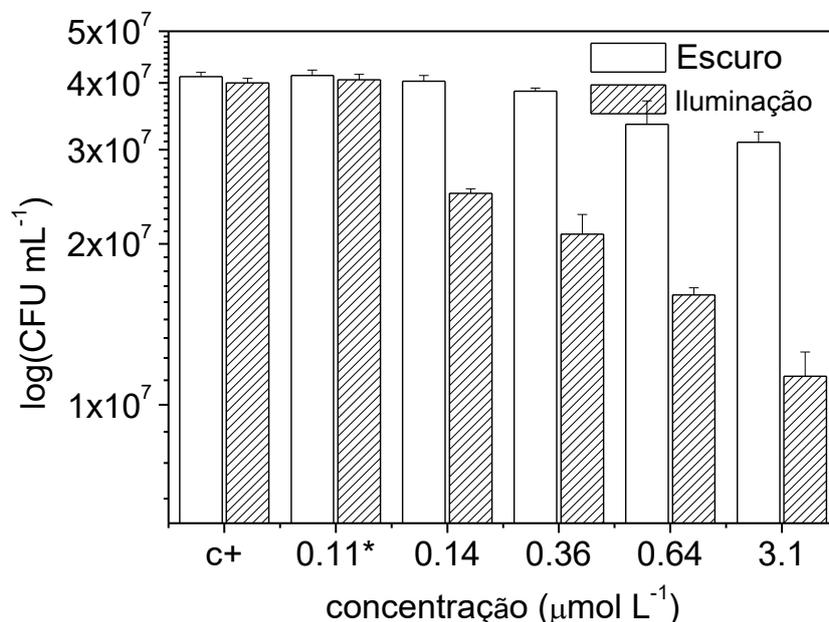


Figura 59. Efeito da concentração de AIPcCl encapsulada em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ e razões $[\text{AIPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] < 0,1$ a 25°C) na inativação fotodinâmica de *C. albicans*. Todos os pontos representam medidas em triplicata. A $[\text{AIPcCl}] = 0,11 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ (denotado como *) refere-se à amostra de ftalocianina dispersa diretamente em meio aquoso.

O valor Z_{90} obtido para este microorganismo foi de $1,78 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, valor cerca de 7 vezes maior do que o valor obtido com a *S. aureus*. Ou seja, o efeito de inativação sobre a levedura foi menor. O maior valor de Z_{90} obtido para a *C. albicans* pode ser explicado em decorrência da maior complexidade de sua parede celular, que possui uma membrana nuclear (ver Figura 5; seção 1.7) que pode atuar como uma barreira adicional limitando a incorporação da AIPcCl, fazendo com que a concentração do princípio ativo necessária para o efeito fotodinâmico sobre os microorganismos seja maior (Perussi, 2007). A *C. albicans* é considerada um modelo adequado para células de mamíferos (Li et al., 2007; Jakus e Farkas, 2005) e considerando o resultado promissor da AIPcCl frente a este fungo, estima-se que este FS seja adequado para fornecer danos à células eucarióticas cancerígenas em experimentos a serem realizados no futuro.

Os valores de Z_{90} obtidos para *S. aureus* ($0,24 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) e *C. albicans* ($1,78 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) foram considerados satisfatórios. A título de comparação estes valores se mostraram inferiores aos obtidos com o corante azul de metileno, fotossensibilizador amplamente estudado para a TFD e

IFDMO (LC-50 de $56,40 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ para *S. aureus* e $63,20 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ para *C. albicans*; Peli, 2007). Além do mais foi observado que o valor Z_{90} obtido para a AlPcCl em *Cândida albicans* foi cerca de 16 vezes menor ao observado para a inativação de 99,5% das colônias de *C. albicans* pela AlPcCl solubilizada em DMSO observada em estudos anteriores (Ribeiro et al, 2013). Ou seja, estes resultados mostraram que mesmo em baixas concentrações, a AlPcCl encapsulada em P-123 já é tóxica, indicando que apenas pequena quantidade do princípio ativo (AlPcCl) encapsulado neste copolímero, já é suficiente para a obtenção do efeito fotodinâmico.

5.1.1. Efeito do tempo de iluminação sobre a inativação fotodinâmica de microorganismos utilizando-se da AlPcCl encapsulada aos copolímeros P-123 e F-127

O efeito do tempo de iluminação na inativação de microorganismos foi estudado com a AlPcCl ($0,36$ e $0,64 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 4%. Avaliou-se o efeito de inativação dos formulados da AlPcCl nos tempos de iluminação de 5, 10 e 15 min.

Para a *E. coli* não se observou inativação mesmo para o sistema capaz de absorver maior quantidade de fótons: maior tempo de iluminação e concentração de AlPcCl. Por outro lado, a *S. aureus* e *C. albicans* mostraram uma inativação dependente do tempo de iluminação. Com o aumento da dose de luz aplicada, observou-se a diminuição no número de unidades formadoras de colônias viáveis (Figura 60). Os resultados obtidos foram usados para determinar o valor D_{90} , relacionado ao tempo necessário para reduzir 90% da carga inicial dos microorganismos. Estes valores são apresentados na Tabela 6, apresentada adiante.

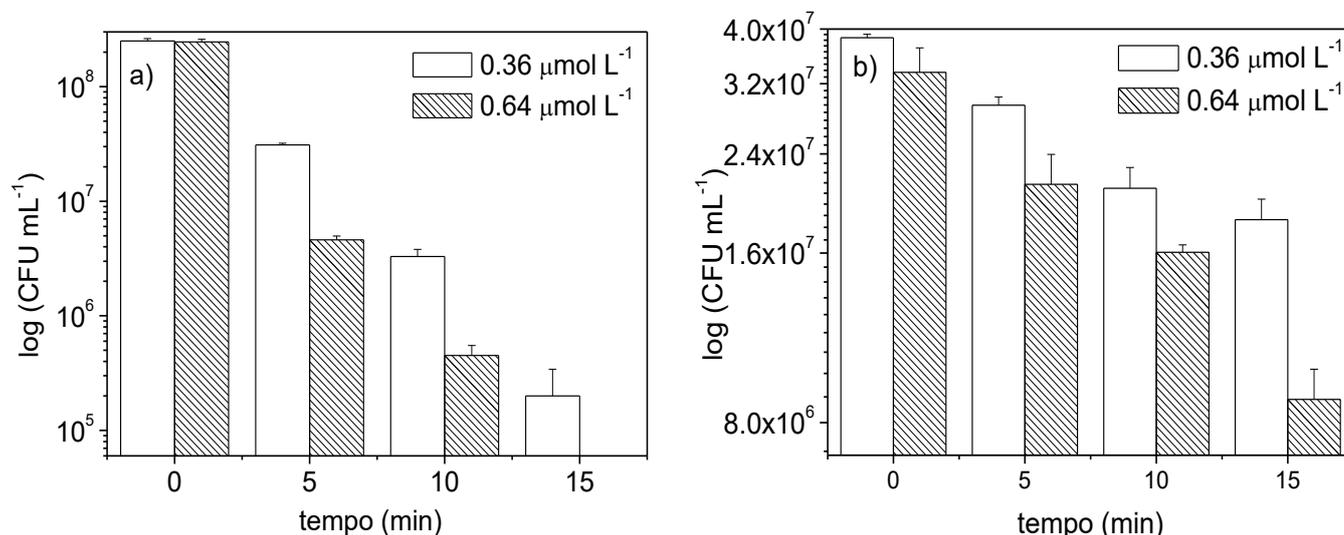


Figura 60. Efeito do tempo de iluminação sobre a inativação de **a)** de *S. aureus* e **b)** *C. albicans*, com AlPcCl ($0,36$ e $0,64 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) encapsulada em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$; $[\text{AlPcCl}]/[\text{P-123}_{\text{mic}}] < 0,1$) a 25°C . Cada ponto representa a média dos experimentos em triplicata.

Tabela 6. Valor D_{90} em função da concentração de AlPcCl para *S. Aureus* e *C. albicans* a 25°C .

[AlPcCl] (μmolL^{-1})	Valor D_{90} <i>S.aureus</i> (min)	Valor D_{90} <i>C. albicans</i> (min).
0,36	5,32	44,7
0,64	3,65	26,8

Pela análise da Tabela 6 verificou-se que o valor D_{90} obtido para a *C. albicans* foi aproximadamente 8 vezes maior do que o obtido para a *S. aureus*. Este valor está em concordância com o que foi discutido anteriormente no que se refere à maior complexidade da parede celular da *C. albicans* em comparação à *S. aureus*, dificultando a penetração da AlPcCl no último, que faz com que haja um aumento no tempo necessário para a inativação deste microorganismo.

5.2. Quantificação dos efeitos por análise quimiométrica

A quantificação dos efeitos isolados, tempo de iluminação e concentração de AlPcCl foi realizada pelo programa Stat-ease (Design-expert 6.0.6 Trial). Os efeitos calculados são apresentados na Tabela 8 para a bactéria *S. aureus* e a levedura *C. albicans*. Os ajustes obtidos pelo modelo foram satisfatórios, considerando-se a complexidade de sistemas biológicos em análise,

apresentando coeficientes de correlação $> 0,98$. O sinal negativo representa a diminuição no número de células viáveis, ou seja, quanto mais negativo o valor obtido para determinado efeito, mais importante e determinante é o mesmo na análise. Os efeitos isolados: tempo de iluminação e concentração de AlPcCl, foram significativos para ambos os microorganismos. O modelo que descreve a quantidade de UFC vivas usando AlPcCl formulada em P-123 4% (m/V; $7,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) como composto foto ativo é apresentado na Tabela 8 como resposta.

Tabela 7. Influência dos efeitos tempo de iluminação e concentração de AlPcCl calculados por análise quimiométrica frente a *S. aureus* e *C. albicans*.

	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Efeitos principais:		
A (Tempo de iluminação)	$-1851,8 \pm 38,8$	$-328,8 \pm 16,0 (\approx 6)$
B (Concentração de AlPcCl)	$-455,8 \pm 38,8$	$-155,5 \pm 16,0 (\approx 3)$
Interação dos efeitos:		
AB	$-29,17 \pm 38,8$	$-19,2 \pm 16,0$
Resposta	1173,4-925,9*A-227,9*B	573,6-164,4*A-77,9*B
R²	0,9964	0,9830

Analisando a influência dos efeitos tempo de iluminação e concentração de AlPcCl sobre cada microorganismo (Tabela 7), observa-se que a influência do tempo de iluminação foi cerca de 6 vezes maior para a bactéria *S. aureus* em comparação à levedura *C. albicans*, enquanto o da concentração foi cerca de 3 vezes maior. Este resultado está em concordância com os valores Z_{90} e D_{90} obtidos anteriormente, em que os efeitos concentração de FS e tempo de iluminação para erradicação da *C. albicans* foram 7 vezes maiores do que para *S. aureus*. Os efeitos calculados mais uma vez mostraram que tanto o tempo de iluminação quanto a concentração de FS mostraram uma importante relação com a inativação de microorganismos. Esses efeitos somam-se devido à sobreposição espectral de absorção da AlPcCl e emissão do LASER, gerando oxigênio singlete *in situ*.

Finalmente chega-se à conclusão de que a diferença na constituição estrutural da parede celular entre estes microorganismos foi crucial para os efeitos tóxicos da AlPcCl. Para a AlPcCl

encapsulada em P-123 resultados favoráveis foram obtidos para a inativação da bactéria gram positiva *S. aureus* e a levedura *C. albicans*, enquanto que nenhum efeito considerável foi obtido contra a bactéria gram negativa *E. coli*.

6. CONCLUSÕES

Os estudos espectroscópicos em meio homogêneo evidenciaram que a AIPcCl se solubiliza e possui melhores propriedades espectroscópicas em etanol em comparação a outros solventes com diferentes graus de polaridade como DMSO, acetona, clorofórmio e água, onde há a auto-agregação desde baixas concentrações deste FS. Em etanol, a AIPcCl se encontra com uma presença mínima de auto-agregados em concentrações abaixo de $0,6 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$. A partir desta concentração é verificada a formação de auto-agregados, como indicado pelas medidas de emissão de fluorescência. Os coeficientes de absorvidade molar das principais bandas de absorção da AIPcCl em etanol foram obtidos através do método das diluições, utilizando-se da Lei de Beer. Os valores obtidos estão de acordo com o que é esperado na literatura para as ftalocianinas. Deste modo, as soluções de AIPcCl em etanol foram utilizadas como ponto de partida para os estudos espectroscópicos. As propriedades fotofísicas da AIPcCl em etanol (rendimento quântico de fluorescência e rendimento quântico de oxigênio singlete) foram obtidas e revelaram que esta molécula possui rendimento quântico de oxigênio singlete (0,43), valor igual ou superior a muitos outros conhecidos fotossensibilizadores utilizados na TFD, que faz com que a mesma seja um promissor fotossensibilizador nesta modalidade médica e em estudos envolvendo a inativação fotodinâmica de microorganismos.

Nos experimentos envolvendo diferentes porcentagens de água em etanol foi observado a auto-agregação da AIPcCl com o aumento do teor de água pelas técnicas de absorção eletrônica, emissão de fluorescência e RLS. Verificou-se que a PAAC (porcentagem de água agregacional crítica) se encontra na região de 50% (V/V) de água. Devido aos deslocamentos das bandas nos espectros de absorção eletrônica da AIPcCl para regiões de menor energia (maiores comprimentos de onda) com adição de água (de 0 a 50% V/V) inferiu-se a presença de auto-agregados do tipo J. Estes resultados mostraram que a AIPcCl precisa ser encapsulada em sistemas solubilizadores/transportadores para a aplicação deste FS desagregado em meio aquoso.

Os estudos envolvendo a interação primária entre a AIPcCl e os copolímeros P-123 e F-127 demonstraram diferentes perfis de ligação nas isotermas, decorrentes de complexos perfis de organização estrutural da AIPcCl com o aumento da concentração destes copolímeros. Estes

complexos perfis de interação decorrem da associação da AIPcCl desagregada/auto-agregada com os copolímeros. As isotermas juntamente com as cinéticas de auto-agregação mostraram que a AIPcCl interage melhor com P-123 em comparação ao F-127. Adicionalmente, os estudos cinéticos de interação em P-123, por sua vez, mostraram que quanto menor a razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]$ mais a AIPcCl se mantém no sistema estabilizada com um menor grau de agregação. Em F-127, no entanto, independentemente da razão $[AIPcCl]/[F-127_{mic}]$ tem-se uma rápida auto-agregação da AIPcCl.

Posteriormente aos estudos termodinâmicos de interação AIPcCl/poloxâmeros partiu-se à incorporação da AIPcCl nestes sistemas nano-estruturados utilizando-se do método de dispersão sólida. A AIPcCl foi incorporada com sucesso nos copolímeros apesar da complexidade dos processos de interação AIPcCl/copolímeros discutida anteriormente. No entanto, para o sistema AIPcCl/P-123, o modo no qual a AIPcCl se incorpora na micela (desagregada ou auto-agregada) depende da razão $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]$ e também da concentração deste copolímero. Em maiores concentrações e menores razões $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]$ tem-se a incorporação da AIPcCl em um estado com menor grau de agregação, devido ao efeito relacionado ao aumento do N_{ag} com a concentração. Para o sistema AIPcCl/F-127, por sua vez, não há a incorporação da AIPcCl desagregada, mesmo em concentrações mais altas deste copolímero. Os estudos de estabilidade da AIPcCl encapsulada em P-123 mostraram que quanto mais semelhante ao estado monomérico do FS maior é a estabilidade do sistema, apresentando uma liberação mais lenta. Nos formulados da AIPcCl encapsulada em F-127, por sua vez, tem-se uma rápida liberação do FS independentemente da razão $[AIPcCl]/[F-127_{mic}]$ e da concentração deste copolímero.

Estes resultados, portanto, evidenciaram uma maior interação entre a AIPcCl e copolímero P-123, que apresenta um maior grau de hidrofobicidade em comparação ao F-127. Como explicitado, em razões baixas $[AIPcCl]/[P-123_{mic}]$ ($<1,5$) e também com o aumento da concentração de P-123, verifica-se um aumento na quantidade de sítios hidrofóbicos deste copolímero, capazes de solubilizar a AIPcCl na forma monomerizada. Este aumento da solubilização da AIPcCl na forma desagregada se deve à maior probabilidade de se encontrar uma molécula por micela em razões $[AIPcCl]/[P-123_{mic}] < 1,5$ e também ao aumento do número de agregação do copolímero em função de sua concentração. Para o sistema AIPcCl/F-127, por sua vez, o maior número de unidades da cadeia PEO em um únmero deste copolímero, aliado ao maior aumento do N_{ag} em função da concentração, faz com que não haja a desagregação da AIPcCl devido a um maior volume e área superficial da corona hidrofílica deste sistema.

Adicionalmente, estudos envolvendo o processo de liofilização/reidratação dos formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 mostraram que a liofilização altera minimamente as propriedades espectroscópicas do FS. Deste modo a liofilização torna-se uma importante ferramenta visando-se o aumento da estabilidade do formulado em relação ao do mesmo em solução.

Os formulados da AlPcCl incorporada em P-123 e F-127 (razão [AlPcCl]/[copolímero_{mic}] <0,05) foram usados como FS na aplicação sobre os microorganismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Os formulados em F-127 não foram eficientes devido à auto-agregação da AlPcCl neste meio enquanto os formulados encapsulados em P-123 apresentaram ótimos resultados na levedura *C. albicans* e, principalmente, na bactéria *S. aureus*. Por sua vez, não foram observados efeitos contra a *E. coli*. Adicionalmente, a solubilização direta do FS em uma solução aquosa contendo as micelas poliméricas de P-123, não foi eficaz contra os microorganismos, o que evidencia a importância do método de dispersão sólida na formulação da AlPcCl desagregada neste copolímero.

A ação mais efetiva dos formulados da AlPcCl encapsulada em P-123 frente à bactéria *S. aureus* em comparação ao fungo *C. albicans* e, principalmente à *E. coli*, se devem à maior complexidade da parede celular destes microorganismos em comparação aos outros estudados. Os efeitos calculados por quimiometria mostraram a importância da concentração da AlPcCl e do tempo de iluminação na eficácia da inativação de microorganismos.

Desse modo, a AlPcCl encapsulada em micelas poliméricas de P-123 foram eficientes na inativação de microorganismos e tem-se a perspectiva futura de aplicar tal formulação *in vitro* quanto *in vivo* em culturas celulares.

7. REFERÊNCIAS

- Akinbulu, I.A.; Ozoemena, K.I e Nyokong, T. “Formation, surface characterization, and electrocatalytic application of self-assembled monolayer films of tetra-substituted manganese, iron, and cobalt benzylthio phthalocyanine complexes”. *J. Solid State Electrochem.*, 15, p.2239–2251, 2011.
- Akter, S.; Clem, B.F.; Hyun, J.L.; Chesney, J e Bae, Y. “Block Copolymer Micelles for Controlled Delivery of Glycolytic Enzyme Inhibitors”. *Pharm. Res.*, 29, p. 847–855, 2012.
- Alexandridis, P e Hatton, T.A. “Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling”. *Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Asp.*, 96, p. 1-46, 1995.

- Alexandridis, P.; Athanassiou, V e Hatton, A. “*Pluronic-Pl05 PEO-PPO-PEO Block Copolymer in Aqueous Urea Solutions: Micelle Formation, Structure, and Microenvironment*”. *Langmuir*, 11, p.2442-2450, 1995.
- Allison, R. R e Sibata, C. H. “*Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review*”. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 7, p. 61—75, 2010.
- Allison, R.R.; Downie, G.H.; Cuenca, R.; Xin-Hua, H.; Childs, C.J.H e Sibata, C. “*Photosensitizers in clinical PDT*”. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 1, p.27-42, 2004.
- Ames, B.N.; Cathcart,R.; Schwiers,E e Hochstein,P. “*Uric Acid Provides an Antioxidant Defense in Humans Against Oxidant and Radical-Caused Aging and Cancer: A Hypothesis*”. *Biochemistry*, 78, p.6858-6862, 1981.
- Andersen, L. K.; Ogilby, P. R.; “*Time-resolved Detection of Singlet Oxygen in a Transmission Microscope*”. *Photochem. Photobiol*, 73, p.489, 2001.
- Andrade, M. L. “*Investigação da formação de intermediário exciplexo durante a oxidação do tetrafenil etileno por ação do oxigênio singlete*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 1995.
- Andrade, M. L. “*Investigação da formação de intermediário exciplexo durante a oxidação do tetrafenil etileno por ação do oxigênio singlete*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 1995.
- Arbeloa, I.L.; e Ojeda, P.R.; “*Dimeric states of rhodamine-B*”. *Chem. Phys. Letters*. 87(6), p. 556-560, 1982.
- Atkins, P.; “*Físico- Química*”. Sétima edição. Editora LTC, 2003.
- Bakshi, M.S.; Sachar, S.; “*Influence of temperature on the mixed micelles of Pluronic F127 and P103 with dimethylene-bis-(dodecyldimethylammonium bromide)*”. *J. Colloid Interface Sci.*, 296, p.309–315, 2006.
- Batrakova, E.V e Kabanov, A.V. “*Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers*”. *J. Control Release*, 130, p.98–106, 2008.
- Bakshi, M.S e Sachar, S. “*Influence of hydrophobicity on the mixed micelles of Pluronic F127 and P103 plus cationic surfactant mixtures*”. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 276, p. 146–154, 2006.

- Bakshi, M.S e Sachar, S. “*Influence of temperature on the mixed micelles of Pluronic F127 and P103 with dimethylene-bis-(dodecyldimethylammonium bromide)*”. *J. Colloid Interface Sci.*, 296, p.309–315, 2006.
- Barbugli, P.A. “*Estudos dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral e em modelos celulares tridimensionais*”. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.
- Ben-Hur, E e Rosenthal I. “*Photosensitization of chinese hamster cells by water soluble phthalocyanines*”. *Photochem. Photobiol.*, 43, p. 615–619, 1986.
- Ben-Hur E.; Roeben, R.C.; van Ormondt, H.; Dubbelman, T.M.A.R e van Steveninck, J. “*Photodynamic inactivation of retroviruses by phthalocyanines: the effects of sulphonation, metal ligand and fluoride*”. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 13, p.145-152, 1992.
- Bernacki, R.J. “*Self-assembling drugs – A new approach to biochemical modulation in cancer-chemotherapy – editorial review*”. *Cancer Investigation*, 12(2), p. 268-269, 1994.
- Bertoncello. P e Peruffo, M. “*An investigation on the self-aggregation properties of sulfonated copper(II) phthalocyanine (CuTsPc) thin films*”. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 321, p.106–112, 2008.
- Bilski, P e Chignell, C.F. “*Properties of differently charged micelles containing rose bengal: application in photosensitization studies*”. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*, 77, p.49-58, 1994.
- Bıyıklıođlu, Z.; Mahmut, D e Kantekin, H. “*Tetra-2-[2-(dimethylamino)ethoxy]ethoxy substituted zinc phthalocyanines and their quaternized analogues: Synthesis, characterization, photophysical and photochemical properties*”. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 222, p.87– 96, 2011.
- Bonacin, J.A.; Engelmann,F.M.; Severino,D.; Toma,H.E e Baptista, M.S. “*Singlet Oxygen Quantum Yields ($\phi\Delta$) in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs*”, *J. Braz. Chem. Soc*, 20, p.31-36, 2009.
- Bonnet, R. “*Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*”, D. Phillips, Gordon and Breach Science, Canada, 2000.
- Brasseur, N.; Ouellet, R.; La Madeleine, C e van Lier, J.E. “*Water-soluble aluminium phthalocyanine- polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour bearingmice*”. *Br. J. Cancer*, 80, p.1533-1541, 1999.
- Braun,A e Tcherniac,J. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 40, 2709, 1907.

- Brown, S.B.; Shillcock, M e Jones, P. “*Equilibrium and kinetic studies of aggregation of porphyrins in aqueous solution*”. *Biochem. J*, 153(2), p. 279-285, 1976.
- Caetano, W. e Tabak, M. “*Interaction of Chlorpromazine and Trifluoperazine with Ionic Micelles: Electronic Absorption Spectroscopy Studies*”. *Spectrochimica Acta Part. A*, 55, p.2513–2528, 1999.
- Caetano, W. “*Estudos Físico-químicos da interação de compostos heterocíclicos nitrogenados com sistemas miméticos de membrana biológica*”. *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, 2001.
- Cai, X.; Luan, Y.; Jiang, Y.; Song, A.; Shao, W.; Li, Z e Zhao, Z. “*Huperzine A- phospholipid complex-loaded biodegradable thermosensitive polymer gel for controlled drug release*”. *International Journal of Pharmaceutics*, 433, p. 102– 111, 2012.
- Castano, A.P e Demidova, T.N. “*Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization*”. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 1, p.279-293, 2004.
- Castano, A.P.; Demidova, T.N e Hamblin, M.R. “*Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction*”. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2, p.91-106, 2005.
- Chang, C.C.; Hsieh, M.C.; Lin, J.C e Chang, T.A. “*Selective photodynamic therapy based on aggregation-induced emission enhancement of fluorescent organic nanoparticles*”. *Biomaterials*, 33, p.897-906, 2012.
- Chauke, V.P. “*Synthesis, photochemical and Photophysical properties of gallium and indium Phthalocyanine Derivatives*”. Rhodes University, 2008.
- Chen, L.C.C.; Wang, C.C e Cheng, C.C. “*Influence of dopant and polymeric matrix on Indium tin oxide/p-zinc phtalocyanine/n-Si hybrid solar cells*”. *Thin Solid Films*, 517, p.1790–1793, 2009.
- Chen, S.; Li, Y.; Guo, C.; Wang, J.; Ma, J.; Liang, X.; Yang, L.R e Liu, H.Z. “*Temperature-Responsive Magnetite/PEO-PPO-PEO Block Copolymer Nanoparticles for Controlled Drug Targeting Delivery*”. *Langmuir*, 23, p.12669-12676, 2007.
- Chidawanyika, W.U. “*Photophysicochemical studies of d^{10} metallophthalocyanines and their interaction with nanoparticles*”. *Thesis*, Rhodes University, 2010.
- Chowdhary, R.K.; Chansarkar, N.; Sharif, I.; Hioka, N e Dolphin, D. “*Formulation of Benzoporphyrin Derivates in Pluronic*”. *Photochem. Photobiol.*, 77(3), p.299-303, 2003.

- Collings, P.J.; Gibbs, E.J.; Starr, T.E.; Vafek, O e Yee, C.; Pomerance, L.A e Pasternack, R.F. “*Resonance Light Scattering and Its Application in Determining the Size, Shape, and Aggregation Number for Supramolecular Assemblies of Chromophores*”, *J. Phys. Chem. B*, 103, p. 8474-8481, 1999.
- Costa, L.; Carvalho, C.M.B.; Faustino, M.A.F.; Neves, M.G.P.M.S.; Tomé, J.P.C.; Tomé, A.C.; Cavaleiro, J.A.S.; Cunha, A e Almeida, A. “*Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: influence of light Parameters*”. *Photochem. Photobiol. Sci*, 9, p.1126–1133, 2010.
- Croy S.R e Kwon G.S. “*Polymeric micelles for drug delivery*”. *Current Pharmaceutical Design*, 12 (36), p.4669-4684, 2006.
- Damasceno, M.V.A. “*Estudos Teóricos dos Efeitos de Solvente no Espectro Eletrônico de Absorção da Molécula Óxido Mesitil.*” Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- Dash, S.; Narasimha, P e Nath, L.; “*Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery System*”, *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*, 67 (3), p. 217- 223, 2010.
- de Paoli, V.M.; de Paoli, S.H.; Borissevitch, I.E e Tedesco, A. “*Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH₂ associated with micelles and DNA*”. *J. Alloys Compd.*, 344, p.27–31, 2002.
- Dhami, S.; de Mello, A.J.; Rumbles, G.; Bishop, S.M.; Phillips, D e Beeby, A. “*Phthalocyanine Fluorescence at high concentration dimers or reabsorption effect?*”. *Photochem. Photobiol.*, 61 (4), p. 341-346, 1994.
- Tommaso, C.D.; Como, C.; Gurny, R e Moller, M. “*Investigations on the lyophilisation of MPEG–hexPLA micelle based pharmaceutical formulations*”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, p. 38–47, 2010.
- Diesbach, H e von der Weid, E. *Helv. Chim. Acta*, 10, p.886, 1927.
- Dolphin, D. “*The Porphyrins: Physical Chemistry*”, V. 3, Academic Press Inc, USA, 1978.
- Dougherty T.J.; Grindey G.B e Fiel, R. “*Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light*”. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, p.115–121, 1975.
- Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korblik, M.; Moan, J. e Peng, Q. “*Photodynamic Therapy*”. *Journal of the National Cancer Institute*, 90, p.889-905, 1998.

- Du, W.; Teng, T.; Zhou, C.C.; Xi, L e Wang, J.Z. “Spectroscopic studies on the interaction of bovine serum albumin with ginkgolic acid: Binding characteristics and structural analysis”. *J. Lumin.*, 132, p. 1207–1214, 2012.
- Durantini E.N. “Photodynamic inactivation of bacteria”. *Curr. Bioact. Comp.*, 2 p.127-142, 2006.
- Dutta, S.; Ray, D.; Kolli, B.K e Chang, K.P. “Photodynamic Sensitization of *Leishmania amazonensis* in both Extracellular and Intracellular Stages with Aluminum Phthalocyanine Chloride for Photolysis”. *Biochim.Biophys. Acta*, 850, p.436-448, 2005.
- Eaton, D.F. “Reference Materials for Fluorescence Measurement”. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2, p.523 – 531, 1988.
- Endo, A.; Matsumoto, S e Mizuguchi, J. “Interpretation of the Near-Infrared Absorption of Magnesium Phthalocyanine Complexes in Terms of Exciton Coupling”. *Effects J. Phys. Chem. A*, 103, p.8193-8199, 1999.
- Errico, G.D.; Paduano, L.; Ortona. O.; Mangiapia. G.; Coppola, L e Celso, F.L. “Temperature and concentration effects on supramolecular aggregation and phase behavior for poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)copolymers of different concentration in aqueous mixtures”. *J. Colloid Interface Sci.*, 359 p.179–188, 2011.
- Fakis, M.; Anastopoulos, D.; Giannetas, V e Persephonis, P. “Influence of Aggregates and Solvent Aromaticity on the Emission of Conjugated Polymers”. *J. Phys. Chem. B*, 110, p. 24897-24902, 2006.
- Farag, A.A.M.; Ashery, A e Shenashen. “Optical absorption and spectrophotometric studies on the optical constants and dielectric of poly (o-toluidine) (POT) films grown by spin coating deposition”. *Physica B*. 407, p. 2404–2411, 2012.
- Fischer, F.; Grasczew, G.; Sinn, H.J.; Maier-Borst, W.; Lorenz, W.J e Schlag, P.M. “A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers”. *Clin. Chim. Acta*, 274, p. 89–104, 1998.
- Fitz Gerald, S. “A photophysical study of novel silicon and zinc phthalocyanines”, theses, Durham University, 2002.
- Foote C.S. “Definition of type I and type II photosensitized oxidation”. *Photochem. Photobiol.*, 54, p.659, 1991.

- Foote, C.S.; Valentine, J.S.; Greenberg, A e Liebman, J.F. “*Active Oxygen in Chemistry*”. *Chapman and Hall*, V.2., London, 1995.
- Fischer, F.; Grasczew, G.; Sinn, H.J.; Maier-Borst, W.; Lorenz, W.J e Schlag, P.M. “*A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers*”. *Clin. Chim. Acta*, 274, p. 89–104, 1998.
- Fritsch, C.; Goerz, G e Ruzicka, T. “*Photodynamic therapy in dermatology*”. *Arch. Dermatol*, 134, p.207–214,1998.
- Froehlich, P. “*Understanding the sensitivity specification of spectrofluorometers*”. *International Laboratory*, 19, p. 42-45, 1989.
- Gagliotti, C.; Balode, A.; Baquero, F.; Degener, J.; Grundann, H.; Gür, D.; Jarlier, V.; Kahlmeter, G.; Monen, J.; Monnet, D.L.; Rossolini, G.M.; Suetens, C.; Weist, K e Heuer, O. “*Escherichia coli and Staphylococcus aureus: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS)*”, *Euro Surveill*, 16(11), 2011.
- Garcia, I e Bouguéneq, C.L. “*Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic Escherichia Colli*”, *Institute Pasteur* , 1996.
- Gelis, S.; Groot, P.W.J.; Castillo, L.; Moragues, M.D.; Sentandreu, R.; Gómez, M.M e Valentín, E. “*Pga13 in Candida albicans is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence*”. *Fungal Genetics and Biology*, 49, p. 322–331, 2012.
- George, M.V e Bhat,V. “*Photooxygenations of Nitrogen Heterocycles*”. *Chem. Rev*, 79, p. 447-478, 1979.
- Gerola, A.P. “*Estudos Físicos-Químicos de Derivados de Clorofila em Sistemas Homogêneos e Micro-Heterogêneos: Aspectos Fotofísicos, Fotodinâmicos e Fotoinativantes sobre Microrganismos*”, *Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá*, 2010.
- Gerola, A.P.; Santana, A.; França, P.B.; Tsubone, T.M.; Oliveira, H.P.M.; Caetano,W e Hioka, N. “*Effects of Metal and the Phytyl Chain on Chlorophyll Derivatives: Physicochemical Evaluation for Photodynamic Inactivation of Microorganisms*”. *Photochem. Photobiol.*, 87, p.884–894, 2011.
- Gerolla, A.P.; Semensato, J.; Pellosi, D.S.; Batistela, V.R.; Rabello, B.R.; Hioka, N e Caetano, W. “*Chemical Determination of Singlet Oxygen from Photosensitizers Illuminated with LED: new calculation methodology considering the influence of photobleaching*”. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.*, 23, p.14–21, 2012.

- Gilbert, A e Baggott, J. “*In: Essentials of Molecular Photochemistry*”, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991.
- Glusko, C.A.; Previtali, C.M.; Vera, D.M.A.; Chesta, C.A e Montejano, H.A. “*An experimental and theoretical study on the photophysical properties of methylene green*”. *Dyes and Pigments*, 90, p.28-35, 2011.
- Gomer, C.J. “*Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy*”. *Photochem. Photobiol.*, 34, p. 1093-1107, 1991.
- Gracetto, A.C.; Batistela, V.R.; Caetano, W.; Oliveira, H.P.M.; Santos, W.G.; Cavalheiro, C.C.S.; Hioka, N.; “*Unusual 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) spectrophotometric behavior in water/ethanol and water/DMSO mixtures*”. *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (8), p. 1497-1502, 2010.
- Gracetto, A.C.; Tessaro, A.L e De Souza, V.R. “*Self-Aggregation Processes of 1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatriene in Water/Ethanol Mixtures with High Water Percentages*”, *Applied Spectroscopy*, 65, pp. 604-610, 2011.
- Guo, L.; Colby, R.H e Thiyagarajan, P. “*Temperature and hydrophobic alcohol-induced structural changes of Pluronics micelles*”. *Physica B*, 385–386, p.685–687, 2006.
- Hamblin, M. R e Newman, E. L. J. *Photochem. Photobiol. B: Biol*, 23, 3, 1994.
- Harada, Y.; Yamamoto, T.; Sakai, M.; Saiki, T.; Kawano, K.; Maitani, Y e Yokoyama, M. “*Effects of organic solvents on drug incorporation into polymeric carriers and morphological analyses of drug-incorporated polymeric micelle*”. *International Journal of Pharmaceutics*, 404, p.271–280, 2011.
- Harris, D.C e Bertolucci, M.D. “*Symmetry and Spectroscopy – An Introduction to Vibrational and Eletronic Spectroscopy*”, New York: Dover, 1989.
- Hatch, J.E. “*Properties of Pure Aluminum: Properties and Physical Metallurgy*”. *American Society for Metals*, p. 24, 1984.
- Hecht, E e Hoffman, H. *Colloids Surf. A.*, 96, p. 181–197, 1995.
- Hioka, N.; Chowdhary, R.K.; Chansarkar, D.; Delmarre, D.; Stenberg, E e Dolphin, D. “*Studies of a benzoporphyrin derivative with Pluronics*”. *Can. J. Chem.*, 80(10), p. 1321-1326, 2002.
- Hosseinzadeh, R.; Maleki, R.; Matin, A.A e Youseff, N. “*Spectrophotometric study of anionic azo-dye light yellow (X6G) interaction with surfactants and its micellar solubilization in cationic surfactant micelles*’. *Spectrochimica Acta Part A*, 69 p.1183–1187, 2008.

- Jakus, J. e Farkas, O. “*Photosensitizers and antioxidants: a way to new drugs?*”. *Photochemical Photobiology Science*,4, p.694-698, 2005.
- Jangher, A.; Griffithsa, P.C.; Paul, A.; King, S.M.; Heenan, R.K e Schweinsc, R. “*Polymeric micelle disruption by cosolvents and anionic surfactants*”. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 391, p.88– 94, 2011.
- Jiang, X.; Li, L.; Liu, J e Zhuo, R. “*Reduction-responsive polymeric micelles for anticancer drug delivery*”. *Journal of Controlled Release*, 152, 130–132, 2011.
- Jones, M.C e Leroux, J.C. “*Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers*”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 48, p. 101-111, 1999.
- Jori, G.; Fabris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppellotti, O.; Dei, D.; Fantetti, L.; Chiti, G e Roncucci, G. “*Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications*”. *LASERs Surg. Med.*, 38, p. 468–481, 2006.
- Júnior–Ricci, E e Marchetti, J.M. “*Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use*”. *International Journal of Pharmaceutics* 310, p. 187–195, 2006.
- Kahn, K e Tipton, P.A. “*Spectroscopic Characterization of Intermediates in the Urate Oxidase Reaction*”. *Biochemistry*, 37, p.11651-11659, 1998.
- Karns, G.A.; Gallagher, W.A; e Elliot, W.B. “*Dimerization constants of water-soluble porphyrins in aqueous alkali*”. *Bioorganic. Chem.*, 8(1), p.69-81, 1979.
- Kasha, M. “*Energy Transfer mechanism and the molecular exciton model for molecular aggregates*”. *Radiat. Res.*, 20, p.55, 1963.
- Kasha, M.; Rawls, H.R e El-Bayoumi, M.A. “*The exciton model in molecular spectroscopy*”. *Pure Appl. Chem.*, 11, p. 371-392. 1965.
- Kataoka, K.; Harada, A e Nagasaki, Y. “*Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance*”. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, p. 113–131, 2011.
- Kearns, D. R.; “*Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen*”.*Chemical Reviews*, 71, p. 395-427, 1971.
- Kedar, U.; Phutane, P.; Shidhaye, S e Kadam, V. “*Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting*”. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6, p.714–729, 2010.
- Kelly J.F e Snell, M. E. “*Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder*”. *J. Urol.*, 115, p. 150–151, 1976.

- Kessel, D e Rossi, E. “*Determinants of porphyrin-sensitized photo-oxidation characterized by fluorescence and absorption-spectra*”. *Photochem. Photobiol*, 35(1), p. 37-41, 1982.
- Khairutdinov, R e Serpone, N. “Photoluminescence and transient spectroscopy of free base porphyrin aggregates”. *J. Phys. Chem. B.*, 103(5), p. 761-769, 1999.
- Kolarova, H.; Nevrelouva, P.; Bajgar, R; Jirova, D.; Kejlova, K e Strnad, M. “*In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine.*”. *Toxicology in Vitro*, 21, p.249–253, 2007.
- Krieg, M. “*Singlet Oxygen production and fluorescence yields of merocyanine 540: a comparative study in solution and model membrane systems*” *Biochimica Biophysica acta*, 1105, p. 333-335, 1992.
- Kyriazi, M.; Alexandratou, E.; Yova, D.; Rallis, M e Trebst, T. “*Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode LASER: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes.*” *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 24, p. 87–94, 2008.
- Kolarova, H.; Nevrelouva, P.; Bajgar, R; Jirova, D.; Kejlova, K e Strnad, M. “*In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine.*”. *Toxicology in Vitro*, 21, p.249–253, 2007.
- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3a ed., Springer, New York, 2006.
- Lam, Y.M.; Grigorieff, N e Goldbeck-Wood, G.; “*Direct Visualisation of micelles of Pluronic block copolymers in aqueous solution by cryo-TEM*”. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1, p. 3331-3334, 1999.
- Lambrechts, S.A.G.; Demidova, T.N.; Aalders, M.C.G.; Hasan, T e Hamblin, M. “*Photodynamic therapy for Staphylococcus aureus infected burn wounds in mice*”. *Photochem. Photobiol. Sci*, 4, p.503-509, 2005.
- Lavorel, J; “*Influence of concentration on the absorption spectrum and the action spectrum of fluorescence of dye solutions*”. *J. Phys. Chem.* 61(12), p. 1600-1605. 1957.
- Lee, J.; Cho, E.C e Cho, K. “*Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-block-poly(ethylene oxide) micelles*”, *Journal of Controlled Release*, 94, p.323– 335, 2004.
- Lee, S.J.; Koo, H.; Lee, D.; Min, S.; Lee, S.; Chen, X.; Choi, Y.; Leary, J.F.; Park, K.; Jeong, Y.; Kwon, I.C.; Kim, K e Choi, K; “*Tumor-homing photosensitizer-*

conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system". *Biomaterials*, 32, p. 4021-4029, 2011.

- Lee, S.J.; Park, K.; Oh, Y.; Kwon, S.; Her, S e Kim, I. "Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice". *Biomaterials*, 30, p. 2929–2939, 2009.

- Lee, T.H e Li, S.Y. "Pluronic F68 Enhanced the Conformational Stability of Salmon Calcitonin in Both Aqueous". *Biopolymers*, 95, p. 785-791, 2011.

- Lee, S.J.; Park, K.; Oh, Y.; Kwon, S.; Her, S e Kim, I. "Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice". *Biomaterials*, 30, p. 2929–2939, 2009.

- Leroux, J.C.; Roux, E.; Garrec, D.L.; Hong, K e Drummond, D.C. "N-isopropylacrylamide copolymers for the preparation of pH-sensitive liposomes and polymeric micelles". *Journal of Controlled Release*, 72, p. 71–84, 2001.

- Li, G.; Liu, J.; Pang, Yan.; Wang, R.; Mao,L .; Yan, D.; Xinyuan, Z. e Sun,J. "Polymeric Micelles with Water-Insoluble Drug as Hydrophobic Moiety for Drug Delivery". *Biomacromolecules*, 12 (6), p. 2016-2026, 2011.

- Linstead,R.P; *J. Chem. Soc.*1016, 1934.

- Lipson, R.L e Baldes, E.J. "The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative". *Arch. Dermatol.*, 82 p. 508, 1960.

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

- Li, W. T.; Tsao, H. W.; Chen, Y. Y.; Cheng, S. W. e Hsu, Y. C. "A study on the Photodynamic properties of chlorophyll derivatives using human hepatocellular carcinoma cells". *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, p. 1341-1348, 2007.

- Li, X-you e Ng, D.K.P. "Synthesis and spectroscopic properties of the first phthalocyanine-nucleobase conjugates." *Tetrahedron Letters*, 42, p. 305-309, 2001.

- Liu, K.; Wang, Y.; Yao, J e Luo, Y. "Origin of the Q-band splitting in the absorption spectra of aluminum phthalocyanine chloride". *Chemical Physics Letters*, 438, p.36–40, 2007.

- Livermore, D.M. "Antibiotic replace and transport by bacteria". *Scandinavian Journal of Infection Disease – Supplements*, 74, p. 15 –22, 1990.

- Longo, J.P.F.; Leal, S.C.; Simioni, A.R.; Almeida-Santos, M.F.M.; Tedesco, A.C e Azevedo, R.B.; “Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study.” *LASERs Med. Sci.*,27, p.575–584, 2012.
- Longo, J.P.F.; Lozzi, S.P.; Simioni, A.R e Morais, P.C. “*Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors*”. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 94, p. 143–146, 2009.
- Macdonald, I. J e Dougherty, T.J. “Basic principles of photodynamic therapy”. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 5, p. 105–129, 2001.
- Machado, A. E. H. “*Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas*”. *Química Nova*, 23(2), p. 237-243, 2000.
- Margalit, R e Rotenberg, M. “*Thermodynamics of porphyrins dimerization in aqueous solutions*”. *Biochem. J.*, 219(2), p. 445-450, 1984.
- Martin, P.C.; Gouterman, M.; Pepich, B.V.; Renzoni, G.E.; Schindele, D.C. “*Effects of ligands, solvent and variable sulfonation on dimer formation of aluminum and zinc phthalocyanine sulfonates*”. *Inorg. Chem.* 30, p. 3305-3309, 1991.
- Mashru, K.H.; Solanki, H.K.; Jani, G.K.; “*Development of modified release gliclazide biological macromolecules using natural biodegradable polymers*”. *Int. J. Biol. Macromol.*, 55, p. 6– 14, 2013.
- Matsuura, T e Saito, I. “*Photoinduced reactions – XXI. Photosensitized oxygenation of N unsubstituted hydroxypurines*”. *Tetrahedron*, 24, p. 6609–6614, 1968.
- Meyer, B. N.; Ferrigini, N. R.; Putnan, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E. e McLaughlin. *J. L. Planta Med.*, 45, 31, 1982.
- Meyer, B.N.; Ferrigini, N.R.; Putnan, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E. e Mc Laughlin, J. L.; *Planta Med.*, 45, p.31, 1982.
- Mi, J.; Guo, L.; Liu, Y.; Liu, W.; You, G e Qian, S. “*Excited-state dynamics of magnesium phthalocyanine thin film*”. *Phys. Lett. A*, 310, p.486, 2003.
- Micali, N.; Scolaro, L.M.; Romeo, A e Mallamace, F. “*Fractal aggregation in aqueous solutions of porphyrins*”. *Physica A*, 249(1-4), p. 501-510, 1998.
- Miranda, J.A. “*Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas*”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 2001.

- Miyata, K. ; Christie, R.J e Kataoka, K. “*Polymeric micelles for nano-scale drug delivery*”. *React. Funct. Polym.*, 71, p. 227–234, 2011.
- Modaressi, A.; Sifaoui, H.; Grzesiak, B.; Solimando, R.; Domanska, U e Rogalski, M. “*CTAB aggregation in aqueous solutions of ammonium based ionic liquids; conductimetric studies*”. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* , 296, p.104–108, 2007.
- Mondolfo, L.F. “*Aluminum Alloys Structure and Properties*”, Butterworths, 1976.
- Moore, S.A.; Harris, A.A e Palepu, R.M. “*Spectroscopic investigations on the binding of ammonium salt of 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid with non-ionic surfactant micelles in aqueous media*”. *Fluid Phase Equilibria*, 251, p. 110–113, 2007.
- Mørkved, E.H.; Andreassen, T e Bruheim, P. “*Zinc azaphthalocyanines with pyridin-3-yloxy peripheral substituents*”. *Polyhedron*, 28, p. 2635–2640, 2009.
- Moser, J. G. “*Photodynamic Tumor Therapy – Generation Photosensitizers*”, 2nd and 3rd ed., Harwood: Índia, 1998.
- Murakami, K. “*Thermodynamic and kinetic aspects of self-association of dyes in aqueous solution*”. *Dyes Pigm.*, 53(1), p. 31-43. 2002.
- Neradovic D.; van Nostrum, C.F e Hennink, W.E. “*Thermoresponsive polymeric micelles with controlled instability based on hydrolytically sensitive N-isopropylacrylamide copolymers*”. *Macromolecules*, 34(22), p. 7589–7591, 2001.
- Neto, L.P.S. “*Propriedades ópticas de ftalocianinas em diferentes pH's*”. dissertação de mestrado; Universidade Federal do Piauí –UFPI, 2010.
- Nishiyama, N e Kataoka, K. “*Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery*”. *Pharmacology & Therapeutics*, 112, p. 630–648, 2006.
- Nitta, H.; Shoji, M.; Takahata, M.; Nakanob, M.; Yamaki, D e Yamaguchi, K.; *J. Photochem. Photobiol. A*, 178, 264. 2006.
- Novaki, P.L e Soud, O.A. El. “*Solvatochromism in Binary Solvent Mixtures: Effects of the Molecular Structure of Probe*”. *Ber Bunsenges. Phys. Chem.*, 101, p.902, 1997.
- Nunes, S.M.T; Sguilla, F.S e Tedesco, A.C; “*Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives*”. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37, p.273–284, 2004.

- Ochsner M.; “*Photodynamic Therapy: The Clinical Perspective*”. *Drug.Res.*, 47(II), p. 1185-1194, 1997.
- Ochsner, M. “*Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors*”. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 39, p 1-18, 1997.
- Ogunsipe, A.; Maree, D e Nyokong, T. “*Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives*”. *Journal of Molecular Structure*, 650 (1/3), p. 131–140, 2003.
- Oliveira, D.M.; Laçava, Z.G.M.; Lima, E.C.D.; Morais, P.C e Tedesco, A.C; “*Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: A promising dual nanostructured system for câncer treatment*”, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 6, p. 2434-2437, 2006.
- Ough, E.A.; Gasyana, Z e Stillman, M.J. *Inorg. Chem.*, **30**, p. 2301, 1991.
- O’ Riordan , K.; Akilov, O.E e Hasan, T.; “*The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections*”., *Photodiagn. Photodyn. Ther.* , 2, 247-262, 2005
- Parmar, A.; Parekh, P e Bahadur, P.; “*Solubilization and Release of a Model Drug Nimesulide*”. *J. Solution Chem.*, 42, p. 80–101, 2013.
- Pasternack, R.F.; Bustamante, C.; Collings, P.J.; Giannetto, A e Gibbs, E.J. “*Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique*”. *J. Am. Chem. Soc.*, 115(13), p. 5393-5399, 1993.
- Pasternack, R.F e Collings, P.J. “*Resonance Light Scattering: A New Technique for Studying Chromophore Aggregation*”. *Science*, 269, p. 935-939, 1995.
- Pasternack, R.F.; Paula J.C e Robblee, J.H. “*Aggregation of Chlorophyll a Probed by Resonance Light Scattering Spectroscopy*. *Biophysical Journal*, 68, p. 335-341, 1995.
- Pasternack, R.F.; Gibbs, E.J.; Collings, P.J.; de Paula, J.C.; Turzo, L.C e Terracina, A. “*A nonconventional approach to supramolecular formation dynamics. The kinetics of assembly of DNA-bound porphyrins*”. *J. Am. Chem. Soc.*, 120(24), p. 5873-5878, 1998.
- 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*”. *J. Biosci.*, 33, p.231–237, 2008.
- Pereira, M.R. “*Fotofísica de Porfirinas e Ftalocianinas em Matrizes de TiO₂ preparadas pelo método de sol-gel*”. Tese de doutorado, Universidade do Minho. 2004.

- Perussi, J.R.; Yushmanov, V.E.; Monte, S.C.; Imasato, H e Tabak, M.; “*Interaction of primaquine and chloroquine with ionic micelles as studied by ¹H NMR and electronic absorption spectroscopy*”. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.*, 27(1), p. 1-15, 1995.
- Perussi, J.R.; “*Inativação fotodinâmica de microrganismos*”. *Quím. Nova*, 30 (4), p. 988-994, 2007.
- Phoenix, D.A.; Sayed, Z.; Hussain, S.; Harris, F e Wainwright, M.; “*The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against Escherichia coli and Staphylococcus aureus*”. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39, p. 17-22, 2003.
- Pop, S.F.; Iona, R.M.; “*Thermal stability – singlet oxygen quantum yields relationship of some metallophthalocyanine sensitizers for photodynamic tests*”. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 12(9), pp. 1976-1980, 2010.
- Potma, E.O e Wiersma, D.A. “*Exciton superradiance in aggregates: The effect of disorder, higher order exciton-phonon coupling and dimensionality*”. *Journal of Chemical Physics*, 108 (12), p. 4894-4903, 1998.
- Rabello, B.R.; Gerola, A.P.; Pellosi, D.S.; Tessaro, A.L.; Aparício, J.L.; Caetano, W e Hioka, N; “*Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation*”. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 238, p. 53-62 ,2012.
- Rabinowitch, E e Epstein, L.F. “*Polymerization of dyestuffs in solution. Thionine and Methylene Blue*”. *J. Am. Chem. Soc.*, 63(1), p. 69-78, 1941.
- Radford, D.R; Challacombe, S.J; Walter, J.D; “*Denture plaque and adherence of Candida Albicans to denture-base materials in vivo and in vitro*”. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 10 (1), p. 99-116, 1999.
- Rangel-Yagui, C.O.; Hsu, H.W.; Barbosa,L.R.; Caetano, W; Pessoa, A.J.; Tavares, L.C e Itri, R. “*Novel Potential Drug Against T. cruzi and Its Interaction with Surfactant Micelles*”. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12, p. 183-192, 2007.
- Redmond, R.W e Gamlin, J.N. A “*Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules*”. *Photochem. Photobiol.*, 1999, 70(4), p.391-475, 1999.
- Reichardt, C. “*Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*”. H.F. Ebel (Ed.), VCH, Germany, p285-338, 1988.

- Ribeiro, J. *Fotofísica e Determinação de Parâmetros Fotodinamicos da Ftalocianina de Zinco em meios homogêneo e micro-heterogêneo*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2003.
- Ribeiro, A.P.D.; Andrade, M.C.; Silva, J.F.; Jorge, J.H.; Primo, F.L.; Tedesco, A.C.; Pararina, A.C.; “*Photodynamic Inactivation of Planktonic Cultures and Biofilms of Candida albicans Mediated by Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Entrapped in Nanoemulsions*”. *Photochem. Photobiol.*, 2013, 89: 111–119.
- Riess, G. “*Micellization of block copolymers*”. *Prog. Polym. Sci.*, 28, p. 1107–1170, 2003.
- Robertson, J.M. “*An X-ray study of the phthalocyanines. Part II. Quantitative structure determination of the metal-free compound*”. *J. Chem. Soc.*, 615, p. 1195-1209, 1936.
- Rohatgi-Mukherjee, K.K. *Fundamentals of photochemistry, New Age International*, p. 235, 1978.
- Rosa, A e Baerends, E.J. “*Metal-macrocycle interaction in phthalocyanines. Density functional calculations of ground and excited states.*” *Inorg. Chem.*, 33, p.584, 1994.
- Roslaniec, M.; Weitman, H.; Freeman, D.; Mazur, Y e Ehrenberg, B.; “*Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of hypericin, tetrahydroxy helianthone and their derivatives: studies in organic solutions and in liposomes*”. *J. Photochem. Photobiol. B*, 57, p. 149–158, 2000.
- Rossetti, F.C.; Lopes, L.B.; Carollo, A.R.H.; Thomazini, J.A.; Tedesco, A.C e Bentley, M.V.L.B. “*A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy*”. *Journal of Controlled Release*, 155, p. 400–408, 2011.
- Roux, A.H.; Douh´eret, G e Roux-Desgranges, G. “*Molar volumes and isentropic compressions of pluronics L64 and P123 in aqueous surfactant solutions, over the critical temperature range of aggregation*”. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 252, p. 43–50, 2005.
- Ruifrok, A.C e Johnston, D.A. “*Quantification of histological staining by color deconvolution*”. *Anal Quant. Cytol Histol.*, 23, p.291-299, 2001.
- Rurack, K e Spieles, M. “*Fluorescence Quantum Yields of a Series of Red and Near-Infrared Dyes Emitting at 600-1000 nm*”. *Anal. Chem.*, 83 (4), p. 1232–1242, 2011.
- Rutstein, S.; “*The Formation Mechanism of Mesoporous Materials studied by EPR Spectroscopy and Cryo-TEM*”. *Thesis for the degree Doctor of Philosophy*, Scientific Council of the Weizmann Institute of Science Rehovot, Israel, 2007.

- Sakakibara, Y.; Bera, R.N.; Mizutani, T.; Ishida, K.; Tokumoto, M e Tani, T. *Photoluminescence Properties of Magnesium, Chloroaluminum, Bromoaluminum, and Metal-Free Phthalocyanine Solid Films*. *J. Phys. Chem. B*, 105, p.1547-1553, 2001.
- Samkoe, K. S.; Fecica, M.S.; Goyan, R.L.; Buchholz, J.L; Campbell,C.; Kelly, N.M e Cramb, D.T.; “*Photobleaching kinetics of optically trapped multilamellar vesicles containing verteporfin using two-photon excitation*”. *Photochem. Photobiol.*, 82, p.152–157, 2006.
- Santos, H.B.D. “*Colonização por Staphylococcus Aureus meticilina-resistente (MRSA) e seus fatores associados, em pacientes clínicos admitidos no hospital de clínicas de Porto Alegre*”. tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- Sehlotho, N. “*Phthalocyanines: photochemical and Biomimetic Catalytic Behavior*”. (Tese de doutorado), Rhodes University, 2007.
- Sessler, J.L.; Jayawickramarajah, J.; Goulomis, A e Dan Pantos, G.; “*Guanosine and fullerene derived de-aggregation of a new phthalocyanine-linked cytidine derivative*”. *Tetrahedron*, 62, p. 2123–2131, 2006.
- Setubal, C.A. “*Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica*”. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – 2007.
- Sezgin, Z.; Yu ksel, N e Baykara, T. “*Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs*”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 64, p. 261–268, 2006.
- Shiraishi, Y.; Inoue, T e Hirai, T. “*Local Viscosity of Triblock Copolymer Micelle with Cyanine Dyes as a Fluorescent Probe*”. *Langmuir*, 26(22), p-17505-17512, 2010
- Sibata, M.N.; Tedesco, A.C e Marchetti, J.M. “*Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use*”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23, p. 131–138, 2004.
- Silva, C.E.B.; “*Efeito do solvente no espectro de absorção da 5-fluorouracil. Análise de diferentes procedimentos teóricos.*” dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2011.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G.C e Morrill, T. C. “*Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*”, 5ª ed., Guanabara Koogan, RJ, 1994.
- Silva, A. R. A.; *Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de alumínio-cloro (AlPcCl) e indocianina verde em lipossomos.* (tese doutorado), USP Ribeirão Preto, p. 31, 2010.

- Simon, F.; “*A photophysical study of novel silicon and zinc phthalocyanines*”, Durham theses, Durham University, 2002.
- Simplicio, F.I.; Soares, R.R.S.; Maionchi, F.; Santin, O.F e Hioka, N. “*Small aggregates of benzoporphyrin molecules observed in water-organic solvent mixtures*”. *Journal Physical Chemistry A*, 108 (43), p. 9384-9389, 2004.
- Simplicio, F. I.; Soares, R.R.D.; Maionchi, F.; Santin, O e Hioka, N. “*Aggregation of a benzoporphyrin derivative in water/organic solvent mixtures: A mechanistic proposition*”. *J. Phys. Chem. A*, 108(43), p. 9384-9389. 2004.
- Skoog, D.A.; West, D.M. e Holler, F.J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 6^a Ed., Saunders College Pub., Fort Worth, 1992.
- Soncin, M.; Polo, L.; Reddi, E.; Jori, G.; Kenney, M.E.; Cheng, G e Rodgers, M.A.J. “*Effect of the delivery system on the biodistribution of Ge(IV)octabutoxy-phthalocyanines in tumour-bearing mice*”. *Cancer Letters*, 89, p. 101-106, 1995.
- Song, A.; Zhang, J.; Zhang, M.; Shen, T e Tang, J. “*Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles*”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 167, p. 253–262, 2000.
- Spesia, M.B.; Rovera, M e Durantini, E.N. “*Photodynamic inactivation of Escherichia coli and Streptococcus mitis by cationic zinc(II) phthalocyanines in media with blood derivatives*”. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45, p. 2198–2205, 2010.
- Spitz, C e Daehne, S. “*Architecture of J-Aggregates Studied by Pressure-Dependent Absorption and Fluorescence Measurements*”. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem*, 5, 102, p. 738-744, 1998.
- Sternberg, E.D.; Dolphin, D e Bruckner, C. “*Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy*”. *Tetrahedron*, 54, p. 4151–4202, 1998.
- Strom, G.; Belliot, S.O.; Daemen, T e Lasic, D. “*Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system*”. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 17, p. 31–48, 1995.
- Su, Y.; Wang, J e Liu, H.; “*FTIR Spectroscopic Investigation of Effects of Temperature and Concentration on PEO-PPO-PEO Block Copolymer Properties in Aqueous Solutions*”. *Macromolecules*, 35, p. 6426-6431, 2002.
- Swan, C.M.; Nelson, N.B.; Siegel, D.A e Kostadinov, T.S. “*The effect of surface irradiance on the absorption spectrum of chromophoric dissolved organic matter in the global ocean*”. *Deep-Sea Research I*, 63, p. 52–64, 2012.

- Taillefer, J.; Jones, M.C.; Brasseur, N.; “Preparation and characterization of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs “. *J Pharm. Sci.* 89(1):52-62, 2000.
- Takahashi, D.; Oda, H.; Izumi, T e Hirohashi, R. “*Substituent effects on aggreation phenomena in aqueous solution of thiocarbocyanine dyes*”. *Dyes Pigments*, 66, p. 1-6, 2005.
- Tapajós, E.C.C.; Longo, J.P.; Simioni, A.R.; Laçava, Z.G.M.; Santos, M.F.M.A.; Morais, P.C.; Tedesco, A.C e Azevedo, R.B. “*In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine*”. *Oral Oncology*, 44, p. 1073– 1079, 2008.
- Taylor, P.W.; Stapleton, P.D e Luzio, J.P. “*New ways to treat bacterial infections*”. *Drug Discovery Today*, 7, p. 1086–1091, 2002.
- Tessaro, A.L.; Batistela, V.R e Gracetto, A.G. “*Stability of benzoporphyrin photosensitizers in water/ethanol mixtures: pK(a) determination and self-aggregation processes*”. *Journal of Physical Organical Chemistry*, 24, p. 155-161, 2004.
- Tessaro, A.L. “*Estudos comparativos de regioisômeros de benzoporfirinas em meio homogêneo e heterogêneo*”. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Maringá, 2010.
- Torchilin, V.P. *J. Control. Release*, 73, 137–172, 2001.
- Ureña, J.R. “*Características generales de los hongos patógenos humanos*”. *Microbiologia Oral*, 1, p. 362-375, 1995.
- Usuda, J.; Kato, H e Okunaka, T. “*Photodynamic Therapy (PDT) for Lung Cancers*”. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(5), p. 489-493, 2006.
- Valeur, B. “*Molecular Fluorescence Principles and Applications*”, Wiley, Weinheim, 2002.
- van Nostrum, C.F. “*Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy*”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (1), p. 9-16, 2004.
- Vicente, M. G. H. “*Porphyrin-based Sensitizers in the Detection and Treatment of Cancer: Recent Progress*”. *Curr. Med. Chem. – Anticancer Agents*, 1, p. 175-194, 2001.
- Wainwright, M. “*The emerging chemistry of blood product disinfection*”. *Chemical Society Reviews*, 31, p. 128–136, 2002.
- Wanka, G.; Hoffmann, H.; Ulbricht, W. “*Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly (ox yethylene)-Poly (oxypropylene) -Poly(oxyet hylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions*”. *Macromolecules*, 27, p. 4145–4159, 1994.

- West, W e Pearce, S. “*Dimeric State of Cyanine Dyes*”. *J. Phys. Chem.*, 69(6), p. 1894-1903, 1965.
- 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*, 22, p. 113–262, 1993.
- Yokoyama, M.; “*Clinical Applications of Polymeric Micelle Carrier Systems in Chemotherapy and Image Diagnosis of Solid Tumors*”. *J. Exp. Clin. Med.*, 3(4), p.151-158, 2011.
- Xiao, Y.; Hong, H.; Javadi, A.; Engle, J.W.; Xu, W.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Barnhart, T.E.; Cai, W e Gong, S. “*Multifunctional unimolecular micelles for cancer-targeted drug delivery and positron emission tomography imaging*”. *Biomaterials*, 33, p. 3071-3082, 2012.
- Zeina, B.; Greenman J.; Purcell, W.N e Das, B.; “*Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy*”. *British Journal of Dermatology*, 144, p. 274-278, 2001.
- Zhang, X.; Jackson, J.K.; Burt, H.M. “*Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol*”. *Int. J. Pharm.*, 132, p. 195–206, 1996.
- Zhao, Y.Z.; Sun, C.Z.; Lu, C.T.; Dai, D.D.; Lv, H.F.; Wu, Y.; Wan, C.W.; Chen, L.J.; Lin, M e Li, X.K. “*Characterization and anti-tumor activity of chemical conjugation of doxorubicin in polymeric micelles (DOX-P) in vitro*”. *Cancer Letters*, 311, p. 187–194, 2011.
- Zheng, C.; Qiu, L.; Yao, X e Zhu, K.; “*Novel micelles from graft polyphosphazenes as potential anti-cancer drug delivery systems: Drug encapsulation and in vitro evaluation*”. *International Journal of Pharmaceutics*. 373, p: 133–140, 2009.
- Zhou, Z e Chu, B. “*Light-Scattering Study on the Association Behavior of Triblock Polymers of Ethylene Oxide and Propylene Oxide in Aqueous Solution*”. *Journal of Colloid and Interface Science*, 126 (1),1988.