



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DA HIPERICINA E DE
SISTEMAS BIOTRANSPORTADORES VISANDO APLICAÇÃO
ANTITUMORAL.”**

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



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, JUNHO/2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ-UEM

Departamento de Química

Tese de Doutorado

**OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DA HIPERICINA E DE
SISTEMAS BIOTRANSPORTADORES VISANDO
APLICAÇÃO ANTITUMORAL**

Aluno: Renato Sonchini Gonçalves

Orientador: Professor Doutor Wilker Caetano

Maringá, PR

Junho de 2016

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

G635o Gonçalves, Renato Sonchini
Otimização da síntese da hipericina e de sistemas
biotransportadores visando aplicação antitumoral /
Renato Sonchini Gonçalves. -- Maringá, 2016.
174 f. : il. col., figs., tabs., esquemas

Orientador: Prof. Dr. Wilker Caetano.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de
Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016

1. Química Orgânica. 2. Hipericina - Otimização.
3. Fotoquímica - Estudos cinéticos. 4. Sistemas
biotransportadores - Síntese - Micelas. 5. NOESY
(Técnica RMN). 6. Terapia fotodinâmica. 7. Melanoma.
I. Caetano, Wilker, orient. II. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas.
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação
em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 547

MN-003854



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Renato Sonchini Gonçalves**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 28 de junho de 2016.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Wilker Caetano
PRESIDENTE - DQI/UEM

Prof. Dr. Ernani Abicht Basso
MEMBRO - DQI/UEM

Profa. Dra. Andréa Diniz
MEMBRO - DFA/UEM

Prof. Dr. Andersson Barison
MEMBRO - DQ/UFPF

Prof. Dr. Divinomar Severino
MEMBRO - USP

“Dedico este trabalho à minha família: Minha mãe Irma, a meu irmão Rafael, a minha tia Marinez, a minha namorada Francielle e especialmente em memória de meu pai, Oscar.”

“Não deve haver limites para o esforço humano. Somos todos diferentes. Por pior do que a vida possa parecer, sempre há algo que podemos fazer em que podemos obter sucesso. Enquanto houver vida, haverá esperança.”

Stephen Hawking

Agradecimentos

Agradeço,

Ao Professor Wilker Caetano, pela oportunidade que me deu para fazer parte do seu grupo de pesquisa, por sua orientação neste trabalho e sobretudo por sua amizade.

Ao Professor Noboru Hioka, por também ter me aceitado como membro do grupo de pesquisa NUPESF (Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos).

A todos os meus colegas pesquisadores do grupo NUPESP, agradeço pela participação direta e indireta na realização deste trabalho.

Ao Professor Expedido Leite Silva, pela colaboração na etapa de extração e isolamento dos compostos antraquinônicos.

Ao aluno de doutorado Bruno Rabello pela colaboração nos estudos fotoquímicos.

Ao aluno de doutorado Gabriel Batista Cezar pela colaboração nos estudos de formulação das micelas copoliméricas.

As técnicas Ivania Albrecht Schuquel e Ana Maria Barelli pela colaboração nas medidas de RMN.

A Professora Tania Toyomi Tominaga do Depto. De Química da Unicentro pela colaboração nos estudos fotocitotóxicos.

À Direção e a todos os funcionários do Departamento de Química da UEM.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo financiamento de minha bolsa de estudos.

O meu MUITO OBRIGADO!

Resumo

Neste trabalho, três sistemas copoliméricos funcionalizados com moléculas de poliaminas e aminolactama, foram sintetizados e utilizados como matrizes biotransportadoras de hipericina (Hip) visando o tratamento fotodinâmico de células tumorais. Os materiais copoliméricos foram preparados por reação de amidação entre o copolímero ativado P84/COOH e moléculas de poliaminas: espermidina (ESD) e espermina (ESN); e com aminolactamas (APP) com rendimentos satisfatórios (70-75 %). Estudos de RMN de ^1H ASIS e NOESY foram realizados de modo a analisar a solubilidade e localização preferencial das moléculas de Hip encapsuladas nas matrizes copoliméricas de P84 e P84/APP. Estudos de fotocitotoxicidade da hipericina pura (DMSO) e encapsulada nas matrizes copoliméricas em células de melanoma B16F10 foram também realizados tanto no escuro como na presença de irradiação luminosa com luz visível utilizando um sistema de LEDs SMD.

Palavras-chave: Hipericina; fotoquímica; sistemas biotransportadores; NOESY; terapia fotodinâmica; melanoma.

Abstract

In this present work was performed the synthesis of three copolymeric materials base to Pluronic[®] P84 biofuncionalized with polyamine and aminolactam molecules as nanocarrier systems of hypericin (Hyp) aiming the photoinactivation of tumor cells. Copolymeric materials were prepared by amidation reaction between the activated copolymer P84/COOH and polyamines: spermidine (SPD) and spermine (SPN); and aminolactam (APP), in satisfaction yields (70-75 %). NMR ¹H ASIS and 2D NOESY were performed in order to analyse the solubility and preferred location of Hyp molecules encapsulated in the copolymeric matrices of P84 and P84/APP. Phototoxicity studies of Hyp in DMSO and encapsulated on P84 and P84/APP against B16F10 melanoma cells were performed for sham and irradiated with visible-light using warm white LEDs SMD system.

Keywords: Hypericin; photochemistry; drug-delivery systems; NOESY; photodynamic therapy; melanoma.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. A natureza como fonte valiosa de medicamentos	10
1.1.1. Antraquinonas: um presente precioso da natureza	12
1.2. <i>Hypericum perforatum</i> e seus constituintes diantrônicos	16
1.2.1. A utilização da hipericina na terapia fotodinâmica e sua potencial atividade fototerapêutica	19
1.3. Sistemas biotransportadores de fármacos	28
1.3.1. A utilização de Plurônicos® como sistemas biotransportadores	29
1.3.2. Poliaminas como biomoléculas para sistemas biotransportadores	31
1.3.3. Características físico-químicas do Plurônico® P84	34
2. OBJETIVOS	35
3. PARTE EXPERIMENTAL	36
3.1. Reagentes e solventes	36
3.2. Métodos cromatográficos	37
3.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	37
3.2.2. Cromatografia em coluna (CC)	37
3.2.3. Cromatografia por exclusão (CE)	37
3.3. Medidas espectroscópicas e espectrofotométricas	37
3.4. Procedimentos de extração e isolamento das AQs crisofanol, fisciona e emodina a partir da casca da <i>Rhamnus Frangula L.</i>	38
3.4.1. Processos de extração	38
3.4.2. Processos de isolamento	39
3.5. Síntese da hipericina	39
3.5.1. Otimização da reação de redução do emodina antraquinona	39
3.5.2. Preparação do emodina antrona	40
3.5.3. Preparação da protohipericina	40
3.5.4. Otimização da reação de fotoconversão da protohipericina em hipericina	41
3.5.5. Preparação da Hipericina	42
3.6. Funcionalização dos sistemas copoliméricos	42
3.6.1. Preparação do copolímero P84 ativado (P84/COOH)	42
3.6.2. Preparação do copolímero P84/ESD	43

3.6.3. Preparação do copolímero P84/ESN.....	43
3.6.4. Preparação do copolímero P84/APP.....	43
3.7. Preparação e caracterização das micelas copoliméricas de P84/APP	44
3.8. Encapsulamento da hipericina nas matrizes copoliméricas biofuncionalizadas	44
3.9. Ensaio citotóxico da hipericina em DMSO e formuladas em micelas copoliméricas em células de melanoma B16F10.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1. Extração e isolamento das AQs crisofanol, fisciona e emodina	47
4.1.1. Extração das AQs crisofanol, fisciona e emodina.....	47
4.1.2. Otimização dos processos de isolamento das AQs crisofanol, fisciona e emodina.	50
4.1.3. Caracterização das AQs por RMN e UV-vis.....	56
4.2. Otimização da síntese da hipericina	64
4.2.1. Reação de redução de antraquinonas	66
4.2.2. Reação de redução da AQ emodina na presença de SnCl ₂ .2H ₂ O e HCl _{conc}	68
4.2.2.1. Monitoramento cinético da reação de redução da AQ emodina.....	71
4.2.2.2. Caracterização do emodina antrona por RMN de ¹ H e ¹³ C	79
4.2.2.3. Mecanismo proposto para a reação de redução da AQ emodina	84
4.2.3. Preparação da protohipericina via dimerização oxidativa do emodina antrona.....	87
4.2.4. Reação de fotociclização da protohipericina.....	89
4.2.4.1. Monitoramento cinético da reação de fotociclização da protohipericina na presença de uma lâmpada de alta potência (W).....	91
4.2.4.2. Monitoramento cinético da reação de fotociclização da protohipericina na presença de LEDs (mW) de baixa potência.	93
4.2.4.3. Mecanismo da reação de fotociclização de diantronas	102
4.3. Síntese dos materiais copoliméricos: P84/aminolactama (P84/APP), P84/espermidina (P84-ESD) e P84/espermina (P84/ESN).....	105
4.3.1. Caracterização dos materiais copoliméricos por RMN ¹ H e RMN 2-D COSY	107
4.3.2. Avaliação, via NOESY, do arranjo das moléculas de APP nas estruturas micelares do copolímero P84-APP.....	120

4.3.3. Avaliação da solubilidade e localização das moléculas de Hip encapsuladas nas micelas copoliméricas de P84.....	124
4.4. Avaliação dos efeitos fotocitotóxicos da Hip pura e formuladas nos sistemas copoliméricos P84 e P84/APP em células de melanoma B16F10	140
4.4.1. Efeito fotocitotóxico da Hip pura (DMSO)	140
4.4.3. Efeito fotocitotóxico da Hip encapsulada em P84/APP	145
5. CONCLUSÕES.....	150
7. REFERÊNCIAS	152

LISTA DE ABREVIATURAS

λ = Comprimento de onda

d1 = Delay time

δ : Deslocamento químico

$^1\text{O}_2$: Oxigênio singlete

T_m : Mixing time

Abs: Absorbância

ADH: Álcool desidrogenase

APP: 1-(3-aminopropil)-2-pirrolidona

AQ: Antraquinona

ASIS: Aromatic solute induced shift

CC: Cromatografia de coluna

CCD: Cromatografia de camada delgada

CE: Cromatografia por exclusão

CK2: Tirosina kinase

CMC: Concentração micelar crítica

COSY: Correlação espectroscópica

DAO: Diaminaoxidase

DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida

DCU: Dicicloexiluréia

DLS: Dynamic Light Scattering (espalhamento de luz dinâmica)

DMAP: 4-(Dimetilamino)piridina

DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado

DOX: Doxorrubicina

EPR: Efeito de permeação e retenção

ESD: Espermidina

ESN: Espermina

FDA: *U.S. food and drug administration*

FM: Fase móvel

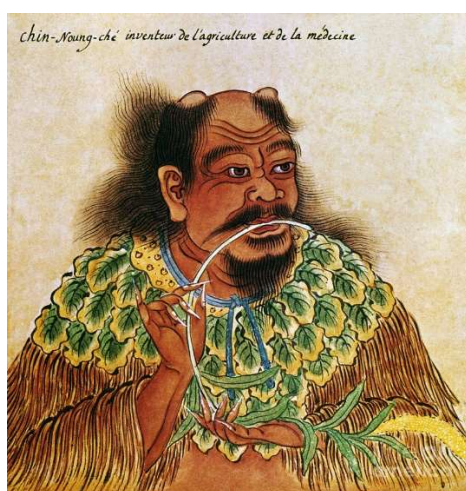
J: Constante de acoplamento
LEDs: Diodos emissores de luz
MDR: Resistência do tumor a multidrogas
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
mW: miliWatt
 N_{Abs} : Número de fótons absorvidos
NHS: N-hidroxissuccinimida
NMDA: N-metil-*D*-aspartato
NMP: N-metilpirrolidona
NOESY: Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
ODC: Ornitina descarboxilase
 $P_{Abs,I}$: Potência de luz individual absorvida
 $P_{Abs,T}$: Potência de luz total absorvida
PAs: Poliaminas
PBS: Tampão fosfato-salino
 P_{em} : Potência de luz emitida
PEO: Poli(óxido de etileno)
PPO: Poli(óxido de propileno)
PVP: Polivinilpirrolidona
Rf: Retention time (tempo de retenção)
RMN de ^1H : Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C : Ressonância magnética nuclear de carbono-13
 S_0 : Estado fundamental
 S_1 : Estado excitado singlete
SPDS: Espermidina sintase
SPMS: Espermina sintase
 T_1 : Triplete excitado de baixa energia
TEA: Trietilamina
TFD: Terapia fotodinâmica
TMC: Temperatura micelar crítica

**OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DA HIPERICINA E DE SISTEMAS
BIOTRANSPORTADORES VISANDO APLICAÇÃO ANTITUMORAL**

1. INTRODUÇÃO

1.1. A natureza como fonte valiosa de medicamentos

Na antiga China, aproximadamente 3.000 a.C, reinava a figura de Shen Nong, cuja tradução de seu nome literalmente significa divino agricultor. Criador da fitoterapia chinesa, Shen Nong também era conhecido como o imperador dos cinco grãos (Figura 1). Relatos históricos descrevem que Shen tinha a habilidade de testar mais de cem ervas por dia, selecionando e descrevendo em detalhes aquelas que efetivamente dispunham de alguma propriedade terapêutica. Como resultado de seu árduo trabalho, inúmeras plantas, potencialmente ativas, tornaram-se parte da rotina dos povos asiáticos no tratamento de muitas enfermidades. Anos depois, quando as plantas e suas propriedades terapêuticas foram devidamente catalogadas formalmente pelo imperador, deu-se origem ao livro clássico da medicina chinesa, *Herbal Classic of Shen Non* (Figura 1) o qual, em 1988 teve uma versão traduzida para o inglês (Shou-Zhong, 1998).



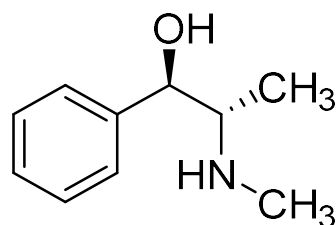
Fonte: Site arianasiresearch.wordpress.com

Figura 1. A esquerda, pintura do imperador Shen Nong e a direita, a capa original do livro *Herbal Classic of Shen Nong*.

Dentre a grande variedade de plantas catalogadas no livro, a *Ma Huang* (*Ephedra distachya* L.), é sem dúvida, de destaque especial, cuja sua descoberta foi um importante marco para a medicina tradicional chinesa. A partir da *Ma Huang*, os Chineses eram capazes de extrair uma importante substância, a qual ficou denominada por eles como “substância milagrosa” (Figura 2). Tal substância tinha razão de ser assim chamada, devido a sua ampla faixa de propriedades farmacológicas, a qual era utilizada no alívio de uma simples tosse, como também no tratamento paliativo de muitas doenças crônicas inflamatórias, como a asma (Lee, 2011). Mas, embora os conhecimentos empíricos adquiridos pela relação direta entre o homem e a natureza faziam-se necessários para o aperfeiçoamento de novas técnicas medicinais e sobretudo para a evolução da ciência como um todo, ainda não eram suficientes para o entendimento de muitos enigmas impostos pela natureza. Contudo, no decorrer das transformações da sociedade, como por exemplo, nas mudanças sofridas na Europa, entre os séculos XVIII e XIX, com o advento da revolução industrial, culminaram o surgimento de doenças de cunho infecciosas, tais como a cólera e a tuberculose (Vynnycky e Fine, 1997). Neste contexto, o homem se viu obrigado a explorar cada vez mais a fundo, as fontes naturais medicamentosas, aperfeiçoando suas habilidades em extrair e manipular substâncias para a criação de novos medicamentos. E foi assim que em quase todas as partes do mundo, a evolução do conhecimento científico, atrelados com as mudanças socioeconômicas foram fundamentais para o nascimento de uma nova ciência. Em 1815, o farmacêutico Alemão, Christianus A. Seydler, criara pela primeira vez, em um dos seus trabalhos denominado *Analecta Pharmacognostica*, o termo farmacognosia, o qual ficou designado ao estudo das matérias de origem natural (Seydler, 1815). Assim, com sua evolução, foi possível, em meados do século XIX, a criação das principais farmacopéias, onde uma enorme variedade de novos medicamentos e procedimentos terapêuticos foram devidamente catalogados, e muito dos quais, ainda hoje, são utilizados com eficácia no tratamento de muitas enfermidades (Mukherjee e Dasgupta, 1946; Atwater, 1957).

Em 1885, com o aperfeiçoamento de novas técnicas experimentais, porém ainda rudimentares, o japonês químico orgânico Nagai Nagayoshi teve o feito de isolar e

caracterizar, pela primeira vez, a efedrina, como sendo o princípio ativo da famosa substância milagrosa (Figura 2), a qual foi comercializada industrialmente, trinta e cinco anos depois, pela companhia *Merck*, com o nome de *Ephetonin* e utilizada, principalmente, como descongestionante nasal, broncodilatador e vasopressor (Lee, 2011).



Efedrina

Fonte: Site florafinder.com.

Figura 2. A esquerda, foto da planta *Ephedra distachya* L., e a direita, estrutura química da efedrina.

1.1.1. Antraquinonas: um presente precioso da natureza

Como dito anteriormente, a natureza foi muito generosa em produzir uma quantidade enorme de poderosas substâncias farmacologicamente ativas. Dentre as muitas variedades disponíveis, e que efetivamente puderam ser extraídas e catalogadas em farmacopéias, destacam-se as antraquinonas (AQs). As AQs são pigmentos químicos naturais, derivados da família das quinonas e se enquadram em um grupo de compostos de coloração variada, as quais são encontradas desde amarela ao púrpura, dependendo da natureza e posição dos grupos químicos substituintes (Caro e colab., 2012; Ledwani e Dave, 2012). Na natureza, uma grande diversidade de representantes antraquinônicos já foram encontrados em tipos variados de animais, plantas e micro-organismos, incluindo fungos, líquens e bactérias. Embora, o motivo pelo qual ocorra a biossíntese das AQs nos micro-organismos tenha sido pouco estudado, sabe-se, que nos animais e

vegetais, as AQs funcionam como “barreiras” de proteção contra ataques de agentes patogênicos (Anke e colab., 1980). No reino animal, as AQs encontram-se presentes em poucos, mas em uma grande variedade de espécies de diferentes habitats. Alguns invertebrados marinhos pertencentes à classe das equinodermas tais como estrelas, lírios, ouriços e pepinos do mar, são produtores de AQs (Utkina E Maksimov, 1978; El-Beih e colab., 2007).

Nos vegetais, as AQs são encontradas em maiores proporções, como metabólitos secundários em uma ampla variedade de plantas do tipo angiospermas e gimnospermas, como é o das famílias: Rubiaceae, Poligonáceas, Rhamnaceae, Fabaceae, Liliaceae, Bignoniaceae e Pedaliaceae. De modo geral, as AQs podem ser extraídas das cascas e raízes secas das plantas, majoritariamente na forma de derivados glicosilados (AQ-Gli), como é o caso da frangulina A e B, cujas posições C1, estão presentes, respectivamente, moléculas de *O*-ramnose e *O*-Piranose (Figura 3).

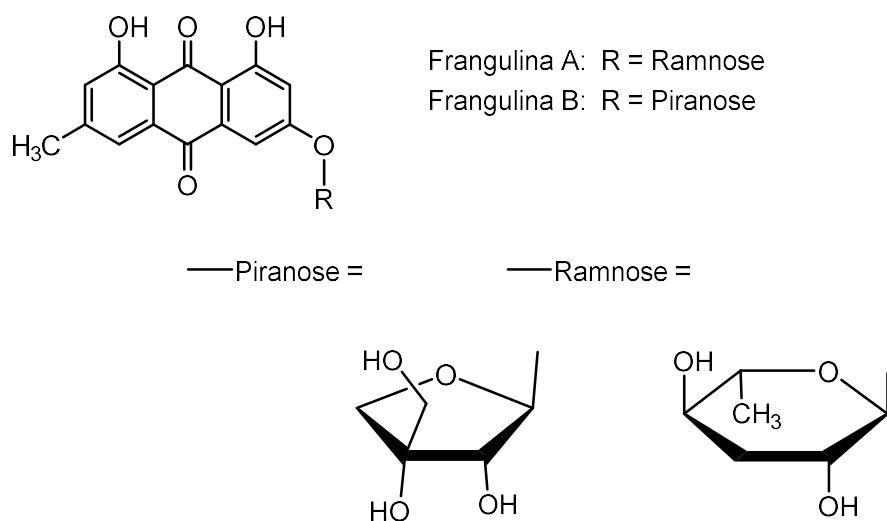


Figura 3. Representação estrutural das AQs-Gli: Frangulina A e B.

As AQs podem também ser encontradas, em menor quantidade, na forma aglicosilada (AQ-aGli), como ocorre com a reina, aloe-emodina, crisofanol, fisciona, e emodina (Figura 4).

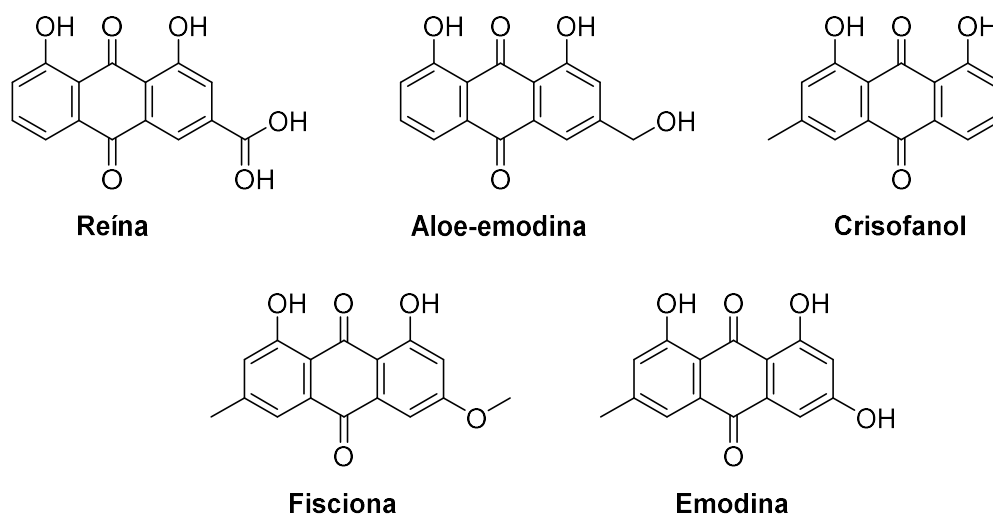


Figura 4. Representação das estruturas químicas das AQs-aGli: Reína, aloe-emodina, crisofanol, fisciona e emodina.

Além dessas duas, as AQ também podem ser encontradas na forma de dímeros, denominados de diantronas, os quais são resultados do acoplamento oxidativo entre duas antronas (forma reduzida da antraquinona), como é o caso dos senosídeos A e B, presentes em grande quantidade em plantas do gênero *Senna* (Figura 5).

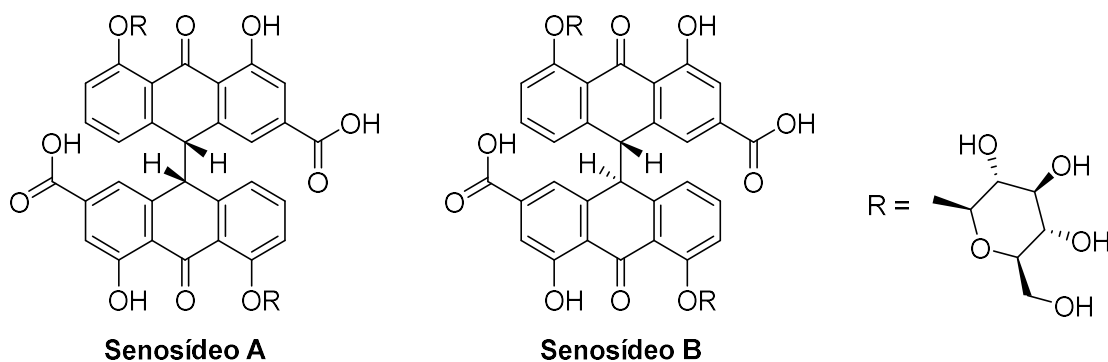


Figura 5. Representação das estruturas químicas dos senosídeos A e B encontrados majoritariamente nas folhas e vagem de plantas do gênero *Senna*.

As AQs, além das formas citadas acima, são frequentemente encontradas em suas formas reduzidas, mediante a reação com doadores de prótons, dando lugar à forma de antranol e seu correspondente isômero antrona, ou ainda, podendo ser encontrada na forma de oxantranol, comumente presentes nos vegetais como uma espécie intermediária entre as formas de antraquinona e antranol (Figura 6).

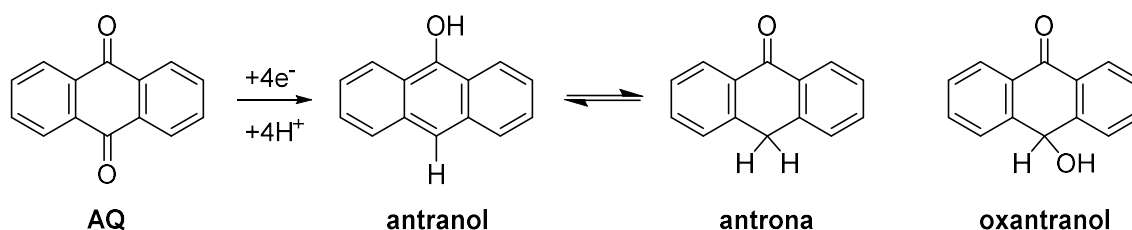


Figura 6. Representação das estruturas químicas dos isômeros antranol e antrona, e da espécie intermediária, oxantranol.

No final da década de 1940, um seleto grupo de professores da escola de farmácia da Universidade de Londres, incluindo o pesquisador J.M. Fairbairn, de renome mundial na área de produtos naturais, se dedicaram aos estudos pioneiros na extração de compostos antraquinônicos a partir de fontes vegetais. Em 1949, Fairbairn, publicou seu primeiro trabalho, dentre uma coleção de 12 artigos, sobre os constituintes ativos de purgativos vegetais contendo AQs-aGli (Fairbairn, 1949). Dois anos depois, Fairbairn e Saleh demonstraram que a potencialidade biológica das plantas do gênero *Senna*, frente a inativação de micro-organismos, era devido à presença majoritária dos senosídeos A e B (Fairbairn e Saleh, 1951a). Um mês depois, os autores publicaram um comunicado na revista *Nature*, reiterando que a principal causa da potencialidade biológica dessas plantas, frente a micro-organismos, era devido ao efeito sinérgico exercido pela fisiona, a qual está presente em uma proporção de, aproximadamente, 15 % em relação às outras AQs (Fairbairn e Saleh, 1951). Nos anos seguintes, muitos trabalhos foram publicados sobre a versatilidade e potencialidade das AQs, sobretudo, frente a micro-organismos e células tumorais (Feng e colab., 1962; Kawai e colab., 1984; Elujoba e colab., 1989). A habilidade das AQs em inativar micro-organismos está relacionada a seus efeitos

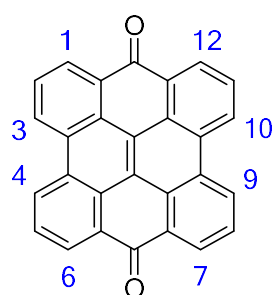
mutagênicos, com destaque para o efeito de *frame-shift*, o qual está associado a inserção e deleção do número de nucleotídeos na sequência de DNA, levando a interferências na síntese proteica, e conseqüentemente à inativação celular (Ames, 1984; Saha e colab., 2013; Yeap e colab., 2015). Por outro lado, estudos recentes, tem mostrado que alguns tipos de AQs, especialmente as hidroxiladas, são capazes de interagir com pares de bases nitrogenadas, constituintes do DNA, levando a danos estruturais irreversíveis (Gholivand e colab., 2011).

Destacadamente, a AQ emodina, tem recebido muita atenção nos últimos anos, em razão da sua ampla e potencial atividade terapêutica, principalmente na atuação como agente anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral e antineoplásico (Gao e colab., 2011; Zhang e colab., 2014; Liu e colab., 2013; Yiu e colab., 2014). Estudos recentes têm demonstrado que o principal modo de ação do emodina está associado, em parte, a sua capacidade em atuar como agente imunossupressor, pela inibição da proteína tirosina quinase (CK2), especificamente, por substituição de sua ligação à molécula de ATP, levando a desestruturação da célula via mecanismo de apoptose. (Battistutta e colab., 2000, Olsen e colab., 2007, Huang e colab, 2008). Além de suas propriedades terapêuticas, a AQ emodina tem sido extensivamente utilizada como molécula precursora para a síntese de outras AQs de estruturas químicas mais complexas, como é o caso da diantrona hipericina, a qual será discutida em detalhes nas próximas sessões.

1.2. *Hypericum perforatum* e seus constituintes diantrônicos

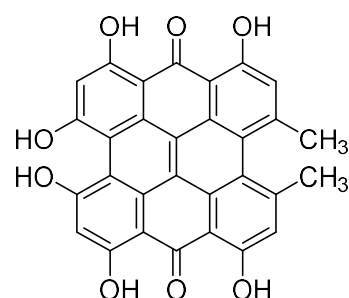
Fenantroperileno quinonas, é uma classe de compostos cujos constituintes apresentam em suas estruturas químicas, múltiplas conjugações de elétrons π , para formação de um sistema cromofórico (Figura 7-a). Formas derivadas são comumente encontradas como resultado da substituição, em posições periféricas, de grupos hidroxílicos e em menor quantidade de grupos alquílicos, como é o caso da diantrona hipericina, um fotossensibilizador (FS) de grande destaque dentro do grupo dos pigmentos orgânicos naturais (Figura 7-b).

(a)



Fenantroperileno quinona

(b)



Hipericina

Figura 7. (a) Estrutura química e numeração da fenantro[1.10.9.8-opqra]perileno-7,14-diona, também nomeada como meso-naftodiantrona e (b) estrutura química da hipericina.

Naturalmente, as diantronas estão presentes como constituintes bioativos em uma variedade de plantas do gênero *Hypericum*, pertencentes a família Guttiferae, cuja espécie mais comum é a *Hypericum perforatum*, popularmente conhecida como erva de São João, a qual segundo a lenda, ao ser macerada ou tritura adquire uma forte coloração avermelhada, simbolizando o sangue derramado pelo profeta São João Batista (Figura 8).



Fonte: Site florafinder.com e site a bíblia.org.

Figura 8. A esquerda fotografia da planta *Hypericum perforatum* e a direita, representação do martírio do profeta São João Batista.

Embora espécies da planta possam estar presentes em diversas partes do mundo, são nas regiões Mediterrâneas e no norte da África que são encontradas em maiores quantidades. Uma das mais antigas referências da utilização de extratos da planta, é encontrada na medicina tradicional, no Século I, no livro *De Materia Medica*, escrito por Discorides, médico do imperador romano Nero (Buttner, 1998). Outros relatos históricos datam suas utilizações, nos séculos XV e XVI, por autores Gregos e Romanos, passando de Galenus a Paracelsus e Matthiolus, os quais consideravam os extratos da planta como um remédio de grande valor universal. Sua ampla faixa de propriedades medicamentosas, justificava sua quase soberania na utilização como medicamento no tratamento de muitas enfermidades. Tamanha era a potencialidade terapêutica da planta, que passou a ser popularmente conhecida como “*fuga daemonum*” cuja tradução, fuga do demônio, era em alusão a sua “mágica” capacidade de aliviar e curar sintomas diversos, principalmente àqueles oriundos da depressão. Como descrito no famoso livro de Nicholas Culpeper (*The English Physitian e Complete Herbal*): “erva de São João designadamente utilizada para o tratamento de feridas e queimaduras, para todas as formas de vômito, para as mordidas de criaturas venenosas, para expelir a cólera e o sangue coagulado no estômago, para o alívio de distúrbios nervosos, dores abdominais e urogenitais...” deixa claro sua ampla faixa de atividade terapêutica (Culpeper, 1653).

Nos anos seguintes, o uso da planta passou a ter uma forte ligação com o termo “síndrome do hipericismo” após um episódio notório no qual ovelhas Australianas morreram sob a luz do sol após a ingestão de grandes quantidades de plantas do gênero *Hypericum*. Apesar desse e de outros eventos trágicos relacionados ao hipericismo, foi possível, no século XIX, atribuí-los aos efeitos fotodinâmicos dos pigmentos orgânicos presentes nas plantas. Em 1911, Cerny isolou pela primeira vez, a hipericina, cujo nome, foi atribuído por ele em alusão ao hipericismo (Cerny, 1911). Vinte e oito anos depois, Brockmann isolou, a partir das espécies *Hypericum perforatum e hirsutum*, a hipericina em sua forma pura (Brockmann e colab., 1939). Nos anos seguintes, os trabalhos envolvendo as fenantroperilenos quinonas passaram a ser escassos na literatura, quando somente na década de 1980 eles foram lembrados com a descoberta

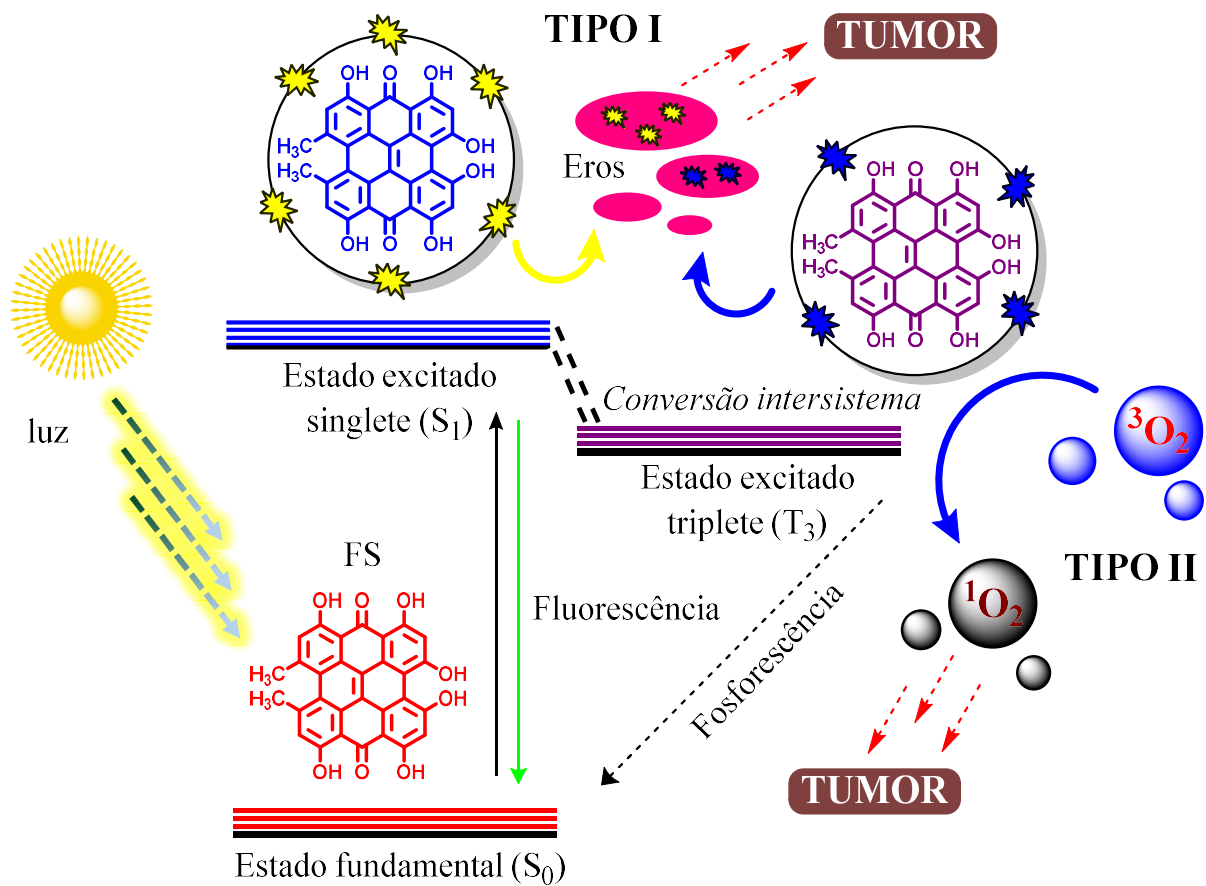
dos efeitos antivirais que a hipericina apresentara (Hudson, Lopezbazzocchi e Towers, 1991).

1.2.1. A utilização da hipericina na terapia fotodinâmica e sua potencial atividade fototerapêutica

Hipericina tem recebido grande atenção nos últimos anos devido a suas potenciais propriedades biológicas e fototerapêuticas, além de sua utilização no fotodiagnóstico de células tumorais (Li e colab., 2016). Além disso, um volume grande de reportes clínicos têm demonstrado seu uso como fotossensibilizador em aplicações na terapia fotodinâmica (TFD). Desta forma, a utilização da TFD combinada com a Hip (Hip-TFD) tem ganhado destaque na medicina em decorrência de sua eficiência na fotoativação de uma variedade de micro-organismos e células cancerígenas, tais como: células de câncer de mama humano (MCF-7), células de leucemia (HL-60 e K562), células de carcinoma de ovário humano (A2780), células de carcinoma cervical humano (HeLa), células de rim humano embrionário (HEK), células de melanoma unipigmentada (A375, UCT Mel-3 e 501mel) e pigmentada (UCT Mel-1) e células de mieloma humano (SP2/0), (Acar e colab., 2014; Jendzelovska e colab., 2014, Penjweini e colab., 2014; Kleemann e colab., 2014; Xu e colab., 2015).

A TFD aplicada no tratamento do câncer envolve basicamente duas etapas: Primeiro, o FS administrado topicamente ou intravenosamente é capturado pelas células do tecido tumoral e em seguida, o tumor é irradiado com uma luz de comprimento de onda específico. Desse modo geral, a Hip ao receber fótons, passa a funcionar como um agente de transferência de energia, ativando moléculas de oxigênio (estado triplete), as quais se tornam altamente reativas (estado singlete) levando à fotodestruição de moléculas relevantes, desta forma induzindo a morte celular, através de mecanismos distintos tais como apoptose e necrose (Buytaert, Dewaele e Agostinis, 2007; Kessel e Oleinick, 2010; Dewaele e colab., 2010). Em nível molecular, a ação fotodinâmica da Hip pode ser melhor compreendida através de dois mecanismos (Esquema 1): No mecanismo conhecido como tipo I, as moléculas de Hip ao absorverem fótons são

levadas de um estado fundamental (S_0) a um estado excitado singlete (S_1), cuja transferência de energia para moléculas e substratos orgânicos próximos, bem como espécies reativas de oxigênio (EROS), dão lugar à espécies radicalares de alta reatividade; já no mecanismo tipo II, ao absorverem luz, as moléculas de Hip são levadas do estado S_1 a um estado excitado tripleto de menor energia (T_3), onde parte da energia é transferida para moléculas de oxigênio (estado tripleto), presentes em abundância nos tecidos biológicos, as quais por sua vez, são convertidas em um estado singlete (1O_2) de alta reatividade para os tecidos alvos. (Bernal e colab., 2015; Kashef, Karami e Djavid, 2015; Zhang e colab., 2015). Contudo, um ponto negativo que tem inviabilizado a utilização da Hip em larga escala tem sido seu alto valor comercial (1 mg ~ R\$ 2.000,00). Uma vez que os processos de isolamento da Hip em sua forma pura exigem um grau elevado de dificuldade e demandam muito tempo, processos sintéticos tem sido uma excelente estratégia para sua obtenção.

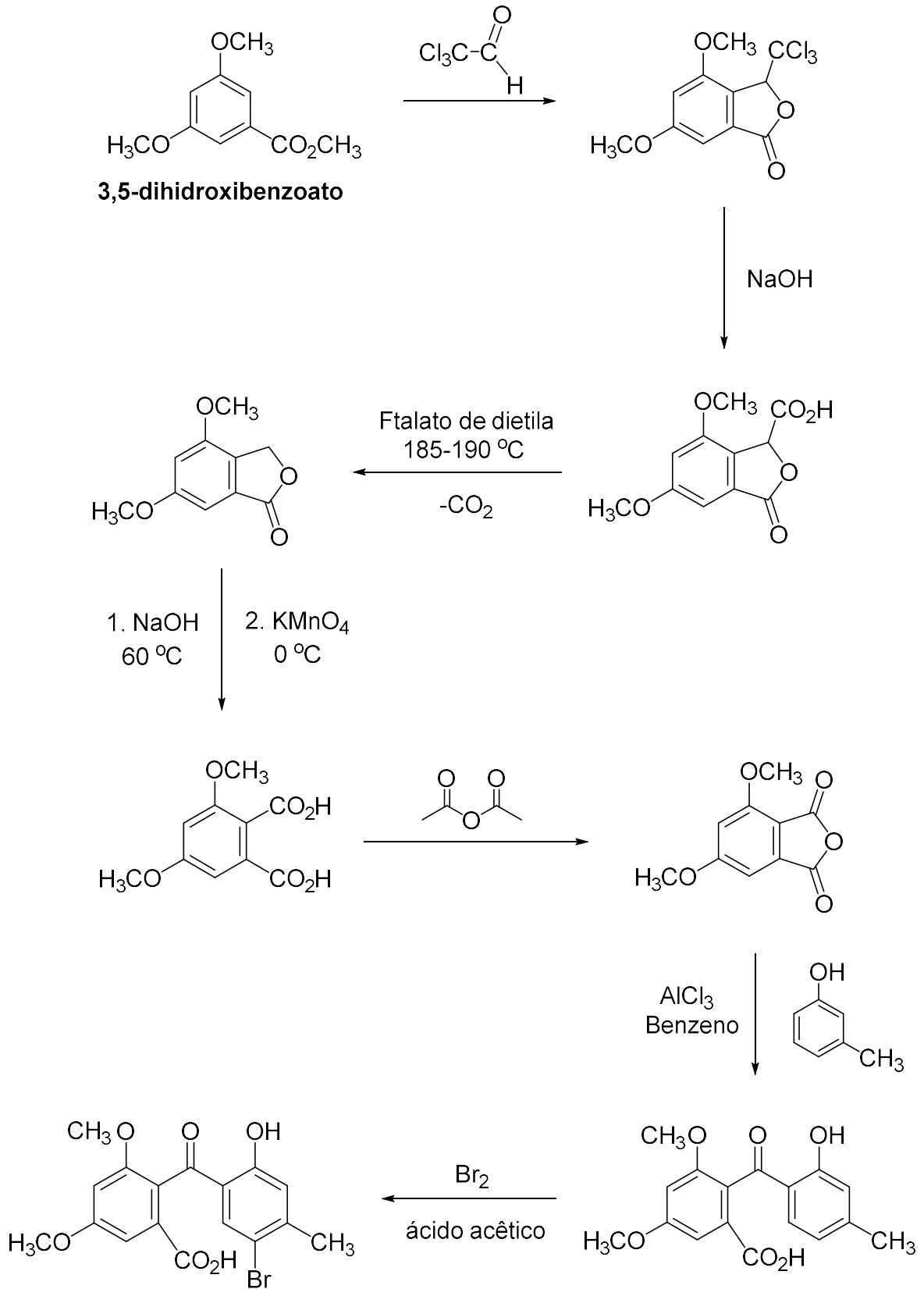


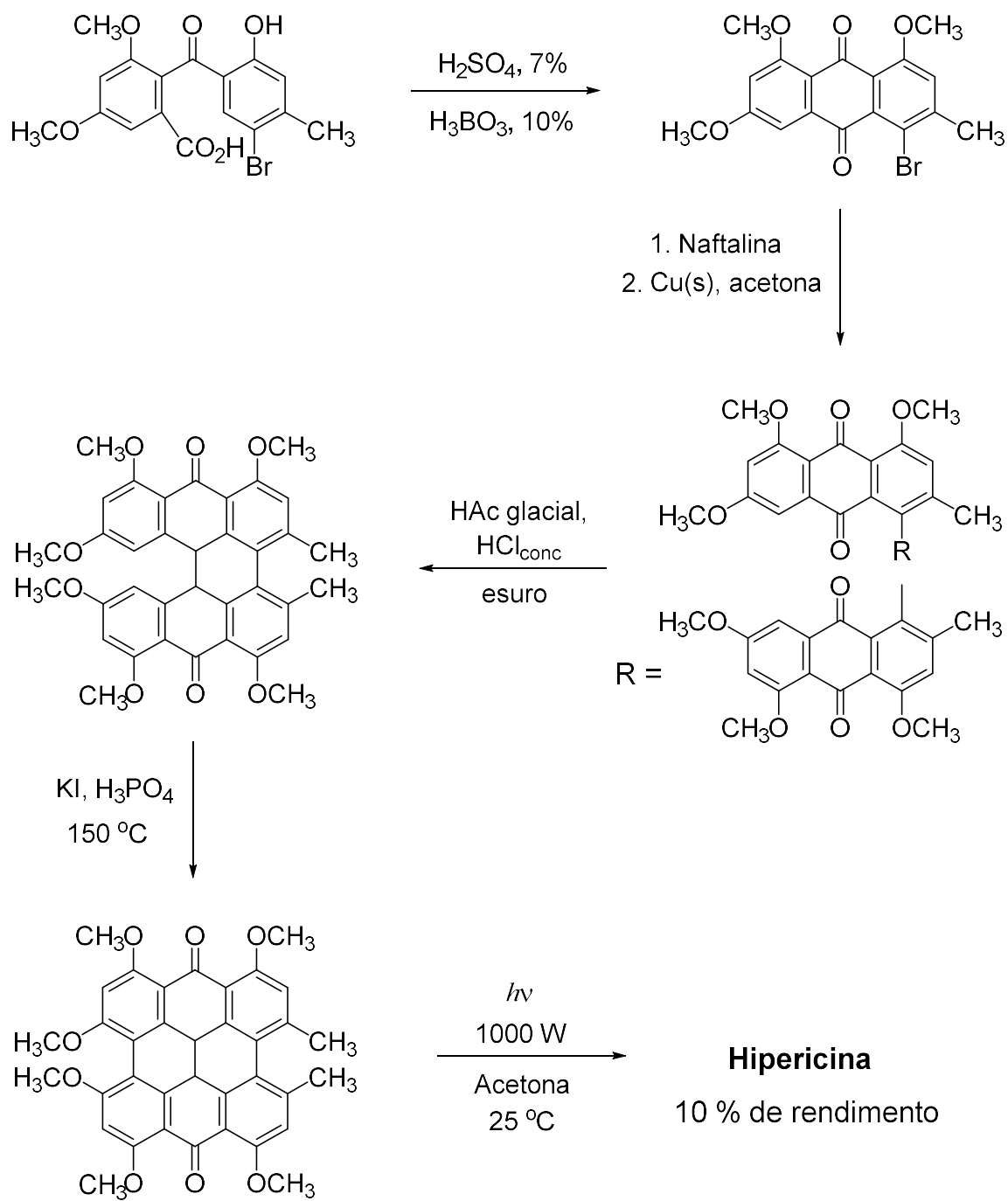
Fonte: Elaborada pelo autor.

Esquema 1. Representação simplificada dos dois possíveis mecanismos de ação fotodinâmica da Hip: Mecanismo tipo I, excitação da molécula de Hip de S₀ para S₁ seguida da transferência de energia para ativação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e mecanismo tipo II, transferência de energia da Hip de S₁ para T₃ (relaxação), seguido da transferência de energia para as moléculas de oxigênio, as quais são elevadas a um estado singlete (¹O₂) de alta reatividade.

1.2.2. Síntese da hipericina

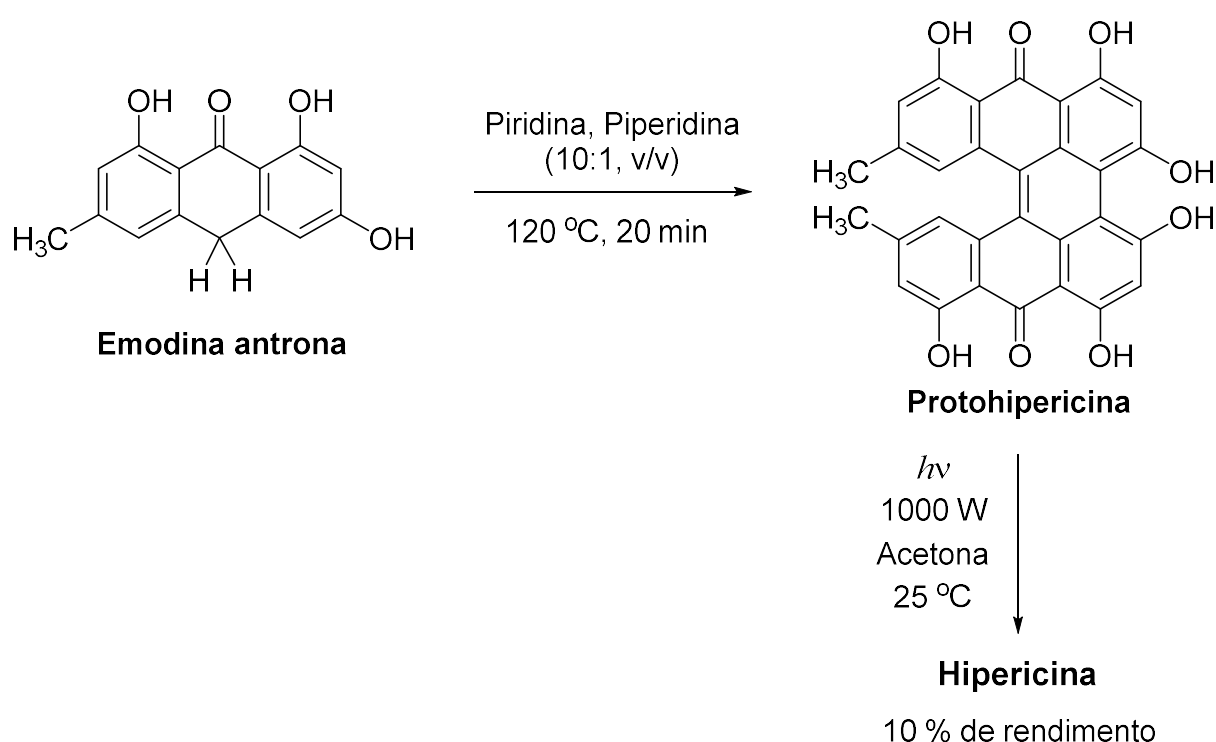
Em 1957, Brockmann e colaboradores, desenvolveram, pela primeira vez, a síntese total da Hip. Partindo-se do precursor metil 3,5-dihidroxibenzoato, foram necessárias doze etapas para a obtenção de aproximadamente, 10 % de Hip, (Esquema 2), (Brockmann, Kluge e Muxfeldt, 1957). Entretanto, o baixo rendimento obtido para o processo exigia com que o preparo da Hip fosse realizado em larga escala. Nos anos seguintes, outras propostas de síntese foram desenvolvidas com o intuito de simplificar o processo, tornando-o economicamente mais viável.





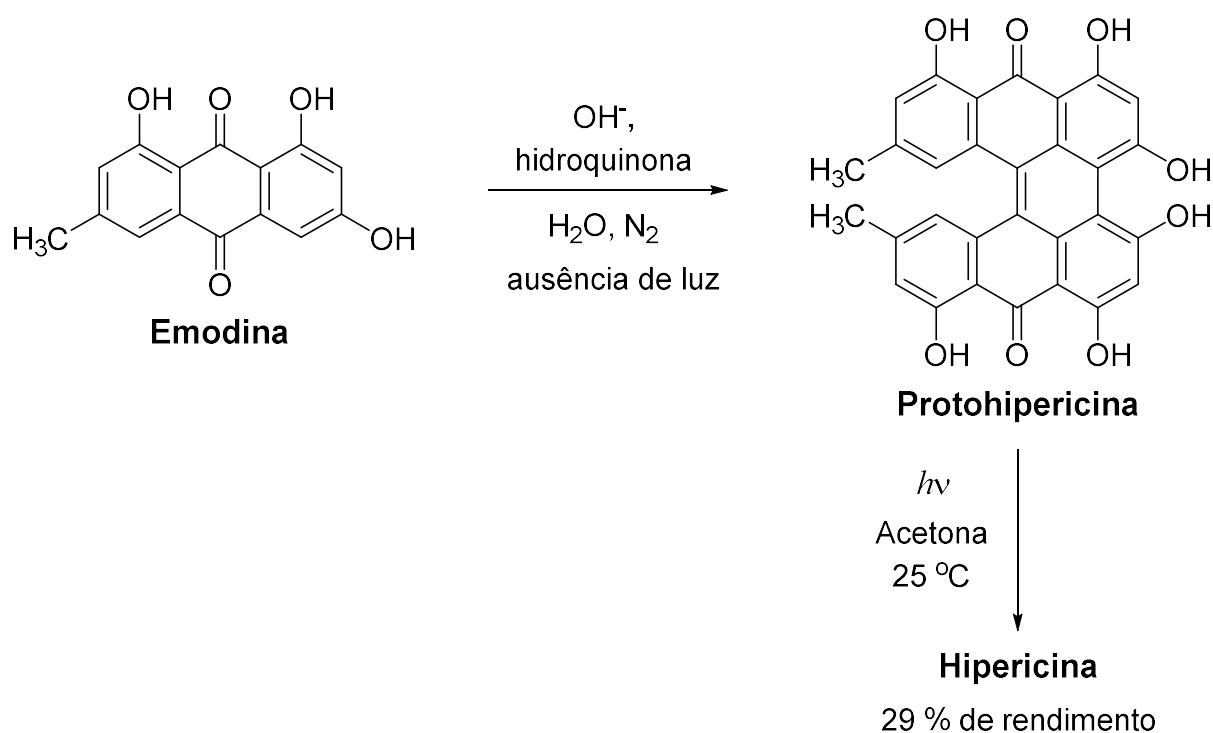
Esquema 2. Síntese total da Hip descrita por Brockmann e colaboradores (Brockmann, Kluge e Muxfeldt, 1957).

Um ano depois, Brockmann e Eggers, propuseram uma metodologia para a preparação de Hip em um processo envolvendo apenas duas etapas (Brockmann e Eggers, 1958). Partindo-se do emodina antrona, o mesmo sofre uma reação de dimerização oxidativa na presença de uma mistura de piridina : piperidina (10 : 1) para obtenção de aproximadamente 10 % da diantrona protohipericina, a qual por sua vez é submetida à reação de fotociclização na presença de uma fonte de irradiação de alta potência (1000 W), para a formação de (Esquema 3). Mas, embora os autores tenham conseguido propor uma metodologia relativamente mais simples que a anterior, o rendimento total do processo ainda não superava os 10 %.



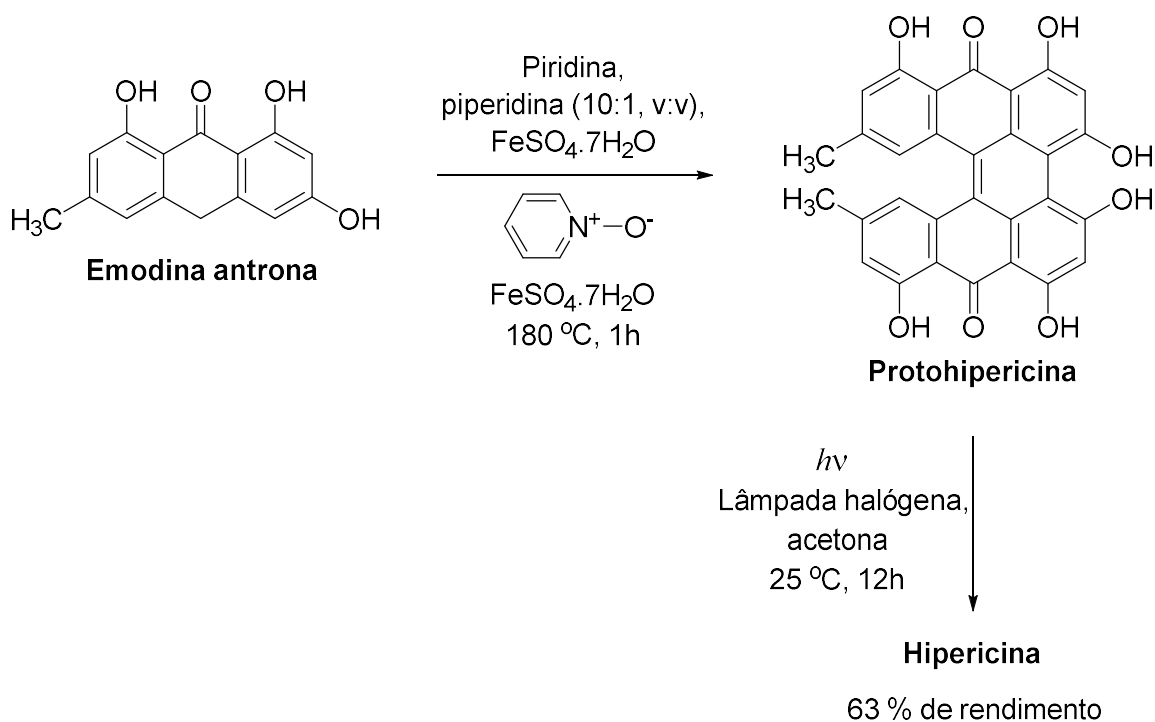
Esquema 3. Síntese da Hip proposta por Brockmann e Eggers, envolvendo um processo em 2 etapas: dimerização oxidativa do emodina antrona e fotociclização da protohipericina (Brockmann e Eggers, 1958).

Dezoito anos depois, Rodewald e colaboradores propuseram uma nova metodologia para obtenção da Hip, com 29 % de rendimento (Rodewald e colab., 1976). Neste processo, a AQ emodina é submetido à reação de dimerização alcalina na presença de *terc*-butóxido de potássio e hidroquinona, segundo o método de Steglich, proposto em 1973, para obtenção direta da protohipericina (Esquema 4), (Steglich e colab., 1973). No entanto, se por um lado o rendimento do processo tenha sido maior com relação aqueles obtidos nas metodologias propostas anteriormente, as condições experimentais (3 semanas de reação à 110 °C) tornara o processo desfavorável para a preparação da Hip.



Esquema 4. Síntese da Hip proposta por Rodewald e colaboradores, através da metodologia de Steglich, em um processo de duas etapas: dimerização alcalina da AQ emodina, seguida da fotociclização da protohipericina.

Somente em 1989, Mazur e colaboradores patentearam um processo para obtenção da Hip com um rendimento satisfatório de 63 %, o que tem viabilizado a síntese da Hip em menores escalas (por exemplo 10 mg) (Mazur, Bock e Lavie, US5120412A, 1989). Nesta patente, os autores utilizaram a mesma metodologia proposta inicialmente por Brockmann, em 1957, para obtenção da protohipericina, porém, combinada com uma fonte doadora de oxigênio (N-óxido de piridina) e na presença de sulfato ferroso heptahidratado, como catalizador, tornando o processo de dimerização oxidativa mais eficiente (Esquema 5). Por ser uma metodologia bastante eficaz, passou a ser utilizada nos trabalhos publicados posteriormente envolvendo a preparação da Hip e seus derivados (Falk e Tran, 1996; Lackner, Ettlstorfer e Falk, 2004; Lackner, Popova e Ettlstorfer, 2005; Cona e colab., 2014). Por outro lado, a partir dos trabalhos encontrados na literatura que descrevem modificações experimentais das etapas de redução do emodina e fotociclização da protohipericina (Waser e colab., 2005; Fonge e colab., 2008; Tobia e colab., US20120245392A1, 2012). Todavia, considerando-se o valor comercial, relativamente elevado do precursor emodina (50 mg ~ R\$ 600,00), a preparação da Hip e de seus derivados torna-se um processo de custos relativamente elevados, sobretudo, em produções em larga escala. Desta forma, quaisquer alterações nas etapas do processo de síntese que possam favorecer um aumento de rendimento e/ou pureza, são informações importantes na redução de custos.



Esquema 5. Processo de síntese da Hip patenteado por Mazur, Bock e Lavie em 1989, empregando o uso de N-óxido de piridina e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como catalisadores na etapa de dimerização oxidativa do emodina antrona.

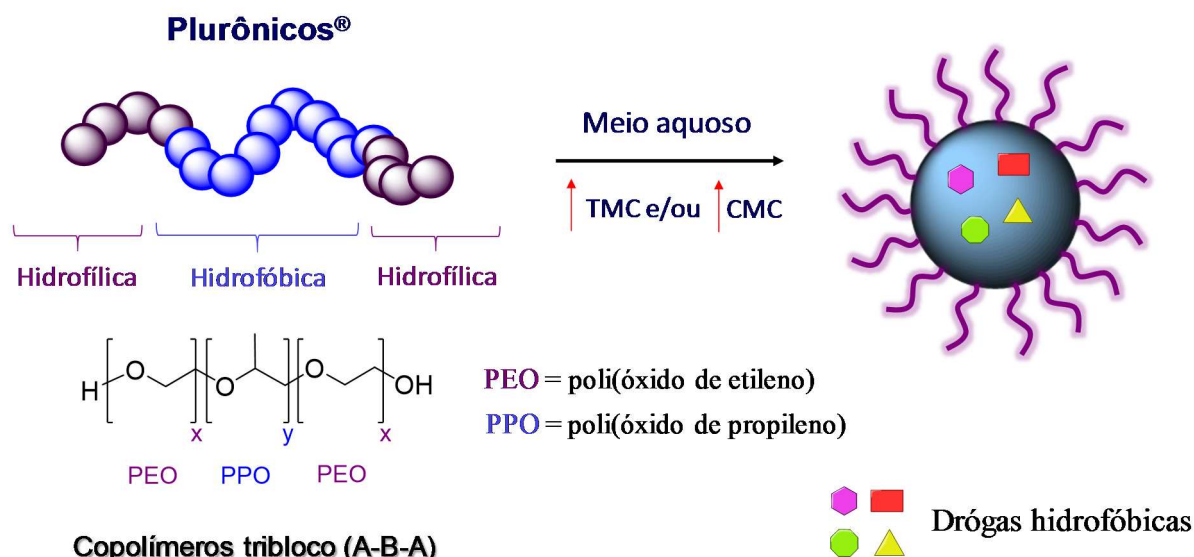
1.3. Sistemas biotransportadores de fármacos

Uma das principais barreiras no tratamento de tumores tem sido a captura não específica de drogas quimioterápicas e fotossensibilizadoras por células fagocitárias mononucleares, além disso, em adição ao alto caráter hidrofóbico dessas drogas, o que leva a baixos valores de solubilidade em sistemas biológicos, tem contribuído para uma diminuição de suas seletividades e potencialidades frente a células tumorais. Nos últimos anos, têm se observado o aparecimento de terapias anticâncer ineficientes, o que tem levando ao aparecimento de tumores resistentes a multidroga (MDR), por exemplo, a alta agressividade do melanoma, um dos tipos mais perigosos de câncer de pele, está associado além do seu potencial de metástase, também ao seu potencial de resistência às convencionais terapias anticâncer (Chang-zheng e colab., 2011). Entretanto, para contornar esse problema, nas últimas décadas, tem emergido uma demanda substancial no desenvolvimento de novos materiais na área da nanomedicina como uma poderosa

estratégia para o tratamento do câncer, incluindo polímeros conjugados com drogas biologicamente ativas e formulações poliméricas, tais como: micelas, hidrogéis e polímeros revestidos com nanopartículas (Danquah, Zhang e Mahato, 2011; Kalueff e colab., 2015; Wang e colab., 2015-a; Zali e colab., 2015; Pitto-Barry e Barry, 2014).

1.3.1. A utilização de Plurônicos® como sistemas biotransportadores

Dentre os polímeros mais comuns utilizados na nanomedicina como sistemas biotransportadores, encontram-se os Plurônicos®, nome comercial dado aos copolímeros tribloco (A-B-A), de caráter anfifílicos constituídos em suas extremidades, de blocos hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO), e em sua região central, de blocos hidrofóbicos de poli(óxido de propileno) (PPO), (Pitto-Barry e Barry, 2014). Quando em solução aquosa, acima dos valores de concentração micelar crítica (CMC) e/ou temperatura micelar crítica (TMC), as porções hidrofóbicas e hidrofílicas tendem a se auto organizarem, criando naturalmente nanoesferas capazes de transportarem com eficiência, em seus microambientes interfaciais, uma ampla diversidade de drogas de diferentes graus de hidrofobicidade, tais como ftalocianinas, clorinas, feoforbídeos, clorofilas, xantenos, antraquinonas, diantronas, dentre outras (Esquema 6).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Esquema 6. Ilustração simplificada da estrutura copolimérica micelar formada quando o Plurônico® é mantido em meio aquoso em condições acima da CMC e/ou da TMC, e sua capacidade de encapsular fármacos hidrofóbicos.

Estudos recentes com Plurônicos® de diferentes tamanhos e graus de hidrofobicidade, têm mostrado suas potencialidades como modificadores da resposta biológica, sendo capazes de sensibilizar células de câncer MDR, aumentar o efeito do transporte, permeação e retenção (EPR) de drogas através de suas membranas, e apresentar prolongado tempo de circulação, biocompatibilidade e fácil eliminação pelo organismo (Batrakova e Kabanov, 2008, Frizon e colab., 2015; Wang e colab., 2015-b). Uma diversidade de mecanismos biológicos já foram propostos de modo a compreender os diversos efeitos dos copolímeros frente a células tumorais, dentre eles destacam-se: a inibição de cadeias mitocondriais e o esgotamento do nível de ATP nas membranas e células cancerígenas (Batrakova e colab., 2000), modificação na microviscosidade de membranas celulares (Batrakova e colab., 2001) e a inibição de transportadores responsáveis pelo efluxo de drogas (*P*-glicoproteínas e proteínas MDR), (Kabanov e colab., 2002).

Adicionalmente, o desenvolvimento de copolímeros funcionalizados com biomoléculas, tem atraído a atenção de pesquisadores, no sentido de desenvolverem novos nanomateriais mais eficientes para a entrega de drogas em alvos específicos em terapias anticâncer (Frizon e colab., 2015; Wang e colab., 2015-b). Neste contexto, a funcionalização de Plurônicos[®] com moléculas biologicamente ativas tais como, aminoácidos, proteínas, anticorpos, moléculas de RNA e DNA, vitaminas, fatores de crescimento celular, esteroides, etc, tem sido uma excelente estratégia para tal finalidade, uma vez que essas moléculas podem ser facilmente reconhecidas e capturadas por alvos terapêuticos (Li e colab., 2015-b; Hernandez e colab., 2013).

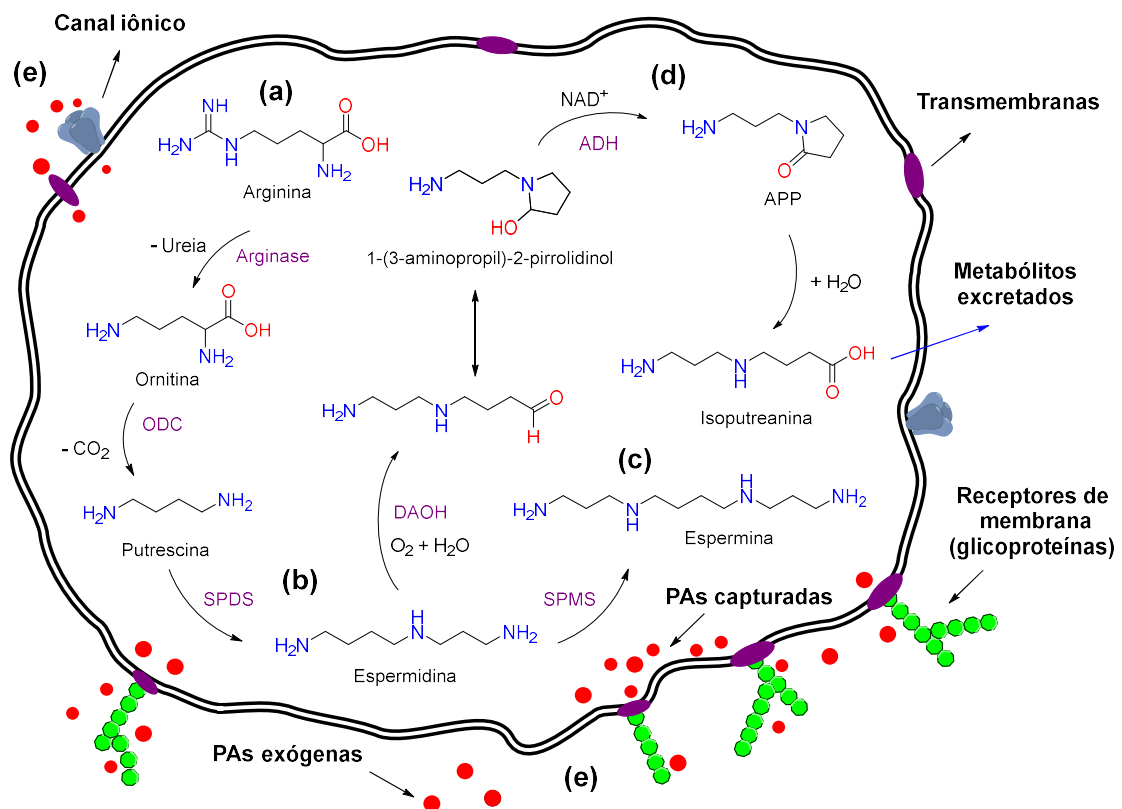
Por outro lado, nos últimos anos, tem-se aumentado o interesse no desenvolvimento de nanoplataformas multifuncionalizados, as quais podem atuar como sistemas sinérgicos frente a alvos terapêuticos. Por exemplo, quando um nanocarreador é combinado com uma biomolécula e uma sonda fluorescente, ao transportar uma droga terapêutica, tal sistema é capaz de interagir seletivamente e especificamente com um determinado alvo tumoral, e ao mesmo tempo ser capaz de sinalizá-lo, aumentando a eficiência do tratamento, (Mohan e Rapoport, 2010; Li e colab., 2012; Li e colab., 2015).

1.3.2. Poliaminas como biomoléculas para sistemas biotransportadores

Dentre uma variedade de moléculas que podem exibir propriedades direcionais para alvos terapêuticos, atualmente alguns pesquisadores tem focado suas atenções para a classe de biomoléculas conhecidas como poliaminas (PAs), (Muth e colab., 2014; Pieri e colab., 2014; Magoulas e colab., 2015). As PAs são moléculas policatiônicas, de múltiplos grupos amínicos, protonáveis em pH fisiológico (menor ou igual a 7). A biossíntese das PAs ocorre na maioria das células epiteliais, principalmente naquelas cuja multiplicação celular se dá em taxas aceleradas, uma vez que as PAs estão diretamente ligadas com às principais funções de crescimento e diferenciação celular (Cohen e colab., 1998).

Em geral, a biossíntese das PAs (Esquema 7) inicia-se pela molécula precursora, a arginina, a qual é transformada em ornitina pela ação da enzima arginase. Em seguida,

ocorre a descarboxilação da ornitina, que por sua vez, é catalisada pela ornitina descarboxilase (ODC), levando a formação da putrescina, a PA de menor massa molar (Esquema 7-a). Na presença de enzimas aminopropil transferases, tais como espermidina sintase (SPDS) e espermina sintase (SPMS), a putrescina é respectivamente transformada nas PAs de maiores massas molares, espermidina e espermina (Esquema 7-b e 7-c). No curso metabólico das PAs, moléculas derivadas podem também ser formadas através de outros processos, como é o caso da deaminação oxidativa da espermina, a qual na presença da diamina oxidase (DAO), dar-se-á lugar a formação do 1-(3-aminopropil)-2-pirrolidinol, cuja ação da enzima álcool desidrogenase (ADH) leva a sua transformação na 1-(3-aminopropil)-2-pirrolidona (APP), uma molécula da classe das aminolactamas, de grande importância em processos de captação celular (Esquema 6-d) (Gonçalves e colab., 2011; Soda, 2011).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Esquema 7. Rotas biossintéticas de formação das PAs: (a) putrescina, (b) espermidina e (c) espermina; (d) deaminação oxidativa da espermidina para formação da APP e (e) transporte transmembrana de PAs exógenas para o interior da célula.

Devido a seu caráter policatiônico, as PAs são altamente solúveis em meio aquoso e possuem alta afinidade com receptores de membrana, como é o caso das glicoproteínas, as quais através de processos de transporte transmembrana, conseguem absorver e capturar PAs exógenas para o interior das células (Esquema 7-e), (Heston e colab., 1984, Rinehart e Chen, 1984, Michin, Martin e Ilett, 1989, Dot e colab., 2000, Hoet e Nemery, 2000). Recentemente, em um estudo publicado por Hirose e colaboradores, os autores demonstraram a habilidade das PAs, especialmente da espermina em se ligarem a receptores ionotrópicos, como é o caso do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), a qual, uma vez ligadas, ativam a abertura dos canais iônicos, podendo ser permeadas para dentro das células (Hirose e colab., 2015). Por outro lado, estudos com formulações a base do solvente N-metilpirrolidona (NMP), aprovado pela

FDA para utilização como veículo de drogas hidrofóbicas, e a base de polivinilpirrolidona (PVP), cujas estruturas moleculares apresentam como grupo funcional a 2-pirrolidinona, o mesmo encontrado na APP, têm mostrado resultados eficientes de efeito de EPR em carcinoma de células uroteliais (MGH) e células epidermóides (A431), (Saw e colab., 2006; Saw e colab., 2007; Feinweber e colab., 2014). Recentemente, a equipe da divisão de pesquisa do Instituto de Câncer Peter MacCallum, na Austrália, coordenada pelo professor Johnstone, reportou um trabalho inédito sobre os efeitos positivos da NMP frente a modelos de mieloma (cMYC), demonstrando sua potencialidade como fármaco biologicamente ativo (Shortt e colab., 2014).

1.3.3. Características físico-químicas do Plurônico® P84

O Plurônico® P84, também nomeado comercialmente como *Symperonic*® PE/P84, possui um peso molecular médio de 4200 g.mol⁻¹ e um volume de 6920 Å³ sendo constituído de, aproximadamente, 40 % em massa de EO, e 60 por cento em massa de PO, cuja fórmula química é PEO₁₉-PPO₄₃-PEO₁₉. Devido ao seu caráter hidrofóbico moderado, à temperatura ambiente o P84 exibe a característica em formar micelas copoliméricas, cujo valor de TMC é de 24 °C (Alexandridis e Holzwarth, 1994). Embora seu processo de micelização não tenha fronteiras bem definidas, estudos revelam que há uma região bastante ampla da coexistência de grandes agregados e polímeros de cadeia simples, cujo valor de CMC é de 7,2x10⁻⁵ mol.L⁻¹ a 40 °C (Alexandridis e Holzwarth, 1994; Bockstahl e colab., 2000; Messaoud e colab., 2005; Prhashanna, Khan e Chen, 2015). Estudos de espalhamento de luz dinâmica (DLS), tem mostrado que soluções micelares do P84 exibem significativa polidispersividade a baixa temperatura, e se transformam em um sistema de monodispersividade a baixa temperatura, com tamanhos de micelas poliméricas de aproximadamente 17,7 nm a 30 °C (Khimani e colab., 2014).

Na literatura, são poucos trabalhos reportados sobre a utilização do P84 como sistema de entrega de fármacos. Recentemente, Salama e Shamma, publicaram a utilização de sistemas binários constituídos de diferentes porcentagens em massa de

plurônicos hidrofóbicos (P84 e F-127) e poloxamina hidrofóbica (*Tetronic*[®] T701), para o encapsulamento do lornoxicam, visando suas aplicações em doenças oculares (Salama e Shamma, 2015). Por outro lado, até onde sabemos, dentre os trabalhos reportados sobre a derivatização de Plurônicos[®], nenhum descreve a utilização do P84 como copolímero de partida. Este é um dos principais fatores que tenha despertado a motivação de nosso grupo de pesquisa em trabalhar no desenvolvimento de novas estratégias sintéticas com o uso do P84 como matriz copolimérica, além de outros copolímeros já estudados, visando-se a obtenção de novos sistemas mais eficientes para a entrega de fotossensibilizadores em aplicações fototerapêuticas de células cancerígenas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consiste em otimizar a síntese da hipericina e de novos sistemas biotransportadores a base de Plurônico[®] P84 funcionalizado com moléculas direcionais: poliaminas (ESD) e (ESN) e aminolactama (APP), e avaliar suas potencialidades terapêuticas frente a efeitos fotocitotóxicos em células de melanoma de camundongo (B16F10).

Assim, os objetivos específicos estão assim divididos:

- I. Otimizar a extração e o isolamento das AQs: Crisofanol, fisciona e emodina, a partir da casca seca da planta *Rhamnus Frangula* L.
- II. Otimizar a síntese da hipericina a partir da AQ precursora emodina.
- III. Sintetizar novos materiais copoliméricos funcionalizados com moléculas de poliaminas: Espermidina (EPD) e espermina (EPN); e aminolactama (APP), por meio de reações de amidação entre essas moléculas e o copolímero P84,

previamente ativado com grupos carboxílicos (P84/COOH), e caracterizá-los por técnicas espectroscópicas de RMN ¹H e RMN bidimensional COSY.

- IV. Avaliar a potencialidade dos sistemas P84/Hip, P84-APP+P84(50%)/Hip e P84-APP(100%)/Hip frente aos efeitos fotocitotóxicos de células B16F10.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e solventes

As cascas de *Rhammus Frangula* L. foram adquiridas comercialmente da empresa *Chá & Cia Produtos Naturais*, na forma seca, em embalagens de 60 g. Os solventes, hexano (Hex), clorofórmio (CHCl₃), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona, dimetilsulfóxido (DSMO), etanol (EtOH), metanol (MeOH), isopropanol, ácido acético (HOAc), piridina, piperidina, 1,4-dioxano e dietil-éter, foram adquiridos comercialmente com padrão de pureza HPLC. Os reagentes, ácido clorídrico (grau P.A.), cloreto de estanho dihidratado (SnCl₂.2H₂O, 98 %) N-óxido de piridina (95 %), sulfato férrico heptahidratado (FeSO₄.7H₂O, > 99 %), Plurônico® P84 (> 99 %), anidrido succínico (> 99 %), 4-(dimetilamino)piridina (DMAP, > 99 %), N-hidroxissuccinimida (NHS, (98%), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 99 %), 1-(3-aminopropil)-2-pirrolidona (APP, 98 %), espermidina (SPD, > 99 %), espermina (SPN, > 99 %), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT, 98 %) e meio Eagle modificado por Dulbecco (IMDM), soro fetal bovino (FBS) e os solventes deuterados (CD₃)₂CO, CDCl₃ e D₂O foram adquiridos comercialmente e utilizados como adquiridos.

3.2. Métodos cromatográficos

3.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises de CCD foram realizadas, utilizando-se como fase estacionária (FE), placas de sílica gel com poros médios de 60 Å de diâmetro, e com indicador de fluorescência em 254 nm, adquiridas comercialmente da marca *Sigma-Aldrich*. Para a fase móvel (FM), foi utilizada a combinação de solventes DCM / Hex (9 / 1, v:v). Os componentes separados são revelados com vapor de amônia e caracterizados qualitativamente mediante o cálculo dos seus valores de tempo de retenção (*R_f*).

3.2.2. Cromatografia em coluna (CC)

Para os procedimentos de purificação por CC, foram utilizadas colunas de vidro de 15 x 200 e 20 x 300 mm, e como fase estacionária utilizou-se sílica gel 60 de partículas com dimensões entre 0,0603-0,2 mm da marca *Macherey-Nage*. As amostras são adicionadas à coluna por via seca (amostra / sílica, 50:1), e eluídas por gradiente de polaridade.

3.2.3. Cromatografia por exclusão (CE)

Para os procedimentos de purificação por CE, foram utilizadas coluna de vidro de 10 x 250 mm, e gel de Sephadex[®] LH-20 e H₂O como FE e FM, respectivamente. As amostras são solubilizadas em, aproximadamente, 1 mL de H₂O e eluídas isocriticamente.

3.3. Medidas espectroscópicas e espectrofotométricas

As medidas de RMN foram adquiridos em espectrômetros da marca *Bruker*, modelo *AVANCE III HD* com campos magnéticos de 7,05 e 11,74 300 T, operando,

respectivamente nas frequências de 300,061 e 500,133 MHz para o núcleo de ^1H , e nas frequências de 75,01 e 125,03 para o núcleo de ^{13}C , equipado com sonda de 5 mm, e detecção direta com gradiente de campo e temperatura constante de 25 °C (298 K). Todas as amostras foram preparadas pesando-se, aproximadamente, 3,0-5,0 mg dos compostos e dissolvidos em 0,7 mL do solvente deuterado. Os espectros de ^1H e ^{13}C foram referenciados com TMS, e os dados foram descritos pelas seguintes convenções: deslocamento químico (δ) em partes por milhão (ppm), multiplicidades dos sinais (s = simpleto, d = duplete, dd = duplete de duplete, t = tripleto, dq = duplete de quarteto, qd = quarteto de duplete e m = multiplete), e constante de acoplamento (J) em Hz. Os experimentos de RMN 2D NOESY foram adquiridos usando uma sequência de pulso padrão $90^\circ-t_1-90^\circ-T_m-90^\circ$ com um *delay time* (d1) de 2,0 s e um *mixing time* (D8) de 0,4 s. Os espectros foram processados utilizando-se os pacotes de softwares *Bruker TopSpin 3.1* e *ACD/NMR Processor Academic Edition*.

As medidas de espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis foram adquiridos em espectrofotômetros *Varian* modelo *Cary 50* e *Beckmann Coulter* modelo *DU 800*, ambos a temperatura ambiente, operando com radiação em fase modulada.

3.4. Procedimentos de extração e isolamento das AQs crisofanol, fisciona e emodina a partir da casca da *Rhamnus Frangula* L.

3.4.1. Processos de extração

Método I: As cascas secas da planta *Rhamnus Frangula* L. (180 g) foram trituradas e maceradas com MeOH (500 mL, 3x) por um período de 24 h. O material macerado foi filtrado, e o solvente eliminado a pressão reduzida para obtenção de 115,20 g (64 %) de uma mistura de AQ glicosiladas (AQ-Gli). O material glicosilado é submetido à hidrólise ácida com 250 mL de uma mistura de HCl concentrado e água (HCl_{conc} / H₂O, 1:1, v/v) para obtenção de 46,08 g (40 %) de uma mistura de AQ aglicosiladas (AQ-aGli), na forma de um pó preto. Em seguida, o material foi extraído exaustivamente, por meio de um aparato Soxhlet, com 700 mL de diclorometano (DCM)

a 100 °C, para obtenção, após eliminação do solvente, de 34,10 g (74 %) da fração extrativa seca I (de cor marrom).

Método II: As cascas secas da planta *Rhamnus Frangula* L. (180 g) foram trituradas e maceradas com Hex a 60 °C (2x de 500 mL) por um período de 30 min. O material macerado foi filtrado, e o solvente eliminado a pressão reduzida para obtenção de 21,6 g (12 %) da fração extrativa seca II (de cor laranja).

3.4.2. Processos de isolamento

As frações extrativas I e II foram submetidas à purificação por CC, na presença de duas diferentes combinações de solventes: Hex / AcOEt e CHCl₃ / AcOEt. As frações eluídas são agrupadas mediante análise por CCD (item 3.3.1). Após isolamento, as AQs 1,8-dihydroxy-3-methylanthracene-9,10-dione (crisofanol) e 1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methylanthracene-9,10-dione (fisciona) foram recristalizadas em uma mistura de Hex / CHCl₃ (60:40) e a AQ 1,3,8-trihydroxy-6-methylanthracen-9,10-dione (emodina) foi recristalizada em CHCl₃, para obtenção de, respectivamente 1,8, 3,5 e 5,5 % de rendimento.

3.5. Síntese da hipericina

3.5.1. Otimização da reação de redução do emodina antraquinona

A reação de redução da AQ emodina foi otimizada por meio do monitoramento espectrofotométrico na região do UV-Vis sob diferentes condições experimentais dos agentes redutores SnCl₂.2H₂O (**A**) e HCl_{conc} (**B**), (**A** = 2,0, 3,0 e 6,4 e **B** = 25,0, 50,0, e 100,0 equivalentes molares) e para diferentes tempos de reação (30, 120 e 300 min). A cada 3,0 min de reação uma alíquota de 1,0 μL foi retirada do meio reacional utilizando uma seringa Hamilton, e diluída para um volume de 2,0 mL de EtOH a 25 °C, diretamente na cubeta de 1,0 cm de caminho óptico, e submetida à análise de UV-Vis.

3.5.2. Preparação do emodina antrona

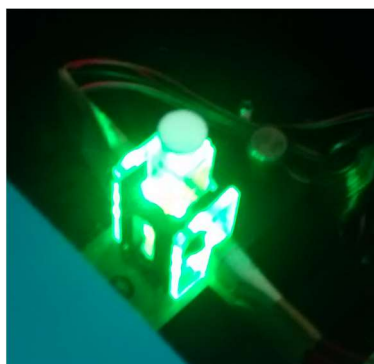
À uma suspensão aquecida do emodina (1,00 g, 3,70 mmol) em HOAc (37,50 mL), foi adicionado uma solução quente de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,23 g, 22,20 mmol em 36,50 mL, 0,37 mol de HCl_{conc}). A solução, de coloração inicialmente laranja, torna-se imediatamente vermelha após a adição da mistura redutora. A solução foi mantida em refluxo, sob agitação constante, por um período de 30-40 min. Em seguida, a solução foi esfriada à temperatura ambiente para dar início a precipitação do produto, a qual foi adicionado 500 mL de uma solução saturada de Na_2CO_3 , e mantida sob agitação constante em banho de gelo por 30 min. Após completado o processo de precipitação, o produto foi filtrado à vácuo e lavado com água destilada, resultando em um sólido fino amarelo, o qual rendeu, sem prévia purificação, 47,5 mg (95 %) do emodina antrona.

3.5.3. Preparação da protohipericina

A protohipericina foi sintetizado com base no procedimento descrito por Mazur e colaboradores (Mazur, Bock e Lavie, CA 2 029 993, 1989). Para uma solução do emodina antrona (1,00 g, 1,97 mmol em 20,00 mL, 0,25 mol de piridina e 2,00 mL, 20,25 mmol de piperidina), foram adicionados 2,00 g, 21,03 mmol de *N*-óxido de piridina e 0,05 g, 0,18 mmol de sulfato ferroso heptahidratado e a mistura reacional foi mantida sob agitação constante, por 1 h a 100 °C. Em seguida, a mistura foi concentrada a vácuo, para um volume de, aproximadamente, 5,00 mL, e 100,00 mL de uma solução 3 % de HCl foi adicionada para formação de um precipitado escuro. O precipitado foi filtrado e lavado exaustivamente com água, até que a água de lavagem estivesse a um pH neutro. Após purificação do produto bruto por CC, utilizando-se DCM e acetona como fases móveis (eluições isocráticas), a protohipericina é obtida com 65 % de rendimento, na forma de um pó fino de cor roxa.

3.5.4. Otimização da reação de fotoconversão da protohipericina em hipericina

A reação de fotociclização da protohipericina foi avaliada cineticamente por absorção eletrônica na região do UV-Vis. Os experimentos foram realizados tomando-se um volume de 3 mL de uma solução de **18** em acetona e adicionado a uma cubeta de 4 faces de quartzo e de 1,0 cm de caminho óptico e fixada em suporte para cubeta, adaptado com 6 encaixes laterais para LEDs (3 em cada lateral) e dispostos a uma distância de aproximadamente 0,5 cm da solução (Figura 9) (Rabello e colab., 2012; Gerola e colab., 2012). Os experimentos foram realizados com 4 conjuntos de LEDs de diferentes cores (azul, verde, laranja e vermelho) e de potência na ordem de 19-84 mW, mensuradas por equipamento para medida de potência, *Power Meter* modelo *Edmund Optics*, selecionando-se o comprimento de onda de máxima emissão para cada conjunto de LEDs.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9. Organização experimental para o monitoramento cinético da reação de fotoconversão de **18** em **15**, através da irradiação de uma amostra de **18** em 3 mL de acetona utilizando um conjunto de 6x LEDs verdes (potência total de 23mW) acoplados a um suporte de cubeta e posicionado na cavidade do espectrofotômetro.

3.5.5. Preparação da Hipericina

A solução de protohipericina (300,00 mg, 0,60 mmol) em acetona (300 mL) foi irradiada com um fotorreator de LEDs SMD verdes (4,0 mW/cm² e $\lambda_{\text{max}} = 525$ nm). A reação foi monitorada por absorção eletrônica na região do UV-Vis até a máxima absorção da banda da Hip em $\lambda_{\text{max}} = 596$ nm, cujo rendimento para a etapa fotoquímica foi de, aproximadamente, 95 %. Após eliminação do solvente, o produto bruto foi purificado por CE utilizando-se EtOH como FM, e recristalizado de Hex, para obtenção de aproximadamente 240 mg de Hip (80 %) na forma de um sólido cristalino de cor azul escuro.

3.6. Funcionalização dos sistemas copoliméricos

3.6.1. Preparação do copolímero P84 ativado (P84/COOH)

À uma solução de P84 (5,00 g, 2,38 mmol de grupos OH) em 1,4-dioxane (30 mL), são adicionadas quantidades equimolares de anidrido succínico (0,24 g, 2,38 mmol), e dos catalizadores DMAP (0,14 g, 12,00 mmol) e TEA (1,20 g, 12,00 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação constante à temperatura ambiente, por um período de 48 h. Em seguida, a solução foi concentrada à vácuo para um volume de, aproximadamente, 10 mL e mantida à uma temperatura de -15 °C por 24 h. A suspensão formada foi filtrada à vácuo através de uma pequena camada de Celite[®] em funil de Buchner com placa porosa. Após eliminação do solvente, o produto foi deixado no dessecador por no mínimo 24 h, para obtenção de um gel incolor. O rendimento de carboxilação do P84 (~ 87 %) foi determinado por técnica de titulação utilizando-se uma solução diluída de NaOH, previamente padronizada com biftalato ácido de potássio, e fenolftaleína como indicador.

3.6.2. Preparação do copolímero P84/ESD

A uma solução do copolímero de P84/COOH (1,00 g, 0,46 mmol de grupos -COOH) em DCM (25 mL) são adicionadas quantidades equimolares de DCC (0,09 g, 0,46 mmol) e NHS (0,05 g, 0,46 mmol) previamente solubilizados no mínimo volume de DCM, como sistemas ativadores. A solução foi mantida sob agitação contínua à temperatura ambiente por um período de 1 h sob atmosfera de argônio. Após o período de ativação, o DCU formado como um sólido branco foi filtrado à vácuo e a solução resultante é adicionada, gota a gota, com o auxílio de um funil de adição, uma quantidade equimolar de ESD (66,8 mg, 0,46 mmol) em DCM (25 mL). A solução foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por um período de 48 h. Após o período reacional, a solução foi concentrada à vácuo para um volume de, aproximadamente, 10 mL e mantida à uma temperatura de -15 °C por 24 h, para precipitação dos reagentes excedentes. Em seguida, a suspensão foi filtrada à vácuo através de uma pequena camada de sílica gel em funil de Buchner com placa porosa. Após eliminação do solvente, o produto foi deixado no dessecador por no mínimo 24 h, para obtenção de um gel incolor. Purificação adicional do produto foi realizada por CE utilizando-se H₂O como FM, para obtenção de, aproximadamente, 60 % de rendimento.

3.6.3. Preparação do copolímero P84/ESN

O copolímero P84/ESN foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito no item 3.6.2, resultando após purificação em, aproximadamente, 55 % de rendimento, na forma de um gel incolor.

3.6.4. Preparação do copolímero P84/APP

O copolímero P84/APP foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito no item 3.6.2, resultando após purificação em, aproximadamente, 72 % de rendimento, na forma de um gel incolor.

3.7. Preparação e caracterização das micelas copoliméricas de P84/APP

As micelas copoliméricas do material P84-APP foram preparadas através do método da dispersão sólida (Zhang, Jackson e Burt, 1996; Mahmud e colab., 2007). O material P84-APP (28,0 mg, 4 % m/v) foi solubilizado no mínimo volume de EtOH, e em seguida, submetido a evaporação por pressão reduzida para obtenção de uma matriz sólida na forma de um filme fino, o qual foi deixado por 24 h no dessecador para a eliminação de traços do solvente. Após este processo, a matriz sólida foi ressuspendida em 0,7 mL de D₂O, e a solução formada foi mantida sob agitação suave a temperatura ambiente por cerca de 20 min e deixada sob processo de estabilização micelar por um período de 24 h. As micelas foram caracterizadas por RMN de ¹H e COSY e a localização e orientação das moléculas de APP foram estudadas por RMN 2D NOESY.

3.8. Encapsulamento da hipericina nas matrizes copoliméricas biofuncionalizadas

O encapsulamento da Hip nas matrizes micelares dos copolímeros biofuncionalizados: P84, P84/APP(50%)+P84 e P84/APP(100%) foram realizados, via método da dispersão sólida (item 3.7). A solubilização e estudo da interação da Hip com os nanocarreadores foram analisados por RMN de ¹H e técnica NOESY.

Os filmes finos formados pela mistura de Hip (4,0 mg) e aos materiais copoliméricos P84 (7,0 mg, 1 % m/v) ou P84/APP (28,0 mg, 4 % m/v) foram ressuspendidos em 0,7 mL de D₂O e as soluções mantidas em um vaso selado sob agitação suave à temperatura ambiente por cerca de 20 min. As soluções foram transferidas para tubos de RMN com uma seringa Hamilton, e previamente às análises, as soluções são mantidas à temperatura ambiente por 24 h para estabilização das micelas.

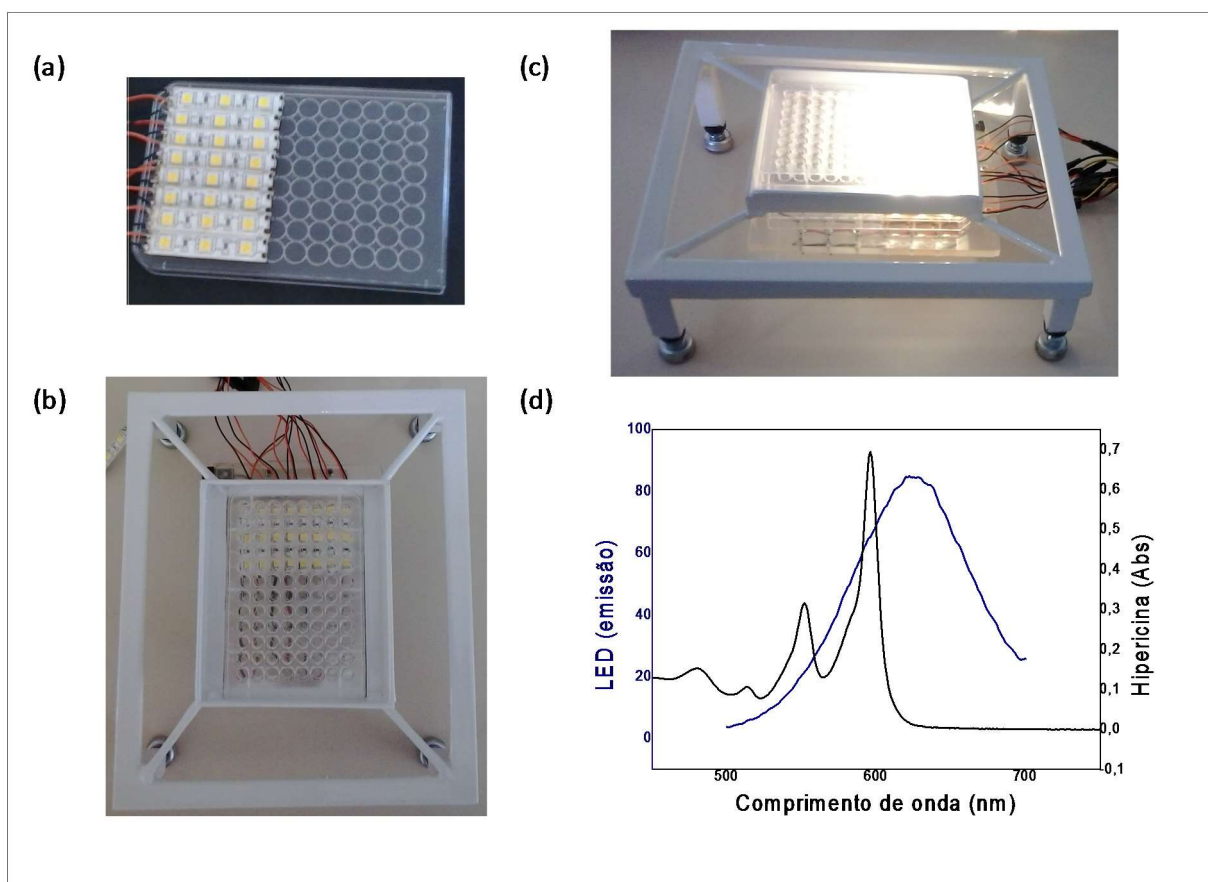
Para os ensaios fotocitotóxicos *in vitro* (item 3.9), os filmes finos formados pela mistura de Hip (100 µmol.L⁻¹) e dos materiais copoliméricos P84 (25,0 mg, 0,5 % m/v) P84/APP+P84 (12,5 mg de cada componente, 0,5 % m/v) e P84/APP (25,0 mg, 0,5 % m/v) foram ressuspendidos em 5,0 mL de H₂O deionizada e as soluções foram mantidas em um vaso selado sob agitação suave à 60 °C por cerca de 1 h. Antes das aplicações as

amostras foram esterilizadas por aquecimento a 80 °C e, em seguida, mantidas à temperatura ambiente por 24 h para estabilização das micelas.

3.9. Ensaios citotóxicos da hipericina em DMSO e formuladas em micelas copoliméricas em células de melanoma B16F10

Os ensaios de citotoxicidade da hipericina solubilidade em DMSO e formulada nas micelas copoliméricas foram avaliadas utilizando linhagem de células de melanoma de camundongos B16F10 (ATCC CRL-6475)¹. As células foram cultivadas aderidas em garrafas de polipropileno, em meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) e suplementadas com 10 % de Soro Fetal Bovino e antibióticos penicilina 10000 IU/mL e estreptomicina 10 mg/mL em um ambiente umidificado com 5 % de CO₂ a 37 °C (Freshney, 1994). Para os experimentos citotóxicos as células foram acondicionadas em uma microplaca de 96 poços, 1,0 x 10⁵ célula/mL por poço e incubadas a 37 °C. Após 24 h, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com diferentes concentrações (0,1 – 10 µmol/L) de Hip-DMSO, P84-Hip, P84/APP+P84(50%)-Hip e P84/APP(100%)-Hip e no escuro, por um período de 3h. Após o período de incubação, retirou-se o meio contendo os fotossensibilizadores, lavou-se as células com PBS, adicionou-se meio de cultura e as células foram irradiadas com 4,2 J/cm² (dose de luz correspondente ao períodos de irradiação de 20 min) a uma distância de 2,0 cm, utilizando como fonte de irradiação, um sistema de LEDs SMD, branco quente (λ 550 – 625 nm) de potência de 35 mW/cm², construído em nosso laboratório (Figura 10). A viabilidade celular foi avaliada usando um ensaio calorimétrico, na presença de MTT, baseado na conversão do sal de tetrazólio em formazan (Denizot e Lang, 1986). Assim, 50 µL de 1 mg/mL de solução de MTT em meio de IMDM foram adicionados a cada poço, seguido por 3 h de incubação a 37 °C, 5 % CO₂. A solução de MTT foi removida, e 50 µL de EtOH e 150 µL de uma solução contendo PBS e isopropanol (1:1) foram adicionados em cada poço de modo a solubilizar os cristais formados. A absorbância de cada poço foi lida em um leitor de microplacas (*Versamax, Molecular Device*) a 570 nm, sendo proporcional ao número de

células vivas. Os experimentos foram realizados em sextuplicatas para cada concentração de DMSO-Hip, P84-Hip, P84/APP+P84(50%)-Hip e P84/APP(100%)-Hip e para as células controles. Os resultados foram expressos pela média \pm o desvio padrão e o índice de sobrevivência (IS) foi calculado como se segue: Índice de sobrevivência (%) = $(A_{\text{droga}} / A_{\text{controle}}) \times 100$ %, onde A = absorbância (Menezes e colab., 2007). As medidas de concentração inibitória (IC_{50}) foi dado como a concentração que causou 50 % da inibição da viabilidade celular, e calculada usando Calculusyn (Chou e Talalay, 1983).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10. Sistema (*biotable*) de LEDs SMD branco quente (35 mW/cm^2) construído em nosso laboratório: (a) montagem dos LEDs na microplaca de 96 poços, (b) encaixe das placa de LEDs na parte de baixo do suporte da *biotable*, a placa contendo o material celular é encaixada na parte superior do suporte, (c) *biotable* em funcionamento

mostrando a irradiação do sistema de LEDs e (d) sobreposição espectral das principais bandas de absorção da Hip ($\lambda_{\text{max}} = 552$ e 596 nm) com a banda de emissão dos LEDs ($\lambda_{\text{max}} = 550 - 650$ nm).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Extração e isolamento das AQs crisofanol, fisciona e emodina

4.1.1. Extração das AQs crisofanol, fisciona e emodina

A partir das cascas secas da planta *Rhamnus Frangula* L. foram realizados os procedimentos de extração dos seus constituintes antraquinônicos. Primeiramente, as etapas de maceração do material vegetal foram realizadas com base nas diferentes formas químicas com que as AQs estão presentes. Deste modo, a escolha da polaridade do solvente foi fundamental no processo de obtenção dos extratos com maiores porcentagens de AQs em suas formas glicosiladas (AQs-Gli) ou aglicosiladas (AQs-aGli). Como esperado, quando o material vegetal foi macerado na presença de MeOH, o extrato obtido foi constituído, majoritariamente, por AQs-Gli. Por outro lado, a utilização de Hex no processo de maceração, forneceu uma extração mais seletiva, rica em AQ-aGli. No fluxograma mostrado abaixo (Figura 11), estão descritas as sequências de etapas utilizadas em ambos os processos de maceração do material vegetal, tanto na presença de MeOH como na presença de Hex.

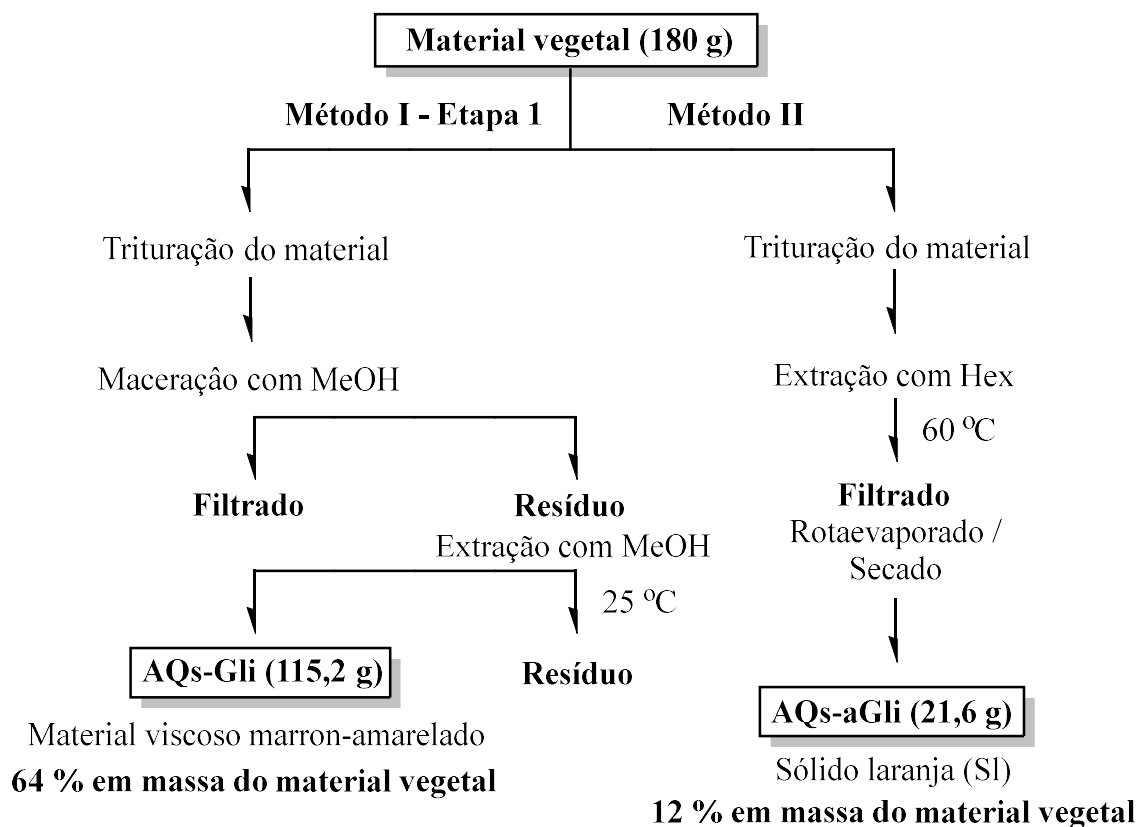


Figura 11. Fluxograma das etapas de obtenção das AQs nas formas glicosilada (AQs-Gli) e aglicosiladas (AQs-aGli), a partir da percolação com MeOH à 25 °C (método I) e Hex à 60 °C (método II), respectivamente.

Quando o material vegetal (180,0 g) foi submetido ao processo de percolação com MeOH (método I – etapa 1), aproximadamente 64 % em massa (115,2 g) de um material viscoso de cor marrom-amarelado foi obtido (fração rica em AQs-Gli). Entretanto, quando a mesma quantidade do material vegetal foi percolado com Hex à 60 °C (método II), foram obtidos, aproximadamente, 12 % em massa (21,6 g) de um sólido laranja (Sl), cuja coloração é característica da presença majoritária das AQs em suas formas aglicosiladas (Caro e colab., 2012). Para obtenção das AQs-aGli, a partir do material extraído na primeira etapa do método I, o mesmo foi submetido ao processo de hidrólise ácida na presença da mistura de HCl e água (1:1), (Figura 12 – etapa 2). Após o período de hidrólise, e tratamento da solução com bicarbonato de sódio, seguido de filtração e lavagem exaustiva com água, aproximadamente 40 % em massa da mistura

de AQS-Gli (46,1 g) foi obtido na forma de um sólido preto (Sp). Finalmente, o material resultante, foi submetido ao processo de extração exaustiva com DCM, para obtenção, após eliminação do solvente, de aproximadamente 74 % em massa em relação ao Sp (34,1 g) e 19 % em massa em relação ao material vegetal (34,2 g), na forma de um sólido marrom (Sm), (Figura 12 – etapa 3).

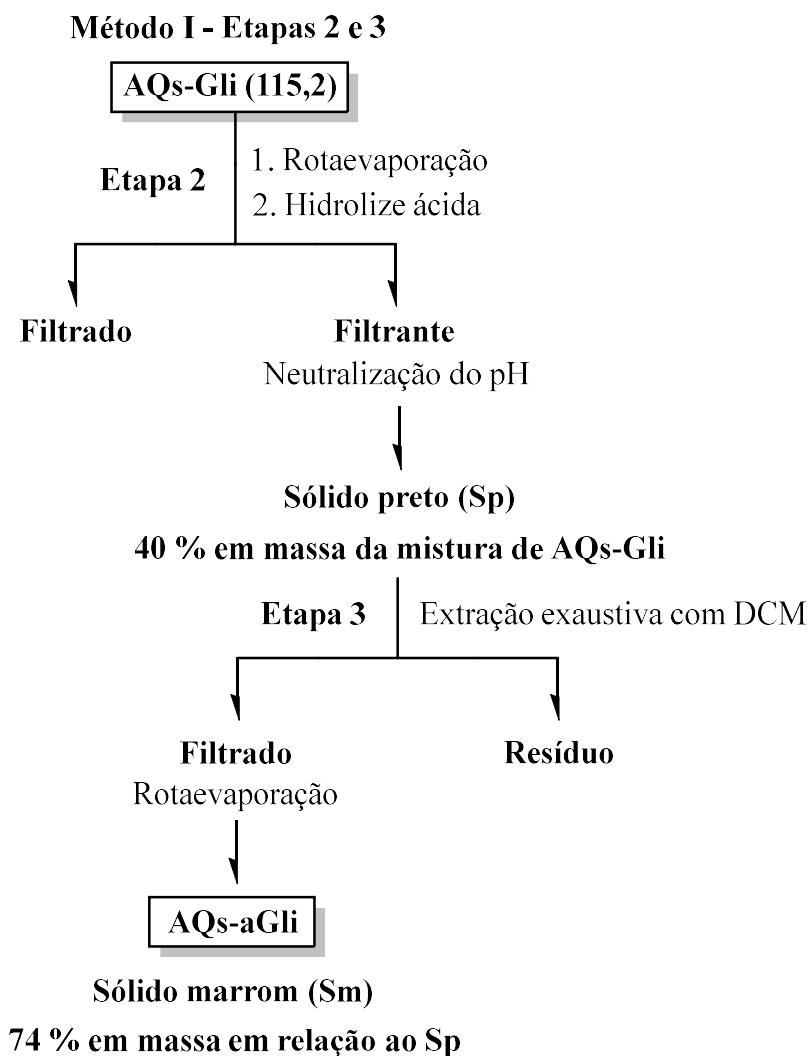


Figura 12. Fluxograma das etapas 2 e 3 executadas no método I para obtenção de 74 % em massa de um sólido marrom (Sm).

Embora o método I tenha fornecido um rendimento total superior aquele obtido pelo método II (19 versus 12 % em massa do material vegetal), a simplicidade de execução, bem como, a redução do tempo e dos custos operacionais, tornam este último, um método mais apropriado para a obtenção da mistura de AQs a partir da casca da planta *Rhamnus Frangula* L. Uma vez obtido as misturas de AQs-aGli, as etapas seguintes foram dedicadas a otimização dos processos de isolamento das antraquinonas de interesse, através da cromatografia de coluna (CC).

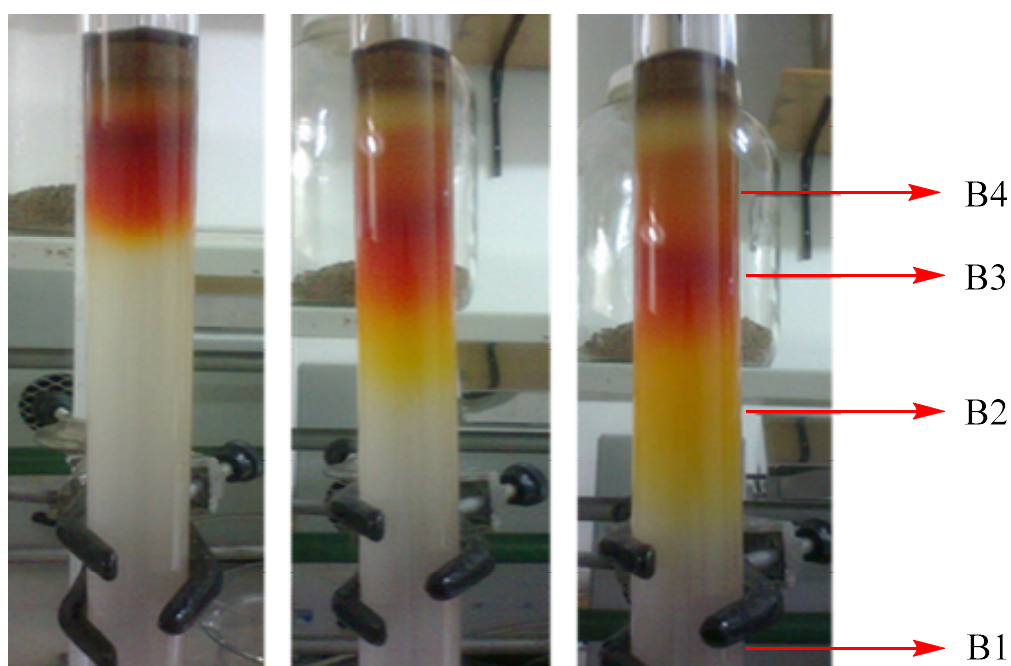
4.1.2. Otimização dos processos de isolamento das AQs crisofanol, fisciona e emodina.

Os produtos brutos (Sm e Sl) obtidos nos processos de extração descritos anteriormente, foram submetidos à separação por CC em duas diferentes combinações de fase móvel (FM). As frações obtidas foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e agrupadas segundo semelhança nos valores de R_f . A eficiência de separação das AQs foi inicialmente avaliada utilizando-se como FM uma combinação de Hex : AcOEt. O processo de eluição iniciou-se na presença de Hex (100 %), seguido de um aumento gradual em 1 % na polaridade do sistema (como apresentado na Tabela 1), mediante a adição de AcOEt, até atingir uma combinação final de 85 : 15 (Hex : AcOEt, v/v). As frações eluídas foram coletadas a cada 10 mL totalizando 127 frações ($Fr_1 - Fr_{127}$), de acordo com o seguinte padrão cromatográfico: (a) na presença de Hex (100 %), observa-se a eluição de uma banda de cor rosa (B1), a qual é coletada em um total de 2 frações, (b) após o aumento da polaridade do sistema, entre 1 a 3 %, inicia-se a eluição de uma segunda banda de cor amarela (B2), a qual é coletada em um total de 35 frações, (c) com o aumento da polaridade entre 4 a 5 %, dar-se-á início a eluição da terceira banda (B3), a qual é coletada em um total de 50 frações e (d) quando a polaridade do sistema é aumentada entre 10 a 15 %, inicia-se a eluição da quarta e última banda (B4), a qual é coletada em um total de 40 frações (Figura 13).

Tabela 1. Eluição das bandas B1-B4 (frações Fr1-127) na presença de Hex : AcOEt como FM, e valores de Rf obtidos via análise de CCD para cada mancha revelada.

Hex : AcOEt (% v:v)	Bandas	Frações	Manchas / Rf*
100	B1	Fr ₁₋₂	M1/0,78
99 : 1	B2	Fr ₃₋₁₂	M2/0,61 e M3/0,48
98 : 2	B2	Fr ₁₃₋₂₂	M2/0,61 e M3/0,48
97 : 3	B2	Fr ₂₃₋₃₇	M2/0,61 e M3/0,48
96 : 4	B3	Fr ₃₈₋₄₇	M2/0,61 e M3/0,48
95 : 5	B3	Fr ₄₈₋₆₂	M2/0,61 e M3/0,48
94 : 6	B3	Fr ₆₃₋₈₇	M3/0,48 e M4/0,11
90 : 10	B4	Fr ₈₈₋₁₀₂	M3/0,48 e M4/0,11
85 : 15	B4	Fr ₁₀₃₋₁₂₇	M3/0,48 e M4/0,11

* Análise por CCD (Figura 14)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13. Desenvolvimento cromatográfico dos produtos brutos Sm e Sl com separação nas bandas B1-B4.

Após a eluição cromatográfica das bandas B1-B4, as correspondentes frações são submetidas à análise de CCD (Figura 14), e agrupadas segundo semelhança nos seus valores de R_f (Tabela 1).

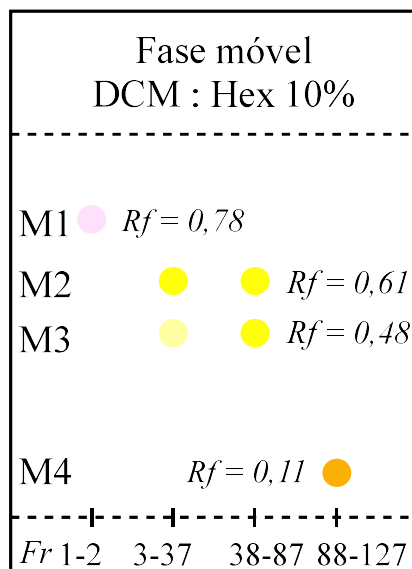


Figura 14. Análise de CCD para os quatro grupos de frações Fr₁₋₂, Fr₃₋₃₇, Fr₃₈₋₈₇ e Fr₈₈₋₁₂₇, utilizando-se DCM : Hex (90 : 10) como FM.

Para o primeiro grupo de frações (Fr₁₋₂), correspondente a banda B1, apenas uma mancha é observada (M1, $R_f = 0,78$), entretanto como a quantidade do material obtida foi muito pequena (< 1 mg), optou-se em não seguir com a sua caracterização via RMN de ¹H. Para a análise dos demais grupos de frações (bandas B2-B4) observa-se a presença de uma mistura entre dois componentes (M2:M3 e M3:M4), evidenciando que na presença dessa combinação de FM, existe uma baixa resolução na separação das três AQS. O cálculo das integrais dos hidrogênios aromáticos, via RMN de ¹H, das frações Fr₃₋₃₇ (B2) e Fr₃₈₋₈₇ (B3), revelam a presença da mistura das AQS crisofanol e fisciona, em proporções de, respectivamente, 26 : 73 e 50 : 50 % (Figura 15 e 16). A mesma análise é realizada para as frações Fr₈₈₋₁₂₇ (B4), revelando a presença de, respectivamente, 30 : 70 % das AQS fisciona e emodina, podendo-se confirmar, em ambos os casos, uma baixa eficiência de separação das bandas cromatográficas quando na presença de Hex : AcOEt como FM.

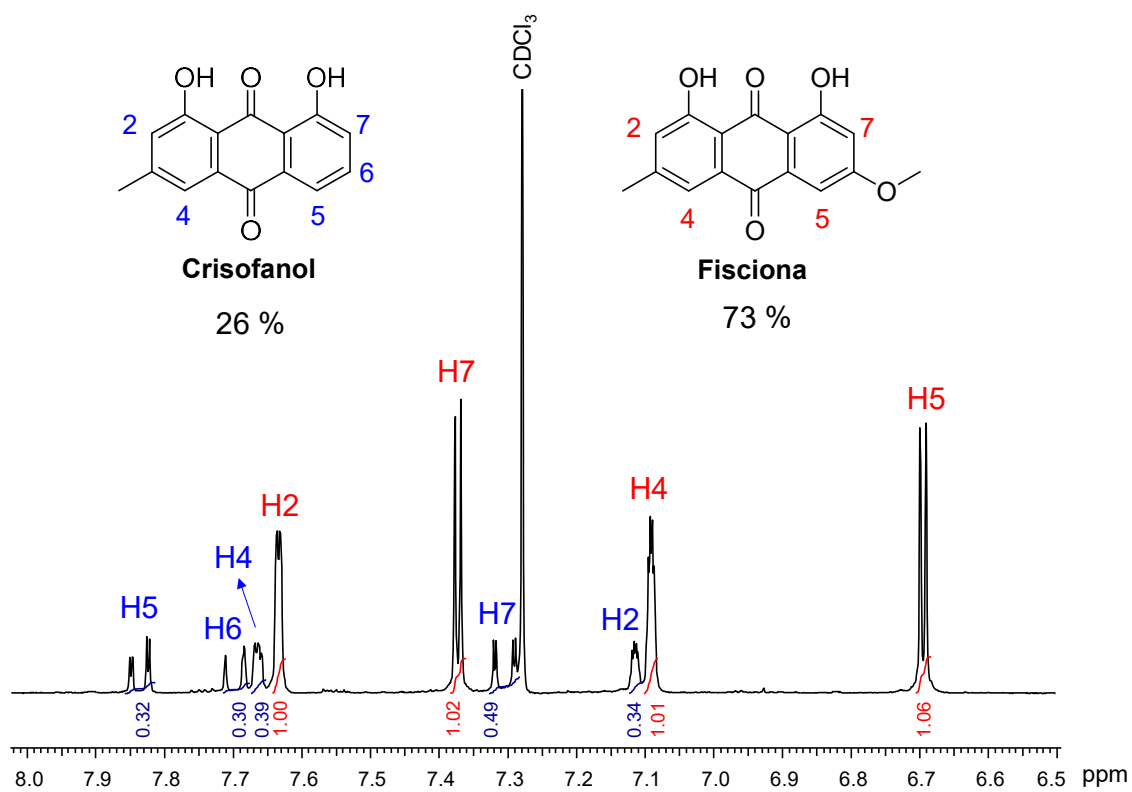


Figura 15. Expansão do RMN de ^1H das frações Fr_{3-37} eluídas por CC na presença de Hex : AcOEt como FM, adquirido em CDCl_3 a 300 MHz. As integrais dos sinais revelam a presença de respectivamente 26 e 73 % das AQs crisofanol e fisciona.

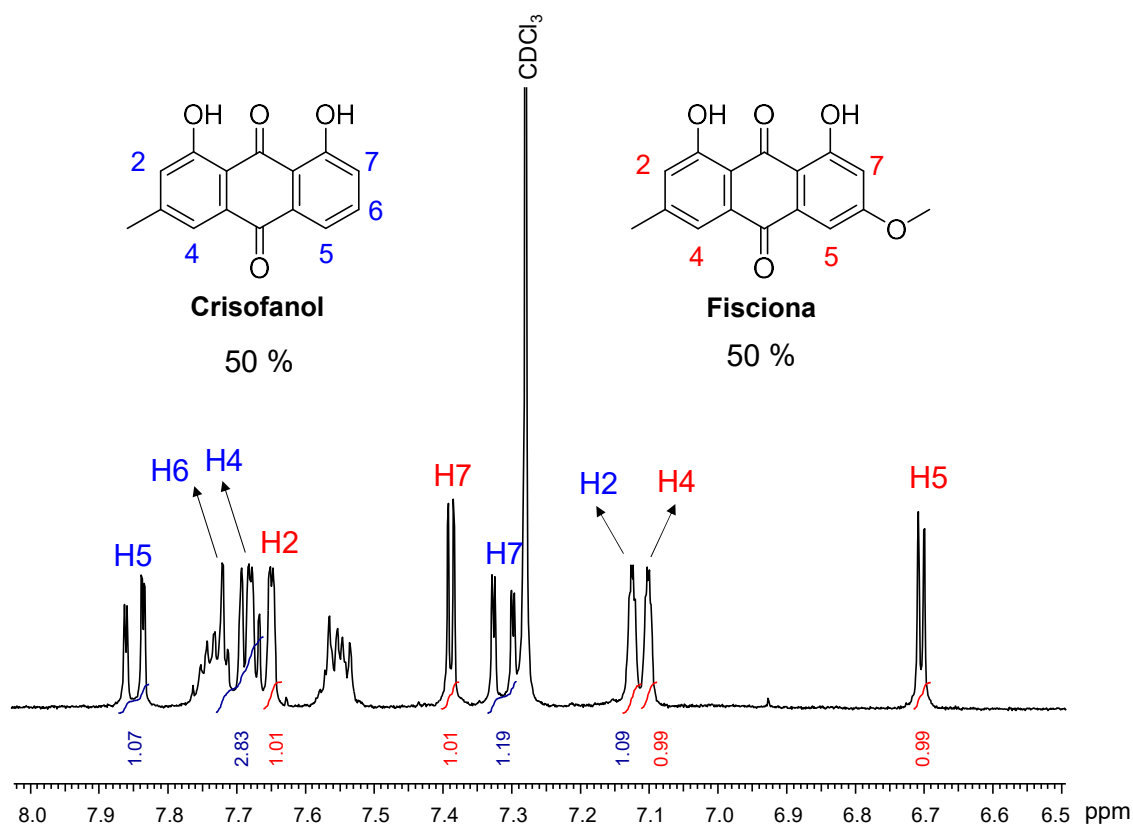


Figura 16. Expansão do RMN de ^1H das frações Fr_{38-87} eluídas por CC na presença de Hex : AcOEt como FM, adquirido em CDCl_3 a 300 MHz. As integrais dos sinais revelam a presença de 50 % de cada uma das AQs crisofanol e fisciona.

Por outro lado, quando os produtos brutos Sm e Sl são submetidos à separação cromatográfica na presença de CHCl_3 : AcOEt como FM, o panorama cromatográfico difere significativamente do anterior. Neste caso, a eluição das frações são realizadas iniciando-se com CHCl_3 (100 %), seguido de um aumento gradual em 5 % da polaridade do sistema (como apresentado na Tabela 2), mediante a adição de AcOEt, até atingir uma combinação final de 85 : 15 (CHCl_3 : AcOEt, v/v). As frações eluídas foram coletadas a cada 5 mL totalizando 101 frações ($\text{Fr}_1 - \text{Fr}_{101}$). Inicialmente, na presença de CHCl_3 (100 %), apenas a banda B1 é eluída em um total de 2 frações (Fr_{1-2}). Com o aumento da polaridade do sistema em 5 %, inicia-se a eluição da banda B2 a qual é coletada em um total de 30 frações (Fr_{3-32}). A banda B3, é eluída somente quando a polaridade do sistema atinge um valor de 10 %, a qual é coletada em um total de 40

frações (*Fr*₃₂₋₇₁). Finalmente, quando a polaridade do sistema é aumentada para 15 %, a banda B4 é eluída em um total de 31 frações (*Fr*₇₁₋₁₀₁), cujas frações coletadas, foram submetidas à análise de CCD e agrupadas segundo seus valores de *Rf* (Figura 17).

Tabela 2. Eluição das bandas B1-B4 (frações *Fr*₁₋₁₂₇) na presença de CHCl₃ : AcOEt como FM, e valores de *Rf* obtidos, via CCD para cada mancha revelada.

CHCl ₃ : AcOEt (% v:v)	Bandas	Frações	Manchas / <i>Rf</i> *
100	B1	<i>Fr</i> ₁₋₂	M1/0,78
95 : 5	B2	<i>Fr</i> ₃₋₃₂	M2/0,61 e M3/0,48
90 : 10	B3	<i>Fr</i> ₃₃₋₇₁	M3/0,48
85 : 15	B4	<i>Fr</i> ₇₂₋₁₀₁	M4/0,11

*Análise por CCD (Figura 17)

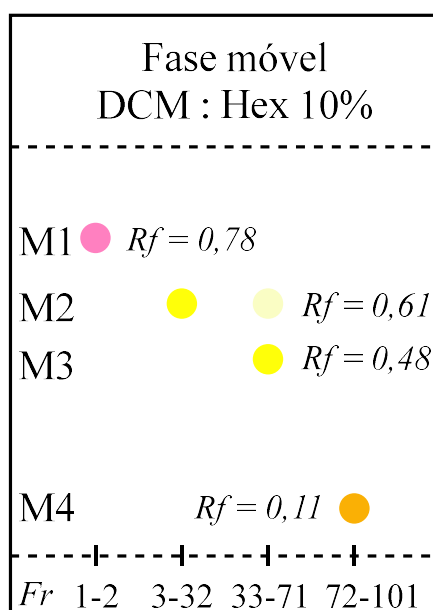


Figura 17. Análise de CCD para os quatro grupos de frações *Fr*₁₋₂, *Fr*₃₋₃₇, *Fr*₃₈₋₈₇ e *Fr*₈₈₋₁₂₇, utilizando-se DCM : Hex (90 : 10) como FM.

As análises de CCD, revelam que, apenas uma mancha está presente para os grupos de frações correspondentes as bandas B1 (M1), B3 (M3) e B4 (M4), entretanto, duas manchas são observadas para o grupo de frações correspondente a banda B2 (M2 e M3), porém com predominância de concentração para a mancha M3. Esses resultados evidenciam que na presença desta combinação de FM, os componentes antraquinônicos são separados com boa resolução, cujos rendimentos obtidos para os compostos crisofanol, fisciona e emodina, foram de, respectivamente, 0,2 % (0,36 g), 0,6 % (1,08 g) e 1,2 % (2,16 g) em relação a massa do material vegetal (180 g). Mediante análise de RMN de ^1H , confirmou-se a presença isoladas das AQs crisofanol e emodina, respectivamente nas frações de Fr_{3-32} (B2) e Fr_{72-101} (B4), e a predominância de 92 % da AQ fisciona nas frações de Fr_{33-71} (B3), cujos resultados estão apresentados abaixo.

4.1.3. Caracterização das AQs por RMN e UV-vis

Para a caracterização das estruturas químicas das AQs isoladas por CC, na presença da combinação de CHCl_3 e AcOEt como FM, as mesmas foram submetidas à análise de RMN de ^1H e absorção eletrônica na região do UV-Vis. Primeiramente, no espectro de RMN de ^1H da amostra correspondente as frações Fr_{3-32} , são observados em δ 12,05 e 11,94 ppm, dois sinais de singleto, os quais são atribuídos aos hidrogênios hidroxílicos OH-1 e OH-8, cujos valores de integrais revelam a presença de 1H cada. Já na região aromática do espectro, são observados entre δ 7,75 a 7,03, a presença de 5 sinais correspondentes aos hidrogênios H2 – H7, integrando para um total de 1H cada (Figura 18). O cálculo da constante de acoplamento (J) para os pares de sinais H-6 / H-5 e H-6 / H-7 (Figura 19), revelam acoplamentos característico de sinais em posição *orto* ($^3J_{6,5} = ^3J_{6,7} = 7,6$ Hz), confirmando a presença de um hidrogênio na posição C6 do composto analisado, o que vai de encontro com a estrutura da AQ crisofanol. Adicionalmente, o desdobramento observado para o sinal H6 em um *dd*, confirma seu acoplamento com cada um dos sinais em posições adjacentes (H-5 e H-7). Na região alifática do espectro, é observada a presença de um sinal em δ 2,39 ppm, cujo valor de sua integral, revela um total de 3H, o qual é atribuído aos hidrogênios metílicos da

posição C3 (*Ar*-CH₃). O desdobramento do sinal dos hidrogênios metílicos acoplando com cada um dos hidrogênios aromáticos presentes nas posições C2 e C4, explicam a multiplicidade de *dd* observada para esse grupo de sinais. Por outro lado, as multiplicidades de *dq* e *qd* observadas, respectivamente, para os sinais dos hidrogênios H-4 e H-2, são também explicadas devido seus acoplamentos (H-2/H-4) e com os sinais dos hidrogênios metílicos (H4-CH₃ e H2-CH₃).

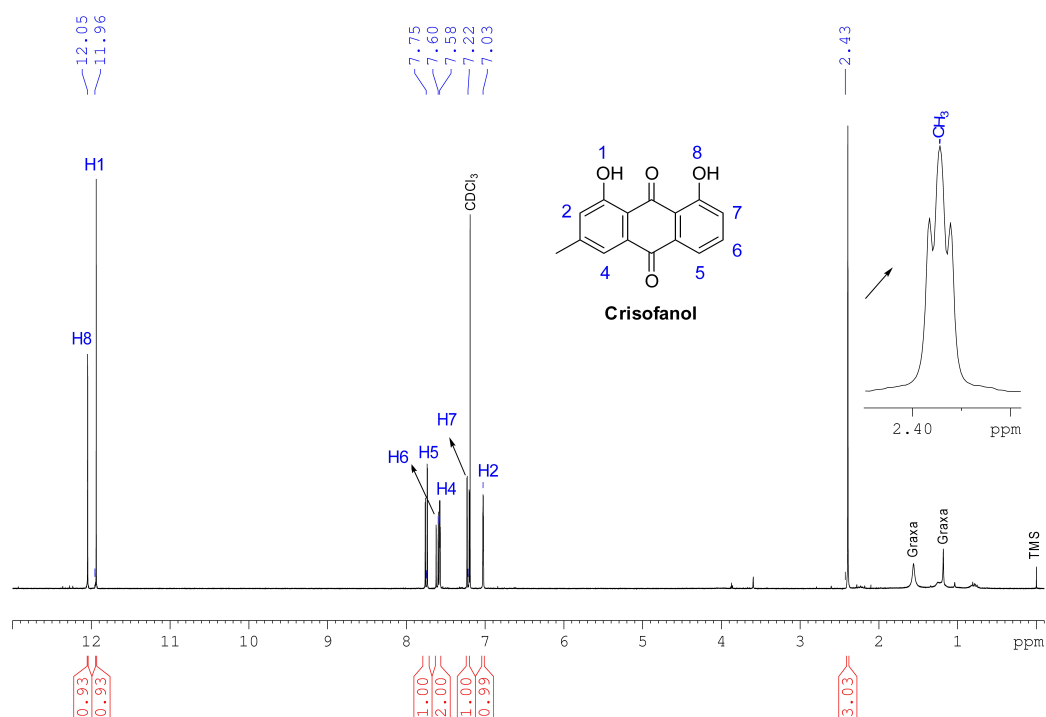


Figura 18. RMN de ¹H da AQ crisofanol adquirido em CDCl₃ a 300 MHz.

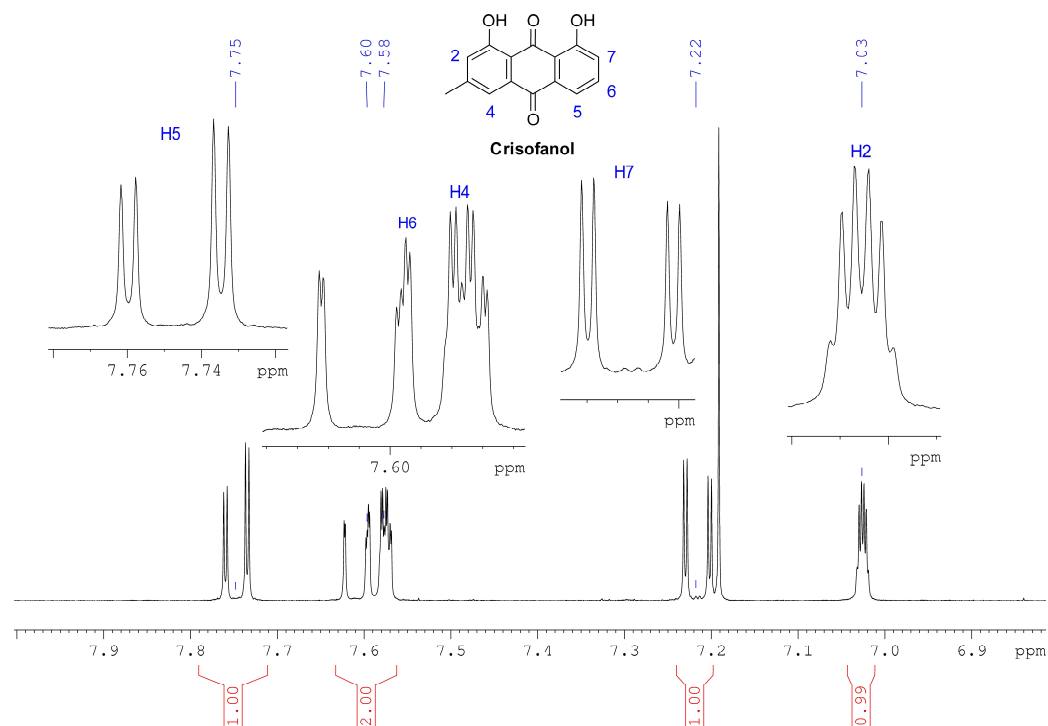


Figura 19. Expansão do espectro de RMN de ¹H da AQ crisofanol, adquirido em CDCl₃ a 300 MHz.

A análise do espectro de RMN ¹H da AQ fisciona revela um padrão de sinais semelhantes ao observado no espectro anterior. Em δ 12,28, 12,08 ppm são observados os sinais de singlete dos hidrogênios hidroxílicos OH-1 e OH-8, integrando para 1H cada (Figura 20). Na região aromática do espectro, entre δ 7,59 a 6,65 ppm, observa-se a presença de quatro sinais, correspondentes aos hidrogênios H-2 (*q*), H-4 (*q*), H-5 (*d*) e H-7 (*d*), os quais integram para 1H cada (Figura 21). A observação de um sinal de hidrogênio a menos na região aromática em comparação com o espectro anterior, é devido a presença de um sinal de simpleto em δ 3,92 ppm (3H), o qual é atribuído aos hidrogênios metoxílicos (Ar-OCH₃), presentes na posição C6, característico da AQ fisciona. Finalmente, na região alifática do espectro, em δ 2,43 ppm, é observado a presença do sinal correspondente aos de hidrogênios metílicos (Ar-CH₃), os quais acoplam com cada um dos sinais dos hidrogênios aromáticos H2 e H4 resultando em uma multiplicidade de *dd*, cujo valor de sua integral revela um total de 6H.

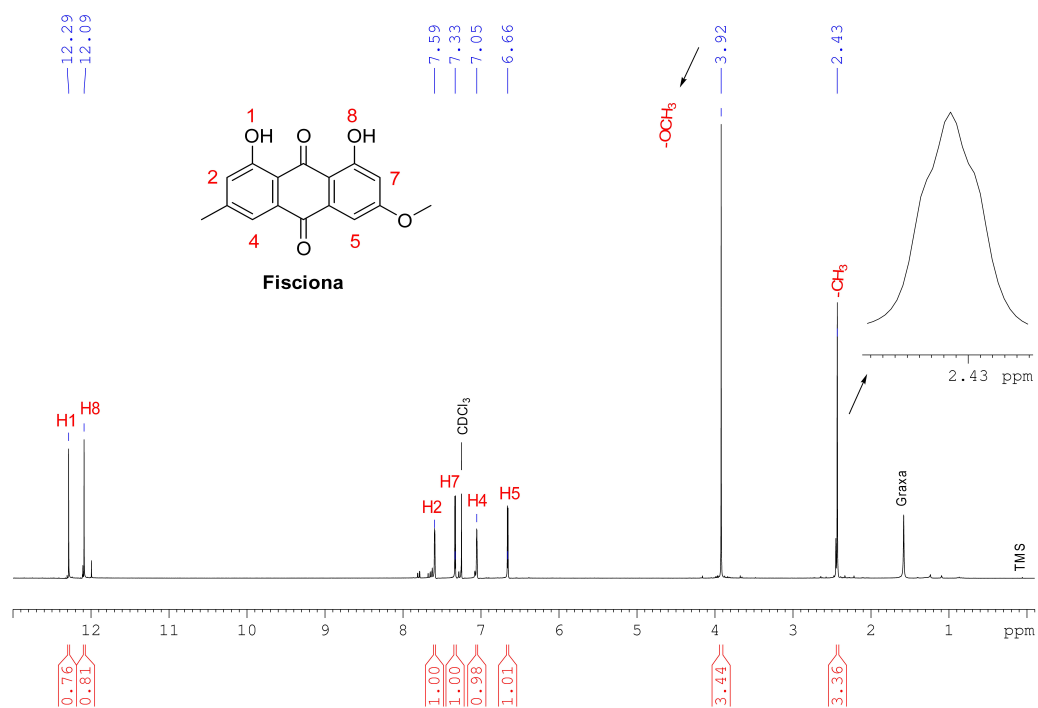


Figura 20. RMN de ¹H da AQ fisciona adquirido em CDCl₃ a 300 MHz.

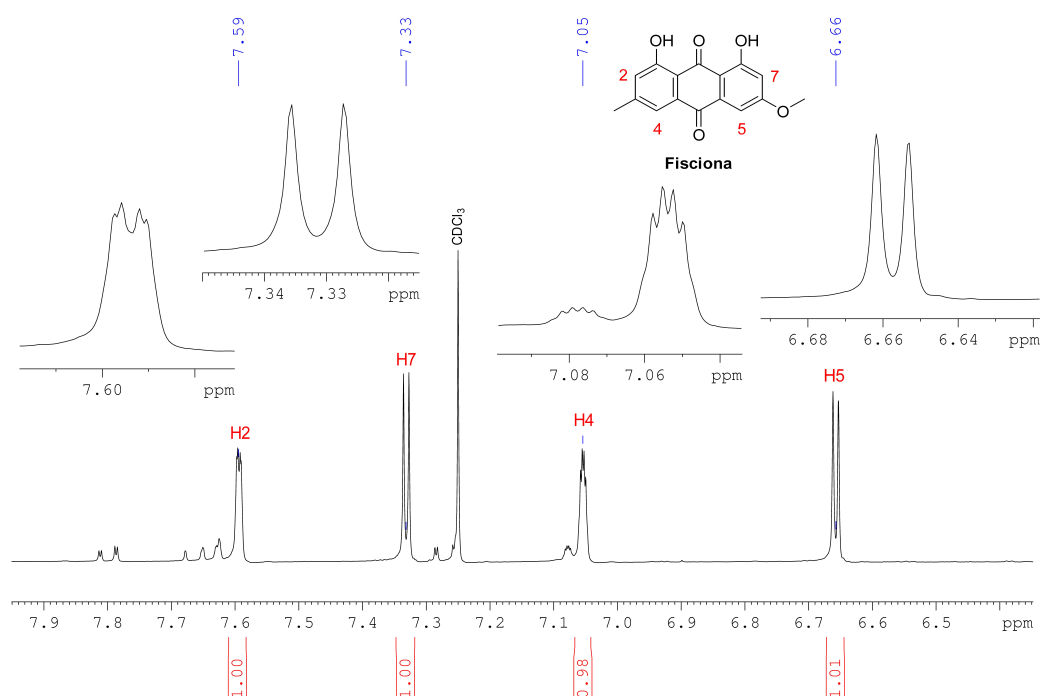


Figura 21. Expansão do espectro de RMN de ^1H da AQ fisiciana adquirido em CDCl_3 a 300 MHz.

Para a caracterização da AQ emodina, via RMN de ^1H , a mesma sequência de sinais reveladas nos espectros das AQs anteriores, foi também observada (Figura 22). Os sinais em δ 12,07, 12,00 e 11,38 ppm são atribuídos aos hidrogênios hidroxílicos OH-1, OH-8 e OH-6, os quais integram para 1H cada. Já na região aromática do espectro, entre δ 7,47 a 6,59 ppm, são observados quatro sinais, os quais fazem referência aos hidrogênios aromáticos: H2 (*d*), H-4 (*q*), H-5 (*d*) e H-7 (*d*), integrando para um total de 1H cada (Figura 23). Finalmente, o sinal de hidrogênio observado na região alifática do espectro, em δ 2,41 ppm, é atribuído aos hidrogênios metílicos (*s*), cujo valor de integral revela a presença de um total de 3H. Os valores de δ obtidos para as três AQs: crisofanol, fisiciana e emodina, são apresentados na Tabela 3 (Gill e Morgan, 2001; Rodríguez e colab., 2006).

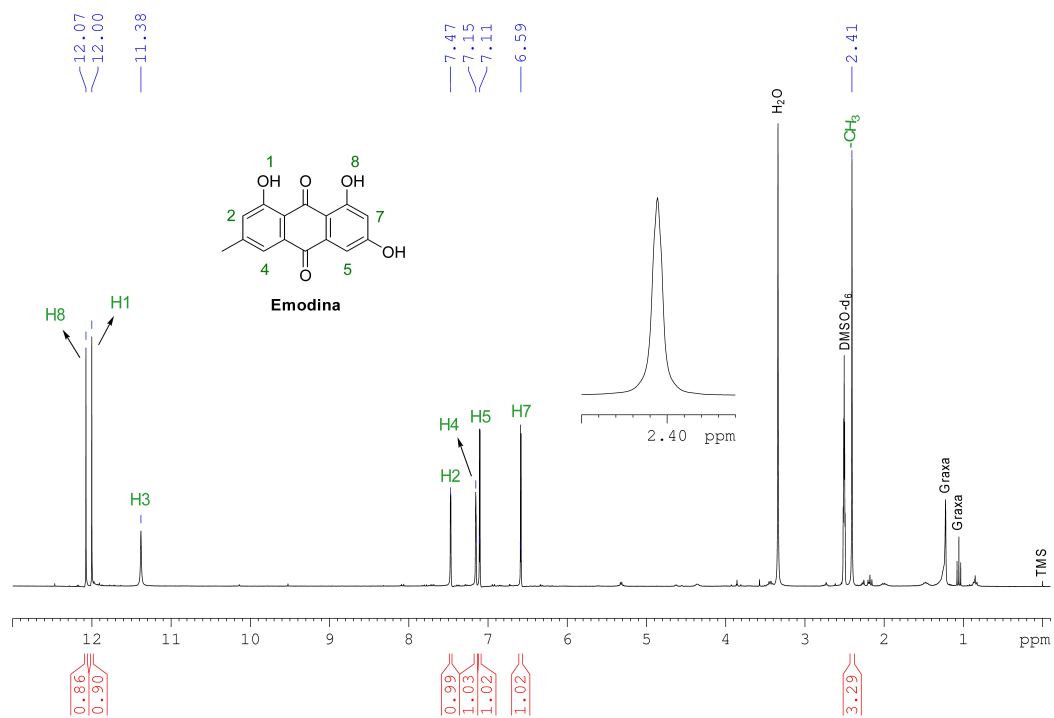


Figura 22. RMN de ¹H da AQ emodina adquirido em CDCl₃ a 300 MHz

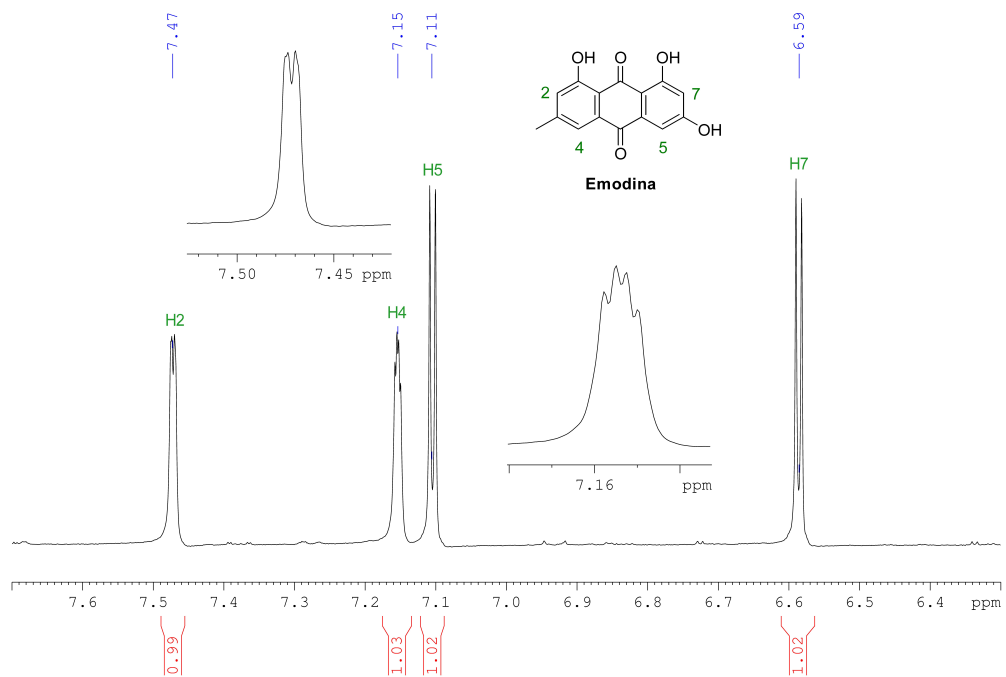
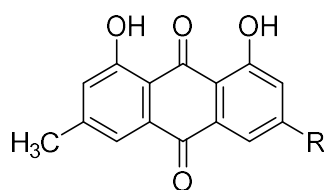


Figura 23. Expansão do espectro de RMN de ^1H da AQ emodina adquirido em CDCl_3 a 300 MHz.

Tabela 3. Valores de δ (ppm), multiplicidade, integral e J (Hz) observados nos espectros de RMN de ^1H das AQs crisofanol e fisciona, obtidos em CDCl_3 e da AQ emodina obtido em DMSO-d_6 a 300 MHz.



Crisofanol. R = H
Fisciona. R = $-\text{OCH}_3$
Emodina. R = $-\text{OH}$

Átomo	Crisofanol	Fisciona	Emodina
OH-1	11,96 (s, 1H)	12,29 (s, 1H)	12,07 (s, 1H)
OH-3	—	—	11,38 (s, 1H)
OH-8	12,05 (s, 1H)	12,09 (s, 1H)	12,00 (s, 1H)
H-7	7,22 (dd, 1H); $^3J_{7,5} = 1,2$ e $^4J_{7,6} = 7,6$	7,33 (d, 1H); $^4J_{7,5} = 2,6$	6,59 (d, 1H); $^4J_{7,5} = 2,6$
H-5	7,75 (dd, 1H); $^3J_{5,6} = 7,6$ e $^4J_{5,7} = 1,2$	6,66 (d, 1H); $^4J_{5,7} =$ 2,6	7,11 (d, 1H); $^4J_{5,7} = 2,6$
H-4	7,58 (dq, 1H)	7,05 (q, 1H)	7,15 (q, 1H)
H-2	7,03 (qd, 1H)	7,59 (q, 1H)	7,47 (d, 1H)
H-6	7,60 (dd, 1H) $^3J_{6,5}$ e $^4J_{6,7} = 7,2$	—	—
Ar-CH₃	2,43 (t, 3H)	2,43 (t, 3H)	2,40 (s)
Ar-OCH₃	—	3,92 (s, 3H)	—

A caracterização das AQs foi ainda confirmada através da técnica de absorção eletrônica na região do UV-Vis. Nos espectros das AQs fisciona e emodina, em EtOH, foram observadas as principais bandas de absorção em 250, 262, 288 e 450 nm, enquanto que no espectro da AQ crisofanol, no mesmo solvente, as duas principais bandas de absorção são observadas em 250 e 425 nm (Figura 24), (Jacquemin e colab., 2007, Gill e Morgan, 2001).

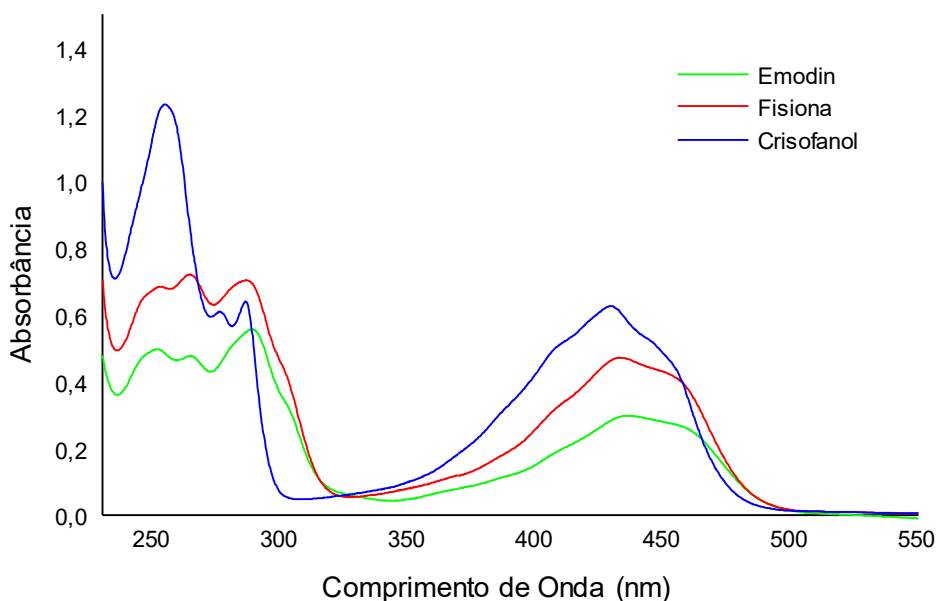
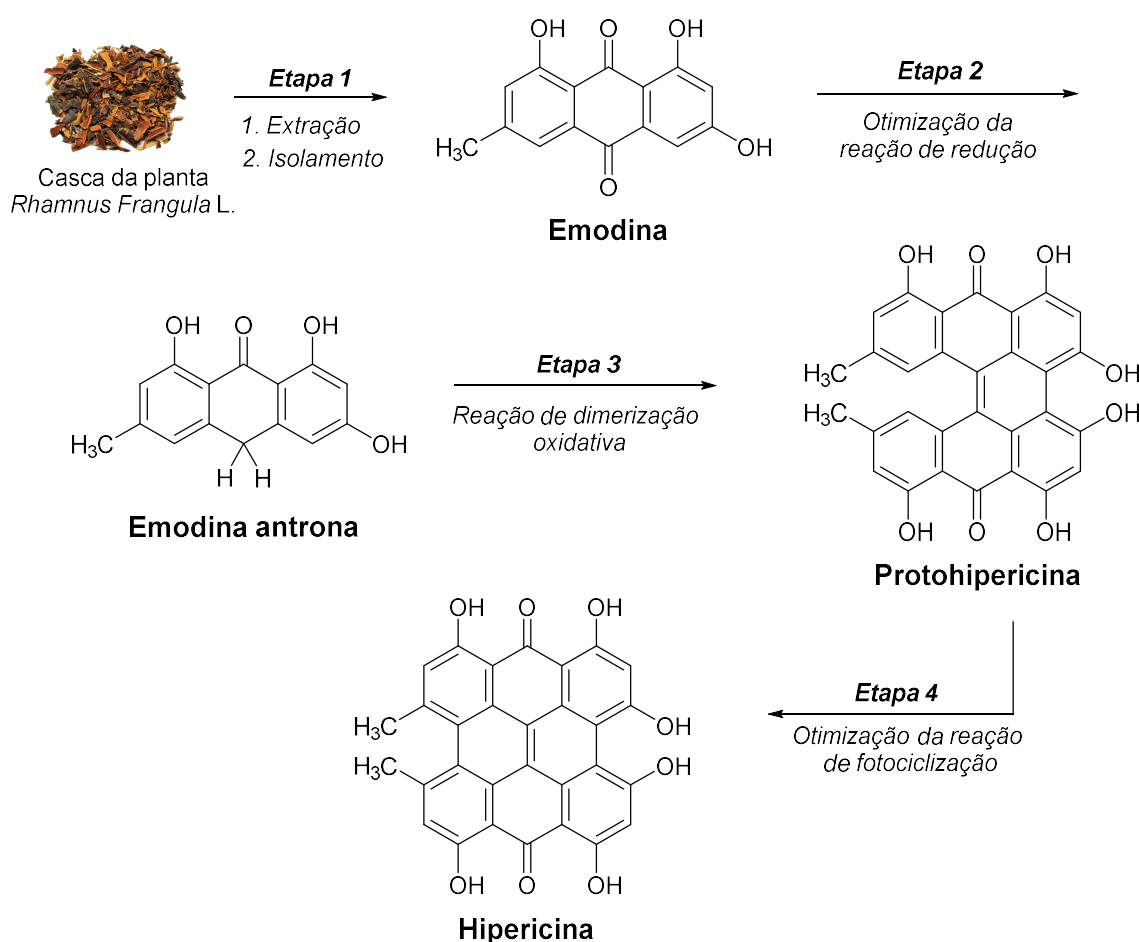


Figura 24. Espectros de absorção UV-Vis das AQs 6-8.

4.2. Otimização da síntese da hipericina

A partir da AQ emodina, previamente extraída e isolada da casca seca da planta *Rhamnus Frangula* L. segundo as condições otimizadas, descritas na sessão 4.1, as etapas seguintes foram dedicadas à preparação da Hip (Esquema 8), com exceção da etapa de dimerização oxidativa da protohipericina, a qual foi realizada com base nas condições experimentais propostas por Mazur e colaboradores (Mazur, Bock e Lavie, CA 2 029 993, 1989). É importante destacar que, embora, somente a AQ emodina tenha sido utilizada nas etapas seguintes deste trabalho, como precursora para a preparação da Hip, os processos de otimização das etapas de extração e isolamento das demais AQs

(crisofanol e fisciona), descritos anteriormente, são de fundamental importância, uma vez que, tais AQs podem ser utilizadas como materiais precursores para a preparação de compostos análogos à Hip, e até onde sabemos, são escassos os trabalhos na literatura que estudam suas propriedades fototerapêuticas. Por outro lado, as propriedades farmacológicas, na ausência de luz, das AQs obtidas neste trabalho, podem ser combinadas com as propriedades fotocitotóxicas da Hip, criando-se formulações com propriedades terapêuticas sinérgicas frente a micro-organismos e células tumorais.



Esquema 8. Sequência de etapas realizadas para obtenção da Hip: *Etapa 1*, extração e isolamento da AQ emodina; *Etapa 2*, redução do emodina antrona: $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3,2-6,4 eq-mol), HCl_{con} (100,0 eq-mol), HOAc , 100 °C, 30 min; *Etapa 3*, dimerização oxidativa de 17: Piridina : piperidina (10 : 1 / v : v), *N*-óxido de piridina (5,0 eq-mol), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

(0,1 eq-mol), 100 °C, 1 h, 65 %; *Etapa 4*, fotociclização da protohipericina: $h\nu$, LED verde (19 mW), acetona, 25 °C, 1 h.

4.2.1. Reação de redução de antraquinonas

As reações redox de sistemas orgânicos constituem uma base teórica de fundamental importância para a compreensão de uma variedade de processos químicos e biológicos. Os trabalhos pioneiros envolvendo o comportamento eletroquímico desses sistemas datam do início do século XX, com a utilização do par redox quinona-hidroquinona (Q-QH₂) como substratos de estudo (Fieser, 1928). Dependendo das condições experimentais, diversos produtos podem ser produzidos a partir da redução química de uma AQ, tais como: antranol, antrona, 9,10-dihidroxi-9,10-dihidroantraceno, 9,10-dihidroantraceno e antraceno (Figura 25).

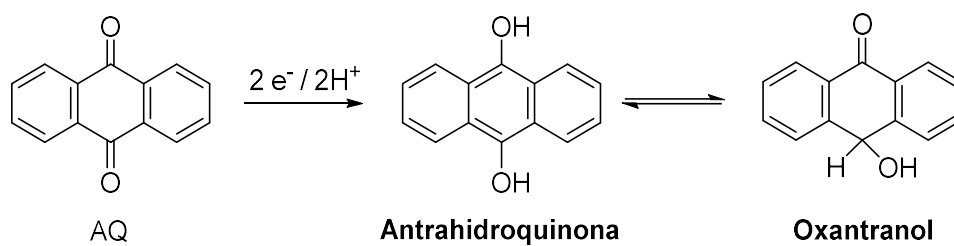


Figura 25. Representação das estruturas químicas das AQs: antranol (11), antrona (12), 9,10-dihidroxi-9,10-dihidroantraceno (19), 9,10-dihidroantraceno (20) e antraceno (21).

Neste sentido, diversos agentes redutores já foram estudados em reações de redução de AQs substituídas, com o propósito de se alcançar maior grau de rendimento e pureza, dos produtos principais. Alguns exemplos incluem: pó de zinco em meio básico (Richter, 1918), hidreto de alumínio e lítio (Nystrom e Brown, 1948), alcóxidos de alumínio (Coffey e Boyd, 1954), diborano (Bapat, Rao e Unni, 1960), liga de alumínio-níquel (Tyman, 1970), hidrossulfito de sódio (Fieser, 1967), fósforo em meio ácido (Renaud e Stephens, 1974). Em 1971, Lund estudou a redução eletroquímica de AQs na presença de uma mistura de EtOH : H₂SO₄ (50:50, v:v) e Hg, propondo um

processo em duas etapas (Lund, 1971). Na primeira etapa reversível, $2e^-$ e $2H^+$ reagem com a 9,10-antracenediona (AQ) para dar lugar a forma de antrahidroquinona, a qual está em equilíbrio tautomérico com a forma de oxantranol (Esquema 9-a). Na segunda etapa, o oxantranol reage novamente com $2e^-$ e $2H^+$, reduzindo-se, após eliminação de uma molécula de água, à forma de antranol, a qual é isomerizada à forma de antrona (Esquema 9-b). Como citado acima, sobre a diversidade de agentes redutores que foram empregados, ao longo dos anos, para a redução de AQs, a utilização de estanho em meio ácido, embora tenha sido proposta no ano de 1941 por Meyer, pouco se falou, nos anos seguintes, desta combinação redutora para AQs (Meyer, 1928). Somente a partir de 1940, o estanho em meio ácido passou a ser bastante empregado para tal finalidade.

(a)



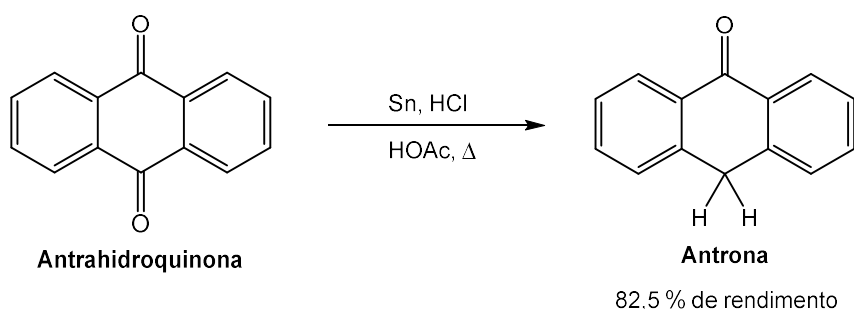
(b)



Esquema 9. Mecanismo proposto por Lund, para a redução eletroquímica da 9,10-antracenediona (AQ) em duas etapas: (a) reação da AQ com $2e^-$ e abstração de $2H^+$ para formação, após isomerização, da oxantranol e (b) reação da oxantranol com $2e^-$ e abstração de $2H^+$ para a formação de antranol, a qual isomeriza para a formação de antrona.

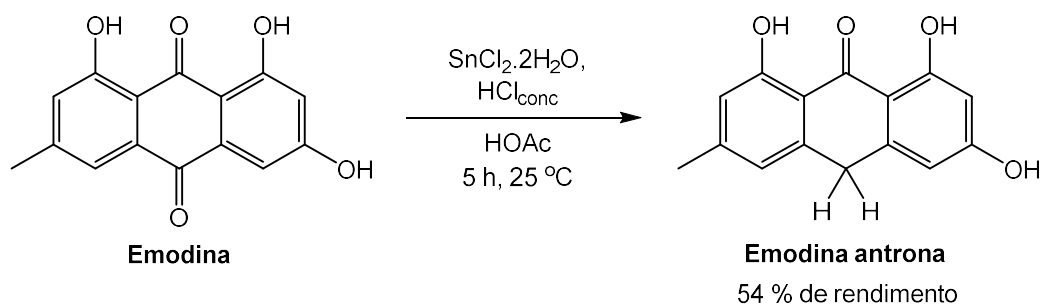
4.2.2. Reação de redução da AQ emodina na presença de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e HCl_{conc}

A combinação de estanho em meio ácido é considerada uma mistura clássica de reagentes de bastante eficiência para a redução de uma série de compostos, especialmente, na redução de quinonas e compostos nitrados (Badger e Gibb, 1949; Oelschlager, 1961). Uma vez que o estanho necessita ser combinado com um meio fortemente ácido, e isso pode ser uma desvantagem para a redução de alguns compostos sensíveis a estas condições, uma alternativa tem sido sua substituição pelo cloreto de estanho (SnCl_2). Entretanto, em comparação com o estanho, o SnCl_2 tem apenas a metade de eficiência, uma vez que é fornecido apenas dois elétrons por mol (Sn doa quatro elétrons). Mas essa desvantagem é mais do que compensada pela facilidade de solubilização do SnCl_2 em meio aquoso, em meio de ácido fraco, álcoois e solventes orgânicos (Hudlicky, 1984). Em 1941, Meyer reportou a redução da 9,10-antracenediona na presença de estanho em HOAc glacial e HCl_{conc} , para obtenção de sua correspondente forma de antrona, (Esquema 10), (Meyer, 1928).



Esquema 10. Reação de redução da antrahidroquinona na presença de Sn e HCl como agentes redutores, para formação de antrona, proposta por Meyer em 1941.

Falk e Oberreiter, em 1993, reportaram a utilização de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em HCl_{conc} como substituto do ácido iodídrico para a redução da AQ emodina (Esquema 11). Segundo os autores, a adaptação do processo é mais conveniente e apresenta menores custos (Falk e Oberreiter, 1993).



Esquema 11. Reação de redução da AQ emodina na presença de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e HCl_{conc} como agentes redutores, para formação da AQ emodina antrona, proposta por Falk e Oberreiter em 1993.

Nos anos seguintes, a grande maioria dos trabalhos publicados envolvendo a redução do emodina e de seus derivados, passaram a utilizar o sistema $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}_{\text{conc}}$ como agente redutor. Deste modo, a partir da adaptação proposta por Falk e Oberreiter, sobre a utilização de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em meio ácido (HCl_{conc} e HOAc glacial) para a reação do emodina, outros trabalhos posteriores à sua publicação, passaram a reproduzir tal metodologia, não só para a redução dessa AQ, mas também para a redução de algumas de suas formas derivadas. Contudo, uma grande divergência de informações experimentais é encontrada nestes trabalhos, tanto com relação as quantidades estequiométricas dos agentes redutores, como também com relação ao tempo de reação. Nas condições experimentais inicialmente propostas por Falk e Oberreiter, os autores utilizam com relação a quantidade estequiométrica da AQ emodina, respectivamente 3,2 e 25,0 equivalentes molares (eq-mol) de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e HCl_{conc} , para um tempo de reação de 5 h. Dois anos depois a esta publicação. Falk, Vaisburg e Amer, reportaram um trabalho sobre a preparação de novos derivados de hip, ω -substituídos. Neste trabalho os autores utilizam na etapa de redução de derivados da AQ emodina, respectivamente, 10,0 e 120,0 eq-mol de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e HCl_{conc} sob um período de tempo de 3-4 h (Falk, Vaisburg e Amer, 1995). No ano de 1998, outros trabalhos envolvendo a síntese de derivados da hip foram também descritos com quantidades divergentes dos agentes redutores em relação aos trabalhos anteriormente publicados. Enquanto Falk e colaboradores descrevem a utilização de, respectivamente,

5,0 e 33,0 eq-mol de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e HCl_{conc} por um período de tempo de 10 min, Altmann, Falk e Gruber, relatam a utilização de, respectivamente 20,0 e 30,0 eq-mol por um período reacional duas vezes maior (Falk e colab., 1998; Altmann, Falk e Gruber, 1998). Em 2007, em um trabalho sobre a preparação de hip a partir de uma rota alternativa para a síntese do emodina. Motoyoshiya e colaboradores, descrevem para a etapa de redução, a utilização de 10,0 eq-mol de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de aproximadamente 2.505,0 eq-mol de HCl_{conc} por um período de 24 h de reação (Motoyoshiya e colab., 2007). Tobia e colaboradores, em 2012, reportaram a utilização de uma quantidade entre 4,2-6,5 eq-mol de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, com a adição lenta de HCl_{conc} durante todo o curso reacional, em um período entre 1 a 2 h, para a redução do emodina (Tobia e colab., 2012).

Como pode ser observado acima, realmente existe uma divergência nas condições experimentais encontradas na literatura para a reação de redução da AQ emodina e de seus derivados. A Tabela 4, resume as quantidades de equivalentes molares de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e HCl , bem como os rendimentos do produto principal (forma de antrona) reportados nos trabalhos da literatura.

Tabela 4. Diferentes condições experimentais e rendimentos reportados na literatura para a redução da AQ emodina e de seus derivados.

Autor / ano de publicação	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (eq-mol)	HCl_{conc} (eq-mol)	Tempo (min)	%
Falk e Oberreiter, 1993	3,2	25,0	300	88
Falk, Vaisburg e Amer, 1995	10,0	120,0	180-240	72-84
Falk e colab., 1998	5,0	33,0	10	90
Altmann, Falk e Gruber, 1998	20,0	30,0	20	40
Motoyoshiya e colab., 2007	10,0	2.505,0	1.440	96
Tobia e colab., 2012	4,2-6,5	Adição contínua	60-120	95

Contudo, de modo a contornar as divergentes informações descritas na literatura, nesta etapa do trabalho, a reação de redução da AQ emodina foi devidamente otimizada por monitoramento cinético, utilizando a técnica de absorção eletrônica na região do UV-Vis.

4.2.2.1. Monitoramento cinético da reação de redução da AQ emodina

Em vista do exposto acima, fica evidente que há uma grande dificuldade na escolha das melhores condições experimentais para a reprodução da reação de redução do emodina. Contudo, ao tentarmos reproduzir algumas condições experimentais mostradas na Tabela 4, os resultados obtidos em termos de rendimento e pureza do produto **17** foram frustrantes e ficaram muito aquém daqueles fornecidos pelos autores. Entretanto, como forma de contornarmos este problema encontrado na literatura, e sobretudo para prevenir gastos desnecessários com perdas de rendimento e pureza do produto principal, diferentes condições experimentais dos agentes redutores: $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**A**) e HCl_{conc} (**B**) foram avaliadas (Tabela 5) e as reações monitoradas por UV-Vis.

Tabela 5. Diferentes condições experimentais de **A** e **B** avaliadas para a redução de **8**, e rendimento de **17** obtido para cada caso.

Experimento	A (eq-mol)	B (eq-mol)	Tempo (min)	(%)
1	2,0	25,0	120	-
2	2,0	50,0	120	30
3	2,0	100,0	120	30
4	3,2	25,0	120	-
5	3,2	50,0	120	45
6	3,2	100,0	30	95
7	6,4	100,0	30	95
8	3,2	100,0	300	50

Inicialmente, quando a reação é avaliada na presença de, respectivamente, 2,0 e 25,0 eq-mol de **A** e **B** (experimento 1), nenhum produto resultante da redução do emodina é formado, visto que seu espectro de absorção permanece inalterado, mesmo após um período de 120 min, (Figura 26-a). Porém, quando a quantidade de **B** é aumentada para 50,0 eq-mol (experimento 2), observa-se, após 3 min, uma diminuição de 0,15 na absorbância da principal banda do emodina ($\lambda_1 = 450$ nm), juntamente com o surgimento da principal banda do emodina antrona ($\lambda_2 = 355$ nm), a qual atinge um limite máximo de absorbância (0,12) após decorrido um período de 12 min, porém este valor se mantém inalterado até o final do período de monitoramento (Figura 26-b).

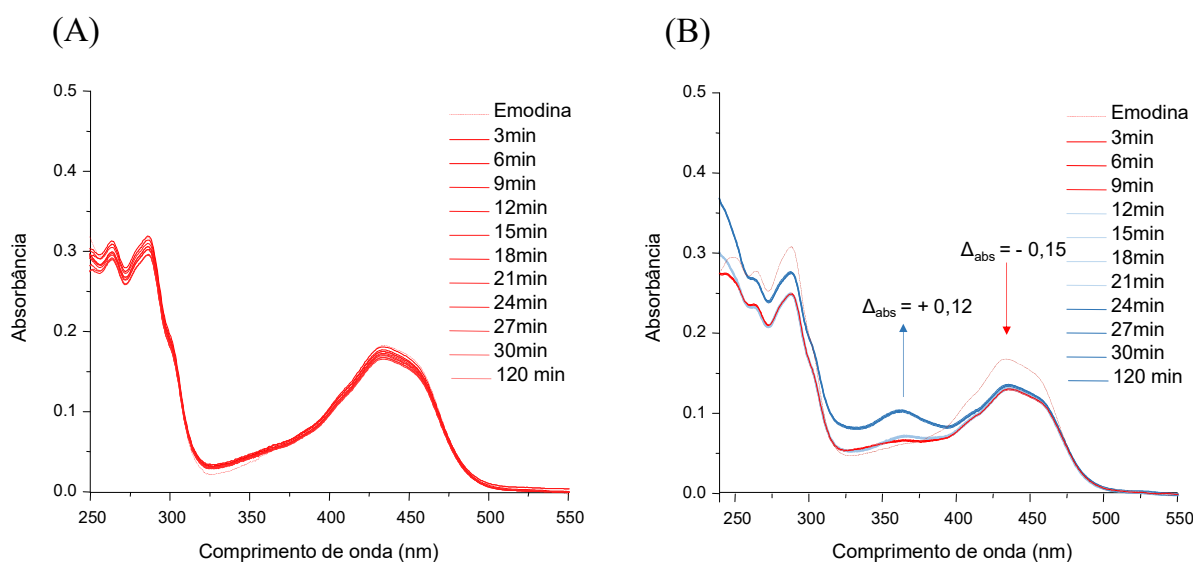


Figura 26. Monitoramento cinético das reações de redução do emodina: (a) experimento 1: Emodina, $5,0 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹; **A**, 2,0 eq-mol; **B**, 25,0 eq-mol; 120 min de reação e (b) experimento 2: Emodina, $5,0 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹; **A**, 2,0 eq-mol; **B**, 50,0 eq-mol; 120 min de reação.

Sob as condições do experimento 3, o perfil espectral é bastante semelhante ao anterior, e nenhum aumento significativo na absorção de λ_2 (0,12) é observado após os doze primeiros minutos de monitoramento. Através dessas avaliações iniciais tem-se um indicativo de que quando **A** é adicionado em quantidades molares menor ou igual a 2,0

em relação ao emodina, a obtenção de sua forma reduzida é limitada para próximo de 30 %, mesmo na presença de um excesso do reagente **B** (50,0-100,0 eq-mol). Nos experimentos seguintes, a redução do emodina foi avaliada fixando-se **A** em 3,2 eq-mol e variando-se **B** em 25,0, 50,0 e 100,0 eq-mol. Assim, para as condições do experimento 4, a mesma utilizada por Falk e Oberreiter (entrada 1, Tabela 4), nenhuma variação espectral de λ_1 é observada, mesmo após o período máximo de 120 min (Figura 27-a). Entretanto, quando a proporção estequiométrica de **B** é aumentada para 50,0 eq-mol (experimento 5), observa-se, após 3 min, uma queda de 0,19 na absorção de λ_1 , junto com um aumento de 0,25 na absorbância de λ_2 . Porém esses valores são mantidos constantes até o período de 120 min, fornecendo, após isolamento da mistura, um rendimento de 45 % de **2** (Figura 27-b).

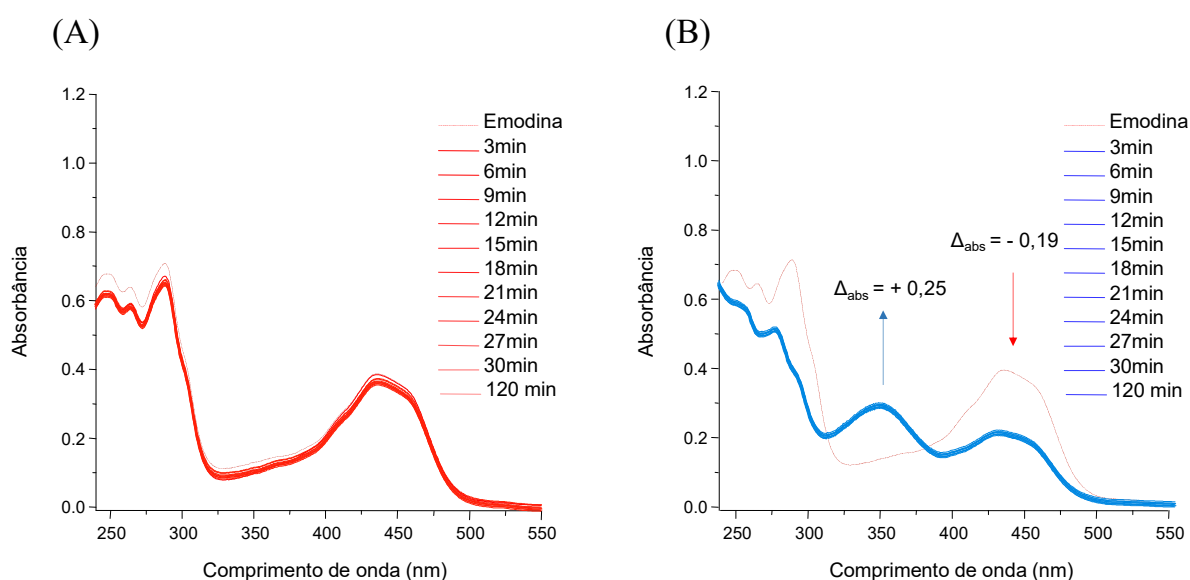


Figura 27. Monitoramento cinético das reações de redução de **17**, (a) experimento 4: Emodina, $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; **A**, 3,2 eq-mol; **B**, 25,0 eq-mol; 120 min de reação e (b) experimento 5: Emodina, $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; **A**, 3,2 eq-mol; **B**, 50,0 eq-mol; 120 min de reação.

Por outro lado, quando **B** é adicionado em uma proporção de 100,0 eq-mol (experimento 6), o perfil espectral difere significativamente dos anteriores. Nos primeiros 3 min de reação, observa-se uma expressiva queda de 0,33 na absorvância de λ_1 , juntamente com o aparecimento de λ_2 em 0,25 de absorção. Nos períodos seguintes de monitoramento, os valores de absorção de ambas as bandas λ_1 e λ_2 continuam variando até atingirem, respectivamente, valores de mínimo (0,05) e máximo (0,69) em 30 min (Figura 28-a), cuja coloração da solução sofre uma mudança de coloração passando de laranja para amarelo claro, ponto no qual a reação é interrompida para o isolamento do produto, o qual é obtido, sem prévia purificação, com um rendimento de, aproximadamente, 95 %. Considerando que sob as quantidades molares dos agentes redutores selecionadas no experimento 6, após 30 min de reação o produto principal é obtido com alto grau de rendimento, então estas condições experimentais são consideradas ótimas para a redução do emodina. Contudo, quando **A** é aumentado para 6,4 eq-mol, e **B** mantido em 100,0 eq-mol (experimento 7), o perfil espectral observado é semelhante ao anterior, sugerindo que a adição de um excesso de **A**, acima de 3,2 eq-mol, não irá alterar, significativamente, o perfil reacional das condições ótimas, desde de que **B** esteja a uma proporção de, no mínimo, 100,0 eq-mol (Figura 28-b).

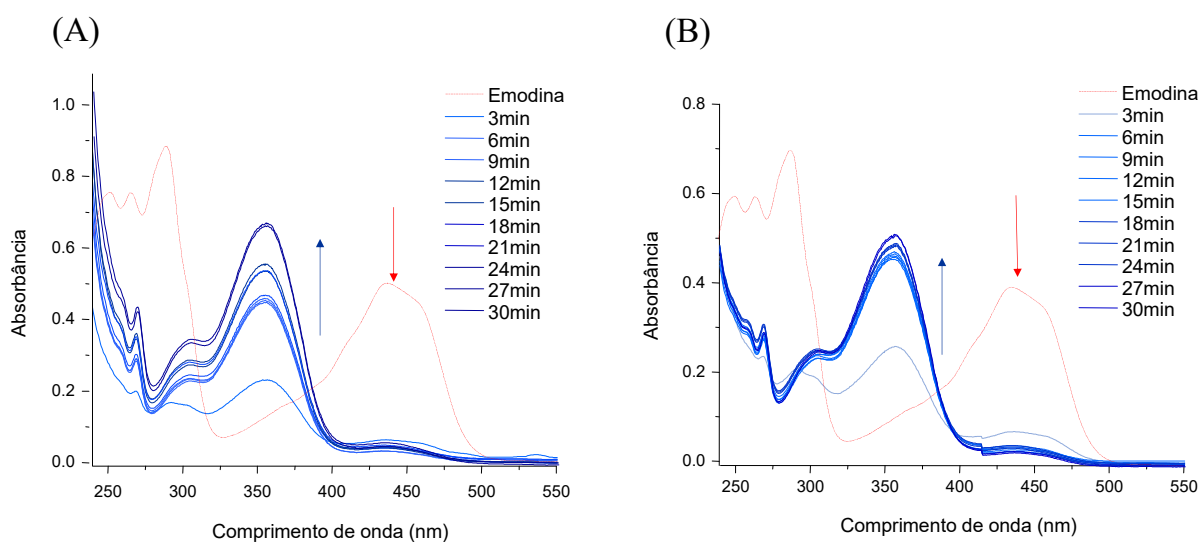


Figura 28. Monitoramento cinético das reações de redução de **8**, (a) experimento 6: Emodina, $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; **A**, 3,2 eq-mol; **B**, 100,0 eq-mol; 30 min de reação e (b) experimento 7: Emodina, $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; **A**, 6,4 eq-mol; **B**, 100,0 eq-mol; 30 min de reação.

Assim, determinada as condições experimentais ótimas, foi avaliado em seguida a influência do tempo reacional na redução do emodina. Mantendo-se as mesmas condições de **A** e **B** utilizadas no experimento 6, a redução do emodina foi monitorada por um período total de 24 h (experimento 8), o mesmo reportado por Motoyoshiya e colaboradores (entrada 5, Tabela 4). Desta forma, decorrido os primeiros 30 min, momento no qual a máxima quantidade do emodina é transformada em emodina antrona, observa-se, a partir daí uma mudança no perfil espectral, começando inicialmente com uma leve queda na absorção de λ_2 , a qual aumenta progressivamente junto a um pequeno deslocamento batocrômico para 361 nm, chegando-se a uma queda de 0,2 de absorção após 300 min de reação (Figura 29-a), e após 24 h de reação o perfil espectral é mantido inalterado (Figura 29-b).

As modificações espectrais são também acompanhadas por uma mudança de coloração da solução, após 180 min de reação, a cor amarelo-claro, característica da forma antrona, torna-se esverdeada com permanência da cor até o período final de monitoramento (24 h), (Figura 30).

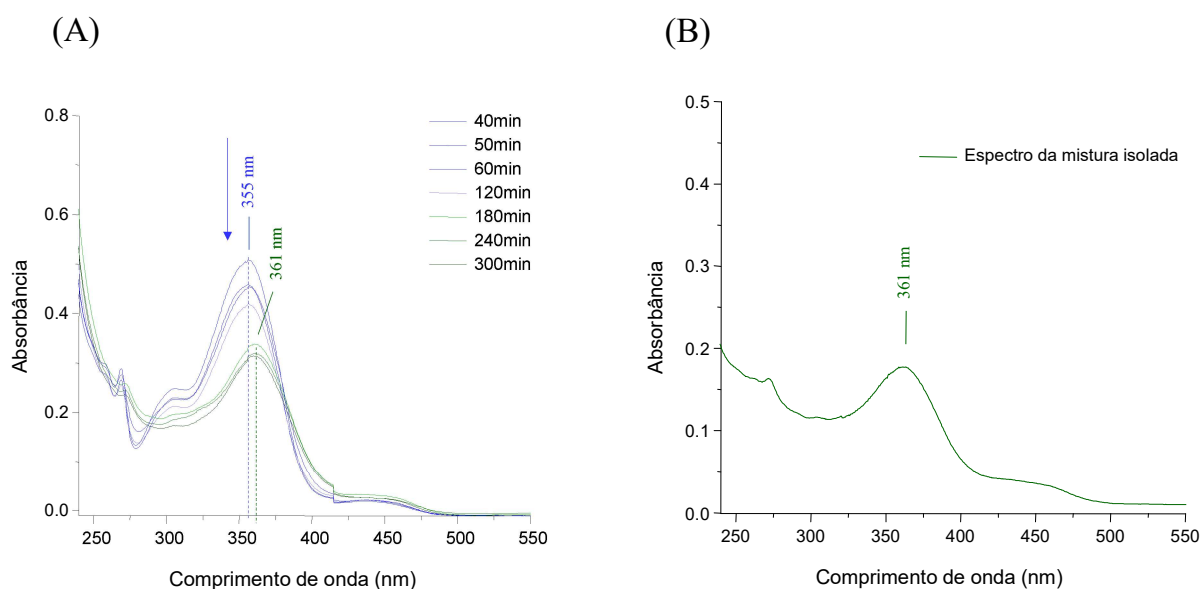


Figura 29. Monitoramento cinético da reação de redução do emodina, (a) experimento 8: Emodina, $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$; **A**, 3,2 eq-mol; **B**, 100,0 eq-mol; 300 min de reação e (b) espectro da mistura isolada após o período de 24 h de reação.

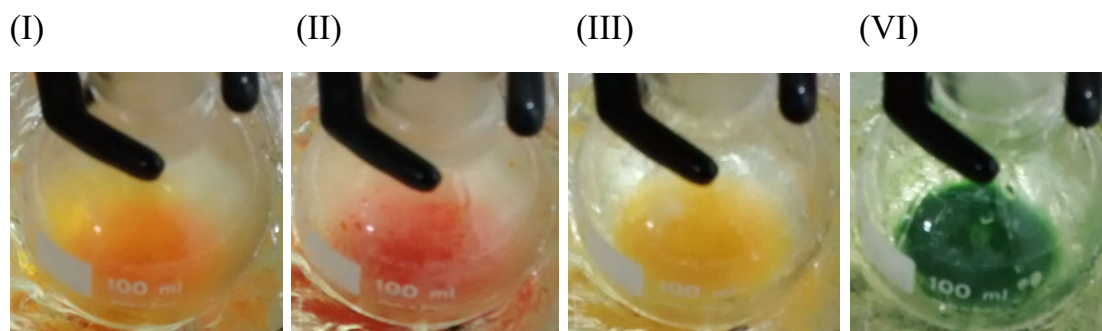


Figura 30. Mudança de coloração da solução durante o curso da redução do emodina: (I) antes da adição da mistura redutora, (II) imediatamente após a adição da mistura redutora, (III) após 30 min de reação e (IV) após 300 min de reação.

Tais alterações, tanto espectrais como visuais, estão atribuídas à formação de subprodutos no curso reacional, decorrentes de processos redutivos consecutivos a partir da formação do emodina antrona. Mediante análise do espectro de RMN de ^1H do produto isolado (sólido verde), é possível observar que na região aromática do espectro,

estão presentes um total de onze sinais de hidrogênio, sete a mais com relação ao observado no espectro de RMN de ^1H do emodina antrona, apresentado adiante. Os valores das integrais, calculados para esses sinais, revelam que existe uma proporção de, aproximadamente, 21 % do produto principal em relação aos demais subprodutos, os quais são também confirmados mediante a presença de dois sinais de hidrogênios benzílicos em δ 4,35 e 4,19 ppm, devido, possivelmente, à redução da carbonila C10 (Figura 31 e 32).

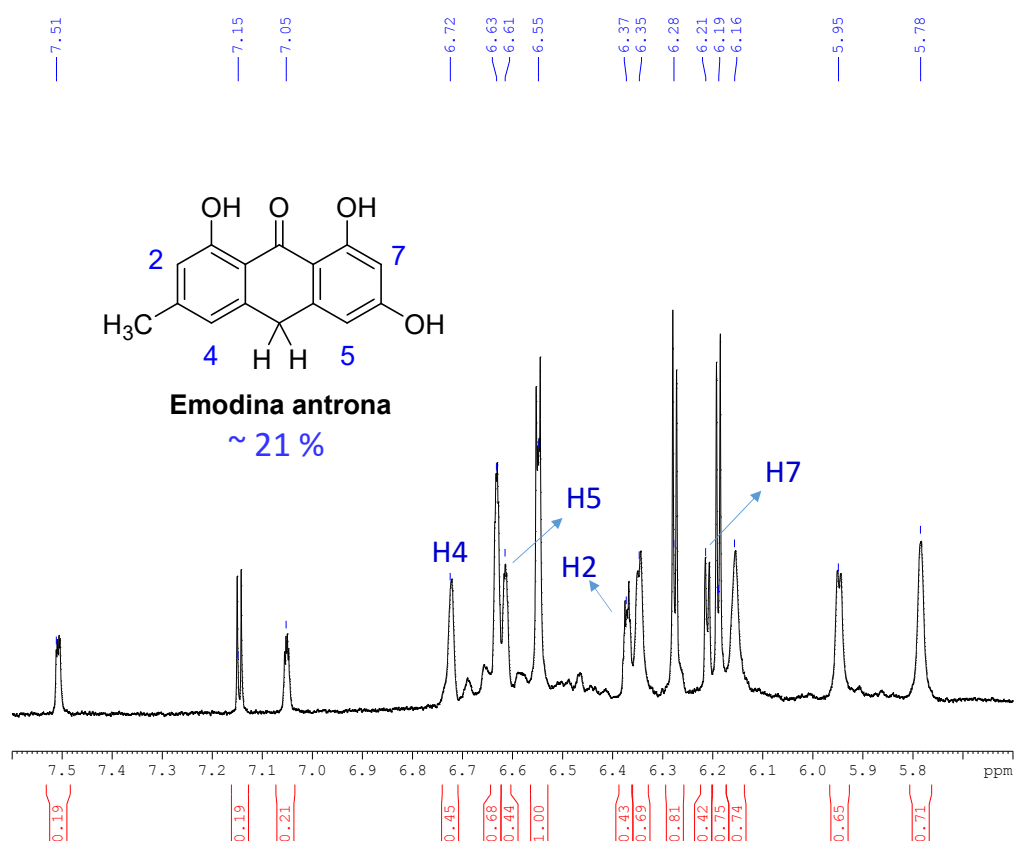


Figura 31. Expansão do espectro de RMN de ^1H (δ 7.5-5.8 ppm) do produto isolado a partir do experimento 8, adquirido em DMSO- d_6 a 300 MHz.

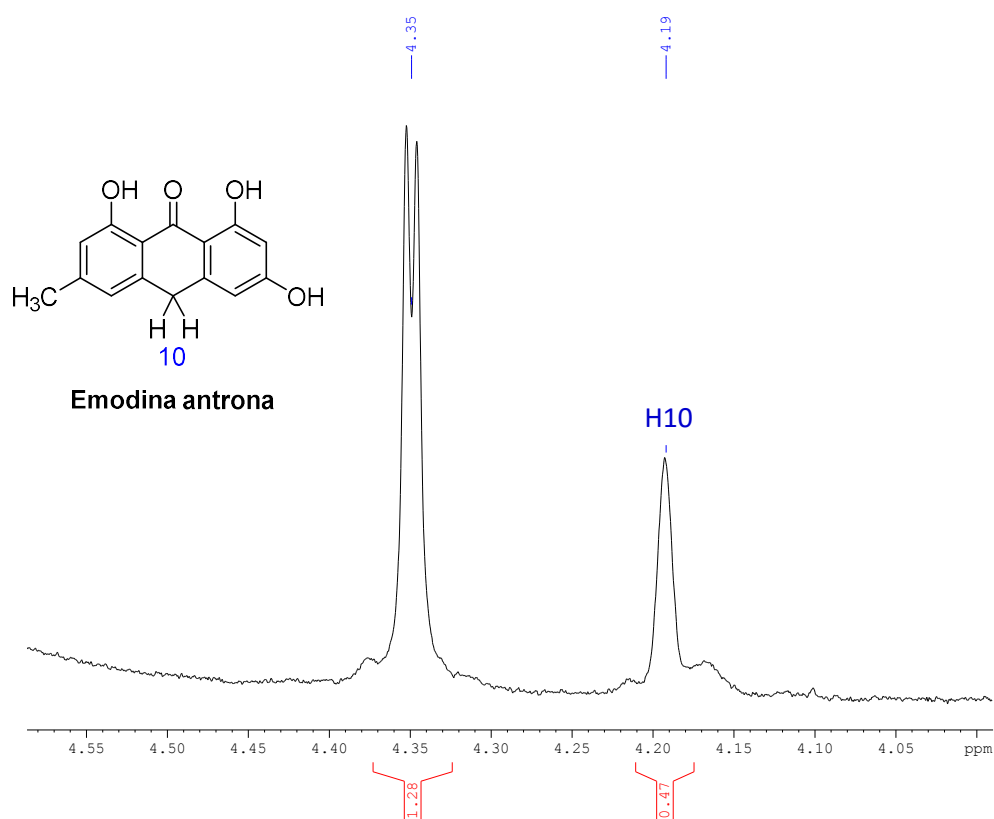


Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ¹H (δ 4.5-4.0 ppm) do produto isolado a partir do experimento 8, adquirido em DMSO-d₆ a 300 MHz.

Contudo, observa-se que a perda de rendimento e pureza do produto principal, é inevitável quando a reação é mantida sob ação dos agentes redutores durante um período prolongado de tempo (acima de 2 h), entretanto é curioso que alguns autores, como por exemplo, Motoyoshiya e colaboradores reportam valores de rendimento elevado (96 %) para a obtenção do emodina antrona, na presença de quantidades elevadas dos agentes redutores (10,0 e 2.505,0 eq-mol de **A** e **B**, respectivamente) sob um tempo de reação prolongado (24 h).

4.2.2.2. Caracterização do emodina antrona por RMN de ^1H e ^{13}C

De modo a comprovar a eficiência da redução do emodina sob as condições experimentais otimizadas (experimento 6), o produto final em sua forma bruta (sem prévia purificação) foi submetido à análise de RMN de ^1H e ^{13}C . Desta forma analisando-se o espectro de RMN de ^1H (Figura 33 e 34) observa-se em δ 12,37, 12,21 e 10,83 ppm três sinais de multiplicidade singleto os quais são atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios hidroxílicos OH-1, OH-8 e OH-6, cujo valor de suas integrais revelam 1H para cada sinal (Tabela 6). Na região aromática do espectro, entre δ 6,77 – 6,22 ppm são observados quatro sinais, correspondes aos hidrogênios H4 (*q*), H-5 (*m*), H-7 (*dq*) e H-2 (*d*), os quais integram cada um para um total de 1H. Já, na região alifática do espectro, observa-se em δ 4,30 ppm a presença de um sinal de simpleto, o qual é atribuído aos hidrogênios benzílicos H-10, os quais integram para um total de 3H. A presença de apenas um sinal nesta região do espectro, comprova a seletividade na redução da carbonila C10. Finalmente, o sinal observado em δ 2,31 ppm (*t*), cuja integral revela um total de 3H, é atribuído aos hidrogênios metílicos da posição C6, confirmando a caracterização do emodina antrona.

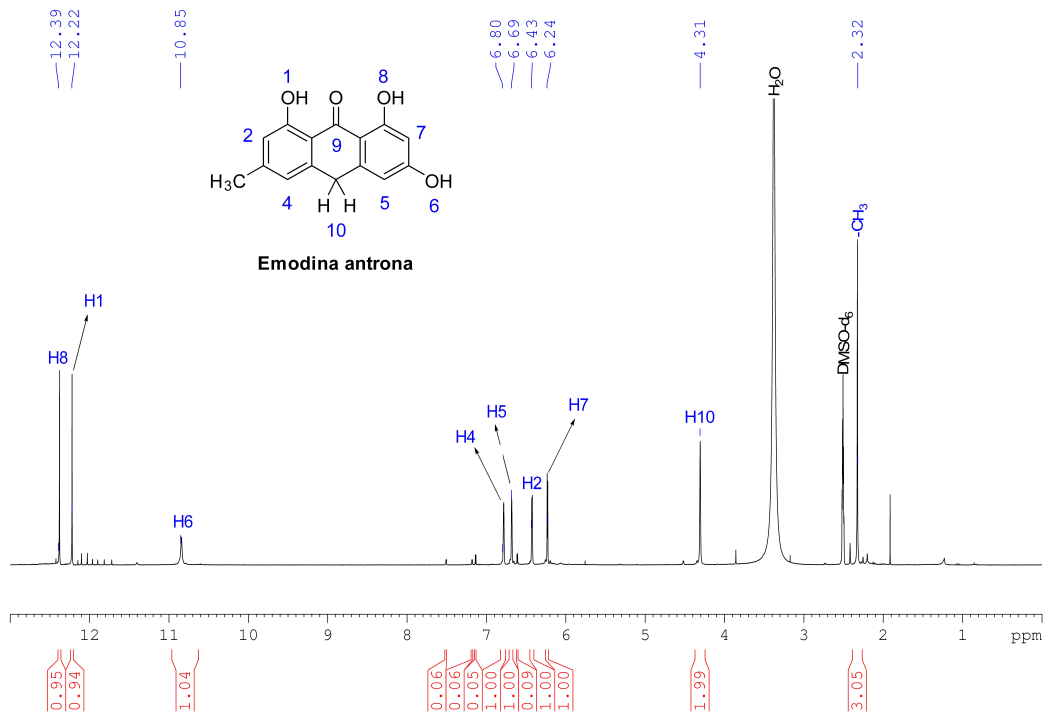


Figura 33. Espectro de RMN de ¹H do emodina antrona, adquirido em DMSO-d₆ a 300 MHz.

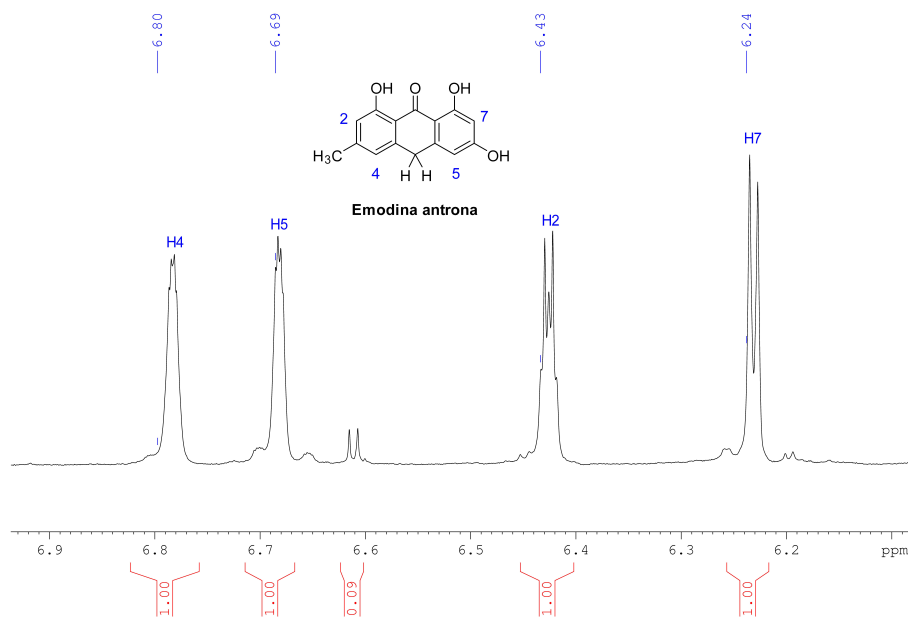


Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ¹H do emodina antrona, adquirido em DMSO-d₆ a 300 MHz.

A caracterização do emodina antrona, também foi realizada por RMN de ¹³C, cuja análise do espectro, pode-se observar um total de 15 sinais, os quais estão de acordo com a estrutura química do produto principal (Figura 35). Adicionalmente o sinal que se observa em δ 32,71 ppm corresponde ao carbono benzílico C10, o qual aparece como resultado da redução da carbonila, inicialmente presente nesta posição. Além disso, a presença de apenas um sinal de carbono carbonílico (-C=O) em 191,28 ppm, confirma a redução seletiva do emodina, excluindo a possibilidade da formação de subprodutos.

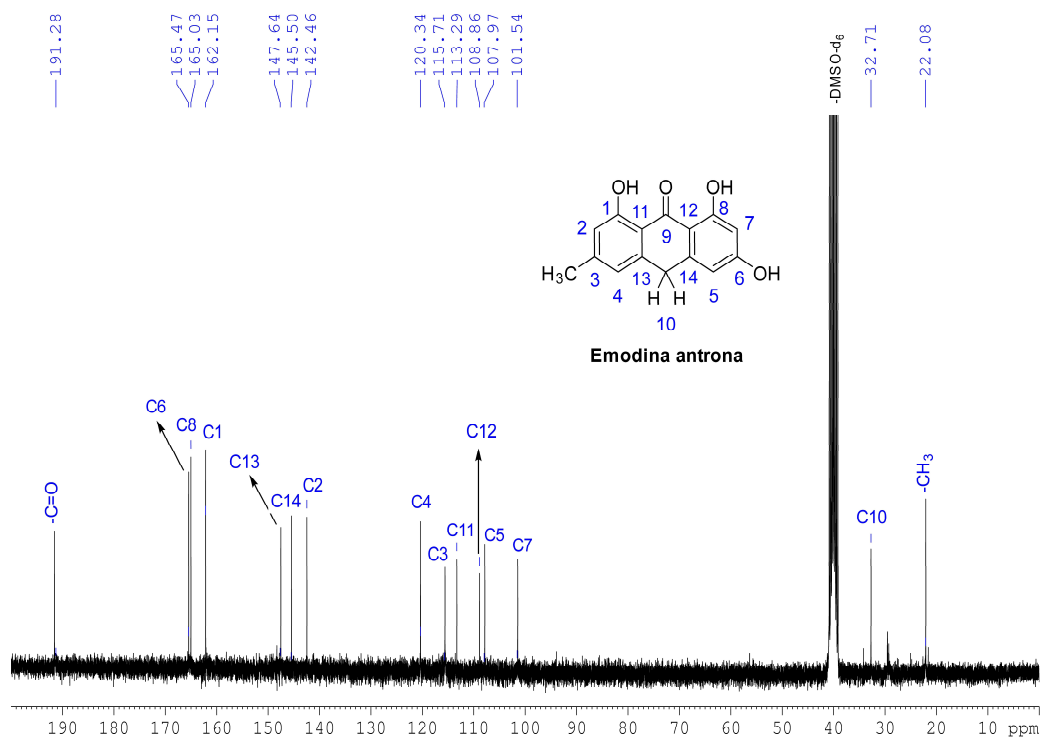
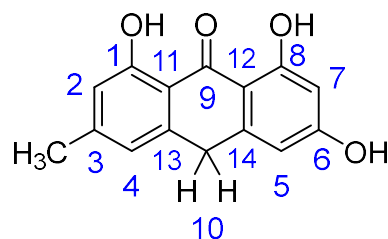


Figura 35. Espectro de RMN de ¹³C do emodina antrona, adquirido em DMSO-d₆ a 75 MHz.

Tabela 6. Valores de δ (ppm), multiplicidade e integral observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da AQs emodina antrona obtidos em DMSO- d_6 a 300 e 75 MHz, respectivamente.

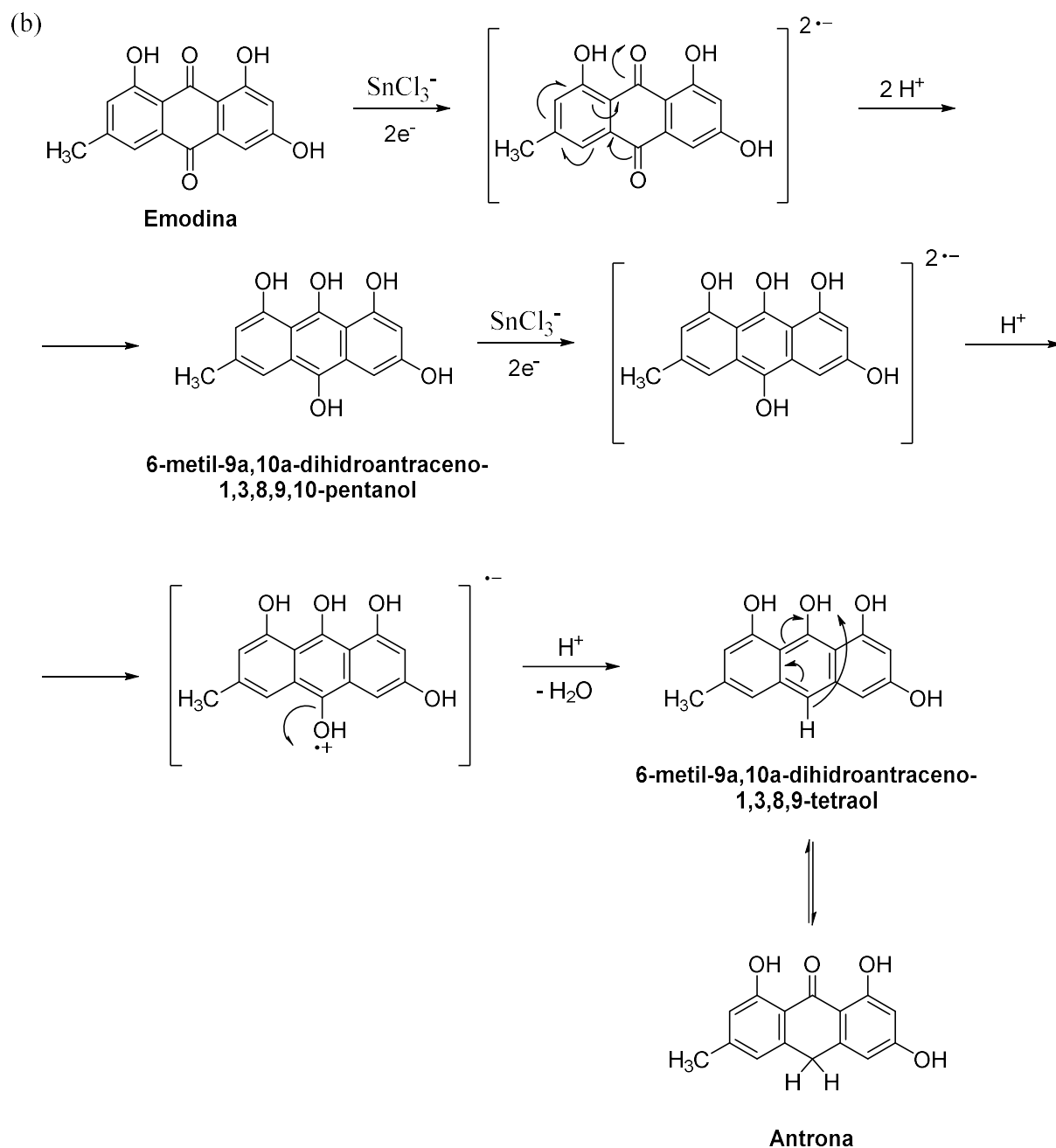
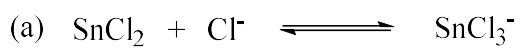


Emodina antrona

Átomos	^1H	Átomos	^{13}C
OH-1	12,21 (<i>s</i> , 1H)	C1	162,15
OH-3	10,84 (<i>s</i> , 1H)	C2	142,46
OH-8	12,37 (<i>s</i> , 1H)	C3	115,71
H-2	6,42 (<i>dq</i> , 1H)	C4	120,34
H-4	6,77 (<i>m</i> , 1H)	C5	107,97
H-5	6,67 (<i>m</i> , 1H)	C6	165,47
H-7	6,23 (<i>d</i> , 1H) $^3J_{7,5} = 2,2$	C7	101,54
H-10	4,30 (<i>s</i> , 2H)	C8	165,03
Ar-CH ₃	2,32 (<i>t</i> , 3H)	-C=O	191,28
		C10	32,71
		C11	113,29
		C12	108,86
		C13	147,64
		C14	145,50x
		-CH ₃	22,08

4.2.2.3. Mecanismo proposto para a reação de redução da AQ emodina

Embora sejam escassos os trabalhos da literatura que reportam o mecanismo de redução da AQ emodina na presença de estanho e HCl_{conc} as mesmas considerações feitas por Lund em 1971, podem ser aplicadas para compreendermos as etapas de redução do emodina. Primeiramente deve-se considerar que a espécie redutora (SnCl_3^-) é formada pela reação entre SnCl_2 e HCl em iguais quantidades molares (Esquema 12-a), (Xing e Ogata, 1982). Na primeira etapa do mecanismo, $2e^-$ são transferidos da espécie SnCl_3^- para o emodina, a qual em seguida reage com dois prótons para a formação do 6-metil-9a,10a-dihidroantraceno-1,3,8,9,10-pentanol, ao qual, na segunda etapa do mecanismo, mais $2e^-$ são transferidos e 2H^+ . Na última etapa do mecanismo, uma molécula de água é eliminada para dar origem ao 6-metil-9a,10a-dihidroantraceno-1,3,8,9-tetraol o qual isomeriza para a forma de antrona (Esquema 12-b).



Esquema 12. Mecanismo proposto para a redução da AQ emodina em sua forma de emodina antrona.

A especificidade na redução do carbono C10 pode ser explicada devido a participação de pelo menos um par de elétrons livres da carbonila, presente nesta posição C10, em abstrair um próton levando-se a sua eliminação na forma de H₂O (segunda etapa do mecanismo). Assim, uma vez que cada par de elétrons da carbonila da posição C9 estão sendo compartilhados para a formação de ligações de hidrogênios com os grupos β -hidroxílicos (Figura 36), não existe a possibilidade da sua eliminação e conseqüentemente da redução do carbono C10.

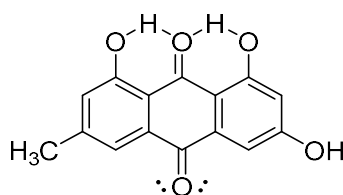


Figura 36. Estrutura proposta para a AQ emodina, mostrando que os dois pares de elétrons da carbonila C9 estão sendo compartilhados para formação de ligações de hidrogênio com os grupos β -hidroxílicos.

Estudos envolvendo α e β -hidroquinonas já foram reportados na literatura, com o propósito de se compreender o papel das ligações de hidrogênio intramolecular em seus comportamentos eletroquímicos. Como relatado por Frontana e González, devido ao fato dos hidrogênios β -hidroxílicos estarem “presos” em uma estrutura cíclica de 6 membros, os grupos β -hidroxílicos não são ácidos o suficiente para protonar as espécies formadas após a primeira transferência eletrônica (Frontana e González, 2005). Tais observações servem de suporte para comprovar a estrutura proposta para a AQ emodina e conseqüentemente sua especificidade na redução da carbonila C10. Entretanto, embora exista uma seletividade no mecanismo da reação de redução da carbonila C10 em relação a C9, sob condições experimentais extremas, tais como altas quantidades molares de agentes redutores e tempos de reação prolongados, não se pode descartar a possibilidade da ocorrência de processos redutivos consecutivos, como pode ser observado nos resultados mostrados acima.

4.2.3. Preparação da protohipericina via dimerização oxidativa do emodina antrona.

Uma vez obtido o emodina antrona, segundo as condições otimizadas discutidas anteriormente, a mesmo foi utilizado, sem prévia purificação, para a preparação da protohipericina, com base no procedimento patenteado por Mazur e colaboradores (Mazur, Bock e Lavie, CA 2 029 993, 1989). Entretanto, na patente em questão, não é relatado rendimento de obtenção da protohipericina, nem o método de purificação usado pelos autores. Contudo, a análise de RMN de ^1H da protohipericina em sua forma bruta obtido neste trabalho, após a fiel reprodução das etapas descritas pelos autores, revelou uma quantidade relativamente grande do reagente de partida utilizado para esta etapa do procedimento sintético da Hip. Desta forma, a purificação da protohipericina foi realizada por técnica de CC utilizando DCM/acetona como FM, para obtenção de, aproximadamente, 75 % da protohipericina, cuja sua caracterização por RMN de ^1H é discutida abaixo.

Inicialmente, no espectro de RMN de ^1H da protohipericina (Figura 37) são observados em δ 14,41 e 12,89 ppm, respectivamente, os sinais de hidrogênios hidroxílicos (OH-1 e OH-6) e (OH-15 e OH-8), os quais integram cada um para um total de 2H (Tabela 7). Na região aromática do espectro são observados três sinais em δ 7,23, 6,77 e 6,33 ppm, os quais são atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-9 (*d*) e H-14 (*d*), H-11 (*dq*) e H-12 (*dq*), H-2 (*s*) e H-5 (*s*), os quais integram cada um para um total de 2H. Finalmente, na região alifática do espectro, é observado a presença de um sinal em 2,07 ppm, o qual é atribuído aos hidrogênios metílicos, cuja integral revela um total de aproximadamente 6H.

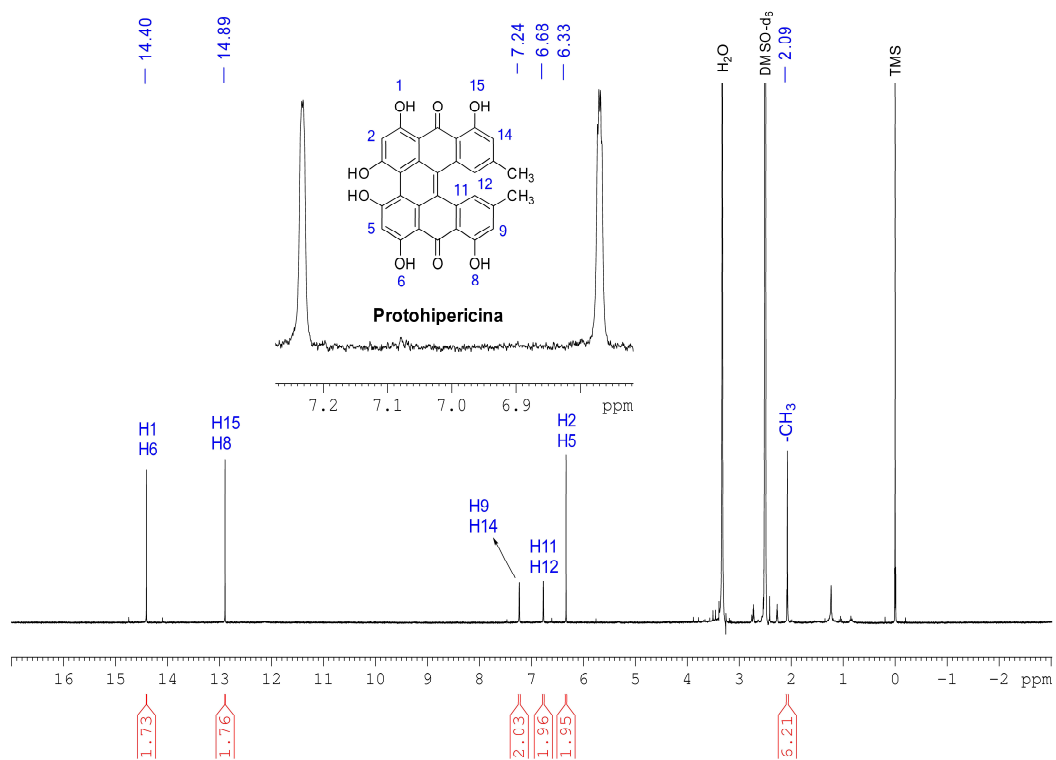
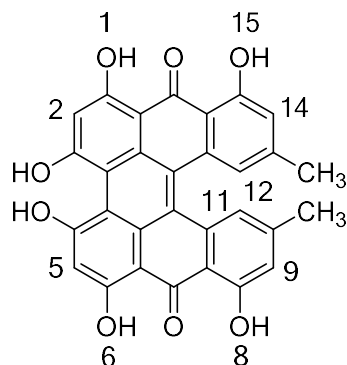


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H da protohipericina, adquirido em DMSO-d₆ a 300 MHz.

Tabela 7. Valores de δ (ppm), multiplicidade e integral observados no espectro de RMN de ^1H da protohipericina, obtido em DMSO- d_6 a 300 MHz.



Protohipericina

Átomos	^1H
OH-1 / OH-6	14,40 (<i>s</i> , 2H)
OH-8 / OH-15	12,89 (<i>s</i> , 2H)
H-2 / H-5	6,33 (<i>s</i> , 2H)
H-9 / H-14	7,23 (<i>q</i> , 2H)
H-11 / H-12	6,77 (<i>q</i> , 2H)
-CH₃	2,07 (<i>t</i> , 6H)

4.2.4. Reação de fotociclização da protohipericina

Não somente as condições experimentais para a redução da protohipericina têm sido descritas com divergência na literatura, mas também, diferentes tipos de fontes e tempos de irradiação são encontrados em trabalhos que descrevem a etapa de fotociclização da protohipericina e/ou de seus compostos derivados. No trabalho pioneiro de Brockmann e colaboradores em 1957, sobre a síntese total da Hip, os autores descrevem a utilização de uma fonte de irradiação de 1000 W para a obtenção, após purificação cromatográfica, de rendimento quase que quantitativo de Hip (Brockmann, Kluge e Muxfeldt, 1957). Em 1989, Mazur e colaboradores, descrevem para o mesmo processo, a utilização de uma lâmpada halógena de 500 W, durante um período reacional

de 12 h, cujo rendimento dessa etapa não é revelado pelo autor (Mazur, Bock e Lavie, CA 2 029 993, 1989). No trabalho publicado por Falk e Schoppel em 1992, os autores reportam a utilização de uma lâmpada de vapor de Hg, de 500 W, cuja irradiação é mantida por um período de 10 min para obtenção, após purificação cromatográfica, de 92 % de Hip (Falk e Schoppel, 1992). Motoyoshiya e colaboradores, em 2006, descrevem para a etapa de fotociclização, a utilização de uma lâmpada de Hg e de alta pressão, por um período de irradiação de 1 h para obtenção, após purificação cromatográfica, de 31 % de Hip (Motoyoshiya e colab., 2006). Recentemente, na patente desenvolvida por Tobia e colaboradores, os autores descrevem o uso de um fotorreator para a fotociclização da protohipericina, constituído de uma coluna de vidro ou material polimérico de alta transparência, ao qual é passado, via fluxo contínuo, uma solução de protohipericina em acetona. O processo de irradiação é realizado utilizando-se duas lâmpadas fluorescentes, dispostas a uma distância de, aproximadamente, 20,0 cm da coluna, durante um período de 50 h para obtenção, após lavagem do produto com hexano, de 50 % de Hip (Tobia e colab., US20120245392A1, 2012).

Todavia, o emprego de lâmpadas de alta potência (> 300 W) e tempos de irradiação prolongado (> 15 min) tem sido fatores comuns observados para a maioria desses trabalhos. Contudo, sob condições extremas de irradiação, a Hip pode sofrer um efeito comum característicos de fotossensibilizadores, o chamado fotobranqueamento, ou do inglês, *photobleaching*. O fotobranqueamento é caracterizado por alterações fotoquímicas em corantes ou fluoróforos, em decorrência de quebras de ligações covalentes que compõem os grupos cromóforos ou fluoróforos. Como resultado dessa desestruturação química, dar-se-á uma perda da cor característica da molécula e/ou de sua capacidade em fluorescer (Serra e Terentjev, 2008). Deste modo, uma vez que o fotobranqueamento pode induzir à perda de rendimento/pureza do produto principal, devido, principalmente à formação de subprodutos, é curioso que, provavelmente, nos trabalhos descritos acima, os autores não tenham levado em consideração a possibilidade do efeito do fotobranqueamento, durante a descrição dos processos de obtenção da Hip e de seus derivados e, mesmo assim, em alguns casos os rendimentos descritos são relativamente elevados. Todavia, uma quantidade reduzida de trabalhos

descritos na literatura tem estudado a influência da luz no efeito de fotobranqueamento da Hip, cujos resultados demonstram que efetivamente, danos estruturais podem ser causados às moléculas quando estas são submetidas a períodos de irradiação prolongado, mesmo na presença de baixas taxas de $^1\text{O}_2$ gerado, ressaltando que o fotobranqueamento pode ter influência direta do efeito das energias dos fótons absorvidos pelas moléculas do fotossensibilizador (Uzdensky, Iani, Moan, 2002; Saw e colab., 2006).

Neste sentido, nesta etapa do trabalho, foi avaliado o efeito do fotobranqueamento na Hip quando esta é submetida à irradiação, com uma lâmpada de Hg alta potência (400 W), sob prolongados períodos de tempo. Adicionalmente, foi demonstrado a eficiência/otimização do processo final da fotociclização da protohipericina, utilizando-se um sistema de LEDs de baixa potência e de diferentes cores: Azul, verde, laranja e vermelho, como fonte de irradiação alternativa àquelas utilizadas na literatura.

4.2.4.1. Monitoramento cinético da reação de fotociclização da protohipericina na presença de uma lâmpada de alta potência (W).

Inicialmente, foi avaliado o efeito do fotobranqueamento da hip quando a reação de fotociclização da protohipericina é executada utilizando uma lâmpada de Hg de 400 W, comparando-os com os efeitos de degradação fotoquímica oriundos da exposição à irradiação de LEDs de cor/energia específicos. O curso da reação é monitorado cineticamente por UV-Vis, cujos resultados estão apresentados na (Figura 38).

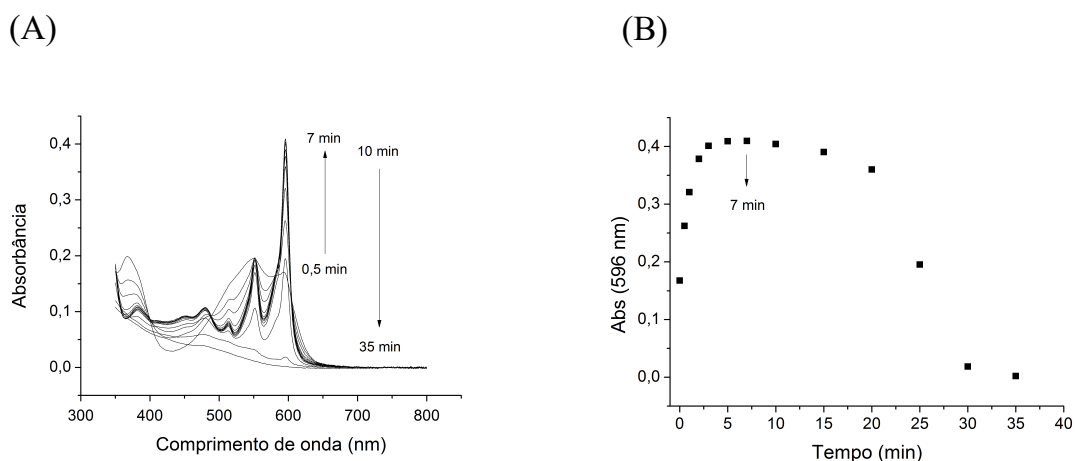


Figura 38. Monitoramento cinético da reação de fotociclização da protohipericina em Hip ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) sob a irradiação com lâmpada de Hg de alta potência (400 W), durante um período total de 35 min. (a) Espectros; (b) monitoramento da formação da Hip com o tempo de irradiação ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$), $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$.

O resultado observado através das figuras 38-a e b foi surpreendente: após 0,5 min de irradiação, o espectro inicial da protohipericina, cujas principais bandas de absorção são observadas em $\lambda = 552$ e 596 nm , começa a dar origem ao espectro da Hip, porém ainda com valores baixos de absorção em $\lambda_{596\text{nm}}$ (0,25). Quando o tempo de irradiação atinge cerca de 7 min, a absorção em $\lambda_{596\text{nm}}$ atinge seu valor máximo de cerca de 0,40; porém a partir deste tempo inicia-se uma queda em sua absorção para 0,35 em 20 minutos de irradiação simultaneamente à observação de uma descoloração, que se torna mais acentuada com a subsequente queda vertiginosa da absorção da solução de 0,35 para 0,0, entre 30 e 35 min, com completa descoloração da amostra.

Este resultado mostra que sob a influência de uma fonte de irradiação de alta potência e multifrequencial o efeito do fotobranqueamento das moléculas de Hip é inevitável, levando à formação irreversível de subprodutos, e como consequência, uma perda considerável de rendimento e pureza, cujos valores podem ser ainda maiores, quanto maior for a potência da lâmpada e o tempo de exposição das moléculas à irradiação; fato que é atribuído não somente devido à dose de luz (W/cm^2), mas também pela irradiação com diferentes comprimentos de onda, não levado em conta nos estudos descritos anteriormente.

4.2.4.2. Monitoramento cinético da reação de fotociclização da protohipericina na presença de LEDs (mW) de baixa potência.

Os resultados apresentados a seguir, mostra a eficiência da fotoconversão da protohipericina em Hip sob a influência de irradiação luminosa de LEDs de diferentes regiões de comprimentos de onda e de relativa baixa potência (mW), por meio dos quais pode-se comparar a eficiência do processo em termos da especificidade de λ e do grau de fotobranqueamento frente aos outros sistemas de irradiação descritos. Inicialmente, e de uma forma qualitativa, as sobreposições espectrais (Figura 39) dos espectros de emissão das diferentes fontes de irradiação utilizadas (LEDs de diferentes cores/energia), com os espectros de absorção tanto do reagente (protohipericina) como do fotoproduto (Hip), permitiriam a princípio avaliar a escolha da fonte de irradiação mais desejável.

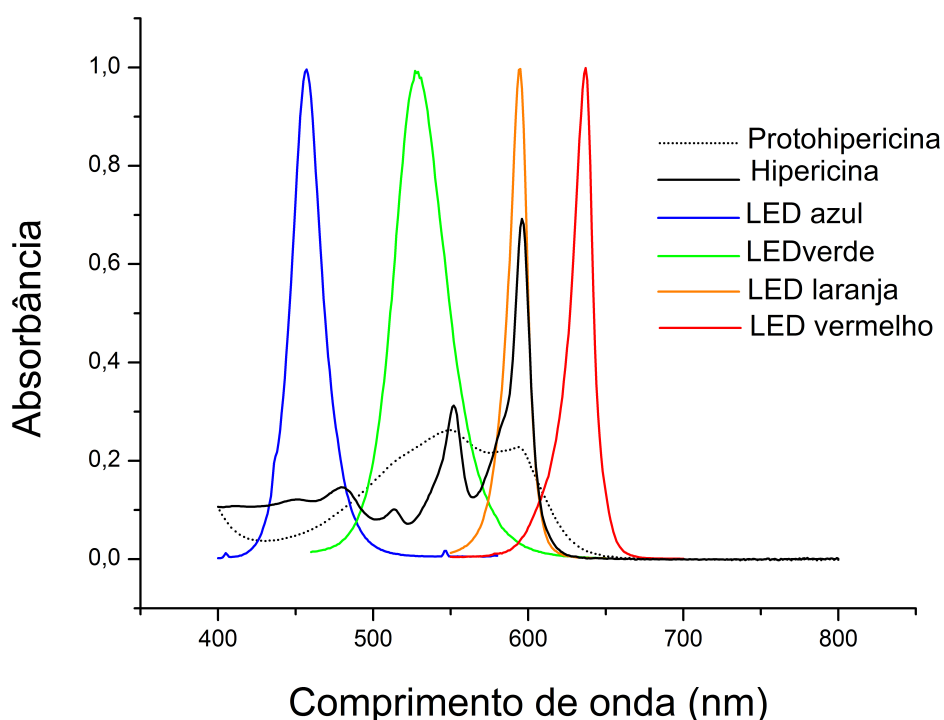
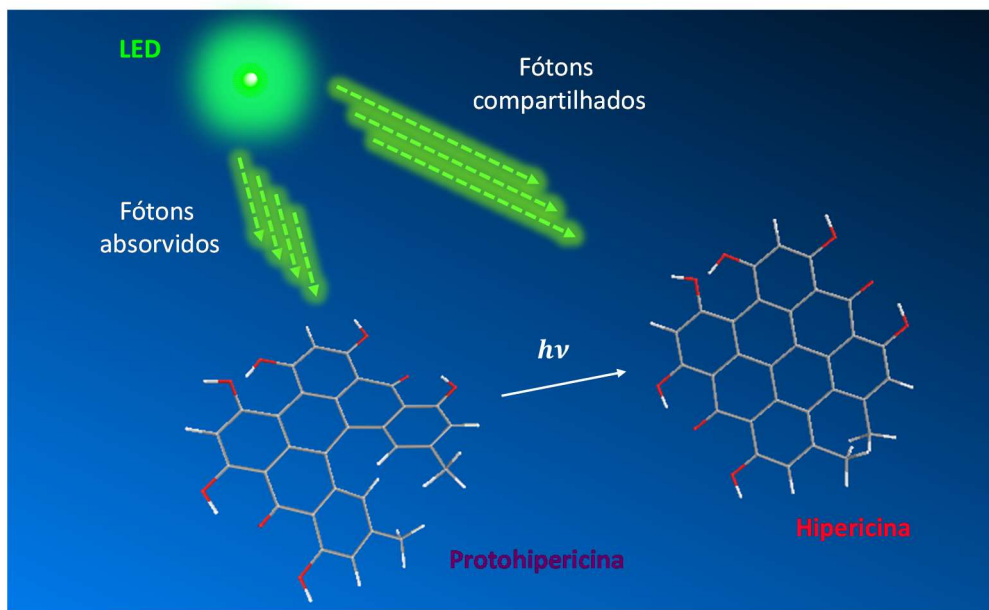


Figura 39. Sobreposição das principais bandas de absorção da protohipericina (---) e Hip (—), ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em acetona a 25 °C e espectros de emissão dos LEDs: azul (274,4 mW), verde (91,6 mW), laranja (18,2 mW) e vermelho (12,5 mW).

A análise da Figura 42 revela, por exemplo, que o sistema de LEDs laranja (31 mW) apresenta uma sobreposição espectral relativamente grande com a segunda banda de absorção da protohipericina ($\lambda_{\text{máx}} = 552 \text{ nm}$), e a medida que a reação de fotoconversão progride, dando lugar à formação da Hip no meio reacional, observa-se sobreposição intensa de sua principal banda de absorção ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$) com o espectro de emissão do LED. Consequentemente, é notável que com o progresso da reação, o número de fótons oriundos da fonte e compartilhados pelo produto será gradativamente maior que o absorvido pelo reagente, levando-se a uma queda progressiva na eficiência do processo fotoquímico.

Por outro lado, por exemplo quando se considera a sobreposição do espectro de emissão do sistema de LEDs verde (de menor potência, 21 mW) com os espectros de absorção de reagente e fotoproduto (neste caso de menor absorção, em $\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$), observa-se que são relativamente próximos. Desta forma, sem ainda considerar a potência da fonte de emissão, a eficiência do processo fotoquímico tenderia, ao menos, a se manter mais uniforme durante todo o curso reacional. Estas estimativas podem ser demonstradas mediante o monitoramento cinético da fotoconversão da protohipericina $9,4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ em acetona ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$), na presença dos diferentes tipos de LEDs (Figuras 40-43). A constante de velocidade de formação (K_f) de Hip pode ser obtida pelo ajuste teórico de crescimento monoexponencial, do tipo $y = 1 - e^{-kt}$, de primeira ordem, aplicado sobre os respectivos perfis cinéticos obtidos experimentalmente.

Como se observa na Figura 42, os valores de constantes cinéticas de formação da Hip K_f para o sistemas de LEDs laranja ($5,95 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) é apenas 8 % maior que para o sistemas de LEDs verde (Figura 41), portanto bem próximas, embora a potência do sistema de LEDs laranja seja cerca de 26 % maior que para o sistema de LEDs verde. Portanto os valores evidenciam a importância do tipo de LED sobre a contribuição no “compartilhamento” de fótons entre reagente e produto refletindo-se na eficiência do processo, como ilustrado no Esquema 13.



Fonte: Elaborada pelo autor

Esquema 13. Ilustração da fotoconversão da protohipericina em Hip correlacionando, respectivamente, os N_{Abs} absorvidos e compartilhados.

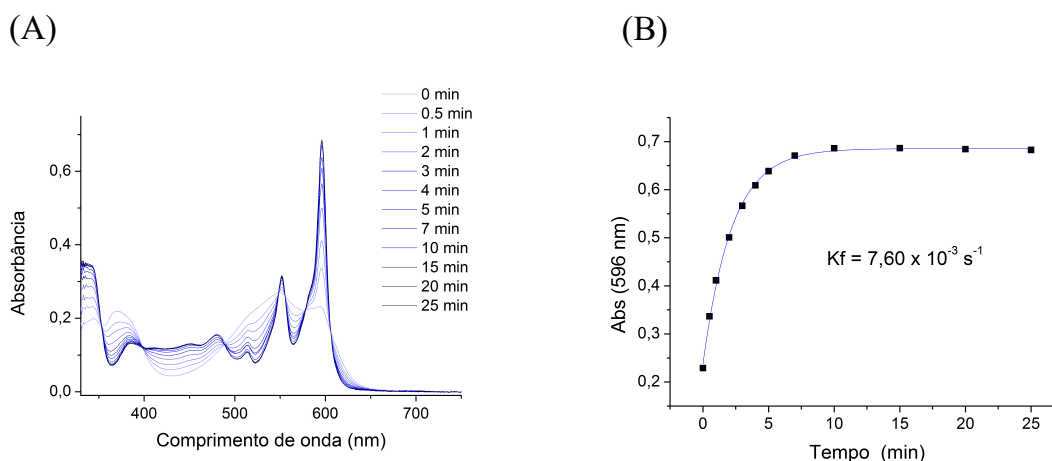


Figura 390. (a) Monitoramento cinético da reação de fotoconversão da Protohipericina em Hip ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) utilizando-se o sistema de **LEDs azul** (84 mW) como fonte de irradiação. (b) Perfil cinético experimental da variação da absorção da Hip ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$) monitorada em função do tempo e ajustada pelo modelo teórico de primeira ordem a $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

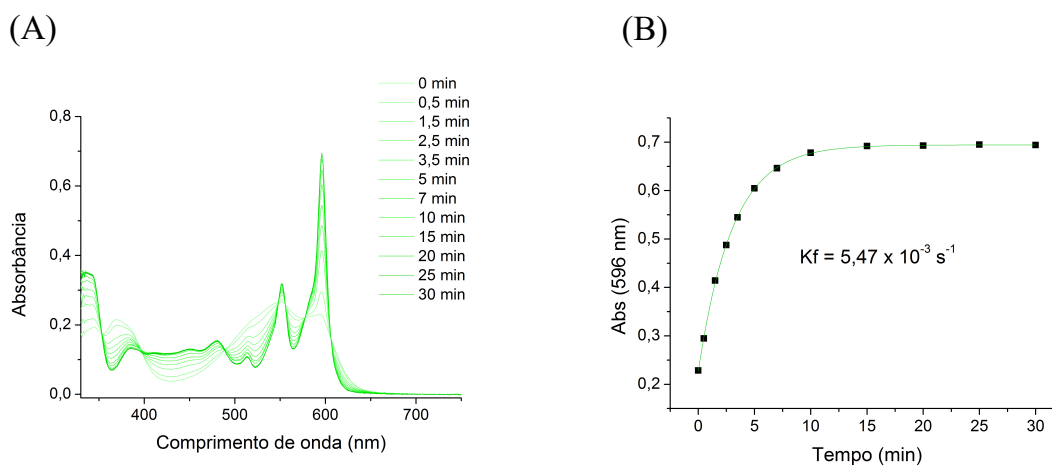


Figura 41. (a) Monitoramento cinético da reação de fotoconversão da Protohipericina em Hip ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) utilizando-se o sistema de **LEDs verde** (23 mW) como fonte de irradiação. (b) Perfil cinético experimental da variação da absorção da Hip ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$) monitorada em função do tempo e ajustada pelo modelo teórico de primeira ordem. $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por sua vez o sistema de LEDs verde (23 mW) possui uma sobreposição espectral (Figura 39) um pouco maior do fotoproduto do que o sistema de LEDs azul (84 mW), durante a formação da Hip ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$). Apesar da potência do sistema de LEDs azul ser cerca de 3.7 vezes maior que a do sistema verde, sua constante K_f ($7.60 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) é cerca de apenas 1.4 vezes maior que para o conjunto de LEDs verde ($5.47 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), demonstrando ainda assim a eficiência do LED verde na fotoconversão neste caso. Finalmente, a sobreposição espectral (Figura 39) é menor ainda com reagente e fotoproduto para os sistemas de LEDs azul (84 mW) e vermelho (19 mW); e quando comparamos a eficiência dos mesmos na velocidade de fotoconversão (Figuras 42 e 43), a constante K_f , obtida para o primeiro conjunto de LEDs Azul ($7.60 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) é cerca de 6.4 vezes maior que para o segundo (LED vermelho) ($1.18 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), enquanto a diferença na potência dos sistemas atinge cerca de 4.4 vezes.

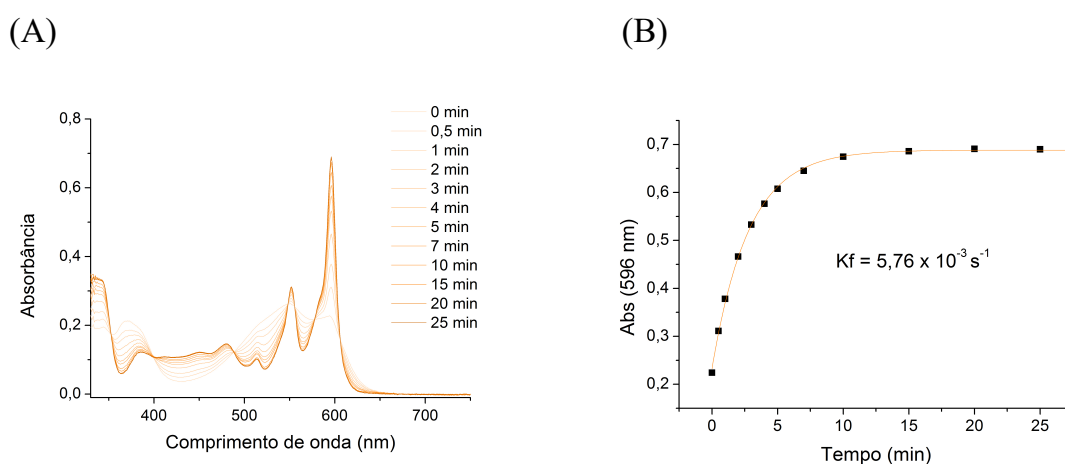


Figura 42. (a) Monitoramento cinético da reação de fotoconversão da Protohipericina em Hip ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) utilizando-se o sistema de **LEDs laranja** (31 mW) como fonte de irradiação. (b) Perfil cinético experimental da variação da absorção da Hipericina ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$) monitorada em função do tempo e ajustada pelo modelo teórico de primeira ordem a $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

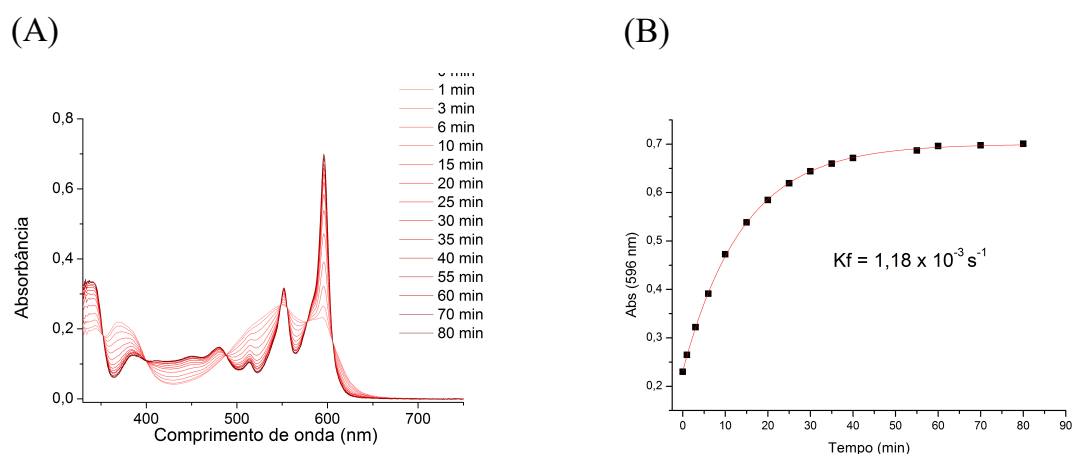


Figura 43. (a) Monitoramento cinético da reação de fotoconversão da Protohipericina em Hip ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) utilizando-se o sistema de **LEDs vermelho** (19 mW) como fonte de irradiação. (b) Perfil cinético experimental da variação da absorção da Hipericina ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$) monitorada em função do tempo e ajustada pelo modelo teórico de primeira ordem a $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Entretanto, como observado adiante, para alguns sistemas de LEDs, também não se pode descartar a possibilidade da ocorrência do efeito de fotobranqueamento quando a fotociclização da protohipericina é realizada sob períodos prolongados de tempos. Deste modo, para avaliar tal efeito, foi selecionado o conjunto de LEDs azul (84 mW) como fonte de irradiação, e a solução da protohipericina ($9,4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, em acetona) é mantida sob irradiação durante o período de 14 horas, e monitorada espectrofotometricamente (Figura 44). Contudo, pode-se observar que a absorbância monitorada em $\lambda = 596 \text{ nm}$ começa a decair após 30 min de reação, cujo valor é de, apenas, 0,05, ou seja, cerca de 10 % no período total aproximado de 14 horas (Figura 46), (cerca de 20 vezes maior do que a observada para a fotorreação com a lâmpada de Hg (Figura 38), que por sua vez fotodegrada completamente o produto ao final do período de monitoramento. Este dado confirma que o fotobranqueamento da Hip na presença de LEDs pode ser desconsiderado em relação às lâmpadas de alta potência (Figura 38), embora não possam ser completamente descartadas, o que novamente reforça o uso do LED verde no sistema.

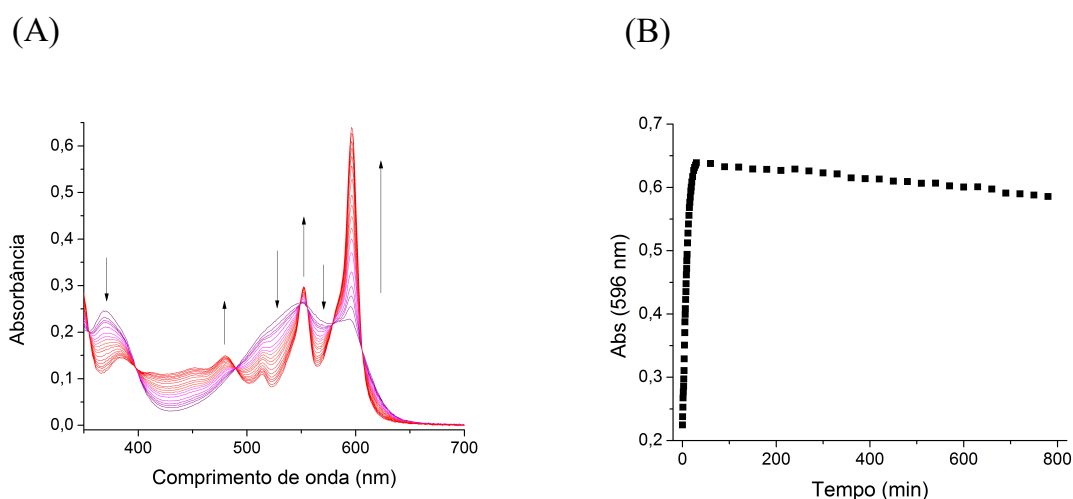


Figura 44. Monitoramento do perfil cinético espectral em $\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$ e da fotoprodução/fotodegradação da Hip ($1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), sob a irradiação com o conjunto de LEDs azul (84 mW), durante um período total de 14 horas a $T = 25^\circ\text{C}$.

4.2.4.2. Caracterização de 15 por RMN de ^1H

Após a otimização da etapa de fotociclização da protohipericina, a Hip obtida é submetida à análise de RMN de ^1H , para sua caracterização estrutural (Figuras 45 e 46). Primeiramente, os sinais de singlete que aparecem em δ 14,74 e 14,09 ppm são atribuídos, respectivamente aos hidrogênios hidroxílicos OH-1, OH-6 e OH-8, OH-13 os quais integram para um total de 2H cada (Tabela 8). Na região aromática do espectro, são observados dois sinais de singlete em δ 7,45 e 6,59 ppm, correspondentes aos hidrogênios H2, H5 e H12, H9, os quais integram para um total de 2H cada. Finalmente na região alifática do espectro, observa-se a presença de apenas um sinal de singlete em δ 2,75 ppm, o qual é atribuído aos hidrogênios metílicos, cujo valor de integral revela um total de 6H. A atribuição dos sinais aromáticos discutidas acima pode ser confirmada mediante análise do mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) da Hip (Figura 47), cuja única correlação escalar observada no espectro é atribuída para os hidrogênios aromáticos H9 e H12 (Tabela 9).

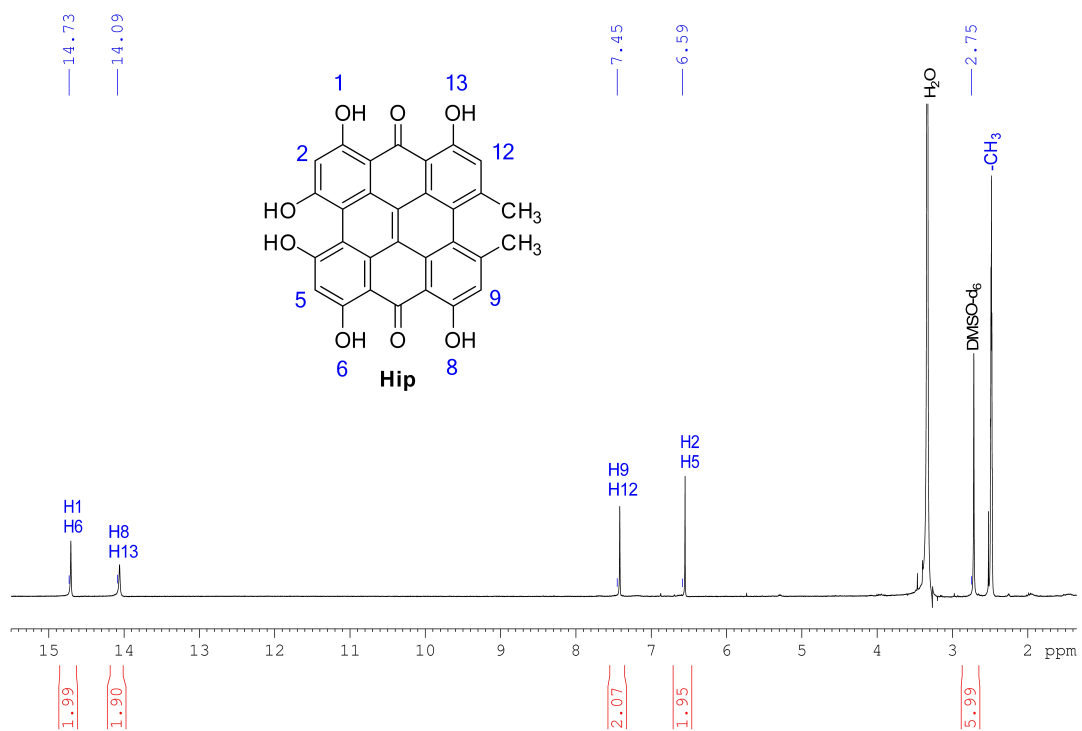


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H da Hip, adquirido em DMSO-d_6 a 300 MHz.

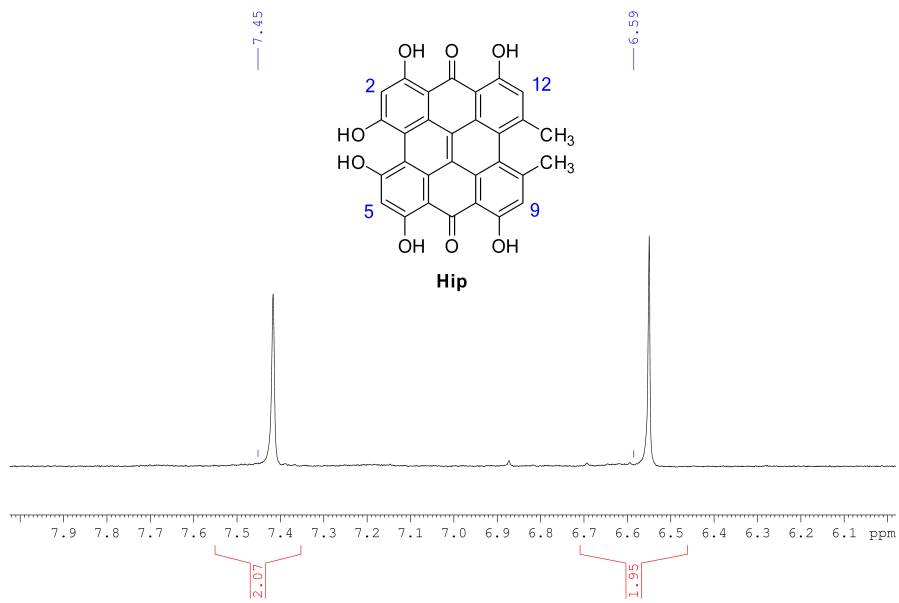


Figura 46. Expansão do espectro de RMN de ^1H da Hip, adquirido em DMSO- d_6 a 300 MHz.

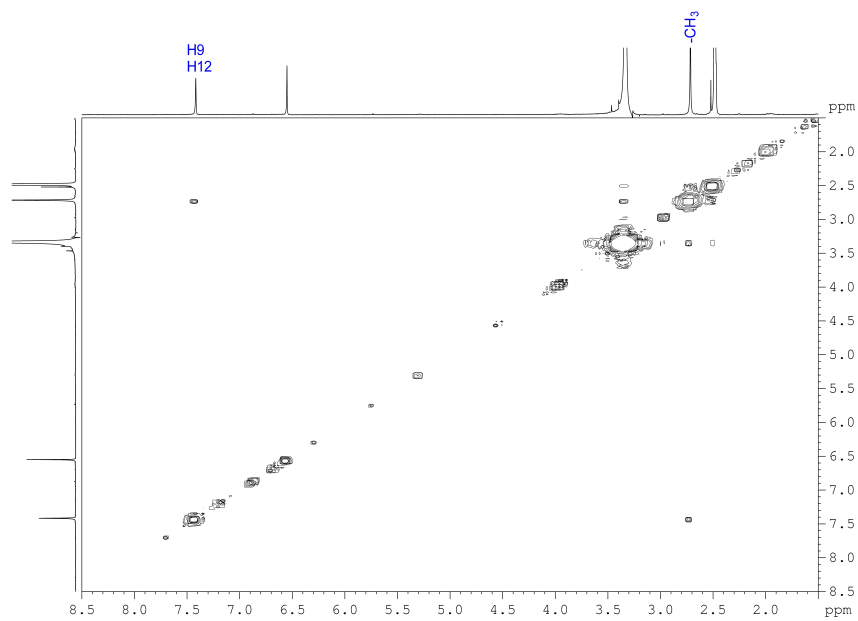
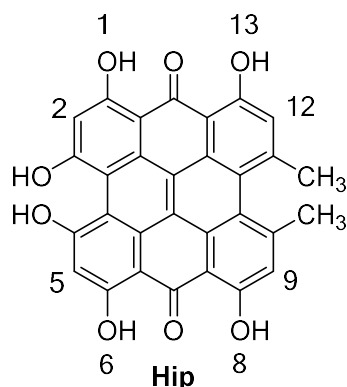


Figura 47. Mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) da Hip adquirido em DMSO- d_6 a 300 MHz.

Tabela 8. Valores de δ (ppm), multiplicidade e integral observados no espectro de RMN de ^1H e 2-D COSY da Hip obtido em DMSO- d_6 a 300 MHz.



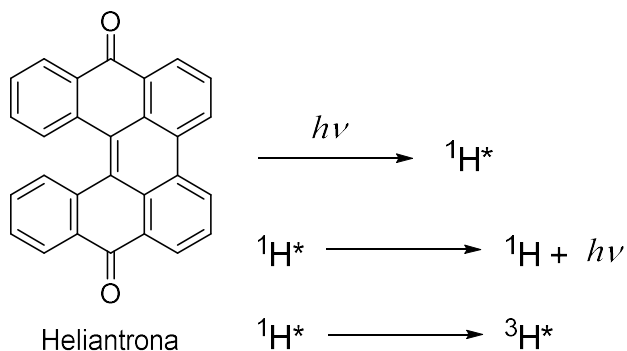
Átomos	^1H	COSY
OH-1 / OH-6	14,73 (s, 2H)	H9, H12 / -CH ₃
OH-8 / OH-13	14,09 (s, 2H)	
H2 / H5	6,59 (s, 2H)	
H9 / H12	7,45 (s, 2H)	
-CH₃	2,75 (s, 6H)	

4.2.4.3. Mecanismo da reação de fotociclicação de diantronas

Em 1970, em contribuição aos trabalhos mecanísticos que já haviam sido estudados sobre reações de fotociclicação de diantronas, Becker e Earhart publicaram um estudo detalhado sobre o mecanismo da reação de fotociclicação da 2,7'-dimetildiantrona. Embora, o mecanismo proposto pelos autores seja de grande complexidade, envolvendo a formação de espécies em estados excitados, e espécies radicalares como intermediários, a fim de simplificar o processo, serão mostradas apenas as principais etapas do mecanismo.

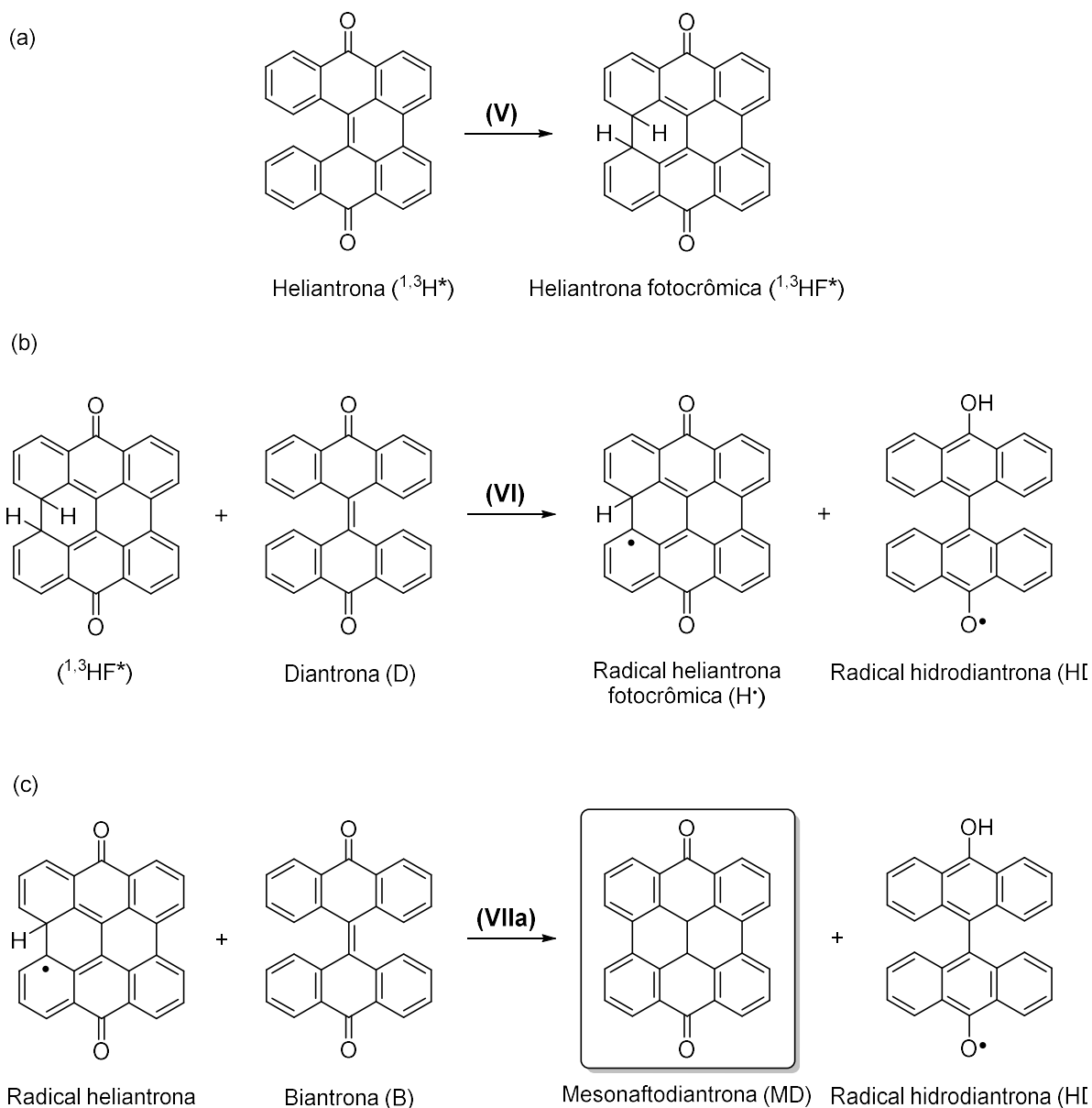
O mecanismo tem início com a ativação fotoquímica da heliantrona (H) para dar origem à heliantrona em seus estados excitados singlete ($^1\text{H}^*$) e/ou triplete ($^3\text{H}^*$), (Etapas

I e III). As reações de desativação, com perda de energia ($h\nu$) são também mostradas (Etapas II e IV), (Esquema 13).



Esquema 13. Etapas iniciais do mecanismo da reação de fotociclização de 2,7'-dimetildiantrona estudado por Becker e Earhart em 1970.

Após a formação das espécies excitadas (${}^1\text{H}^*$) e/ou (${}^3\text{H}^*$), em seguida, a formação da heliantrona fotocrômica (${}^{1,3}\text{HF}^*$) pode surgir diretamente a partir de um desses estados excitados, (Esquema 14-a). Embora alguns autores defenderam a ideia da formação de ${}^{1,3}\text{HF}^*$ a partir da heliantrona ${}^1\text{H}^*$, as propostas são controversas. Becker e Charles também não puderam decidir com clareza qual dos estados excitados levava, efetivamente, à formação de ${}^{1,3}\text{HF}^*$. Entretanto, uma evidência importante descrita pelos autores para a caracterização dessa espécie ativada foi a observação das espécies radicalares ($\text{H}\cdot$) e ($\text{HD}\cdot$) em solução, as quais são formadas após a abstração de um próton da espécie ${}^{1,3}\text{HF}^*$ por uma molécula de diantrona (D), (Esquema 14-b). Contudo, em soluções contendo oxigênio dissolvido, estes podem servir como moléculas abstratoras de prótons para a formação da espécie radicalar $\text{H}\cdot$, como proposto por Broberg e colaboradores em seus trabalhos envolvendo dihidrofenantrenos (Broberg, Muszkat e Fischer, 1968; Broberg e Muszkat, 1969). Na sequência, quando um segundo próton é abstraído da espécie radicalar $\text{H}\cdot$ pela D, dar-se-á origem à formação de uma espécie irreversível, a mesonaftodiantrona (MD) juntamente com a formação de um radical $\text{HD}\cdot$ (Esquema 14-c). Cabe ressaltar que o processo total envolve mais uma série de etapas, as quais foram omitidas a fim de simplificar o mecanismo proposto pelos autores.



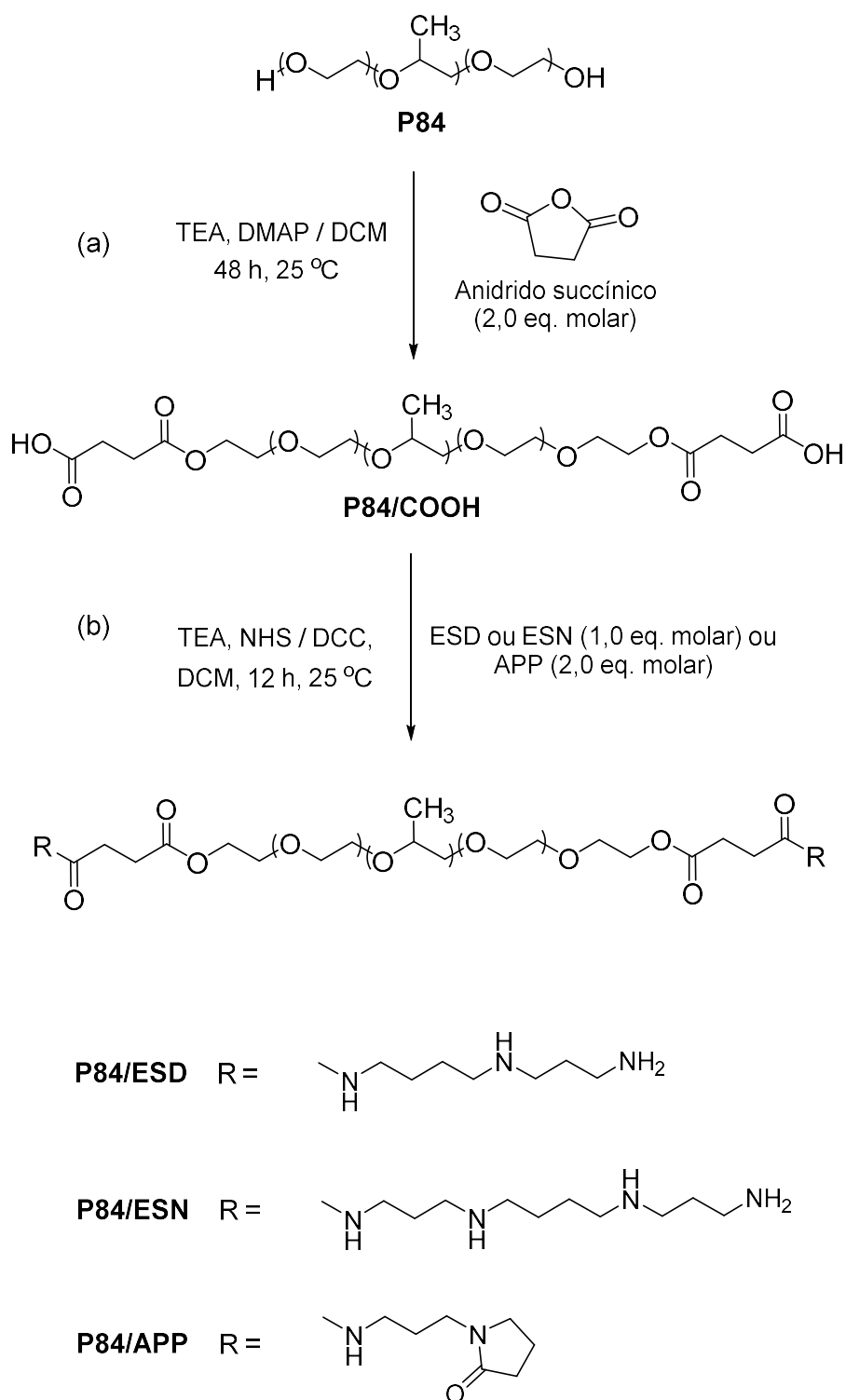
Esquema 14. Mecanismo simplificado, adaptado do trabalho de Becker e Earhart, da reação de fotociclicização da heliantrona para formação da mesonaftodiantrona (MD) (Becker e Earhart, 1970).

Com base na proposta mecanística para a reação de fotociclicização da heliantrona, proposta por Becker e Earhart, acreditamos que o mecanismo envolvido na fotoconversão da protohipericina em Hip deva acontecer por uma sequência de etapas semelhante. Entretanto é interessante notar que a reação de fotociclicização da

protohipericina está associada a um efeito multifrequencial, como foi demonstrado anteriormente pela utilização de lâmpadas de diferentes comprimentos de onda (Figuras 40-43). Contudo, para a compreensão de tal mecanismo, estudos substanciais em diferentes níveis de teoria, incluindo estudos computacionais, serão realizados como etapa de complementação aos resultados fotofísicos iniciais realizados neste trabalho.

4.3. Síntese dos materiais copoliméricos: P84/aminolactama (P84/APP), P84/espermidina (P84-ESD) e P84/espermina (P84/ESN)

A preparação dos materiais copoliméricos foi realizada segundo um processo em duas etapas. Primeiramente, a ativação do copolímero P84, mediante inserção de grupos carboxílicos terminais (P84/COOH), foi realizada mediante reação de abertura de anel com quantidades equimolares de anidrido succínico, na presença de DMAP/TEA, como sistema catalizador (Esquema 15-a). Em seguida, o material P84/COOH é submetido à reação de amidação com 1,0 eq. molar das poliaminas, EPD e EPN e com 2,0 eq. molares da aminolactama APP, na presença de NHS/DCC como sistema catalizador, para obtenção, após as etapas de purificação, de aproximadamente 70-75 % dos respectivos materiais copoliméricos P84/ESD, P84/ESN e P84/APP (Esquema 15-b).



Esquema 15. Etapas para a preparação dos materiais copoliméricos P84/ESD, P84/ESN e P84/APP: (a) ativação do P84 via carboxilação com anidrido succínico e (b) amidação de P84/COOH com as poliaminas (ESD e ESN) e com a aminolactama (APP).

4.3.1. Caracterização dos materiais copoliméricos por RMN ^1H e RMN 2-D COSY

Após a preparação dos materiais copoliméricos, os mesmos foram submetidos à caracterização espectroscópica via RMN de ^1H e RMN 2-D COSY. Deste modo, a inserção dos grupos succínicos terminais ($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COO}-$) na estrutura do copolímero P84 é confirmada pela presença no espectro do copolímero P84/COOH (Figura 48) dos sinais H-1 e H-I, respectivamente, em δ 4,26 e 2,67 ppm, os quais são atribuídos, aos hidrogênios metilênicos ($-\text{COOCH}_2\text{CH}_2-$ e $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COO}-$), cuja ausência desses sinais no espectro do copolímero P84, serve de suporte para tal caracterização (Tabela 9).

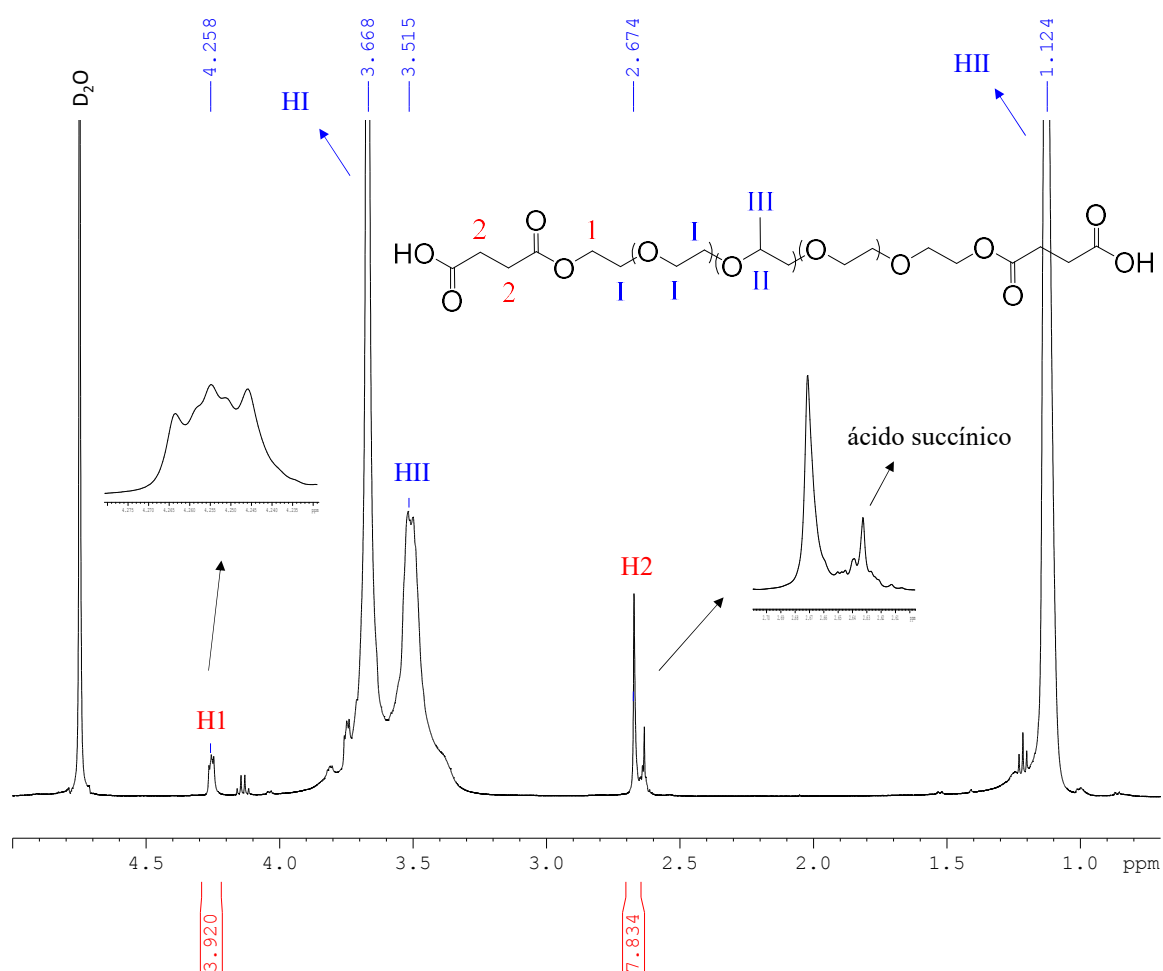
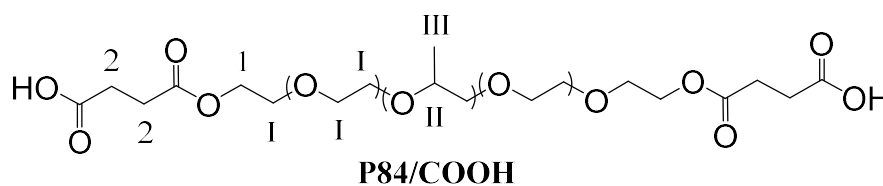


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H do copolímero P84/COOH adquirido em D_2O a 500 MHz.

Tabela 9. Valores de δ (ppm), multiplicidade e integral observados no espectro de RMN de ^1H do copolímero P84/COOH, obtido em DMSO- d_6 a 500 MHz.



Átomos	^1H
H-I	3,66 (<i>s</i>)
H-II	3,51 (<i>m</i>)
H-III	1,12 (<i>d</i>)
H-1	4,25 (<i>t</i> , 4H)
H-2	2,67 (<i>s</i> , 8H)

A caracterização dos materiais copoliméricos P84/ESD e P84/ESN foram realizadas por meio da comparação dos seus espectros de RMN ^1H com aqueles das poliaminas (PAs) precursoras (ESD e ESN) em suas formas isoladas. Deste modo, no espectro da ESD, na região de maior δ (Figura 49), observa-se um multipeto entre 2,59 e 2,49 ppm, o qual é decorrente da sobreposição de quatro sinais de tripletos, gerados pelos hidrogênios metilênicos α -aminícos (H-a'), os quais juntos, integram um total de 8H. Na região de menor δ do mesmo espectro, são observados dois multipletos em δ 1,55 e 1,41 ppm, correspondentes, respectivamente, aos hidrogênios β -aminícos (H-b' e H-c'), cujos sinais integram, na mesma ordem, um total de 2H e 4H.

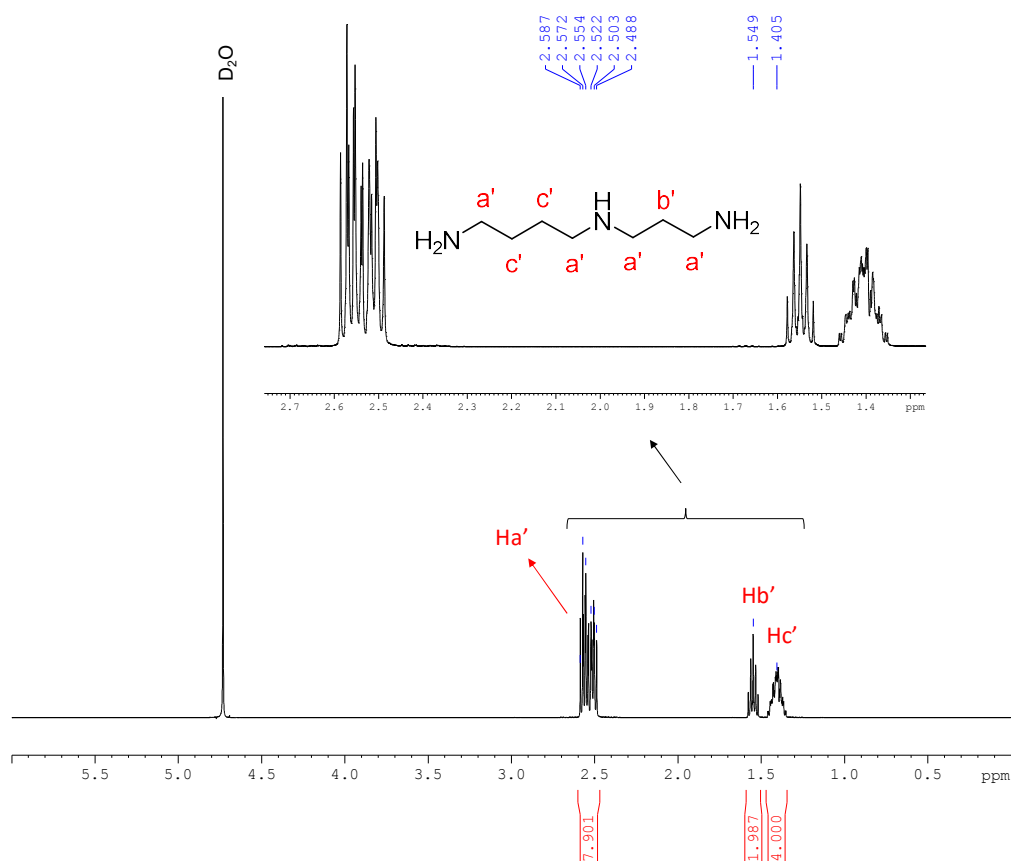


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da ESD adquirido em D_2O a 500 MHz.

No espectro de RMN ^1H da poliamina ESN (Figura 50), observa-se o mesmo padrão de sinais observado no espectro da poliamina ESD (Figura 51). Entre δ 2,68 e 2,56 ppm observa-se uma sobreposição de quatro sinais de multiplicidade triplete, correspondentes aos hidrogênios α -amínicos ($\text{H-a}'$), os quais integram, juntos, um total de 12H. Já em δ 1,60 e 1,47 ppm são observados, respectivamente os sinais de hidrogênios β -amínicos ($\text{H-b}'$ e $\text{H-c}'$), os quais aparecem como multipletos, cuja integral revelam um total de 4H.

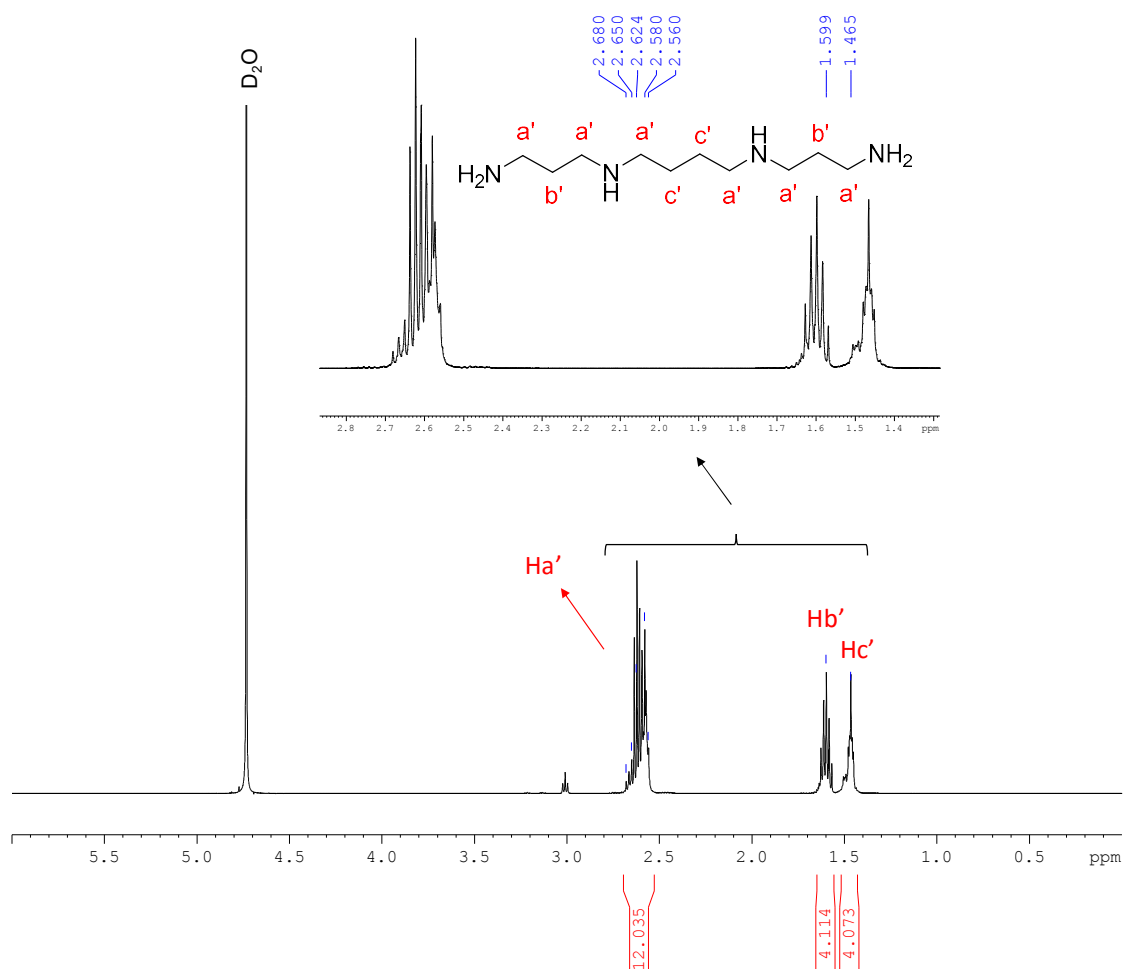


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H da ESN, adquirido em D_2O a 500 MHz.

A principal evidência para a comprovação da ligação covalente entre as PAs (ESD e ESN) e o copolímero ativado (P84/COOH) é a observação, nos espectros dos materiais P84/ESD e P84/ESN da presença de sinais característicos de hidrogênios metilênicos α -amida. Assim, quando analisado o espectro do material P84/ESD (Figura 51), observa-se em δ 3,05 ppm, a presença de dois sinais sobrepostos de multiplicidade triplete, os quais são atribuídos aos hidrogênios metilênicos α -amida (H-a_1). Devido a diferença de δ 0,42 ppm observado para os sinais de hidrogênios metilênicos α -amínicos (H-a_2 e H-a_3), em relação ao espectro da poliamina ESD pura, torna-se possível observar, separadamente, dois sinais de multiplicidade triplete em δ 2,59 e 2,45 ppm, respectivamente. Já, os sinais de hidrogênios β -amínicos (H-b e H-c), podem ser observados, respectivamente em δ 1,89 e 1,75 ppm, os quais, devido à presença das

ligações de amida, exibem uma diferença de δ 0,34 ppm com relação aos relativos sinais atribuídos no espectro da ESD pura. Ainda, para o mesmo espectro, observa-se em δ 2,76 ppm a presença dos sinais de hidrogênios metilênicos H-3 (-OOCCH₂CH₂CONH-), suportando a reação de amidação para a formação do material P84/ESD (Tabela 10).

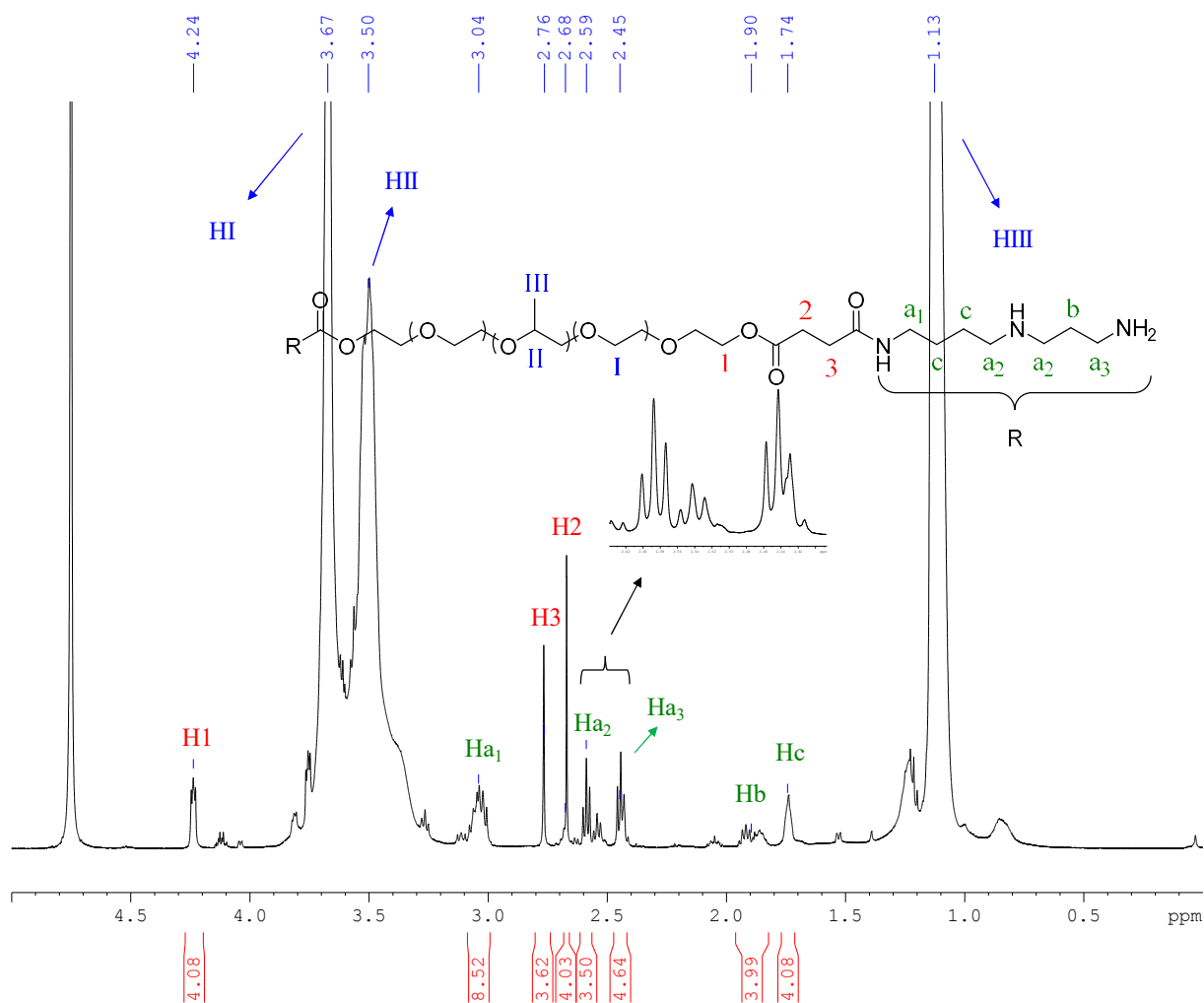
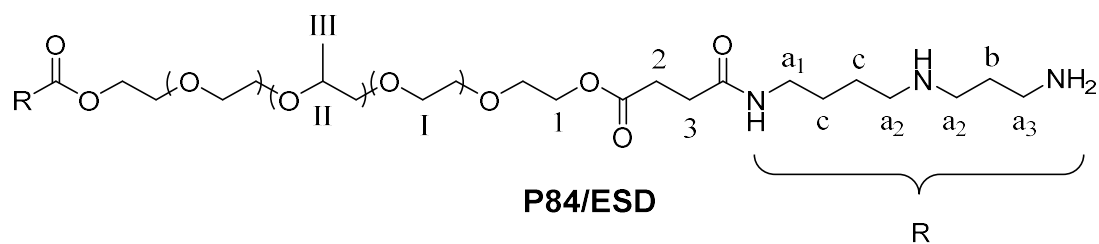


Figura 51. Espectro de RMN de ¹H de P84/ESD adquirido em D₂O a 500 MHz.

Tabela 10. Valores de δ (ppm), multiplicidade e integral observado no espectro de RMN de ^1H do copolímero P84/ESD adquirido em D_2O a 500 MHz.



Átomos	^1H
H-I	3,67 (s)
H-II	3,51 (m)
H-III	1,13 (d)
H-1	4,25 (t, 4H)
H-2	2,68 (s, 4H)
H-3	2,77 (s, 4H)
H-a ₁	3,04 (m, 8H)
H-a ₂	2,59 (t, 4H)
H-a ₃	2,44 (t, 4H)
H-b	1,90 (qu, 4H)
H-c	1,74 (qu, 4H)

Para a caracterização do material P84/ESN, foi observado o mesmo padrão de sinais do espectro do copolímero P84/ESD (Figura 51). Desta forma, no espectro de RMN de ^1H do copolímero P84/ESN (Figura 52), observa-se em δ 2,98 ppm, os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos α -amida (H- a_1). Na região do espectro entre δ 2,59 a 2,45 ppm são observados dois grupos de sinais, os quais são atribuídos aos hidrogênios α -amínicos (H- a_2 e H- a_3). Os sinais que se observam em δ 1,91 e 1,74 ppm, são atribuídos aos hidrogênios metilênicos β -amínicos (H-b e H-c). Finalmente, o sinal observado em δ 2,71 ppm é atribuído aos hidrogênios metilênicos H-3 (-OOCCH₂CH₂CONH-), confirmando a formação da ligação de amida entre o copolímero ativado (P84/COOH) e a poliamina ESN (Tabela 11).

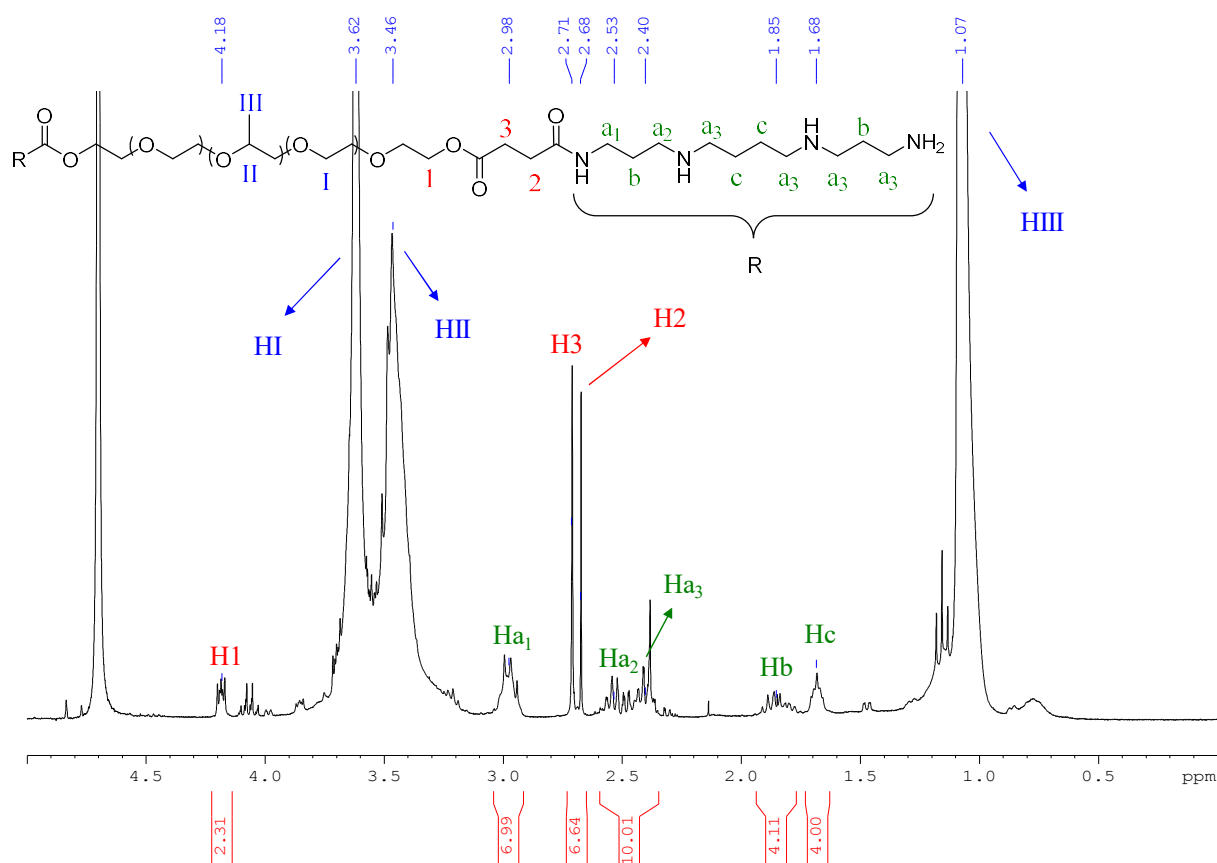
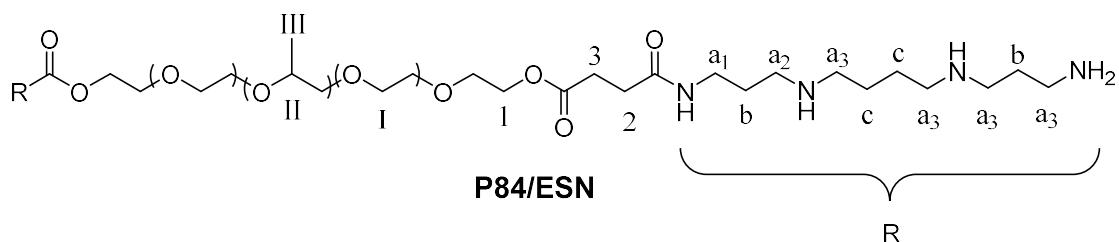


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H de **29** adquirido em D_2O a 500 MHz.

Tabela 11. Valores de δ (ppm), multiplicidade e integral observado no espectro de RMN de ^1H do copolímero P84/ESN adquirido em D_2O a 500 MHz.



Átomos	^1H
H-I	3,67 (s)
H-II	3,52 (m)
H-III	1,13 (d)
H-1	4,24 (t, 4H)
H-2	2,73 (s, 4H)
H-3	2,77 (s, 7H)
H-a₁	3,03 (m, 12H)
H-a₂	2,58 (t, 5H)
H-a₃	2,45 (t, 10H)
H-b	1,89 (qu, 7H)
H-c	1,74 (qu, 7H)

Na caracterização do material copolimérico P84/APP por RMN de ^1H , primeiramente foi identificado a presença dos sinais de hidrogênio metilênicos característicos da aminolactama APP, previamente caracterizada em sua forma isolada por RMN de ^1H da APP pura (Figura 53). Deste modo, no espectro de RMN de ^1H do copolímero P84/APP (Figuras 54 e 65), observa-se em δ 3,46, 3,14 e 1,73 ppm, os sinais de hidrogênios metilênicos constituintes da cadeia alifática das moléculas de APP terminais: H-a (*t*), H-c (*t*) e H-f (*m*), cujos valores de integrais revelam a presença de aproximadamente 4H para cada sinal (Tabela 12). Já os sinais que aparecem em δ 3,27, 2,40 e 2,01 ppm, são atribuídos, respectivamente aos hidrogênios metilênicos constituintes do anel lactâmico das moléculas de APP: H-d (*t*), H-e (*t*) e H-f (*m*), os

quais integram, para 4H cada. Embora o sinal dos hidrogênios H-a, esteja encoberto pelo sinal largo referente aos hidrogênios metilênicos das cadeias de PO (H-II), sua correta atribuição pode ser feita mediante análise do mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) do copolímero P84/APP, cuja correlação escalar observada em δ 3,46/2,01 ppm é atribuída aos hidrogênios H-a/H-e (Figura 56).

A formação das ligações de amida entre o copolímero ativado (P84/COOH) e as moléculas de aminolactama APP, é confirmada por meio da diferença de δ de 0,61 ppm observada para o sinal dos hidrogênios metilênicos α -amínicos (H-c') da APP pura (Figura 58), com relação ao sinal dos hidrogênios metilênicos α -amínicos (H-c) observado no espectro do copolímero P84/APP (Figura 53). A atribuição de δ para o sinal H-c no espectro do copolímero P84/APP é confirmada mediante a observação no seu espectro COSY da correlação escalar entre os sinais dos hidrogênios H-c/H-f em δ 3,15/1,73 ppm (Figura 56). Além disso, outras correlações são observadas para os sinais dos hidrogênios H-f/H-b e para os sinais de hidrogênios lactâmicos H-a/H-e, H-e/H-d.

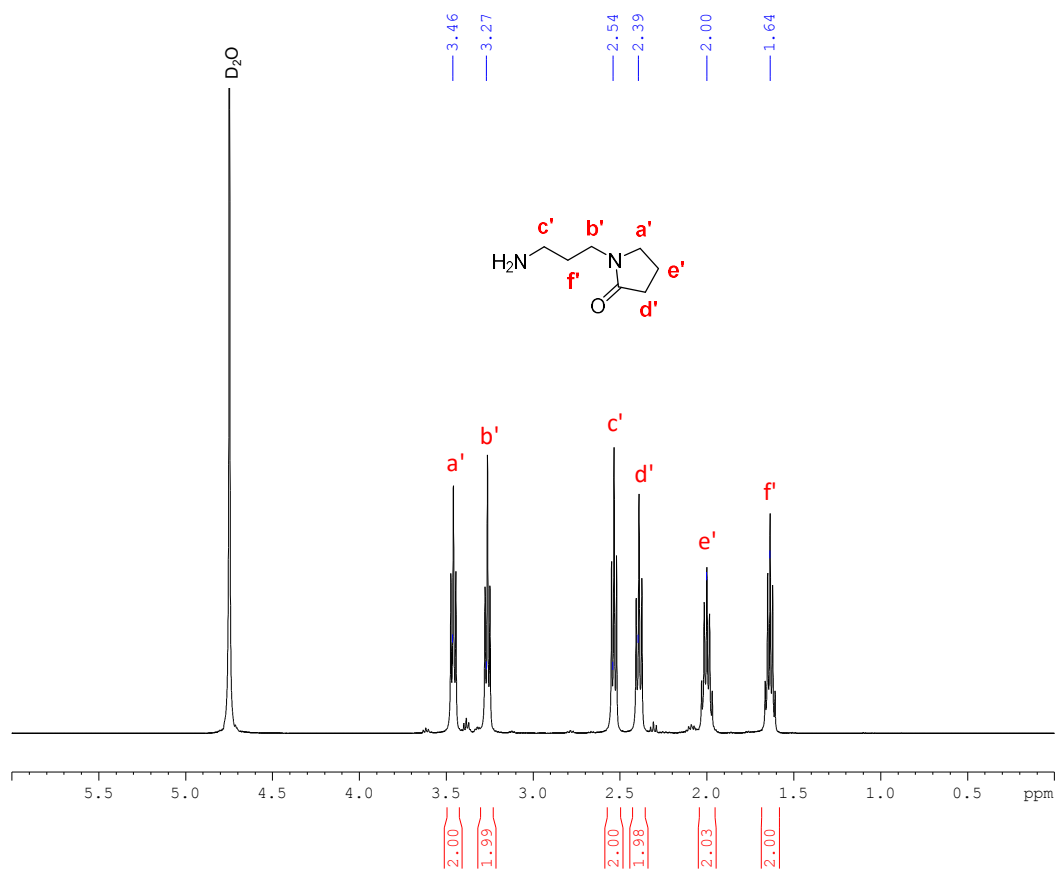


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H do copolímero P84/APP adquirido em D_2O a 500 MHz.

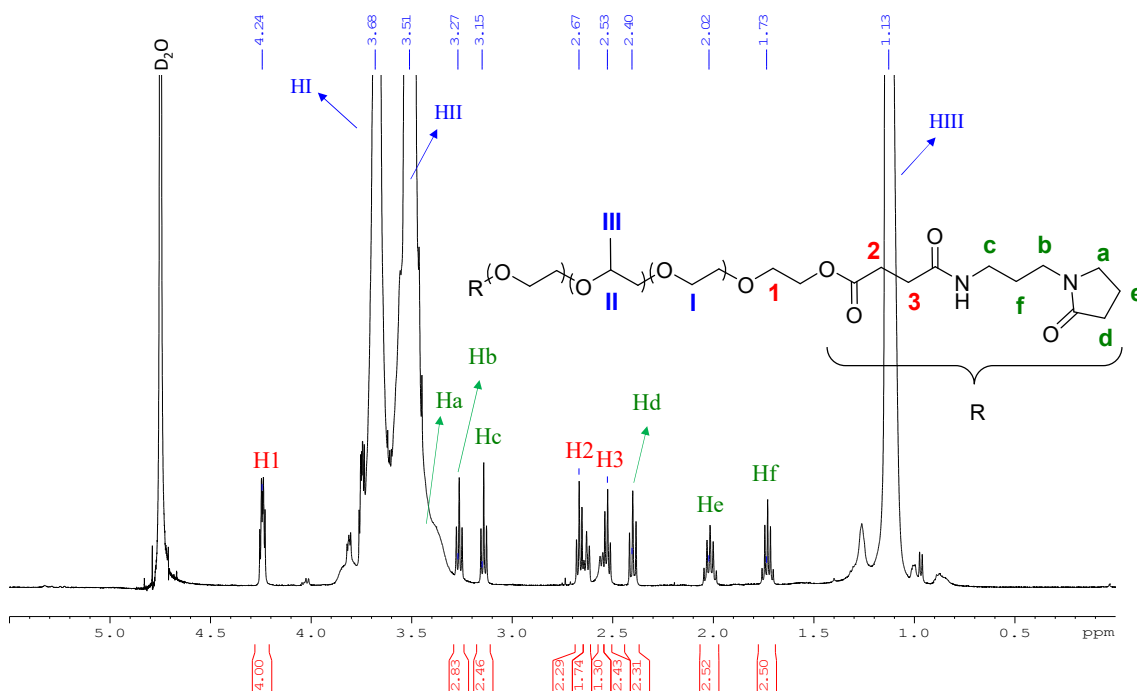


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H da APP adquirido em D_2O a 500 MHz.

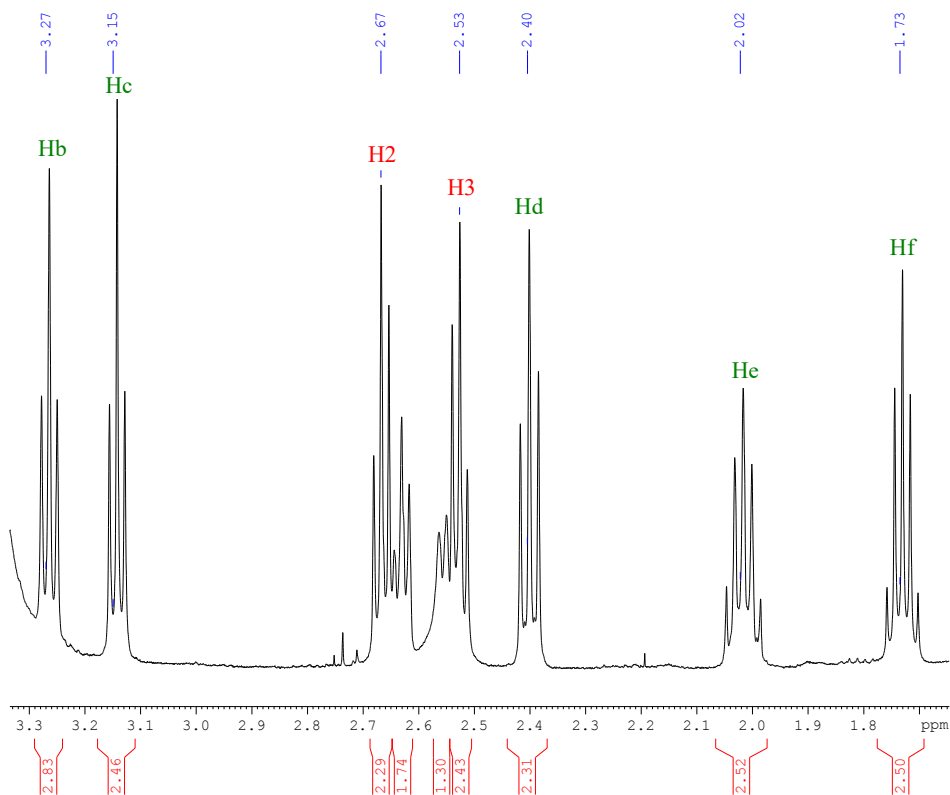


Figura 55. Expansão do espectro de RMN de ^1H do copolímero P84/APP, adquirido em D_2O a 500 MHz.

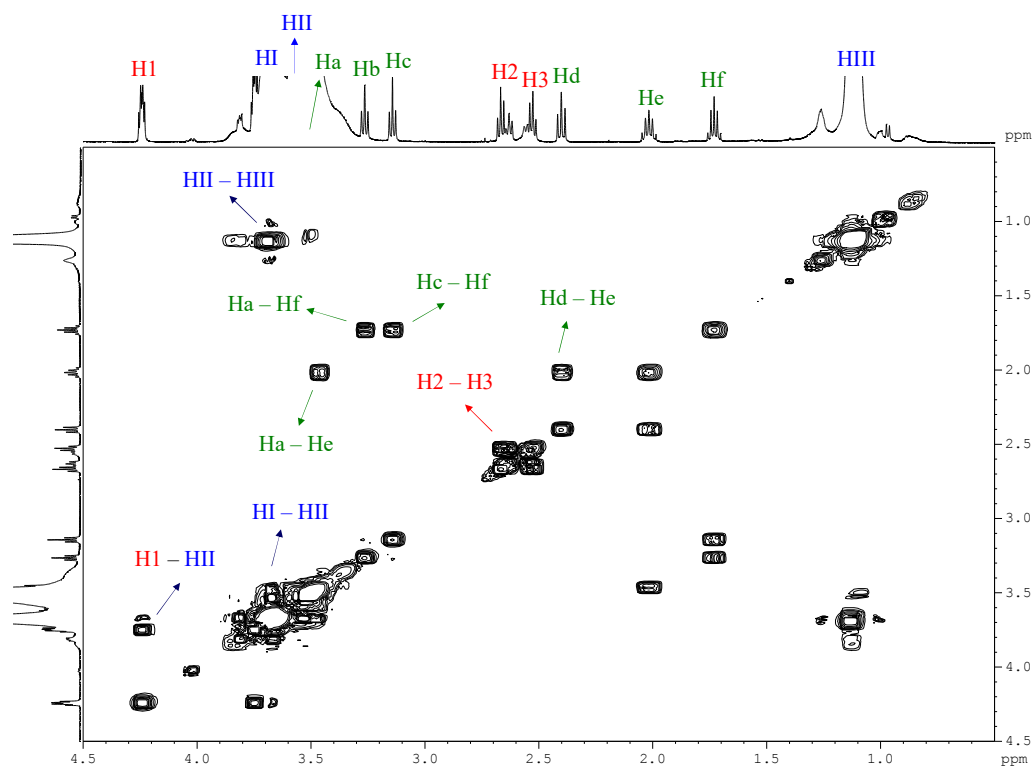
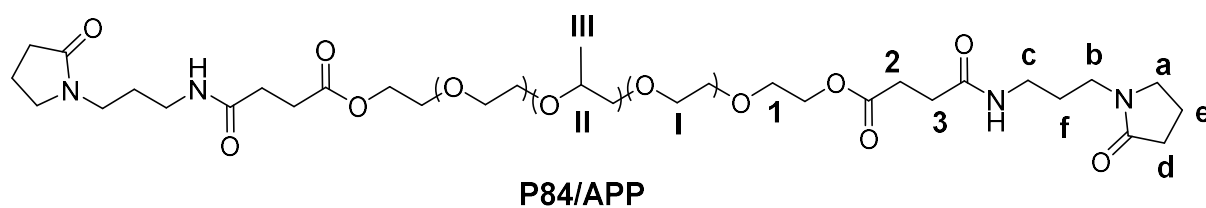


Figura 56. Mapa de correlação ¹H-¹H (COSY) do copolímero P84/APP adquirido em D₂O a 500 MHz.

Tabela 12. Valores de δ (ppm), multiplicidade e integral observados nos espectros de RMN de ^1H e 2-D COSY de **30** obtidos em DMSO- d_6 a 500 MHz.



Átomos	^1H	COSY
H-I	3,68 (<i>s</i>)	H-I / H-III
H-II	3,51 (<i>m</i>)	H-II / H-III
H-III	1,13 (<i>d</i>)	H-2 / H-3
H-1	4,24 (<i>t</i> , 4H)	H-a / H-b
H-2	2,53 (<i>t</i> , 2H)	H-b / H-f
H-3	2,67 (<i>t</i> , 2H)	H-c / H-f
H-a	3,46 (<i>t</i> , 2H)	H-d / H-e
H-b	3,27 (<i>t</i> , 2H)	
H-c	2,27 (<i>t</i> , 2H)	
H-d	2,40 (<i>t</i> , 2H)	
H-e	2,02 (<i>m</i> , 2H)	
H-f	1,73 (<i>m</i> , 2H)	

4.3.2. Avaliação, via NOESY, do arranjo das moléculas de APP nas estruturas micelares do copolímero P84-APP

Para melhor compreensão do arranjo molecular das terminações de APP presentes nas estruturas micelares do copolímero P84/APP, estudos de NOESY foram realizados para uma solução do P84/APP em D₂O (0,043 mg. mL⁻¹), cujo espectro revelou a presença de significativos picos de correlação, negativos e positivos (Figura 57). Picos de correlação negativos são esperados para moléculas que giram muito lentas em solução e, conseqüentemente, apresentam um elevado tempo de correlação (T_c), o qual está relacionado com a razão na qual uma molécula pode girar ou rotacionar em solução (Wennerstrom e colab., 1979; Hawrylak e Marangoni, 1999). Desta forma, picos de correlação de média e fraca intensidades são observadas, respectivamente, entre os sinais de hidrogênios H-d e H-3 e entre os sinais de hidrogênios H-a e H-f (Tabela 13), sugerindo a possibilidade das moléculas terminais de APP estarem ligeiramente inclinadas na direção dos grupamentos amidas, tendendo a ligação de hidrogênio entre os grupamentos carbonílicos e os hidrogênios α -amídicos (Esquema 15). Adicionalmente, picos de correlações são também observados entre os sinais de hidrogênios metilênicos das cadeias de APP (H-a/H-e, H-b/H-f, H-b/H-c, H-c/H-f e H-d/H-e), e entre os sinais dos grupos succínicos (H-2/H-3), os quais estão também presentes no mapa de correlação ¹H-¹H do copolímero P84/APP (Figura 56).

Em contraste, nenhum pico de correlação é observado para os sinais de hidrogênios das moléculas de APP e aqueles presentes nas cadeias de EO (H-I) e PO (H-II e H-III), indicando que não estão relativamente próximos no arranjo espacial formado pelas nanopartículas micelares do copolímero P84/APP.

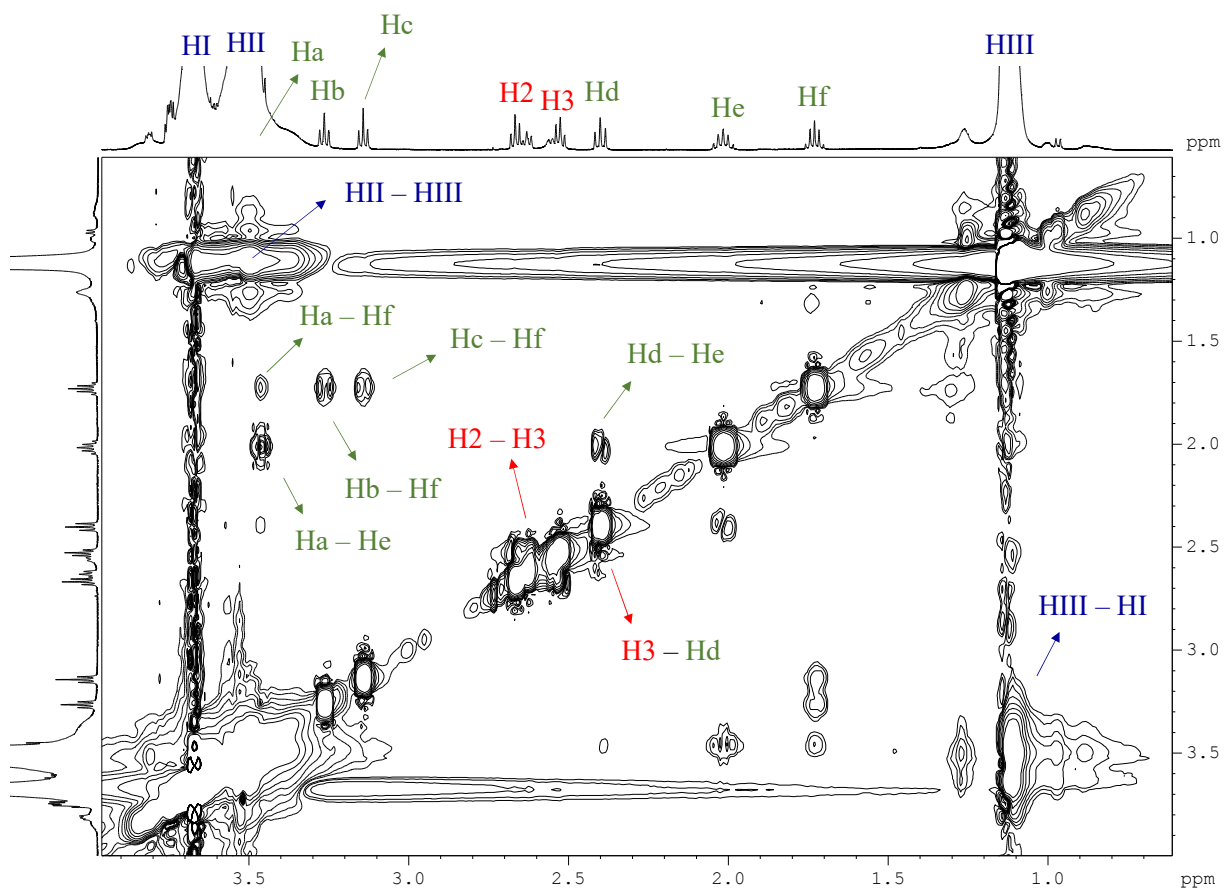
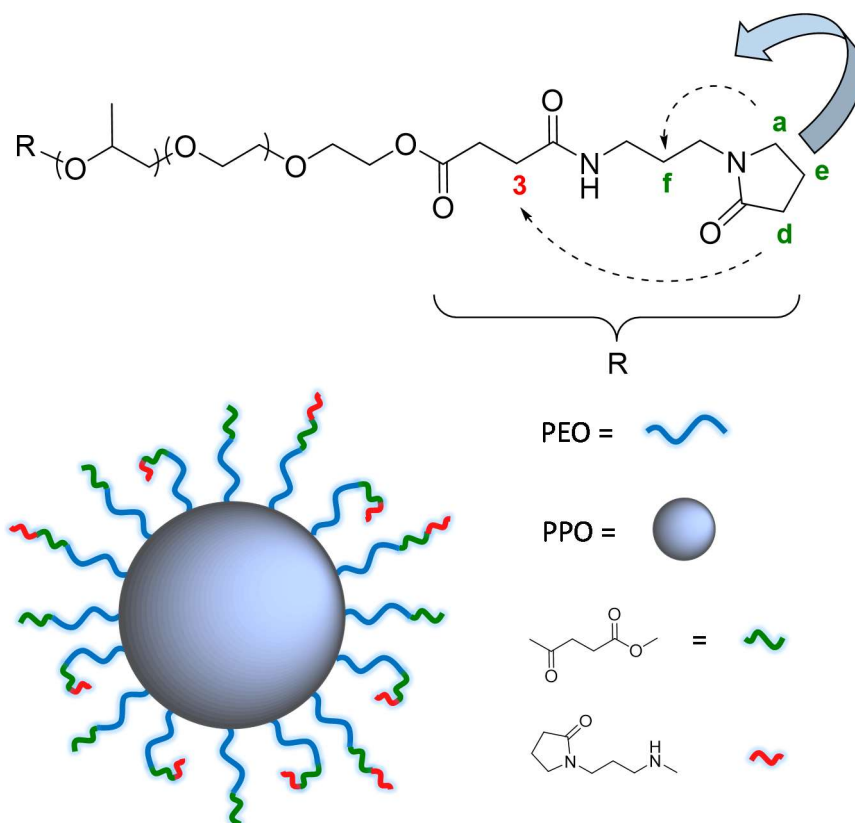


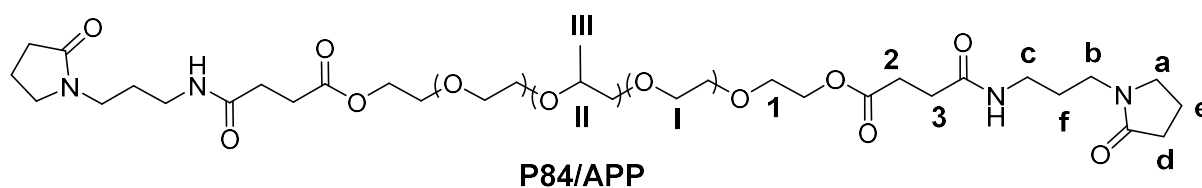
Figura 57. Mapa de correlação ^1H - ^1H (NOESY) do copolímero P84/APP, adquirido em D_2O a 500 MHz.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Esquema 15. Representação do arranjo das moléculas de APP nas estruturas das nanopartículas micelares do copolímero P84-APP. A seta azul indica que as moléculas de APP estão ligeiramente inclinadas na direção dos hidrogênios dos grupamentos amins.

Tabela 13. Correlações observadas nos espectros de RMN 2-D NOESY e COSY para o copolímero P84/APP



NOESY	COSY
H-I / H-III	H-I / H-III
H-II / H-III	H-II / H-III
H-2 / H-3	H-2 / H-3
H-a / H-e	H-a / H-b
H-a / H-f	-
H-b / H-f	H-b / H-f
H-c / H-f	H-c / H-f
H-d / H-e	H-d / H-e
H-d - H2	-

4.3.3. Avaliação da solubilidade e localização das moléculas de Hip encapsuladas nas micelas copoliméricas de P84.

A solubilização e localização preferencial das moléculas de Hip nas nanoestruturas micelares do copolímero P84 foram avaliadas por técnicas de RMN de ^1H *ASIS* e 2-D NOESY na presença de D_2O como solvente (4,0 mg de Hip em 12,0 mg de P84, 1 % m/v). A análise do deslocamento químico dos sinais dos hidrogênios do P84, bem como os picos de correlação dipolares observados no experimento NOESY, foram os parâmetros utilizados para tal avaliação. Inicialmente, a solubilidade das moléculas de Hip na matriz copolimérica, foi avaliada mediante análise do espectro de RMN de ^1H do material P84-Hip na presença de D_2O como solvente. Os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos da Hip ($\text{H9}'$, $\text{H12}'$ e $\text{H2}'$, $\text{H5}'$), são observados na região aromática do espectro em δ 7,45 e 6,59 ppm, enquanto que o sinal correspondente aos hidrogênios metílicos, é observado em δ 2,3 ppm (Figura 58).

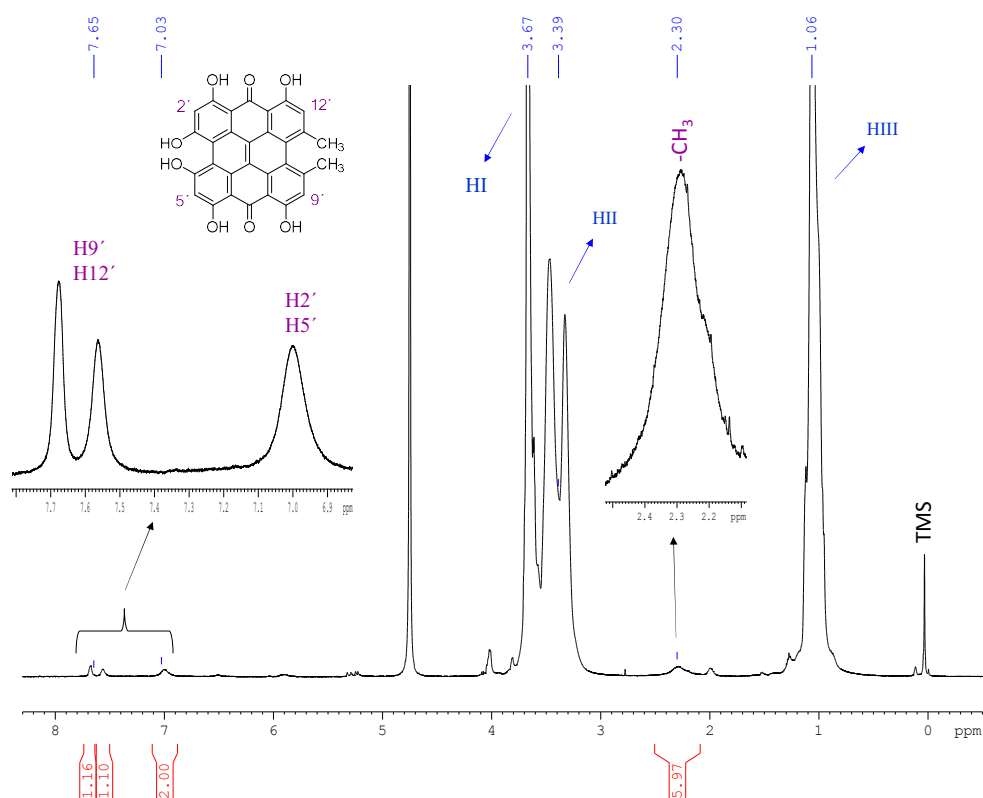


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H do sistema P84/Hip adquirido em D_2O a 500 MHz.

Nota-se que as moléculas de Hip induzem, via efeito *ASIS*, a uma blindagem do campo magnético sentido pelos sinais de hidrogênios da matriz copolimérica que estão próximos a elas, gerando-se um deslocamento desses sinais para regiões de menor δ . Desta forma, observa-se, no espectro de RMN de ^1H do material P84/Hip, que os sinais dos hidrogênios HII e HIII das cadeias de PO, são deslocados em, respectivamente, $\Delta\delta$ 0,14 e 0,07 ppm com relação aos seus correspondentes valores, observados no espectro do P84 puro, para o mesmo solvente (D_2O), (Figura 59). Esta análise é uma forte evidência de que as moléculas de Hip estão bem solubilizadas nas nanoestruturas micelares. Além disso, nenhum deslocamento químico é observado para os sinais dos hidrogênios HI das cadeias de EO, indicando que devido ao carácter mais hidrofóbico das moléculas de Hip, estas devem se organizar, preferencialmente na região do core nas estruturas micelares. Tais observações são também sustentadas mediante análise dos resultados de NOESY para uma solução de P84/Hip.

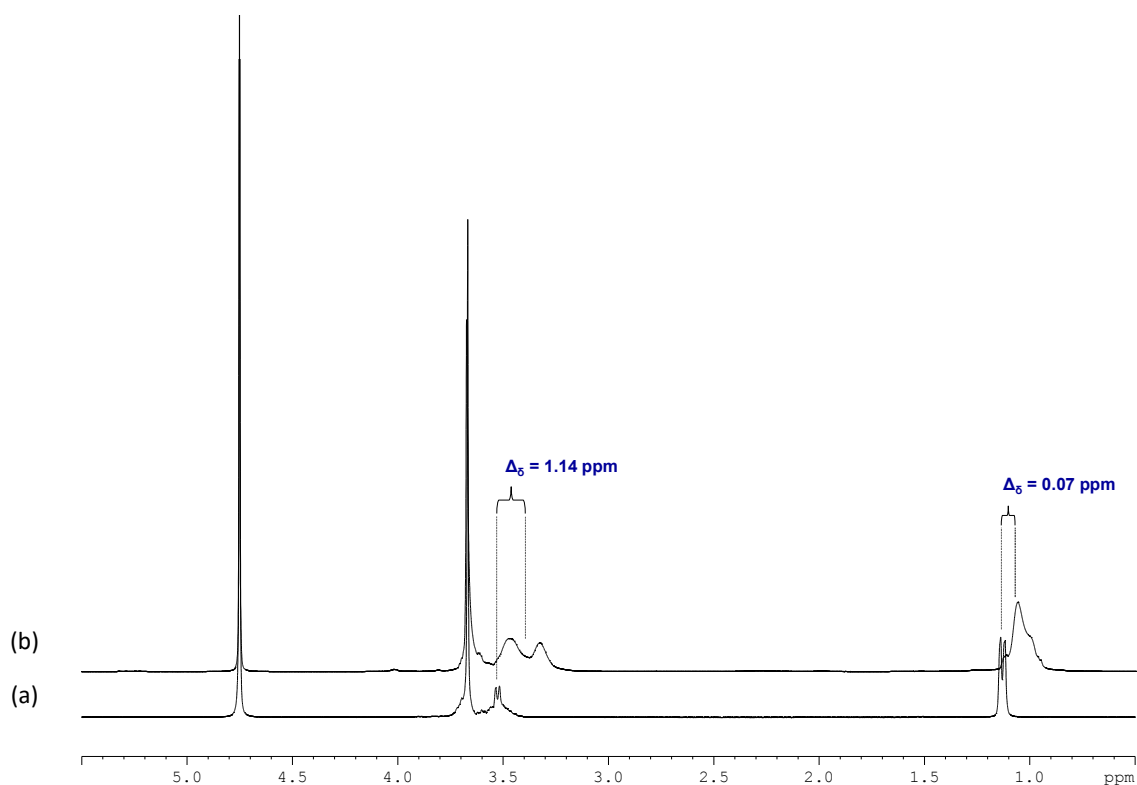


Figura 59. Deslocamentos químicos observados via RMN de ^1H *ASIS* para os sinais dos hidrogênios H-II e H-III das cadeias de PO: (a) Espectro de RMN de ^1H do P84 puro (12,0 mg de P84) e (b) espectro de RMN de ^1H do sistema P84-Hip (4,0 mg de Hip em 12,0 mg de P84, 1 % m/v), ambos adquiridos em D_2O a 500 MHz.

No espectro 2-D NOESY do material P84-Hip (Figura 60), observa-se a existência de fortes picos de correlações dipolares entre os sinais dos hidrogênios das cadeias de PO (H-II e H-III) com aqueles das moléculas de Hip (H-2', H-5', H-9', H-12' e $-\text{CH}_3$), marcados em azul no espectro. Por outro lado, nenhuma correlação dipolar é observada entre os sinais de hidrogênios das moléculas de Hip com os sinais de hidrogênios das cadeias de EO (Tabela 14). Esses resultados confirmam que as moléculas de Hip estão relativamente mais próximas da região central, hidrofóbica, das nanopartículas de P84 (Esquema 16).

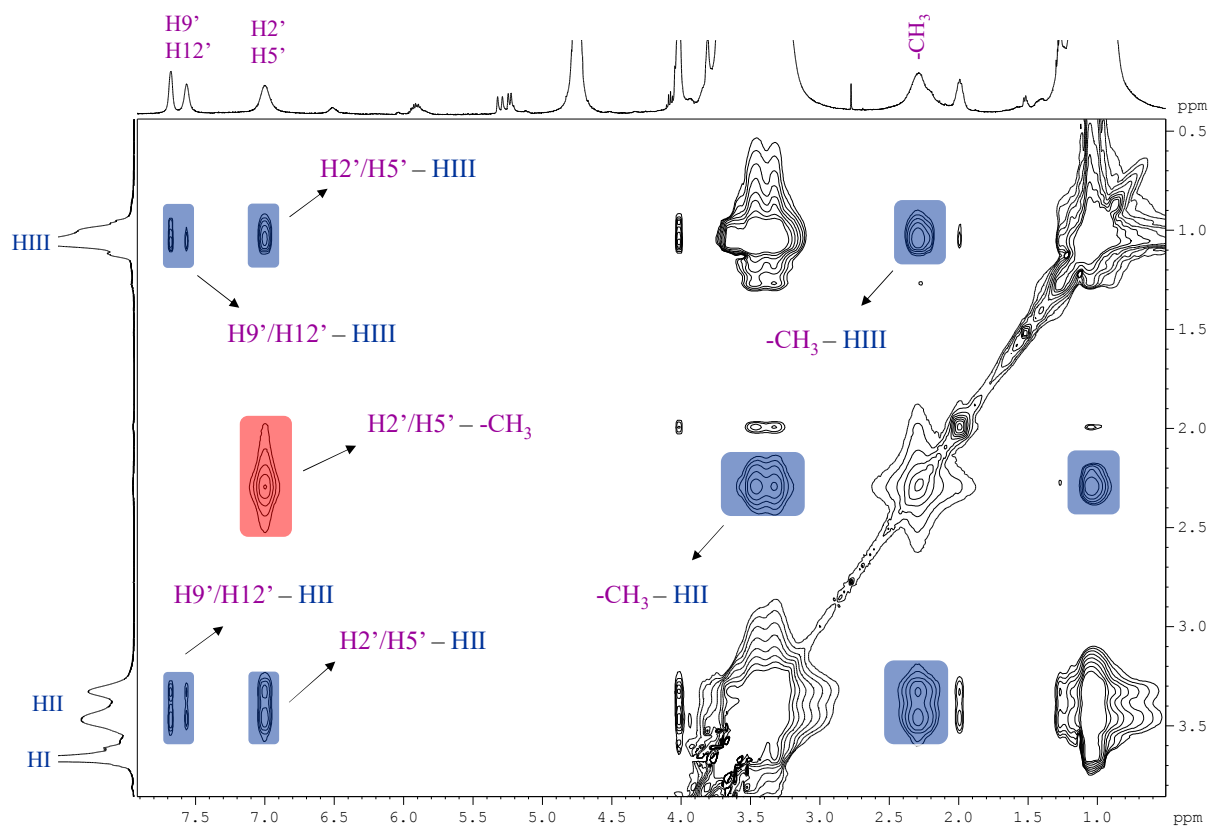
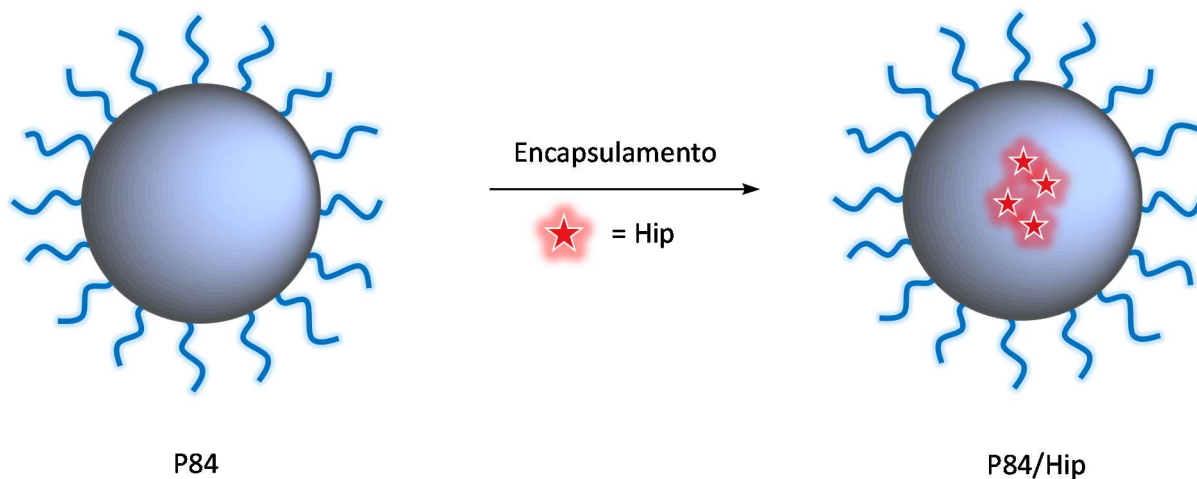


Figura 60. Expansão do mapa de correlação ^1H - ^1H (NOESY) do material P84-Hip adquirido em D_2O a 500 MHz.



Esquema 16. Representação da localização preferencial das moléculas de Hip na região do core das nanoestruturas micelares do copolímero P84, observada por técnica 2-D NOESY.

Ainda, analisando o espectro NOESY do sistema P84-Hip observa-se um pico de correlação intermolecular Hip-Hip, de forte intensidade, entre os sinais de hidrogênios aromáticos H-2' e H-5' de uma molécula, com os sinais de hidrogênios metílicos de outra (marcado em vermelho no espectro). Tal correlação pode ser explicada mediante a formação de agregados do tipo dímero, cujo modelo proposto para essa conformação é do tipo cabeça-calda (*head-to-tail*), cujos dipolos dos hidrogênios metílicos de uma molécula de Hip estão orientados, paralelamente, aos dipolos dos hidrogênios aromáticos de outro molécula (Figura 61).

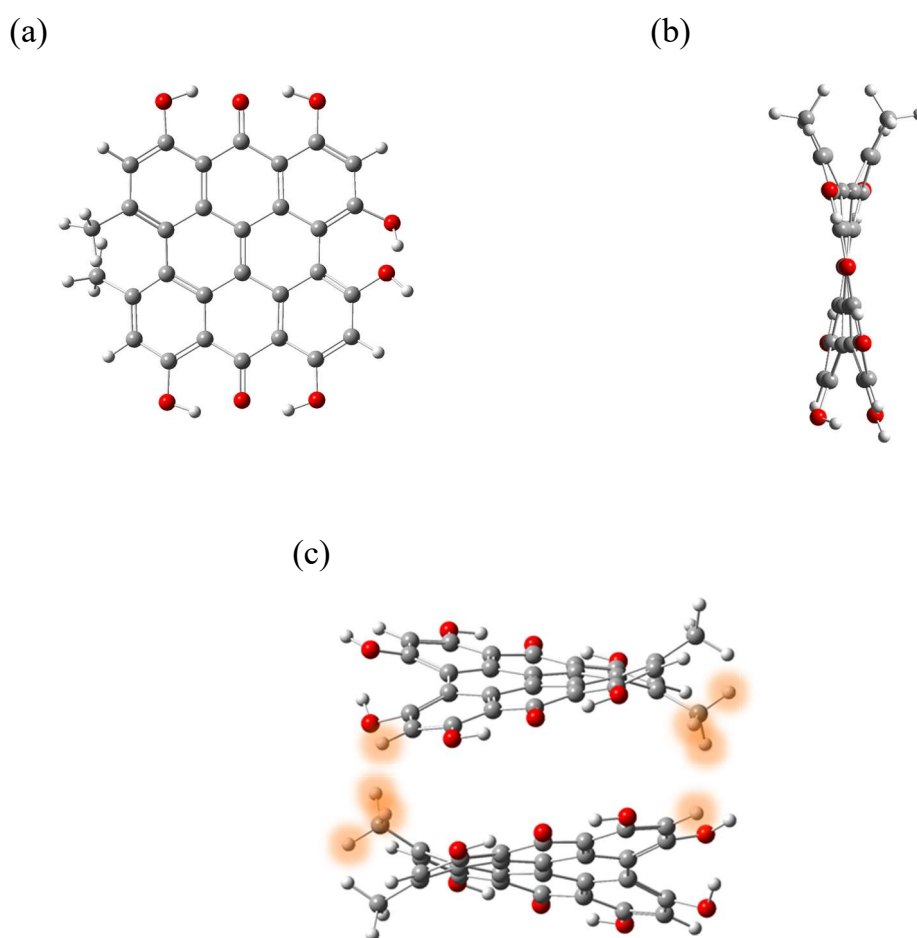


Figura 61. Otimização de mínima energia da molécula de Hip usando a base de cálculo B3LYP/6-31+G(d,p): (a) visão lateral, (b) frontal e representação da conformação preferencial do tipo cabeça-calda para os dímeros de Hip.

O modelo proposto para esta conformação pode ainda ser sustentado analisando-se o mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) do material P84/APP-Hip (Figura 62), cuja única correlação é observada para os sinais de hidrogênios das cadeias de PO (H-II/H-III). A ausência da correlação escalar nas moléculas de Hip entre os hidrogênios aromáticos (H-2' e H-5') com os hidrogênios metílicos, confirmam que, efetivamente a correlação (H-2', H-5')/-CH₃) observada no espectro 2-D NOESY é de origem dipolar. Por outro lado, uma vez que, no espectro 2-D NOESY do material P84/APP-Hip não são observadas correlações intermoleculares entre os hidrogênios aromáticos das moléculas de Hip (H12', H9' e H2', H5'), pode-se eliminar a possibilidade da coexistência de uma conformação do tipo cabeça-cabeça (*head-to-head*) entre os dímeros de Hip.

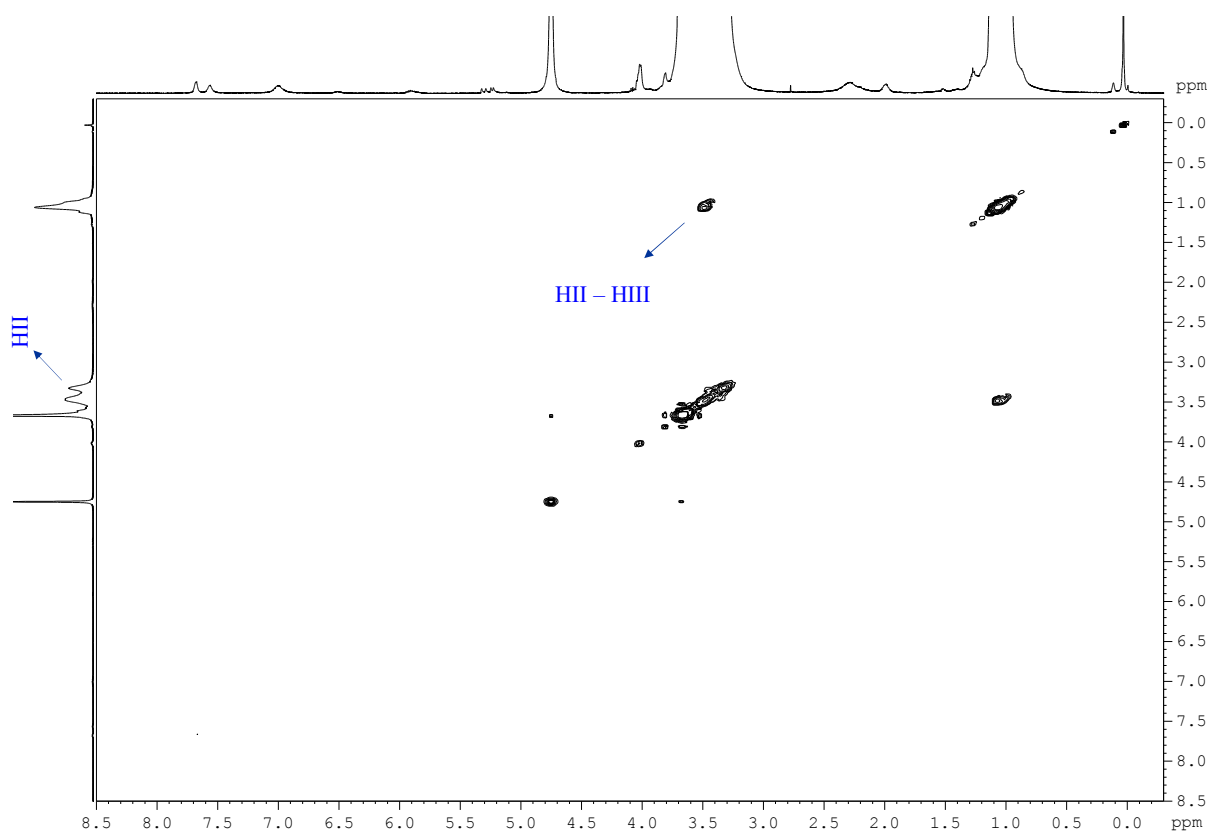
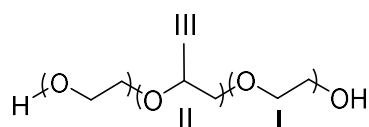
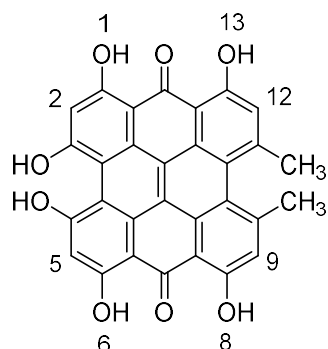


Figura 62. Mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) do material P84-Hip, adquirido em D₂O a 500 MHz.

Recentemente, Pietrzak e colaboradores demonstraram, por medidas espectroscópicas e por simulação de dinâmica molecular, a formação desses dímeros de Hip-Hip, em uma mistura de água-DMSO 50 % (v/v) (Pietrzak e colab., 2014). Os resultados indicaram a formação dos dois tipos de dímeros, cabeça-calda e cabeça-cabeça, com uma maior estabilidade para o segundo. Entretanto, os resultados que obtivemos por técnica NOESY podem servir de complemento aos resultados teóricos reportados por esses autores. Adicionalmente, esses resultados podem servir de parâmetros iniciais para uma investigação mais detalhada, por técnica NOESY, do comportamento agregacional das moléculas de Hip em diferentes concentrações do copolímero P84, como uma ferramenta de suporte aos estudos físico-químico desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa.

Tabela 14. Correlações observadas nos espectros de RMN NOESY e COSY para o material P84-Hip.



P84-Hip

NOESY	COSY
H-I / H-III	—
H-II / H-III	H-II / H-III
H-2'/H-5' / H-III	—
H-9'/H-12' / H-III	—
H-2'/H-5' / -CH ₃	—
H-9'/H-12' / H-II	—
H-2'/H-5' / H-II	—
-CH ₃ / H-II	—
-CH ₃ / H-II	—

4.3.4. Avaliação da solubilidade e localização das moléculas de Hip encapsuladas nas micelas copoliméricas de P84/APP.

A solubilidade e localização preferencial das moléculas de Hip nas nanopartículas copoliméricas de P84/APP foram avaliadas por RMN de ^1H *ASIS* e 2-D NOESY, na presença de D_2O como solvente (4,0 mg de Hip em 28,0 mg de P84/APP, 4 % m/v). A confirmação dos sinais de Hip no espectro do material P84/APP-Hip é realizada mediante a observação tanto dos sinais dos hidrogênios aromáticos, entre δ 8,82 – 7,17 ppm (H-2', H-5', H-9' e H-12'), como também pela presença do sinal referente aos hidrogênios metílicos em δ 2,70 ppm (Figura 63). Nota-se, entretanto, que em comparação ao espectro de RMN de ^1H da Hip pura (Figuras 47 e 48), os sinais de hidrogênios aromáticos são desdobrados de dois para cinco sinais. Este efeito pode estar associado com as diferentes mudanças de ambiente químico experimentado por esses sinais em função da movimentação (giro/rotação) das moléculas de Hip dentro das nanocapsulas de P84/APP.

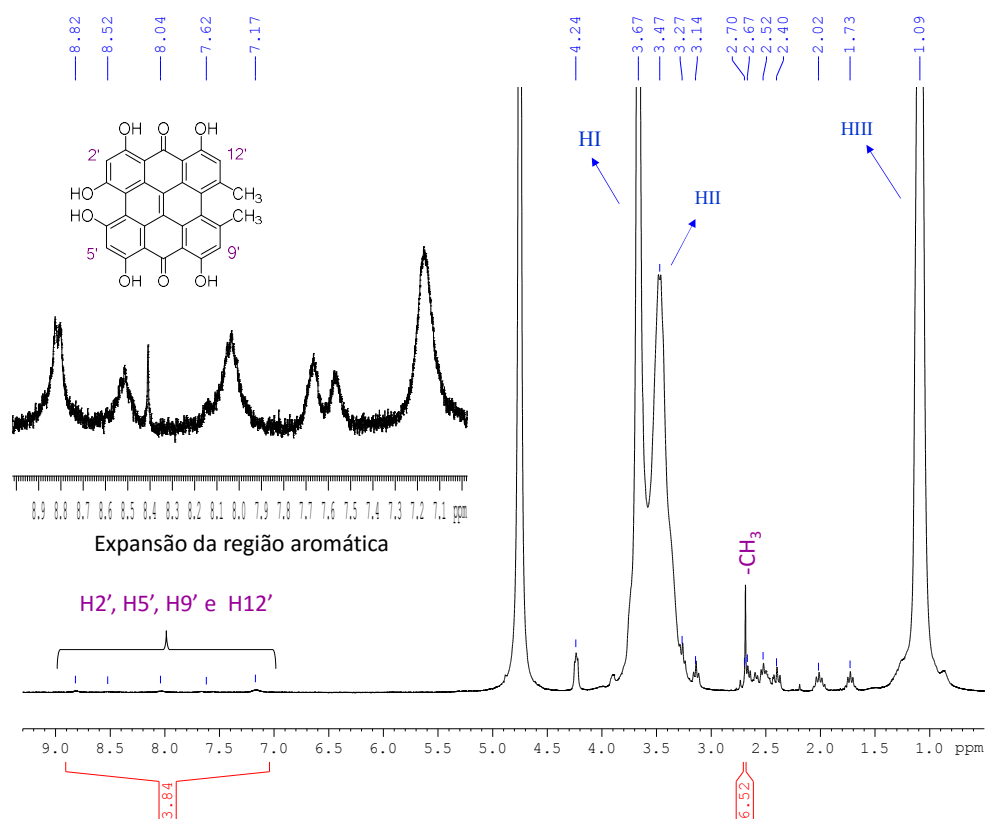


Figura 63. Espectro de RMN de ^1H do sistema P84/APP-Hip adquirido em D_2O a 300 MHz.

Por meio da análise do RMN de ^1H *ASIS* (Figura 64), observa-se que devido ao efeito da anisotropia magnética gerado pelas moléculas de Hip, os sinais de hidrogênios próximos a elas são blindados, sentindo, conseqüentemente, um menor efeito do campo magnético aplicado. Deste modo, como as moléculas de Hip tem uma maior probabilidade de se localizarem na região de maior hidrofobicidade das nanoestruturas micelares, como demonstrado na sessão anterior (item 4.4.3), os sinais de hidrogênios das cadeias de PO, H-II e H-III, do copolímero P84/APP são deslocados para menores valores de δ , observando-se um $\Delta\delta$, respectivamente de 0,03 e 0,04 ppm.

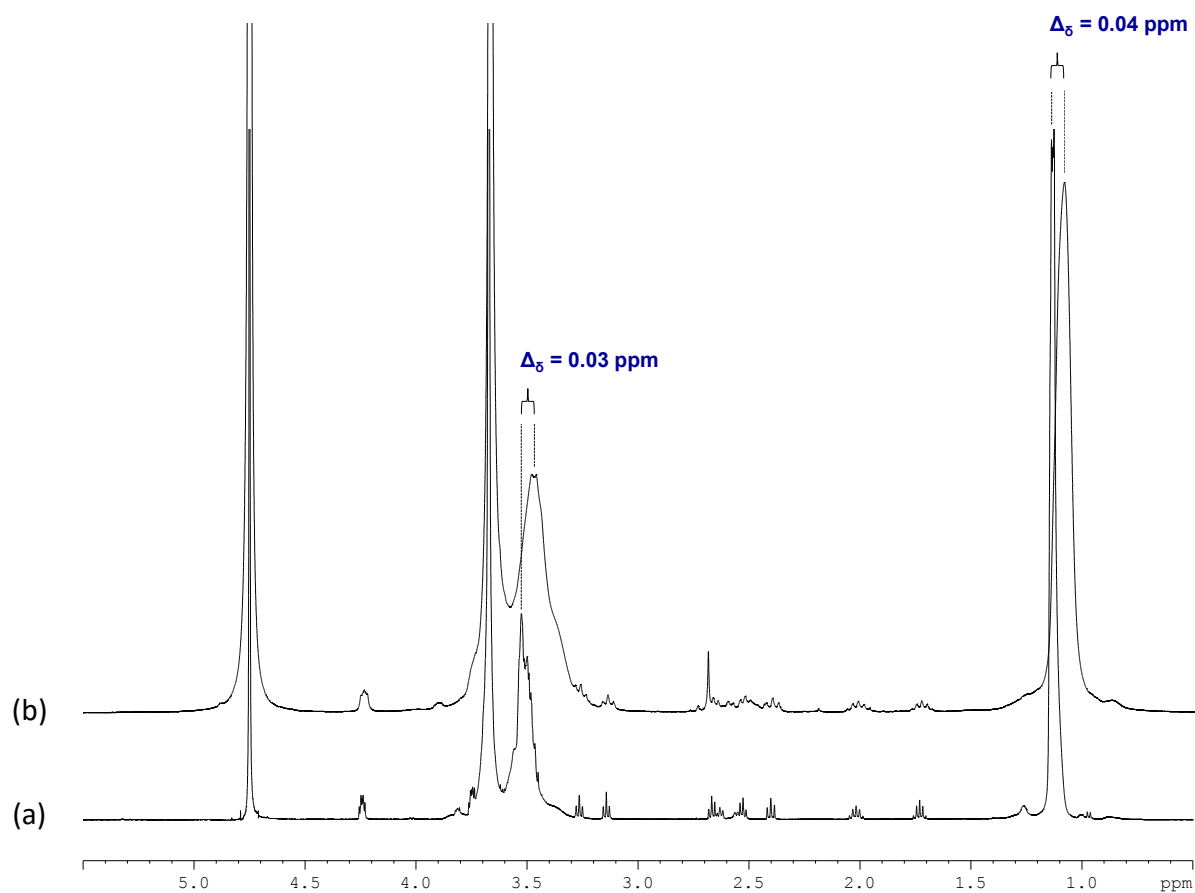


Figura 64. Deslocamentos químicos observados via RMN de ^1H *ASIS* para os sinais dos hidrogênios H-II e H-III das cadeias de PO: (a) Espectro de RMN de ^1H do P84/APP puro e (b) espectro de RMN de ^1H do sistema P84/APP-Hip, adquiridos em D_2O a 500 e 300 MHz, respectivamente.

Uma vez demonstrado que as moléculas de Hip estão solubilizadas nas nanoestruturas micelares do copolímero P84/APP, com uma maior probabilidade de se localizarem nas regiões mais hidrofóbicas (cadeias de PO), o estudo de NOESY para o sistema P84/APP-Hip foi realizado de modo a se obter informações mais detalhadas sobre o perfil de localização das moléculas de Hip. Deste modo, analisando-se o espectro 2-D NOESY (Figura 65) observa-se em δ 7,17 ppm a presença de fortes picos de correlações positivos entre os sinais de hidrogênios aromáticos da Hip ($H2'$ e $H5'$) com os sinais de hidrogênios das cadeias de PO, H-II e H-III, respectivamente em δ 3,47 e 1,09 ppm (Tabela 15). Considerando que estes sinais estão ausentes no mapa de correlação 1H - 1H do material P84/APP-Hip (Figura 66), torna-se evidente que tais correlações espectroscópicas são de origem dipolares, confirmando a proximidade das moléculas de Hip com as cadeias de PO do copolímero P84/APP.

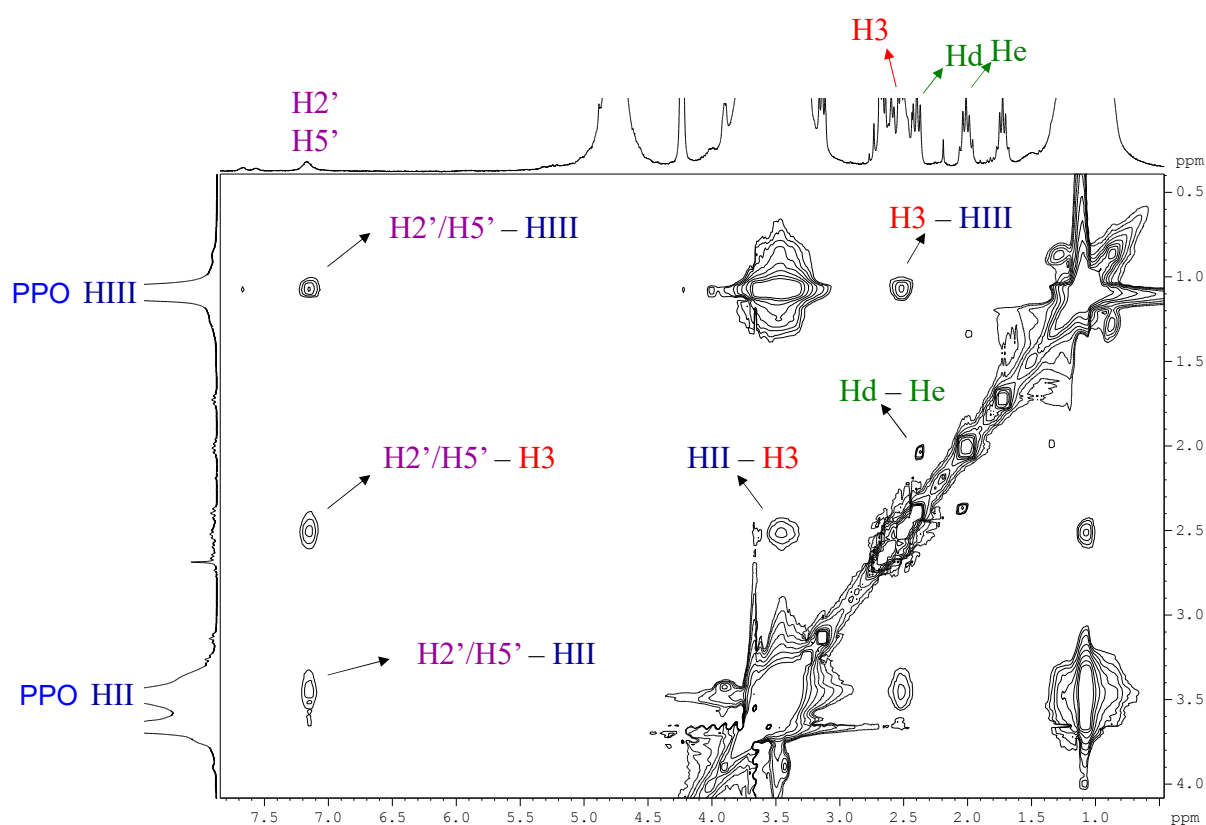


Figura 65. Espectro de RMN 2-D NOESY do sistema P84/APP-Hip adquirido em D_2O a 300 MHz.

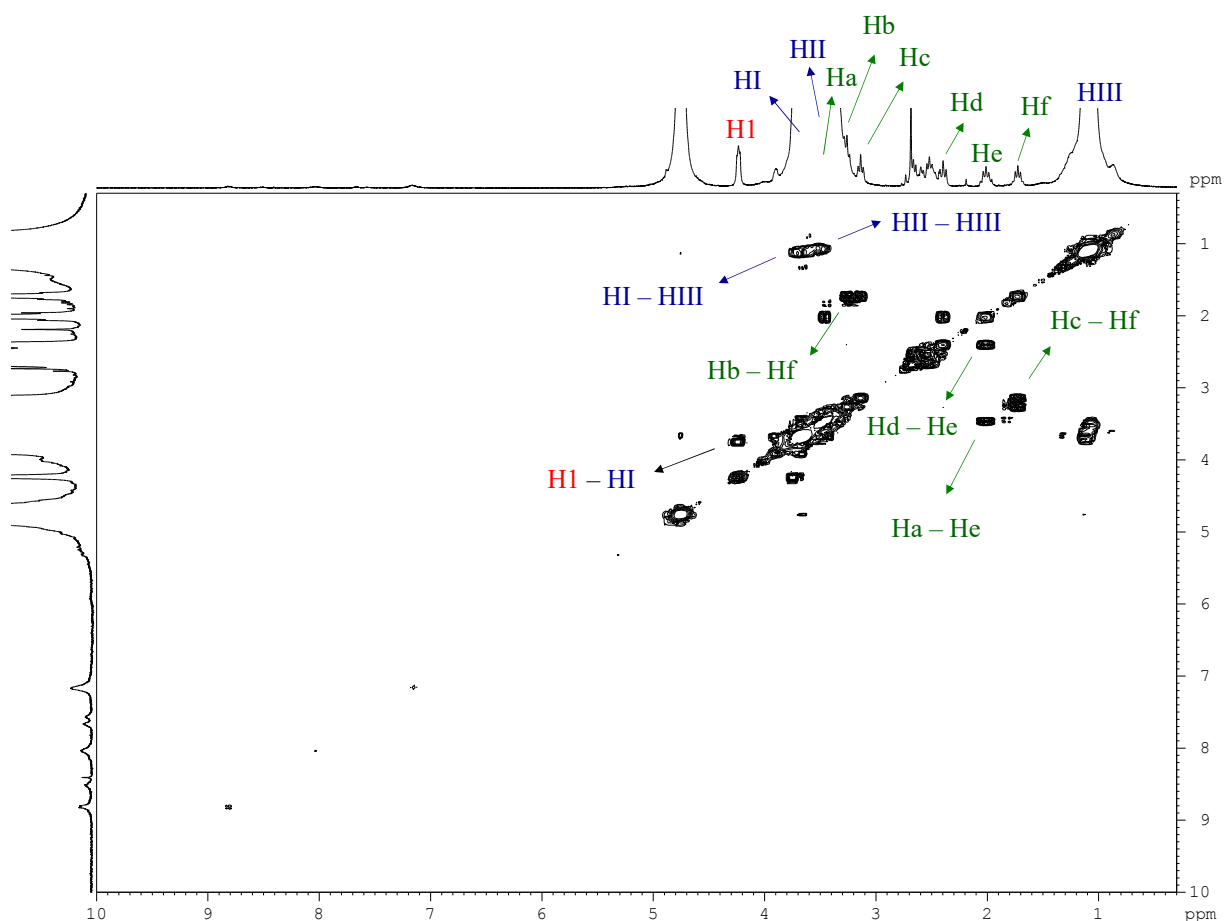
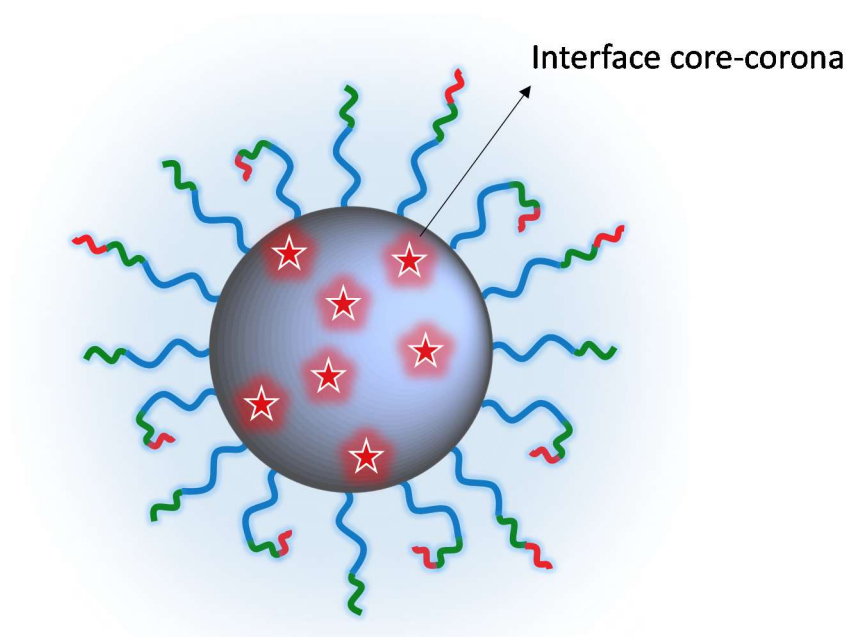
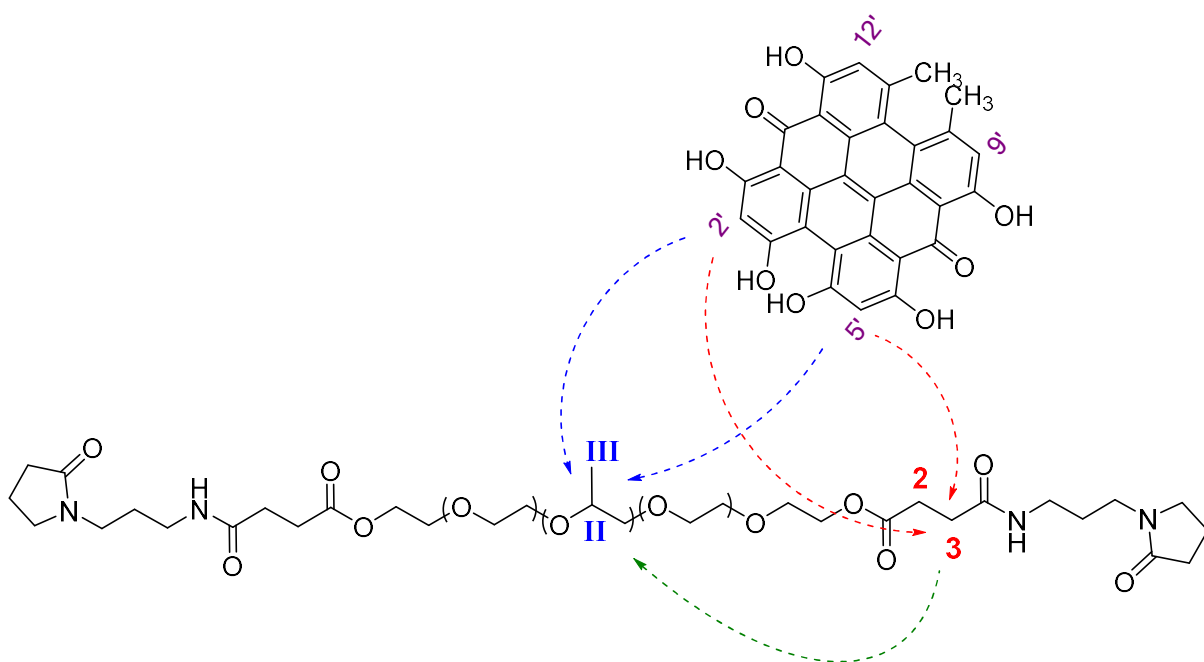


Figura 66. Mapa de correlação ^1H - ^1H (COSY) do material P84/APP-Hip, adquirido em D_2O a 300 MHz.

Nota-se ainda, no mesmo espectro, um forte pico de correlação dipolar entre os sinais de hidrogênios aromáticos H-2' e H-5' com os sinais de hidrogênios α -carboxílicos dos grupos succinatos (H-3) do copolímero P84/APP, em δ 2,52 ppm. A correlação entre esses sinais, demonstram que existe uma probabilidade das moléculas de Hip estarem se movimentando em direção à região da corona das nonoesferas copoliméricas. Diferentemente do que se observa no espectro NOESY do sistema P84-Hip, cujos picos de correlações observados revelam que as moléculas de Hip estão preferencialmente localizadas na região do core, quando o copolímero P84 é derivatizado com as moléculas de APP, as moléculas de Hip tendem a se localizarem na interface do sistema (região entre o core e a corona), como mostrado no Esquema 18.

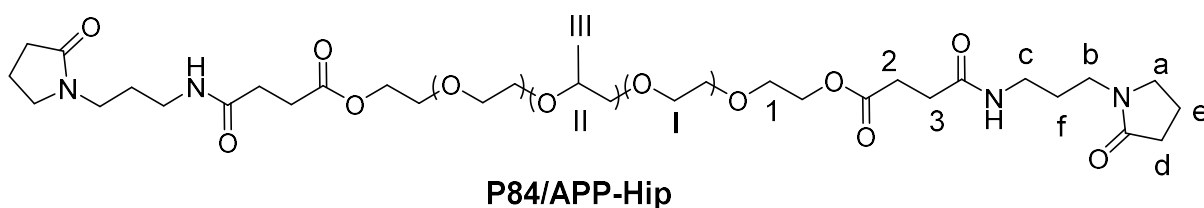
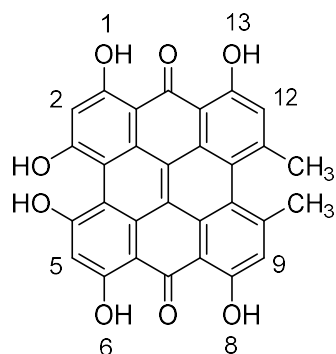
Adicionalmente, os picos de correlações dipolares observados entre os sinais de hidrogênios H3 com os sinais de hidrogênios das cadeias de PO, H-II e H-III mostram que as terminações das cadeias de EO podem estar inclinadas em direção as cadeias de PO das micelas copoliméricas, sustentando a evidência de sua aproximação com as moléculas de Hip. A observação do pico de correlação de média intensidade entre os sinais de hidrogênios Hc e Hd das moléculas de APP, revelam que as moléculas de APP tendem a se inclinarem juntamente com as cadeias de EO, favorecendo a aproximação do átomo de oxigênio carbonílico ao hidrogênio do grupamento amida (Esquema 17).

Diferentemente da correlação intermolecular *cabeça-calda* observada no espectro NOESY do material P84-Hip, entre os dímeros de Hip (Figura 65), no espectro 2-D NOESY do material P84/APP-Hip, nenhuma correlação é observada entre as moléculas de Hip. Com isso, pode-se concluir que o efeito do aumento da concentração do copolímero P84/APP durante o processo de formulação, resulta em uma distribuição mais homogênea das moléculas de Hip tornando-as mais dispersas e monomerizadas na matriz copolimérica.



Esquema 17. Representação da organização das moléculas de Hip na matriz copolimérica de P84/APP-Hip. As moléculas de Hip tendem a se distribuírem na interface core-corona das nanopartículas micelares (setas azuis e vermelhas), enquanto que os grupos succinatos tendem a se inclinarem na direção das cadeias de PO (seta verde).

Tabela 15. Correlações observadas nos espectros de RMN NOESY e COSY para o material P84/APP-Hip



NOESY	COSY
H-I / H-III	H-I / H-III
H-II / H-III	H-II / H-III
H-2', H-5' / H-II	H-I / H-1
H-2', H-5' / H-III	H-a / H-e
H-2', H-5' / H-3	H-b / H-f
H-3 / H-II	H-c / H-f
H-2 / H-III	H-d / H-e

4.4. Avaliação dos efeitos fotocitotóxicos da Hip pura e formuladas nos sistemas copolímeros P84 e P84/APP em células de melanoma B16F10

4.4.1. Efeito fotocitotóxico da Hip pura (DMSO)

A avaliação do efeito fotocitotóxico na linhagem de células de melanoma B16F10 foi realizada incubando-se previamente as células com diferentes concentrações de Hip em DMSO (5,0 %, v/v), por um período de 3 h. Os ensaios de viabilidade celular (% de IS) foram realizados para o tratamento das células no escuro e com uma fonte de irradiação luminosa, utilizando-se um sistema de LEDs (λ 550 – 625 nm e 3,5 mW/cm² de potência) por um período de 20 min, correspondente a uma dose de luz de 4,2 J/cm². Em seguida aos tratamentos, a viabilidade celular é determinada por ensaio calorimétrico, baseado na redução de MTT (ver Materiais e Métodos, item 3.8), cujo resultados são apresentados na Figura 67.

Para o tratamento das células com Hip pura, no escuro, o efeito significativo na viabilidade celular é observado para concentrações de Hip acima de 1,20 μ M, onde ocorre uma diminuição nos valores de IS para próximo de 80 %, especificamente entre 2,4 e 5,0 μ M. Por outro lado, quando a Hip é fotoativada com uma dose de 4,2 J/cm², os valores de IS decaem entre, aproximadamente, 65 a 58 %, para uma faixa de concentração de Hip de 0,3 a 1,2 μ M. Adicionalmente, quando as células são tratadas com uma concentração de Hip superior a 1,2 μ M, os valores de viabilidade celular são severamente afetados, decrescendo para, próximo de 18 %, na maior concentração de Hip (5,0 μ M), mantendo-se a mesma dose de irradiação.

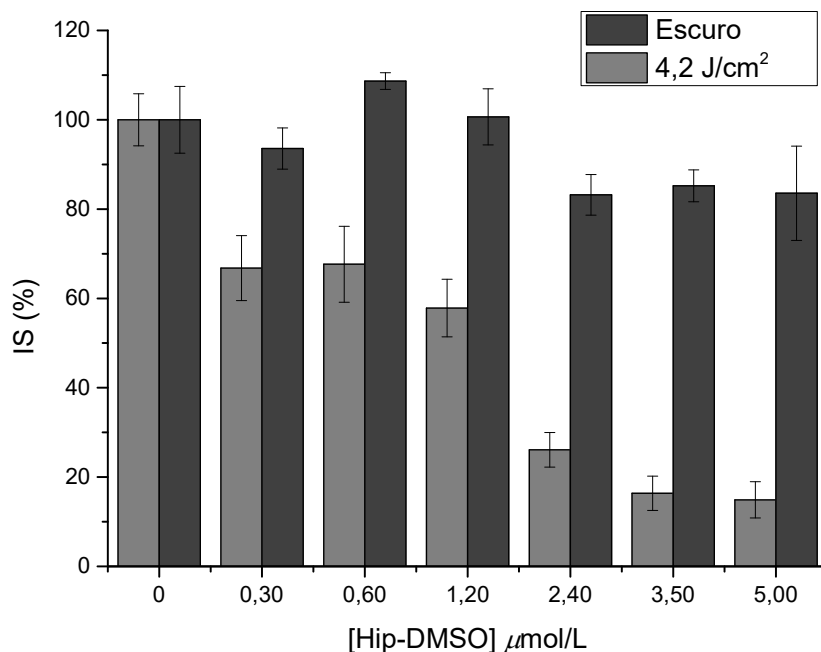


Figura 67. Índice de Sobrevivência (% IS) das células de melanoma B16F10 em função da concentração de Hip pura (DMSO 5,0 %, v/v), após 3 h de incubação com o fotossensibilizador no escuro e sob irradiação com uma dose de luz de 4,2 J/cm², utilizando-se um sistema de LEDs SMD, branco quente (λ 550 – 625 nm e 3,5 mW/cm² de potência). A citotoxicidade é avaliada por ensaio de MTT como descrito nas materiais e métodos. Cada ponto é expressado como a medida \pm SD em sextuplicata.

Os resultados prévios, obtidos para o tratamento das células B16F10 com Hip pura, foram comparados com os trabalhos descritos na literatura, os quais descrevem a utilização deste fotossensibilizador em combinação com a TFD para o tratamento *in vitro* de diferentes linhagens de células de melanoma (Hadjur e colab., 1996; Davids e colab., 2008; Davids e colab., 2009; Davids e Sharma, 2011; Davids e colab.; 2014). Desta forma, quando as células são tratadas com diferentes concentrações de Hip ($5,0 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-10}$ M e 1,0 – 10,0 μM), no escuro, nenhuma diminuição nos valores de viabilidade celular é observado pelos autores. Contudo, Hadjur e colaboradores, demonstraram que, quando as células de melanoma G361, M18 e M6 são incubadas por 1 h e irradiadas por um período de 20 min, com lâmpada alógena de tungstênio ($\lambda > 590$

m e 10 mW/cm² de potência), 50 % do IS é alcançado para uma faixa de concentração de Hip de 5,0 x 10⁻⁷ a 5,0 x 10⁻⁸ M (Hadjur e colab., 1996). Por outro lado, nos trabalhos descritos pelo grupo de pesquisa de Davids e colaboradores, os quais estudaram o efeito fotocitotóxico da Hip frente as linhagem de células de melanoma UCT Mel-1e Mel-3, A375 e 501Mel, nenhuma diminuição significativa no índice de sobrevivência (~ 98 %) é observado quando as células são tratadas com 1,0 μM de Hip e irradiadas com uma dose de luz de 1,0 J/cm² por uma lâmpada de UVA (λ 400-315 nm). Contudo, a diminuição do IS para um valor próximo a 58 %, observado neste estudo, para um valor de concentração de Hip (1,2 μM) próximo ao utilizado pelos autores, pode estar associado com a utilização de uma dose de luz, quatro vezes maior, e especificamente na região do visível, na qual a geração de ¹O₂ pela Hip é maximizada (item 4.2.4.1). Entretanto, para valores de concentração de Hip acima de 1,0 μM, o mesmo perfil discutido anteriormente, em relação ao decréscimo abrupto nos valores de IS, também é observado pelos autores (~ 40 a 20 %) para valores de concentração de Hip entre 3,0 a 10,0 μM mantendo-se a mesma dose de luz (1,0 J/cm²), (Davids e colab., 2008; Davids e colab., 2009).

Embora tenhamos observado que o tratamento das células de melanoma B16F10 com Hip pura, fotoativada com LEDs, tenha sido satisfatórios e reprodutíveis com aqueles obtidos na literatura, este trabalho traz a vantagem da utilização de uma fonte de irradiação de comprimento de onda na região do visível, isenta de efeitos colaterais tanto para as células (efeitos carcinogênicos e de fotoenvelhecimento), como também para as próprias moléculas do fotossensibilizador (efeito do fotobranqueamento), como já demonstrado neste trabalho (item 4.2.4.1). Adicionalmente, em contribuição aos poucos trabalhos descritos na literatura sobre o uso de sistemas carreadores de Hip, para aplicações *in vivo*, tais como: matrizes poliméricas de PVP, polifosfazeno e nanopartículas lipídicas (Kubin e colab., 2008, Vandepitte e colab., 2011; Teasdale e colab., 2012, Lima e colab., 2013), o ponto principal deste trabalho, foi o desenvolvimento de sistemas inéditos, a base do copolímero P84 (item 4.3), como mais uma alternativa aos materiais já desenvolvidos visando o biotransporte e a entrega

seletiva de Hip, para o tratamento de células cancerígenas, especificamente, de células de melanoma.

Desta forma, os potenciais efeitos citotóxicos dos sistemas P84-Hip, P84/APP+P84(50%)-Hip e P84/APP-Hip frente as células de melanoma B16F10, foram avaliados tanto no escuro, como na presença de irradiação luminosa, utilizando o mesmo sistema de LEDs descrito anteriormente, cujos resultados foram comparados com aqueles obtidos para o tratamento das células com o sistema padrão, Hip pura em DMSO, e com os trabalhos acima citados.

4.4.2. Efeito fotocitotóxico da Hip encapsulada em P84

A viabilidade celular das células, em função da concentração de Hip encapsulada na matriz copolimérica de P84 (P84-Hip), foi determinada tanto no escuro, como na presença de luz. Para o tratamento na ausência de luz, observa-se uma diminuição relativamente pequena na viabilidade celular (~ 80 %), para concentrações de Hip igual ou superior a 2,4 μM (Figura 68), similar ao obtido para a Hip pura.

Quando o sistema P84-Hip é fotoativado com uma dose de 4,2 J/cm^2 , observa-se uma relação entre o aumento da concentração de Hip com uma diminuição lenta e progressiva na viabilidade celular, chegando-se a um valor médio de, aproximadamente, 50 %. Diferentemente do perfil observado para o tratamento das células com Hip pura, o qual apresenta uma diminuição mais acentuada nos valores de IS, principalmente para concentrações acima de 1,2 μM , o tratamento das células com o sistema P84-Hip, exibe uma queda mais atenuada para os valores de IS, mesmo para concentrações de Hip acima deste valor. Uma vez que o efeito citotóxico das moléculas de Hip depende em grande parte do seu acesso à superfície celular, a concentração da matriz copolimérica de P84 no meio passa a ser um fator determinante para este efeito.

Deste modo, sob valores elevados de concentração, muito acima de sua CMC ($7,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), o número de agregação micelar, torna-se alto o suficiente para “blindar” o acesso das moléculas de Hip em direção a interface das nanoesferas copolímeras, dificultando sua liberação para o meio celular (Mendes-Perez e colab.,

2013; Sobczynski, Kristensen and Berg, 2014). Contudo, os resultados reportados sobre a utilização de matrizes poliméricas de PVP para o biotransporte de Hip, demonstram que, além da Hip preservar suas propriedades fotoquímicas, o sistema PVP-Hip é altamente seletivo para tecidos tumorais com relação aos tecidos normais, em aplicações *in vivo*, principalmente devido a capacidade das células neoplásicas em capturar as moléculas de PVP (Vandepitte e colab., 2011). Neste sentido, os resultados apresentados a seguir, mostram que, quando o material copolimérico P84 é biofuncionalizado com moléculas de APP (mesmo grupo funcional do polímero PVP), observa-se um decréscimo significativo nos valores de IS com relação ao tratamento das células com o sistema P84-Hip, para a mesma faixa de concentração de Hip.

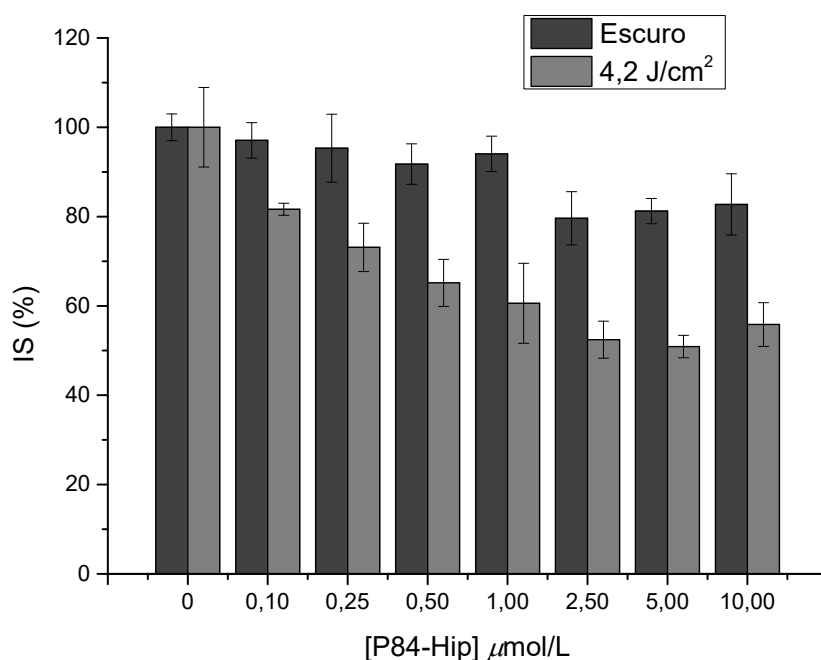


Figura 68. Índice de sobrevivência (% IS) das células de melanoma B16F10 em função da concentração de P84-Hip (25,0 mg de P84, 0,5 % m/v), após 3 h de incubação com o fotossensibilizador no escuro e sob irradiação com uma dose de luz de 4,2 J/cm², utilizando-se um sistema de LEDs SMD, branco quente (λ 550 – 625 nm e 3,5 mW/cm² de potência). A citotoxicidade é avaliada por ensaio de MTT como descrito nas materiais e métodos. Cada ponto é expressado como a medida \pm SD em sextuplicata.

4.4.3. Efeito fotocitotóxico da Hip encapsulada em P84/APP

Contudo, para avaliar o efeito da funcionalidade do copolímero P84 com as moléculas de APP, a viabilidade celular foi inicialmente determinada pelo tratamento das células com diferentes concentrações de Hip encapsulada na mistura dos materiais copoliméricos: P84/APP e P84 (P84/APP+P84(50%)-Hip) em uma proporção em massa de 1:1, tanto no escuro como na presença de luz, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos para o sistema P84-Hip fotoativado. Para o tratamento das células com o material copolimérico misto, na ausência de luz (Figura 69), observa-se uma queda média na viabilidade celular de, aproximadamente, 80 %, para uma faixa de concentração de Hip entre 0,10 a 10,0 μM . Por outro lado, quando o sistema copolimérico misto é fotoativado com uma dose de 4,2 J/cm^2 , a viabilidade celular é reduzida para 60 %, na presença de 1,0 μM de Hip. Entretanto, para o tratamento com concentrações superiores de Hip (2,5 a 5,0 μM), observa-se uma queda acentuada na viabilidade celular (\sim 40 a 18 %), diferentemente do perfil observado para o sistema P84-Hip, o qual revela uma queda mais tênue nos valores de IS (\sim 60 a 50 %) para a mesma faixa de concentração.

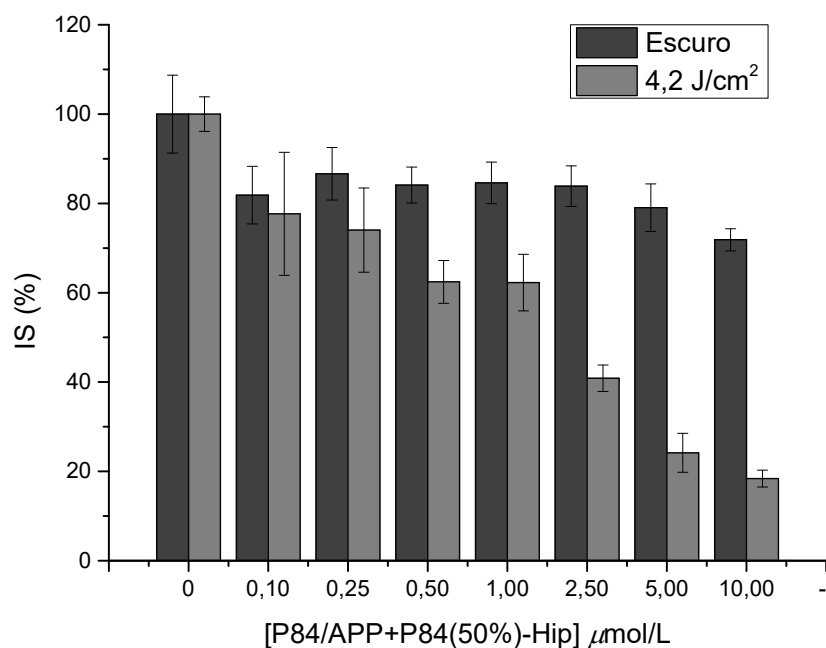


Figura 69. Índice de sobrevivência (% IS) das células de melanoma B16F10 em função da concentração de P84/APP+P84(50%)-Hip (12,5 mg de P84/APP e 12,5 mg de P84, 0,5 % m/v), após 3 h de incubação com o fotossensibilizador no escuro e sob irradiação com uma dose de luz de 4,2 J/cm², utilizando-se um sistema de LEDs SMD, branco quente (λ 550 – 625 nm e 3,5 mW/cm² de potência). A citotoxicidade é avaliada por ensaio de MTT como descrito nas materiais e métodos. Cada ponto é expressado como a medida \pm SD em sextuplicata.

A viabilidade celular foi avaliada na presença de diferentes concentrações de Hip encapsuladas na matriz copolimérica de P84/APP(100%), tanto no escuro como também na presença de luz, utilizando-se o mesmo sistema de LEDs descritos para os tratamentos anteriores. Na ausência de luz, os valores médios observados de viabilidade celular, não mostraram uma diminuição expressiva nos valores de IS (~ 80 %), mesmo para valores de concentração de Hip acima de 1,2 μM (Figura 70). Entretanto, quando o sistema é fotoativado com uma dose de 4,2 J/cm², observa-se um decréscimo significativo nos valores de IS em função do aumento da concentração de Hip, tornando-se mais pronunciados a partir de 2,5 μM (~ 53 – 32 %). Ainda, na presença de irradiação luminosa (mesma dose de luz utilizada para os resultados anteriores), um decréscimo

considerável nos valores de IS são observados para o tratamento das células com o sistema copolimérico misto (P84/APP+P84(50%)-Hip) em relação ao sistema puro (P84-APP(100 %)), mais especificamente para valores de concentração de Hip acima de $1,0 \mu\text{M}$. Esses resultados demonstram que a porcentagem de moléculas de APP na matriz copoliméricas micelar de P84, parecem modular o acesso das moléculas de Hip na superfície celular, e conseqüentemente, o efeito sobre a viabilidade das células de melanoma.

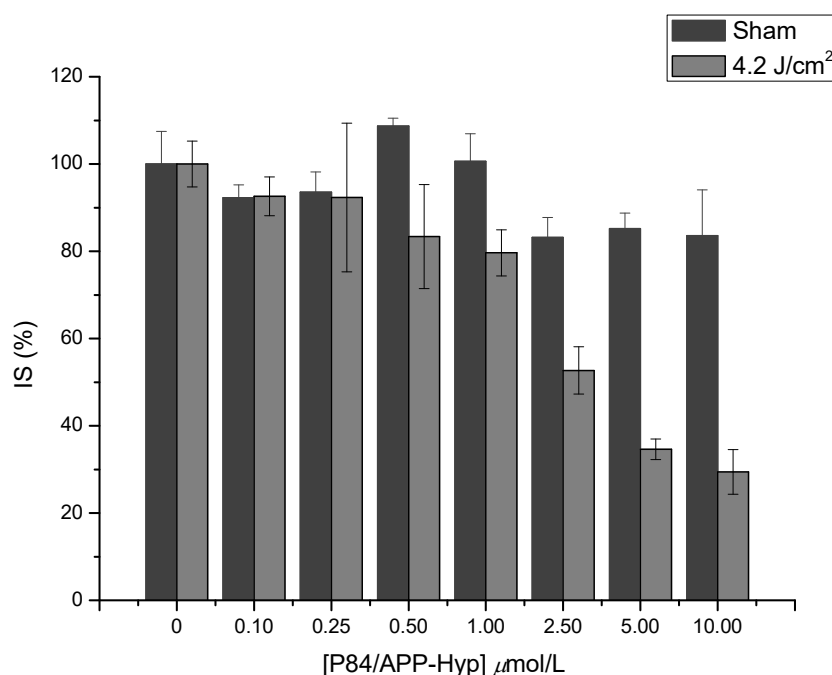


Figura 70. Índice de sobrevivência (% IS) das células de melanoma B16F10 em função da concentração de P84/APP(100%)-Hip (25,0 mg, 0,5 % m/v), após 3 h de incubação com o fotossensibilizador no escuro e sob irradiação com uma dose de luz de $4,2 \text{ J/cm}^2$, utilizando-se um sistema de LEDs SMD, branco quente (λ 550 – 625 nm e $3,5 \text{ mW/cm}^2$ de potência). A citotoxicidade é avaliada por ensaio de MTT como descrito nas materiais e métodos. Cada ponto é expressado como a medida \pm SD em sextuplicata.

O aumento do efeito fotocitotóxico observado para o tratamento das células com a Hip encapsulada nos sistemas copoliméricos funcionalizados, pode estar associado, por um lado, com a capacidade das células em capturar com maior facilidade as moléculas de APP externamente ligadas às nanoesferas copoliméricas, como demonstrado por Vandepitte e colaboradores para o sistema PVP-Hip (Vandepitte e colab., 2011), e por outro, com a probabilidade de uma população de moléculas de Hip estarem preferencialmente localizadas na interface dessas nanoesferas, como foi observado nos experimentos de NOESY, descritos no item 4.3.4 (Esquema 17), favorecendo, em ambos os casos, a liberação das moléculas de Hip para a superfície celular. Finalmente, o efeito do aumento da dose luz no tratamento das células com a Hip pura e encapsulada nas matrizes copoliméricas citadas acima (P84, P84/APP+P84(50 %) e P84/APP) foi também investigado, e os resultados são mostrados na Figura 79. Desta forma, quando a Hip pura ou formulada nas matrizes copoliméricas é fotoativada com uma dose de luz, duas vezes maior ($8,4 \text{ J/cm}^2$), em média, nenhuma melhora significativa é observada para os valores de viabilidade celular, para a mesma faixa de concentração de Hip utilizada nos tratamentos anteriores. Esses resultados demonstram que a dose de $4,2 \text{ J/cm}^2$ é suficiente para a observação do efeito fotocitotóxico da Hip frente as células de melanoma B16F10. Adicionalmente, quando as células são irradiadas por um tempo maior (40 min), correspondente a dose de $8,4 \text{ J/cm}^2$, a multiplicação acelerada das células de melanoma parece compensar o efeito do aumento da dose de luz empregada, como pode ser observado pela redução nos valores de IS, para todos os sistemas avaliados para a mesma faixa de concentração de Hip (Figura 71).

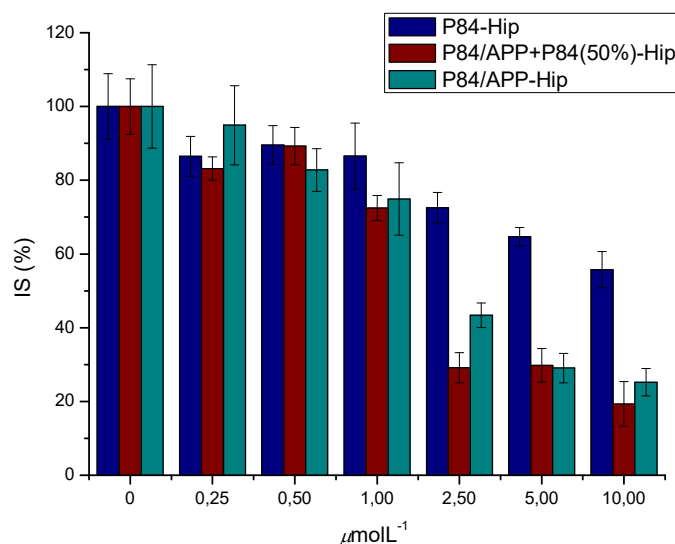


Figura 71. Índice de sobrevivência (% IS) das células de melanoma B16F10 em função da concentração de P84-Hip, P84/APP+P84(50%)-Hip e P84/APP-Hip (25,0 mg, 0,5 % m/v), após 3 h de incubação com o fotossensibilizador e sob irradiação com uma dose de luz de $8,4 \text{ J/cm}^2$, utilizando-se um sistema de LEDs SMD, branco quente (λ 550 – 625 nm e $3,5 \text{ mW/cm}^2$ de potência). A citotoxicidade é avaliada por ensaio de MTT como descrito nas materiais e métodos. Cada ponto é expressado como a medida \pm SD em sextuplicata.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, as antraquinonas (AQs) crisofanol, fisciona e emodina foram isoladas com rendimentos satisfatórios (0,2, 0,6 e 1,2 %, respectivamente) a partir da casca seca da planta *Rhamnus Frangula* L. Os resultados de RMN de ^1H revelaram que as AQs podem ser isoladas por técnica de CC, com maior grau de pureza, quando utilizado uma combinação de CHCl_3 e AcOEt como FM. De posse das AQs em suas formas isoladas, a AQ emodina foi selecionada como material precursor para a obtenção da Hip, cujas etapas de redução e fotociclização foram devidamente otimizadas. Os resultados mostraram que as proporções estequiométricas ótima para a mistura redutora $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e HCl_{conc} , foram de, respectivamente, 3,2-6,4 e 100,0 eq-mol para um tempo reacional de 30 min, enquanto que o sistema de LEDs verde, mostrou-se mais eficiência para a fotociclização da protohipericina, levando-se a um aumento de seu rendimento/pureza.

Os materiais copoliméricos P84/ESD, P84/ESN e P84/APP foram sintetizados com sucesso, e com rendimentos satisfatórios (~ 70-75 %). Estudos de RMN 2-D NOESY para os sistemas P84-Hip e P84/APP-Hip mostraram que para o primeiro sistema, as moléculas de Hip encontram-se mais localizadas na região do core enquanto que para o segundo, as moléculas de Hip estão preferencialmente localizadas na região de interface core-corona nas nanopartículas micelares.

Finalmente, os ensaios de fotocitotoxicidade da Hip encapsulada nos materiais P84/APP+P84(50%)-Hip e P84/APP-Hip frente as células de melanoma B16F10 foram mais eficientes, em termos de viabilidade celular, com relação a Hip formulada nas micelas copoliméricas de P84. Esses resultados podem indicar que as células de melanoma podem apresentar uma maior probabilidade em capturar as moléculas de APP, externamente ligadas às nanoesferas copoliméricas, além do fato de que as moléculas de Hip, preferencialmente localizadas na interface core-corona, podem estar sendo liberadas com maior facilidade para a superfície celular. Baseado nesses resultados, os materiais desenvolvidos neste trabalho podem ser promissores como

novas plataformas de transporte de Hip e de outras drogas hidrofóbicas em aplicações fototerapêutica de células cancerígenas.

7. REFERÊNCIAS

ALEXANDRIDIS, P.; Holzwarth, J. F.; Hatton, T. A., Micellization of poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules* **1994**, 27, (9), 2414-2425.

ALTMANN, R.; Falk, H.; Gruber, H. J., Synthesis and properties of ionophore conjugated hypericin derivatives. *Monatshefte Fur Chemie* **1998**, 129 (3), 235-244.

AMERICAN type culture collection: Cell lines. Disponível em: <www.atcc.org>

ANKE, H.; Kolthoum, I.; Zahner, H.; Laatsch, H., Metabolic products of microorganisms .185. the anthraquinones of the aspergillus glaucus group .I. occurrence, isolation, identification and anti-microbial activity. *Archives of Microbiology* **1980**, 126 (3), 223-230.

ATWATER, R. M., Pharmacopeia of the united-states of america (15th rev.) - us-pharmacoepial-convention. *American Journal of Public Health and the Nations Health* **1957**, 47 (6), 770-771.

BADGER, G. M.; Gibb, A. R. M., Polycyclic aromatic amines .2. *Journal of the Chemical Society* **1949**, (4), 799-803.

BAPAT, D. S.; Rao, B. C. S.; Unni, M. K.; Venkataraman, K., The action of diborane and of sodium borohydride-boron trifluoride-etherate on anthraquinones - a new synthesis of aloe-emodin and citreorosein and a general method for the reduction of anthraquinones to anthracene derivatives. *Tetrahedron Letters* **1960**, (5), 15-19.

- BATRAKOVA, E. V.; Kabanov, A. V., Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release* **2008**, *130* (2), 98-106.
- BATTISTUTTA, R.; Sarno, S.; De Moliner, E.; Papinutto, E.; Zanotti, G.; Pinna, L. A., The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (38), 29618-29622.
- BATRAKOVA, E. V.; Li, S.; Alakhov, V. Y.; Kabanov, A. V., Selective energy depletion and sensitization of multiple drug resistant cancer cells by pluronic block copolymers. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2000**, *220*, 1639-1640.
- BATRAKOVA, E. V.; Li, S.; Elmquist, W. F.; Miller, D. W.; Alakhov, V. Y.; Kabanov, A. V., Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *British Journal of Cancer* **2001**, *85* (12), 1987-1997.
- BECKER, R. S.; Earhart, C. E., Spectroscopy and photochemistry of bianthrone. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92* (17), 5049-5057.
- BERNAL, C.; Ribeiro, A. O.; Andrade, G. P.; Perussi, J. R., Photodynamic efficiency of hypericin compared with chlorin and hematoporphyrin derivatives in HEp-2 and Vero epithelial cell lines. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2015**, *12* (2), 176-185.
- BOCKSTAHL, F.; Duplaatre, G.; Miguel, M. D.; Burrows, H. D., Probing the size of Pluronic (R) P84 block copolymer micelles in aqueous solution by means of

positron annihilation lifetime spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, 2 (20), 4768-4771.

BROCKMANN, H.; Eggers, H., Synthese des proto-hypericins und hypericins aus emodin-anthron-(9). *Chemische Berichte-Recueil* **1958**, 91 (3), 547-553.

BROCKMANN, H.; Haschad, M.N.; Maier, K.; Pohl, F. Hypericin, the photodynamically active pigment from *Hypericum perforatum*. *Naturwissenschaften* **1939**, 32, 550.

BROCKMANN, H.; Kluge, F.; Muxfeldt, H., Total synthese des hypericins. *Chemische Berichte-Recueil* **1957**, 90 (10), 2302-2318.

BROCKMANN, H.; Muhlmann, R., Uber die photochemische cyclisierung des helianthrons und dianthrons zum meso-naphthodianthron. *Chemische Berichte-Recueil* **1949**, 82 (4-5), 348-357.

BROMBERG, A.; Muszkat, K. A., Oxidation of 4a,4b-dihydrophenanthrenes .1. kinetics of thermal reaction of 9,10-cyclopentano-4a,4b-dihydrophenanthrene with oxygen. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, 91 (11), 2860-2866.

BROMBERG, A.; Muszkat, K. A.; Fischer, E., Oxidation of 4a,4b-dihydrophenanthrenes - a large kinetic isotope effect of deuterium in initiation step of thermal reaction with oxygen. *Chemical Communications* **1968**, (21), 1352-1354.

BUCKLES, R. E., Illumination of cis-stilbenes and trans-stilbenes in dilute solutions. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77 (4), 1040-1041.

- BUNTON, C. A.; Cowell, C. P., The binding of phenols and phenoxide ions to cationic micelles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1988**, *122* (1), 154-162.
- BUTTNER, T. T., Encyclopaedia of the history of science, technology, and medicine in non-western cultures. *Anthropos* **1998**, *93* (4-6), 565-573.
- BUYTAERT, E.; Dewaele, M.; Agostinis, P., Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta* **2007**, *1776*, 86-107.
- CARO, Y.; Anamale, L.; Fouillaud, M.; Lauret, P.; Petit, T.; Dufosse, L., Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants:an overview. *Natural Products and Bioprospecting* **2012**, *2*, 174-193.
- CERNY, C., Hypericin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* **1911**, *73*, 371-382.
- CHANG-ZHENG, S.; Cui-Tao, L.; Ying-Zheng, Z.; Ping, G.; Ji-Lai, T.; Lu, Z.; Xiao-Kun, L.; Hai-Feng, L.; Dan-Dan, D.; Xing, L, Characterization of the Doxorubicin-Pluronic F68 Conjugate Micelles and Their Effect on Doxorubicin Resistant Human Erythroleukemic Cancer Cells. *Nanomedicine & Nanotechnology* **2011**, *2* (5), 1-6.
- CHOU, T. C.; Talalay, P., Analysis of combined drug effects - a new look at a very old problem. *Trends in Pharmacological Sciences* **1983**, *4* (11), 450-454.
- COFFEY, S.; Boyd, V., The reduction of anthraquinone and other polycyclic quinones with aluminium alkoxides (Meerwein-Pondorff reagent). *Journal of the Chemical Society* **1954**, (7), 2468-2470.

- COHEN, S. S.; A guide of polyamines. Ilustrada. Universidade de Michiga: Oxford University Press, **1998**. 595.
- CONA, M. M.; Li, J. J.; Feng, Y. B.; Chen, F.; Verbruggen, A.; de Witte, P.; Oyen, R.; Ni, Y. C., Targetability and Biodistribution of Radioiodinated Hypericin: Comparison between Microdosing and Carrier-Added Preparations. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2014**, *14* (6), 852-861.
- CULPEPER, N., Culpeper's complete herbal and english physcian: The classic herbal for over 350 years. Bedford, Massachusetts: Applewood books, **1653**. 399 p.
- DANQUAH, M. K.; Zhang, X. A.; Mahato, R. I., Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63* (8), 623-639.
- DAVIDS, L. M.; Kleemann, B.; Cooper, S.; Kidson, S. H., Melanomas display increased cytoprotection to hypericin-mediated cytotoxicity through the induction of autophagy. *Cell Biology International* **2009**, *33*, 1065-72.
- DAVIDS, L. M.; Kleemann, B.; Kacerovska, D.; Pizinger, K.; Kidson, S. H., Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **2008**, *91* (2-3), 67-76.
- DAVIDS, L. M.; Britta, K.; Benjamin, L.; Thomas, J. S.; Dirk, L., St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photo medicine: Hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death. *A Peer-Reviewed Open Access Journal (PLOS ONE)* **2014**, *9*, (7), 1-20.

- DENIZOT, F.; Lang, R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* **1986**, *89*, (2) 271-277.
- DEWAELE, M.; Martinet, W.; Rubio, N.; Verfaillie, T.; de Witte, P. A., Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *Journal of Cellular Molecular Medicine* **2010**, *15*, 1402-1414.
- DOT, J.; Lluch, M.; Blanco, I.; Rodriguez-Alvarez, J., Polyamine uptake in cultured astrocytes: Characterization and modulation by protein kinases. *Journal of Neurochemistry* **2000**, *75* (5), 1917-1926.
- EL-BEIH, A. A.; Kawabata, T.; Koimaru, K.; Ohta, T.; Tsukamoto, S., Monodictyquinone A: A new antimicrobial anthraquinone from a sea urchin-derived fungus *Monodictys* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2007**, *55* (7), 1097-1098.
- ELUJOBA, A. A.; Ajulo, O. O.; Iweibo, G. O., Chemical and biological analyses of nigerian *cassia* species for laxative activity. *Journal of Pharmaceutical Biomedicinal Analysis* **1989**, *7* (12), 1453-1457.
- FAIRBAIRN, J. W., The active constituents of the vegetable purgatives containing anthracene derivatives .1. glycosides and aglycones. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1949**, *1* (10), 683-694.
- FAIRBAIRN, J. W.; Lou, T. C., Vegetable purgatives containing anthracene derivatives .4. the active principles of rhubarb. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1951**, *3* (2), 93-104.
- FAIRBAIRN, J. W.; Saleh, M. R. I., Synergistic effect of a 3rd active glycoside of senna. *Nature* **1951**, *167* (4259), 988-988.

FALK, H.; Meyer, J.; Oberreiter, M., A convenient semisynthetic route to hypericin. *Monatshefte Fur Chemie* **1993**, *124* (3), 339-341.

FALK, H.; Sarhan, A.; Tran, H. T. N.; Altmann, R., Synthesis and properties of hypericins substituted with acidic and basic residues: Hypericin tetrasulfonic acid - A water soluble hypericin derivative. *Monatshefte Fur Chemie* **1998**, *129* (3), 309-318.

FALK, H.; Tran, T. N. H., Synthesis and properties of an ω , ω' -appended eighteen carbon chains hypericin derivative. *Monatshefte Fur Chemie* **1996**, *127* (6-7), 717-723.

FALK, H.; Vaisburg, A. F.; Amer, A. M., On the synthesis of ω -appended hypericin derivatives. *Monatshefte Fur Chemie* **1995**, *126* (8-9), 993-1000.

FEINWEBER, D.; Verwanger, T.; Brueggemann, O.; Teasdale, I.; Krammer, B., Applicability of new degradable hypericin-polymer-conjugates as photosensitizers: principal mode of action demonstrated by in vitro models. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2014**, *13* (11), 1607-1620.

FENG, P. C.; Haynes, L. J.; Magnus, K. E.; Plimmer, Jr S. H. S., Pharmacological screening of some west indian medicinal plants. *Journal of Pharmacy Pharmacology* **1962**, *14* (5), 556-561.

FIESER, L. F.; Fieser, M., Reagents for organic synthesis. Vol. I. John Wiley and Sons Inc.. New York, N.Y. **1967**. p. 1082.

FIEDLER, H.-P.; Dieter, A.; Guider, T. A. M.; Kajahn, I.; Hamm, A.; Brown, R.; Jones, A. L.; Goodfellow, M.; Mueller, W. E. G.; Bringmann, G., Genoketides A1 and

A2, new octaketides and biosynthetic intermediates of chrysophanol produced by *Streptomyces* sp AK 671. *Journal of Antibiotics* **2008**, *61* (7), 464-473.

FIESER, L. P., "The tautomerism of hydroxy quinones". *Journal of the American Chemical Society*, **1928**, *50* (2), 439-465.

FONGE, H.; Jin, L. X.; Wang, H. J.; Bormans, G.; Ni, Y. C.; Verbruggen, A., Synthesis and preliminary biological evaluation of a (99m)Tc-labeled hypericin derivative as a necrosis avid imaging agent. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **2008**, *51* (1-2), 33-40.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells. New York: Wiley-Liss Inc., **1994**, 486 p.

FRIZON, T. E. A.; Micheletto, Y. M. S.; Westrup, J. L.; Wakabayashi, P. S. S.; Serafim, F. R.; Damiani, A. P.; Longaretti, L. M.; de Andrade, V. M.; Giacomelli, F. C.; Fort, S.; Dal Bo, A. G., New glycosylated conjugate copolymer N-acetyl-beta-D-glucosaminyl-pluronic: Synthesis, self-assembly and biological assays. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2015**, *133*, 323-330.

FRONTANA, C.; Gonzalez, I., The role of intramolecular hydrogen bonding in the electrochemical behavior of hydroxy-quinones and in semiquinone stability. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2005**, *16* (3A), 299-307.

GAO, Q.; Wang, F.; Guo, S.; Li, J.; Zhu, B.; Cheng, J.; Jin, Y.; Li, B.; Wang, H.; Shi, S.; Gao, Q.; Zhang, Z.; Cao, W.; Tian, Y., Sonodynamic effect of an anti-inflammatory agent - emodin on macrophages. *Ultrasound in Medicine and Biology* **2011**, *37* (9), 1478-1485.

GAO, Z. S.; Wasylshen, R. E.; Kwak, J. C. T., NMR-studies in surfactant and polymer-surfactant systems - micelle formation of sodium omega-phenyldecanoate and

interaction with poly(ethylene oxide). *Journal of Colloid and Interface Science* **1990**, *137* (1), 137-146.

GHOLIVAND, M. B.; Kashanian, S.; Peyman, H.; Roshanfekar, H., DNA-binding study of anthraquinone derivatives using Chemometrics methods. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46* (7), 2630-2638.

GONCALVES, R. S.; Abdelnur, P. V.; Santos, V. G.; Simas, R. C.; Eberlin, M. N.; Magalhaes, A.; Perez Gonzalez, E. R., Synthesis of potentially bioactive PABA-related N-(aminoalkyl)lactamic amino acids and esters via selective SNAr reactions. *Amino Acids* **2011**, *40* (1), 197-204.

HADJUR, C.; Richard, M. J.; Parat, M.; O.; Jardon, P.; Favier, A., Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *64*, 375-81.

HAWRYLAK, B. E.; Marangoni, D. G., A 2-D NMR investigation of the micellar solubilisation site in ionic micellar solutions. *Canadian Journal of Chemistry- Revue Canadienne De Chimie* **1999**, *77* (7), 1241-1244.

HERNANDEZ, F. J.; Hernandez, L. I.; Pinto, A.; Schaefer, T.; Ozalp, V. C., Targeting cancer cells with controlled release nanocapsules based on a single aptamer. *Chemical Communications* **2013**, *49* (13), 1285-1287.

HESTON, W. D. W.; Kadmon, D.; Covey, D. F.; Fair, W. R., Differential effect of alpha-difluoromethylornithine on the invivo uptake of C-14-labeled polyamines and methylglyoxal bis(guanylhydrazone) by a rat prostate-derived tumor. *Cancer Research* **1984**, *44* (3), 1034-1040.

- HIRSCHBERG, Y.; Lacassange, A. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **1950**, 231, 903.
- HIRSCHBERG, Y.; Lowenthal, E.; Bergamnn, E. D.; Pullmann, B. *Bulletin de la Société Chimique de France*, **1951**, 18, 88.
- HOET, P. H. M.; Nemery, B., Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **2000**, 278 (3), L417-L433.
- HOFFMANN, R.; Woodward, R. B., Selection rules for concerted cycloaddition reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, 87 (9), 2046-2048.
- HOFFMANN, R.; Woodward, R. B., The conservation of orbital symmetry. *Conservation of Orbital Symmet* **1968**, 1 (8), 17-22.
- HUANG, X.-z.; Wang, J.; Huang, C.; Chen, Y.-y.; Shi, G.-y.; Hu, Q.-s.; Yi, J., Emodin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in prostate cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* **2008**, 7 (3), 468-475.
- HUDLICKY M., Reduction in organic chemistry. 108. Washington, D.C.: American Chemistry Society, **1984**, p. 214.
- HUDSON, J. B.; Lopezbazzocchi, I.; Towers, G. H. N., ANTIVIRAL ACTIVITIES OF HYPERICIN. *Antiviral Research* **1991**, 15 (2), 101-112.
- JENDZELOVSKA, Z.; Jendzelovsky, R.; Hilovska, L.; Koval, J.; Mikes, J.; Fedorocko, P., Single pre-treatment with hypericin, a St. John's wort secondary metabolite, attenuates cisplatin- and mitoxantrone-induced cell death in A2780, A2780cis and HL-60 cells. *Toxicology in Vitro* **2014**, 28 (7), 1259-1273.

- KABANOV, A. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y., Pluronic (R) block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2002**, *82* (2-3), 189-212.
- KALUEFF, A. V.; Stewart, A. M.; Nguyen, M.; Song, C.; Gottesman, II, Targeting drug sensitivity predictors: New potential strategies to improve pharmacotherapy of human brain disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **2015**, *63*, 76-82.
- KASHEF, N.; Karami, S.; Djavid, G. E., Phototoxic effect of hypericin alone and in combination with acetylcysteine on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2015**, *12* (2), 186-192.
- KAWAI, K.; Kato, T.; Mori, H.; Kitamura, J.; Nozawa, Y., A comparative-study on cytotoxicities and biochemical-properties of anthraquinone mycotoxins emodin and skyrin from *penicillium-islandicum* sopp. *Toxicology Letters* **1984**, *20* (2), 155-160.
- KESSEL, D.; Oleinick, N. L., Photodynamic Therapy and Cell Death Pathways. *Photodynamic Therapy: Methods and Protocols* **2010**, pp. 35-46.
- KHIMANI, M.; Rao, U.; Bahadur, P.; Bahadur, P., Calorimetric and Scattering Studies on Micellization of Pluronic in Aqueous Solutions: Effect of the Size of Hydrophilic PEO End Blocks, Temperature, and Added Salt. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2014**, *35* (11), 1599-1610.
- KLEEMANN, B.; Loos, B.; Scriba, T. J.; Lang, D.; Davids, L. M., St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) Photomedicine: Hypericin-Photodynamic Therapy Induces Metastatic Melanoma Cell Death. *Plos One* **2014**, *9* (7).

- KORYTOWSKI, W.; Kalyanaraman, B.; Menon, I. A.; Sarna, T.; Sealy, R. C., Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochemica et Biophysica Acta* **1986**, 882, 145-153.
- KUBIN, A.; Loew, H. G.; Burner, U.; Jessner, G.; Kolbabeck, H.; Wierrani, F., How to make hypericin water-soluble. *Pharmazie* **2008**, 63 (4), 263-269.
- LACKNER, B.; Etlstorfer, C.; Falk, H., Synthesis and properties of 10,11-dibenzimidazolyl-10,11-didesmethyl-hypericin - The first heterocyclically substituted hypericin derivative. *Monatshefte Fur Chemie* **2004**, 135 (9), 1157-1166.
- LACKNER, B.; Popova, Y.; Etlstorfer, C.; Smelcerovic, A. A.; Klampfl, C. W.; Falk, H., Syntheses and properties of two heterocyclically substituted hypericin derivatives: 10,11-dibenzothiazolyl-10,11-didemethylhypericin and 10,11-dibenzoxazolyl-10,11-didemethylhypericin. *Monatshefte Fur Chemie* **2005**, 136 (5), 777-793.
- LEDWANI, L, Dave, H (2012). A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. *Indian. J. Nat. Prod.* 3:291-319.
- LEE, M. R. The history of Ephedra (ma-huang). *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh* 2011, 41 (1), 78-84.
- LEWIS, G.N.; Magel, T. T.; Lipkin, D., The absorption and re-emission of light by cis- and trans-stilbenes and the efficiency of their photochemical isomerization. *Journal of the American Chemical Society* **1940**, 62, 2973-2976.
- LI, J.; Cona, M. M.; Chen, F.; Feng, Y.; Zhou, L.; Yu, J.; Nuyts, J.; de Witte, P.; Zhang, J.; Himmelreich, U.; Verbruggen, A.; Ni, Y., Exploring Theranostic Potentials of

Radioiodinated Hypericin in Rodent Necrosis Models. *Theranostics* **2012**, *2* (10), 1010-1019.

LI, X.; Yu, Y.; Ji, Q.; Qiu, L. Y., Targeted delivery of anticancer drugs by aptamer AS1411 mediated Pluronic F127/cyclodextrin- linked polymer composite micelles. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2015**, *11* (1), 175-184.

LI, J. D.; Zhang, J.; Yang, S. W.; Jiang, C. H.; Zhang, D. J.; Jin, Q. M.; Wang, Q.; Wang, C.; Ni, Y. C.; Yin, Z. Q.; Song, S. L., Synthesis and Preclinical Evaluation of Radioiodinated Hypericin Dicarboxylic Acid as a Necrosis Avid Agent in Rat Models of Induced Hepatic, Muscular, and Myocardial Necroses. *Molecular Pharmaceutics* **2016**, *13* (1), 232-240.

LIMA, A. M.; Dal Pizzol, C.; Monteiro, F. B. F.; Creczynski-Pasa, T. B.; Andrade, G. P.; Ribeiro, A. O.; Perussi, J. R., Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **2013**, *125*, 146-154.

LIU, Z.; Wei, F.; Chen, L. J.; Xiong, H. R.; Liu, Y. Y.; Luo, F.; Hou, W.; Xiao, H.; Yang, Z. Q., In Vitro and in Vivo Studies of the Inhibitory Effects of Emodin Isolated from *Polygonum cuspidatum* on Coxsackievirus B-4. *Molecules* **2013**, *18* (10), 11842-11858.

LUI, P.; Cashin, R.; Machado, M.; Hemels, M.; Corey-Lisle, P. K., Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treatment Reviews* **2007**, *33*, 665-680.

LUND, H., The chemistry of hydroxyl group. *Interscience Publishers Inc.* New York, **1991**, p. 274.

- MA, X.; Yang, X.; Zeng, F.; Yang, L.; Yu, D.; Ni, H., Physcion, a natural anthraquinone derivative, enhances the gene expression of leaf-specific thionin of barley against *Blumeria graminis*. *Pest Management Science* **2010**, *66* (7), 718-724.
- MAGOULAS, G. E.; Kostopoulou, O. N.; Ganelis, T.; Athanassopoulos, C. M.; Kournoutou, G. G.; Leotsinidis, M.; Dinos, G. P.; Papaioannou, D.; Kalpaxis, D. L., Synthesis and antimicrobial activity of chloramphenicol-polyamine conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23* (13), 3163-3174.
- MALLORY, F. B.; Gordon, J. T.; Wood, C. S.; Lindquist, L. C.; Savitz, M. L., Photochemistry of stilbenes .1. *Journal of the American Chemical Society* **1962**, *84* (22), 4361-4362.
- MALLORY, F. B.; Wood, C. S.; Gordon, J. T., Photochemistry of stilbenes .3. some aspects of mechanism of photocyclization to phenanthrenes. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86* (15), 3094-3102.
- MAZUR Y.; Bock H.; Lavie D., Preparation of hypericin. CA 2 029 993. 15 nov. **1989**.
- McLACHLAN, A. A.; Marangoni, D. G., 1D and 2D NMR investigations of the interaction between oppositely charged polymers and surfactants. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **2010**, *88* (2), 124-134.
- MENDEZ-PEREZ, M.; Vaz, B.; Garcia-Rio, L.; Perez-Lorenzo, M., Polymeric premicelles as efficient lipophilic nanocarriers: Extending drug uptake to the submicellar regime. *Langmuir* **2013**, *29* (36), 11251-11259.
- MENEZES, P. F. C.; Bagnato, V. S.; Johnke, R. M.; Bonnerup, C.; Sibata, C. H.; Allison, R. R.; Perussi, J. R., Photodynamic therapy for Photogem (R) and

Photofrin (R) using different light wavelengths in 375 human melanoma cells. *Laser Physics Letters* **2007**, 4 (7), 546-551.

MESSAOUD, T.; Duplatre, T.; Waton, G.; Michels, B., Behaviour of Pluronic (R) P84 block copolymer micelles above the gelification temperature as probed by positron annihilation lifetime spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, 7 (22), 3839-3844.

MEYER, H.; Bondy, R.; Eckert, A., Uber die vermeintliche darstellung des bianthrone durch padova. *Uber ZweikerneHinode der AnthracHinode* **1912**, 3, 1447-1468.

MEYER, K. H., Anthrone. *Organic Syntheses* **1928**, 8, 8.

MINCHIN, R. F.; Martin, R. L.; Ilett, K. F., Paraquat is not accumulated in B-16 tumor-cells by the polyamine transport-system. *Life Sciences* **1989**, 45 (1), 63-69.

MOHAN, P.; Rapoport, N., Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking. *Molecular Pharmaceutics* **2010**, 7 (6), 1959-1973.

MOTOYOSHIYA, J.; Masue, Y.; Nishi, Y.; Aoyama, H., Synthesis of hypericin via emodin anthrone derived from a two-fold diels-alder reaction of 1,4-benzoquinone. *Natural Product Communications* **2007**, 2 (1), 67-70.

MAHMUD, A.; Xiong, X.-B.; Aliabadi, H. M.; Lavasanifar, A., Polymeric micelles for drug targeting. *Journal of Drug Targeting* **2007**, 15 (9), 553-584.

- MUKHERJEE, S.; Dasgupta, K. K., PHARMACOPOEIAL KAOLIN. *Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1946**, *19* (1), 21-27.
- MUTH, A.; Madan, M.; Archer, J. J.; Ocampo, N.; Rodriguez, L.; Phanstiel, O., Polyamine Transport Inhibitors: Design, Synthesis, and Combination Therapies with Difluoromethylornithine. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (2), 348-363.
- NYSTROM, R. F.; Brown, W. G., Reduction of organic compounds by lithium aluminum hydride .3. halides, quinones, miscellaneous nitrogen compounds. *Journal of the American Chemical Society* **1948**, *70* (11), 3738-3740.
- OELSCHLAGER, H., 3-Alkyl-6-halogen-aniline aus para-halogenierten fettaromatischen ketonen. *Annalen Der Chemie-Justus Liebig* **1961**, *641* (1-3), 81-94.
- OLSEN, B. B.; Bjorling-Poulsen, M.; Guerra, B., Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: A study on its mechanism of action. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2007**, *39* (1), 227-237.
- PARKER, C. O.; Spoerri, P. E., Photochemical conversion of stilbene to phenanthrene. *Nature* **1950**, *166* (4223), 603-603.
- PENJWEINI, R.; Smisdom, N.; Deville, S.; Ameloot, M., Transport and accumulation of PVP-Hypericin in cancer and normal cells characterized by image correlation spectroscopy techniques. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **2014**, *1843* (5), 855-865.

- PIERI, C.; Borselli, D.; Di Giorgio, C.; De Meo, M.; Bolla, J.-M.; Vidal, N.; Combes, S.; Brunel, J. M., New Ianthelliformisamine Derivatives as Antibiotic Enhancers against Resistant Gram-Negative Bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (10), 4263-4272.
- PIETRZAK, M.; Maciejczyk, M.; Szabelski, M.; Kasperek, A.; Wieczorek, Z., Self-association of hypericin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulations. *Chemical Physics Letters* **2014**, *601*, 39-44.
- PITTO-Barry, A.; Barry, N. P. E., Pluronic (R) block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry* **2014**, *5* (10), 3291-3297.
- PRHASHANNA, A.; Khan, S. A.; Chen, S. B., Co-Micellization Behavior in Poloxamers: Dissipative Particle Dynamics Study. *Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119* (2), 572-582.
- RENAUD, R. N.; Stephens, C. L., Synthesis of substituted 9,10-dihydroanthracenes by the reduction of anthraquinones in hydriodic acid. *Canadian Journal of Chemistry* **1974**, *52*, 1229-1230.
- RICHTER, V. V., The chemistry of carbon compounds. Vol. 3. Elsevier Publishing Co., Inc., New York, N.Y. 1946, R. SCHOLL. *Monatsh.* *39*, 231, **1918**, p. 655-656.
- RINEHART, C. A.; Chen, K. Y., Characterization of the polyamine transport-system in mouse neuro-blastoma cells - effects of sodium and system a amino-acids. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259* (8), 4750-4756.

- RODEWALD, G.; Arnold, R.; Griesler, J.; Steglich, W., Synthesis of hypericin and related meso-naphthodianthrones by alkaline dimerization of hydroxyanthraquinones. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1976**, *16* (1), 46-47.
- SAHA, K.; Lam, K. W.; Abas, F.; Hamzah, A. S.; Stanslas, J.; Hui, L. S.; Lajis, N. H., Synthesis of damnacanthal, a naturally occurring 9,10-anthraquinone and its analogues, and its biological evaluation against five cancer cell lines. *Medicinal Chemistry Research* **2013**, *22* (5), 2093-2104.
- SALAMA, A. H.; Shamma, R. N., Tri/tetra-block co-polymeric nanocarriers as a potential ocular delivery system of lornoxicam: in-vitro characterization, and in-vivo estimation of corneal permeation. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *492* (1-2), 28-39.
- SARNA, T, Menon, I.; A.; Sealy, R.; C. Photosensitization of melanin: a comparative study. *Photochemistry and Photobiology* **1985**, *42*, 529-532.
- SAW, C. L. L.; Heng, P. W. S.; Chin, W. W. L.; Soo, K. C.; Olivo, M., Enhanced photodynamic activity of hypericin by penetration enhancer N-methyl pyrrolidone formulations in the chick chorioallantoic membrane model. *Cancer Letters* **2006**, *238* (1), 104-110.
- SAW, C. L. L.; Olivo, M.; Wohland, T.; Fu, C. Y.; Kho, K. W.; Soo, K. C.; Heng, P. W. S., Effects of N-methyl pyrrolidone on the uptake of hypericin in human bladder carcinoma and co-staining with DAPI investigated by confocal microscopy. *Technology in Cancer Research & Treatment* **2007**, *6* (5), 383-394.

- SEALY, R.; C.; Sarna, T.; Wanner.; E. J.; Reszka, K. Photosensitization of melanin: an electron spin resonance study of sensitized radical production and oxygen consumption. *Photochemistry and Photobiology* **1984**, *40*,453-459.
- SERRA, F.; Terentjev, E. M., Nonlinear dynamics of absorption and photobleaching of dyes. *Journal of Chemical Physics* **2008**, *128* (22), 6.
- SEYDLER, A. C. *Analecta pharmacognostica*. Grunert, **1815**. p. 32.
- SHORTT, J.; Hsu, A. K.; Martin, B. P.; Doggett, K.; Matthews, G. M.; Doyle, M. A.; Ellul, J.; Jockel, T. E.; Andrews, D. M.; Hogg, S. J.; Reitsma, A.; Faulkner, D.; Bergsagel, P. L.; Chesi, M.; Heath, J. K.; Denny, W. A.; Thompson, P. E.; Neeson, P. J.; Ritchie, D. S.; McArthur, G. A.; Johnstone, R. W., The drug vehicle and Solvent N-methylpyrrolidone is an immunomodulator and antimyeloma compound. *Cell Reports* **2014**, *7* (4), 1009-1019.
- SHOU-ZHOUNG, Yang. *The divine farmer's materia medica*. Primeira edição. Boulder, CO 80301: Blue poppy press, **1998**. p. 205.
- SINGH, R.; Tonnesen, H. H.; Kristensen, S.; Berg, K., The influence of Pluronics on dark cytotoxicity, photocytotoxicity, localization and uptake of curcumin in cancer cells: studies of curcumin and curcuminoids XLIX. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2013**, *12* (3), 559-575.
- SMAKULA, A., THE PHOTOCHEMICAL TRANSFORMATION OF TRANS-STILBENE. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie B*, **1934**, *25*, 90-98.
- SOBCZYNSKI, J.; Kristensen, S.; Berg, K., The influence of Pluronics nanovehicles on dark cytotoxicity, photocytotoxicity and localization of four model

photosensitizers in cancer cells. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2014**, *13* (1), 8-22.

SODA, K., The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2011**, *30*.

STEGLICH, W.; Arnold, R., Alkaline condensation of emodin to isohypericin - simple synthesis of meso-naphthodianthrone (phenanthro [1,10,9,8-opra]perylene) system. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1973**, *12* (1), 79-79.
targeted therapy. *Nature* **2007**, *445*, 851-857.

TEASDALE, I.; Waser, M.; Wilfert, S.; Falk, H.; Brueggemann, O., Photoreactive, water-soluble conjugates of hypericin with polyphosphazenes. *Monatshefte Fur Chemie* **2012**, *143* (3), 355-360.

TOBIA, A. J.; Cabana, B. E.; Vadlapatla, V.; Connolly, R. H., Methods for preparing hypericin. US20120245392A1. 27 sep. **2012**.

TOBIA, A. J.; Cabana, B. E.; Vadlapatla, V.; Connolly, R. H., Methods for preparing hypericin. US20120245392A1. 27 sep. **2012**.

TYMAN, J. H. P., Reduction of aromatic carbonyl compounds with nickel/aluminium alloy. *Journal of Applied Chemistry* **1970**, *20* (6), 179-182.

UTKINA, N. K.; Maksimov, O. B., Anthraquinone pigments of the starfish *Echinaster echinophorus*. IV *Plenum Publishing Corporation* **1978**, *77*, 528-531.

UZDENSKY, A. B.; Iani, V.; Ma, L. W.; Moan, J., Photobleaching of hypericin bound to human serum albumin, cultured adenocarcinoma cells and nude mice skin. *Photochemistry and Photobiology* **2002**, *76* (3), 320-328.

- VANDEPITTE, J.; Roelants, M.; Van Cleynenbreugel, B.; Hettinger, K.; Lerut, E.; Van Poppel, H.; de Witte, P. A. M., Biodistribution and photodynamic effects of polyvinylpyrrolidone-hypericin using multicellular spheroids composed of normal human urothelial and T24 transitional cell carcinoma cells. *Journal of Biomedical Optics* **2011**, *16* (1).
- VYNNYCKY, E.; Fine, P. E. M., The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiology and Infection* **1997**, *119* (2), 183-201.
- WANG, K.; Fan, D. Q.; Liu, Y. Q.; Wang, E. K., Highly sensitive and specific colorimetric detection of cancer cells via dual-aptamer target binding strategy. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *73*, 1-6.
- WANG, W.; Liu, Z. M.; Sun, P.; Fang, C.; Fang, H. W.; Wang, Y. M.; Ji, J. J.; Chen, J., RGD Peptides-Conjugated Pluronic Triblock Copolymers Encapsulated with AP-2 alpha Expression Plasmid for Targeting Gastric Cancer Therapy in Vitro and in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (7), 16263-16274.
- WASER, M.; Popova, Y.; Etzlstorfer, C.; Huber, W. F.; Falk, H., Syntheses, photochemical properties, and tautomerism of intramolecularly Friedel-Crafts acylated hypericin derivatives. *Monatshefte Fur Chemie* **2005**, *136* (7), 1221-1231.
- WENNERSTROM, H.; Lindman, B., Micelles-physical-chemistry of surfactant association. *Physics Reports-Review Section of Physics Letters* **1979**, *52* (1), 1-86.
- WHO (2014) Skin cancers. World Heal Organ. Available: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>.

- WOOD, C. S.; Mallory, F. B., Photochemistry of stilbenes .4. preparation of substituted phenanthrenes. *Journal of Organic Chemistry* **1964**, 29 (11), 3373-3377.
- WOODWARD, R. B.; Hoffmann, R., Selection rules for sigmatropic reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, 87 (11), 2511-2513.
- WOODWARD, R. B.; Hoffmann, R., Stereochemistry of electrocyclic reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, 87 (2), 395-397.
- WOODWARD, R. B.; Hoffmann, R., The conservation of orbital symmetry. *Angewandte Chemie International Edition* **1969**, 8 (11), 781-853
- ACAR, M.; Ocak, Z.; Erdogan, K.; Cetin, E. N.; Hatipoglu, O. F.; Uyeturk, U.; Gunduz, E.; Gundue, M., The effects of hypericin on ADAMTS and p53 gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Buon* **2014**, 19 (3), 627-632.
- XING, W. K.; Ogata, Y., Steric acceleration by ortho substituents of the stannous chloride reduction of nitrobenzenes in aqueous ethanol. *Journal of Organic Chemistry* **1982**, 47 (18), 3577-3581.
- XU, Y. X.; Wang, D. X.; Zhuang, Z. Z.; Jin, K. K.; Zheng, L. Z.; Yang, Q.; Guo, K. Y., Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis in K562 human leukemia cells through JNK pathway modulation. *Molecular Medicine Reports* **2015**, 12 (5), 6475-6482.
- YEAP, S.; Akhtar, M. N.; Lim, K. L.; Abu, N.; Ho, W. Y.; Zareen, S.; Roohani, K.; Ky, H.; Tan, S. W.; Lajis, N.; Alitheen, N. B., Synthesis of an anthraquinone derivative (DHAQC) and its effect on induction of G2/M arrest and apoptosis in breast cancer MCF-7 cell line. *Drug Design Development and Therapy* **2015**, 9, 983-992.

- YIU, C. Y.; Chen, S. Y.; Yang, T. H.; Chang, C. J.; Yeh, D. B.; Chen, Y. J.; Lin, T. P., Inhibition of epstein-barr virus lytic cycle by an ethyl acetate subfraction separated from Polygonum cuspidatum root and its major component, Emodin. *Molecules* **2014**, *19* (1), 1258-1272.
- ZALI, H.; Zamanian-Azodi, M.; Tavirani, M. R.; Baghban, A. A. Z., Protein Drug Targets of Lavandula angustifolia on treatment of Rat Alzheimer's Disease. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **2015**, *14* (1), 291-302.
- ZHANG, X. C.; Jackson, J. K.; Burt, H. M., Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, *132* (1-2), 195-206.
- ZHANG, J.; Shao, L.; Wu, C.; Lu, H.; Xu, R., Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis of myeloma SP2/0 cells depended on caspase activity in vitro (Retraction of vol 15, 58, 2014). *Cancer Cell International* **2015**, *15*.
- ZHANG, Y. Y.; Liu, B.; Ge, X. P.; Liu, W. B.; Xie, J.; Ren, M. C.; Chen, R. L.; Zhou, Q. L.; Pan, L. K., Comparative Study of antibacterial properties of emodin and enrofloxacin against aeromonas hydrophila. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **2014**, *66*, 1-10.

