



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

ESTUDOS DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FOTODINÂMICAS DOS DERIVADOS DA CLOROFILA *a* E LAPACHOL EM SISTEMAS HOMOGÊNEOS E INCORPORADOS, NA FORMA MISTA, NOS COPOLÍMEROS MICELARES PLURONICS® P-123 e F-127



Centro de  
Ciências Exatas



Dissertação apresentada por *Katieli da Silva Souza Campanholi* ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

MARINGÁ, Abril/2014.



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

**ESTUDOS DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FOTODINÂMICAS**  
**DOS DERIVADOS DA CLOROFILA *a* E LAPACHOL EM SISTEMAS HOMOGÊNEOS E**  
**INCORPORADOS, NA FORMA MISTA, NOS COPOLÍMEROS MICELARES PLURONICS® P-123 e**  
**F-127.**

**Mestranda: Katieli da Silva Souza Campanholi**

**Orientador: Prof. Dr. Wilker Caetano**

**Maringá, Abril/2014.**

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me concedeu sabedoria para completar essa complexa etapa da minha formação. Aos meus pais Paulo e Ana, pelo amor incondicional, pela paciência, pelas palavras de incentivo e pelo apoio durante minha trajetória acadêmica. Ao meu namorado, noivo e esposo Rafael, pelo amor, carinho e por acreditar na minha capacidade nos momentos em que me faltavam forças.*

---

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, que me permitiu, no meio do mestrado, mudar a área de atuação e me encontrar profissionalmente.

Ao meu orientador Wilker Caetano por acreditar no meu trabalho e depositar em mim a confiança em meu momento de maior fragilidade. Agradeço imensamente pela amizade, paciência, carinho, amparo e por todos os ensinamentos científicos.

Agradeço ao professor Hioka pelo voto de confiança quando mais precisei, pelas conversas, conselhos e ajuda na pesquisa.

À Adriana Gerola Passarella (Driquinha) por me adotar na pesquisa e por me passar valores, os quais quero levar comigo o resto da vida. Agradeço também pelas palavras de apoio, pelos gestos de carinho, otimismo e por acreditar no meu trabalho.

Ao Bruno Vilsinski e Manu Panice, por toda força profissional e pessoal durante todo mestrado. Agradeço em especial pela alegria, pelas brincadeiras, pelo apoio e otimismo.

Ao meu amigo Gustavo Braga, que além da força serviu como um referencial na minha pesquisa. Sem seu apoio, certamente, eu não teria finalizado este trabalho.

À minhas amigas Évelin e Flávia por toda força na parte experimental e pessoal.

À meus amigos Camila Fabiano de Freitas e Douglas Vanzin, pelo carinho, companheirismo e amizade durante toda trajetória acadêmica.

Aos meus amigos do grupo Nupesf de uma forma geral pelo apoio, carinho, auxílio e compreensão durante todo tempo. Cada integrante do grupo teve sua parcela e contribuiu de alguma forma, seja no incentivo, na confiança, amizade e prazer de saber que somos um grupo e que podemos contar um com o outro sempre.

## Sumário

<b>Capítulo 1.....</b>	<b>1</b>
<b>1.Introdução Geral.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.Revisão da literatura .....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Processos Fotofísicos e Fotoquímicos .....	5
1.2.2. Terapia Fotodinâmica .....	12
1.2.3. Derivados da Clorofila como Fotosensibilizadores para TFD .....	17
1.2.4. Terapia de combinação de drogas.....	22
1.2.5. Naftoquinonas.....	26
1.2.6. Sistemas de formulação .....	31
<b>1.3. Objetivos.....</b>	<b>38</b>
<b>1.4.Metodologias de Análises Físico-Químicas .....</b>	<b>40</b>
1.4.1. Materiais .....	40
1.5. Métodos .....	41
1.5.1. Determinação da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) do lapachol e da $\beta$ -lapachona em etanol, diclorometano e octanol.....	41
1.5.2. Comportamento espectroscópico do lapachol e da $\beta$ -lapachona em meio homogêneo monofásico constituído de mistura água/ etanol.....	42
1.5.3. Determinação do pKa do lapachol em mistura de solventes água/etanol.....	42
1.5.4. Determinação do coeficiente de partição ( $K_p$ ) água/octanol para as naftoquinonas .....	43
1.5.5. Determinação do pKa do lapachol em micelas poliméricas de P-123 e F-127 .....	44
1.5.6. Estudo da interação das naftoquinonas com F-127 e P-123: análise da isoterma de Ligação ( $K_b$ ) .....	45
1.5.7. Formulação das naftoquinonas incorporadas em nanoesferas de Poloxâmeros® .....	46
1.5.8. Estabilidade temporal e influência do efeito térmico na organização estrutural das naftoquinonas incorporadas em P-123 e F-127. ....	47
1.5.9. Formulação da naftoquinona simultâneo ao FS nos copolímeros micelares P-123 e F-127 pelo método de dispersão sólida .....	48

---

1.6.0. Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) das Clorofilas em etanol (contendo as naftoquinonas) e no formulado misto .....	49
1.6.1. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta^1O_2}$ ) das Clorofilas em etanol, na presença de naftoquinonas. ....	50
1.6.2. Estabilidade temporal e influência do efeito térmico nos formulados multi-componentes (naftoquinona/fotossensibilizador) incorporados nos biotransportadores copolímeros P-123 e F-127.....	53

**Capítulo 2..... 54**

2. Caracterização Físico-Química das naftoquinonas em meio homogêneo e micro-heterogêneo ..  
.....54

2.1. Determinação da Absortividade molar ( $\epsilon$ ) do lapachol e da  $\beta$ -lapachona em Etanol, Diclorometano e Octanol .....

2.1.1. Efeito da mistura de solventes água/etanol nos processos agregacionais das naftoquinonas...59

2.1.2. Determinação do pKa do lapachol em mistura binária homogênea constituída de água/etanol..... 68

2.1.3. Determinação do coeficiente de partição água/octanol .....

2.1.4. Determinação do pKa do lapachol nos copolímeros P-123 e F-127. ....75

2.1.5. Avaliação da Interação das naftoquinonas com sistemas micelares copolímeros em água pura (pH 5,0): análise das isotermas de associação naftoquinona/poloxâmoro..... 83

2.1.6. Avaliação da Interação das naftoquinonas com sistemas micelares copolímeros em pH ácido e básico.....96

2.1.7. Formulação do lapachol e  $\beta$ -lapachona nos copolímeros P-123 e F-127. ....108

2.1.8. Estudo do efeito da temperatura nas propriedades espectrais das naftoquinonas incorporadas em micelas copolímeras .....

2.1.9. Estudo da Estabilidade das naftoquinonas formuladas em F-127 e P-123.....120

**Capítulo 3..... 124**

3. Caracterização Físico-química do formulado contendo os derivados da clorofila fotossensibilizadores (Pheid e Zn-Chld) com as naftoquinonas lapachol e  $\beta$ -lapachona. ....124

3.1. Formulação nos copolímeros micelares P-123 e F-127 pelo método de dispersão sólida .....125

3.1.1. Estabilidade dos formulados mistos durante processo liofilização/reidratação: estudos espectroscópicos .....

3.2. Estudos das propriedades fotofísicas dos derivados da clorofila na presença de naftoquinonas: Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) e de oxigênio singlete ( $\Phi^1O_2$ ). .... 132

3.2.1.	Rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) do Pheid e Zn-Chld em meio homogêneo, na presença de naftoquinonas, e no formulado misto antes e após a liofilização.....	132
3.2.2.	Determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto ( $\Phi_\Delta$ ) dos derivados da clorofila em presença das naftoquinonas em etanol.....	137
3.2.3.	Influência da temperatura na auto-agregação do Formulado Misto incorporado em F-127 e P-123.....	148
3.2.4.	Estabilidade do Formulado Misto incorporado em F-127 e P-123 com o tempo.....	151
<b>4.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>154</b>
<b>5.</b>	<b>Referências .....</b>	<b>159</b>

---

## Resumo

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica centrada na interação entre um composto fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz com comprimento de onda adequado gerando, por transferência de energia, o oxigênio singleto ou espécies reativas de oxigênio (EROS). Os derivados da clorofila *a*, feoforbídeo (Pheid) e clorofilida de zinco (Zn-Chld), são considerados bons FS's para a TFD, sobretudo quando formulados em sistemas solubilizadores biotransportadores, responsáveis por estabilizar seu estado monomérico essencial para a aplicação fotodinâmica.

Mesmo oferecendo eficácia considerável, as terapias centradas em um único agente podem ser aprimoradas com a utilização de um fármaco adjuvante, que poderá agir sinergicamente elevando o grau de morte celular. Nesse quesito, os fotossensibilizadores Pheid e Zn-Chld foram avaliados em sistemas combinados com os fármacos lapachol e  $\beta$ -lapachona (naftoquinonas), cuja atividade não depende da luz.

Em suma, verificou-se um comportamento anfifílico para as naftoquinonas, com boa solubilidade em meios de menor polaridade, auto-agregação em meio aquoso e efeitos de solvatação preferencial em proporções próximas a 50% (V/V) de água/etanol. Os estudos de pKa do lapachol em meio homogêneo (50% água/etanol) e incorporado nos sistemas micelares P-123 e F-127 atestaram valores próximos ao pH fisiológico. Os estudos de interação das formas protolíticas, na forma individual (ligação em pH 4,5 para a forma neutra e pH 8,0 para o lapachonato) e combinadas (mistura de espécies em água pura com pH 5) com os sistemas micelares revelaram maior interação entre a espécie neutra do lapachol com os sistemas micelares. Além disso, as avaliações de ligação no tempo inicial e após o equilíbrio, para a mistura de espécies (em água pura com pH 5), apontaram a existência de uma dependência temporal na estabilidade das naftoquinonas.

O processo de formulação das naftoquinonas foi satisfatório, seja na forma individual ou combinada com os fotossensibilizadores Pheid e Zn-Chld que, por sua vez, mantiveram-se monomerizados na composição do formulado misto. A estabilidade térmica e temporal dos formulados

---



mistos atestaram que as espécies, naftoquinonas e fotossensibilizadores, na maior parte dos casos mantem o comportamento intrínseco da forma individual.

A caracterização das propriedades fotofísicas dos sistemas combinados expressou uma redução significativa no rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) para os sistemas obtidos a partir da  $\beta$ -lapachona. Em adição, as avaliações vinculadas ao rendimento quântico de oxigênio singleto ( $\Phi_{\Delta}^1O_2$ ) demonstraram valores elevados para os formulados obtidos a partir da Zn-Chld, o que pode estar associado a erros vinculados à inespecificidade do ácido úrico ou ainda a complexação do metal do FS com a naftoquinona (agente quelante).

**Palavras chave:** feoforbídeo, clorofilida de zinco, naftoquinonas, pluronics, formulado multi-componentes.

---

## **Abstract**

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality focused on the interaction involving a photosensitizing compound (PS), molecular oxygen and light with a suitable wavelength, generating singlet oxygen or reactive oxygen species (ROS) that causes apoptosis or necrosis of cells. The derivatives of chlorophyll *a*, pheophorbide (Pheid) and zinc chlorophyllide (Zn-Chld), are considered good PS for PDT, especially when formulated in biocarriers solubilizing systems, that are responsible for stabilizing the PS in monomeric state suitable to Photodynamic Therapy.

Although offering significant efficacy in therapies that focus on a single agent can be enhanced with the use of an adjuvant drug that may act synergistically, increasing the degree of cell death. In this aspect, the Pheid and Zn-Chld photosensitizers were evaluated in combination with drugs lapachol and  $\beta$ -lapachone (naphthoquinones), whose activity does not depend of light systems.

In short, there was an amphiphilic behavior for naphthoquinones, with good solubility in less polar media. In aqueous media the naphthoquinones suffer self aggregation mainly in proportions close to 50% water/ethanol (V/V). Studies of Lapachol's pKa in homogeneous media constituted of 50% water/ethanol and added to micellar systems P-123 and F-127 attested pKa values close to physiological pH. Interaction studies of protolytic forms in individual form (link at pH 4.5 for neutral and pH 8.0 for lapachonato) and combined (mixed species at pH 5) with micellar systems revealed greater interaction between lapachol neutral species with micellar systems. Moreover, the evaluations of the initial bond and after equilibration time for the blend of Species (pH 5), showed the existence of a time-dependent stability of naphthoquinones

The process of formulation of naphthoquinone incorporated in P-123 and F-127 was satisfactory, either individually or in combination with Pheid and Zn-Chld photosensitizers, which in turn remained monomerized in the composition of the formulated mixture. The thermal and temporal

---

stability of mixed formulated showed that these species, photosensitizers and naphthoquinones, in most cases hold the intrinsic behavior of the individual form.

The characterization of the photophysical properties of the combined systems expressed a significant reduction in fluorescence quantum yield ( $\Phi_F$ ) for systems obtained from the  $\beta$ -lapachone . In addition, evaluations linked to quantum yield of singlet oxygen ( $\Phi_{\Delta}^1O_2$ ) demonstrated high values for formulated obtained from Zn-Chld, which may be associated with errors linked to the specificity of uric acid or complexation of the PS metal with the naphthoquinone (chelating agent).

**Keywords:** pheophorbide, zinc chlorophyllide, naphthoquinones, pluronics and formulated multi-components.

---

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação Esquemática de um Diagrama de Jablonski.....	6
<b>Figura 2.</b> Representação dos processos de absorção e posterior decaimento radiativo/ não radiativo nas curvas de potencial em função da distância internuclear (R) para dois estados eletrônicos, sendo 1-absorção, 2-conversão interna, 3-fluorescência. As linhas pontilhadas representam as transições eletrônicas refletidas nos espectros de absorção e emissão de fluorescência. Modificado de Lakowicz, 2006.....	7
<b>Figura 3.</b> Paciente com leucoplasia na região bucal, sendo (a) antes do tratamento com ALA e (b) após o tratamento com ALA (Kübler, 2005).....	14
<b>Figura 4.</b> Vista colangioscópica sendo (a) massa polipóide intraductal e (b) vista colangioscópica com o sistema de iluminação ativado (Choi et al., 2011).....	15
<b>Figura 5.</b> Paciente com diagnóstico de sarcoma de Kaposi sendo (A) antes e (B) após tratamento fotodinâmico com solução de azul de metileno (2% m/V) e azul de toluidina (2% m/V) durante duas semanas (Tardivo & Giglio, 2005). .....	16
<b>Figura 6.</b> Estrutura molecular da clorofila e seus derivados.....	18
<b>Figura 7.</b> Respresentação da micela copolimérica (PEG-b-PLA) proposta por Shin, H. et al (2009)....	25
<b>Figura 8.</b> Estrutura química das quinonas.....	27
<b>Figura 9.</b> Medicamentos ricos em lapachol comercializados em diversas localidades, entre elas (a) California, Nebraska e Iowa, (b) desenvolvido por convênio firmado entre Brasil e Universidade de Teykio (Japão) conveniada a Empresa Tradepia Corporation, (c) Estados Unidos, Bélgica, Bulgária, Colômbia, Croácia, França, Alemanha, Israel, Itália, Coreia, Peru, Portugal, Venezuela, Kuwait, entre outros, (d) Estados Unidos, (e) Portugal e (f) Espanha.....	30
<b>Figura 10.</b> Aplicação de HPMA-ZnPP e ZnPP (meio homogêneo) em ratos, utilizando endoscopia com lâmpada de Xenon. Adaptado de Nakamura, H. et al (2012). .....	33

---

- Figura 11.** Efeitos do Pluronic em células RMD, com sinalização das etapas de dano. Adaptado de Batrakova, E. V. *et al* (2008). .....35
- Figura 12.** Representação esquemática dos copolímeros micelares sendo (a) constituição da micela polimérica formada pelos surfactantes pluronicos® e (b) estrutura dos poloxâmeros P-123 e F-127. ....36
- Figura 13.** Sistema utilizado nos experimentos de determinação da atividade fotodinâmica química, com ácido úrico, para as misturas FS/naftoquinona em etanol, sendo (a) fonte de alimentação LASERline, (b) fonte de emissão LASERline iZi, (c) detector e (d) fenda. ....51
- Figura 14.** Caracterização espectroscópica das naftoquinonas sendo (a) absorção eletrônica do lapachol ( $4,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) Emissão de fluorescência do lapachol ( $4,2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>,  $\lambda_{exc} = 235$  nm, fenda 10/10 nm), (c) absorção eletrônica da  $\beta$ -Lapachona ( $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e (d) emissão de fluorescência da  $\beta$ -Lapachona ( $3,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>,  $\lambda_{exc} = 230$  nm, fenda 10/10 nm), em etanol e água destilada pura (pH 5,0), a 30,0 °C. O inserte 14-d corresponde a ampliação do espectro de emissão da  $\beta$ -Lapachona em meio aquoso. ....56
- Figura 15.** Espectros de (a) Absorção eletrônica ( $4,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) máximo de absorção, (c) emissão de fluorescência ( $5,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>,  $\lambda_{exc} = 225$  nm, fenda 10/10 nm) e (d) máximo da intensidade de emissão (I. E.) do lapachol em mistura água/etanol (V/V), a 30,0 °C, sendo -- 0%, -- 10%, --20%, --30%, --40%, --50%, --60%, --80%, --100% de água. As setas indicam a direção da variação espectral com o aumento do teor de água no sistema. ....60
- Figura 16.** Razão entre os máximos de absorção do lapachol (Abs279 nm /Abs250 nm) com a proporção de água e etanol (V/V) a 30,0 °C. ....64
- Figura 17.** Espectros da  $\beta$ -lapachona sendo (a) Absorção eletrônica Uv-Vis ( $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) máximo de absorção em 255 nm, (c) Emissão de fluorescência ( $5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>,  $\lambda_{exc} = 220$  nm, fenda 10/10 nm) e (d) máximo de emissão em 333 nm a 30,0 °C, sendo -- 0%, -- 10%, --20%, --30%, --40%, --50%, -- 60%, --70%, --80%, --90%, --100% de água. As setas indicam a direção da variação espectral. ....65
-

**Figura 18.** Espectro de absorção eletrônica do lapachol em soluções compostas por mistura de solventes água/etanol 50:50 (V/V) em pHs variando entre 2,5 e 10,3 a 30,0 °C. As setas indicam a direção da variação espectral com o aumento do pH.....71

**Figura 19.** Curvas sigmoidais obtidas pelo método de análise univariado para o lapachol em mistura 50:50 (V/V) água/etanol, sendo (a) em 250 e (b) 275 nm. ....72

**Figura 20.** Curvas sigmoidais da concentração relativa em função do pH para o lapachol, obtido pelo método quimiométrico multivariado.....72

**Figura 21.** Espectro das espécies protolíticas puras estimados pelo método da Matriz-K. ....73

**Figura 22.** Espectro de absorção eletrônica do lapachol em F-127 (2% m/V;  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em pHs variando de 3,5 e 8,0 a 30,0 °C. As setas indicam a direção da variação espectral com o aumento do pH.....77

**Figura 23.** Curvas sigmoidais para o lapachol em diferentes pHs, sendo (a) e (b) aplicação do método univariado para o lapachol formulado em P-123 (2% m/V;  $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), (c) e (d) aplicação do método univariado para o lapachol formulado em F-127 (2% m/V;  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), nos máximos de 250 e 274 nm, respectivamente.....78

**Figura 24.** Curvas sigmoidais de concentração relativa em função do pH para o lapachol obtidas pelo método quimiométrico multivariado, sendo (a) em P-123 (2% m/V;  $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) e (b) em F-127 (2% m/V;  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). ....79

**Figura 25.** Efeito da concentração de íons hidrônio  $[\text{H}^+]$  sobre o equilíbrio de dissociação do lapachol. ....81

**Figura 26.** Lapachol ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em concentrações variadas de P-123, sendo (a) espectros de emissão de fluorescência no  $T_0$ , (b) espectros de emissão de fluorescência no  $T_{\text{eq}}$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (c) isotermas de ligação no  $T_0$  e  $T_{\text{eq}}$  obtidas a 30,0 °C e em água destilada com pH 5. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.....85

---

**Figura 27.** Lapachol ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em concentrações variadas de F-127, sendo (a) espectros de emissão de fluorescência no  $T_0$ , (b) espectros de emissão de fluorescência no  $T_{eq}$  ( $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (c) isotermas de ligação no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , obtidas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e em água destilada com pH 5. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.....87

**Figura 28.**  $\beta$ -Lapachona ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em concentrações variadas do copolímero P-123, sendo (a) espectros de emissão de fluorescência no  $T_0$ , (b) espectros de emissão de fluorescência no  $T_{eq}$  ( $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (c) isotermas de ligação no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , obtidas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e em água destilada com pH 5. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero. ....89

**Figura 29.**  $\beta$ -Lapachona ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em concentrações variadas do copolímero F-127, sendo (a) espectros de emissão de fluorescência no  $T_0$ , (b) espectros de emissão de fluorescência no  $T_{eq}$  ( $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (c) isotermas de ligação no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , obtidas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e em água destilada com pH 5. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição do copolímero. ....90

**Figura 30.** Estudos de ligação clorofila/copolímero desenvolvidos por Gerola *et al* (2011) e Gerola (2013) sendo, (a) espectros de emissão de fluorescência do Pheid ( $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) com a adição de alíquotas de P-123 2% (m/V), (b)  $\lambda_{max}$  610 nm do Pheid em P-123, (c) espectros de emissão de fluorescência do Pheid ( $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) com a adição de F-127 2% (m/V) e (d)  $\lambda_{max}$  610 nm do Pheid em F-127. Dados extraídos de Gerola, 2010.....95

**Figura 31.** Representação esquemática, extraída de Yang, B. *et al* (2006), com modificações, sobre o efeito da adição de ácido na agregação e constituição das micelas de P123. ....101

**Figura 32.** Espectros de emissão de fluorescência obtidos a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  (a) (c) e isoterma de ligação (b) (d) obtidos a partir da titulação do lapachol com copolímero P-123 nos pHs 4,5 e 8,0, respectivamente. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.....103

**Figura 33.** Espectros de emissão de fluorescência obtidos a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  (a) (c) e isoterma de ligação (b) (d) obtidos a partir da titulação do lapachol com copolímero F-127 nos pHs 4,5 e 8,0, respectivamente. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.....105

**Figura 34.** Espectros de absorção e emissão das naftoquinonas em etanol e nos sistemas micelares F-127 (1% m/V ;  $6,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) sendo (a) absorção eletrônica ( $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e (b) emissão de fluorescência do lapachol ( $4,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>); (c) absorção eletrônica ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e (d) emissão de fluorescência da  $\beta$ -lapachona ( $3,8 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>).  $\lambda_{exc}=230$ nm; 30,0 °C (fenda 5/5 nm) em água destilada. ....109

**Figura 35.** Espectros de absorção eletrônica das naftoquinonas em diferentes temperaturas, sendo (a) lapachol ( $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>); (b) absorção eletrônica ( $\lambda_{273}$  e  $\lambda_{247}$  nm – referente à *Figura a*); (c) F-127 (1% m/V ;  $6,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>); (d) absorção eletrônica ( $\lambda_{271}$  e  $\lambda_{248}$  nm – referente à *Figura c*); (e)  $\beta$ -lapachona ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) e (f) F-127 (1% m/V ;  $6,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), respectivamente. As setas indicam a direção da variação espectral com a redução da temperatura. ....114

**Figura 36.** Estabilidade do lapachol ( $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) incorporado em micelas de (a) F-127 (1% m/V;  $6,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e (b) P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), em água destilada (pH 5,0) a 30,0 °C. ....120

**Figura 37.** Estabilidade da  $\beta$ -lapachona ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) incorporada em micelas de (a) F-127 (1% m/V;  $6,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e (b) P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) em água destilada (pH 5,0), a 30,0 °C. ....122

**Figura 38.** Cinética de estabilidade das clorofilas formuladas em P-123 (a) e F-127 2% (m/V) (b), a temperatura ambiente. ....123

**Figura 39.** Espectros de absorção dos formulados mistos obtidos a 30,0 °C, em água destilada (pH 5) sendo, (a) formulados obtidos pelo encapsulamento simultâneo do lapachol com Zn-Chld, (b) lapachol com Pheid, (c)  $\beta$ -lapachona com Zn-Chld, (d)  $\beta$ -lapachona com Pheid (Lap= $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>,  $\beta$ -lap= $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, derivados da clorofila  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, F-127 1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e P-123 1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). ....126

**Figura 40.** Espectro de absorção eletrônica do formulado misto, contendo o derivado da clorofila ( $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) combinado (a,b) lapachol ( $1,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) ou (c,d)  $\beta$ -lapachona ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>)



solubilizados em micelas copoliméricas de F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), proporção 1:1 (fármaco:micela), antes e após a liofilização. Medidas a 30,0 °C, obtidas em água destilada. As setas indicam a direção da variação espectral após o processo de reidratação.....129

**Figura 41.** Espectros de emissão de fluorescência da mistura dos derivados da clorofila ( $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) com lapachol (a,c) ( $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) ou β-lapachona (b,d) ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em etanol e incorporados nos sistemas micelares F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), a 30,0 °C. Excitação na banda Q para absorção menor que 0,1. ....133

**Figura 42.** Sobreposição (normalizada) dos espectros de absorção da Zn-Chld e Pheid ( $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) em etanol ( $\lambda_{\text{máx}}=660$  nm) com a emissão do LASER de diodo ( $\lambda_{\text{máx}}= 663\text{nm}$ ) a 30,0 °C.....139

**Figura 43.** Espectros de absorção eletrônica UV-Vis dos derivados da clorofila em presença das naftoquinonas e cinéticas de degradação do ácido úrico (293 nm) em etanol sendo (a,b) Pheid ( $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), (c-d) Pheid ( $3,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>)/β-lapachona ( $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), (e-f) Zn-Chld ( $3,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>)/β-lapachona ( $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), (g,h) Pheid ( $1,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>)/lapachol ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e (i,j) Zn-Chld ( $1,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>)/lapachol ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), a 30,0 °C, pH básico (9,0) e com sistema de iluminação acoplado LASER de diodo, com  $\lambda_{\text{máx}}= 663\text{nm}$ . As setas indicam a direção da variação espectral com o tempo de iluminação.....141

**Figura 44.** Relação entre  $k_1$  e o número de fótons absorvidos para (a) Pheid, (b) Pheid/β-lapachona, (c) Pheid/lapachol, (d) ZnChld/ β-lapachona e (e) Znchld/ lapachol.....144

**Figura 45.** Estabilidade do formulado misto com a temperatura, sendo (a) Zn-Chld/Lapachol em F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) Zn-Chld/Lapachol em P123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), (c) Pheid/Lapachol em F127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), (d) Pheid/Lapachol em P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). [lapachol]= $1,6 \times 10^{-5}$  mol/L e [Chls]=  $2 \times 10^{-6}$  mol/L. Nos insertes são apresentados os  $\lambda_{\text{máx}}$  monitorados para cada composto. ....149

**Figura 46.** Estabilidade do formulado misto com a temperatura, sendo (a) Zn-Chld  $\beta$ lap em F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) Zn-Chld  $\beta$ lap em P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), (c) Pheid  $\beta$ lap em F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e (d) Pheid  $\beta$ lap em P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). [ $\beta$ -lapachona]= $1,3 \times 10^{-5}$  mol/L e [Chls]=  $2 \times 10^{-6}$  mol/L; em água destilada (pH 5). Nos insertes são apresentados os  $\lambda_{\text{máx}}$  monitorados para cada composto. ....150

**Figura 47.** Estabilidade do formulado misto com o tempo, sendo (a) Pheid/Lap em P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) Zn-Chld/Lap P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), (c) Pheid/Lap em F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e (d) Zn-Chld/Lap F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), em água destilada (pH 5) a 30,0 °C. ....152

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares ( $\pi^*$ ) do oxigênio no estado singlete excitado ( $1\Sigma_g^+$ ,  $1\Delta_g$ ) e no estado fundamental ( $3\Sigma_g^-$ ). Adaptado de Ishii, K. (2012) e Machado, A. E. H. (2000). .... 11

**Tabela 2.** Valores de Absortividade molar do lapachol e  $\beta$ -lapachona em etanol, diclorometano e octanol. ....58

**Tabela 3.** Valores de  $K_b$  (constante de ligação) do lapachol e  $\beta$ -lapachona com sistemas micelares de P-123 e F-127, a 30,0 °C, pH 7, no  $T_0$ =tempo inicial. ....92

**Tabela 4.** Valores de  $K_b$  obtidos para isotermas de ligação em pH 4,5 (neutra) e 8,0 (lapachonato).106

**Tabela 5.** Rendimento quântico de fluorescência para os derivados Pheid e Zn-Chld em meio micro heterogêneo ( F-127 1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e P-123 1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) e em etanol.135

**Tabela 6.** Constantes de velocidade ( $k_1$ ) determinadas nos experimentos de oxidação fotoinduzida do AU utilizando LASER, Constante de fotobranqueamento ( $k_{FB}$ ) e Eficiência fotodinâmica química ( $\gamma\Delta$ ).

..... 145

**Tabela 7.** Rendimento quântico de oxigênio ( $\Phi_{\Delta}^1O_2$ ) determinado para os derivados da clorofila em presença das naftoquinonas em etanol, usando Pheid como padrão..... 146

### Lista de Esquemas

**Esquema 1.** Representação dos mecanismos fotoquímicos do Tipo I e Tipo II, sendo  $^0S$  fotossensibilizador no estado fundamental,  $1S^*$  fotossensibilizador no estado excitado singleto,  $3S^*$  fotossensibilizador do estado excitado tripleto,  $R^{\cdot}$  radical do substrato orgânico (cátion ou ânion),  $S^{\cdot}$  radical do fotossensibilizador (cátion ou ânion) e CIS cruzamento inter sistemas (Ronsein et al., 2006).....10

**Esquema 2.** Mecanismo de foto oxidação do ácido úrico em meio alcalino (George e Bhat, 1979 modificado).....143

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

E	Absortividade molar
Abs	Absorbância
CTAB	Brometo de cetil-trimetil amônio
DTAB	Brometo trimetilamônio de dodecilo
CTAC	Cloreto de cetiltrimetilamônio
Chl	Clorofila
Mg-Chl	Clorofila de magnésio
Zn-Chld	Clorofilida de Zinco
$K_p$	Coefficiente de partição
$\lambda_{\text{emissão}}$	Comprimento de onda de emissão
CMC	Concentração micelar crítica
$K_b$	Constante de ligação
$D_{\text{mic}}\text{Fc}$	Dendrímero micelar-ftalocianina
DDMPS	Dodecil-N,N-dimetil-3-amino-1-propanosulfonato
SDS	Dodecilsulfato de sódio
DOX	Doxorrubicina
$E_T$	Energia de transição
RLS	Espalhamento de luz ressonante
Pheid	Feoforbídeo
FS	Fotossensibilizador
LPC	Isoleucina
Lap	Lapachol
$N_{\text{ag}}$	Número de agregação do surfactante polimérico P-123 ou F-127
DMDAO	Óxido de amina dodecil-dimetil
OE	Óxido de etileno
OP	Óxido de propileno
POE	Poli óxido de etileno
POP	Poli óxido de propileno
[FS]/[micela]	Razão entre as concentrações de Fármaco pela concentração do copolímero micelar
$\Phi_F$	Rendimento quântico de fluorescência
$\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$	Rendimento quântico de oxigênio singleto
RMD	Resistência a múltiplos fármacos
P-123	Surfactante polimérico da classe dos Pluronic <sup>®</sup>
F-127	Surfactante polimérico da classe dos Pluronic <sup>®</sup>
TMC	Temperatura micelar crítica
TFD	Terapia fotodinâmica
UV-Vis	Ultravioleta-visível
$\beta$ -lap	$\beta$ -lapachona

---

## **Apresentação**

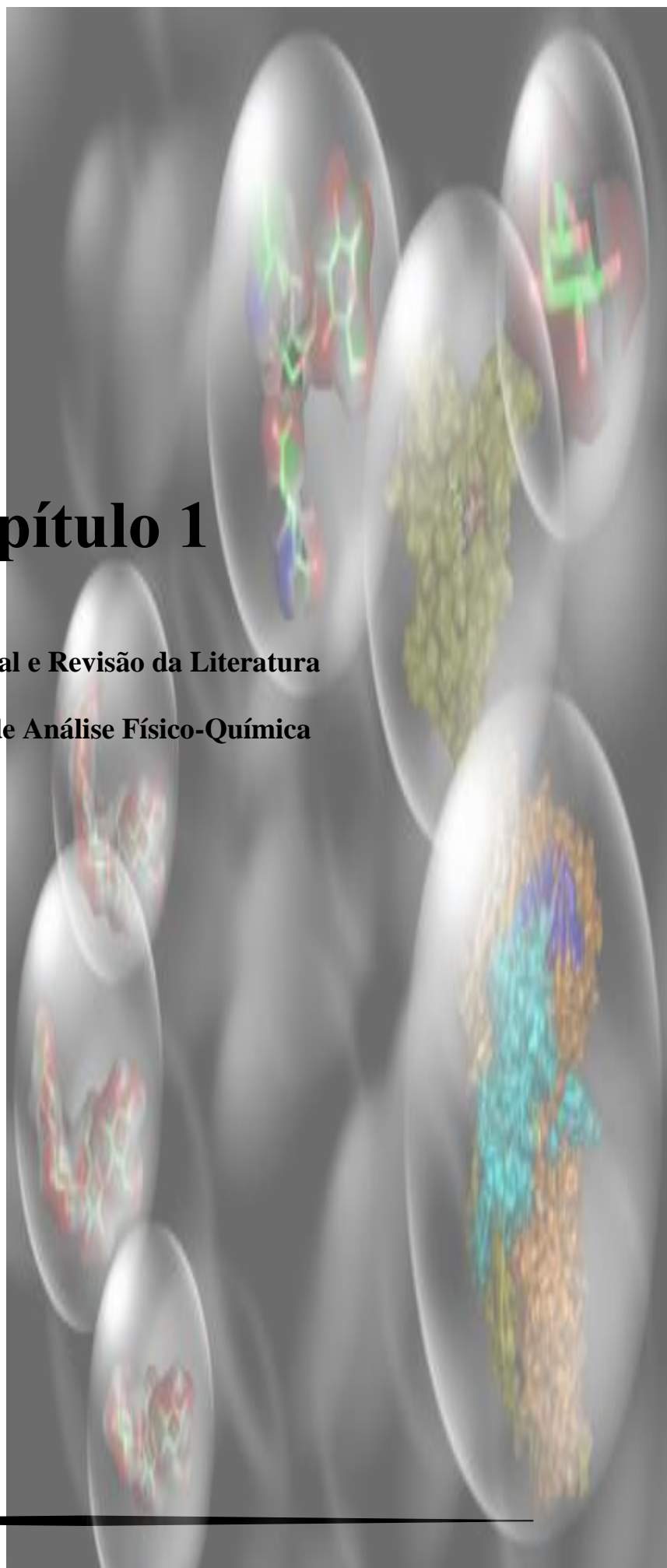
Por fins didáticos, o presente trabalho foi segmentado três capítulos. O *Capítulo 1* contempla uma revisão da literatura referente aos temas relacionados a esta pesquisa, juntamente com o objetivo e as descrições das metodologias de análise físico-química empregadas. Os *Capítulos 2 e 3* expõem os resultados e discussão para as naftoquinonas de forma isolada e combinadas com os fotossensibilizadores Feoforbídeo e Clorofilida de Zinco, respectivamente.

---

# Capítulo 1

**Introdução Geral e Revisão da Literatura**

**Metodologias de Análise Físico-Química**



# **Introdução Geral e Revisão da Literatura**

---

## **1. Introdução Geral**

A TFD consiste em uma modalidade terapêutica empregada para o tratamento de uma série de distúrbios, que têm como característica comum o crescimento anormal de tecidos (Rudys et al., 2013; Sanabria et al., 2013; Senge & Radomski, 2013; C. Silva et al., 2013). O princípio básico da TFD consiste em etapas baseadas na *i) administração tópica ou sistêmica do fotossensibilizador (FS); ii) excitação do FS com luz de comprimento de onda adequado; iii) geração de oxigênio singlete (TFD do Tipo II) ou espécies radiculares de oxigênio (TFD do Tipo I) e iv) morte celular*(Chatterjee, Fong, & Zhang, 2008; Milla Sanabria et al., 2013). A eficiência da técnica está atrelada a inúmeras vantagens, como a capacidade de agir sobre células com resistência a múltiplas drogas (RMD), obtida comumente após tratamentos prolongados com fármacos convencionais (Hendrich, Wesolowska, Motohashi, Molnár, & Michalak, 2003a), ao caráter anti-RMD, já que a acumulação intracelular do FS não é reduzida pela atividade da Glicoproteína-P (Tang et al., 2009) e à mínima toxicidade sistêmica, devido à aplicação e irradiação *in situ* o que culmina em uma elevada seletividade. Tais benefícios permitem o emprego de ciclos reprodutíveis de tratamento, além da combinação com outras modalidades terapêuticas (L. Li et al., 2010a; Milla Sanabria et al., 2013).

Por considerações econômicas e ambientais, FS's obtidos a partir de matérias primas abundantes atraem maior interesse, comparados aos preparados por rotas químicas complexas (Yoon, Li, & Shim, 2013). Neste quesito, a Clorofila e seus derivados apresentam aplicabilidade em tratamentos fotofísicos (Gomaa, Ali, El-Tayeb, & Abdel-kader, 2012b) amparados por suas características intrínsecas, como absorção



de luz na chamada “janela terapêutica” (600 a 800nm), devido a sua maior penetração em tecidos, alto rendimento quântico de oxigênio singleto ( $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ ) e acentuada hidrofobicidade, que incita maior tendência de permeação em membranas biológicas (A Agostiano, Catucci, Colafemmina, Della Monica, & Scheer, 2000).

A partir da clorofila *a* (Mg-Chl) pode-se obter o derivado Feoforbídeo (Pheid), pela retirada do metal central e da cadeia fitílica. A incorporação do Zinco no anel heteromacrocíclico do Pheid permite a formação do derivado Clorofilida de Zinco (Zn-Chld) (Gerola, Santana, et al., 2011). Ambas as espécies são frequentemente relatadas na literatura por apresentarem atividade, na presença de luz com comprimento de onda adequado, contra uma série de linhagens de células tumorais e micro-organismos (Cosma et al., 2008; Gomaa et al., 2012b; Jakubowska et al., 2013; Ulatowska-Jarża et al., 2006).

Segundo a literatura, mesmo o tratamento oferecendo eficácia considerável em alguns casos, terapias antitumorais baseadas na utilização de um único agente ou fármaco são limitadas devido à heterogeneidade das células doentes e sua resistência a múltiplas drogas (RMD) (Harmsen, Meijerman, Beijnen, & Schellens, 2007; Mroz, Yaroslavsky, Kharkwal, & Hamblin, 2011; Shin, Alani, Rao, Rockich, & Kwon, 2009; Tang et al., 2009). Dessa forma, combinações entre fármacos oferecem a possibilidade de produzir uma resposta maior e retardar a resistência das células, elevando o grau de morte celular (Harmsen et al., 2007; Shin et al., 2009). Além dos predicados supracitados, vinculados à RMD, a combinação de fármacos pode ser avaliada sob outra visão, que leva em conta a interação medicamentosa dos compostos combinados. Por conta desse efeito, as respostas dos fármacos mistos podem revelar-se de três formas: (1) *soma* dos efeitos individuais; (2) *efeito sinérgico*, onde se tem um resultado melhor

que o esperado ou (3) *resposta menor* do que o potencial individual do medicamento (Tallarida, 2001).

Amparado nessa perspectiva, o presente trabalho buscou investigar sistemas combinados para tratamento fotodinâmico, compostos por um agente antineoplásico, não aplicável a TFD, simultâneo a um fotossensibilizador (derivados de clorofila Pheid e Zn-Chld). Tal combinação visa duas etapas de tratamento que compreendem i) *etapa não dependente da luz*, onde se tem a ação das naftoquinonas e ii) *etapa no claro*, com ação fotodinâmica (geração de oxigênio singlete e/ou espécies radicalares de oxigênio) (Lamberti, Vittar, da Silva, Ferreira, & Rivarola, 2013).

As naftoquinonas apresentam uma série de atividades farmacológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatório, antipirético e atividade anticancerígena (Kumar, Aithal, Rao, Udupa, & Rao, 2009). O lapachol, pertencente a essa classe de compostos, é isolado a partir de plantas do gênero *Tabebuia avellanedae* pertencentes à família Bignoniaceae, facilmente encontradas nas regiões norte e nordeste do Brasil (Hussain, Krohn, Ahmad, & Miana, 2007). O isômero  $\beta$ -lapachona é obtido a partir do lapachol por meio de um tratamento ácido (Barbosa & Diniz Neto, 2013).

A avaliação da natureza lipofílica dos medicamentos é um dos parâmetros utilizados para previsão de suas propriedades farmacocinéticas. Nesse quesito, estudos amparados em sistemas modelos complexos, como as micelas copoliméricas, são amplamente realizados devido à mimetização da complexidade da membrana celular, composta por uma região hidrofílica (grupos fosfatos) e hidrofóbica (região lipídica) (Marsden, Tomatsu, & Kros, 2011). Além disso, muitos trabalhos atribuem à utilização dos sistemas micelares a monomerização dos fotossensibilizadores

hidrofóbicos e manutenção das propriedades fotofísicas, indispensáveis para terapia fotodinâmica, além de efeitos de estabilização e proteção contra degradação no organismo. Esse fato está atrelado à distinta composição e polaridade dos microdomínios das micelas copoliméricas que, acima da TMC (temperatura micelar crítica) e CMC (concentração micelar crítica) do surfactante, tendem a formar uma região de menor polaridade (centro hidrofóbico), onde normalmente são solubilizados os fármacos lipofílicos e, outra de maior polaridade, hidratada, responsável pela estabilização e monomerização de medicamentos menos lipofílicos (Trubetskoy, 1999; van Nostrum, 2004).

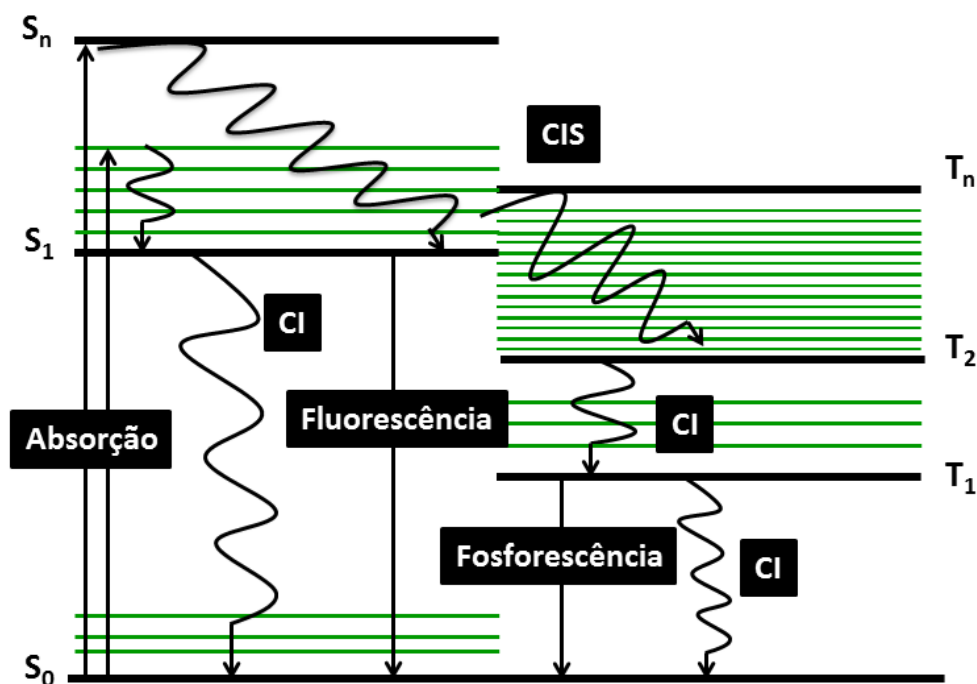
Sendo assim, o presente trabalho buscou contribuir com a caracterização físico-química de formulados multi-componentes, compostos pelo FS (Pheid e Zn-Chld) combinado a naftoquinona (lapachol ou  $\beta$ -lapachona), incorporados nos copolímeros micelares da classe dos pluronics® para aplicação na TFD.

## **1.2. Revisão da literatura**

### **1.2.1. Processos Fotofísicos e Fotoquímicos**

Os processos fotoquímicos são oriundos da interação da luz com a matéria que, ao absorver energia com comprimento de onda adequado, permite a promoção de um elétron do estado fundamental, denominado HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital), para o estado excitado LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), de maior energia. O estado excitado é instável e nele a molécula pode sofrer processos químicos ou físicos. Os processos químicos estão envolvidos com rearranjos ou fragmentações da molécula, enquanto os físicos se referem a procedimentos de desexcitação, dependente do tipo da molécula, natureza dos estados excitados envolvidos e o efeito do solvente (Gracetto et al., 2011; Lakowicz, 2006).

Os mecanismos fotofísicos que regem a TFD são descritos pelo diagrama de Jablonski, ilustrado na Figura 1. Nele, são representados os estados energéticos de uma molécula e as transições entre os mesmos. No diagrama, os termos S e T denotam o estado de multiplicidade singleto e tripleto, respectivamente. Os subíndices expressam o nível energético, como o fundamental singleto ( $S_0$ ), primeiro estado excitado singleto ( $S_1$ ) e primeiro estado excitado tripleto ( $T_1$ ). Os estados são arranjados verticalmente por energia e agrupados de acordo com a sua multiplicidade de spin (singleto ou tripleto). As transições que envolvem processos radiativos, isto é, com a emissão de luz, são indicadas por setas retas e as não-radiativas por linhas onduladas. Os estados fundamentais vibracionais de cada estado eletrônico ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_n$ ) são representados por linhas menos espessas, apresentadas em verde no diagrama de energia (Agostinis et al., 2011; Castano, Demidova, & Hamblin, 2005; Lakowicz, 2006).

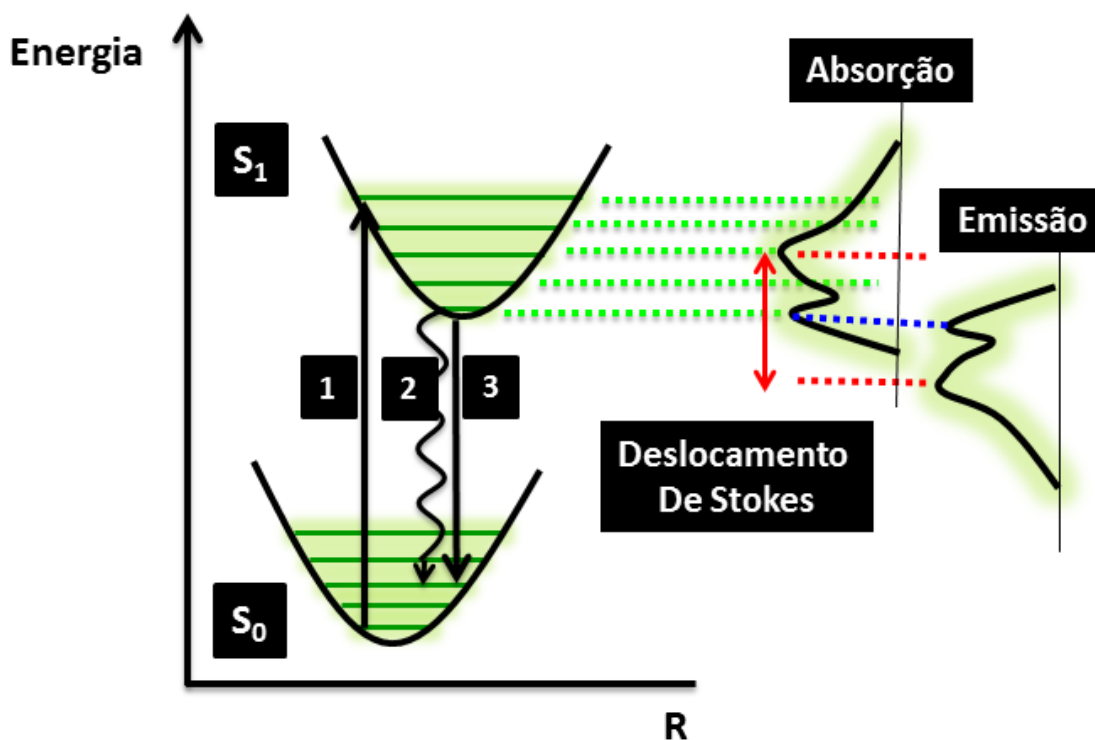


**Figura 1.** Representação Esquemática de um Diagrama de Jablonski.

Os elétrons de um fármaco no estado fundamental estão dispostos em um orbital de menor energia (HOMO), com seus spins opostos ou antiparalelos. Após a absorção de luz, em um comprimento de onda específico, o composto fotossensível é promovido para o nível vibracional de maior probabilidade do estado excitado de mesma multiplicidade de spin (S<sub>1</sub> ou S<sub>2</sub>). Os casos em que há a excitação para o estado energético S<sub>2</sub> (ou superior - S<sub>n</sub>) são seguidos por um rápido relaxamento (10<sup>-12</sup> s) até o nível vibracional de menor energia do estado S<sub>1</sub>, sendo esse estado excitado o ponto de partida para a maior parte dos processos fotoquímicos (Gracetto et al., 2010; Lakowicz, 2006). O tempo de vida no estado S<sub>1</sub> é curto (cerca de 10<sup>-9</sup> s) e o decaimento (S<sub>1</sub>→S<sub>0</sub>) pode ocorrer via processo não radiativo e/ou radiativo. O primeiro está vinculado à perda de energia na forma de calor, influenciada por efeitos colisionais em um processo

chamado Conversão Interna (CI), enquanto o segundo está relacionado à emissão de fluorescência ou fosforescência, conforme representado na Figura 1 e 2 (Gracetto et al., 2010).

A implicação desses processos sobre os espectros de absorção e emissão dos compostos é verificada através do deslocamento de Stokes, observado nas curvas de potencial (parábolas representadas na Figura 2) em função da distância internuclear para dois estados eletrônicos (Gracetto et al., 2010; Lakowicz, 2006).



**Figura 2.** Representação dos processos de absorção e posterior decaimento radiativo/não radiativo nas curvas de potencial em função da distância internuclear (R) para dois estados eletrônicos, sendo 1-absorção, 2-conversão interna, 3-fluorescência. As linhas pontilhadas representam as transições eletrônicas refletidas nos espectros de absorção e emissão de fluorescência. Modificado de Lakowicz, 2006.

No que tange à Figura 2, as curvas em forma de parábolas descrevem a energia potencial de moléculas diatômicas como função somente do comprimento da ligação, sendo uma representante do estado eletrônico fundamental e a outra do excitado (Lakowicz, 2006). As setas contínuas verticais representam as transições eletrônicas, as quais podem ser interpretadas sob o mesmo ponto de vista dos processos discutidos anteriormente para o diagrama de Jablonski. As linhas horizontais contínuas representam os níveis vibracionais e as tracejadas o efeito do decaimento do elétron entre os mesmos sobre o perfil espectral de absorção e emissão dos compostos. Dessa forma, devido à influência dos processos de relaxação da molécula, o fóton emitido na fluorescência sempre apresentará energia menor, comparado à energia absorção/excitação, resultando em um sinal de emissão deslocado para maiores comprimentos de onda, isto é, em regiões de menor energia (Agostinis et al., 2011; Allison, Moghissi, Downie, & Dixon, 2011; Gracetto et al., 2010; Lakowicz, 2006).

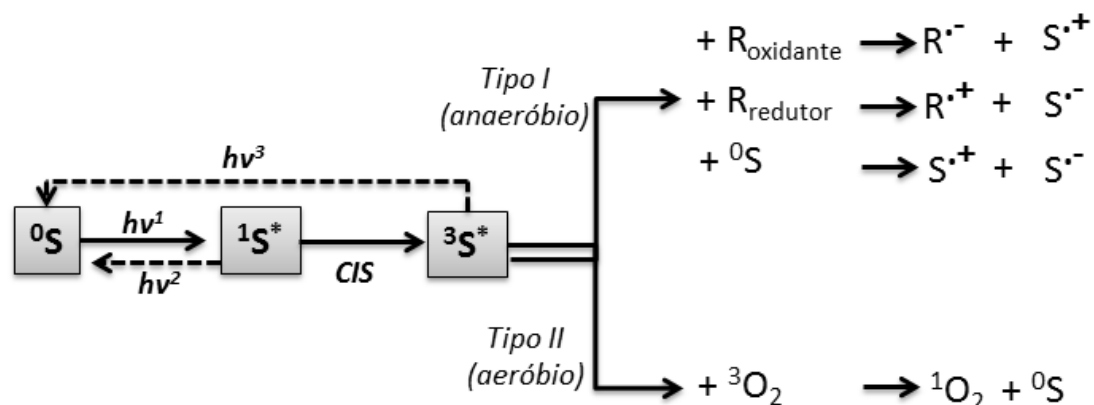
Os processos discutidos até então ocorrem sem a inversão de spin, isto é, sem a mudança na multiplicidade do sistema que, para a maioria das moléculas no estado fundamental, apresenta-se como singleto (S). Entretanto, outro processo competitivo de desativação do estado excitado pode ocorrer quando se tem a inversão de spin no estado excitado, passando de singleto para o tripleto ( $^1S^* \rightarrow ^1T^*$ ) em um evento conhecido como cruzamento inter-sistemas (CIS) (Figura 1). Esse processo é caracterizado como transição não radiativa, envolvendo níveis vibracionais de mesma energia e diferentes multiplicidades, proibidas por spin, porém favorecida quando se tem átomos pesados que facilitem o acoplamento spin-órbita (Allison et al., 2011; Gracetto et al., 2010; Lakowicz, 2006).

Uma vez no estado tripleto excitado ( $^1T^*$ ), o decaimento para o estado fundamental singleto pode acontecer por *perda de energia através de colisões* sem

emissão de luz (processos não radiativos) ou pela *emissão de fosforescência* (processos radiativos), além dos mecanismos vinculados a transferência de carga, mudança conformacional e interação no estado excitado com outras moléculas (Valeur, 2001). Por se tratar de uma transição proibida (por spin), a constante de velocidade de decaimento é várias ordens de magnitude menor que a fluorescência, resultando em um maior tempo de vida na ordem de microssegundos para o estado excitado tripleto (Lakowicz, 2006), tempo longo o suficiente para permitir a interação do fármaco com moléculas vizinhas por reações do Tipo 1 e do Tipo 2 (Lakowicz, 2006; A. E. da H. Machado, 2000).

O mecanismo do Tipo 1 (Esquema 1) está vinculado à transferência de elétrons do fotossensibilizador no estado tripleto excitado ( $^3S^*$ ) para espécies orgânicas (R), permitindo a formação de substratos radicalares (radicais cátions e/ou ânions). Já o mecanismo do Tipo II está vinculado à transferência de energia para o oxigênio molecular, gerando  $^0S$  e  $^1O_2$ . Estes processos podem ocorrer simultaneamente, dependendo da capacidade de transferência de energia do FS para o oxigênio molecular, do meio e concentração de  $O_2$  (Ishii, 2012; A. E. da H. Machado, 2000; Ronsein, Miyamoto, Bechara, Di Mascio, & Martinez, 2006).

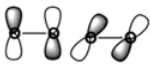




**Esquema 1.** Representação dos mecanismos fotoquímicos do Tipo I e Tipo II, sendo  ${}^0S$  fotossensibilizador no estado fundamental,  ${}^1S^*$  fotossensibilizador no estado excitado singlete,  ${}^3S^*$  fotossensibilizador do estado excitado tripleto,  $R^{\cdot}$  radical do substrato orgânico (cátion ou ânion),  $S^{\cdot}$  radical do fotossensibilizador (cátion ou ânion) e CIS cruzamento inter sistemas (Ronsein et al., 2006).

O oxigênio no estado fundamental tem a configuração eletrônica de dois orbitais  $\pi^*$  degenerados (orbitais de mesma energia), ocupados por um elétron com spin paralelo em cada orbital (Tabela 1)(Ishii, 2012; A. E. da H. Machado, 2000). Segundo a Teoria do Orbital Molecular, o oxigênio no estado fundamental e excitado pode assumir diferentes formas de ocupação dos orbitais moleculares antiligantes (Ishii, 2012; A. E. da H. Machado, 2000), conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares ( $\pi^*$ ) do oxigênio no estado singlete excitado ( $^1\Sigma_g^+$ ,  $^1\Delta_g$ ) e no estado fundamental ( $^3\Sigma_g^-$ ). Adaptado de Ishii, K. (2012) e Machado, A. E. H. (2000).

Estado	Orbitais $\pi^*$	Energia (kJ mol <sup>-1</sup> )
	 $\pi_x^*$ $\pi_y^*$	
$^1\Sigma_g^+$	(↑) (↓)	159,6
$^1\Delta_x$	(↑↓) ( )	92,4
$^1\Delta_y$	( ) (↑↓)	92,4
$^3\Sigma_g^-$	(↑) (↑)	0

O oxigênio no estado fundamental apresenta dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$ . Esses elétrons, no estado fundamental, tendem a assumir um estado de multiplicidade máxima ( $^3\Sigma_g^-$ , triplete) e menor energia (0 kJ mol<sup>-1</sup>) (Tabela 1)(Ishii, 2012; A. E. da H. Machado, 2000).

O estado  $^1\Sigma_g^+$ , mais energético, por restrições de simetria do estado fundamental e excitado, decai rapidamente para a forma menos energética ( $^1\Delta_x$  ou  $^1\Delta_y$ ), apresentando um tempo de vida extremamente curto (ordem de picosegundos). Os estados de energia intermediária, designados por  $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$ , por apresentarem simetrias diferentes entre o estado fundamental e excitado, possuem um tempo de vida maior e são os responsáveis pela reatividade química do oxigênio singlete (Machado, 2000; Ishii, K. 2012). Por se tratar de estados degenerados, os orbitais  $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$  podem ser representados somente por  $^1\Delta_g$ . A presença do orbital vazio em  $^1\Delta_g$  permite ao oxigênio

singleto um caráter eletrofílico, favorecendo reações com substratos ricos em elétrons (Ishii, 2012; A. E. da H. Machado, 2000).

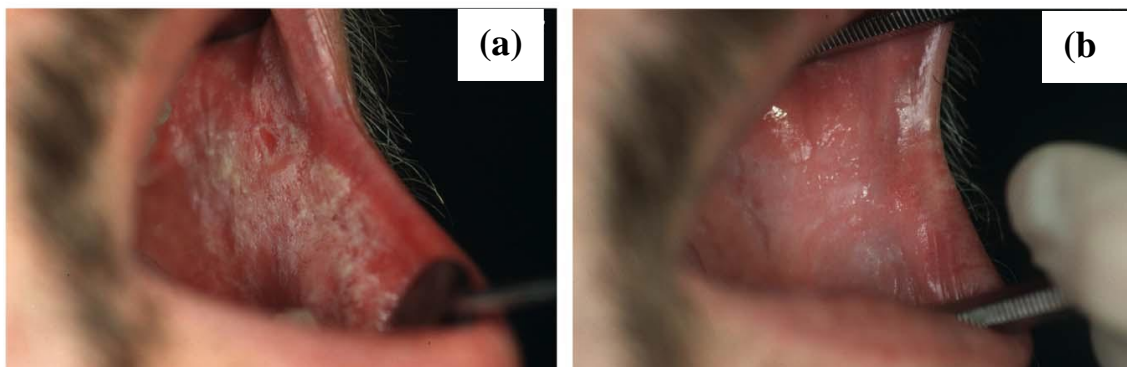
O tempo de vida ( $\tau$ ) do oxigênio singleto é profundamente influenciado pela natureza do solvente. Em suma, meios que não oferecem ligações C-H e grupos hidroxila em sua estrutura favorecem tempos de vida mais elevados (Lakowicz, 2006; A. E. da H. Machado, 2000). Esse efeito está associado a menor probabilidade de sobreposição entre os níveis vibracionais do supressor e do oxigênio singleto, ocorrendo menor transferência de energia (A. da H. Machado, 2000). Em água, como exemplo, o  $\tau$  encontra-se por volta de 2 a 4  $\mu$ s e em água deuterada próximo a 70  $\mu$ s. Em tetracloreto de carbono o  $\tau$  encontra-se próximo a 30 ms e em clorofórmio perto de 250  $\mu$ s. Em sistemas biológicos, o  $\tau$  do  $^1\text{O}_2$  é muito menor ( $< 0,04 \mu$ s), devido à presença de uma série de biomoléculas com as quais esta espécie reage por mecanismos de supressão (A. E. da H. Machado, 2000). Sistemas ricos em elétrons, como lipídios insaturados, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, são rapidamente atacados levando a danos à membrana celular e a diversas organelas citoplasmáticas (Lakowicz, 2006; A. E. da H. Machado, 2000).

### **1.2.2. Terapia Fotodinâmica**

A Terapia fotodinâmica baseia-se em uma modalidade terapêutica aprovada para uso clínico em alguns países, para tratamento de doenças como: vitiligo; artrite reumatoide; patologias causadas por microorganismos (bactérias, fungos e protozoários) e crescimento anormal de tecidos (miopia patológica, degeneração macular da retina e câncerem fase inicial e avançado) (Milla Sanabria et al., 2013; Simplicio, Maionchi,

&Hioka, 2002). O tratamento consiste basicamente na administração de um fotossensibilizador, de forma tópica ou sistêmica, que posteriormente será ativado por luz com comprimento de onda adequado (Milla Sanabria et al., 2013). As vantagens desta terapia são frequentemente relatadas na literatura, ora devido a sua elevada seletividade, o que culmina em uma mínima toxicidade sistêmica, ora a maior efetividade sobre células resistentes a múltiplas drogas (RMD) (Hendrich, Wesołowska, Motohashi, Molnár, & Michalak, 2003b; Tang et al., 2009) e a possibilidade de combinação com outras modalidades terapêuticas (L. Li et al., 2010b; Sanabria et al., 2013).

Segundo Kubler (2005), por se tratar de uma técnica minimamente invasiva, a TFD tem sido aplicada no tratamento de carcinomas primários ou metástases localizadas nas regiões da cabeça e pescoço, como a cavidade oral, faringe, laringe, entre outros. O autor aborda uma série de resultados que demonstraram a eficácia da terapia, seja na ressecção completa da doença ou na redução do volume tumoral, a fim de minimizar riscos cirúrgicos e o sofrimento do paciente. A título de exemplo, Kubler traz os resultados da aplicação do ácido aminolevulínico (ALA), um pró-fármaco que, após sua aplicação e irradiação com luz visível, induz a formação da substância fotodinamicamente ativa (Protoporfirina), comumente usada em lesões externas, como no tratamento da leucoplasia da cavidade bucal (Figura 3).

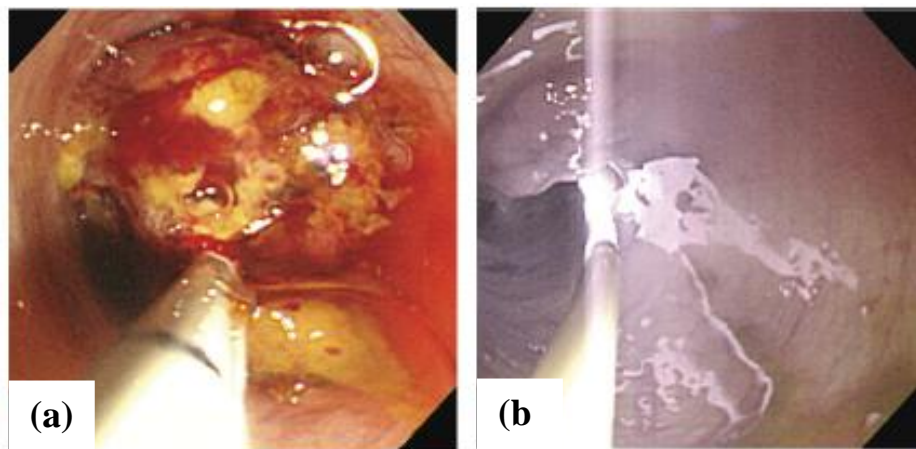


**Figura 3.** Paciente com leucoplasia na região bucal, sendo (a) antes do tratamento com ALA e (b) após o tratamento com ALA (Kübler, 2005).

Com o mesmo intuito, Li-bo Li *et al* (2010) desenvolveram pesquisas centradas no efeito da terapêutica quando administrada *i)* em combinação com a quimioterapia, *ii)* TFD de forma isolada e *iii)* somente quimioterápicos. As avaliações foram realizadas em 90 pacientes, os quais foram divididos nos três grupos. Os tratamentos foram executados durante 2 anos, utilizando-se o Photofrin (FS) em uma dose de 2 mg/kg. A irradiação foi empregada após 48 horas (tempo de acumulação), utilizando-se de fibra óptica com emissão em 630 nm acoplada a um endoscópio. Em termos de eficácia, os autores observaram maiores benefícios ao se utilizar a quimioterapia como intervenção complementar, estabelecendo a seguinte ordem curativa observada: Terapia fotodinâmica combinada à quimioterapia > terapia fotodinâmica > quimioterapia isolada (L. Li *et al.*, 2010b).

Igualmente, Choi *et al* (2011) revelaram o sucesso da técnica aplicada a tratamentos paliativos de colangiocarcinoma inoperável, utilizando-se Photofrin como fotossensibilizador e um endoscópio superior ultra-slim como fonte de guia e iluminação, acoplado a um sistema de laser diodo de 630 nm com potência máxima de

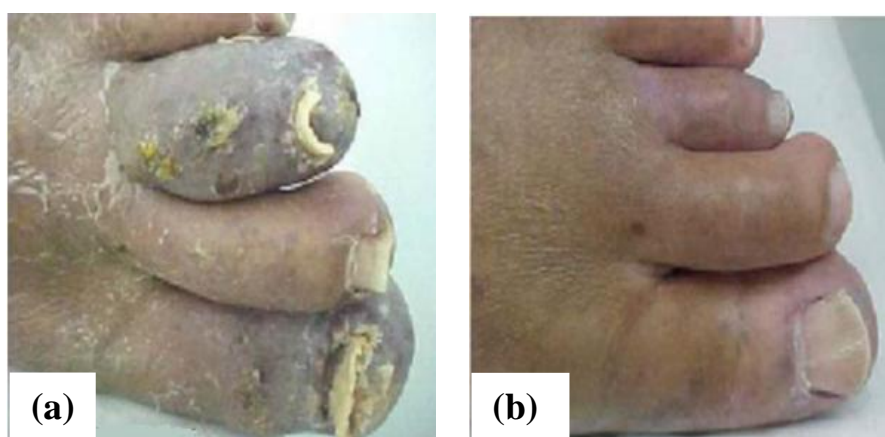
2.000 mW. Nove pacientes foram submetidos a dezessete sessões, as quais faziam uso da aplicação via intravenosa do fármaco 48 horas antes da iluminação. Decorrido o tempo de acumulação do princípio ativo no tecido canceroso (48 horas), a iluminação se deu por 450 segundos. A Figura 4 representa a atividade do sistema endoscópio no tratamento do colangiocarcinoma (câncer das vias biliares).



**Figura 4.** Vista colangioscópica sendo (a) massa polipóide intraductal e (b) vista colangioscópica com o sistema de iluminação ativado (Choi et al., 2011).

Segundo os autores, a técnica se mostrou vantajosa para sete dos nove pacientes, sendo que dois destes morreram durante o tratamento por causa de comorbidades adjacentes não relacionadas às lesões biliares. Para um paciente houve a resseção completa do tumor, enquanto para os demais houve uma redução significativa no tamanho do mesmo. Os dados verificados sugerem que a TFD guiada por endoscópio *ultra-slim* é viável e segura para o tratamento de pacientes com colangiocarcinoma extra-hepático inoperável (Choi et al., 2011).

Em adição, diversos artigos de revisão reportam o avanço da prática clínica para os mais diversos tipos de câncer. Foi nessa perspectiva que Bozzini *et al* (2012) recapitularam os estudos relacionados a TFD aplicada a neoplasias urológicas. Os dados revelaram resultados oncológicos promissores, porém a presença de efeitos colaterais demonstraram a necessidade de mudança no protocolo de aplicação a respeito do planejamento dosimétrico(Bozzini et al., 2012). Outro artigo de revisão, encabeçado por Tardivo *et al* (2005), também discutiu a ação fotomedicinal do azul de metileno para uma série de moléstias, tais como carcinoma basocelular, sarcoma de Kaposi, melanoma, vírus e infecções fúngicas. Os autores remetem alguns trabalhos que denotam a eficiência curativa da técnica em casos específicos, como o trabalho de Bernstein reportado que investiga o efeito da TFD sobre o tumor maligno Sarcoma de Kaposi (Figura 5), comum em pacientes com AIDS. A avaliação foi realizada em 25 pacientes que receberam 1,0mg/kg de Photofrin, 48 horas antes da exposição a luz com comprimento de onda de 630 nm (Tardivo & Giglio, 2005).



**Figura 5.** Paciente com diagnóstico de sarcoma de Kaposi sendo (A) antes e (B) após tratamento fotodinâmico com solução de azul de metileno (2% m/V) e azul de toluidina (2% m/V) durante duas semanas (Tardivo & Giglio, 2005).

Como resultado, Bernstein notou que de 348 lesões tratadas, 33% apresentaram resposta clínica completa, 63% parcial e 4% insucesso. Além disso, foi verificada uma forte correlação entre a resposta e a dose de luz, sendo que a melhor dose/resposta obtida encontra-se entre 250 e 300 J/cm<sup>2</sup> (Tardivo & Giglio, 2005).

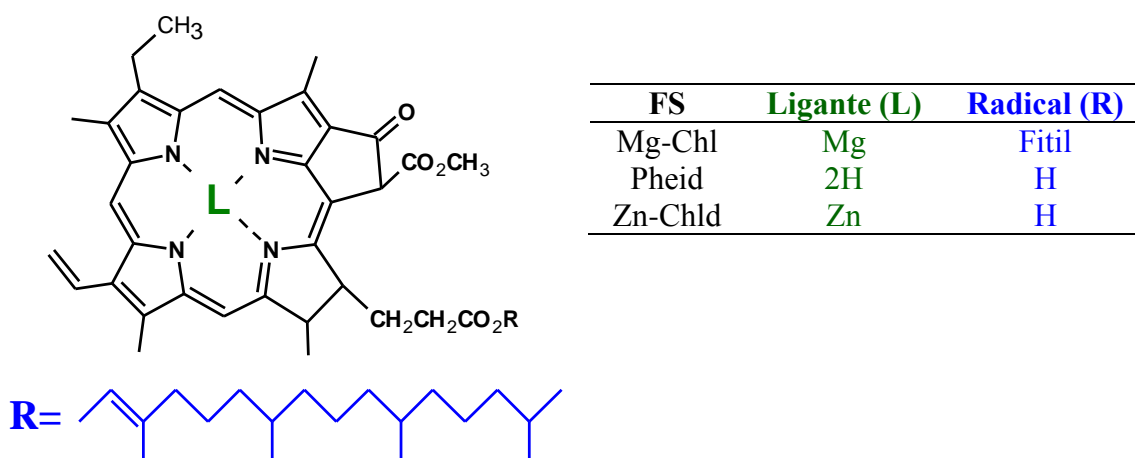
Assim, a elevada seletividade e eficácia comprovada da TFD fez dessa modalidade terapêutica foco de diversos estudos *in vitro* e *in vivo* e, por isso, tornou-se também objeto de estudo deste trabalho, na composição de agentes terapêuticos potencializados (Allison et al., 2011; Gomaa et al., 2012b; Simplicio et al., 2002; Ulatowska-Jarza et al., 2006).

### **1.2.3. Derivados da Clorofila como Fotossensibilizadores para TFD**

As clorofilas (Chl-Mg) são pigmentos naturais abundantes em plantas e responsáveis por executar as funções principais na fotossíntese. Na natureza, é possível encontrar os tipos de clorofilas *a*, *b*, *c* e *d*, sendo que as espécies *a* e *b* são frequentemente obtidas de vegetais de folhas verdes e as *c* e *d* em alguns protistas e cianobactérias (Fennema, 1996). Além de possuir uma estrutura heteromacrocíclica assimétrica insaturada, com elétrons frouxamente ligados e Magnésio como metal central, apresenta longa cauda de hidrocarbonetos (representada em azul na Figura 6), quase sempre ligada à estrutura complexa em anel, atuando no posicionamento da clorofila em um ambiente hidrofóbico nas lamelas dos cloroplastos. Nesse meio ocorrem as reações fotoquímicas, promovidas na membrana dos tilacoides e, bioquímica, no estroma dos cloroplastos (Fennema, 1996; Zeiger, 2004).



Em termos estruturais, as Clorofilas (Chls) são formadas por ciclos tetrapirrólicos, complexados com o íon Magnésio ( $Mg^{2+}$ ). A presença do anel pirrol na forma reduzida (Figura 6) permite a essas substâncias aplicabilidade na TFD, devido a alterações na simetria e conjugação do anel heteromacrocíclico (Gerola, Tsubone, et al., 2011).



**Figura 6.** Estrutura molecular da clorofila e seus derivados

De um modo geral, as Chls e seus derivados apresentam cinco bandas de absorção originadas por transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ , onde duas apresentam maior absorvidade molar, sendo uma denominada Soret, na região de 400 nm (transição do tipo  $S_0 \rightarrow S_2$ ), e outra Q ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), na região de 600 a 700 nm (Moreira et al., 2010). Outras bandas Q, de menor intensidade, são correlacionadas à assimetria do anel clorínico ou a transição metal-ligante, para os derivados desmetalados e metalados,

respectivamente. Os espectros de emissão de fluorescência dessa classe de compostos assinalam a presença de bandas características da transição  $S_1 \rightarrow S_0$  (Angela Agostiano et al., 2002; Gerola, Santana, et al., 2011; Gerola, Tsubone, et al., 2011; Pale et al., 2013).

A partir da clorofila de magnésio (Mg-Chl) pode-se obter o derivado Feoforbídeo (Pheid), pela retirada do metal central e da cadeia fitílica. A incorporação do Zinco no anel heteromacrocíclico do Pheid permite a formação do derivado Clorofilida de Zinco (Zn-Chld), ambos menos hidrofóbicos que seu precursor (Chl-Mg)(Gerola, Tsubone, et al., 2011). Tais derivados clorínicos são frequentemente relatados na literatura por apresentarem atividade, na presença de luz com comprimento de onda adequado, contra uma série de linhagens de células tumorais e microorganismos (Cosma et al., 2008; Gomaa, Ali, El-Tayeb, & Abdel-kader, 2012a; Jakubowska et al., 2013; Ulatowska-Jarza et al., 2006).

Goma *et al* (2012) estudaram a eficácia e a segurança genética, no que diz respeito a efeitos mutagênicos e genotóxicos, do derivado da clorofila (clorofilida) como fotossensibilizador no tratamento do câncer de mama. Os resultados obtidos foram comparados a avaliações da resposta celular ao quimioterápico metotrexato (MTX). Os testes de viabilidade, em linhagens de células MCF-7, apresentaram efeito pronunciado do fotossensibilizador em concentrações cerca 138 vezes menor que a empregada utilizando o quimioterápico MTX. Além disso, foi verificada a ausência de efeitos colaterais genéticos para os tratamentos via TFD e a presença dos mesmos (quebras cromossômicas) em células submetidas à MTX (Gomaa et al., 2012a).

Jakubowska *et al* (2011) estudaram a atividade da clorofilida de zinco em neoplasias malignas glandular, em termos de absorção celular, localização do FS e os mecanismos de morte celular. Segundo os autores, uma das vantagens em se utilizar a

clorofilida de zinco como FS está em seu longo tempo de retenção, permitindo níveis mais elevados na região tumoral. As avaliações foram realizadas em três linhagens celulares, sendo: linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano de células epiteliais (A549), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e adenocarcinoma de cólon humano (LoVo). Os autores verificaram que, mesmo em menores concentrações e baixas doses de luz, o FS provoca morte celular de 100% por apoptose e necrose. Em avaliações do efeito do FS em tumores A549 foi verificada uma redução significativa do tamanho ou ainda a eliminação completa do tumor (Jakubowska et al., 2013).

No que tange ao desenvolvimento de propriedade intelectual envolvendo clorofila e seus derivados, Kim *et al* (2012) patentearam a síntese de um novo foto-fármaco, sob o registro US20130210756A1, constituído pelo derivado da clorofila Feoforbídeo modificado, quimicamente, com os quimioterápicos Doxorrubicina e Paclitaxel. Os autores não utilizaram sistemas carreadores, considerando apenas as implicações observadas para o fotossensibilizador modificado em comparação ao Feoforbídeo puro, não levando em consideração os processos auto-agregacionais característicos de espécies hidrofóbicas em meio aquoso.

Semelhantemente, Vernet (2007) registrou o título de propriedade temporária (US 20100255045 A1) da clorofilina (derivado da clorofila) associada a um antioxidante (alfa ou beta-hidroxi ácido) para rejuvenhecimento da pele. O autor incorpora os fármacos em sistemas biotransportadores compostos por uma matriz polimérica reticulada (hidrogel), não considerando os efeitos auto-agregacionais resultantes da liberação gradual do fotossensibilizador em meio aquoso.

De forma símil, Brandis *et al* (2000) garantiram propriedade de composições farmacêuticas compostas por ésteres de clorofila e bacterioclorofila, sob o

registro US 2003148926. A patente propõe uma série de derivados de clorofila e bacterioclorofila a partir de reações de transesterificação em diversos sítios ativos do anel tetrapirrólico. A distinção principal entre os derivados ésteres obtidos na patente supracitada e os explorados nesse trabalho (clorofilida de zinco e feoforbídeo) está na rota química demasiadamente complexa para os derivados ésteres, além do maior tempo de preparo que pode chegar a 14 dias de reação a elevadas temperaturas. Os derivados clorofilida de zinco e feoforbídeo apresentam efeito citotóxico foto-induzido comprovado e são obtidos por uma rota química simples e rápida. Em termos dos sistemas de solubilização, a patente supradita expõe a incorporação dos derivados em sistemas lipossomais, materiais de elevado custo e baixa estabilidade. Propomos a utilização de sistemas biotransportadores de baixo custo, compostos por nanopartículas de copolímeros tribloco da classe dos pluronics®, cujo princípio é solubilizar os fármacos hidrofóbicos (manutenção de suas propriedades fotofísicas) e interagir preferencialmente com células resistentes a múltiplos fármacos (inibir a ação da glicoproteína-P relacionada à RMD). Tais atributos, vinculados à inibição da Glicoproteína-P, favorecem a implementação de outras modalidades terapêuticas simultâneas ao tratamento via TFD, como a quimioterapia, com possibilidade de potencialização do efeito quimioterápico.

Da mesma forma, Albrecht (2003) sob o registro WO2004093980 (A1), reservou os direitos vinculados à ação do Feoforbídeo em meio homogêneo administrados em tempos pré-estabelecidos, para manter uma concentração maior no sítio tumoral em primazia as células saudáveis. Uma distinção marcante entre a patente citada e o presente trabalho está na ausência de processos de formulação. Neste trabalho propomos a incorporação dos fotofármacos em micelas copoliméricas que, por

garantirem maior estabilidade do FS no estado monomérico, exigem concentrações menores para eficácia terapêutica.

#### **1.2.4. Terapia de combinação de drogas.**

O desenvolvimento de medicamentos promissores requer da ciência o aprimoramento de investigações pautadas na ação conjunta de dois ou mais fármacos (Janet Woodcock, M.D., Joseph P. Griffin, J.D., and Rachel E. Behrman, M.D., 2011). Tal anseio está atrelado à ineficácia da terapia de agente único em muitos casos, derivada da heterogeneidade das células doentes e sua resistência a múltiplas drogas (RMD)(Harmsen et al., 2007; Shin et al., 2009; Tang et al., 2009). À vista disso, combinações entre agentes oferecem, além da possibilidade de resposta potencializada, retardo à resistência das células, elevando o grau de morte celular (Harmsen et al., 2007; Shin et al., 2009). Não obstante, os modelos clínicos tradicionais, mesmo reconhecendo a necessidade da implementação da terapia de combinação, avaliam a ação de um agente por vez, até mesmo para doenças nas quais a combinação é necessária (Janet Woodcock, M.D., Joseph P. Griffin, J.D., and Rachel E. Behrman, M.D., 2011).

A Food and Drug Administration (FDA), órgão governamental responsável pelo controle de alimentos, suplementos, medicamentos (humano e animal) e cosméticos, reconhece a importância da terapia de combinação de drogas. Com base nos pressupostos da FDA, a evolução desse paradigma requer o detalhamento da contribuição de cada medicamento no efeito global, o que muitas vezes é um desafio

clínico devido a efeitos sinérgicos ou antagônicos (Janet Woodcock, M.D., Joseph P. Griffin, J.D., and Rachel E. Behrman, M.D., 2011; Tallarida, 2001). A resposta a esse impasse, segundo as políticas da FDA, sugere a utilização da combinação de drogas para o tratamento de doenças de maior gravidade (câncer e doenças infecciosas), embora ofereça potencial atividade para melhora na resposta de uma série de tratamentos (Janet Woodcock, M.D., Joseph P. Griffin, J.D., and Rachel E. Behrman, M.D., 2011).

A combinação entre agentes terapêuticos pode ser avaliada sob a visão que leva em conta a interação medicamentosa dos compostos combinados. Por conta desse efeito, as respostas dos fármacos mistos podem revelar-se de três formas: *soma* dos efeitos individuais, um *efeito sinérgico*, onde se tem um resultado melhor que o esperado ou uma *resposta menor* do que o potencial individual de cada medicamento (Tallarida, 2001). O tratamento dos dados vinculados à dose-efeito dos fármacos isolados e combinados é complexo, rendendo inúmeros modelos, métodos, hipóteses e teorias discutidas em uma série de artigos de revisão, publicados desde longas datas até a atualidade (Chou & Talaly, 1977; Elion, Singer, & Hitchings, 1954; Greco, Bravo, & Parsons, 1995; Loewe, 1957; Miranda, Puig, Prieto, & Pinardi, 2006; Tallarida, 1992).

Hsueh-Lin Lu *et al* (2011) avaliaram o efeito da coadministração de Ftalocianina (Fc) e Doxorubicina (Dox), encapsulados em dendrímeros micelares ( $D_{mic}$ ). Os sistemas eram formados primeiramente pela combinação entre a ftalocianina com dendrímero aniônico, com posterior interação com os copolímeros em bloco (polietileno glicol e poli lisina PEG-PLL), formando um sistema complexo dendrímero micelar ftalocianina ( $D_{mic}Fc$ ). As nanoesferas ( $D_{mic}Fc$  com tamanho médio de 50 nm) combinadas com o quimioterápico Dox foram testadas em células da mama e avaliadas em termos do processo de internalização fotoquímica, ramo específico da TFD, cujo mecanismo envolve a

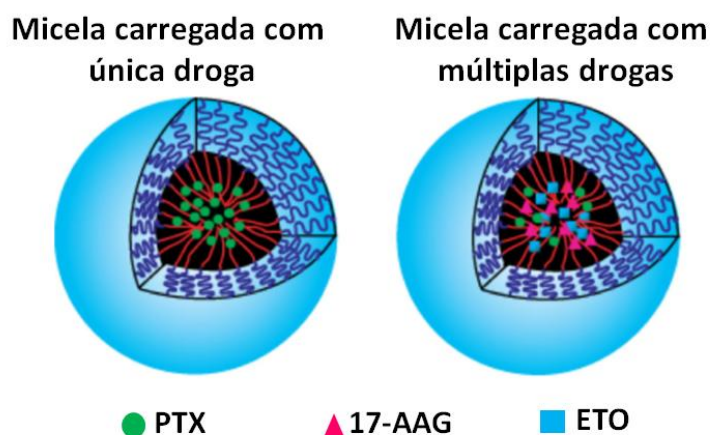
quebra da membrana endossomal/lisossomal (compartimentos ácidos que reduzem a concentração do fármaco Dox em processos de RMD) por fotoativação do FS. Os autores notaram que o sistema  $D_{mic}Fc$ , em presença de luz com comprimento de onda adequado, foi eficaz no rompimento da membrana lisossomal, corroborando para maior acúmulo do quimioterápico doxorubicina. Além disso, a combinação entre quimioterápico e fotossensibilizador ( $D_{mic}Fc$ -Dox) mostrou atividade antitumoral melhorada, comparado ao efeito do sistema  $D_{mic}Fc$  de forma isolada (Lu, Syu, Nishiyama, Kataoka, & Lai, 2011).

Da mesma forma, Lambert *et al* (2013) exploraram o efeito da naftoquinona  $\beta$ -lapachona combinada com o metil aminolevulinato, este último considerado pró-fármaco devido a sua rota biossintética que produz, de forma endógena, o FS protoporfirina. Segundo os autores, células cancerosas apresentam maior quantidade da enzima quinona oxireductase (NQO1) e, fármacos ativados por essa enzima, como as naftoquinonas que agem por mecanismo redox, devem mostrar efeito antineoplásico significativo. Aplicando a combinação em células MCF-7C3 foi verificada interação sinérgica e a combinação promissora no tratamento do câncer (Lamberti *et al.*, 2013).

Miranda *et al* (2006) estudaram o efeito antinociceptivo (redução da capacidade de perceber a dor) em camundongos, provocados pela co-administração (intraperitoneal e oral) de combinações entre o paracetamol e diferentes anti-inflamatórios não esteróides (diclofenaco, ibuprofeno, cetoprofeno, meloxicam, metamizol, naproxeno, nimesulida, parecoxib e piroxicam) (Miranda *et al.*, 2006). Os resultados obtidos pelos autores revelaram a presença do efeito sinérgico entre as espécies e a combinação vantajosa no tratamento da dor.

Shin, H. *et al* (2009) estudaram formulações em micelas de copolímeros em bloco compostos por poli(etileno glicol) e poli(D, L, ácido lático) (PEG-b-PLA) para solubilização de diferentes anticancerígenos, como paclitaxel (PTX), etoposide (ETO),

docetaxel (DCTX) e 17-alil-amino-17- demetioxigeldanamicin (17-AAG), forma individual e combinada, conforme Figura 7 (Shin et al., 2009).



**Figura 7.** Representação da micela copolimérica (PEG-b-PLA) proposta por Shin, H. et al (2009).

Os autores observaram a ausência de mudanças na dimensão micelar, maior capacidade de carga (97% do fármaco imobilizado) e estabilidade para micelas com três medicamentos incorporados. Além disso, por meio da técnica de espectroscopia de RMN  $H^1$ , estimaram a localização dos antineoplásicos na forma isolada e mista nas micelas de (PEG-b-PLA), verificando que os mesmos encontram-se no core hidrofóbico. Os autores constataram que todos os medicamentos, seja na forma individual ou combinada, foram significativamente solubilizados e mantiveram-se estáveis por 24 horas nos sistemas micelares, sobretudo para os compostos combinados sendo, portanto, um sistema carreador promissor para terapia de associação de drogas (Shin et al., 2009).

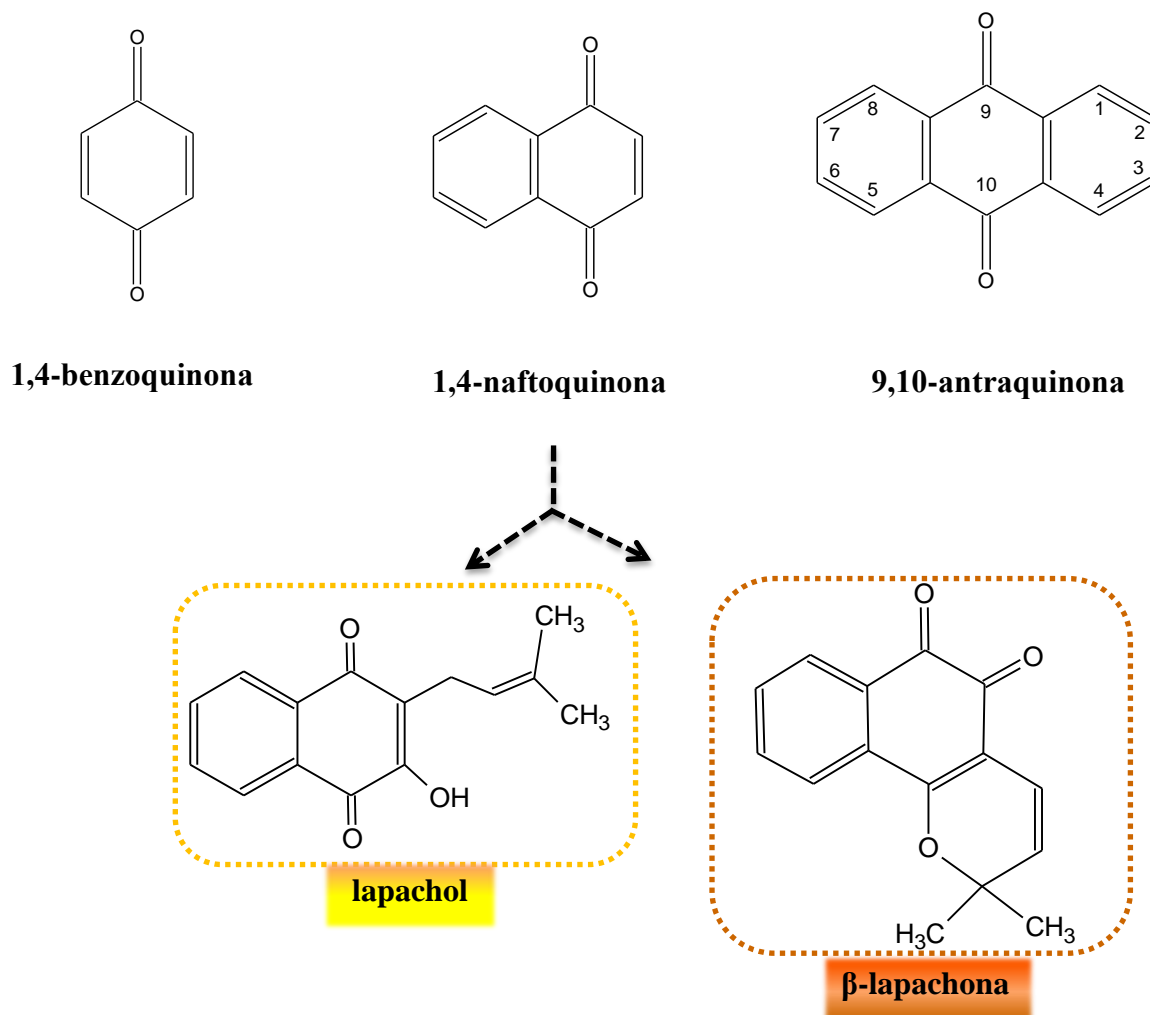


Diante do exposto, o presente trabalho buscou investigar sistemas combinados para tratamento fotodinâmico, constituídos por um fármaco potencialmente antineoplásico, cuja atividade não depende da luz (como as naftoquinonas lapachol e  $\beta$ -lapachona – Figura 8), simultâneo a um fotossensibilizador (derivados de clorofila Pheid e Zn-Chld – Figura 6). Com base nos pressupostos reportados na literatura, a combinação de fármacos busca potencializar a atividade terapêutica global incluindo uma etapa adicional no tratamento não dependente da luz (ação das naftoquinonas). Da mesma forma, o sistema de formulação visa contribuir em melhorias na biodistribuição, manutenção das propriedades fotofísicas do FS, aumentar o tempo de circulação além de tornar o processo de liberação dos fármacos reprodutível, devido à estreita distribuição de tamanho das micelas formadas.

### **1.2.5. Naftoquinonas**

As quinonas são classificadas como metabólitos secundários, isto é, são compostos não participantes das funções de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Em termos estruturais, as quinonas são obtidas a partir da oxidação dos fenóis, formando dois grupos carbonílicos e um sistema conjugado (Hussain et al., 2007; Ough et al., 2005).

A literatura considera a presença de três classes principais de compostos quinolínicos: as benzoquinonas, com a presença de um anel benzênico, naftoquinonas, com um anel naftalênico e antraquinonas, com um anel antracênico. (Figura 8). Na natureza já foram comprovadas a presença de aproximadamente 1500 quinonas, cujas funções são distintas e dependentes do tipo de organismo vivo (Hussain et al., 2007; Ough et al., 2005).



**Figura 8.** Estrutura química das quinonas.

Nos últimos anos tem aumentado o interesse nas pesquisas das naftoquinonas, em especial o lapachol e  $\beta$ -lapachona, devido a sua eficácia terapêutica. O lapachol é extraído da casca do Ipê Roxo (gênero *Tabebuia avellanae* pertencentes à família Bignoniaceae), facilmente encontrado em regiões norte e nordeste do Brasil (Hussain et al., 2007). O isômero  $\beta$ -lapachona (Figura 8) é obtido a partir do lapachol por meio de tratamento ácido. O estudo de tais compostos desperta o interesse das indústrias farmacêuticas devido a uma série de propriedades particulares, como: efeito antitumoral (Hussain et al., 2007; Ough et al., 2005), bactericida (Guiraud, Steiman,

Campos-Takaki, Seigle-Murandi, & Simeon de Buochberg, 1994; Pereira et al., 2006), malaricida, inibidora do HIV-1, anti-inflamatória (Moon, Choi, Kim, Park, & Kim, 2007), tripanocida (Goulart, Falkowski, Ossowski, & Liwo, 2003), Leishmanicida (Hussain et al., 2007), antifúngica (Medeiros et al., 2010) e efeitos contra larvas *Aedes aegypti* (Hussain et al., 2007).

Maeda *et al* (2008) estudaram *in vitro* e *in vivo* a atividade do lapachol como inibidor de metástase de células de melanoma B16BL6. Os ensaios *in vitro* foram conduzidos utilizando uma concentração etanólica de 40 mmol L<sup>-1</sup> de lapachol (a mesma quantidade de etanol foi adicionada ao controle). Os testes *in vivo* utilizaram camundongos BALB machos e seguiram os procedimentos relatados nas diretrizes da Comissão de Animais Experimentais em Kanazawa University Medical. Os autores observaram um aumento da metástase em ratos com deficiência das células T e NK, tratados com doses elevadas (tóxicas 80-100mg/kg) do fármaco. Esse efeito foi vinculado a um estado de hipercoagulabilidade induzido pelo lapachol, conhecido antagonizada vitamina K. Por outro lado, a administração oral de baixas concentrações da naftoquinona (5-20 mg/kg) suprime significativamente a metástase, o que sugere uma possível utilização como agente anti-metastático (Maeda, Murakami, Takegami, & Ota, 2008).

Macedo *et al* (2013) estudaram a atividade antimicrobiana do lapachol e  $\beta$ -lapachona combinados a seis diferentes antimicrobianos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, gentamicina, ciprofloxacina e meropenem) contra o agente etiológico *Staphylococcus aureus*, causador de grande parte das infecções hospitalares. Os autores verificaram maior capacidade inibitória para a  $\beta$ -lapachona, onde a concentração inibitória mínima (CIM) variou de 8-32  $\mu$ g/mL. Das estirpes de *S. aureus* estudadas, quatro foram resistentes a todos antimicrobianos testados. A linhagem que

mostrou maior resistência a  $\beta$ -lapachona foi escolhida (CIM = 32  $\mu\text{g/mL}$ ) para os testes de interação entre a naftoquinona e antimicrobianos. Segundo Macedo *et al* (2013) a adição da  $\beta$ -lapachona potencializou a atividade anti-estafilocócica de todos os agentes antimicrobianos, exceto para a combinação com cefoxitina contra estirpes resistentes (LFBM 31 e LFBM 33). A atividade sinérgica foi detectada por uma redução significativa CIM ( $\geq 87,5\%$ ) e determinada pelo Índice de Concentração Inibitória Fractional para todos os agentes antimicrobianos combinados com a  $\beta$ -lapachona (Macedo et al., 2013).

No Brasil, o LAFEPE (Laboratório Farmacêutico de Pernambuco) comercializa cápsulas com 250 mg de lapachol para tratamento de neoplasias malignas, como Sarcoma de Yoshida, carcinosarcoma de Walker, adenocarcinoma, carcinomas escamosos do aparelho digestivo, epidermóide do colo de útero ou ainda como adjuvante na quimioterapia. Um dos efeitos prescritos no campo de indicações da bula do medicamento é a redução das dores em pacientes com neoplasias malignas. O uso difundido da casca do Ipê roxo, comercializado como “Pau d’arco”, em Pernambuco talvez esteja vinculado ao fato da região ser o berço dos estudos da aplicação do lapachol na terapêutica (Vasconcelos, Feitosa, Maria, Xavier, & Randau, 2011). Entretanto, a disseminação da eficácia levou vários laboratórios de diferentes países a comercializar e exportar formulações ricas em lapachol como suplemento medicamentoso (Figura 9).



**Figura 9.** Medicamentos ricos em lapachol comercializados em diversas localidades, entre elas (a) Califórnia, Nebraska e Iowa, (b) desenvolvido por convênio firmado entre Brasil e Universidade de Teykio (Japão) conveniada a Empresa Tradepia Corporation, (c) Estados Unidos, Bélgica, Bulgária, Colômbia, Croácia, França, Alemanha, Israel, Itália, Coreia, Peru, Portugal, Venezuela, Kuwait, entre outros, (d) Estados Unidos, (e) Portugal e (f) Espanha.

Segundo a LAFEPE, os medicamentos com o fitofármaco  $\beta$ -lapachona são promissores para o tratamento de câncer e encontram-se em fase de avaliação em pacientes pela Anvisa (Freitas-Neto et al., 2012).

Dessa forma, considerando a eficácia terapêutica do lapachol e  $\beta$ -lapachona, buscou-se investigar o efeito aditivo das naftoquinonas em sistemas combinados com os FS (feoforbídeo e clorofilida de Zn) para aplicação na Terapia fotodinâmica. O primórdio desse estudo será centrado na caracterização físico-química e fotofísica dos FS na presença dos adjuvantes, investigando possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos das espécies combinadas.

### **1.2.6. Sistemas de formulação**

Conhecer a natureza lipofílica dos fármacos é de extrema importância para prever suas propriedades farmacocinéticas. Assim, estudos amparados em substratos utilizados como sistemas modelos, como as micelas poliméricas, têm servido para prognosticar seu transporte, biodistribuição, acumulação e eficácia (Peetla, Stine, & Labhasetwar, 2009; Sarpietro et al., 2011). A razão para a dada comparação está atrelada a similaridade em termos de complexidade da micela copolimérica e a membrana celular.

A presença de distintos microdomínios micelares, ditos como hidrofóbico e hidrofílico, permitem estimar a tendência de partição do medicamento de acordo com a região em que o mesmo foi solubilizado. Comparado a outros modelos de membranas, as micelas poliméricas apresentam como vantagens: a mínima toxicidade, distribuição estreita de tamanho, maior tempo de permanência no sistema circulatório, biodisponibilidade melhorada e maior estabilidade do fotossensibilizador incorporado (A. George, 2011).

Por um lado, compostos hidrofóbicos apresentam maior interação com membranas celulares (Peetla et al., 2009), por outro, em meio aquoso, estas espécies tendem a formar auto-agregados que, além de reduzir drasticamente o  $\Phi_{\Delta}^1O_2$ , podem provocar dor no ato da administração intravenosa ou ainda morte devido à obstrução de artérias por precipitados (Simplicio et al., 2002). Dessa forma, além de servir como sistema modelo, as micelas poliméricas têm sido uma alternativa vantajosa para superar os problemas de solubilidade e estabilidade dos agentes terapêuticos (van Nostrum, 2004).

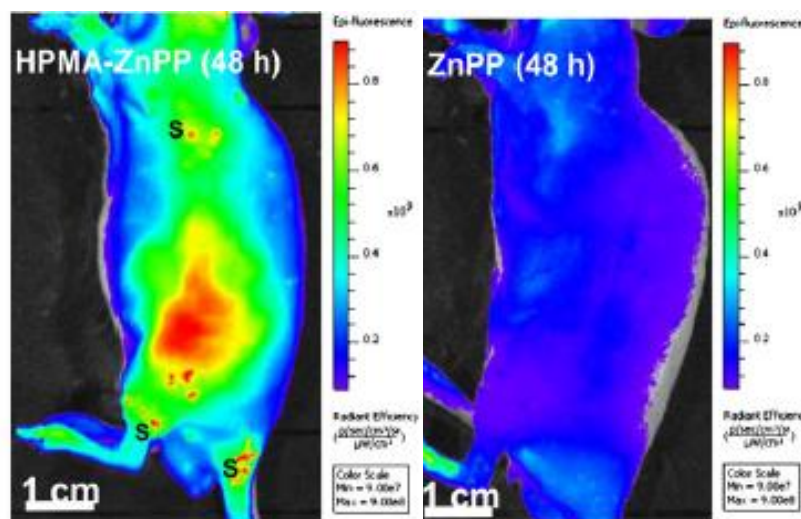
Em termos de constituição, as micelas poliméricas são formadas por um núcleo hidrofóbico, composto por segmentos de óxido de propileno (OP) que pode facilitar a solubilização de fármacos lipofílicos, envolto por uma camada exterior hidrofílica de grupos óxido de etileno (OE) (Figura 12) (Trubetskoy, 1999; van Nostrum, 2004). O balanço hidrofóbico é determinado pelo tamanho dos segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos OE-OP-OE (Wanka, Hoffmann, & Ulbricht, 1994).

A utilização de polímeros coloidais como biotransportadores de fármacos tem sido extensivamente estudada devido a algumas características específicas, como: *i*) tamanho das nanoesferas formadas (10-100 nm), *ii*) longa circulação, sendo dificilmente reconhecidos e internalizados pelo sistema retículo endotelial, *iii*) capacidade de solubilizar drogas hidrofóbicas (P. Liu, Wang, & Weili Qiao, 2008), *iv*) maior interação com as células com resistência a múltiplos fármacos (RMD), *v*) internalizados pelas células doentes comumente exercem influência sobre a mitocôndria, causando a redução na produção de ATP e consumo de oxigênio (Alakhova et al., 2010) e *vii*) inibe a Glicoproteína-P, responsável pelo efluxo de drogas, permitindo maior acumulação do fármaco no meio intracelular (efeito anti-RMD) (Alakhova et al., 2010; Kabanov, Batrakova, & Alakhov, 2002).

Diversos trabalhos reportam a eficiência das micelas poliméricas na solubilização de drogas hidrofóbicas. Zhao, Y. et al (2011) estudaram as propriedades físico químicas da doxorubicina (DOX) imobilizada quimicamente e fisicamente no copolímero micelar F-68. Os resultados observados pelos autores demonstraram melhores efeitos para as micelas copoliméricas modificadas quimicamente com DOX, seja nas propriedades físico-químicas (tamanho, CMC, liberação prolongada) comparada ao sistema de formulação e aprisionamento convencional do fármaco. Da mesma forma, testes em células de carcinoma de pulmão (linhagem A549)

demonstraram que a modificação química proposta pode aumentar a atividade antitumoral (Zhao et al., 2011).

De forma análoga, Nakamura, H. et al (2012) estudaram um conjugado formado pela modificação química do copolímero neutro HPMA (N-2-hidroxipropil metacrilamida) com protoporfirina de zinco (ZnPP). Segundo os autores, o conjugado formou macromoléculas circulares (diâmetro de  $82,8 \pm 41,8$  nm) composta por cadeias de menor peso molecular. As avaliações de citotoxicidade *in vivo*, utilizando luz de Xenon (normalmente usada em endoscopia convencional, em 420 nm), demonstraram que o FS apresenta maior tempo de permanência no organismo e encontra-se estabilizado no estado monomérico, atuando na geração de oxigênio singleto. Além disso, os autores observaram que os sistemas micelares HPMA-ZnPP podem ser úteis para imagiologia de tumores, conforme Figura 10. Segundo os autores, a relação entre os resultados de fluorescência obtidos para o sistema micelar (HPMA-ZnPP) comparado a ZnPP em meio homogêneo demonstraram a monomerização do FS e maior afinidade do conjugado pelo tecido tumoral (Nakamura et al., 2013).

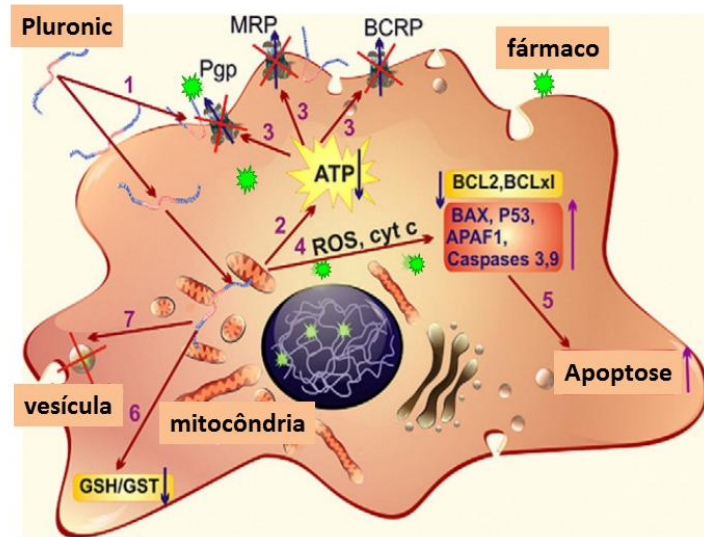


**Figura 10.** Aplicação de HPMA-ZnPP e ZnPP (meio homogêneo) em ratos, utilizando endoscopia com lâmpada de Xenon. Adaptado de Nakamura, H. et al (2012).



Segundo Batrakova, E. *et al* (2008), os polímeros micelares utilizados como biotransportadores oferecem outras vantagens, além da estabilização, proteção e melhora na biodistribuição do medicamento. Esse paradigma está prestes a sofrer uma evolução substancial devido a fortes indícios que levam a crer que esses compostos são capazes de atuar preferencialmente em células cancerosas específicas (resistentes), exercendo uma atividade potencializadora (Batrakova & Kabanov, 2008).

Os mecanismos complexos relacionados aos efeitos dos pluronics em células RMD foram exaustivamente estudados. Há evidências que tais compostos são: (1) incorporados pela membrana, resultando em modificações em sua microviscosidade; (2) internalizado pelas mitocôndrias interferindo nas etapas da respiração celular, causando redução nos níveis de ATP; (3) inibidores de proteínas responsáveis pelo efluxo de drogas (Glicoproteína-P); (4) responsáveis pela liberação do citocromo C, aumentando os níveis de EROS no citoplasma, além de favorecer a sinalização pró-apoptótica e decrescimento da defesa anti-apoptótica em células RMD; (5) inibidores da glutathione/glutathione sistema S-transferase de desintoxicação e (6) impedidores do sequestro de medicamento por vesículas citoplasmáticas. A Figura 11 representa as etapas preconizadas por Batrakova e colaboradores.

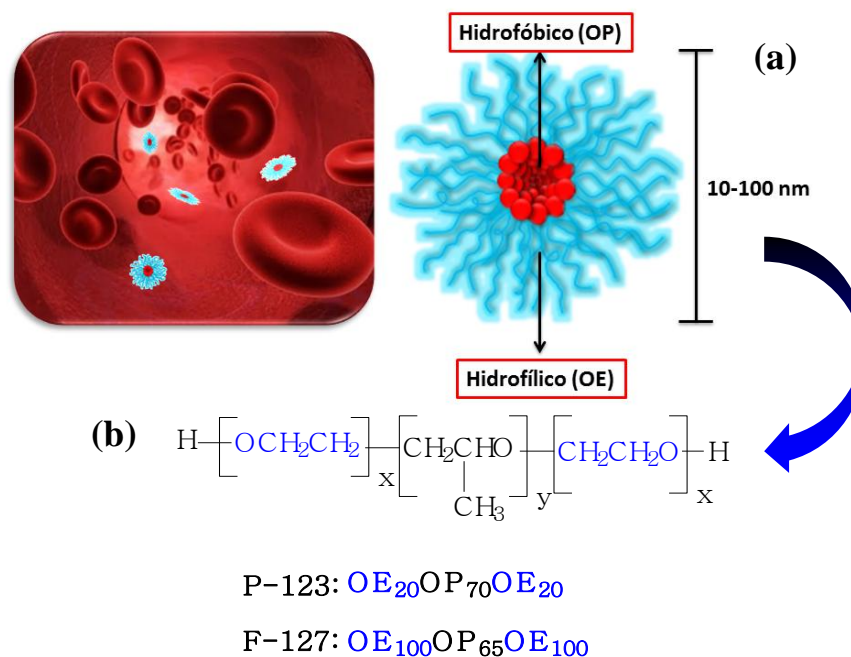


**Figura 11.** Efeitos do Pluronic em células RMD, com sinalização das etapas de dano. Adaptado de Batrakova, E. V. *et al* (2008).

Além disso, os autores verificaram efeitos mais pronunciados em condições abaixo da CMC, sugerindo que os unímeros são os responsáveis por tais propriedades modificadoras. Uma verificação importante reportada pelos autores e que fundamenta essa condição, é que a região hidrofóbica dos copolímeros (OP) é responsável por interagir e modificar a microviscosidade da membrana. Dessa forma, para que exista essa interação é preciso que a concentração de surfactante polimérico seja baixa (abaixo da CMC), caso contrário os unímeros se organizaram na forma de micelas, onde os grupamentos hidrofóbicos irão compor o núcleo micelar, com menor acesso a membrana plasmática (Batrakova & Kabanov, 2008).

Dentro da classe dos copolímeros micelares destacam-se poloxâmeros, surfactantes tribloco comercializados com o nome de Pluronic®. Tais surfactantes copolímeros são compostos por unímeros que apresentam um centro hidrofóbico, formado por grupos óxido de propileno (OP) e extremidades hidrofílicas, constituídas

por grupos óxido de etileno (OE) (Figura 12). Sob condições de concentração e temperatura específica, os unímeros se rearranjam na forma de micelas poliméricas, cujo tamanho pode variar de 10-100 nm (Bakshi & Sachar, 2006; Roux, Douh ret, & Roux-Desgranges, 2005; Sharma & Bhatia, 2004).



**Figura 12.** Representação esquemática dos copolímeros micelares sendo (a) constituição da micela polimérica formada pelos surfactantes pluronics® e (b) estrutura dos poloxâmeros P-123 e F-127.

Além da baixa toxicidade e CMC, comparada aos surfactantes usuais, os pluronics® podem variar a hidrofobicidade da micela alterando o número de unidades repetitivas das cadeias hidrofílicas (OE) ou hidrofóbicas (OP). Nesse sentido, um aumento dos segmentos hidrofílicos contribui para a melhora na capacidade de solubilização de moléculas de menor hidrofobicidade e, da mesma forma, um aumento no tamanho da porção composta por grupos OP favorecem um core com maior tamanho e capacidade de solubilização de fármacos hidrofóbicos (Torchilin, 2001).

A TMCe CMC dos surfactantes poliméricos denotam a temperatura e concentração limite a partir da qual se tem a formação de micelas poliméricas. A baixa CMC dos surfactantes poliméricos (na ordem de  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) oferece a vantagem de resistência aos efeitos de diluição do formulado no plasma sanguíneo. De forma análoga, a TMC oferece a vantagem de agregar efeitos termo-responsivos, fazendo com que a micela polimérica torne-se um gel a temperatura do corpo. Essas características permitem a prevenção da aderência das micelas nos tecidos e vantagens no perfil de liberação, descrevendo o sistema como promissor para aplicações clínicas (Cohn, Sosnik, & Levy, 2003).

### **1.3.Objetivos**

Investigar as propriedades físico-químicas (propriedades espectroscópicas de solubilidade, organização estrutural e interação com os copolímeros micelares) do lapachol e da  $\beta$ -lapachona em meio homogêneo, constituído por solventes de diferentes polaridades e, em meio micro-heterogêneo, composto por micelas formadas pelos copolímeros micelares da classe dos pluronics<sup>®</sup> F-127 e P-123. Caracterizar por técnicas ópticas (espectroscopia de absorção eletrônica e emissão de fluorescência) os formulados multi-componentes obtidos pela combinação das naftoquinonas com os fotossensibilizadores (FS) derivados da Clorofila (feoforbídeo e clorofilida de zinco), incorporados em sistemas biotransportadores, visando aplicações em TFD e Inativação Fotodinâmica de Microorganismos (IFDMO).

# **Metodologias de Análises Físico-Químicas**

## **1.4. Metodologias de Análises Físico-Químicas**

### **1.4.1. Materiais**

O lapachol (Figura 8) foi obtido a partir da serragem do Ipê roxo, segundo a metodologia de extração proposta por Barbosa e Neto (2013). O derivado  $\beta$ -lapachona (Figura 8) foi preparado a partir do lapachol, conforme procedimento reportado no mesmo trabalho. Os compostos foram caracterizados por RMN  $^1\text{H}$  e FTIR-ATR atestando elevado grau de pureza.

A extração da Clorofila *a* (Mg-Chl) da folha do espinafre seguiu a metodologia descrita por Jubert e Bailey (2007). O derivado Pheid foi preparado a partir da Mg-Chl, seguindo a metodologia proposta por Hynninen e Lotjonen (1980) e a Zn-Chld obtida através da metalação do Pheid, conforme procedimento descrito nos trabalhos de Gerola *et al* (2011). A clorofila e seus derivados (Figura 6) foram caracterizados por seus espectros de absorção eletrônica UV-Vis (espectrofotômetro DU800, acoplado ao sistema controlador de temperatura do tipo peltier da Beckman) e emissão de fluorescência (espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian/Agilent Technologies) (Gerola *et al*, 2011; Chen *et al*, 2010). Os surfactantes poliméricos da classe dos pluronics<sup>®</sup> P-123 (MM= 5800 g.mol<sup>-1</sup>) e F-127 (MM= 12600 g.mol<sup>-1</sup>) (Figura 12) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes e demais reagentes empregados foram de grau analítico (P.A.) e utilizados sem purificação prévia.

## 1.5. Métodos

### *Propriedades espectroscópicas das naftoquinonas em meio homogêneo*

#### 1.5.1. Determinação da absortividade molar ( $\epsilon$ ) do lapachol e da $\beta$ -lapachona em etanol, diclorometano e octanol

Os espectros de Absorção eletrônica UV-Vis e emissão de fluorescência do lapachol e  $\beta$ -lapachona foram obtidos, respectivamente, nas concentrações de  $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , para experimentos envolvendo a análise dos espectros de absorção eletrônica e,  $4,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e  $3,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para medidas de emissão de fluorescência, respectivamente. Os valores de coeficiente de absortividade molar ( $\epsilon$ ) das naftoquinonas em etanol, diclorometano e octanol foram determinados a partir de diluições acompanhadas pela aquisição dos espectros de Absorção eletrônica UV-Vis. A partir dos espectros de absorbância *versus* concentração molar das espécies, determinaram-se os valores de  $\epsilon$  obtidos pela lei de Lambert-Beer, Equação 1, (Y. Li, Scales, Blankenship, Willows, & Chen, 2012). Todas as análises foram realizadas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$$\text{Abs} = b \cdot c \cdot \epsilon \qquad \text{Equação 1}$$

Sendo: *Abs* a Absorbância, *b* o caminho óptico (1 cm) e *c* a concentração da naftoquinona ( $\text{mol L}^{-1}$ ).



### **1.5.2. Comportamento espectroscópico do lapachol e da $\beta$ -lapachona em meio homogêneo monofásico constituído de mistura água/ etanol**

Com o intuito de investigar as possíveis formas auto-agregadas das naftoquinonas em solução, foram realizados estudos espectroscópicos por absorção eletrônica UV-Vis e emissão de fluorescência dos compostos em sistema binário homogêneo, composto por diferentes proporções de água/etanol (V/V). Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos a partir de soluções de lapachol ( $4,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\beta$ -lapachona ( $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), enquanto que os espectros de emissão de fluorescência foram adquiridos a partir de concentrações  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para ambas as espécies nas diferentes proporções das soluções binárias monofásicas. Os espectros foram coletados após 15 minutos de estabilização (a fim de obter medidas no equilíbrio), a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  (Vilsinski, 2013).

### **1.5.3. Determinação do pKa do lapachol em mistura de solventes água/etanol**

A determinação do pKa do lapachol em meio homogêneo, constituído por uma mistura binária homogênea água/etanol 50:50 (V/V), foi realizada por espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis, utilizando-se soluções tampões (Tampão Fosfato e Ácido cítrico  $0,32 \text{ mol L}^{-1}$  até pH 8 e tampão cloreto de potássio e Ácido bórico  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  para pH 8,5 até 10,3) com força iônica constante ( $\text{NaCl} = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e pH variando entre 2,7 e 10,3. Neste experimento, alíquotas de  $44,3 \text{ } \mu\text{L}$  de uma

solução estoque de lapachol em etanol ( $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram adicionadas às soluções nas cubetas (2 mL) contendo tampão em mistura de água/etanol 50:50 (V/V), obtendo-se uma concentração de lapachol de  $2,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Os dados foram avaliados pelo método univariado, utilizando a Equação 2 para o ajuste da sigmóide e, pelo método quimiométrico multivariado (Batistela et al., 2011; Freisinger, 2007; Sena, Collins, Collins, & Scarminio, 2001). As medidas foram realizadas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$$A_{total} = \frac{A_{lap} + A_{lapH} 10^{(pka-pH)}}{1 + 10^{(pka-pH)}} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo  $A_{lap}$  a absorvância da forma iônica e  $A_{lapH}$  a absorvância da forma neutra do lapachol (Freisinger, 2007).

#### **1.5.4. Determinação do coeficiente de partição ( $K_p$ ) água/octanol para as naftoquinonas**

A determinação do coeficiente de partição ( $K_p$ ) dos compostos no sistema bifásico água/octanol foi realizada com o intuito de avaliar o grau de hidrofobicidade dos mesmos, que reflete a tendência das espécies em distribuir-se entre as biomoléculas hidrofóbicas (exemplo membranas celulares) ou soluções aquosas (plasma sanguíneo) (Shojaei, Linforth, & Taylor, 2007).

Em um funil de separação contendo 30 mL da mistura água/octanol a 50% (V/V), adicionou-se a naftoquinona ( $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). Após agitação vigorosa e repouso de 48 horas no escuro, determinou-se a concentração da espécie na fase aquosa e

orgânica por absorção eletrônica UV-Vis, a 30,0 °C. O coeficiente de partição foi calculado pela Equação 3 (dos Santos et al., 2013; Pellosi et al., 2012).

$$K_P = \frac{[\text{Naft}]_{\text{oct}}}{[\text{Naft}]_{\text{água}}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $[\text{Naft}]_{\text{oct}}$  corresponde à concentração da naftoquinona em octanol e  $[\text{Naf}]_{\text{água}}$  à concentração em água.

*Propriedades físico-químicas das naftoquinonas incorporadas nos sistemas micelares biotransportadores P-123 e F-127.*

**1.5.5. Determinação do  $pK_{a_{ap}}$  do lapachol em micelas poliméricas de P-123 e F-127**

A determinação do  $pK_{a_{ap}}$  do lapachol foi realizada por espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis, utilizando-se soluções tampões (Tampão Fosfato e Ácido cítrico 0,32 mol L<sup>-1</sup> até pH 8 e tampão cloreto de potássio e Ácido bórico 0,2 mol L<sup>-1</sup> para pH 8,5 até 10,3) com força iônica constante (NaCl = 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e pH variando de 3,5 a 9,5 para o sistema em P-123 e 3,5 a 8,0 para o sistema em F-127. Neste experimento alíquotas de 44,3 µL de uma solução estoque de lapachol em etanol

( $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram adicionadas às soluções nas cubetas contendo tampão e copolímero 2% (m/V;  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para F-127 e  $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para P-123) totalizando 2 mL, atingindo-se uma concentração de lapachol de  $2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . As medidas foram realizadas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Da mesma forma, os dados foram analisados pelo método univariado e quimiométrico multivariado, utilizando a Equação 2 para o ajuste dos gráficos de perfil sigmoidal obtidos (Batistela et al., 2011; Freisinger, 2007; Sena et al., 2001).

#### **1.5.6. Estudo da interação das naftoquinonas com F-127 e P-123: análise da isoterma de Ligação ( $K_b$ )**

As investigações sobre a interação primária das naftoquinonas ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) com os copolímeros micelares foram realizadas em duas condições:

- i) Por titulações das naftoquinonas inicialmente em água destilada (pH 5,0) com soluções estoques dos copolímeros F-127 (4% m/V;  $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e P-123 (4% m/V;  $6,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso (Pellosi et al., 2012).
- ii) Para o lapachol, devido ao seu valor de pKa encontrar-se próximo ao pH fisiológico, buscou-se avaliar separadamente o perfil de interação das micelas copoliméricas com as formas protolíticas (lapachol na forma neutra e lapachonato). Para tal, foram realizadas titulações do mesmo em tampões ácidos (pH 4,5) e básicos (pH 8). Os estoques dos copolímeros F-127 (4% m/V;  $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e P-123 (4% m/V;  $6,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparados nos respectivos pHs (Nascimento & Tabak, 1994).

Os estudos de interação foram efetuados por meio de titulação das naftoquinonas, nas condições *i*) e *ii*) descritas acima, com alíquotas de uma solução estoque de F-127 e P-123, preparadas em meio aquoso ou nos respectivos pHs, com concentração de F-127 e P-123 variando de 0 a  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . O monitoramento da interação foi feito por espectro de emissão de fluorescência, a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , no tempo inicial ( $T_0$ ) (condição *i* e *ii*) e após o equilíbrio ( $T_{eq}$ ) (após 48 horas, somente para condição *i*), com o objetivo de avaliar efeitos de auto-agregação e reorganização do fármaco no micro ambiente micelar (Vilsinski, 2013). O valor da constante de ligação ( $K_b$ ) foi determinado a partir da Equação 4.

$$F = F_f + \frac{(F_o + F_f)}{\left(\frac{1}{K_b([S] - CMC)^n} + 1\right)} \quad \text{Equação 4}$$

Onde  $F$  corresponde à intensidade de fluorescência,  $F_f$  emissão da naftoquinona ligada ao surfactante,  $F_o$  a emissão na ausência de surfactante,  $[S]$  a concentração de surfactante,  $CMC$  a concentração micelar crítica e  $n$  o número de micelas copoliméricas por molécula de fármaco (Caetano & Tabak, 1999).

### **1.5.7. Formulação das naftoquinonas incorporadas em nanoesferas de Poloxâmeros ®**

A incorporação do lapachol ( $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\beta$ -lapachona ( $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) nos copolímeros micelares F-127 (0,8% m/V;  $6,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) e P-123 (1,4% m/V;

$2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ), na proporção 1:1 (fármaco:micela) (Wanka et al., 1994), foi realizada pela técnica de dispersão sólida (Aruna, Babu, Thadanki, & Gupta, 2011; Sinha et al., 2010; Zhang, Jackson, & Burt, 1996). Esse método consiste na co-solubilização do fármaco e do copolímero em solvente orgânico (etanol), seguido da evaporação do solvente e formação da matriz sólida. Esta foi deixada sob vácuo por aproximadamente 12 horas e posteriormente hidratada com água destilada, a  $70,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação vigorosa por 4 horas. Após a completa solubilização, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completado com água destilada. O mesmo procedimento foi realizado sem a adição do fármaco, para obter o “branco” ou referência nas medidas. Os formulados obtidos foram caracterizados por técnicas ópticas de análise (absorção eletrônica e emissão de fluorescência) a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

O cálculo da razão fármaco/micela levou em consideração o número de agregação dos copolímeros proposto por Wanka *et al* (1994), sendo  $N_{ag} = 222$  para o P-123 e  $N_{ag} = 67$  a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os formulados foram preparados com a concentração de copolímero necessária ( $8,0 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$  de F-127 e  $1,4 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  de P-123) para que se tenha um fármaco solubilizado por micela copolimérica (Wanka et al., 1994).

### **1.5.8. Estabilidade temporal e influência do efeito térmico na organização estrutural das naftoquinonas incorporadas em P-123 e F-127.**

A estabilidade das naftoquinonas incorporadas nos sistemas nano-estruturados biotransportadores foi avaliada acompanhando-se uma alíquota (2 mL) durante 25 dias, por espectros de absorção eletrônica UV-Vis dos componentes estudados. Também foram realizados estudos da estabilidade e organização molecular

em função da temperatura, monitorando-se suas propriedades ópticas em temperaturas entre 14,0 e 30,0 °C, isto é, em condições acima e abaixo dos valores da temperatura micelar crítica destes copolímeros (Vilsinski, 2013).

***Preparo e caracterização do formulado misto, composto por Naftoquinona-Pheid e Naftoquinona-ZnChld, incorporados nos sistemas micelares P-123 e F-127.***

### **1.5.9. Formulação da naftoquinona simultâneo ao FS nos copolímeros micelares P-123 e F-127 pelo método de dispersão sólida**

Os formulados mistos foram obtidos seguindo o mesmo procedimento descrito na seção 1.5.7. para as naftoquinonas. Nesse caso, a matriz sólida foi preparada pela solubilização do surfactante P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) ou F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), naftoquinona (lapachol  $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> ou  $\beta$ -lapachona  $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), juntamente com um dos derivados da clorofila (Pheid ou Zn-Chld, ambos  $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) (Aruna et al., 2011; Sinha et al., 2010; Zhang et al., 1996) na proporção 1:1 (fármaco/micela) (P Alexandridis, Athanassiou, & Hatton, 1995; Wanka et al., 1994). Nessa etapa obtiveram-se oito formulados, sendo quatro em cada um dos poloxâmicos (Pheid/Lap-Copolímero, Pheid/ $\beta$ -lap-Copolímero, Zn-Chld/Lap-Copolímero e Zn-Chld/ $\beta$ -lap-Copolímero). A caracterização espectroscópica dos compostos formulados foi obtida por espectros de absorção eletrônica UV-Vis e emissão de fluorescência.

Semelhantemente ao apresentado na seção 1.5.7., os cálculos da razão fármaco/micela consideraram o número de agregação dos copolímeros proposto por

Wanka *et al* (1994) ( $N_{ag} = 222$  para o P-123 e  $N_{ag} = 67$  a  $30,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Os formulados mistos, da mesma forma, foram preparados com a concentração de copolímero necessária ( $9,7 \times 10^{-3}$  g/mL para F-127 e  $1,7 \times 10^{-3}$  g/mL para P-123) para que se tenha um fármaco (naftoquinona ou fotossensibilizador) solubilizado em cada micela copolimérica (Wanka *et al.*, 1994).

### **Estudos das propriedades fotofísicas do formulado misto: Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) e de oxigênio singlete ( $\Phi^1\text{O}_2$ ).**

#### **1.6.0. Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) das Clorofilas em etanol (contendo as naftoquinonas) e no formulado misto**

Para a determinação do  $\Phi_F$  foi utilizado como padrão o Pheid em etanol ( $\Phi_{F_p} = 0,28$ ), conforme procedimento reportado por Eichwurzel (2000). Os derivados clorínicos foram excitados na banda Soret ( $\lambda_{exc}$  variando de 433 a 437 nm) e a leitura registrada na região de 600 a 800 nm. Os valores de  $\Phi_F$  foram obtidos a partir da Equação 5 (Eichwurzel, Stiel, & Röder, 2000; Gerola, Tsubone, *et al.*, 2011).

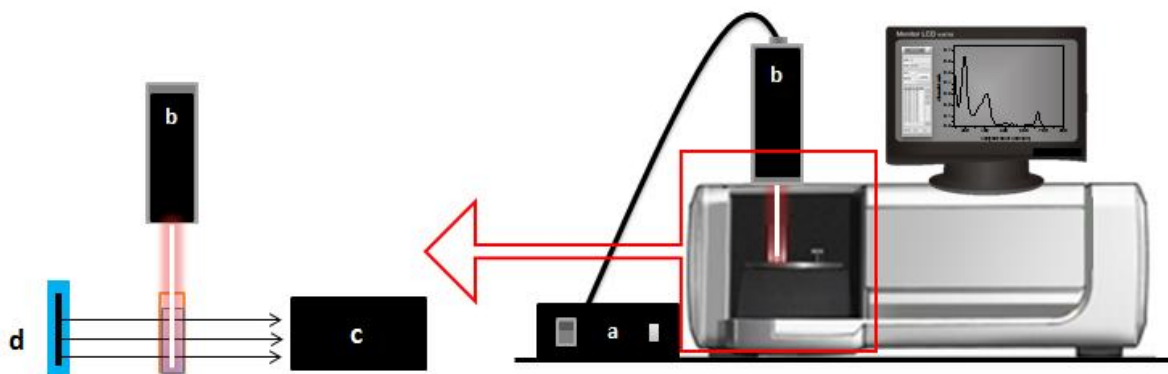
$$\Phi_F = \frac{Abs_p F_m n_p^2}{Abs_m F_p n_m^2} \Phi_{F_p} \quad \text{Equação 5}$$



Sendo  $F_p$  referente ao padrão,  $m$  referente aos derivados da clorofila no formulado misto,  $n$  correspondente ao índice de refração e  $F_m$  (ou  $F_p$ ) a área do espectro de emissão.

### **1.6.1. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ ) das Clorofilas em etanol, na presença de naftoquinonas.**

A determinação da capacidade de geração de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) foi realizada pelo método indireto, utilizando-se como substrato químico o ácido úrico (AU) ( $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), forte sequestrante de oxigênio singlete. O princípio dessa análise está na correlação direta entre a foto-oxidação do substrato (AU) com a quantidade de  $^1\text{O}_2$  gerado pelo FS, após irradiado com luz de  $\lambda$  adequado, permitindo assim estimar do valor de  $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ . Nos experimentos realizados foram utilizadas soluções dos derivados Pheid e Zn-Chld em etanol, em concentrações nas quais obtêm-se os derivados no estado monomérico (concentrações variadas de 1 a  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Gerola, 2013). No mesmo ambiente, adicionou-se a naftoquinona (com concentrações entre 0,8 e  $2,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  para o lapachol e 0,7 a  $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  para a  $\beta$ -lapachona) a fim de observar a influência da presença do lapachol e  $\beta$ -lapachona nos valores de  $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ . Os sistemas foram iluminados continuamente com um Laser de diodo (100 mW;  $\lambda_{\text{máx}}$ : 663 nm) adaptado a um espectrofotômetro Cary 50 (Figura 13) que, por trabalhar com radiação em fase, permite a incidência de iluminações externas sem interferência nas medidas (Rabello et al., 2012).



**Figura 13.** Sistema utilizado nos experimentos de determinação da atividade fotodinâmica química, com ácido úrico, para as misturas FS/naftoquinona em etanol, sendo (a) fonte de alimentação LASERline, (b) fonte de emissão LASERline iZi, (c) detector e (d) fenda.

A cinética de degradação do ácido úrico foi monitorada em 293 nm. Os ajustes cinéticos foram realizados por meio do modelo bi-exponencial de primeira ordem (Equação 6) para o máximo de absorção eletrônica do sensor químico (Gerola, 2013).

$$y = y_0 + A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad \text{Equação 6}$$

Sendo  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $k_1$  e  $k_2$  as amplitudes de decaimento da absorção eletrônica e constantes de velocidade de degradação na primeira e segunda etapa, respectivamente (Rabello et al., 2012). Nos cálculos foram utilizados somente os valores de  $k_1$ , pois somente essa constante de velocidade é diretamente proporcional ao número de fótons absorvidos ( $N_{\text{abs}}$ ) (Gerola, 2010; Rabello et al., 2012).

Concomitante à redução da banda de ácido úrico (293 nm) com o tempo de irradiação, avaliou-se o fotobranqueamento do Pheid e Zn-Chld monitorando-se a banda

Q para consideração nos cálculos. As cinéticas de fotobranqueamento foram ajustadas por meio da Equação 7 (Gerola, 2013).

$$\ln \frac{(A-A_{\infty})}{A_0-A_{\infty}} = -k_{FB}t \quad \text{Equação 7}$$

A quantidade de fótons absorvidos ( $N_{abs}$ ) pelos derivados clorínicos combinados as naftoquinonas foi determinada por meio da Equação 8 (Rabello et al., 2012).

$$N_{Abs} = \frac{1}{N_a \cdot h \cdot c} \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P(\lambda) \cdot I_0 (1 - 10^{-b \cdot c \cdot \epsilon}) \cdot e^{-k_{PB}t} d\lambda dt \quad \text{Equação 8}$$

Sendo  $N_{Abs}$  o número de fótons absorvidos pelo Pheid ou Zn-Chld,  $N_a$  a constante de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ),  $h$  a constante de Planck ( $6,63 \times 10^{-34} \text{ Js}$ ),  $c$  a velocidade da luz ( $2,3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ ),  $e^{-k_{PB}t}$  o termo que considera reações de fotodegradação ou fotobranqueamento do fotossensibilizador,  $I_0(1 - 10^{-bc\epsilon})$  a fração de luz incidente absorvida pelos FS e  $P$  a potência em cada comprimento de onda.

A partir do  $N_{abs}$  pode-se determinar eficiência de formação de oxigênio singlete ( $\gamma_{\Delta}$ ) a partir da Equação 9.

$$\gamma_{\Delta} \propto \frac{k_1}{N_{Abs}} \quad \text{Equação 9}$$

Sendo  $\gamma_{\Delta}$  a eficiência de formação de oxigênio singlete e  $k_1$  a constante de fotodegradação do substrato. Por fim, o rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ ) pode ser obtido por meio da Equação 10 (Rabello et al., 2012).

$$\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2 = \frac{\phi_{\Delta}^s}{\gamma_{\Delta}^s} \gamma_{\Delta}$$

**Equação 10**

Onde  $\Phi_{\Delta}^s$  corresponde ao rendimento quântico do padrão Pheid,  $\gamma_{\Delta}^s$  a eficiência de formação de oxigênio singlete do padrão e  $\gamma_{\Delta}$  a eficiência de formação de oxigênio singlete do FS em presença da naftoquinona.

### **1.6.2. Estabilidade temporal e influência do efeito térmico nos formulados multi-componentes (naftoquinona/fotossensibilizador) incorporados nos biotransportadores copoliméricos P-123 e F-127**

A estabilidade dos sistemas mistos, compostos pelo FS em combinação a naftoquinona incorporados nos sistemas biotransportadores coloidais, foi estudada seguindo o mesmo procedimento reportado na seção 1.5.8. Para isso, monitorou-se diariamente por espectros de absorção eletrônica UV-Vis uma alíquota (2 mL) do formulado armazenado em uma cubeta tampada, onde a solução é mantida em repouso durante 25 dias. A estabilidade e organização molecular em função da temperatura também foi avaliada, monitorando-se as propriedades ópticas em temperaturas entre 14,0 e 30,0 °C, isto é, em condições acima e abaixo dos valores da temperatura micelar crítica do copolímero (Vilsinski, 2013).

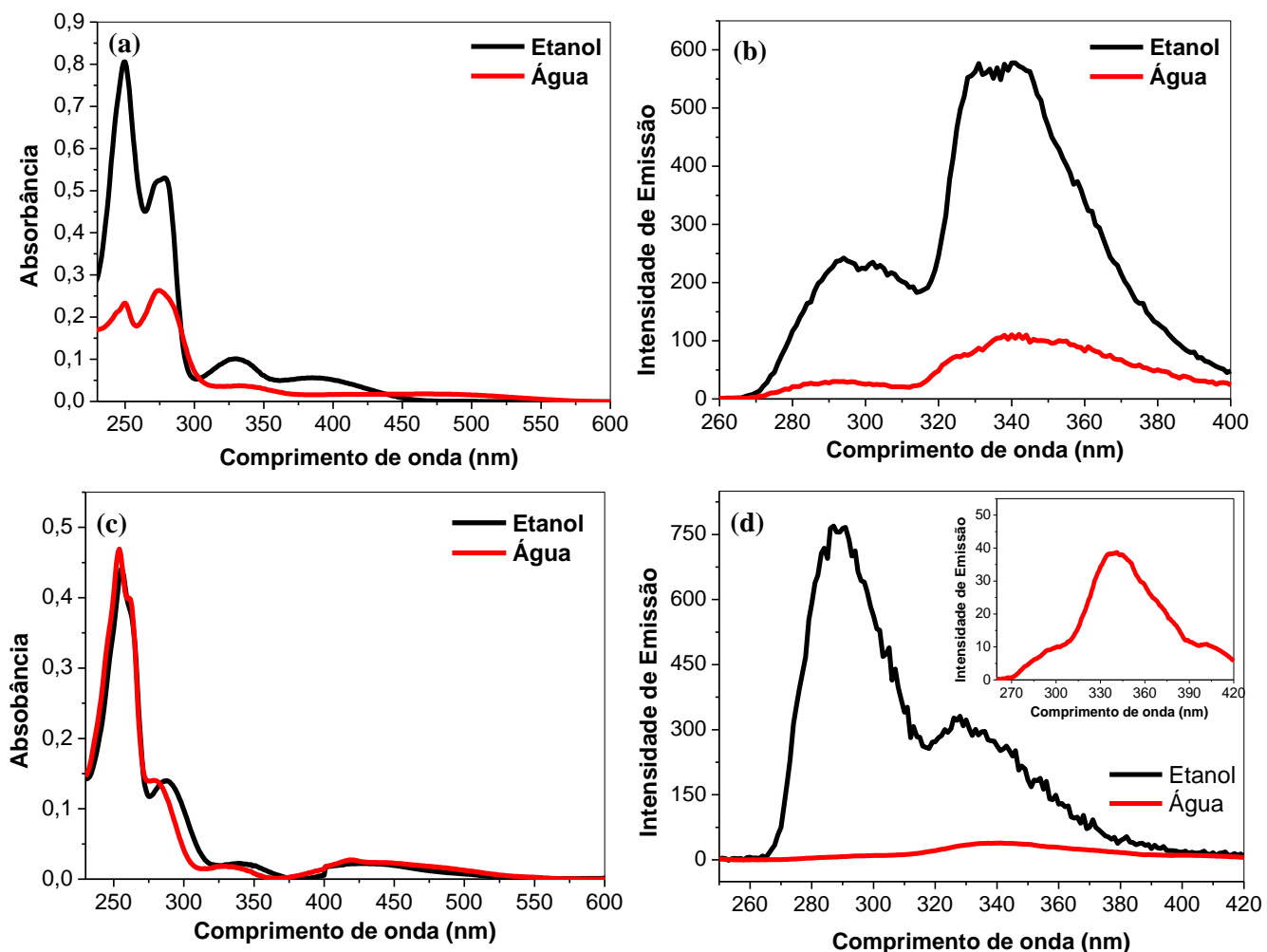
# Capítulo 2

**Caracterização Físico-Química das naftoquinonas em meio homogêneo e micro-heterogêneo**

## **Propriedades Espectroscópicas das naftoquinonas em meio homogêneo**

### **2.1. Determinação da Absortividade molar ( $\epsilon$ ) do lapachol e da $\beta$ -lapachona em Etanol, Diclorometano e Octanol**

Inicialmente, buscou-se avaliar a organização estrutural (monomerizada/auto-agregada), refletida nos espectros de absorção eletrônica e emissão de fluorescência, do lapachol e  $\beta$ -lapachona em meio homogêneo. Análises dessa natureza servem como ferramenta para posterior interpretação do estado estrutural das naftoquinonas nos microambientes micelares dos copolímeros P-123 e F-127. Na Figura 14 encontram-se os espectros de absorção eletrônica e emissão de fluorescência do lapachol e  $\beta$ -lapachona em etanol e água.



**Figura 14.** Caracterização espectroscópica das naftoquinonas sendo (a) absorção eletrônica do lapachol ( $4,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), (b) Emissão de fluorescência do lapachol ( $4,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 235 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm), (c) absorção eletrônica da  $\beta$ -Lapachona ( $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e (d) emissão de fluorescência da  $\beta$ -Lapachona ( $3,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm), em etanol e água destilada pura (pH 5,0), a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . O inserte 14-d corresponde a ampliação do espectro de emissão da  $\beta$ -Lapachona em meio aquoso.

Com base nos espectros de absorção eletrônica UV-Vis do lapachol e da  $\beta$ -lapachona (Figura 14-a e 14-c) em etanol, pode-se verificar a presença de quatro bandas situadas na região de comprimento de onda entre 230 e 500 nm. As primeiras bandas (região de 230 a 350 nm) são originadas por transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  de conformações

planares do anel benzênico e quinona (Khan & Khan, 2005; I. Singh, Ogata, Moore, Chang, & Scheuer, 1968). A última, de menor intensidade (região de 390 a 450 nm), refere-se a transições do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  do grupo carbonílico (Khan & Khan, 2005; I. Singh et al., 1968).

No que tange aos espectros de absorção eletrônica do lapachol e  $\beta$ -lapachona em água, pode-se verificar maior implicância do meio aquoso para o lapachol, que demonstrou uma acentuada redução das principais bandas de absorção (entre 230 e 450 nm), sobretudo para a banda localizada em 250 nm. Esse efeito está associado à insolubilidade da espécie em meio aquoso (processos de auto-agregação) (Gerola, Tsubone, et al., 2011; Moreira et al., 2009) e será melhor investigado na seção 2.1.1.

No que se refere ao espectro de emissão de fluorescência do lapachol e da  $\beta$ -lapachona em etanol (Figura 14-b e 14-d), foram obtidas duas bandas localizadas entre 250 e 400 nm, resultantes de transições  $S_1 \rightarrow S_0$  (de Lucas et al., 2012). Para o lapachol, Figuras 14-a e 14-b, verificou-se que o espectro de absorção (em etanol) é imagem especular do espectro de emissão (em etanol), o que pode estar relacionado à inalteração da geometria da molécula no estado fundamental e excitado (Lakowicz, 2006). A ausência dessa característica entre os espectros de absorção e emissão da  $\beta$ -lapachona (em etanol) (Figura 14-c e 14-d) pode estar associada a alguns efeitos, como: presença de *transições do tipo  $S_0 \rightarrow S_2$  na absorção e emissão fluorescente devido à transição  $S_1 \rightarrow S_0$ , a mudança da geometria da molécula no estado excitado, a presença de espécies auto-agregadas não identificadas no espectro de absorção* ou ainda a maior *sensibilidade da molécula a polaridade do meio no estado excitado*, dadas as semelhanças verificadas entre os espectros de absorção em água e etanol e as



diferenças (com inversão das bandas em 290 e 340 nm) observadas no espectro de emissão de fluorescência nesses meios (Gracetto et al., 2010; Lakowicz, 2006).

As absorptividades molares ( $\epsilon$ ) do lapachol e  $\beta$ -lapachona em etanol, diclorometano e octanol foram determinadas e encontram-se apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores de absorptividade molar do lapachol e  $\beta$ -lapachona em etanol, diclorometano e octanol.

<b>Composto (meio)</b>	<b><math>\epsilon</math> (<math>10^3</math>) (<math>\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}\text{L}</math>)</b>		
lapachol (etanol)	<b>251nm</b>	<b>278nm</b>	<b>331nm</b>
	17,4	11,5	2,2
lapachol (diclorometano)	<b>250nm</b>	<b>280nm</b>	<b>332nm</b>
	18,0	11,5	1,5
lapachol (octanol)	<b>251nm</b>	<b>279nm</b>	<b>335nm</b>
	19,7	12,5	1,3
$\beta$ -lapachona (etanol)	<b>254nm</b>	<b>261nm</b>	<b>281nm</b>
	23,4	20,0	6,9
$\beta$ -lapachona (diclorometano)	<b>256nm</b>	<b>263nm</b>	<b>281nm</b>
	24,5	21,4	7,0
$\beta$ -lapachona (octanol)	<b>254nm</b>	<b>263nm</b>	<b>281nm</b>
	24,8	21,5	7,5

Os dados revelaram valores de  $\epsilon$  na ordem de  $10^3$  para as espécies nos meios citados, bem como um aumento sutil da absorptividade molar dos compostos com a redução da polaridade do meio, o que sugere maior interação das naftoquinonas com

solventes ou micro ambientes de menor polaridade. Esse efeito será melhor compreendido por meio da determinação do coeficiente de partição apresentado na seção 2.1.3, que irá propor a tendência de partição das naftoquinonas, seja em micro ambientes de maior ou menor polaridade.

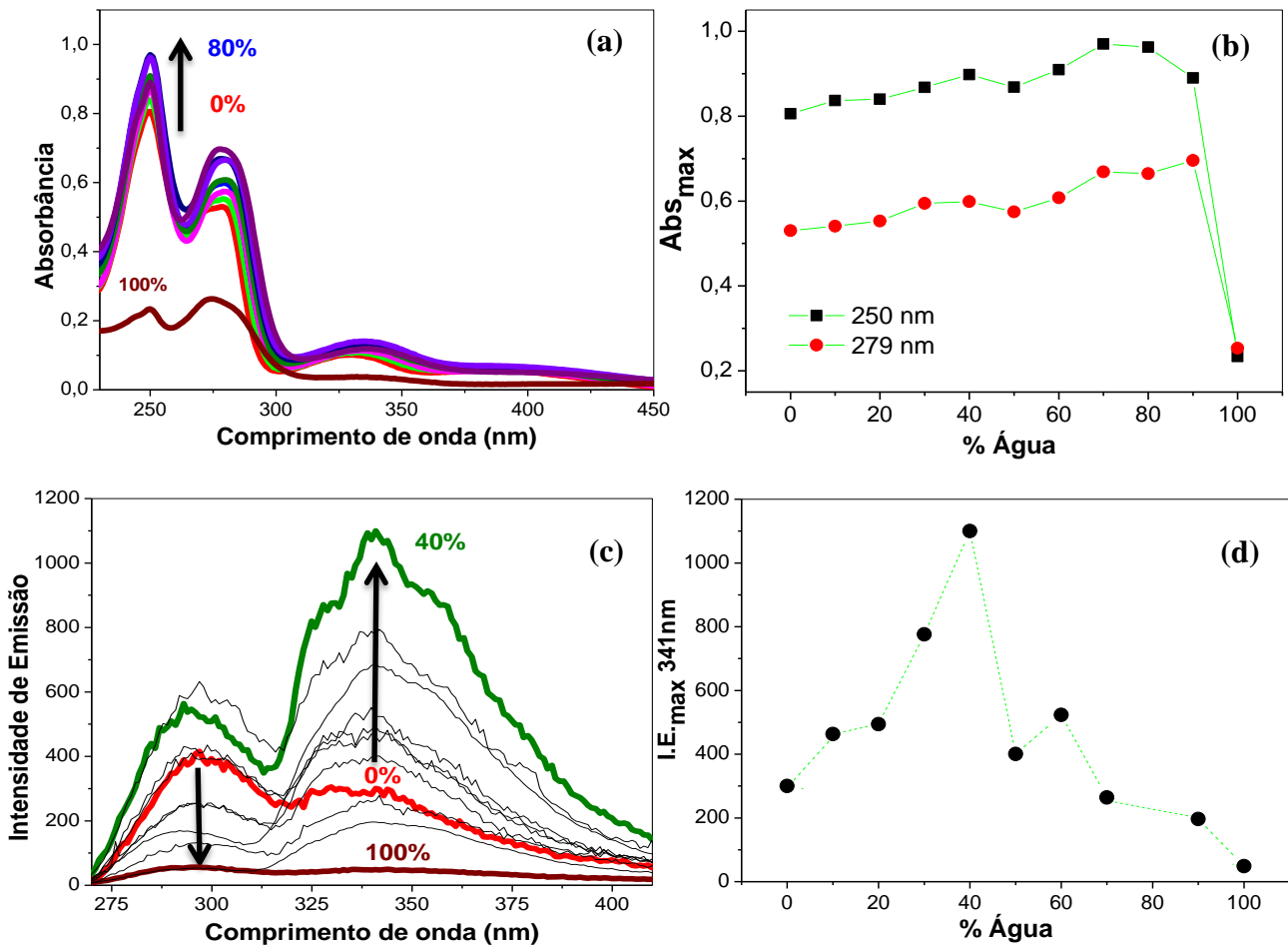
Adicionalmente, investigou-seo perfil espectral das formas auto-agregadas das naftoquinonas em mistura binária homogênea, composta por diferentes proporções de água e etanol. Conhecimentos dessa natureza servem como ferramenta para obtenção de dados complementares qualitativos relacionados à organização estrutural desses compostos, seja em meio homogêneo ouquando incorporados nas micelas copoliméricas. Estes estudos foram realizados e serão discutidos na próxima seção.

### **2.1.1. Efeito da mistura de solventes água/etanol nos processos agregacionais das naftoquinonas**

Diversos trabalhos reportam os efeitos causados pelo aumento da polaridade em mistura de solventes sobre o comportamento de absorção dos compostos (Bevilaqua, Gonçalves, Venturini, & Machado, 2006; Farajtabar, Jaber, & Gharib, 2011; Moreira et al., 2010). Deslocamentos acentuados nos comprimentos de onda (batocrômico ou hipsocrômico) são obtidos ao se avaliar sondas solvatocrômicas, cuja intensidade e posição dos máximos de absorção dependem fortemente da polaridade ou composição do meio (Bosch & Roses, 1992; D. C. da Silva, Ricken, Silva, & Machado, 2002; Etienne, Michaux, Monari, Assfeld, & Perpète, 2014).

Além disso, estudos envolvendo misturas binárias podem servir como uma importante ferramenta para se obter informações detalhadas acerca das características

espectroscópicas das possíveis formas auto-agregadas dos compostos. Essas avaliações são fundamentais para posterior comparação e compreensão dos fenômenos de auto-agregação que ocorrem em meio micro-heterogêneo (Murakami, 2002; Vilsinski, 2013), seja no formulado individual, formado apenas pela naftoquinonas, ou multi-componentes, composto pela combinação entre o fotossensibilizador e a naftoquinona. Os espectros de absorção eletrônica e emissão de fluorescência do lapachol em diferentes porcentagens água/etanol (V/V) são apresentados na Figura 15.



**Figura 15.** Espectros de (a) Absorção eletrônica ( $4,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), (b) máximo de absorção, (c) emissão de fluorescência ( $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 225 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (d) máximo da intensidade de emissão (I. E.) do lapachol em mistura água/etanol (V/V), a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo -- 0%, --10%, --20%, --30%, --40%, --50%, --60%, --80%, --100% de água. As setas indicam a direção da variação espectral com o aumento do teor de água no sistema.

Primeiramente, verifica-se através dos espectros de absorção eletrônica UV-Vis do lapachol (Figura 15-a) que o aumento da polaridade do meio não resultou em deslocamentos significativos nos comprimentos de onda de máxima absorção. Já em termos das intensidades de absorção, foi verificado um aumento contínuo da absorbância (cerca de 20% de acréscimo, melhor visualizado pela Figura 15-b) e alargamento das principais bandas de absorção com o aumento do teor de água até aproximadamente 80% (V/V; Figura 15-a). Igualmente, os espectros de emissão de fluorescência para o lapachol nestes sistemas (Figura 15-c 15-d) mostraram um aumento nas intensidades de emissão na região de 290 e 340 nm, mais evidente até 40% (V/V) de água.

O aumento da absorbância (Figura 15-a) e emissão de fluorescência (Figura 15-b) em determinadas proporções de água e etanol, por sua vez, podem estar vinculados ao processo de solvatação preferencial, que considera a presença de três espécies na mistura binária de solventes (água, etanol e clusters, compostos pela associação água-etanol) (Delgado, Holguín, Almanza, Martínez, & Marcus, 2011; Farajtabar et al., 2011; Ito, Ito, Yoshikawa, Watanabe, & Kokubun, 1996; Nomura, Onoda, & Miyahara, 1982). Dados referentes a sistemas mistos envolvendo água e álcoois, reportados anteriormente na literatura, foram utilizados no estudo da solvatação preferencial e avaliados em termos das interações soluto-solvente e solvente-solvente (Farajtabar et al., 2011).

Como exemplo, Silva *et al* (2002) investigaram a polaridade da Merocianina em misturas binárias água/etanol e observaram que a composição da esfera de solvatação justifica as variações no comportamento da energia de transição ( $E_T$ ) (deslocamentos nos comprimentos de onda de máxima absorção) pela fração molar do

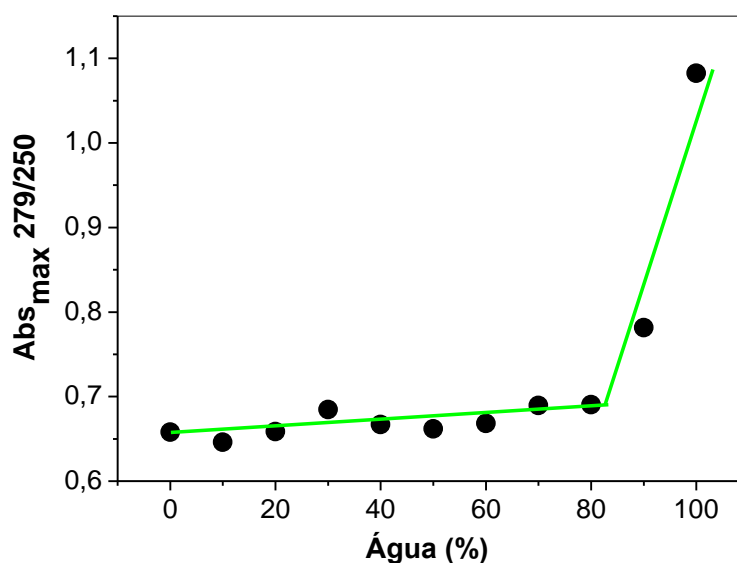
componente de maior polaridade. Os autores verificaram ainda a contribuição de cada espécie de solvente na camada de solvatação do cromóforo e aplicaram esse conhecimento para explicar o comportamento cinético da metilação do 4-nitrofenóxido de sódio, em misturas de acetona-água (D. C. da Silva et al., 2002).

O aumento contínuo (aproximadamente 20%) da absorbância do lapachol até a proporção de 80% de água (V/V) (Figura 15-a e 15-b) sugere que a composição da camada de solvatação é distinta do seio da solução. Nessa condição o composto, retido em uma esfera de solvatação característica, pode ser solvatado por dois efeitos: (i) interações não específicas (interação preferencial com o componente de maior constante dielétrica “enriquecimento dielétrico”) e (ii) interações específicas, como ligações de hidrogênio (Ghoneim, 2001; Józefowicz, 2011). Além disso, estudos mostram que diversas soluções compostas por misturas binárias são formadas por regiões com microdomínios diferentes, resultante de um comportamento não ideal da mistura de solventes (azeótropos), constituídos por espécies associadas (água/etanol) chamadas “clusters” (Peeters & Leroy, 1994; A. Wakisaka, Komatsu, & Usui, 2001). Esses clusters, compostos por misturas de água e álcool, foram relatados na literatura e comprovados pela técnica de espectrometria de massa (eletronspray) (A. Wakisaka et al., 2001; Akihiro Wakisaka, Matsuura, Uranaga, Sekimoto, & Takahashi, 2011). Ainda no que se refere à Figura 15-a ou 15-b (entre 80 e 100% de água), pode-se notar uma redução do máximo de absorção do lapachol em 250 nm e um aumento na intensidade em 279nm, sugerindo a formação de espécies auto-agregadas à medida que o meio se torna saturado de água (Gracetto et al., 2010). A porcentagem de água agregacional crítica para o lapachol, que corresponde à porcentagem de água limite em que não se verifica a formação de espécies auto-agregadas (Gracetto et al., 2010), encontra-se na região de 80% de água.

De forma símil, a elevação dos máximos de emissão de fluorescência até 40% são decorrentes da composição da camada de solvatação e dos diferentes tipos de interação entre o lapachol e os componentes da mistura. A redução na intensidade de emissão de fluorescência observada em proporções superiores a 40% de água pode estar associada à supressão por moléculas de água (Kyrychenko, Sevriukov, Syzova, Ladokhin, & Doroshenko, 2011; Lopez Arbeloa, Lopez Arbeloa, Tapia, & Lopez Arbeloa, 1993).

A determinação do pKa do lapachol em mistura binária homogênea (50%; V/V) etanol/água, realizada neste trabalho e exposta na seção 2.1.2, revelou que uma pequena variação de pH na região de 6,2 causaria também mudanças nos espectros de absorção dos compostos. Entretanto, os pHs das misturas binárias foram medidos e ficaram próximos a 5,7, indicando que as modificações espectrais não eram decorrentes de variações no equilíbrio protolítico da espécie.

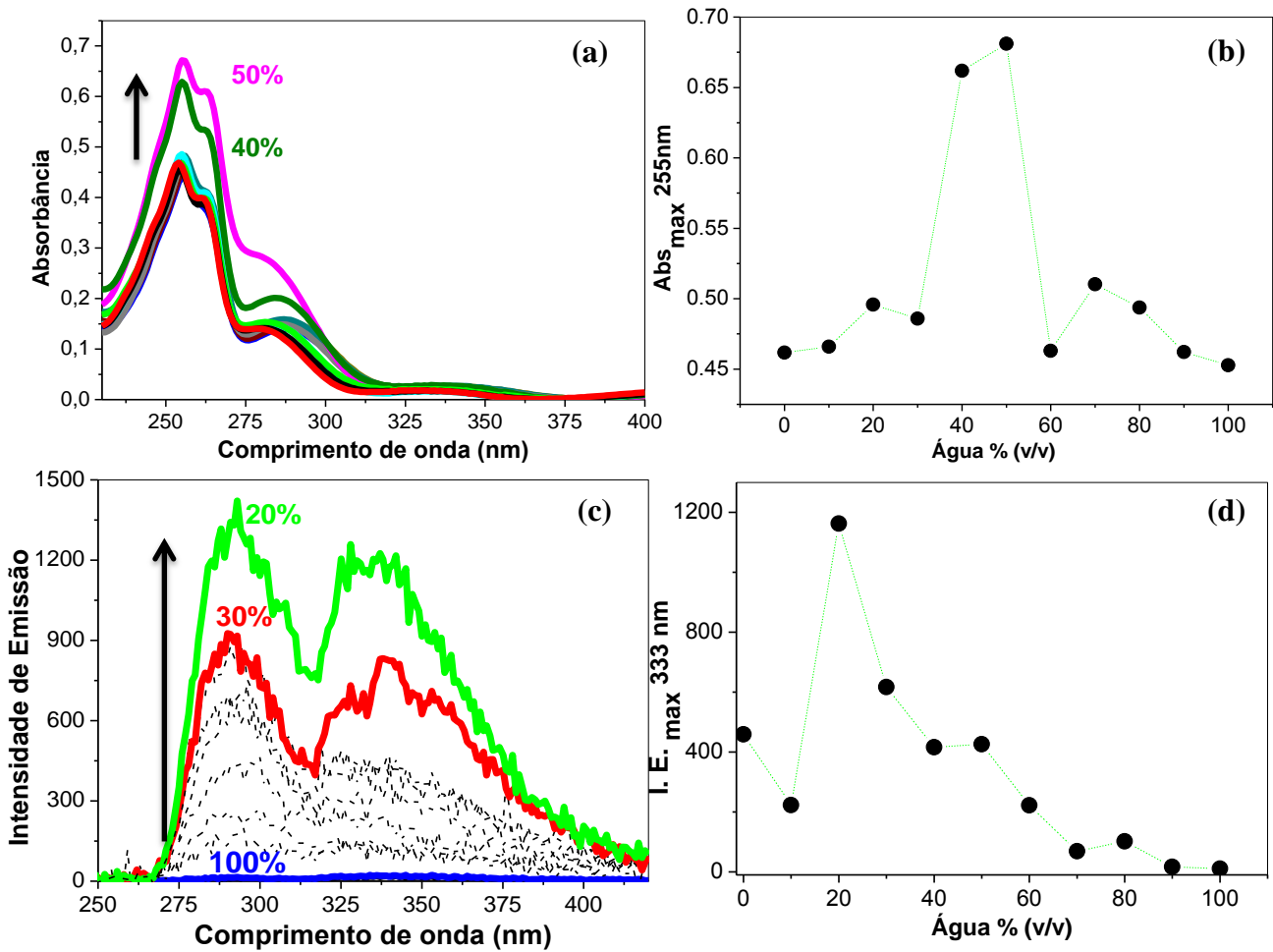
Para melhor caracterizar a organização estrutural do sistema e estimar a porcentagem de água agregacional crítica, analisou-se a razão entre as bandas ( $Abs_{279nm}/Abs_{250nm}$ ) (Figura 16), semelhantemente aos estudos reportados na literatura para o pireno (sonda de micro polaridade em que a resposta é fornecida por meio da razão da primeira e terceira banda vibrônica do espectro de emissão de fluorescência)(Basu Ray, Chakraborty, & Moulik, 2006).



**Figura 16.** Razão entre os máximos de absorção do lapachol (Abs279 nm/Abs250 nm) com a proporção de água e etanol (V/V) a 30,0 °C.

De acordo com a Figura 16 pode-se conferir uma constância dos quocientes (aproximadamente 0,65) até 80% de água; quanto mais próximo de 0,65 (razão em 100% etanol) mais intensa é a banda em 250 nm, comparada ao máximo em 279 nm e, mais o composto estaria em seu estado monomérico. Todavia, em meios ricos em água (acima de 80%) o processo auto-agregacional foi favorecido devido à insolubilidade do composto em meio aquoso.

O estudo das propriedades físico-químicas da  $\beta$ -lapachona em mistura binária também foi realizado e encontra-se apresentado na Figura 17.



**Figura 17.** Espectros da  $\beta$ -lapachona sendo (a) Absorção eletrônica Uv-Vis ( $2,0 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$ ), (b) máximo de absorção em 255 nm, (c) Emissão de fluorescência ( $5 \times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ ,  $\lambda_{exc}=220$  nm, fenda 10/10 nm) e (d) máximo de emissão em 333 nm a 30,0 °C, sendo -- 0%, -- 10%, -- 20%, -- 30%, -- 40%, -- 50%, -- 60%, -- 70%, -- 80%, -- 90%, -- 100% de água. As setas indicam a direção da variação espectral.

Por sua vez, para a  $\beta$ -lapachona em diferentes porcentagens de água/etanol (V/V) não foram observadas mudanças consideráveis no perfil do espectro de absorção eletrônica UV-Vis com o aumento do teor de água no sistema (Figura 17-a), exceto para as proporções entre 40 e 50% de água, que demonstraram um súbito aumento da absorção eletrônica em aproximadamente 30% com posterior retorno. A Figura 17-b



complementa os resultados evidenciando uma inexpressiva mudança na intensidade de absorção eletrônica para a maioria das proporções (A. Wakisaka et al., 2001; Akihiro Wakisaka et al., 2011). Tais resultados apontam, mais uma vez, que a mistura dos solventes não pode ser considerada como um meio contínuo, caracterizado apenas por suas constantes físicas (constante dielétrica, densidade, índice de refração), mas sim como um meio descontínuo, constituído por moléculas de solventes individuais que interagem mutuamente (Christian Reichardt, 2004). A descrição do processo de solvatação das moléculas em misturas de solventes é complexa, pois a espécie estará solvatada preferencialmente pelo componente (água, álcool ou clusters) que permita uma menor energia de Gibbs de solvatação (Christian Reichardt, 2004). Dessa forma, avaliando os dados empíricos observados para a  $\beta$ -lapachona, nas porcentagens 40 e 50% de água (Figura 17-a), pode-se sugerir que o súbito aumento notado nas intensidades de absorção eletrônica UV-Vis está vinculado à composição da camada de solvatação e ao processo de solvatação preferencial da espécie. Segundo Guo *et al* (2004) tais eventos também podem estar associados à miscibilidade parcial do meio a nível molecular, bem como à forte associação entre os solventes conjugados, regida por ligações de hidrogênio, na formação dos “clusters” (J.-H. Guo et al., 2004).

No que tange aos espectros de emissão de fluorescência para a  $\beta$ -lapachona (Figura 17-b), pode-se observar um aumento na intensidade de emissão para as bandas localizadas entre 275 a 375 nm variando de 0 a 20% de água no meio. Em concordância aos espectros de absorção eletrônica, o aumento na intensidade de emissão de fluorescência (Figura 17-c e 17-d) entre essas proporções de água pode ser atribuída à formação dos clusters e a influência dos mesmos na solvatação e monomerização da naftoquinona (D. C. da Silva et al., 2002). Em meios ricos em água a diminuição na intensidade de emissão de fluorescência, como observado para a  $\beta$ -lapachona e

igualmente para o lapachol (Figura 16-d), pode ser resultante de dois efeitos, uma agregação mais intensa dos compostos com o aumento da polaridade do meio (Moreira et al., 2010) e/ou ainda a desativação da fluorescência por moléculas de água (Lakowicz, 2006). O fenômeno da supressão de fluorescência em meio aquoso foi investigado por Kyrychenko *et al* (2011) a partir de modelagem teórica e por estudos de fluorescência da 2,6-bis(1H-benzimidazol-2-il) piridina, em água e na presença de sistemas modelos mimetizadores. Nestes, foram examinadas as propriedades fotofísicas e a capacidade do composto atuar como sonda para o meio aquoso, pois a fluorescência da espécie foi observada somente em baixos teores de água. Segundo os autores, a supressão de fluorescência por moléculas de água é atribuída à formação de ligações de hidrogênio intermoleculares, que favorecem a dissipação da energia excessiva de moléculas eletronicamente excitadas (Kyrychenko et al., 2011; Lopez Arbeloa et al., 1993).

Da mesma forma, estudos envolvendo sistemas binários água/etanol foram realizados para a clorofila  $\alpha$  por Moreira *et al*, 2010 e notado uma forte influência da composição do meio na organização estrutural da clorina. Em suma, os autores verificaram uma queda nos espectros de excitação e emissão de fluorescência dos compostos com o aumento do teor de água, atribuindo essa observação à elevada polaridade da mistura binária que, por favorecer as interações hidrofóbicas, resulta na auto-agregação do fotossensibilizador (Moreira et al., 2010).

Diante do exposto para as naftoquinonas, estes estudos mostraram, portanto, o perfil espectral com a variação do meio refletido nas organizações estruturais das espécies. O próximo passo é avaliar o pKa do lapachol para a proporção 50:50 (V/V) água/etanol (meio homogêneo), para posteriormente correlacionar com os dados de pKa do mesmo quando incorporado em micelas copoliméricas.

### **2.1.2. Determinação do pKa do lapachol em mistura binária homogênea constituída de água/etanol**

A atividade terapêutica de um medicamento está intimamente subordinada à permanência do mesmo no organismo. Assim, estudos que revelam a trajetória do fármaco no corpo são indispensáveis e fazem parte da avaliação farmacocinética do princípio ativo (Manallack, 2008; Y. Wang, Wang, Qiao, & Yin, 2010).

De uma forma geral, o medicamento só pode exercer efeito farmacológico a partir do momento que transpor a membrana biológica e entrar na circulação sistêmica, responsável pela trajetória para diferentes tecidos e órgãos. A velocidade de transporte e o processo de absorção das substâncias são influenciadas por propriedades físico-químicas que levam em conta o tamanho, forma molecular, coeficiente de partição, solubilidade, lipofilicidade, cristalinidade e a constante de dissociação (pKa), parâmetros bastante difundidos em estudos biofarmacológicos.

Devido à bicamada lipídica da membrana biológica, a lipofilicidade e solubilidade da substância em meio aquoso influencia a taxa de difusão passiva (Binghe Wang, Teruna J. Siahaan, 2005; Caetano & Tabak, 1999). O aumento da natureza hidrofóbica da espécie permite um acréscimo exponencial do fluxo intramembranar até um dado limite, associado à redução da solubilidade e auto-agregação com conseqüente diminuição da fluência (Binghe Wang, Teruna J. Siahaan, 2005).

Outro fator determinante no processo de biodisponibilidade refere-se ao caráter ácido e básico dos fármacos e seus respectivos pKas. Devido ao maior caráter apolar das membranas biológicas, substâncias neutras interagem melhor, sendo mais

internalizadas que os compostos presentes na forma ionizada (Binghe Wang, Teruna J. Siahaan, 2005). Amparados nessa conjuntura, os estudos envolvendo pKa dos fármacos ganharam sentido, recebendo a devida atenção no desenvolvimento deste trabalho.

A avaliação do pKa do lapachol se fez inicialmente em mistura binária homogênea, constituída por água e etanol em uma proporção 50:50 (V/V). O tratamento dos dados espectrofotométricos foi realizado por dois métodos: *i) método univariado*, que considera a contribuição da forma ácida e básica apenas nos máximos de maior absorção eletrônica relativa a cada espécie e *ii) método quimiométrico multivariado*, que considera a contribuição das espécies em todos os comprimentos de onda avaliados e, por isso, agrega maior confiabilidade aos resultados (Batistela et al., 2011; Sena et al., 2001).

A Equação 11, utilizada para os ajustes sigmoidais univariados, parte do equilíbrio de dissociação do lapachol apresentado abaixo:



Como somente as espécies LapH e Lap<sup>-</sup> influenciam no perfil do espectro de absorção, as absortividades molares ( $\epsilon$ ) podem ser escritas da seguinte forma:

$$\epsilon_{\text{lap}}[\text{Lap}] + \epsilon_{\text{lapH}}[\text{LapH}] = \epsilon_{\text{total}}([\text{Lap}] + [\text{LapH}]) \quad \text{Equação 12}$$

Considerando a proporcionalidade entre a absorbância e a absortividade molar, a Equação 12 pode ser reescrita sob a forma:

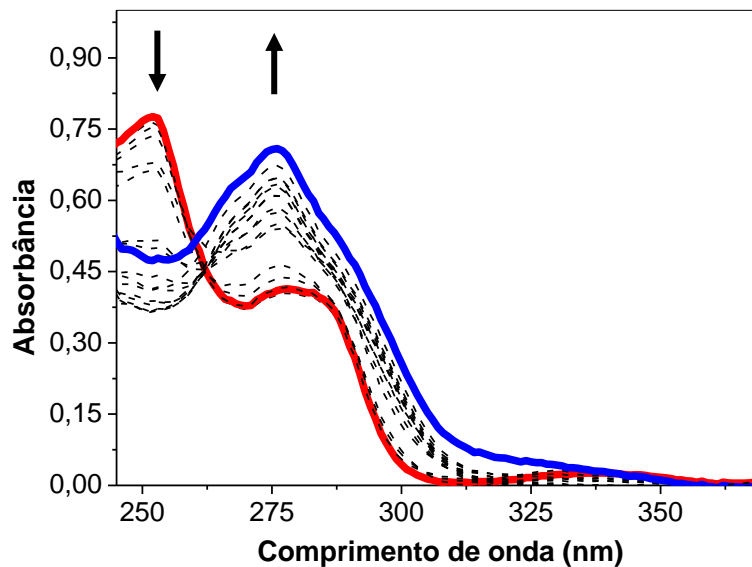
$$A_{\text{total}}([\text{Lap}] + [\text{LapH}]) = A_{\text{Lap}}[\text{Lap}] + A_{\text{LapH}}[\text{LapH}] \quad \text{Equação 13}$$

Sendo que a  $A_{\text{total}}$  corresponde à contribuição espectral das formas ácida (LapH) e básica (Lap<sup>-</sup>) no máximo de absorção correspondente a cada espécie. A partir de propriedades matemáticas e considerações teóricas, como preconizado anteriormente no trabalho de Freisinger (2007), a Equação 13 pode ser rearranjada sob a forma sigmoideal aplicável aos ajustes das curvas experimentais (Caetano & Tabak, 1999; Freisinger, 2007):

$$A_{\text{total}} = \frac{A_{\text{lap}} + A_{\text{lapH}} 10^{(\text{pka}-\text{pH})}}{1 + 10^{(\text{pka}-\text{pH})}} \quad \text{Equação 2}$$

Dessa forma, por considerar somente as implicações das formas protolíticas em comprimentos de onda fixos, as avaliações realizadas são classificadas como univariadas e, em muitos casos, limitadas na obtenção de informações e precisão dos dados. Para confirmar as análises exploratórias dos gráficos utilizou-se de metodologias baseadas em análises multivariadas, as quais utilizam simultaneamente todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados e, por isso, agregam maior confiabilidade aos resultados (Batistela et al., 2011; Sena et al., 2001).

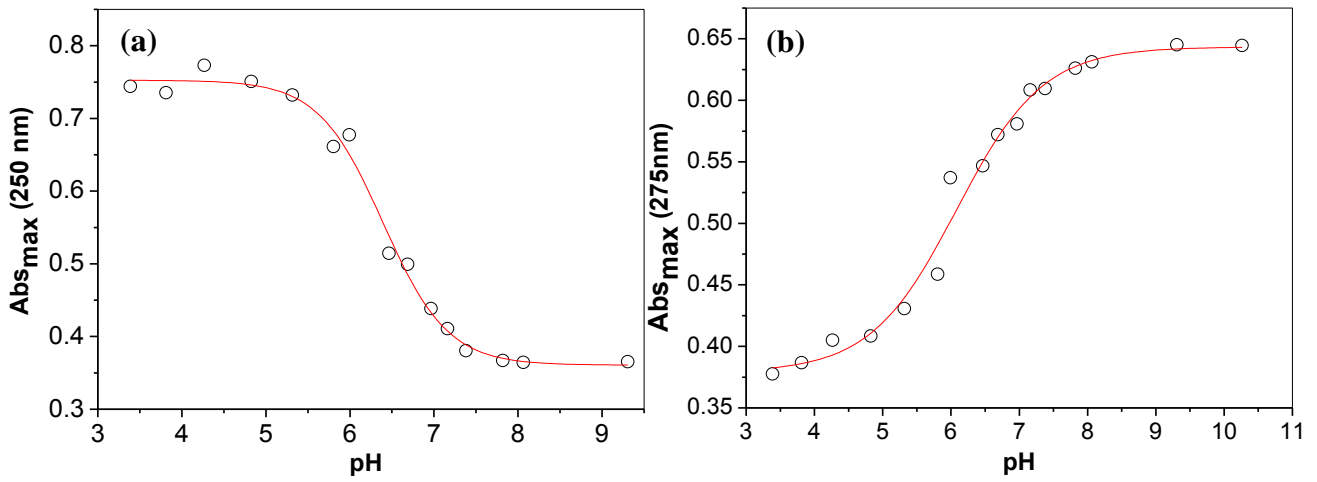
Na Figura 18 encontra-se o espectro de absorção eletrônica UV-Vis do lapachol com a variação do pH.



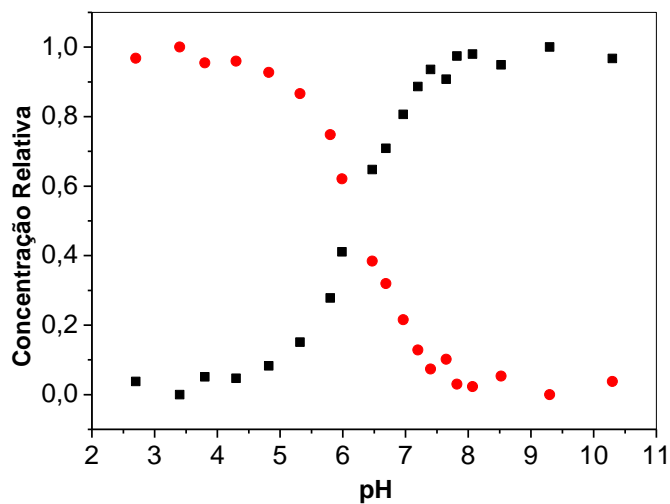
**Figura 18.** Espectro de absorção eletrônica do lapachol em soluções compostas por mistura de solventes água/etanol 50:50 (V/V) em pHs variando entre 2,5 e 10,3 a 30,0 °C. As setas indicam a direção da variação espectral com o aumento do pH.

Com base na Figura 18 pode-se verificar a influência do grau de protonação do meio nas alterações espectrais do lapachol, evidenciada pelo decaimento do máximo em 250 nm com simultânea elevação da banda em 275 nm (Ossowski et al., 2008).

As curvas sigmoidais para as formas protolíticas do lapachol em meio homogêneo, estimados pelos dois métodos de análise univariado e multivariado, encontram-se apresentadas nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

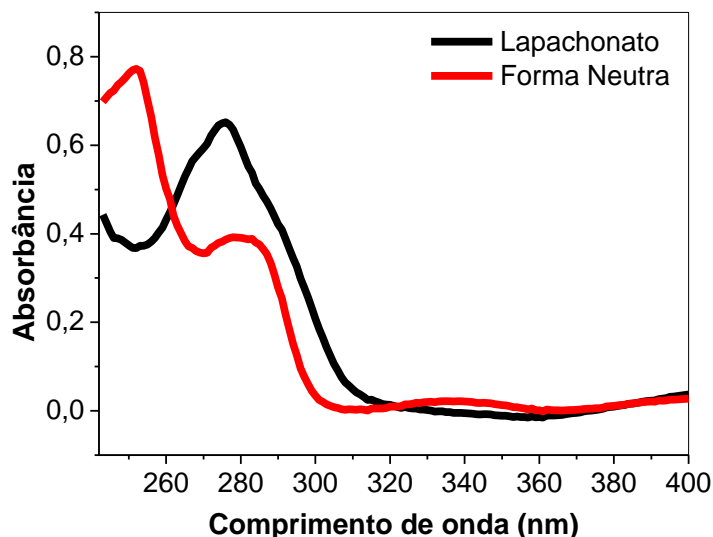


**Figura 19.** Curvas sigmoidais obtidas pelo método de análise univariado para o lapachol em mistura 50:50 (V/V) água/etanol, sendo (a) em 250 e (b) 275 nm.



**Figura 20.** Curvas sigmoidais da concentração relativa em função do pH para o lapachol, obtido pelo método quimiométrico multivariado.

A partir das metodologias quimiométricas de análise multivariada, utilizando-se o método da Matriz-K (Sena et al., 2001), obteve-se a projeção (simulação) dos espectros de absorbância das espécies puras, conforme Figura 21.



**Figura 21.** Espectro das espécies protolíticas puras estimados pelo método da Matriz-K.

No que concerne à Figura 21 pode-se verificar a presença de dois máximos de absorção eletrônica para a forma neutra do lapachol, situados entre 240 e 300 nm. A presença da forma iônica da espécie, lapachonato, foi verificada por meio da elevação da banda na região de 275 nm, com concomitante redução do máximo em 250 nm.

Para obtenção dos valores de pKa aplicou-se aos dados a equação de Handerson-Hasselbalch, resultando nos valores de  $6,1 \pm 0,09$  para análise univariada e  $6,2 \pm 0,1$  pelo método de avaliação multivariada, dado concordante com os resultados verificados por Ossowski et al (2008), obtidos por titulação potenciométrica na mesma mistura de solventes.



Para a maioria das células animais, a 37,0 °C, o pH fisiológico encontra-se próximo de 7,4 (Raman, Selvaganapathy, & Radhakrishnan, 2014). Isso indica que o lapachol em pH fisiológico será encontrado como uma mistura de formas protolíticas (aproximadamente 10% na forma neutra e 90% lapachonato), onde cada uma poderá interagir diferentemente e apresentar diferentes velocidades de absorção pela membrana celular, modulando seu efeito *in vivo* (Binghe Wang, Teruna J. Siahaan, 2005; Manallack, 2008). O perfil de difusão de cada forma protolítica frente à membrana celular poderá ser estimado por meio da constante de ligação do lapachol em pH 4,5, onde prevalece a forma neutra, e 8,0, em que predomina a forma iônica. Este estudo foi desenvolvido e encontra-se apresentado na seção 2.1.6.

Após avaliar o pKa do lapachol em meio homogêneo, buscou-se avaliar a interação das naftoquinonas com nanoesferas copoliméricas, sistemas utilizados, a princípio, para melhorar a solubilização, estabilidade e biodistribuição do fármaco. Para isso, foram explorados previamente modelos experimentais simplificados que respondem à tendência de solubilização do fármaco, seja em micro-ambientes de maior ou menor polaridade, a fim de se complementar os estudos da distribuição dos mesmos em sistemas biomédicos solubilizadores/transportadores (Smith et al., 2012; Wainwright, 2003).

### **2.1.3. Determinação do coeficiente de partição água/octanol**

O coeficiente de partição do fármaco é uma medida quantitativa que fornece informações acerca do caráter hidrofóbico/hidrofílico dos compostos em sistemas bifásicos. Esses estudos são úteis para compreensão de fenômenos físico-químicos e

biofísicos de distribuição (Banerjee, 1980) dos fármacos *in vitro* (tendência de distribuição nos sistemas carreadores) e *in vivo* (membranas biológicas, enzimas, proteínas ou plasma sanguíneo e fluídos intracelulares) (Smith et al., 2012).

Usualmente, valores negativos de  $\log K_p$  são atribuídos a compostos hidrofílicos e indicam maior tendência dos mesmos a se particionarem para a fase aquosa. Da mesma forma, valores de  $\log K_p$  superiores 1,5 são característicos de compostos lipofílicos, que apresentam uma migração preferencial para a bicamada lipídica. Valores intermediários, entre 0 e 1,5, são característicos de espécies com comportamento anfifílico (Smith et al., 2012; Wainwright, 2003).

Para o lapachol foi obtido  $\log K_p$  igual 0,97 e para  $\beta$ -lapachona 1,0 indicando que ambas as espécies apresentam um comportamento anfifílico, podendo migrar tanto para a bicamada lipídica das membranas biológicas quanto se dissolver no plasma sanguíneo (J. Guo, Song, Ding, Zhang, & Sun, 2012; Smith et al., 2012; Wainwright, 2003). A mesma análise foi realizada para os derivados da clorofila *a* por Gerola (2013), revelando um caráter mais hidrofóbico para a Pheid ( $\log K_p$  2,32) e relativamente menor para a Zn-Chld ( $\log K_p$  1,5) (Gerola, 2010).

## **Propriedades físico-químicas das Naftoquinonas incorporadas em copolímeros micelares P-123 e F-127**

### **2.1.4. Determinação do pKa do lapachol nos copolímeros P-123 e F-127.**

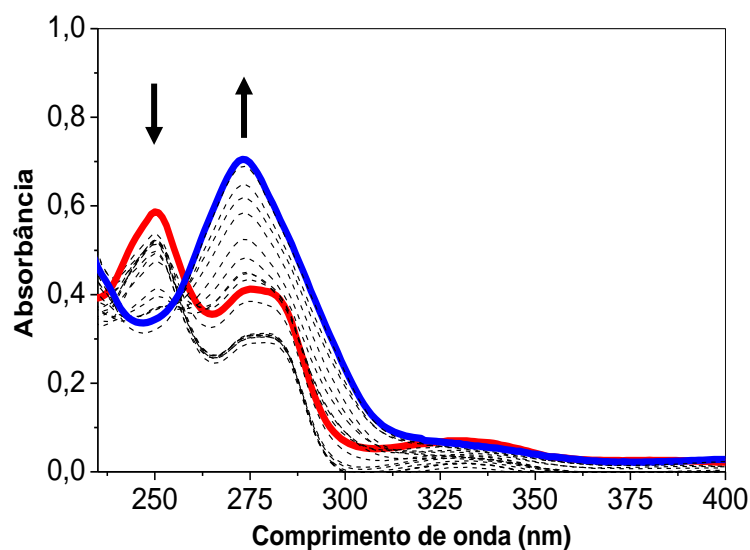
A difusão efetiva de princípios ativos ácidos e básicos através da bicamada lipídica, conforme discutido na seção 2.1.2., pode ser afetada pelo estado de carga do

fármaco, determinado pelo pKa da espécie (David, Armstrong April, Ehrin, & Tashjian Armen H., 2009). Assim, identificar a forma protolítica que o composto assumirá em pH fisiológico e microlocal é de extrema importância, uma vez que o grupo ionizável atribuirá diferentes propriedades de ligação com sítios ativos da membrana celular (Caetano & Tabak, 1999; Pellosi et al., 2013).

Vale ressaltar que os valores de pKa experimentais para lapachol em sistemas micelares são resultantes de variações ocorridas devido a interação do mesmo com o sistema coloidal e, por isso, serão chamados neste trabalho como pKa aparente ( $pK_{a_{ap}}$ ) (Previdello, Carvalho, & Tessaro, 2006). Os experimentos foram conduzidos utilizando-se concentrações de surfactantes relativamente elevadas (2% m/V, o que corresponde a  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para F-127 e  $7,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  para P-123), para garantir a ligação completa entre a naftoquinona e a micela copolimérica (Caetano & Tabak, 1999). Os resultados foram comparados aos obtidos em meio homogêneo, apresentados na seção 2.1.2.

A determinação do pKa aparente do grupo oxidrila presente no lapachol se fez pelo método espectrofotométrico de absorção eletrônica UV-Vis, avaliando-se a variação da absorção eletrônica UV-Vis das bandas de maior absorvidade molar, que concerne às formas ácidas e básicas, em 250 e 273 nm, respectivamente (Freisinger, 2007; Previdello et al., 2006). Os tratamentos dos dados espectrofotométricos foram realizados pelo *método univariado* e *quimiométrico multivariado*, cujas características foram discutidas na seção 2.1.2. (Batistela et al., 2011; Sena et al., 2001).

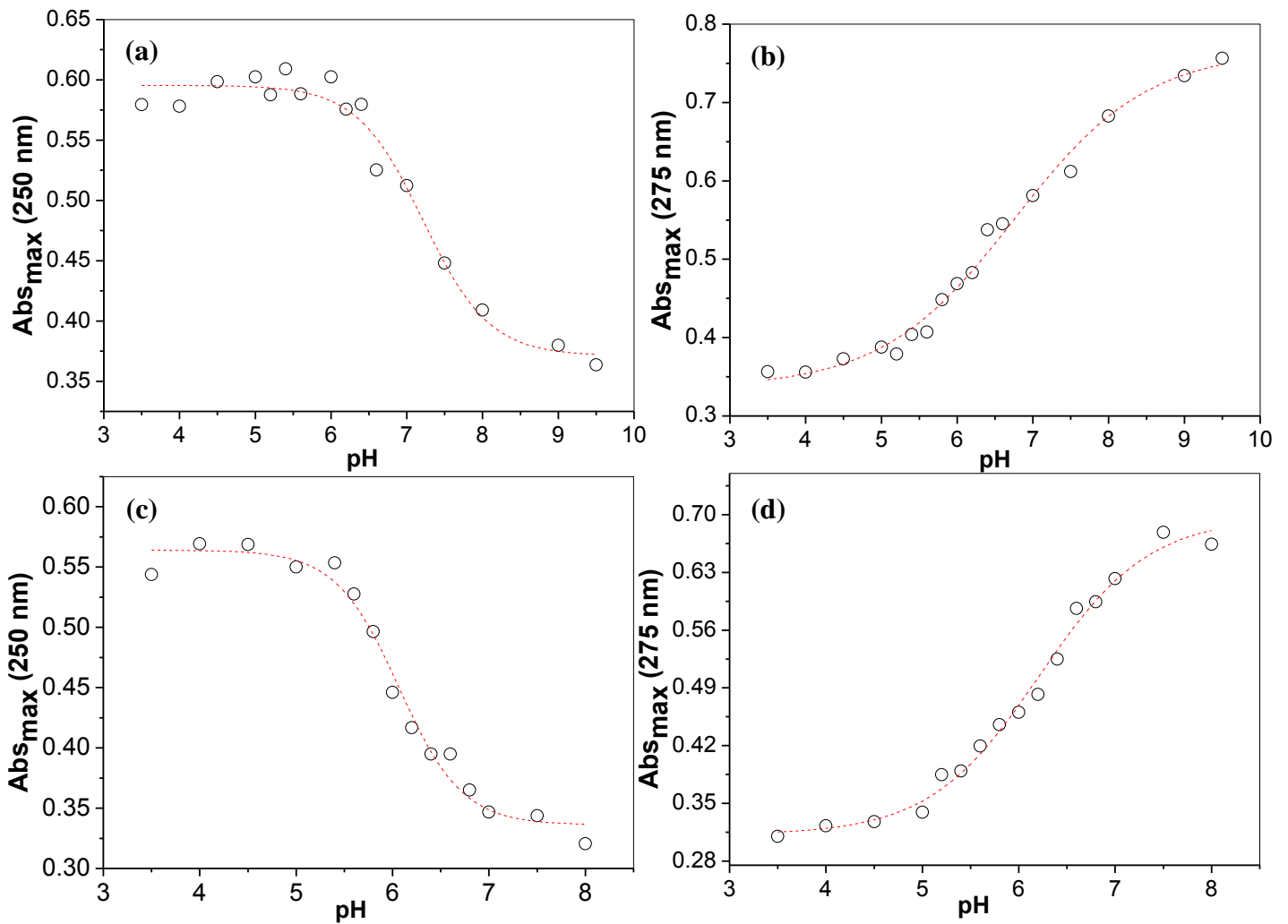
Na Figura 22 encontram-se o espectro de absorção eletrônica UV-Vis para o lapachol em F-127 em diferentes pHs.



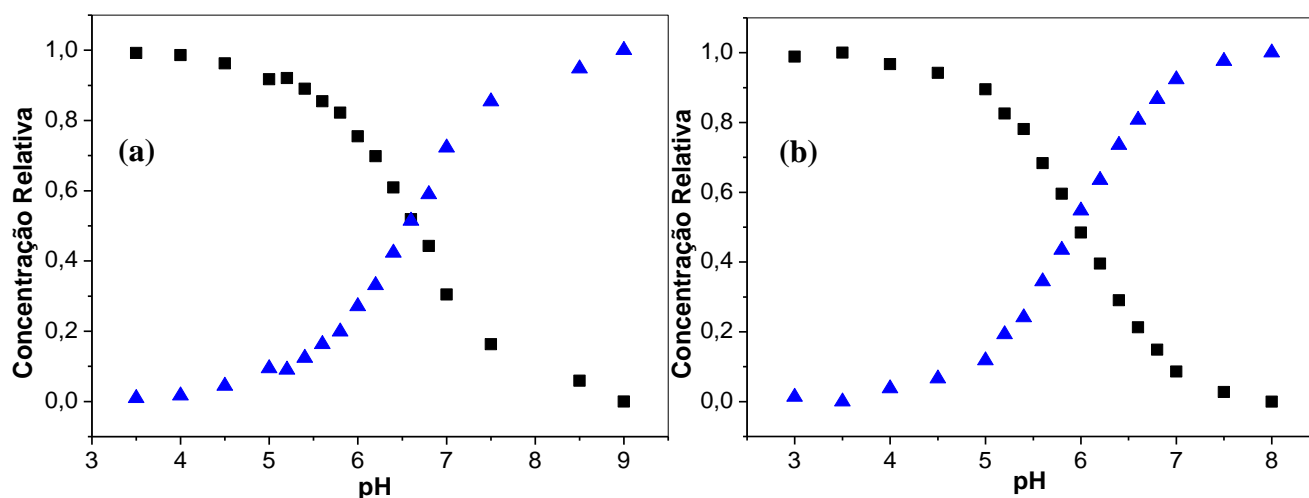
**Figura 22.** Espectro de absorção eletrônica do lapachol em F-127 (2% m/V;  $3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em pHs variando de 3,5 e 8,0 a 30,0 °C. As setas indicam a direção da variação espectral com o aumento do pH.

A partir da Figura 22 pode-se verificar que a influência do pH do meio nas alterações espectrais do lapachol foi semelhante aos resultados obtidos para a mistura binária homogênea (Figura 18 da seção 2.1.2.). O aumento do pH foi acompanhado pela redução do máximo em aproximadamente 250 nm com simultânea elevação da banda na região de 275 nm (Ossowski et al., 2008).

Nas Figuras 23 e 24 encontram-se as curvas sigmoidais obtidas pelas metodologias de análise univariada e quimiométrica multivariada, respectivamente.



**Figura 23.** Curvas sigmoidais para o lapachol em diferentes pHs, sendo (a) e (b) aplicação do método univariado para o lapachol formulado em P-123 (2% m/V; 7,0x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>), (c) e (d) aplicação do método univariado para o lapachol formulado em F-127 (2% m/V; 3,0x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>), nos máximos de 250 e 274 nm, respectivamente.



**Figura 24.** Curvas sigmoidais de concentração relativa em função do pH para o lapachol obtidas pelo método quimiométrico multivariado, sendo (a) em P-123 (2% m/V;  $7,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) e (b) em F-127 (2% m/V;  $3,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>).

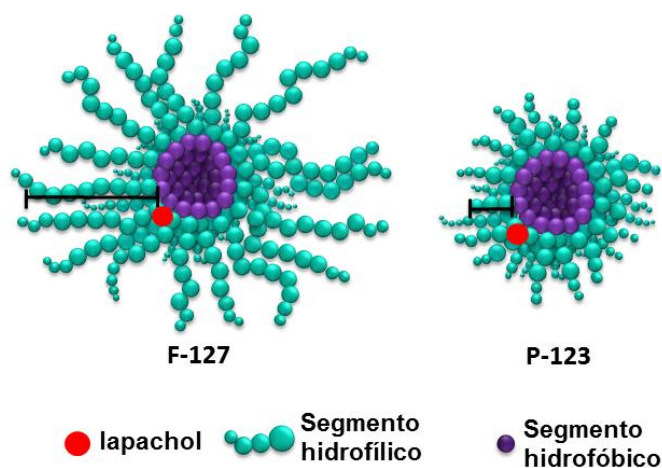
Os ajustes das curvas sigmoidais (Figura 23), realizados a partir da Equação 2 (método univariado), para o lapachol em F-127 e P-123, resultaram nos valores de pK<sub>a</sub> de  $6,2 \pm 0,1$  e  $7,0 \pm 0,1$ , respectivamente.

A concentração relativa das espécies protolíticas (Figura 24) envolvidas nos sistemas, obtida pelo método quimiométrico multivariado, foi aplicada na equação de Handerson-Hasselbach, obtendo-se os valores de pK<sub>a<sub>ap</sub></sub> de  $6,0 \pm 0,1$  e  $6,6 \pm 0,1$  para o lapachol em F-127 e P-123, respectivamente (Batistela et al., 2011; Sena et al., 2001). Os dados obtidos pelos métodos de análise univariado e multivariado apontaram valores menores de pK<sub>a<sub>ap</sub></sub> para o lapachol em F-127 (6,2 e 6,0) e maiores valores para o lapachol em P-123 (7,0 e 6,6).

Sob o ponto de vista teórico, as micelas formadas pelos copolímeros F-127 e P-123 são caracterizadas como não iônicas e, portanto, infere-se que os efeitos de superfície são resultantes da carga de polarização e menos expressivos que nos sistemas

análogos iônicos. Segundo a literatura, existem duas formas de interpretação dos resultados de  $pK_{a_p}$  dos compostos incorporados em micelas não iônicas. Por um lado, alguns trabalhos desconsideram a variação de  $pK_a$  (entre a superfície da micela não iônica e a água) e explicam seus resultados com base na conjectura de que o  $pK_a$  intrínseco é o mesmo medido em superfícies neutras (Fernandez & Fromherz, 1977; Fromherz & Masters, 1974; Loginova, Samokhina, Mchedlov-Petrossyan, Alekseeva, & Savvina, 2001). Por outro, a compreensão dos deslocamentos no equilíbrio de dissociação dos compostos nesses sistemas levam em consideração uma interação entre os íons hidrônio ( $H_3O^+$ ) com os segmentos polares (OE) da região hidrofílica da micela, causando uma leve redução de pH micro-local na região interfacial da mesma (Caetano & Tabak, 1999; Previdello et al., 2006). Em estudos desse tipo, os efeitos vinculados à localização do fármaco na micela copolimérica também são considerados, visto que a posição do mesmo influencia diretamente em seu acesso aos prótons e, conseqüentemente, na estabilização da forma protolítica predominante da espécie no meio micelar (Caetano & Tabak, 1999; Harada & Okada, 1990).

A Figura 25 ilustra a influência que o tamanho do segmento hidrofílico pode acarretar no equilíbrio de dissociação do lapachol.



**Figura 25.** Efeito da concentração de íons hidrônio  $[H^+]$  sobre o equilíbrio de dissociação do lapachol.

As micelas de F-127 são mais volumosas que as micelas de P-123, devido à maior razão entre grupos OE/OP (óxido de etileno/óxido de propileno) (Figura 12 e Figura 25), que lhe conferem uma região hidrofílica com volume e área superficial cerca de 5 vezes maior (P Alexandridis et al., 1995; Bakshi & Sachar, 2006; Shiraishi, Inoue, & Hirai, 2010; Wanka et al., 1994). Esse fato pode estar vinculado a pequena variação no valor de  $pK_{a_{ap}}$  para o lapachol em micelas de F-127 comparado a P-123 (Caetano & Tabak, 1999).

Os segmentos OE causam uma mudança da polaridade do micro-ambiente, podendo influenciar no equilíbrio de dissociação do lapachol (Fernandez & Fromherz, 1977; Previdello et al., 2006). As micelas de P-123 apresentam um tamanho de segmento hidrofílico menor, contendo uma razão mais baixa de grupos OE/OP e um maior caráter hidrofóbico em relação ao F-127 (Wanka et al., 1994). Regido por seu caráter anfifílico, o lapachol pode ter se alojado em um micro-ambiente complexo (Bonnet, Berleur, Roman, & Fatome, 1989) que desfavoreça a dissociação da



naftoquinona por efeitos vinculados à: maior interação entre a espécie neutra com a micela ou simplesmente ter deslocado o equilíbrio para minimizar os efeitos de repulsão eletrostática (grupos OE e a espécie aniônica lapachonato) (Loh & Volpe, 1992). Além disso, o maior valor de  $pK_{a_{ap}}$  obtido pode indicar maior acesso dos íons hidroxônios ao lapachol, provavelmente devido a menor extensão da porção hidrofílica (Figura 25), deslocando o equilíbrio para a forma neutra.

Sob o mesmo ponto de vista, as micelas de F-127 oferecem uma região hidrofílica maior e com maior teor de água estruturada. Assim, a similaridade entre a polaridade do ambiente aquoso e dos micro-compartimentos da corona micelar (mais hidratados), podem justificar a semelhança entre os valores de  $pK_{a_{ap}}$  obtidos para o lapachol em micelas de F-127 (Shiraishi et al., 2010). Além disso, os efeitos de localização da naftoquinona na micela podem contribuir para baixas variações entre os dados em meio homogêneo e micro-heterogêneo. Descrições que levam em conta o posicionamento do fármaco no micro-ambiente micelar e sua influência nos valores de  $pK_{a_{ap}}$  foram reportadas por Harada *et al* (1990), que estudaram a dissociação de propilamina e metilamina incorporadas em micelas SDS. Os autores atribuíram as variações nos valores de  $pK_a$  às distintas posições das espécies nos micro-domínios micelares (Harada & Okada, 1990).

Após os estudos que evidenciaram as formas protolíticas predominantes das naftoquinonas nos micro-ambientes das micelas, buscou-se investigar as isotermas ou perfil de associação das mesmas com os copolímeros micelares, conforme apresentado na próxima seção.

**2.1.5. Avaliação da Interação das naftoquinonas com sistemas micelares copoliméricos em água pura (pH 5,0): análise das isotermas de associação naftoquinona/poloxâmico.**

Após verificar o comportamento dos compostos em meios ricos em água (Seção 2.1.1.), o balanço hidrofóbico das espécies (Seção 2.1.3.) e a forma protolítica do lapachol no micro ambiente micelar (Seção 2.1.4), partiu-se para estudos que avaliam a interação primária das naftoquinonas com os sistemas solubilizadores micelares (Rangel-Yagui, Hsu, Pessoa-Jr, & Tavares, 2005).

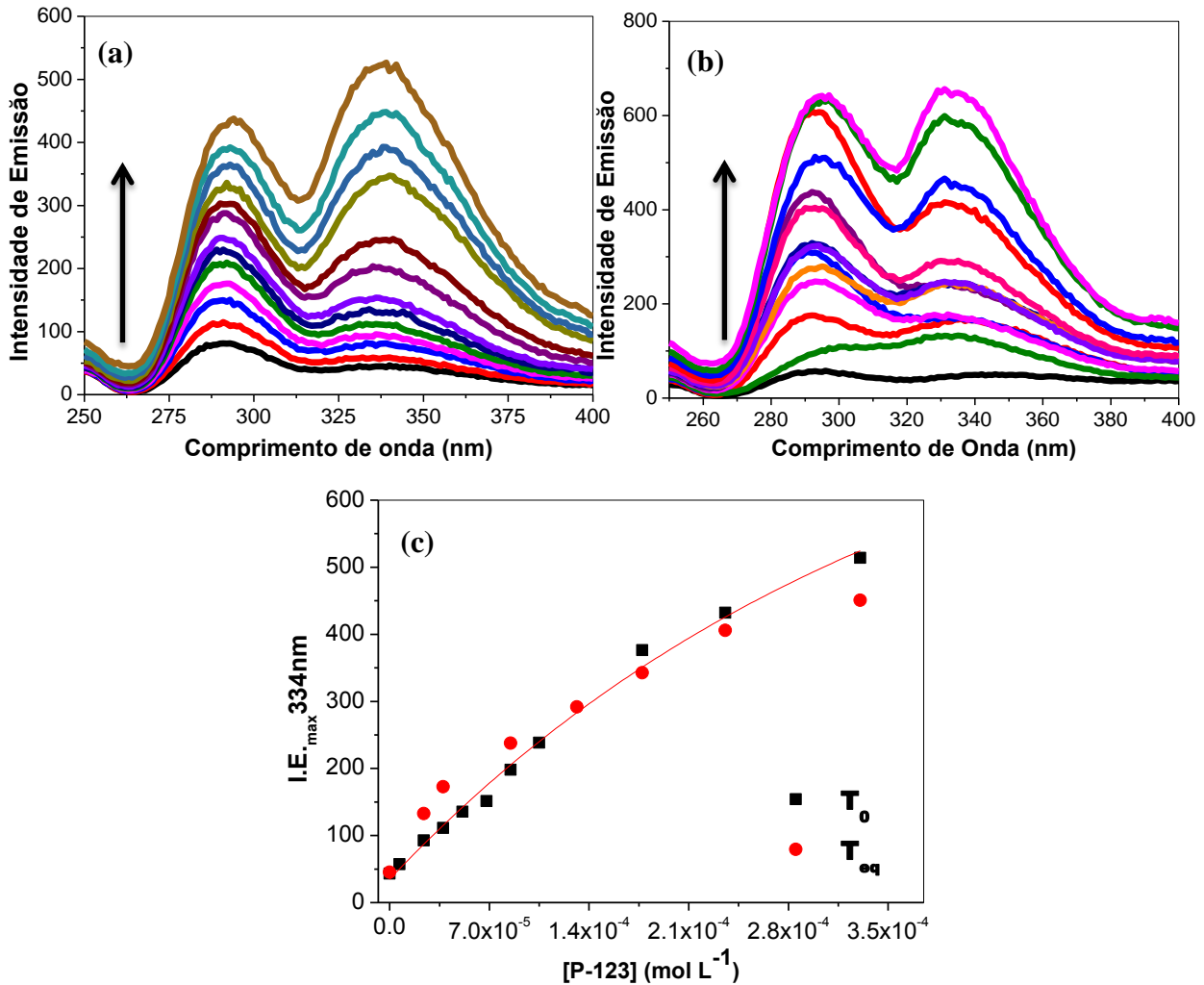
Devido à proximidade verificada entre o pKa do lapachol (próximo a 6,2) e o pH fisiológico (7,4), optou-se por avaliar a interação dessa espécie com os copolímeros micelares em diferentes condições: em meio ácido (pH 4,5 onde prevalece a forma neutra do lapachol), básico (pH 8,0 em que predomina a forma iônica) e em pH 5 (água destilada). O objetivo da investigação está vinculado à previsão do comportamento das formas protolíticas do lapachol, na forma protolítica individual (em pH 4,5 e 8) e combinada (em meio aquoso, com mistura de formas protolíticas), em presença dos surfactantes poliméricos que, além de desempenharem a função de biotransportadores, atuam também como sistemas mimetizadores da membrana celular (Fendler, 1982). A avaliação da interação primária ( $T_0$ ) do lapachol e  $\beta$ -lapachona com os copolímeros micelares foi complementada com estudos de ligação após 48 horas ( $T_{eq}$ ), a fim de identificar efeitos de reorganização estrutural e auto-agregação dos compostos dependente do tempo. As avaliações da interação em pHs específicos foram realizadas somente no tempo inicial e serão apresentadas na próxima seção.

Os estudos de interação com os surfactantes poliméricos servirão como base para compreender o comportamento, no que diz respeito à influência nas propriedades

físico-químicas e fotodinâmicas *in vitro* e *in vivo*, das naftoquinonas sozinhas e combinadas com os fotossensibilizadores derivados da clorofila, incorporados nos sistemas micelares nanoestruturados pelo método de dispersão sólida (Zhang et al., 1996). A administração das naftoquinonas formuladas buscou contribuir no efeito terapêutico global com uma adicional citotoxicidade não dependente da luz, complementando o tratamento fotoinduzido dos fotossensibilizadores, os quais fazem uso de irradiação com comprimento de onda específico (Lamberti et al., 2013). Para o caso do lapachol e  $\beta$ -lapachona, o sistema de solubilização utilizado visa influir na farmacocinética, melhorando sua biodisponibilidade, estabilidade no organismo, além de favorecer a seletividade na entrega do fármaco (Batrakova et al., 2010).

Os estudos basearam-se no monitoramento da emissão de fluorescência com a titulação de uma solução da naftoquinona ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em meio aquoso (ou tamponado em pH 4,5 e pH 8, apresentados na próxima seção), contendo 0,2% (V/V) de etanol (porcentagem esta que não interfere na estabilidade das micelas) (Vilsinski, 2013), com diferentes volumes dos copolímeros micelares, variando entre 0 e  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , partindo de uma solução estoque 4% (m/V; o que corresponde a  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  de F-127 e  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de P-123), em meio aquoso (ou nos respectivos tampões), para se obter as isotermas de ligação naftoquinona-copolímero (K. Liu, Wang, Yao, & Luo, 2007). A afinidade dos compostos com os pluronics® foi estimada por meio da constante de ligação ( $K_b$ ), parâmetro obtido a partir de ajustes que levam em conta a variação na intensidade de emissão com a concentração do surfactante, considerando os parâmetros CMC (concentração micelar crítica) e  $n$  (número de micelas por moléculas de FS), importantes na análise da ligação entre os sistemas copoliméricos micelares e o princípio ativo (Caetano & Tabak, 1999; Pellosi et al., 2013). Os espectros de emissão fluorescência do lapachol no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , monitoramento do máximo de emissão ( $\lambda_{max} =$

334nm) em função da concentração dos copolímeros P-123 e F-127 e os ajustes das isotermas de ligação encontram-se apresentados no Figura 26.

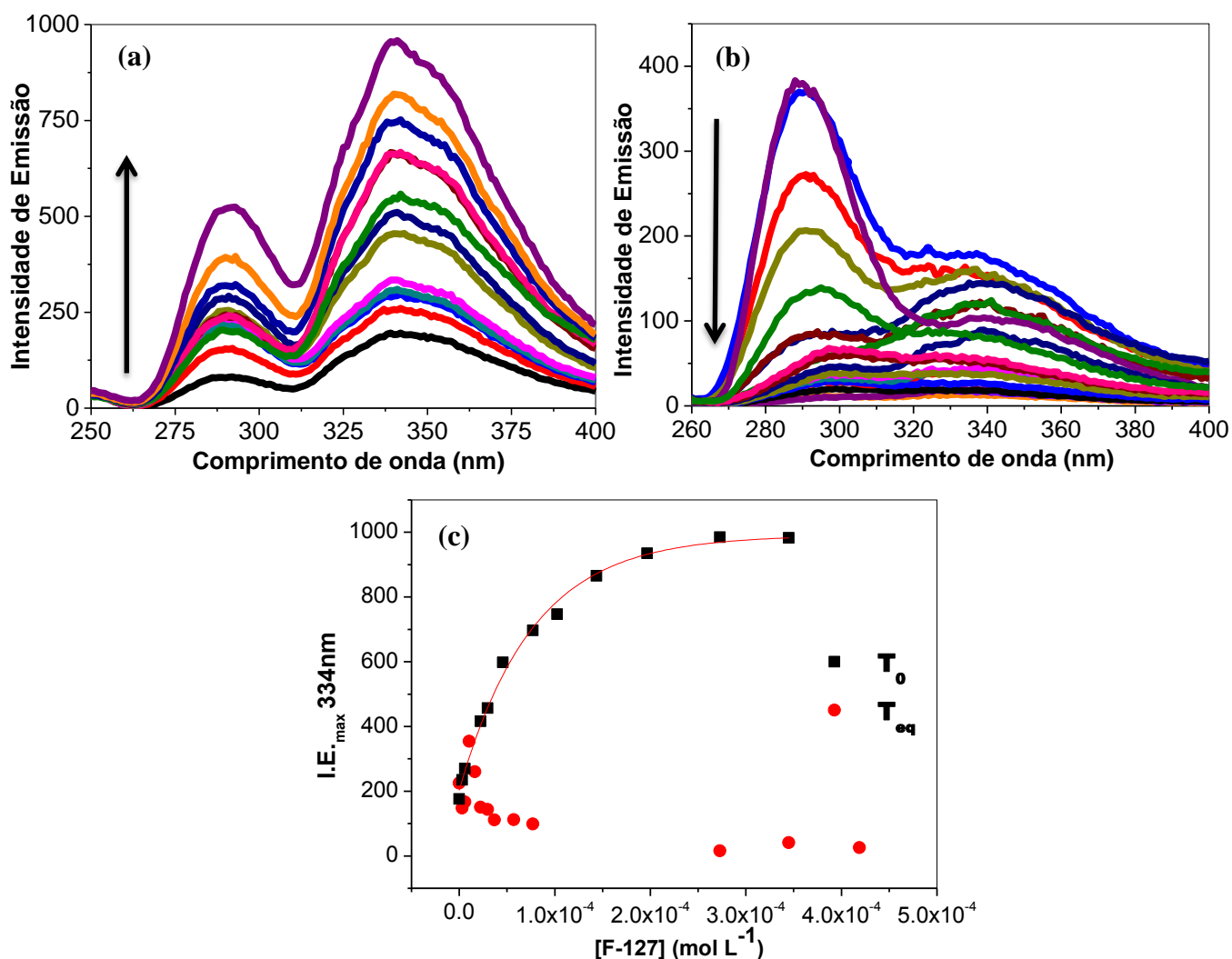


**Figura 26.** Lapachol ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em concentrações variadas de P-123, sendo (a) espectros de emissão de fluorescência no  $T_0$ , (b) espectros de emissão de fluorescência no  $T_{eq}$  ( $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (c) isotermas de ligação no  $T_0$  e  $T_{eq}$  obtidas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e em água destilada com pH 5. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.

Por intermédio das Figuras 26-a e 26-b, referentes ao lapachol em P-123 no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , pode ser observado que a intensidade de emissão de fluorescência para o lapachol ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em água foi extremamente pequena, fato justificado pelo

efeito da auto-agregação dos compostos em meio aquoso, conforme verificado na seção 2.1.1 em sistemas binários homogêneos compostos por água e etanol, além do processo da autosupressão de fluorescência por moléculas de água (Gracetto et al., 2010; Kyrychenko et al., 2011; Lakowicz, 2006; Lopez Arbeloa et al., 1993). Com a adição subsequente de alíquotas do copolímero P-123, foi observado um aumento na intensidade de emissão de fluorescência do composto de forma semelhante no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , efeito possivelmente associado a: i) redução da supressão por moléculas de água com a partição do fármaco para as micelas e ii) a associação dos compostos com a micela induz à monomerização dos mesmos e redistribuição no microambiente micelar com consequente recuperação da fluorescência (Paschalis Alexandridis & Hatton, 1995). No que tange a Figura 26-c pode-se notar que as intensidades de emissão de fluorescência no  $T_0$  e  $T_{eq}$  se assemelham, indicando que o sistema foi capaz de estabilizar o lapachol no estado monomerizado e que não houve uma reorganização significativa do fármaco na micela após o equilíbrio. Dessa forma, para o lapachol em P-123, o sistema se mostrou eficiente na solubilização no  $T_0$  e  $T_{eq}$  e demonstrou aparentemente um processo de estabilização relativamente rápido (Vilsinski, 2013).

Na Figura 27 encontram-se os espectros de emissão de fluorescência e as isotermas de ligação obtidas no  $T_0$  e  $T_{eq}$  para o lapachol em F-127.

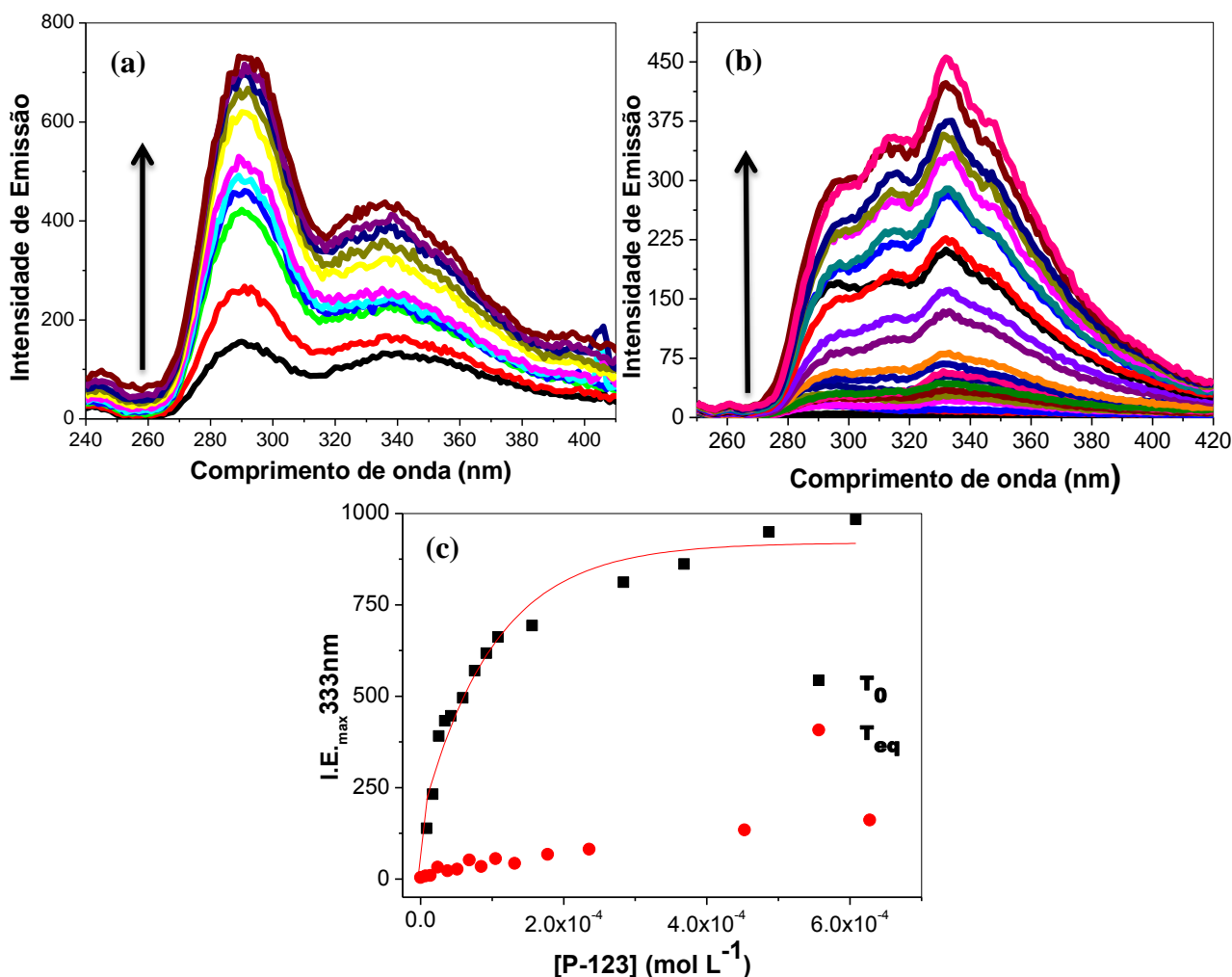


**Figura 27.** Lapachol ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em concentrações variadas de F-127, sendo (a) espectros de emissão de fluorescência no  $T_0$ , (b) espectros de emissão de fluorescência no  $T_{eq}$  ( $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (c) isotermas de ligação no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , obtidas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e em água destilada com pH 5. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.

Com base na Figura 27 pode-se verificar a presença de resultados análogos aos supracitados para o lapachol em P-123 no  $T_0$  (Figura 27-a) que, da mesma forma, demonstrou associar-se imediatamente à micela propiciando a desagregação e redistribuição no microambiente micelar durante um processo primário de ligação.

Entretanto, as medidas no  $T_{eq}$  diferiram do comportamento esperado (Figura 27-b e 27-c), demonstrando um decaimento do máximo de emissão de fluorescência com o aumento da concentração do surfactante, indicando que houve uma reorganização estrutural do composto nos nanocarreadores de F-127, com auto-agregados na micela polimérica após a estabilização termodinâmica (Vilsinski, 2013). Os dados dos experimentos envolvendo absorção eletrônica UV-Vis para o lapachol em F-127 no  $T_{eq}$  (não mostrados) corroboram com o verificado para a emissão, evidenciando uma diminuição e alargamento das principais bandas de absorção eletrônica resultantes da redução da concentração das espécies monomerizadas. De modo semelhante, Vilsinski (2013) verificou uma reorganização estrutural da Ftalocianina de Alumínio-cloro no copolímero P-123 e F-127 com o passar do tempo, dependente da razão  $[FS]/[micela]$ , através de medidas de absorção eletrônica UV-Vis. Esta reorganização foi explicada em termos da complexidade do micro-ambiente micelar copolimérico.

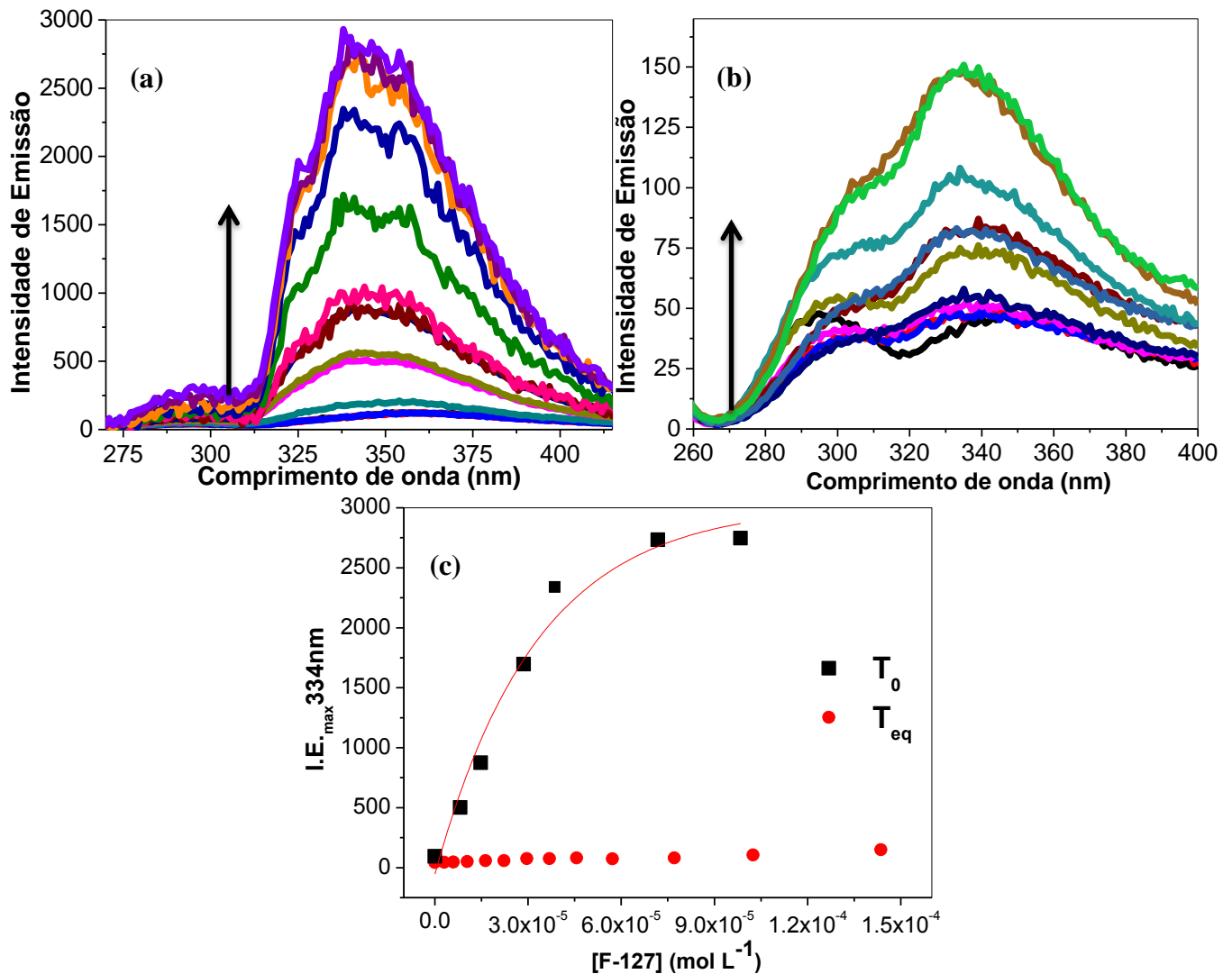
Semelhantemente, as isotermas de ligação obtidas para a  $\beta$ -lapachona nos copolímeros micelares P-123 e F-127 apontaram o efeito de reorganização dependente do tempo, conforme Figuras 28 e 29, respectivamente.



**Figura 28.**  $\beta$ -Lapachona ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em concentrações variadas do copolímero P-123, sendo (a) espectros de emissão de fluorescência no  $T_0$ , (b) espectros de emissão de fluorescência no  $T_{eq}$  ( $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (c) isothermas de ligação no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , obtidas a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e em água destilada com pH 5. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.

No que tange a Figura 28-a e 28-b, para o sistema  $\beta$ -lapachona/P-123, pode-se verificar um aumento da intensidade de emissão de fluorescência com a concentração do copolímero no  $T_0$ , com efeitos de redistribuição e/ou auto-agregação da naftoquinona no  $T_{eq}$  (Figura 28-c).





**Figura 29.**  $\beta$ -Lapachona ( $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em concentrações variadas do copolímero F-127, sendo (a) espectros de emissão de fluorescência no  $T_0$ , (b) espectros de emissão de fluorescência no  $T_{eq}$  ( $\lambda_{exc} = 230 \text{ nm}$ , fenda 10/10 nm) e (c) isotermas de ligação no  $T_0$  e  $T_{eq}$ , obtidas a 30,0 °C e em água destilada com pH 5. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição do copolímero.

Da mesma forma, as Figuras 29-a e 29-b demonstram a partição da naftoquinona para o copolímero, evidenciada pelo aumento na intensidade de emissão

de fluorescência com a adição do surfactante polimérico, sobretudo para a Figura 29-a ( $\beta$ -lapachona/F-127) comparado aos outros sistemas (Figura 26 a 29). Para a Figura 29-a e 29-c verifica-se uma desagregação mais expressiva no  $T_0$ , visto que a intensidade de emissão de fluorescência foi cerca de 29 vezes maior ao valor obtido no  $T_{eq}$ , revelando uma interação inicial mais acentuada da  $\beta$ -lapachona com o copolímero F-127. A menor intensidade de emissão da  $\beta$ -lapachona no  $T_{eq}$  deve-se, como já discutido anteriormente, ao processo de reorganização molecular e auto-agregação do composto com o decorrer do tempo nos microambientes complexos das micelas copoliméricas.

No que concerne ao comportamento da  $\beta$ -lapachona/F-127 no  $T_{eq}$  (Figura 29-b e 29-c), pode-se verificar um perfil digressivo para a isoterma de ligação, ou seja, a mesma apresentou uma expressiva redução na intensidade de emissão de fluorescência comparada ao  $T_0$ , mais uma vez vinculada a efeitos de redistribuição e reorganização temporal da naftoquinona nos microambientes micelares (Vilsinski, 2013).

Os valores de  $K_b$  (constante de ligação), que refletem o grau de interação dos fármacos com as nanoesferas coloidais (Tabela 3), foram obtidos por meio da Equação 4, para as Figuras 26, 27, 28 e 29-c (Caetano & Tabak, 1999; Lázaro et al., 2008). Os valores de  $K_b$  considerados foram aqueles que ofereceram a melhor qualidade do gráfico de resíduos regular obtido nos ajustes não lineares (não mostrado).

**Tabela 3.** Valores de  $K_b$  (constante de ligação) do lapachol e  $\beta$ -lapachona com sistemas micelares de P-123 e F-127, a 30,0 °C, em água destilada (pH 5,0), estimados pela Equação 4, no  $T_0$ =tempo inicial.

	$K_b(10^3 Lmol^{-1})$	CMC( $10^{-6} molL^{-1}$ )	n
<b>lapachol/F-127</b>	16,8±0,8	4,41±0,9	1,0±0,001
<b>lapachol/P-123</b>	1,28±0,03	29,6±3,9	1,0±0,001
<b><math>\beta</math>-lapachona /F-127</b>	7,8±0,5	6,80±0,9	0,8±0,01
<b><math>\beta</math>-lapachona /P-123</b>	4,7±0,2	0,38±2,7	1,0±0,005

As isotermas no  $T_{eq}$  para os sistemas naftoquinona/copolímero não puderam ser ajustadas pelo modelo proposto, devido à complexidade do perfil de interação naftoquinona/copolímero (Hosseinzadeh, Maleki, Matin, & Nikkhahi, 2008; Moore, Harris, & Palepu, 2007; Vilsinski, 2013). Esse efeito foi associado à estabilização da naftoquinona nos sistemas micelares copoliméricos que, quando comparados aos surfactantes usuais, apresentam características intrínsecas e que podem conferir aos sistemas comportamentos anômalos, dependendo da concentração, complexidade na organização estrutural e localização do fármaco no micro ambiente (Vilsinski, 2013). Uma das distinções mais marcantes entre as micelas usuais (SDS, CTAB, entre outras) e as copoliméricas está na constituição dos unímeros poliméricos que, individualmente, apresentam a capacidade de solubilizar fármacos hidrofóbicos, mesmo abaixo da CMC, devido a sua auto-associação em meio aquoso e a formação de micro domínios com propriedades específicas e polaridade distinta (P. Liu et al., 2008).

Segundo os dados apresentados para as naftoquinonas incorporadas nos copolímeros micelares F-127 e P-123 (Tabela 3) pode-se verificar, no geral, maior interação de ambos os compostos com o copolímero F-127 no  $T_0$ , visto que os mesmos

ofereceram maior constante de associação ( $K_b$ ). Além disso, comparando-se as medidas nos tempos iniciais ( $T_0$ ) da Figura 26-c (lapachol/P-123) com 27-c (lapachol/F-127) e 28-c ( $\beta$ -lapachona/P-123) com 29-c ( $\beta$ -lapachona/F-127), pode-se verificar que ambos interagem significativamente com os copolímeros micelares no  $T_0$ , sem reorganização aparente, provavelmente devido ao primeiro contato com o sistema micelar que, por apresentar maior área superficial com relação ao fármaco, oferece maior capacidade de adsorver a naftoquinona. No  $T_0$  o lapachol apresentou os maiores valores de  $K_b$  para o sistema em F-127, sendo aproximadamente 10 vezes maior que seu análogo em P-123. Para a  $\beta$ -lapachona o mesmo foi verificado, sendo que o valor de  $K_b$  obtido foi aproximadamente duas vezes maior ao verificado em P-123 no  $T_0$  (Tabela 3). Esse efeito pode estar atrelado a maior extensão do segmento OE característico dessas micelas quando comparadas às obtidas em P-123 (Figura 25) e a baixa hidrofobicidade das naftoquinonas, conforme verificado pelos coeficientes de partição água/octanol apresentados na Seção 2.1.3, permitindo maior interação naftoquinona/região OE das micelas de F-127.

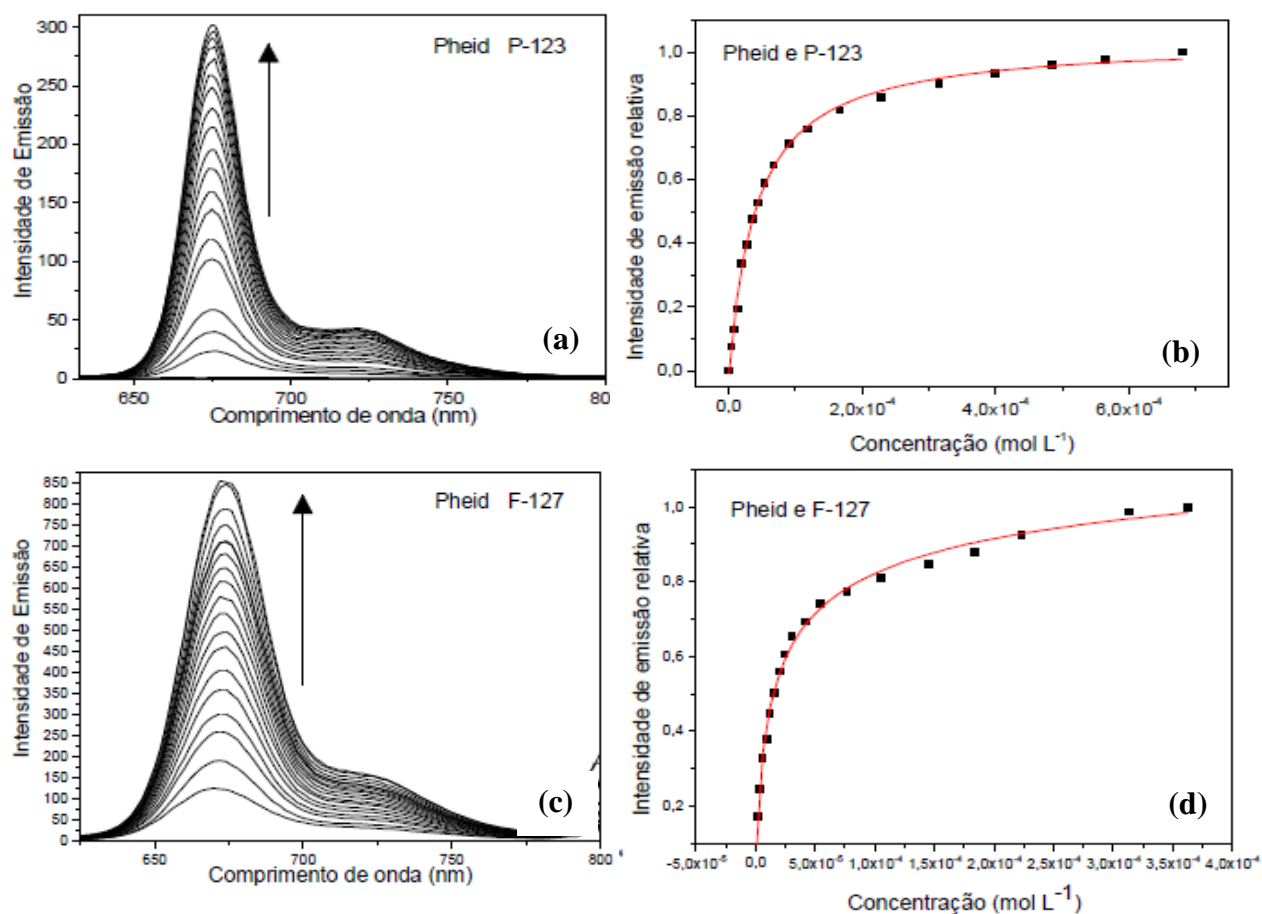
No que tange ao parâmetro  $n$  (Tabela 3), associado ao número de moléculas de fármaco por nanopartícula coloidal, pode-se verificar valores próximos à unidade, indicando a presença de uma molécula de naftoquinona solubilizada por micela. A respeito dos valores de CMC verificados (Tabela 3), pode-se afirmar que a presença da naftoquinona forneceu valores razoáveis de CMC nos ajustes, tanto para o F-127 ( $CMC_{literatura}$  na ordem de  $10^{-5}$ ) quanto para o P-123 ( $CMC_{literatura}$  na ordem de  $10^{-6}$ ) (Paschalis Alexandridis & Hatton, 1995; Su, Wang, & Liu, 2002).

As respostas obtidas nesses estudos (reorganização estrutural dos compostos nos copolímeros com o passar do tempo) levam à concepção de que as naftoquinonas não podem ser formuladas pela simples adição de surfactante, método direto, e que o

procedimento de formulação por dispersão sólida (DS) poderia ser mais eficiente na estabilização do composto na matriz micelar. A prerrogativa que caracteriza o método DS vantajoso está vinculada à formação de uma matriz sólida amorfa que, pelo fato das moléculas estarem arranjadas ao acaso, requer uma energia de solvatação e homogeneização menor, favorecendo uma dissolução rápida e efetiva, além de permitir um encapsulado com maior concentração de espécies monomerizadas devido ao maior contato fármaco/copolímero (Shi et al., 2013).

Diante da complexidade das isotermas de ligação e da dificuldade em se obter o parâmetro que estima a interação naftoquinona/copolímero ( $K_b$ ), avaliaram-se também os valores de  $K_b$  pela equação tradicional de duplo recíproco, que não considera influência das variáveis CMC e o termo  $n$  em suas determinações (não mostrado). Os valores de  $K_b$  obtidos no  $T_0$  a partir da equação de duplo recíproco, embora superiores aos apresentados na Tabela 3 seguiram a mesma tendência e demonstraram  $K_b$ 's maiores para os sistemas naftoquinona/F-127, sendo aproximadamente 10 vezes maior para o lapachol e 1,3 vezes maior para a  $\beta$ -lapachona, comparada a seus análogos em P-123.

Investigações envolvendo a ligação entre os copolímeros e os derivados da clorofila haviam sido previamente realizadas nos estudos desenvolvidos por Gerola (2011). Na Figura 30 encontram-se os espectros de emissão de fluorescência obtidos por Gerola (2011) para os derivados Pheid em F-127 e P-123.



**Figura 30.** Estudos de ligação clorofila/copolímero desenvolvidos por Gerola *et al* (2011) e Gerola (2013) sendo, (a) espectros de emissão de fluorescência do Pheid ( $5,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) com a adição de alíquotas de P-123 2% (m/V), (b)  $\lambda_{\max}$  610 nm do Pheid em P-123, (c) espectros de emissão de fluorescência do Pheid ( $5,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>) com a adição de F-127 2% (m/V) e (d)  $\lambda_{\max}$  610 nm do Pheid em F-127. Dados extraídos de Gerola, 2010.

No que tange as Figuras 30-a e 30-c podem-se verificar comportamentos similares aos observados para as naftoquinonas, isto é, um aumento na intensidade de emissão de fluorescência com a adição do copolímero. Segundo a autora, tais eventos estão atrelados a efeitos de interação, associação e monomerização da clorina nos microdomínios micelares. Com base nas Figuras 30-b e 30-d podem-se verificar

comportamentos divergentes aos verificados para as naftoquinonas. As curvas experimentais obtidas para o derivado clorínico mostram comportamentos semelhantes e comumente observados em isotermas de ligação, caracterizado por uma etapa simples de interação com tendência a saturação na interação com o copolímero (Hosseinzadeh et al., 2008; Moore et al., 2007). As isotermas com perfil definido não foram obtidas para as naftoquinonas, sobretudo no  $T_{eq}$ , sendo esse efeito foi atribuído à complexidade do sistema.

As constantes de ligação ( $K_b$ ), que estimam a interação clorofila/copolímero, foram determinadas pelos ajustes da Equação 4, fixando  $n$  igual a 1. Os dados obtidos revelaram uma forte interação clorofila/surfactante, com valores de  $K_b$  na ordem de  $10^4$  (Gerola, 2010; Gerola, Tsubone, et al., 2011).

#### **2.1.6. Avaliação da Interação do lapachol com sistemas micelares copoliméricos em pHs ácido (4,5) e básico (8,0)**

As micelas copoliméricas, assim como outros sistemas biotransportadores, são frequentemente utilizadas para transporte e entrega de fármacos devido a uma série de vantagens. A proteção contra degradação ou excreção do fármaco, efeito da solubilização do medicamento, entrega direcionada e a proteção contra os efeitos colaterais são os benefícios que atribuíram a esses sistemas destaque na pesquisa (van Nostrum, 2004).

Uma vez na corrente sanguínea, o fármaco incorporado no biotransportador pode alojar-se no tecido doente por dois efeitos principais: a *retenção e permeabilidade*

*umentada* (EPR - Enhanced Permeability and Retention), com liberação da carga de uma forma não controlada ou ainda por um *estímulo responsivo*, com mecanismo de liberação desencadeado por estímulos locais do tecido doente, como temperatura e pH (Gao, Li, & Lee, 2013). O pH dos tecidos tumorais é mais ácido que os tecidos saudáveis (pH 7,4). Isso ocorre devido a maior taxa de glicólise nessa região produzindo, entre outros ácidos, o ácido lático em condições aeróbias e anaeróbias (Gao et al., 2013). Essa característica tem sido utilizada como fonte de estímulo interno para liberação do medicamento. Além disso, a maior acidez das organelas endossomo (5,5-6,5) e lisossomos (4,5-5,0) faz com que o copolímero tenha maior tendência de incorporação nas mesmas. A desestabilização causada é um ponto importante para a maior permanência e atividade do medicamento no citosol (I. Lee et al., 2013).

Os polímeros sensíveis ao pH são constituídos por grupos ionizáveis, que alteraram sua forma protolítica em resposta a uma variação do pH do meio. À medida que os valores de pH são modificados, a ionização do polímero pode ser alterada, resultando em modificações no diâmetro hidrodinâmico e estado molecular das cadeias de polímero (Louro, Nascimento, & Tabak, 1994; K. Singh, Dharaiya, Marangoni, & Bahadur, 2013).

Singh *et al* (2013) estudaram a influência da p-toluidina, cujo pKa é 5,1, na viscosidade, forma e tamanho micelar com a variação do pH em micelas de surfactantes aniônico (SDS- dodecil sulfato de sódio), catiônico (DTAB - brometo trimetilamônio de dodecilo), zwitteriônico (DDMPS - dodecil-N,N-dimetil-3-amino-1-propanosulfonato), catiônico não aniônico (DMDAO - óxido de amina dodecil – dimetil) e não iônico (Triton X-100). Os autores verificaram que dependendo da forma protolítica da p-toluidina pode ocorrer interação eletrostática ou hidrofóbica com os surfactantes. A localização da substância na micela polimérica influi em sua forma e esta pode ser



modificada com a variação do pH do meio. De uma forma geral, os autores notaram comportamentos particulares para cada surfactante, obtendo uma modificação estrutural mais significativa para as micelas de SDS em baixos valores de pH, que passaram de cilíndricas para bastonetes. O efeito foi atribuído à formação do par iônico entre os monômeros SDS e a forma catiônica da p-toluidina (pKa 5,1), favorecendo a solubilidade da p-toluidina e ao aumento da viscosidade em pH baixo. De forma análoga, as micelas de DMDAO demonstraram sensibilidade de tamanho e forma com a variação de pH. Nesse caso, as modificações verificadas foram influenciadas pelo grau de protonação da “cabeça” óxido amino do surfactante, que influencia nas interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Os resultados demonstraram a presença de micelas na forma de haste entre pH 5-6, região essa de maior viscosidade, esférica em pH baixo e elíptica em meio alcalino. As respostas obtidas para as micelas de Triton X-100, da mesma forma, demonstraram sensibilidade ao pH e um aumento do tamanho micelar em meios alcalinos. O efeito foi associado à forma protolítica da substância acima do ponto isoelétrico (pH 5,1) que, por não causar efeitos de repulsão, permitiu o crescimento micelar. Em pHs baixos o inverso foi verificado. A protonação da p-toluidina e os segmentos óxido de etileno da micela geraram efeito de repulsão, fazendo com que a p-toluidina se aloje em um micro ambiente externo da micela, na interface micela-água, reduzindo o tamanho do carreador de forma semelhante a “referência” obtida sem a presença da p-toluidina. Os resultados obtidos para os sistemas DTAB / DDMPS demonstraram certa inércia da forma e tamanho micelar com a variação do pH do meio (K. Singh et al., 2013).

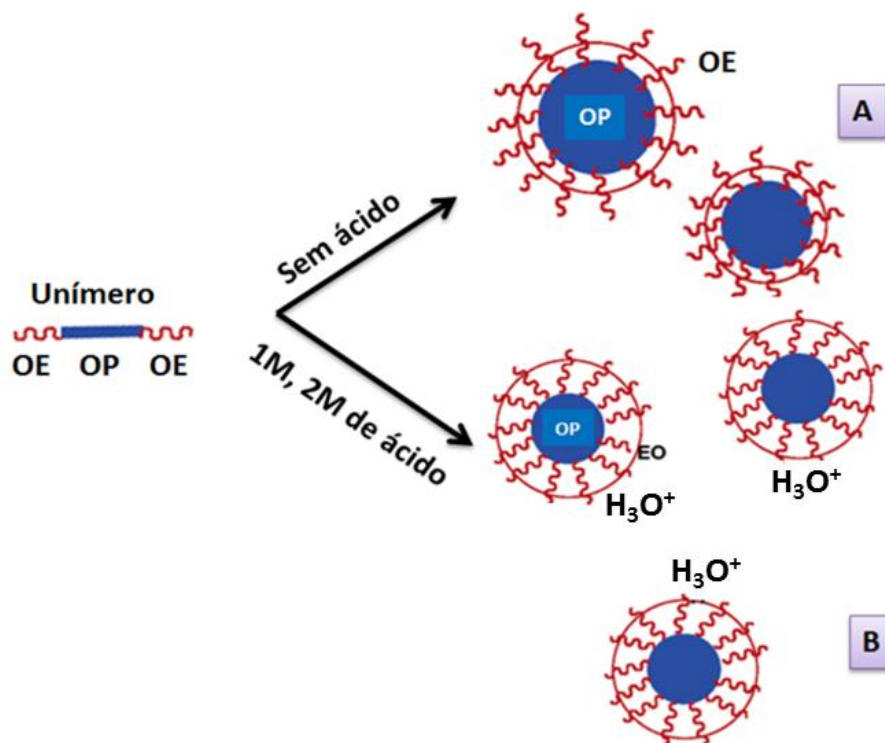
Louro *et al* (1994) estudaram a ligação pH-dependente da dibucaína, fármaco utilizado como anestésico local, com micelas iônicas (CTAC-cloreto de cetiltrimetilamônio, LPC-isoleucina e SDS-dodecilsulfato de sódio) por espectroscopia

de emissão de fluorescência. A estrutura química de muitos anestésicos locais envolve a presença de uma amina terciária e anéis aromáticos. O grupo amina terciária apresenta um valor de pKa próximo ao pH fisiológico, o que implica a presença de duas formas protolíticas interagindo com os sistemas biológicos. Os anéis aromáticos apresentam propriedades fluorescentes particulares que variam com o estado de protonação, permitindo o acompanhamento das mudanças no valor de pKa decorrentes da associação dibucaína /micela. A mudança nas intensidades de emissão foi o parâmetro utilizado pelos autores para a determinação da constante de ligação para as formas carregada e neutra da espécie. Segundo os autores, a proximidade entre o pKa da substância e o pH fisiológico exige estudos cujo objetivo é a investigação das propriedades de ligação de cada forma protolítica com a membrana celular. Para isso, a utilização de sistemas modelos, como as micelas poliméricas, são fundamentais para estimar a afinidade de moléculas anfipáticas com a membrana biológica, seja na avaliação do  $pK_{a(ap)}$  ou determinação da constante de ligação, ambos resultantes da interação do medicamento com sistemas membranares ou biotransportadores em si. Com relação às constantes de ligação pH dependentes (realizadas em pHs que favoreçam a presença de somente uma forma protolítica), obtidas entre a dibucaína e as micelas iônicas (CTAC, SDS e LPC), os autores observaram que a forma protolítica neutra em micelas de CTAC e LPC atingiram a saturação em concentrações mais baixas de surfactante, comparada à forma ionizada. Isso quer dizer que os valores de constante de ligação obtidos para a forma neutra nesses sistemas micelares foram maiores, comparados aos valores obtidos para a forma protonada. Para as micelas de SDS, os autores verificaram que a saturação de surfactante foi atingida em menores concentrações para a forma protonada (meio ácido), comparada a forma neutra, levando a um valor de  $K_b$  aproximadamente 11 vezes maior para a forma ionizada. Esse efeito

foi justificado pela interação entre as cargas opostas das micelas de SDS (aniônica) e a forma protolítica da dibucaína, carregadas positivamente em meio ácido (Louro et al., 1994).

Yang, B. *et al* (2006), utilizando-se das técnicas de espectroscopia no infravermelho, fluorescência e microscopia, investigaram o efeito da adição de ácido no tamanho, TMC e constituição de micelas de P-123. Os autores utilizaram como sonda de micropolaridade o Pireno, que apresenta cinco picos de fluorescência ( $I_1, I_2...I_5$ ), onde a razão entre  $I_1/I_3$  permite estimar a micropolaridade do ambiente. Nesses casos, meios que ofereçam razões ( $I_1/I_3$ ) elevadas são caracterizados por apresentar maior polaridade. Os autores verificaram, por espectros de FTIR, uma redução da interação dos grupos metila do copolímero (segmento hidrofóbico) com as moléculas de água ao adicionar concentrações de 0,5 a 2,0 mol L<sup>-1</sup> de HCl, resultando em um encurtamento do tamanho do segmento apolar da micela polimérica, conforme Figuras 31-a e 31-b. Já os segmentos polares, compostos por grupos óxido de etileno, sofreram uma espécie de fortalecimento ou reforço das ligações de hidrogênio com a adição de íons H<sup>+</sup> até 2 mol L<sup>-1</sup> de HCl, resultando em um alongamento da área dos segmentos polares do carreador micelar. Em condições abaixo da TMC, a razão entre as bandas do pireno indicou a presença de um ambiente de elevada polaridade, decorrente do reforço das ligações de hidrogênio pelos prótons adicionados. Em condições acima da TMC ocorre a desidratação dos grupos óxido de propileno, formação do core hidrofóbico, com uma mudança abrupta na polaridade do meio indicada pela baixa razão entre as bandas do pireno. O aumento da temperatura e da acidez do meio (3 mol L<sup>-1</sup> de HCl) resulta em razões ainda mais baixas decorrentes não só da desidratação dos segmentos OP, mas também da degradação dos grupos óxido de etileno do copolímero. Foi verificado ainda nos trabalhos de Yang, B. *et al* (2006) um aumento da TMC do copolímero para 14, 16,

18, e 22,0 °C para as concentrações 0, 1, 2 e 3 mol L<sup>-1</sup> de HCl. A Figura 31 ilustra os efeitos da adição de ácido sobre a constituição micelar (Yang et al., 2006).

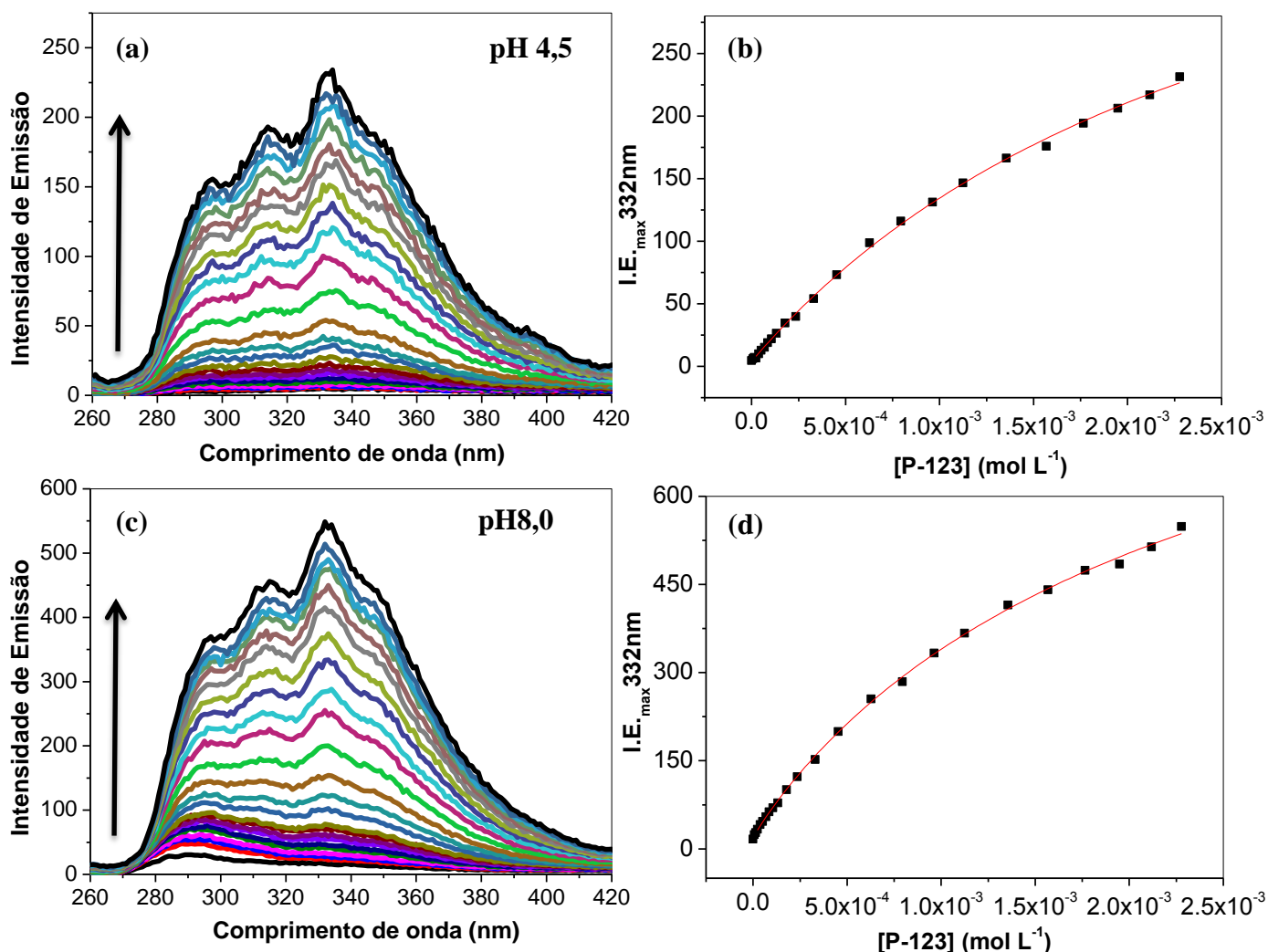


**Figura 31.** Representação esquemática, extraída de Yang, B. *et al* (2006), com modificações, sobre o efeito da adição de ácido na agregação e constituição das micelas de P-123.

A Figura 31-a representa a constituição das micelas de P-123 sem a adição de ácido. As micelas de P-123, comparadas às de F-127, apresentam um tamanho de segmento hidrofílico menor, contendo uma razão mais baixa de grupos OE/OP e um maior caráter hidrofóbico (Wanka et al., 1994). A adição de íons H<sup>+</sup>, Figura 31-b, permitiu um reforço das ligações de hidrogênio entre o copolímero e as moléculas de água protonada, tornando a desidratação mais dificultada (aumento da TMC) (Yang et al., 2006). Esse reforço (originado pela interação com as moléculas de água protonada) gerou um alongamento das cadeias de óxido de etileno e um aumento no tamanho do

segmento hidrofílico, resultante da minimização de repulsão de cargas dos grupos OE. A presença de moléculas de água protonada na superfície da micela causou a redução da polidispersividade, pois as mesmas foram responsáveis por forças de repulsão entre as cargas geradas na superfície micelar (Yang et al., 2006).

Diante das características particulares das micelas frente a variações de pH e das diferentes propriedades de ligação das formas protolíticas com os sistemas micelares, buscou-se complementar os estudos estimando qual espécie protolítica (lapachol ou lapachonato) apresentará maior tendência de partição e solubilização nas micelas poliméricas, sistemas modelo que mimetizam a membrana celular. As avaliações foram realizadas em pHs específicos, que favoreçam o predomínio de uma forma protolítica, escolhida com base nos estudos de pKa apresentado nas seções 2.1.2 e 2.1.4. Os resultados obtidos para o sistema lapachol/P-123 em pH 4,5, onde se obtém 99% das espécies na forma neutra e em pH 8,0, com aproximadamente 96% das espécies na forma iônica (lapachonato), encontram-se na Figura 32.

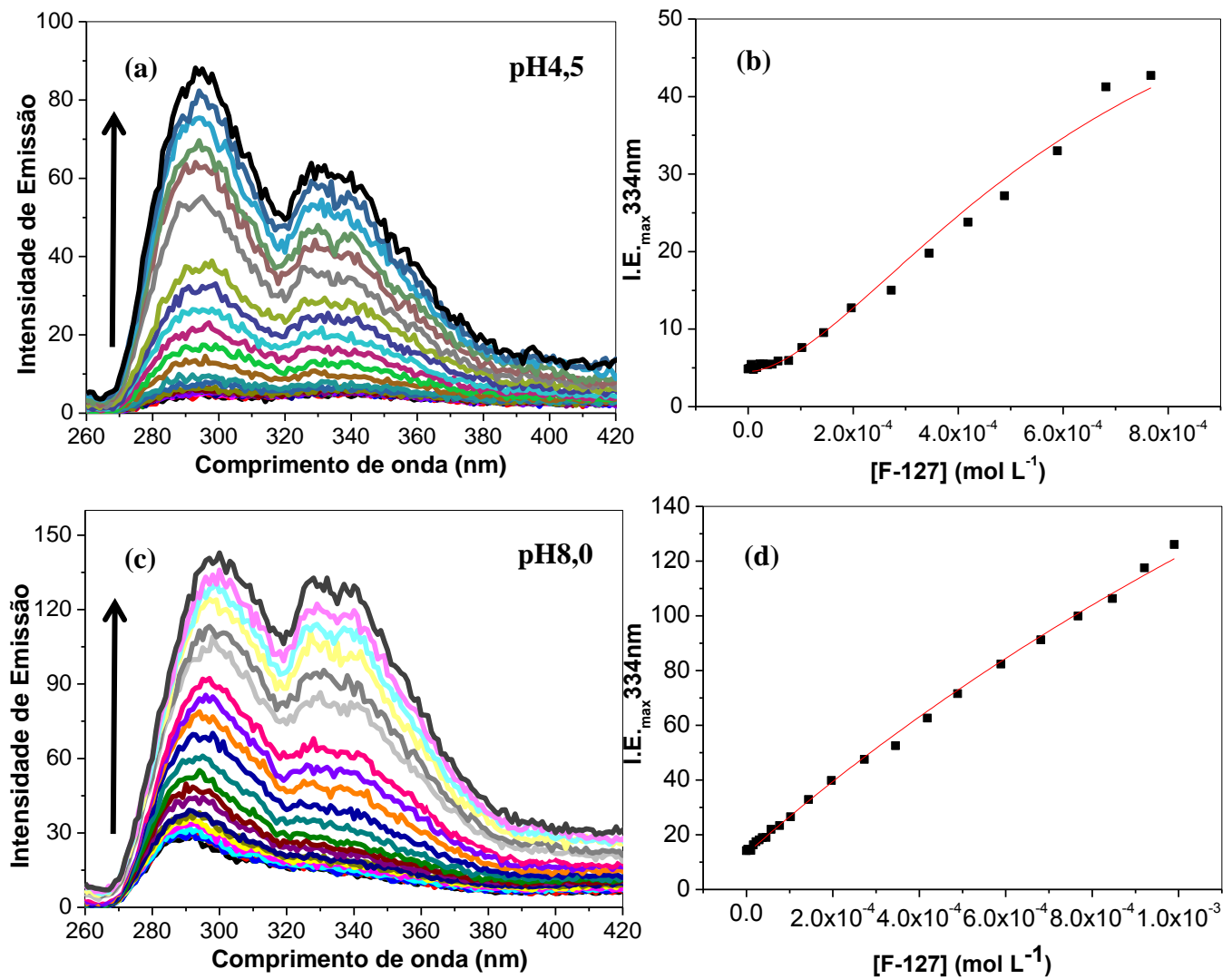


**Figura 32.** Espectros de emissão de fluorescência obtidos a 30,0 °C (a) (c) e isoterma de ligação (b) (d) obtidos a partir da titulação do lapachol com copolímero P-123 nos pHs 4,5 e 8,0, respectivamente. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.

Com base na Figura 32-a e 32-c, referentes ao lapachol em P-123 nos pHs 4,5 e 8,0, pode-se verificar inicialmente uma baixa intensidade de emissão de fluorescência para o lapachol ( $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) em meio aquoso tamponado. Esse fato pode estar associado, conforme discutido nos estudos de misturas binárias água/etanol (seção 2.1.1.), ao efeito da auto-agregação dos compostos nesse meio ou ainda ao

processo da supressão de fluorescência por moléculas de água (Gracetto et al., 2010; Kyrychenko et al., 2011; Lakowicz, 2006; Lopez Arbeloa et al., 1993). Com a adição subsequente de alíquotas do copolímero P-123, cujo estoque foi preparado no respectivo tampão, foi verificado um aumento na intensidade de emissão de fluorescência do composto em ambos os pHs estudados. Segundo Alexandridis e Hatton (1995) esse efeito pode estar vinculado, conforme discutido na seção 2.1.5, à redução da supressão por moléculas de água e a monomerização do fármaco resultante da associação com o sistema micelar (Paschalis Alexandridis & Hatton, 1995). A menor intensidade de emissão verificada para o sistema Lapachol/pH 4,5 pode estar associada a um baixo rendimento quântico da espécie protonada, uma vez que seria esperado maior intensidade de emissão como resposta da maior interação dessa espécie com os copolímeros micelares.

Os resultados obtidos para o lapachol em F-127 na forma neutra (pH 4,5 com 97% na forma LapH) e ionizada (pH 8,0 com 99% na forma Lap<sup>-</sup>) encontram-se na Figura 33.



**Figura 33.** Espectros de emissão de fluorescência obtidos a 30,0 °C (a) (c) e isoterma de ligação (b) (d) obtidos a partir da titulação do lapachol com copolímero F-127 nos pHs 4,5 e 8,0, respectivamente. As setas indicam a direção da variação espectral com a adição de copolímero.

No que tange às Figuras 33-a e 33-c, relativas ao lapachol em F-127 nos pHs 4,5 (forma neutra) e 8,0 (lapachonato), verificou-se o mesmo comportamento particular de



ligação discutido anteriormente, caracterizado por uma baixa intensidade de emissão de fluorescência para o lapachol inicialmente em meio aquoso tamponado, seguido do aumento da mesma com a adição do copolímero micelar.

A constante de ligação ( $K_b$ ), que estima a interação entre os copolímeros e o fármaco, foi determinada e encontra-se apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores de  $K_b$ , estimados pela Equação 4, para as isotermas de ligação do lapachol em pH 4,5 (neutra) e 8,0 (lapachonato).

pH		$K_b(10^2 \text{Lmol}^{-1})$	CMC( $10^{-6} \text{Lmol}^{-1}$ )	n
4,5	<b>Neutra/ P-123</b>	5,0±0,05	16,3±4,75	1,0±0,00
8,0	<b>Lapachonato/ P-123</b>	3,0±0,02	6,85±0,01	1,0±0,00
4,5	<b>Neutra/ F-127</b>	3,2±0,10	30,8±7,44	1,0±0,00
8,0	<b>Lapachonato/ F-127</b>	2,4±0,07	10,42±0,02	1,0±0,00

Embora as Figuras 32 e 33 demonstrem maiores intensidades de emissão para a forma iônica (lapachonato) (Figura 32 e 33-c e 33-d), sugerindo maiores interações desta com os copolímeros micelares, os ajustes apontaram o inverso, isto é, maiores valores de  $K_b$  para a forma neutra da espécie. Essa observação pode estar vinculada à constituição da micela polimérica em meio ácido que, por apresentar um segmento hidrofílico maior (segmentos OE) (Figuras 6 e 25) acomoda melhor a substância (Yang et al., 2006). Em adição, a monomerização primária verificada pode também estar atrelada à acomodação do fármaco em um micro ambiente que favoreça maior monomerização, já que a localização é também dependente do pH do meio (K. Singh et al., 2013). Além disso, os íons  $H^+$  presentes na solução podem fortalecer as ligações de hidrogênio existentes entre lapachol/copolímero, permitindo os maiores

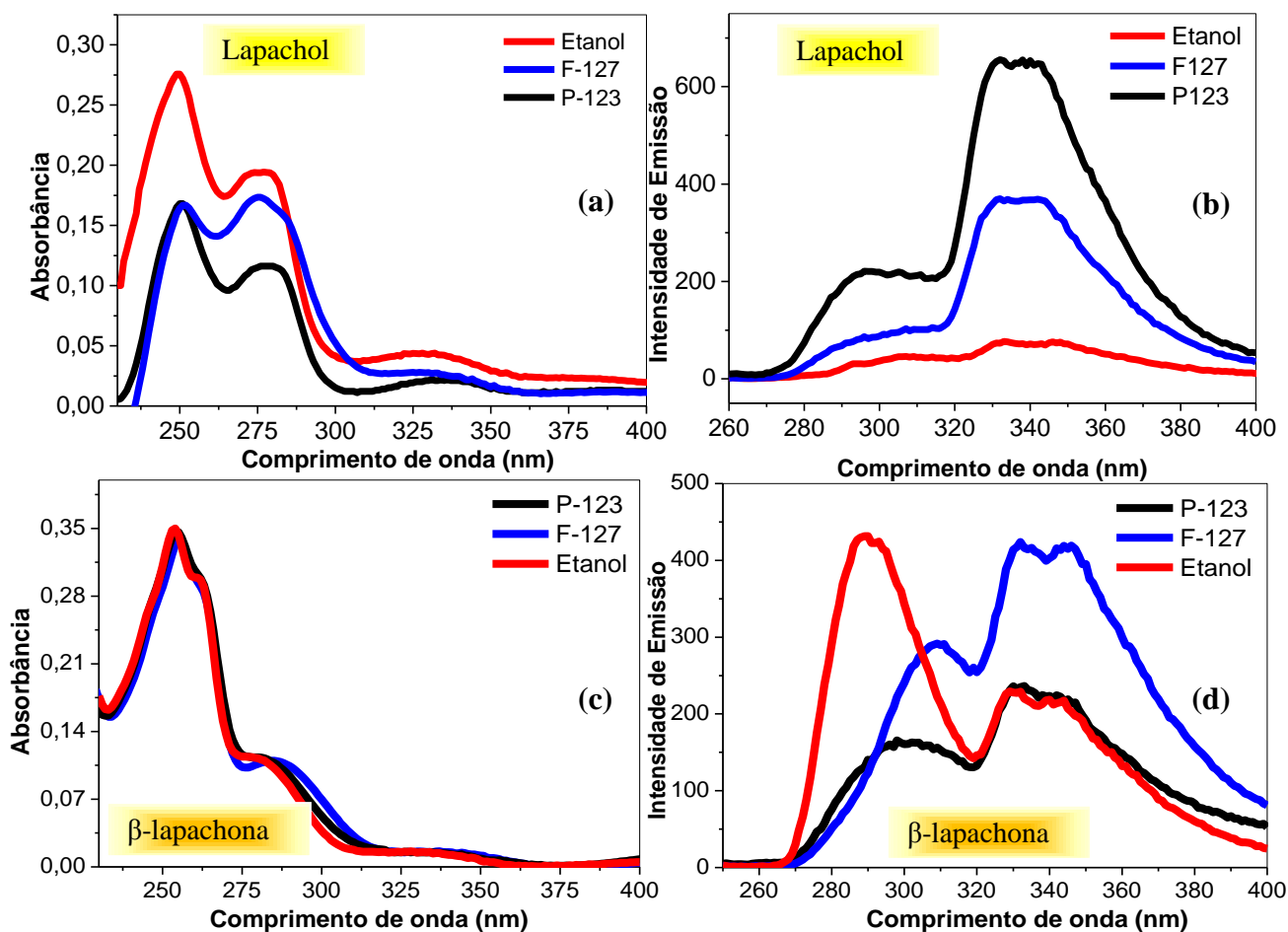
valores de  $K_b$  observados (Basak & Bandyopadhyay, 2013; Chen & Li, 2011; Yang et al., 2006). Tratando-se ainda dos dados apresentados nas Figuras 32 e 33 e Tabela 4, a menor interação verificada entre o lapachol na forma ionizada e a micela copolimérica pode estar associada a efeitos de repulsão com os segmentos de óxido de etileno, que constituem a região hidrofílica da micela copolimérica.

Tais resultados vão de encontro ao trabalho desenvolvido por Basak e Bandyopadhyay (2013), que estudaram os efeitos da solubilização de fármacos hidrofóbicos, temperatura e pH em micelas de F-127. Os autores observaram uma redução considerável da TMC e da polidispersividade e um aumento da hidrofobicidade dos segmentos OP com a adição do medicamento. Além disso, os autores constataram que a incorporação do fármaco carregado negativamente gerava um aumento no tamanho da micela, originado pela repulsão entre as cargas. Em pHs mais alcalinos o medicamento foi liberado para o meio extra micelar, sofrendo o processo de auto-agregação (Basak & Bandyopadhyay, 2013). Dessa forma, pode-se sugerir que o comportamento das isotermas de ligação apresentadas na seção 2.1.5. obtidas em água pura (pH 5,0) (P-123 tem-se 97% na forma LapH e F-127 91% na forma LapH) apresentam a contribuição das duas formas protolíticas, sendo que a forma neutra, por apresentar aparentemente maior interação com os sistemas micelares, contribuiu de forma mais efetiva para obtenção dos valores de  $K_b$ .

Após analisar o comportamento de ligação das naftoquinonas, buscou-se investigar as propriedades físico-químicas das mesmas quando submetidas ao método de formulação por dispersão sólida nos copolímeros micelares. Este estudo foi desenvolvido e encontra-se apresentado na próxima seção.

### **2.1.7. Formulação do lapachol e $\beta$ -lapachona nos copolímeros P-123 e F-127.**

Após estudar os processos de auto-agregação em meio homogêneo e afinidade dos compostos com os copolímeros em diferentes pHs, buscou-se investigar a capacidade de solubilização e as propriedades espectroscópicas do lapachol e  $\beta$ -lapachona nesses sistemas copoliméricos coloidais. O encapsulamento foi realizado pelo método de dispersão sólida (Zhang, Jackson, & Burt, 1996) na proporção 1:1 [Naftoquinona]/[copolímero<sub>mic</sub>], o que corresponde 1% m/V ( $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) para o F-127 e 2% m/V; ( $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) para o P-123 a 30,0 °C. A literatura aponta que a partir dessa metodologia pode-se alcançar melhor eficiência de encapsulamento devido à formação inicial de uma matriz sólida amorfa, composta pelo fármaco disperso no copolímero micelar (Dhirendra, Lewis, Udupa, & Atin, 2009; Kimura, Hirayama, Arima, & Uekama, 2000; Mogal, Gurjar, Yamgar, & Kamod, 2012; Shi et al., 2013). A caracterização espectral dos compostos formulados encontra-se na Figura 34.



**Figura 34.** Espectros de absorção e emissão das naftoquinonas em etanol e nos sistemas micelares F-127 (1% m/V ;  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) e P-123 (2% m/V ;  $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) sendo (a) absorção eletrônica ( $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e (b) emissão de fluorescência do lapachol ( $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ); (c) absorção eletrônica ( $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e (d) emissão de fluorescência da  $\beta$ -lapachona ( $3,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ).  $\lambda_{\text{exc}}=230 \text{ nm}$ ;  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$  (fenda 5/5 nm) em água destilada.

Pode-se verificar, a partir da Figura 34-a, pequenos deslocamentos batocromicos no espectro de absorção eletrônica UV-Vis do lapachol formulado em F-127 e P-123. Nota-se que o sistema lapachol/F-127 apresenta uma maior intensidade de absorção e alargamento da banda de absorção eletrônica em 273 nm, o que pode estar associado a três efeitos: *i*) consequência da polaridade ou variações do pH no micro ambiente micelar, como observado nos estudos de pKa (seções 2.1.2 e 2.1.4 ); *ii*) a presença de espécies auto-agregadas, conforme verificado nos estudos prévios efetuados

em meio homogêneo envolvendo misturas binárias de água e etanol (seção 2.1.1.) ou *iii*) a mudança na forma espectral como característica intrínseca do lapachol nesse meio.

Para melhor caracterizar tais sistemas prepararam-se formulados a 2, 4 e 8% (m/V) do lapachol nos surfactantes poliméricos P-123 (3,4; 6,9; 13,8 mmol L<sup>-1</sup>) e F-127 (1,3; 3,2; 6,4 mmol L<sup>-1</sup>). Os perfis espectrais obtidos para esses formulados foram semelhantes aos apresentados na Figura 34, mostrando que os mesmos não são dependentes da proporção de copolímero empregada. A estes formulados adicionaram-se alíquotas de ácido (0,05 mol L<sup>-1</sup>) e base (0,5 mol L<sup>-1</sup>) a fim de identificar a sensibilidade do lapachol ao pH do meio em função da sua localização e também do tamanho micelar. Notou-se que as formulações obtidas em menores concentrações de copolímero (2% m/V) apresentaram maior sensibilidade aos íons H<sup>+</sup> e OH<sup>-</sup> adicionados, sobretudo para o sistema lapachol/F-127. Nestes, a adição de ácido resultou em um aumento na intensidade de absorção da banda em 250 nm, com redução significativa do máximo em aproximadamente 273 nm. De forma análoga, a adição de base resultou em um aumento da banda em aproximadamente 273 nm com concomitante redução do sinal em torno 250 nm (não mostrado). Para os formulados obtidos em 4% (m/V) os efeitos da variação do pH foram menos expressivos e ausentes para as formulações a 8% (m/V) do copolímero (não mostrado). Esse comportamento provavelmente está vinculado ao aumento no número de agregação micelar com o aumento da concentração do copolímero (Lam, 1999). Assim, em concentrações de copolímero maiores a naftoquinona encontra-se em um microambiente de maior complexidade e difícil acesso aos íons adicionados. Tal avaliação permitiu propor que as variações observadas nos espectros de absorção do lapachol (Figura 34) correspondem preferencialmente aos efeitos de variações microlocais de pH oriundas da localização do fármaco na micela copolimérica.

Com relação aos espectros de emissão de fluorescência do lapachol em etanol e nos meios micelares (Figura 34-b), pode-se verificar uma maior intensidade de emissão dos formulados em P-123 e F-127, com relação ao valor obtido em etanol. As diferenças nas intensidades de emissão das espécies após a formulação podem estar associadas a efeitos de localização do lapachol na micela copolimérica e sua acessibilidade a moléculas de água (supressor de fluorescência) ou resultantes de diferentes rendimentos quânticos da espécie no micro ambiente micelar.

No que diz respeito à  $\beta$ -lapachona formulada em P-123 e F-127, apresentadas nos espectros de absorção eletrônica UV-Vis da Figura 34-c, pode-se verificar semelhanças entre os perfis espectrais dos sistemas em meio homogêneo (etanol) e micro heterogêneo (F-127 e P-123). As distinções na forma e intensidade das bandas verificadas nos espectros de emissão de fluorescência, para a  $\beta$ -lapachona em etanol e incorporada nos sistemas micelares (Figura 34-d), podem estar associadas a maior influência da polaridade do meio sobre o estado excitado da molécula (Christian Reichardt, 2004; Joshi & Pant, 2012).

Estudos envolvendo a incorporação dos derivados da clorofila *a* (Pheid e Zn-Chld em concentrações na ordem  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) nos sistemas micelares (P-123 e F-127 a 2% (m/V)), foram investigados por Gerola (2013). Os resultados demonstraram a monomerização dos derivados quando formulados pelo método de adição direta e dispersão sólida. Segundo Gerola (2013), os formulados micelares mantiveram as características espectrais das espécies monoméricas, com a manutenção da banda Soret (região do azul) e da banda Q (região do vermelho), sem a observação de alargamento, surgimento de banda adicional na região de 700 nm ou deslocamentos espectrais, característicos da presença de espécies auto-agregadas (Gerola, 2013).

Após conhecer o perfil espectral das naftoquinonas incorporadas nos copolímeros micelares P-123 e F-127, buscou-se avaliar a estabilidade térmica e temporal desses sistemas. Esses estudos foram desenvolvidos e encontram-se apresentados nas próximas seções.

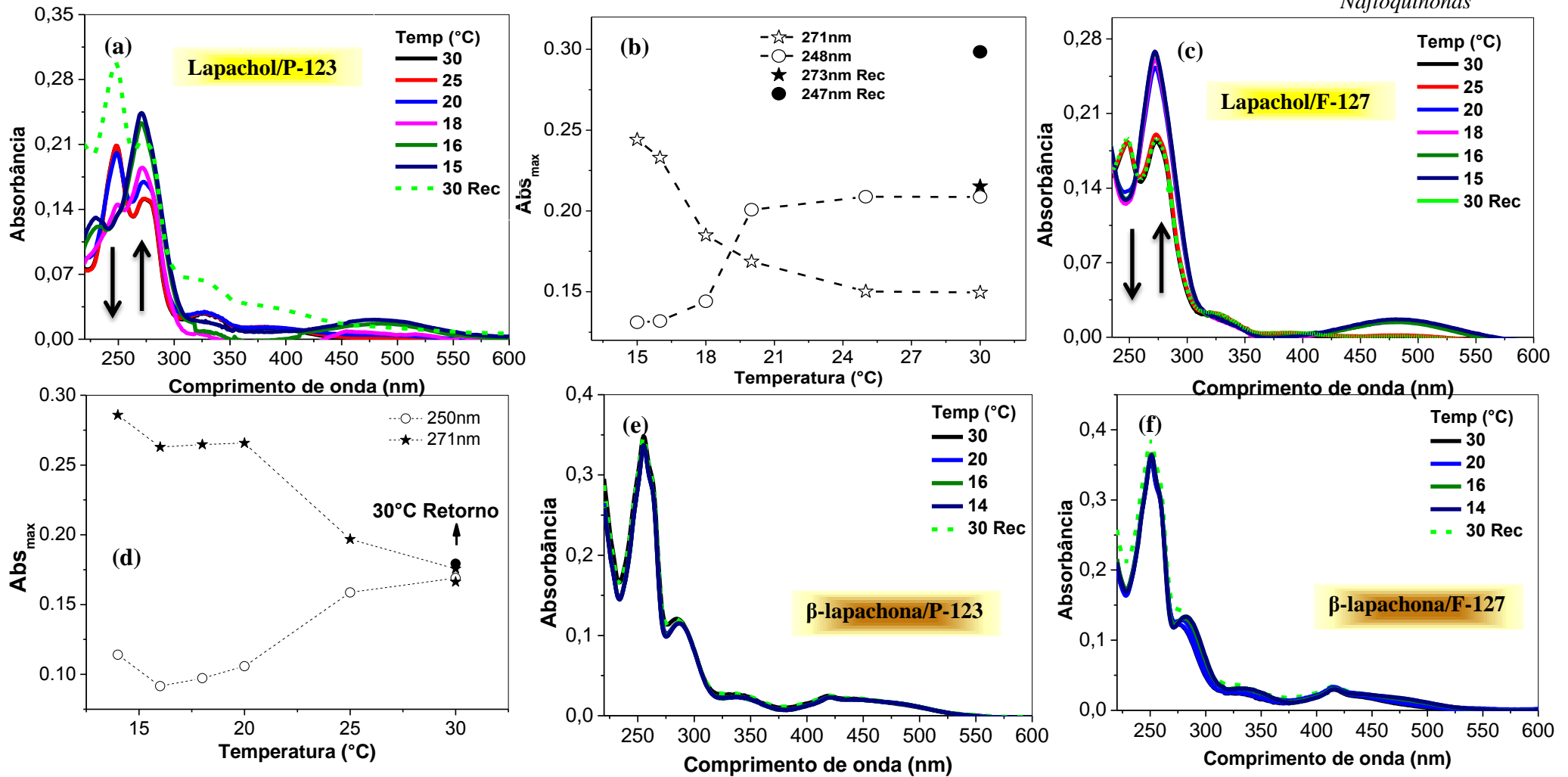
### **2.1.8. Estudo do efeito da temperatura nas propriedades espectrais das naftoquinonas incorporadas em micelas copoliméricas**

Os sistemas micelares poliméricos apresentam características intrínsecas como a CMC (concentração micelar crítica) e a TMC (temperatura micelar crítica), que denotam concentração/temperatura limite a partir do qual se tem a auto-organização dos copolímeros em sistemas micelares (Kang, Kim, & Lim, 2001; Letchford & Burt, 2007; Wanka et al., 1994; Wei, Cheng, Zhang, & Zhuo, 2009). Análises que levam em conta a resposta que a temperatura induz ao sistema são de extrema importância, pois o número de agregação da micela, polaridade dos microambientes, raio dos segmentos polar (óxido de etileno) e apolar (óxido de propileno) e a microviscosidade dependem diretamente desse parâmetro (Dutt, 2005; Kumbhakar, Goel, Nath, Mukherjee, & Pal, 2006; Shiraishi et al., 2010; Wanka et al., 1994). Além disso, a compreensão das propriedades físico-químicas instigadas pela temperatura são relevantes pelo fato do sistema fármaco/micela sofrer uma série de variações de temperatura até o ato da administração, seja em processos de preparo, liofilização para armazenamento, até a sua aplicação *in vivo* (37,0 °C) (Vilsinski, 2013).

Diante do exposto, neste estudo, a estabilidade das naftoquinonas incorporadas nos copolímeros micelares foi analisada monitorando-se as propriedades espectroscópicas, em temperaturas abaixo e acima da TMC dos surfactantes (17,8 °C

para P-123 e 20,4 °C para F-127)(Wanka et al., 1994), variando de 30,0 a 15,0 °C, conforme Figura 35.





**Figura 35.** Espectros de absorção eletrônica das naftoquinonas em diferentes temperaturas, sendo (a) lapachol ( $1,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ); (b) absorção eletrônica ( $\lambda_{273}$  e  $\lambda_{247}$  nm – referente à Figura a); (c) F-127 (1% m/v ;  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ); (d) absorção eletrônica ( $\lambda_{271}$  e  $\lambda_{248}$  nm – referente à Figura c); (e)  $\beta$ -lapachona ( $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) em P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e (f) F-127 (1% m/V ;  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), respectivamente. As setas indicam a direção da variação espectral com a redução da temperatura.

No que diz respeito às Figuras 35-a a 35-d pode-se verificar a estabilidade do lapachol nas micelas na faixa de temperatura entre 20,0 a 30,0 °C, temperaturas estas acima da TMC dos copolímeros, evidenciada pela similaridade dos máximos de absorbância apresentados nas Figuras 35-b e 35-d. Em temperaturas inferiores (abaixo da TMC) tem-se uma redução significativa no número de agregação micelar, efeito este refletido nos perfis dos espectros de absorção eletrônica do lapachol. A redução da banda em aproximadamente 250 nm com concomitante elevação do máximo em torno de 270 nm (Figura 35-a a 35-d) pode estar associada às distintas localizações do fármaco na micela copolimérica com a dinâmica micelar. Além disso, as contribuições auto-agregacionais, decorrentes da insolubilidade do lapachol em meio aquoso (seção 2.1.1), podem exercer efeito aditivo aos efeitos de localização no que diz respeito às alterações espectrais verificadas, sobretudo em baixas temperaturas.

Quanto às Figuras 35-e e 35-f, para a  $\beta$ -lapachona incorporada nos copolímeros micelares, pode-se verificar que não houve variação significativa do comportamento espectral com as modificações na temperatura.

É sabido que a variação da temperatura afeta diretamente a estabilidade das micelas poliméricas (Letchford & Burt, 2007; Wei et al., 2009). Esta modificação, resultante da implicação térmica, pode ser verificada a partir de alterações nos perfis de absorção eletrônica dos compostos insolúveis em água como resposta a: dissociação micelar, mudança no grau de hidratação dos compartimentos micelares (corona e núcleo micelar), mudança na micropolaridade, tamanho e microviscosidade dos segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos em condições acima e abaixo da TMC do copolímero (Dutt, 2005; Kumbhakar et al., 2006; Shiraishi et al., 2010; Su et al., 2002).

O processo de micelização acontece a partir de uma concentração e temperatura particular para cada copolímero. Por se tratar de um sistema endotérmico, o

calor inserido está intimamente ligado ao processo de desidratação dos segmentos OP, tornando-os insolúveis em água e permitindo a formação dos agregados micelares (Dutt, 2005; Kumbhakar et al., 2006; Wanka et al., 1994).

As interações hidrofóbicas entre os segmentos OP dão sustentação à formação/equilíbrio das micelas poliméricas e a intensidade de tais interações é modulada pela hidratação desses segmentos, pois as ligações de hidrogênio com moléculas de água são responsáveis por diminuir as forças de interação hidrofóbicas. Embora o número de agregação varie com o incremento da temperatura, a literatura reporta que o raio hidrodinâmico da micela é pouco afetado e que as maiores distinções estão atreladas a mudanças na polaridade, microviscosidade e tamanho dos segmentos micelares, resultantes da desidratação dos segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos do copolímero (Paschalis Alexandridis & Hatton, 1995; Kumbhakar et al., 2006; Shiraishi et al., 2010). Assim, a elevação na temperatura é responsável pela desidratação e consequente aumento da hidrofobicidade dos segmentos OP e OE, resultando em aumento do tamanho dos segmentos apolares e redução da região hidratada, de forma que o tamanho da micela (raio hidrodinâmico) não sofra variações consideráveis (Chen & Li, 2011; Kumbhakar et al., 2006)

Su *et al* (2002) estudaram, por meio de espectroscopia no infravermelho FTIR, o efeito da temperatura nas alterações estruturais dos segmentos OE-OP-OE. Os autores verificaram que em temperaturas próximas da TMC os grupos metilo (segmento hidrofóbico) estão experimentando um ambiente menos polar, com interações enfraquecidas com moléculas de água. Em maiores temperaturas os grupos metilo são desidratados e um micro ambiente mais apolar é criado, isto é, as micelas passam a ter um núcleo de maior tamanho, viscosidade e densidade (Su et al., 2002).

Da mesma forma, Kumbhakar et al (2006) estudaram as micelas de F-127 e P-123 utilizando compostos Cumarínicos como sonda de micro polaridade, em uma proporção 1:1 fármaco/micela. A partir dos deslocamentos de Stokes observado nos espectros de emissão de fluorescência, os autores observaram que a região hidrofílica das micelas de F-127 é mais hidratada comparada ao P-123. Segundo os autores, o micro ambiente das micelas de F-127 sofre uma mudança repentina acima de 55,0 °C devido a desidratação dos segmentos. O efeito da desidratação é mais pronunciado do núcleo em direção à corona micelar. Nessas condições, os colapsos entre os grupos OE desidratados são responsáveis pelo aumento da viscosidade local. Os autores reportam ainda a formação de clusters entre os segmentos OE e moléculas de água estruturadas e estes, por sua vez, atuam como um componente de reforço no processo de solvatação rápida do corante em maiores temperaturas (Kumbhakar et al., 2006).

Em adição, Shiraishi et al (2010) estudaram corantes de cianina, que mostram fluorescência baixa em menores temperaturas e fluorescência melhorada após a TMC do copolímero micelar F-127. Os autores verificaram, por meio de deslocamento de Stokes, que a viscosidade do núcleo micelar é maior e que esta diminui em direção a corona hidratada. Além disso, os autores avaliaram a relação entre o deslocamento de Stokes com o aumento da temperatura, constatando que o núcleo micelar apresenta polaridade semelhante a do etanol (Shiraishi et al., 2010).

Conforme já mencionado, a elevação da temperatura acarreta em um aumento do número de agregação do copolímero (Nishiyama & Kataoka, 2006). Um acréscimo de temperatura de 25,0 para 35,0 °C, por exemplo, aumenta mais que o dobro o número de agregação (n= 37 a 25,0 °C e n=82 a 35,0 °C) para o F-127 e quase o triplo para micelas de P-123 (n= 86 a 25,0 °C e n=244 a 35,0 °C) (Wanka et al., 1994). Já abaixo da TMC (20,0°C para F-127 e 18,0 °C para o P-123 (Paschalis Alexandridis

&Hatton, 1995) alguns trabalhos consideram a presença de somente unímeros em solução, devido à ausência de energia para desidratação dos grupos OP (Paschalis Alexandridis & Hatton, 1995; Wanka et al., 1994), outros, por sua vez, reportam que esses unímeros na verdade fazem parte de uma micela de maior extensão, onde os efeitos da hidratação acentuada e aumento da solubilidade dos grupos OP resultam em maior vulnerabilidade à solvatação/hidratação do fármaco (Basak & Bandyopadhyay, 2013).

Dessa forma, considerando os efeitos da dinâmica micelar nos perfis de absorção lapachol em P-123, Figura 35-a, pode-se verificar uma modificação espectral com a redução da temperatura de 25,0 para 20,0 °C, evidenciada pela redução da banda em torno de 250 nm com elevação do máximo em aproximadamente 270 nm. Esse resultado pode estar associado a maior hidratação dos segmentos hidrofóbicos, com modificações na micropolaridade e microviscosidade do compartimento hidrofílico (OE), onde possivelmente a naftoquinona encontra-se acomodada. Entre as temperaturas de 18,0 e 20,0 °C, para o lapachol em P-123, notaram-se alterações significativas possivelmente vinculadas à sensibilidade do composto ao meio de maior polaridade, obtido a partir do aprisionamento e fortalecimento das interações do copolímero com moléculas de água (Dutt, 2005; Kumbhakar et al., 2006; Shiraishi et al., 2010).

Os mesmos perfis podem ser observados para o lapachol incorporado em F-127 (Figura 35-c). Nesse caso, o próprio sistema de formulação acarretou uma elevação da banda em torno de 270 nm, com simultânea redução do máximo em aproximadamente 250 nm (seção 2.1.7.). Assim, a atenuação da temperatura fez com que as variações se tornassem mais intensas por conta da dinâmica micelar refletida na acomodação ou localização do fármaco, sobretudo na região entre 20,0 e 18,0 °C, onde se tem a TMC para o F-127.

Uma característica marcante verificada para o lapachol formulado nos dois sistemas micelares foi o restabelecimento da sua condição inicial com o retorno da temperatura, sendo que em ambos os casos, além de restabelecer, houve uma significativa monomerização e/ou redistribuição do composto nos micro-domínios micelares (linha tracejada nos espectros). Esse fato está concordante com as constatações a respeito da ligação fármaco/micela discutidas na seção 2.1.5., que demonstram a incorporação do lapachol na forma auto-agregada na micela.

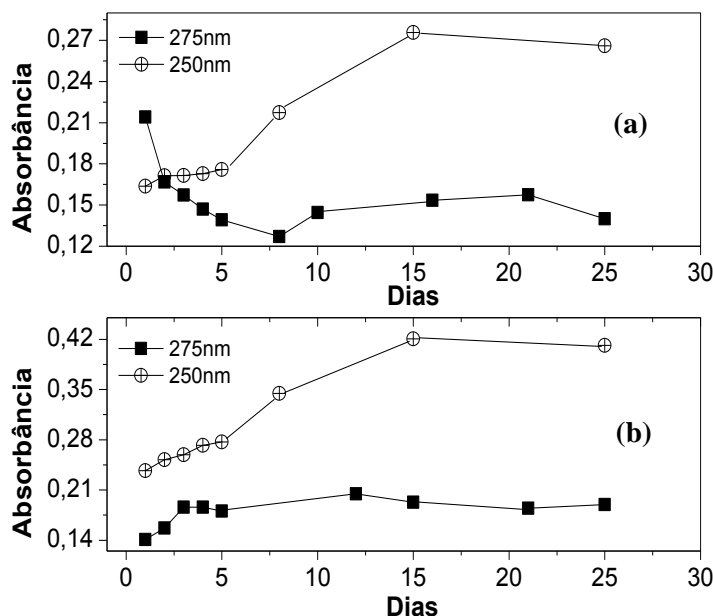
No que se refere ao efeito da temperatura na estabilidade da  $\beta$ -lapachona formulada (Figura 35-c e 35-d), pode-se dizer que não houve efeitos significativos antes e após a TMC dos surfactantes. Essa verificação vem de encontro com os estudos de partição ( $\log K_p = 1,00$  seção 3.1.4.) e ao comportamento da naftoquinona em mistura binária água etanol (seção 2.1.1), os quais revelaram um comportamento anfifílico para o composto. Além disso, a manutenção do perfil espectral da  $\beta$ -lapachona com a atenuação da temperatura pode estar associada à redução da TMC do copolímero (Gerola, 2013), ou ainda a interações com unímeros ou sistemas micelares de maior extensão, obtidos a partir da hidratação e solubilização dos segmentos OP em temperaturas menores. Segundo a literatura, mesmo estando abaixo da CMC, apenas um unímero pode assumir uma estrutura definida capaz de estabilizar o princípio ativo (P. Liu et al., 2008).

A avaliação do efeito térmico sobre a organização estrutural dos derivados da clorofila *a*, incorporadas em micelas de F-127 e P-123, foi realizada por Gerola (2013) que, da mesma forma, não verificou alterações espectrais nos formulados, mesmo em condições abaixo da TMC para ambos os surfactantes. De forma análoga, Gerola (2013) atribuiu esse efeito à redução da TMC observada por medidas

deespalhamento de luz ressonante que mostraram a presença de micelas em baixas temperaturas (Gerola, 2013).

### 2.1.9. Estudo da Estabilidade das naftoquinonas formuladas em F-127 e P-123

O acompanhamento da dinâmica dos formulados se faz necessário para obter informações a respeito da estabilidade (reorganização do fármaco na micela copolimérica e liberação com o passar do tempo). A estabilidade do formulado foi monitorada por meio de espectros de absorção eletrônica UV-Vis por um período de 25 dias e encontra-se apresentada na Figura 36.

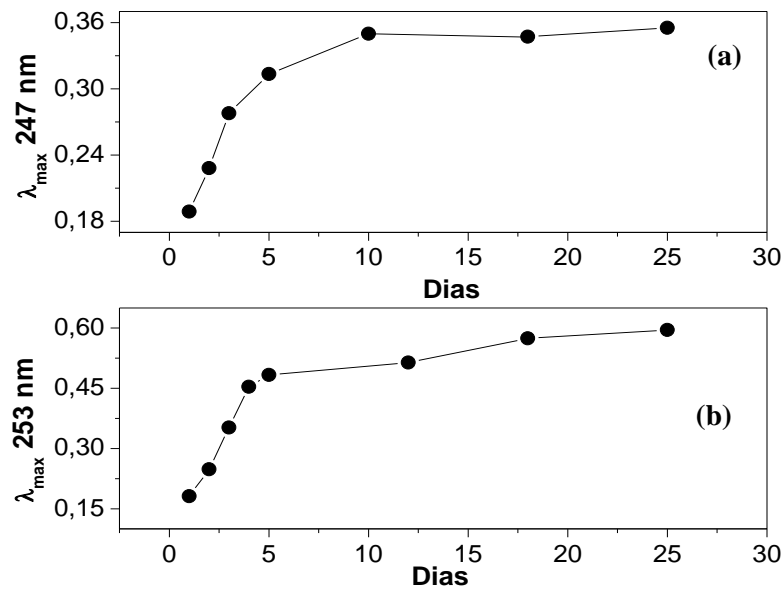


**Figura 36.** Estabilidade do lapachol ( $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) incorporado em micelas de (a) F-127 (1% m/V;  $6,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e (b) P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), em água destilada (pH 5,0) a 30,0 °C.

Para o lapachol em F-127 (Figura 36-a), notou-se um aumento do máximo de absorção em 250nm, com simultâneo decaimento da banda em 275nm com o passar do tempo. Já o composto incorporado em P-123 (Figura 36-b), verificou-se um aumento sincrônico dos dois máximos de absorção com o decorrer dos dias.

Com base nos estudos previamente realizados vinculados ao comportamento agregacional do lapachol em mistura de solventes (seção 2.1.1.) e à estabilidade do formulado com a temperatura (seção 2.1.8.), esperava-se obter um comportamento espectral semelhante (redução da banda em 250 nm com elevação e alargamento do sinal em 273 nm), associado a efeitos de liberação ou reorganização com auto-agregação do fármaco no micro-ambiente micelar. Entretanto, avaliando-se o comportamento dos espectros de absorção UV-Vis para o lapachol encapsulado no copolímero F-127, Figura 36-a, pode-se propor a existência de efeitos de reorganização, com difusão e provável monomerização do composto dependente do tempo. Tais indícios podem ser verificados pelo aumento do sinal em 250 nm com concomitante redução do máximo de absorção eletrônica em 275 nm. Além disso, avaliando-se o quociente entre os máximos de absorção (275/250 nm) pode-se verificar uma alta razão inicial (275/250 nm=1,31) com uma tendência a redução com o passar dos dias (razão final de 0,53), vinculando esse efeito a monomerização do composto. De forma análoga, o lapachol em P-123 (Figura 36-b) apresentou alterações mais sutis, que demonstraram uma redução na razão entre os máximos (275/250 nm) de 0,59 para 0,46 no 25º dia. A mesma avaliação foi realizada para os formulados obtidos a partir da  $\beta$ -lapachona (Figura 37).

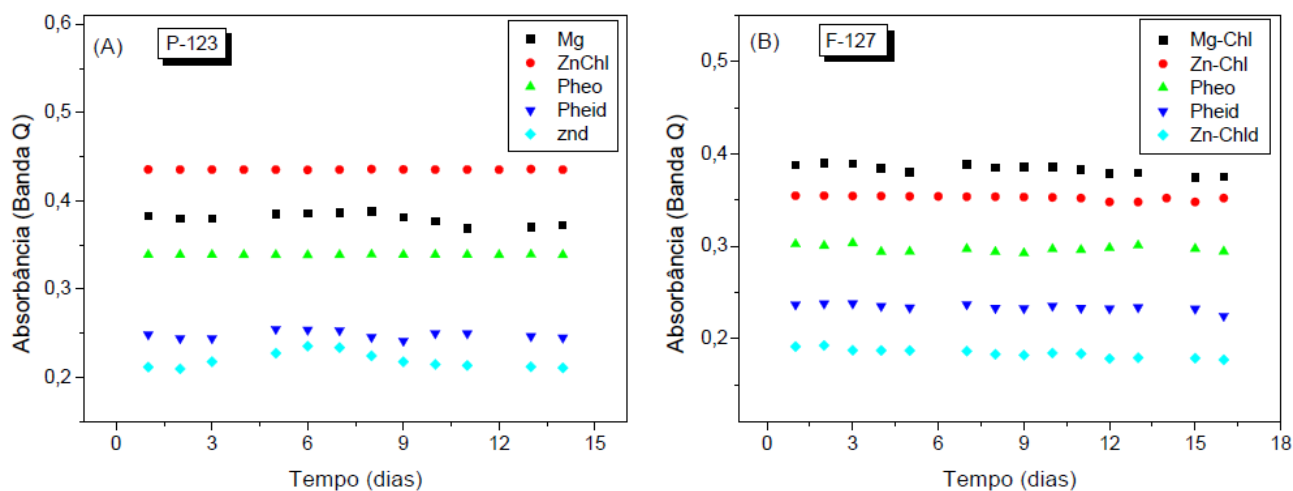




**Figura 37.** Estabilidade da  $\beta$ -lapachona ( $1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) incorporada em micelas de (a) F-127 (1% m/V;  $6,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) e (b) P-123 (2% m/V;  $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) em água destilada (pH 5,0), a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Para os formulados obtidos com a  $\beta$ -lapachona pode-se notar um aumento significativo do máximo de absorção eletrônica na região de 250nm (Figura 37-a e 37-b) dependente do tempo e relativamente maior que o observado para o lapachol. Da mesma forma, o comportamento foi atribuído a efeitos de reorganizaçãoda naftoquinona no microambiente micelar com o passar dos dias.

As avaliações envolvendo a clorofila *a* e seus derivados, da mesma forma, foram desenvolvidas em estudos prévios realizados por Gerola (2013). Por meio do monitoramento dos espectros de absorção eletrônica dos compostos formulados, durante 15 dias, a autora obteve o que chamou de perfil cinético (Figura 38) no  $\lambda_{\text{max}}$  da banca Q para os diferentes derivados da clorofila.



**Figura 38.** Cinética de estabilidade das clorofilas formuladas em P-123 (a) e F-127 2% (m/V) (b), a temperatura ambiente.

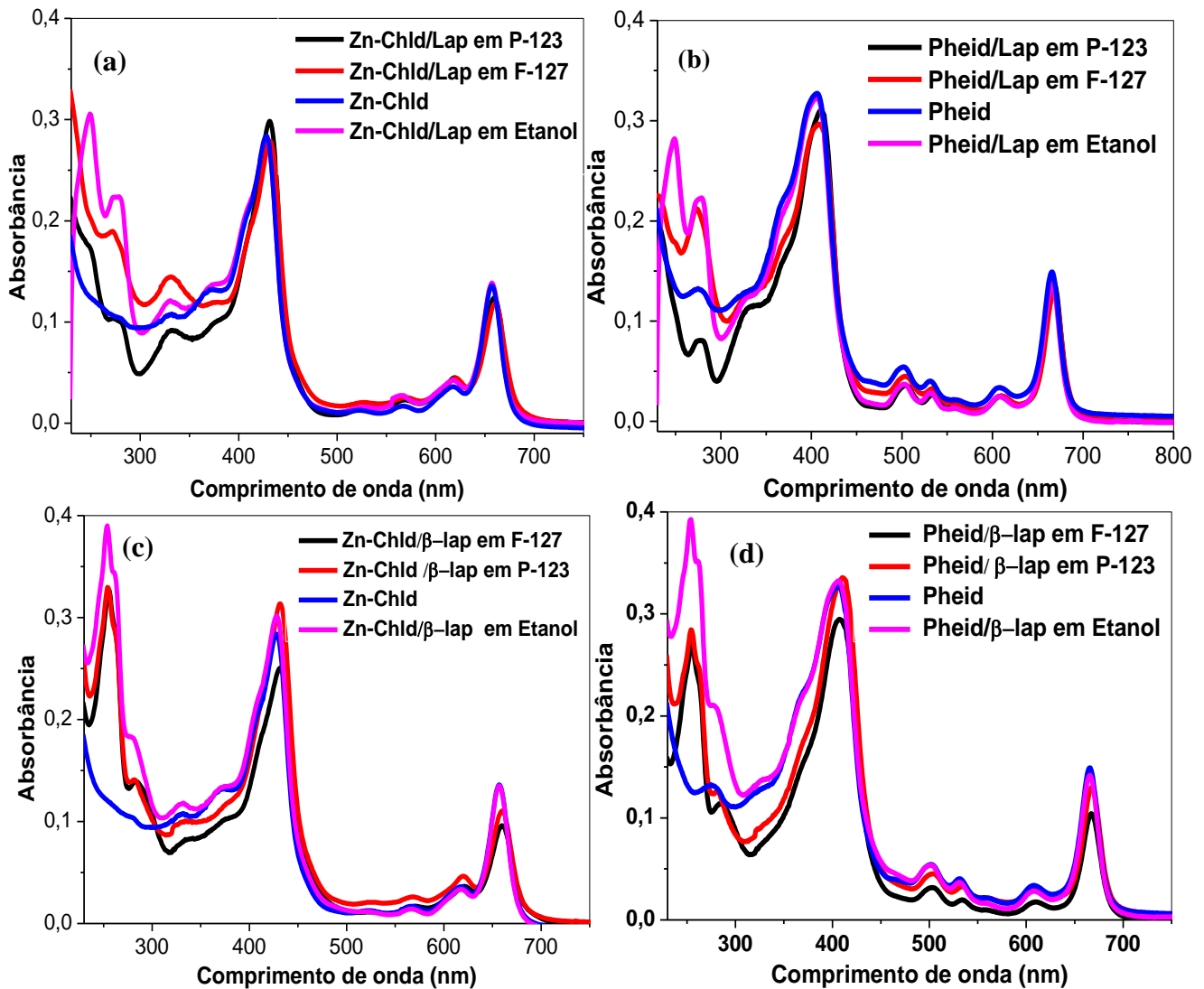
Segundo a autora, os formulados permaneceram-se praticamente estáveis e mostraram apenas sutis variações na intensidade de absorção eletrônica com o decorrer do tempo, em ambos os surfactantes copoliméricos (Gerola, 2013).

# Capítulo 3

**Caracterização Físico-química do formulado  
contendo os derivados da clorofila fotossensibilizadores (Pheid e Zn-  
Chld) com as naftoquinonas lapachol e  $\beta$ -lapachona**

### **3.1. Formulação nos copolímeros micelares P-123 e F-127 pelo método de dispersão sólida**

Pesquisas pautadas na incorporação de agentes duplos em sistemas micelares tem um caráter necessário para tratamentos prolongados, devido ao menor efeito da RMD (Harmsen et al., 2007; P. Liu et al., 2008; Y. Wang et al., 2010). Aplicar essa prática na terapia fotodinâmica pode trazer benefícios relacionados ao retardo da RMD e potencialização do efeito terapêutico. Os espectros de Absorbância UV-Vis dos formulados mistos, nos pluronics® P-123 e F-127, encontram-se na Figura 39.



**Figura 39.** Espectros de absorção dos formulados mistos obtidos a 30,0 °C, em água destilada (pH 5) sendo, (a) formulados obtidos pelo encapsulamento simultâneo do lapachol com Zn-Chld, (b) lapachol com Pheid, (c) β-lapachona com Zn-Chld, (d) β-lapachona com Pheid (Lap=1,6x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, β-lap=1,3x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, derivados da clorofila 2x10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, F-127 1,0% m/V; 7,7x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> e P-123 1,7% m/V; 2,9x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>).

A avaliação espectral do formulado misto será centrada principalmente nos derivados da clorofila, visto que os mesmos têm sua ação fotodinâmica dependente da organização estrutural. Segundo os espectros apresentados nas Figuras 39-a a 39-d

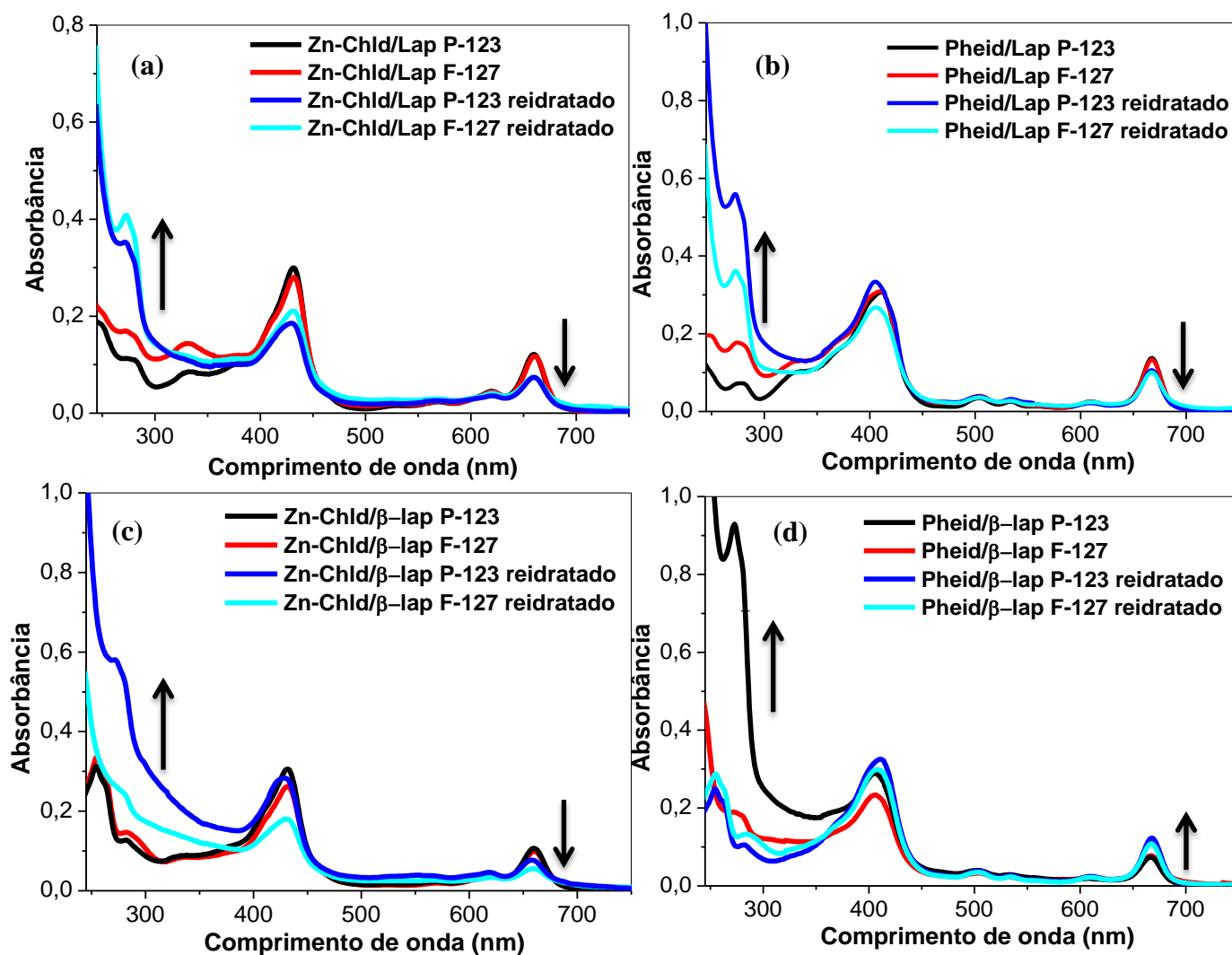
pode-se inferir que os derivados de clorofila estudados no formulado misto, Pheid e Zn-Chld, mantiveram o perfil espectral relativo à forma monomerizada, necessária para aplicabilidade na TFD, sobretudo no que diz respeito à banda Soret (região de 400 nm) e banda Q (em torno de 650 nm). Verificou-se um sutil deslocamento batocrômico para o Pheid e Zn-Chld combinados às naftoquinonas após a formulação (Figura 39-a a 39-d), o que pode estar associado ao micro ambiente em que o fotossensibilizador encontra-se alojado. Embora não haja indícios de auto-agregação, notou-se uma redução na absorção de até 29% para as principais bandas do Pheid e Zn-Chld (Figura 39-c e 39-d) quando combinados a  $\beta$ -lapachona que, da mesma forma, pode estar associada à absorvidade molar do fotossensibilizador frente à micro polaridade local na micela copolimérica. Segundo a literatura, as clorofilas no estado auto-agregado apresentam alargamentos nas principais bandas de absorção UV-Vis e uma banda adicional característica de auto-agregados na região de 700 nm, o que não foi verificado para os formulados mistos em meio homogêneo e micro heterogêneo (Figura 39) (Correia, Andrade, & Viseu, 2012; Cosma et al., 2008; Dentuto, Catucci, Cosma, Fini, & Agostiano, 2004; Moreira et al., 2010). A auto-agregação dos compostos limita sua ação fotoinduzida, pois permite baixo tempo de vida no estado tripleto e, conseqüentemente, um baixo rendimento quântico de oxigênio singleto (Allison et al., 2011).

A respeito das naftoquinonas, não há relatos na literatura que vinculem a dependência da organização estrutural (monomérica/auto-agregada) com os resultados *in vitro* e, amparados nesse conhecimento, as aplicações em micro-organismos poderão ser realizadas com a presença de naftoquinonas solubilizadas na forma monomérica ou auto-agregada.

### **3.1.1. Estabilidade dos formulados mistos durante processo liofilização/reidratação: estudos espectroscópicos**

A estabilidade de um fotossensibilizador incorporado em micelas copoliméricas é um critério importante para avaliar a manutenção de sua eficácia. Assim, estudos envolvendo fotoestabilidade, liberação com o tempo e reorganização molecular frente às variações térmicas no sistema atuam como uma importante ferramenta para garantir a preservação do efeito terapêutico (Vilsinski, 2013).

Este estudo foi desenvolvido com o intuito de monitorar a *organização molecular* (formas monomerizadas/auto-agregadas) dos fotossensibilizadores no formulado misto, após ser submetido ao processo imediato de liofilização e reidratação (à temperatura ambiente) após um período de 30 dias na forma liofilizada e armazenada a temperatura ambiente. A capacidade *estabilizante ou crioprotetora* dos copolímeros coloidais F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) e P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi investigada, avaliando-se os espectros de absorção eletrônica dos fotossensibilizadores (Pheid ou ZnChld;  $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) neles incorporados (Di Tommaso, Como, Gurny, & Möller, 2010; Koo, Rubinstein, & Onyuksel, 2005). Além disso, este estudo permite prever o efeito temporal na redução da temperatura, que pode ser de forma *lenta e gradual* (que serão discutidas na seção 3.2.3.) ou de *congelamento instantâneo* (liofilização), nos processos de reorganização dos fotossensibilizadores no micro ambiente micelar. Na Figura 40 encontram-se os espectros de absorção eletrônica dos formulados mistos após o processo de liofilização e reidratação após 30 dias, com leitura imediata a reidratação.



**Figura 40.** Espectro de absorção eletrônica do formulado misto, contendo o derivado da clorofila ( $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) combinado (a,b) lapachol ( $1,5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) ou (c,d)  $\beta$ -lapachona ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) solubilizados em micelas copoliméricas de F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), proporção 1:1 (fármaco:micela), antes e após a liofilização. Medidas a 30,0 °C, obtidas em água destilada. As setas indicam a direção da variação espectral após o processo de reidratação.

Com base na Figura 40, pode-se verificar através dos espectros de absorção eletrônica dos formulados mistos, incorporados nos sistemas micelares P-123 e F-127, uma diminuição da absorção eletrônica (entre 20% e 40%) para a banda Q da clorofila



para a maioria dos formulados (Figura 40-a, b, c), sem a presença de alargamento ou surgimento de banda adicional. Diferentemente, as naftoquinonas nos formulados liofilizados e reidratados mostraram um aumento significativo para algumas bandas de absorção eletrônica. Para o lapachol, foi verificado um aumento expressivo na intensidade do máximo em 270 nm. Da mesma forma, a  $\beta$ -lapachona apresentou um aumento acentuado na intensidade da principal banda de absorção situada na região de 273 nm. Tais comportamentos podem ser ocasionados por efeitos da localização, liberação, reorganização ou modificações na micropolaridade dos segmentos micelares após serem submetidos ao stress térmico (Di Tommaso et al., 2010).

Para o formulado obtido pela mistura do Pheid e  $\beta$ -lapachona foi constatado, ao contrário dos demais, um aumento na intensidade de emissão de aproximadamente 65% para a banda Q da clorofila. Esta observação pode estar associada a variações no micro ambiente com reorganizações dos FS's no sistema antes e após a liofilização, resultando em modificações nas intensidades de absorção após o processo de reidratação a temperatura ambiente (Song et al., 2011).

A liofilização consiste em um método de desidratação do substrato por sublimação, à temperatura e pressão reduzida (Di Tommaso et al., 2010). O congelamento instantâneo, desidratação, presença de crioprotetores, tempo e temperatura de armazenamento até a ressuspensão são variáveis determinantes para a estabilidade dos compostos (W. Wang, 2000). Entretanto, um dos parâmetros mais explorados nessa questão envolve as alterações nas propriedades físico-químicas estruturais dos sistemas carreadores, provocadas durante a etapa de congelamento através do stress térmico gerado pela cristalização de moléculas de água (Schaffazick, Guterres, Freitas, & Pohlmann, 2003). Segundo Tommaso *et al*, 2005 a etapa de congelamento do formulado é a mais crítica na liofilização, pois dependendo da rapidez

em que o processo é efetuado, pode-se permitir a separação de fases (copolímero, gelo e crioprotetores, quando empregados), aumento do raio hidrodinâmico, ruptura micelar, além de uma distribuição heterogênea de tamanho (Di Tommaso et al., 2010).

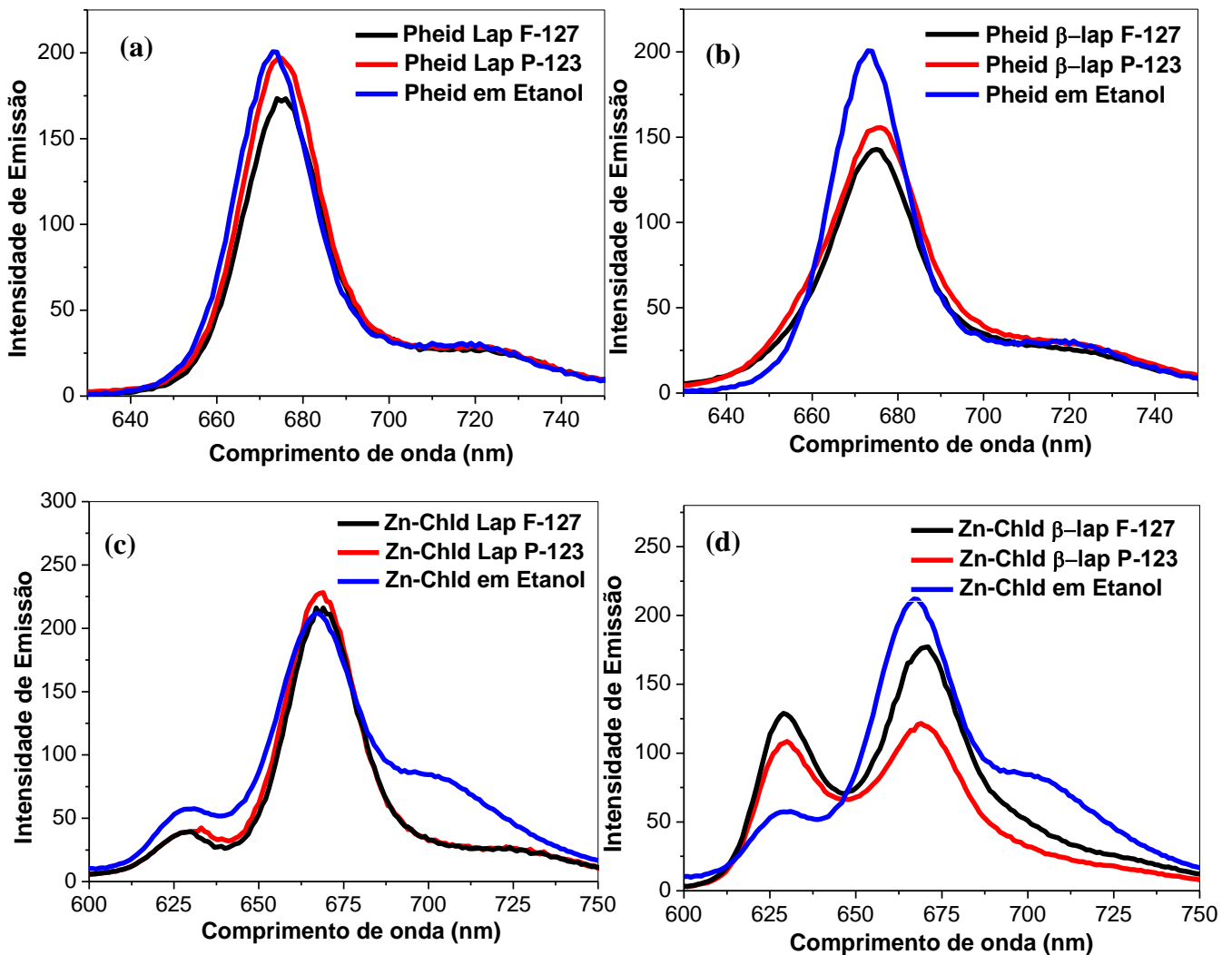
Dessa forma, as variações na absorbância verificadas para os derivados da clorofila (Pheid e Zn-Chld) (Figura 40) podem estar também vinculadas à agregação das micelas copoliméricas durante a remoção do solvente, podendo ser necessária, em alguns casos, a adição de estabilizantes/ protetores (como exemplo açúcares) (Di Tommaso et al., 2010). Os crioprotetores atuam na formação de uma matriz amorfa ao redor dos sistemas carreadores. Isso faz com que exista um espaçamento entre eles responsável por dificultar a agregação e tornar a ressuspensão facilitada (Konan, Gurny, & Allémann, 2002; Saez, Guzmán, Molpeceres, & Aberturas, 2000). Outro efeito que pode estar associado às alterações verificadas está na separação de fases (copolímero e gelo), resultante da presença de água residual originada por um congelamento incompleto do formulado (Di Tommaso et al., 2010). Tais observações sinalizam que o processo de liofilização, por causar uma redução nos espectros de absorção do fotossensibilizador na maior parte dos sistemas estudados, deverá ser melhor investigado, por exemplo, com a adição de espécies crioprotetoras e com ressuspensão em menores intervalos de tempo. Além disso, a reidratação com o emprego de temperatura e tempo de agitação poderia ocasionar melhores resultados, caso os efeitos observados sejam resposta de uma resolubilização ineficiente. Embora tenha ocorrido uma redução na intensidade de absorção para a maior parte dos sistemas após a reidratação, o sistema de liofilização para os formulados foi considerado vantajoso, pois não mostrou sinais de auto-agregados (alargamento da banda Q e surgimento de banda adicional na região de 700 nm). A manutenção do estado monomérico é a principal condição que o sistema deve respeitar para tornar-se viável para terapia fotodinâmica.

### **3.2. Estudos das propriedades fotofísicas dos derivados da clorofila na presença de naftoquinonas: Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) e de oxigênio singleto ( $\Phi^1O_2$ )**

#### **3.2.1. Rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) do Pheid e Zn-Chld em meio homogêneo, na presença de naftoquinonas, e no formulado misto antes e após a liofilização**

O rendimento quântico de fluorescência de um composto é importante para a compreensão de suas propriedades fotofísicas. Compostos que apresentam elevado  $\Phi_F$  tendem a ser inapropriados para TFD, pois apresentam baixo rendimento quântico do estado tripleto e, conseqüentemente, baixo rendimento quântico de oxigênio singleto ( $\Phi_{\Delta}^1O_2$ ).

Na Figura 41 encontram-se os espectros de emissão de fluorescência para a combinação dos fármacos em etanol e incorporado nos sistemas micelares P-123 e F-127 pelo método de dispersão sólida.



**Figura 41.** Espectros de emissão de fluorescência da mistura dos derivados da clorofila ( $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) com lapachol (a,c) ( $1,6 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) ou β-lapachona (b,d) ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) em etanol e incorporados nos sistemas micelares F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), a 30,0 °C. Excitação na banda Q para absorção menor que 0,1.

Pode-se verificar a partir da Figura 41-a uma maior intensidade de emissão, com sutil deslocamento batocrômico de aproximadamente 3 nm para os sistemas encapsulados compostos por Pheid/lapachol, comparados ao comportamento do fotossensibilizador em meio homogêneo (Shiraishi et al., 2010). Este comportamento

pode estar atrelado a efeitos de localização (Shiraishi et al., 2010) e/ou monomerização dos fotossensibilizadores nos micro ambientes micelares (Gerola, 2013; Gerola, Tsubone, et al., 2011). Diferentemente, na Figura 41-b pode-se observar uma redução na intensidade de emissão de fluorescência com um sutil deslocamento batocrômico (3 nm) que, mais uma vez, pode estar associado à localização do fotossensibilizador na micela copolimérica (Shiraishi et al., 2010) e sua acessibilidade a moléculas de água, supressores de fluorescência (Gracetto et al., 2011; Lakowicz, 2006).

A respeito dos espectros de emissão de fluorescência obtidos para a combinação entre a clorofilida de zinco e lapachol em etanol (Figura 41-c), pode-se verificar a presença de três máximos de emissão, situados em aproximadamente 640, 660 e 710 nm. Após o processo de formulação, estes sistemas (Zn-Chld/lapachol nos copolímeros micelares) mostraram uma redução das bandas em aproximadamente 640 e 710 nm, com inexpressiva alteração nos máximos de emissão em torno de 710 nm. No que se refere à Figura 41-d, para o sistema Zn-Chld/ $\beta$ -lapachona incorporada nos copolímeros, verificou-se uma redução acentuada no máximo de emissão em 660 e 710 nm, com elevação da banda de emissão em aproximadamente 640 nm, o que pode estar associado à: interação com a naftoquinona ou micela copolimérica e influência nos níveis eletrônicos relacionados a transições vibracionais do fotossensibilizador.

Os rendimentos quânticos de fluorescência dos derivados da clorofila nos sistemas mistos foram determinados através da Equação 5 e encontram-se apresentados na Tabela 5. Os valores de absorbâncias dos derivados da clorofila foram menores que 0,1 no comprimento de onda de excitação, objetivando-se minimizar efeitos de filtro interno (Dhami et al., 1995; Lakowicz, 2006). Utilizou-se como padrão o Pheid em etanol ( $\Phi_F = 0,28$  determinado por Eichwurz et al., 2000).

**Tabela 5.** Rendimento quântico de fluorescência para os derivados Pheid e Zn-Chld em meio micro heterogêneo (F-127 1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e P-123 1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) e em etanol.

	<b>F-127</b>	<b>P-123</b>	<b>F-127</b> <sup>(b)</sup>	<b>P-123</b> <sup>(b)</sup>	<b>Etanol</b>
<b>ZnChld– Lap</b>	0,19	0,19	0,22	0,28	0,51
<b>Zn-Chld –βlap</b>	0,09	0,07	0,14	0,23	0,20
<b>Pheid – Lap</b>	0,20	0,23	0,31	0,35	0,17
<b>Pheid –βlap</b>	0,05	0,05	0,24	0,18	0,13
<b>ZnChld</b>	0,16 <sup>(c)</sup>	0,16 <sup>(c)</sup>	--	--	0,49
<b>Pheid</b>	0,16 <sup>(c)</sup>	0,16 <sup>(c)</sup>	--	--	0,28 <sup>(a)</sup>

\*(a) Eichwurzel *et al*, 2000, (b) formulados após processo de liofilização e reidratação e (c) Gerola (2013).

No que tange aos valores de  $\Phi_F$  da mistura formada pelo fotossensibilizador e a naftoquinona em etanol, Tabela 5, comparado aos valores de  $\Phi_F$  dos fotossensibilizadores Pheid e Zn-Chld em etanol (sem naftoquinonas), pode-se verificar uma redução de 40 a 60% para os sistemas Pheid/Lap, Pheid/β- lap e ZnChld- β-lap, o que pode estar relacionado a processos de supressão de fluorescência da clorofila pela naftoquinona. O sistema ZnChld/Lap não apresentou grandes variações em meio homogêneo.

Os valores de  $\Phi_F$  para o Pheid e Zn-Chld nos sistemas micelares P-123 e F-127 foram estudados por Gerola (2013), que obteve valores coincidentes para ambos derivados nos copolímeros micelares, sendo 0,16 para os sistemas em P-123 e F-127 (Tabela 5). Amparada na literatura, nos valores obtidos de  $\Phi_F$  e nos espectros de

absorção eletrônica UV-Vis, a autora caracterizou as micelas poliméricas como eficientes na solubilização e monomerização dos derivados da clorofila (Gerola, 2013).

No que tange aos formulados mistos incorporados nos sistemas micelares P-123 e F-127, pode-se verificar através da Tabela 5 um aumento sutil nos valores de  $\Phi_F$  para os formulados obtidos a partir da Zn-Chld/lapachol e Pheid/lapachol. Em adição, pode-se notar uma redução nos valores de  $\Phi_F$  superior a 45% para os formulados obtidos a partir da Zn-Chld/ $\beta$ -lapachona e Pheid/ $\beta$ -lapachona. Tal atenuação pode estar associada preferencialmente à despopulação do estado excitado via processos não radiativos, envolvendo colisões com moléculas do solvente (conversão interna) ou cruzamento intersistemas (CIS), onde estados de diferentes multiplicidades estão envolvidos (Lakowicz, 2006). A possibilidade da existência de agregados em solução que contribuam com a redução dos valores de  $\Phi_F$  é pequena, pois os mesmos não foram identificados nos espectros de absorção eletrônica UV-Vis da Figura 39 (Gerola, 2013).

Conforme já mencionado, o processo de liofilização submete o formulado a variações bruscas de temperatura e desidratação. O estudo das propriedades espectroscópicas após a reidratação (Figura 40) serve como ferramenta para compreender a estabilidade do liofilizado durante longos períodos, maiores que em solução (Vilsinski, 2013). Os dados de  $\Phi_F$  obtidos após a liofilização, apresentados na Tabela 5, demonstram um sutil aumento para os sistemas obtidos com o lapachol e  $\beta$ -lapachona. Esse efeito pode estar associado ao processo de redistribuição do FS no micro ambiente micelar após a reidratação, acomodando-se em um micro ambiente de diferente polaridade e viscosidade, onde se tem menor acesso a moléculas de água que atuam como supressores de fluorescência (Vilsinski, 2013).

A proteção dos formulados frente ao processo de liofilização/reidratação verificada nesse estudo vai de encontro ao trabalho desenvolvido por Lee e Lin (2011),

que estudaram a estabilidade estrutural da Calcitonina de salmão, um hormônio peptídeo, em distintos meios micelares antes e após a liofilização. Os autores verificaram, por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), manutenção da estrutura secundária da proteína incorporada no copolímero F-68 após o “estress” térmico (T.-H. Lee & Lin, 2011).

Ao avaliar a manutenção do estado monomérico dos fotossensibilizadores em presença das naftoquinonas em meio micelar (Figura 39), verificaram-se alguns pontos que poderiam estar vinculados a algum tipo de interação medicamentosa. A manutenção do estado monomérico do FS (Figura 39) em oposição às variações nos espectros de emissão de fluorescência para os sistemas obtidos a partir da Zn-Chld (Figura 41), assim como a redução acentuada no  $\Phi_F$  para os formulados obtidos pela combinação entre FS/ $\beta$ -lapachona (Tabela 5), demonstraram a necessidade de estudos que avaliam a eficiência dos FS nos sistemas combinados. Este estudo foi desenvolvido e encontra-se apresentado na próxima seção.

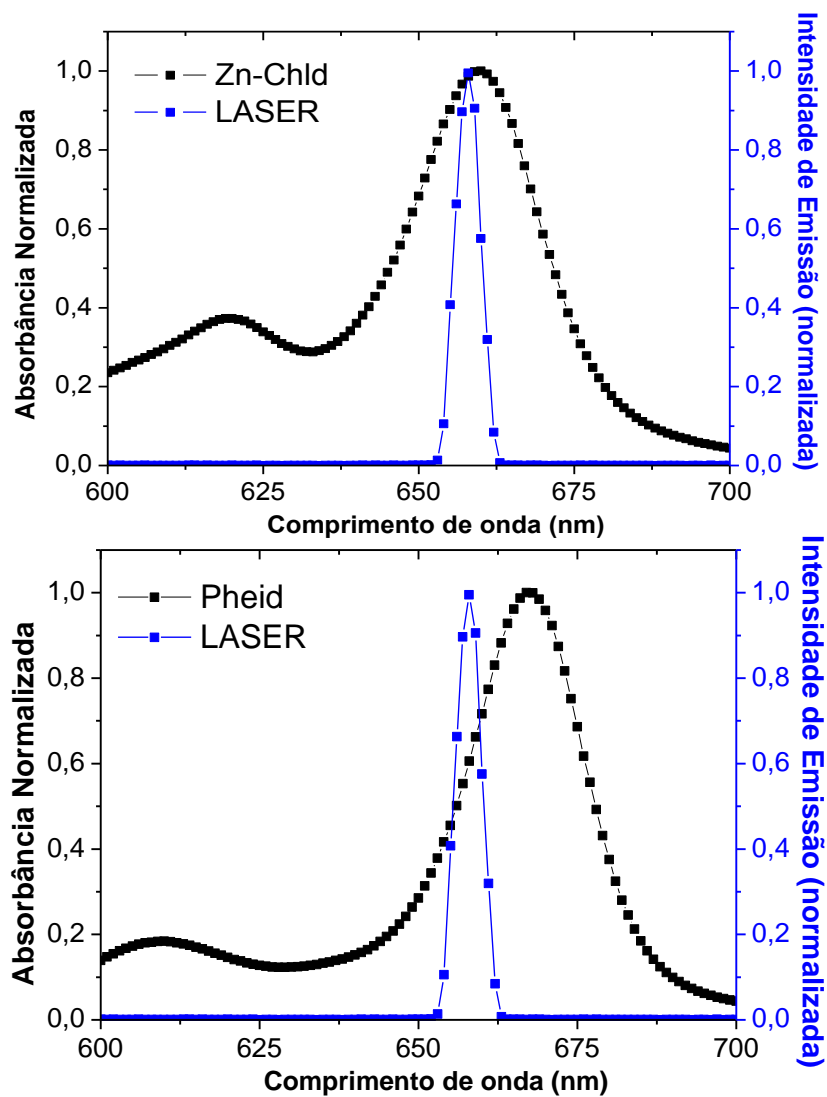
### **3.2.2. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto ( $\Phi_{\Delta}^1O_2$ ) dos derivados da clorofila em presença das naftoquinonas em etanol**

Ao se tratar de estudos fotodinâmicos, estudar a eficácia dos compostos fotossensibilizadores na geração de oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) é de extrema importância. A quantificação pode acontecer de duas formas: *método físico direto*, de maior custo, realizado por medidas de tempo de vida onde o FS, excitado por um laser, emite



fosforescência na região do infravermelho próximo (1270 nm) ou pelo *método indireto ou alternativo*, cujo princípio é a utilização de uma sonda química, como o ácido úrico (AU), utilizado como captor de  $^1\text{O}_2$  em reações de foto-oxidação (Rabello et al., 2012). O menor custo e a simplicidade envolvida na técnica envolvendo a utilização do AU não são os únicos benefícios, uma vez que a pequena sobreposição espectral entre o espectro de absorção eletrônica dos FS's e do AU ( $\lambda=293$  nm em etanol) facilita o tratamento dos dados. Além disso, o AU não absorve na região de fotoexcitação dos derivados da clorofila, permitindo ao mesmo estabilidade frente à iluminação. A degradação do substrato observada é resultante dos processos fotofísicos e fotoquímicos descritos pelo diagrama de Jablonski (Figura 1), onde o FS no estado excitado gera, na TFD do tipo II, o oxigênio singleto responsável pela oxidação do sensor químico.

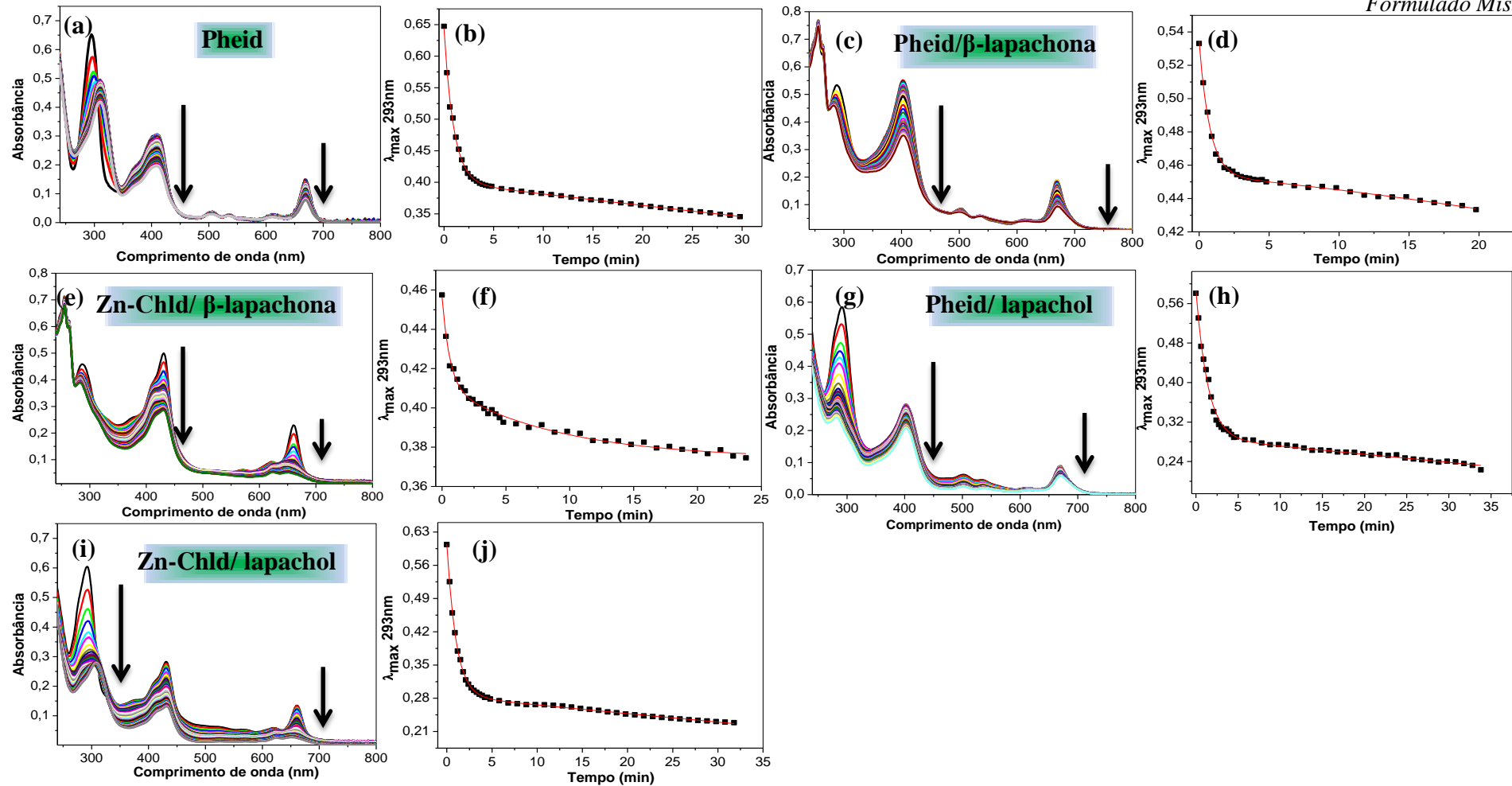
Para que estas reações fotoquímicas sejam desencadeadas é imprescindível que haja sobreposição entre o espectro de absorção dos derivados da clorofila (Pheid e Zn-Chld) com o espectro de emissão do sistema de excitação empregado (LASER), conforme Figura 42.



**Figura 42.** Sobreposição (normalizada) dos espectros de absorção da Zn-Chld e Pheid ( $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em etanol ( $\lambda_{\text{máx}}=660 \text{ nm}$ ) com a emissão do LASER de diodo ( $\lambda_{\text{máx}}=663 \text{ nm}$ ) a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Por meio da Figura 42 pode-se verificar a sobreposição espectral entre os espectros de absorção eletrônica dos derivados da clorofila com o de emissão do LASER ( $\lambda_{\text{máx}}=663 \text{ nm}$ ), sendo total para a Zn-Chld e parcial para o Pheid. A dependência temporal da reação do AU com  $^1\text{O}_2$  observada (cinética), por sua vez, irá

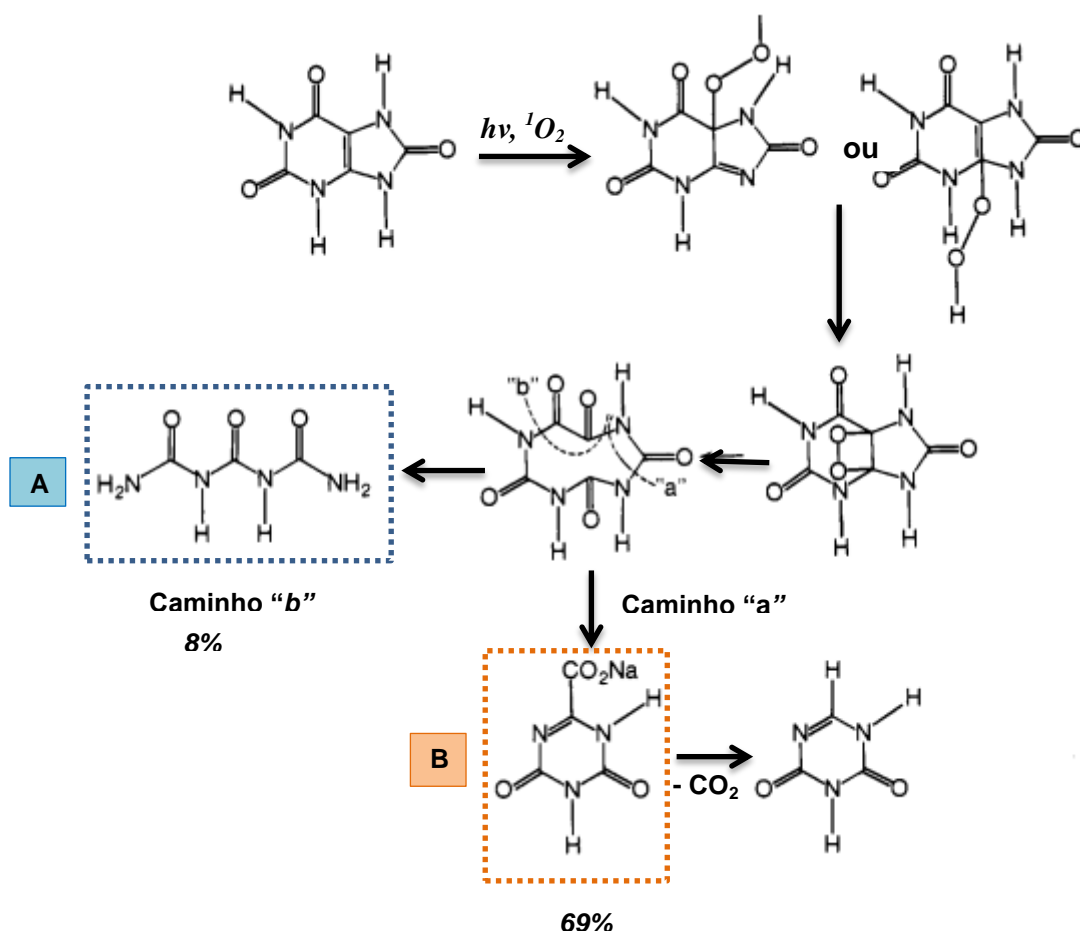
depende principalmente da potência do LASER (energia fornecida pelo seu fluxo de fótons). A potência de máxima emissão do LASER medida é de 100 mW, suficiente para a observação da reação do consumo total do ácido úrico no experimento. Na Figura 43 encontram-se apresentados os espectros de absorção eletrônica UV-Vis e a cinética de degradação do AU ( $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), em etanol contendo fotossensibilizador Pheid ( $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em função do tempo de iluminação.



**Figura 43.** Espectros de absorção eletrônica UV-Vis dos derivados da clorofila em presença das naftoquinonas e cinéticas de degradação do ácido úrico (293 nm) em etanol sendo (a,b) Pheid ( $2,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>), (c-d) Pheid ( $3,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>)/ $\beta$ -lapachona ( $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), (e-f) Zn-Chld ( $3,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>)/ $\beta$ -lapachona ( $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), (g,h) Pheid ( $1,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>)/lapachol ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e (i,j) Zn-Chld ( $1,5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>)/lapachol ( $1,3 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), a 30,0 °C, pH básico (9,0) e com sistema de iluminação acoplado LASER de diodo, com  $\lambda_{\text{máx}} = 663\text{nm}$ . As setas indicam a direção da variação espectral com o tempo de iluminação.

Com base nas Figuras 43-a e 43-j pode-se notar a fotodegradação do derivado da clorofila na presença de luz, evidenciada pela redução na intensidade de absorção da banda Q da clorofila (669 nm). A fotodegradação da clorofila resulta na abertura do anel tetrapirrólico em uma das pontes metilo, formando tetrapirróis lineares oxidados de menor massa molar (Fennema, 1996). Além do efeito da luz, tanto o oxigênio singlete quanto os radicais hidroxila, gerados pela clorofila durante a etapa de iluminação, reagem com os tetrapirróis formando radicais livres e peróxidos que causam a destruição da estrutura clorínica (Cuny, Romano, Beker, & Rontani, 1999; Fennema, 1996).

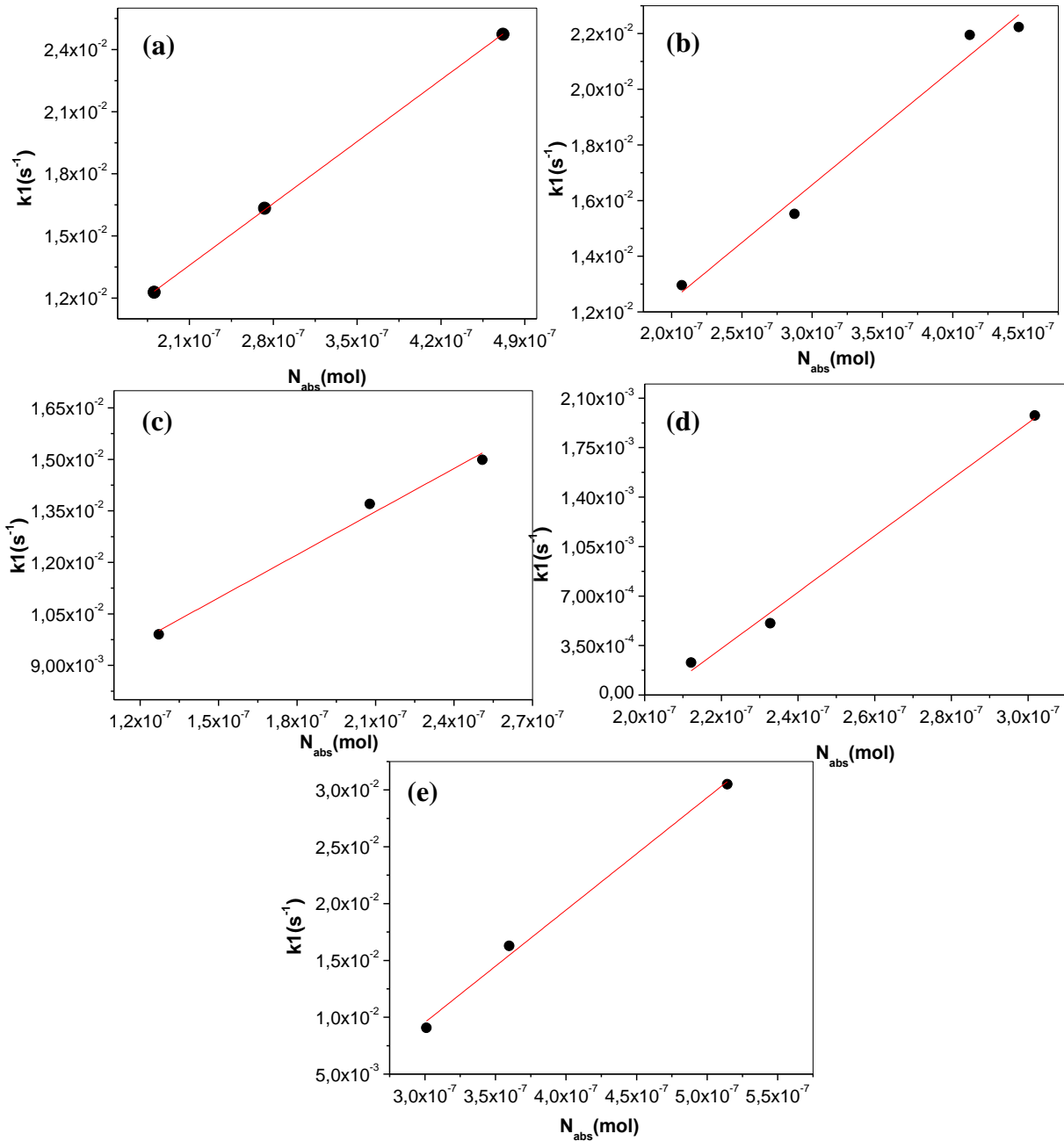
Além disso, verifica-se na Figura 43 o decaimento da banda em 293 nm, correspondente ao processo fotodegradativo do ácido úrico (Rabello et al., 2012), com aumento sutil do máximo em aproximadamente 320 nm correspondente à formação do intermediário (Rabello et al., 2012). A degradação do ácido úrico *via*  $^1O_2$ , melhor visualizada pelas Figuras 43-b, 43-d, 43-f, 43-h e 43-j, é ajustada por uma equação biexponencial, que considera duas etapas consecutivas de primeira ordem ( $k_1$  e  $k_2$ ). Estudos mostram que somente a primeira etapa da reação ( $k_1$ ) deve ser utilizada nos cálculos e a segunda constante ( $k_2$ ), embora dependa do ataque do  $^1O_2$ , é relativa ao intermediário e independente da luz (Rabello et al., 2012). O mecanismo de fotodegradação do ácido úrico em diferentes pHs foi estudado por George e Bhat (1979) e encontra-se apresentado no Esquema 2 (M. V. George & Bhat, 1979).



**Esquema 2.** Mecanismo de foto oxidação do ácido úrico em meio alcalino (George e Bhat, 1979 modificado).

Segundo George e Bhat (1979) o ataque do oxigênio singleto resulta na formação do hidroperóxido. Este, por sua vez, pode ser clivado formando quatro compostos. O mecanismo de foto degradação é dependente do pH e os produtos obtidos em maior quantidade, em condições alcalinas, é o oxonato de sódio (B) com 69% e triureto (A) com 8% (M. V. George & Bhat, 1979). Na Tabela 6 encontram-se os valores das constantes de velocidade de consumo do ácido úrico e fotobranqueamento, bem como a eficiência fotodinâmica (Equação 9) química utilizada para determinação

do rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ ). A relação entre os valores de  $k_1$  com o número de fótons absorvidos (Equação 9) (Figura 44) fornece uma relação linear, onde o coeficiente angular da reta corresponde à eficiência fotodinâmica ( $\gamma_{\Delta}$ ).



**Figura 44.** Relação entre  $k_1$  e o número de fótons absorvidos para (a) Pheid, (b) Pheid/ $\beta$ -lapachona, (c) Pheid/lapachol, (d) ZnChld/ $\beta$ -lapachona e (e) Znchld/lapachol.

**Tabela 6.** Constantes de velocidade ( $k_1$ ) determinadas nos experimentos de oxidação fotoinduzida do AU utilizando LASER, Constante de fotobranqueamento ( $k_{FB}$ ) e Eficiência fotodinâmica química ( $\gamma\Delta$ ).

<b>FS/Naftoquinona</b>	<b>Experimento</b>	<b><math>k_1(10^3 \text{ s}^{-1})</math></b>	<b><math>k_{FB}(10^2 \text{ s}^{-1})</math></b>	<b><math>\gamma\Delta (10^4)</math></b>
<b>Pheid</b>	A	24,7±1,65	5,05±0,19	
	B	12,3±0,01	8,39±0,33	4,27±0,45
	C	16,3±0,15	10,50±0,30	
<b>Pheid/Lap</b>	A	9,9±0,28	3,20±0,20	
	B	14,0±0,39	8,80±0,12	2,27±0,55
	C	15,0±0,48	7,50±0,10	
<b>Pheid/<math>\beta</math>-Lap</b>	A	13,0±0,25	7,40±0,21	
	B	15,5±0,50	11,51±0,23	4,16±0,38
	C	22,2±0,72	11,50±0,18	
<b>Zn-Chld /Lap</b>	A	9,07±0,02	20,82±0,47	
	B	16,3±1,39	21,16±0,49	9,85±0,66
	C	30,51±0,46	21,06±0,63	
<b>Zn-Chld /<math>\beta</math>-Lap</b>	A	0,23±0,00	27,74±1,54	
	B	2,0±0,02	40,86±1,95	7,11±1,07
	C	27,9±0,28	51,41±3,44	

No que tange a Tabela 6, pode-se verificar maiores velocidades de fotodegradação para o derivado metalado, em concordância com os dados da literatura



(Gerola, Santana, et al., 2011). As reações de fotodegradação dos derivados da clorofila são evidenciadas pela redução na intensidade no espectro de absorção eletrônica (Figura 43), fazendo com que uma menor concentração de espécies fotoativas participe das reações. O processo de fotodecomposição pode ser explicado pela formação de espécies reativas que atacam tanto o composto sonda quanto o fotossensibilizador. A metodologia descrita neste trabalho considera os efeitos do fotobranqueamento nos cálculos (termo  $e^{-k_{FB}t}$  da Equação 8), reduzindo assim os erros sistemáticos (Rabello et al., 2012).

O rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ ) foi determinado utilizando-se a Equação 10, tendo o Pheid como substância padrão. Os valores encontrados encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7.** Rendimento quântico de oxigênio ( $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ ) determinado para os derivados da clorofila em presença das naftoquinonas em etanol, usando Pheid como padrão.

<b>FS/Naftoquinona</b>	<b><math>\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2</math></b>
<b>Pheid/Lap</b>	0,27
<b>Pheid/<math>\beta</math>-lap</b>	0,51
<b>ZnChld/Lap</b>	1,00
<b>ZnChld/ <math>\beta</math>-lap</b>	0,86
<b>Pheid*</b>	0,51
<b>Zn-Chld*</b>	0,47

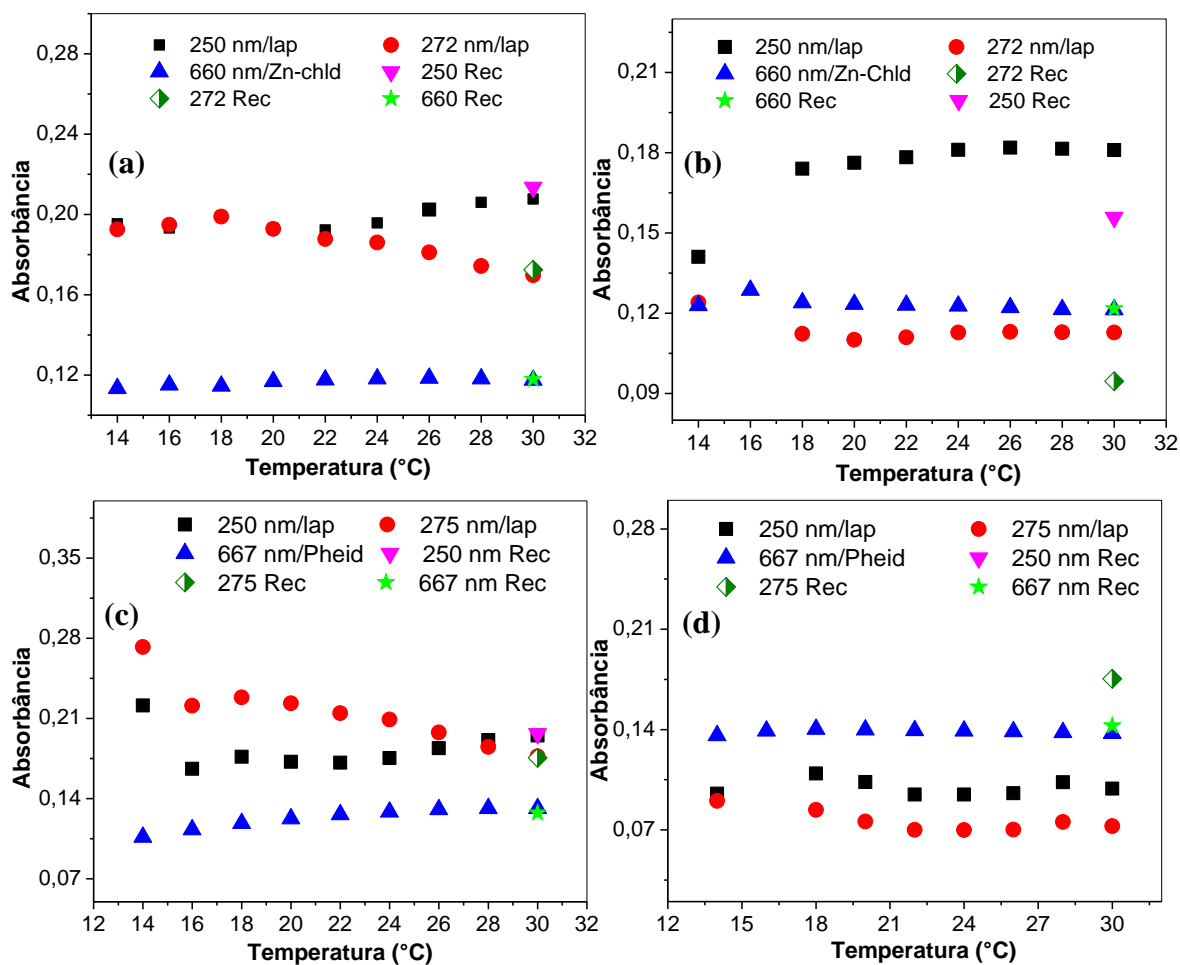
\* dados obtidos por Gerola (2013)

Avaliações envolvendo a estabilidade do ácido úrico em presença das naftoquinonas foram realizadas para servirem como referência. Os resultados obtidos (não mostrados) demonstraram que o ácido úrico não é degradado pelas naftoquinonas com e sem a presença de iluminação (LASER).

Com base na Tabela 7 podem-se notar maiores valores de rendimento quântico de oxigênio singleto para os formulados mistos obtidos a partir da Zn-Chld, comparado aos sistemas preparados a partir do Pheid. Para o derivado metalado, os dados do sistema misto divergem dos apresentados na literatura para as formas individuais Pheid e Zn-Chld (Gerola, 2013). Gerola (2013) observou valores de  $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$  próximos para os derivadosa clorofila *a* (Mg-Chl) e seus derivados, sendo 0,51 para o Pheid, 0,48 para a Zn-Chld e 0,47 para Mg-Chl em etanol. O aumento observado para as formas combinadas Zn-Chld/naftoquinona pode ser resultante da complexação da naftoquinona (agente quelante bidentado) com o zinco do fotossensibilizador, permitindo maior acoplamento spin-órbita o que favorece maior conversão inter-sistemas, onde são formadas as espécies citotóxicas, como o oxigênio singleto. Diversos trabalhos estudam a síntese de organometálicos terapêuticos, obtidos a partir da complexação do lapachol, ligante anti câncer bidentado bioativo, com uma série de metais, como cobre, cobalto, zinco e rutênio (Goulart et al., 2003; Martínez, Jiménez, Castellano, Piro, & Aymonino, 2005) em meio básico. O objetivo desses autores é otimizar a atividade biológica do lapachol após inserir um centro metálico, com caráter positivo, que permite maior interação com biomoléculas de carga negativa (segmentos de DNA) (Kandioller et al., 2013). Assim, sugere-se que além de permitir a otimização da atividade do fotossensibilizador (aumento no rendimento quântico de oxigênio singleto), a complexação tende a influenciar de forma positiva a eficácia da naftoquinona.

### **3.2.3. Influência da temperatura na auto-agregação do formulado misto incorporado em F-127 e P-123**

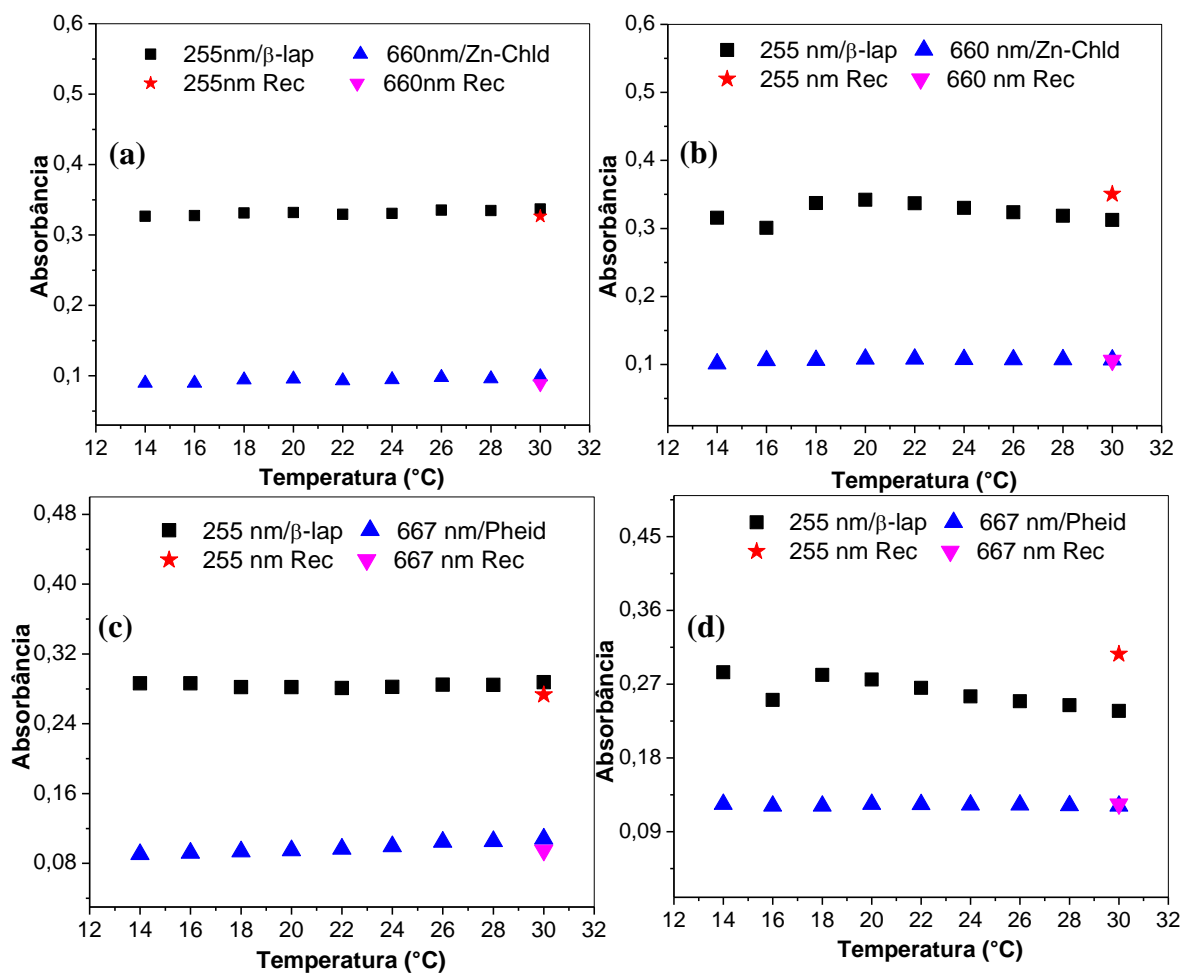
As propriedades espectroscópicas dos fármacos, que compõem os sistemas mistos, foram estudadas frente às mudanças estruturais dos surfactantes poliméricos, induzidas por variações na temperatura entre 14,0 e 30,0 °C (condições acima e abaixo da TMC dos copolímeros). Na Figura 45 são mostradas as propriedades espectrais dos fármacos (naftoquinonas e derivados de clorofila) formulados nos sistemas micelares F-127 e P-123.



**Figura 45.** Estabilidade do formulado misto com a temperatura, sendo (a) Zn-Chld/Lapachol em F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) Zn-Chld/Lapachol em P123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), (c) Pheid/Lapachol em F127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), (d) Pheid/Lapachol em P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). [lapachol]= $1,6 \times 10^{-5}$  mol/L e [Chls]= $2 \times 10^{-6}$  mol/L. Nos insertes são apresentados os  $\lambda_{\text{máx}}$  monitorados para cada composto.

No que tange às Figuras 45-a a 45-d, com relação ao lapachol incorporado em sistemas multifármacos, em micelas F-127 e P-123, verifica-se o processo auto-agregacional em baixas temperaturas, indicado pela redução do máximo de absorção em 250nm com elevação da banda em 275 nm. O efeito associativo do lapachol e as

variações na estrutura micelar não resultaram em implicações para os derivados Pheid e Zn-Chld, indicados pela inalterabilidade do máximo de absorção da banda Q (região de 655 nm) correspondente a cada espécie. A avaliação dos formulados obtidos a partir da  $\beta$ -lapachona também foi realizada e encontra-se apresentada na Figura 46.



**Figura 46.** Estabilidade do formulado misto com a temperatura, sendo (a) Zn-Chld  $\beta$ lap em F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) Zn-Chld  $\beta$ lap em P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), (c) Pheid  $\beta$ lap em F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e (d) Pheid  $\beta$ lap em P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). [ $\beta$ -lapachona]= $1,3 \times 10^{-5}$  mol/L e [Chls]= $2 \times 10^{-6}$  mol/L; em água destilada (pH 5). Nos insertes são apresentados os  $\lambda_{\text{máx}}$  monitorados para cada composto.

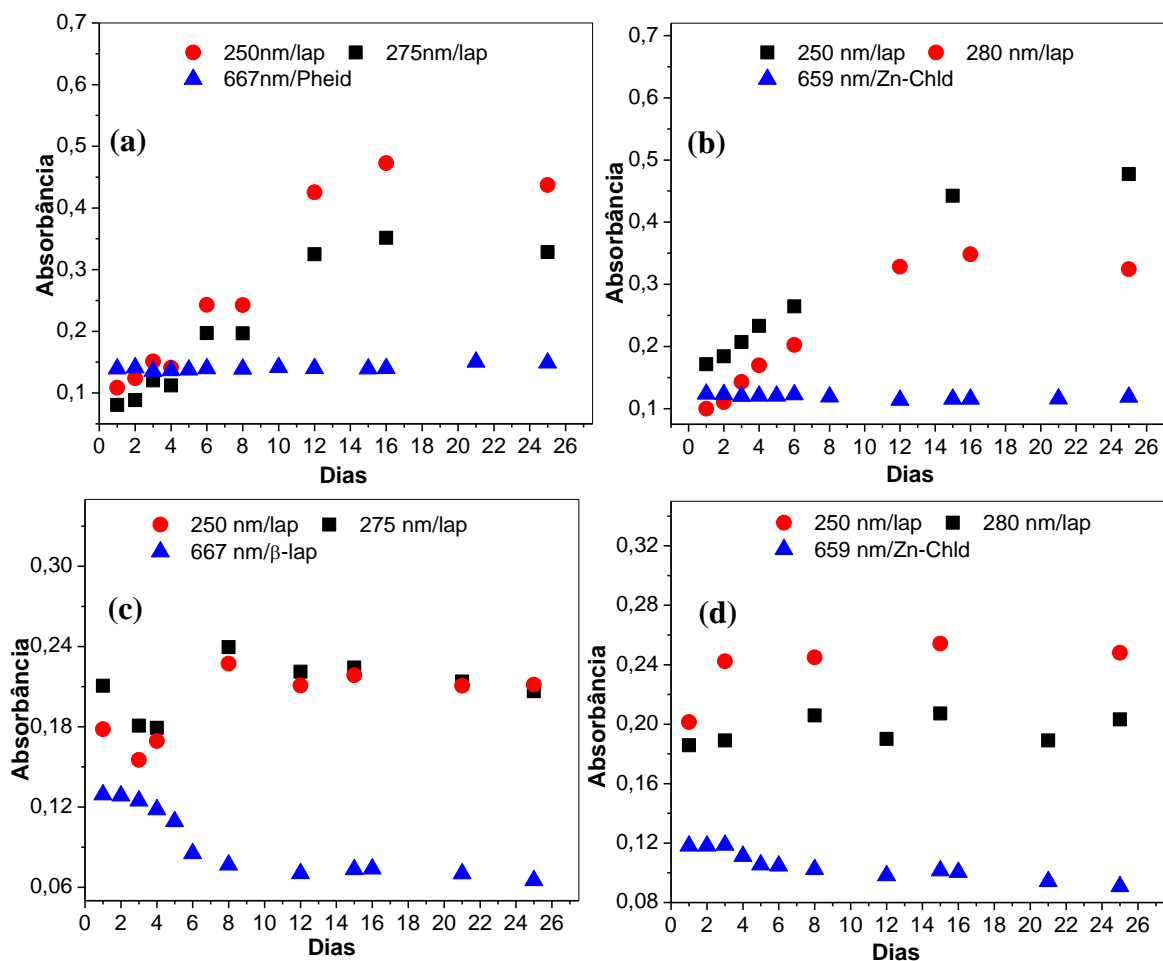
Da mesma forma, os formulados obtidos com encapsulamento simultâneo da  $\beta$ -lapachona com as respectivas clorinas, Figuras 46-a a 46-d, mostraram um perfil

constante para a banda Q, do Pheid e Zn-Chld, e para banda em 255nm da  $\beta$ -lapachona. Dessa forma, verificou-se que somente o lapachol sofreu maior implicância do efeito térmico devido a acessibilidade mais pronunciada a moléculas com a atenuação da temperatura, conforme discutido na seção 2.1.8. A estabilidade da  $\beta$ -lapachona e do lapachol no formulado misto, com relação à dinâmica micelar, está de acordo com o comportamento verificado para os sistemas naftoquinona/F-127 e P-123, discutido na seção 2.1.8, atestando que as espécies se comportam de forma independente em um ambiente com mais de um fármaco. A constância dos máximos de absorção eletrônica com a variação da temperatura para os derivados Pheid e Zn-Chld também foi verificada nos estudos desenvolvidos por Gerola (2013). Por meio de espectros de RLS (espalhamento de luz ressonante) obtidos em baixas temperaturas a autora atribuiu tal comportamento à redução na TMC dos surfactantes (Gerola, 2013).

#### **3.2.4. Estabilidade do Formulado Misto incorporado em F-127 e P-123 com o Tempo**

Este estudo foi realizado com o intuito de se obter informações a respeito da estabilidade/reorganização, com possíveis efeitos de liberação dos compostos mistos nas micelas poliméricas, para posterior correlação com os dados apresentados na seção 2.1.9. A estabilidade dos formulados mistos foi monitorada por meio de espectros de absorção eletrônica UV-Vis registrados durante um período de 25 dias. Foram avaliados os máximos de absorção eletrônica das principais bandas do lapachol (250 e 273 nm),  $\beta$ -lapachona (255 nm) e dos fotossensibilizadores Pheid e Zn-chd (banda Q

em 660 e 667 nm). Na Figura 47 estão apresentados os máximos de absorção eletrônica com o passar dos dias para os formulados multi-fármacos propostos.



**Figura 47.** Estabilidade do formulado misto com o tempo, sendo (a) Pheid/Lap em P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), (b) Zn-Chld/Lap P-123 (1,7% m/V;  $2,9 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>), (c) Pheid/Lap em F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>) e (d) Zn-Chld/Lap F-127 (1,0% m/V;  $7,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), em água destilada (pH 5) a 30,0 °C.

Com base nos máximos de absorção eletrônica UV-Vis para os sistemas mistos Pheid/Lap e Zn-Chld/Lap, formulados em P-123 (Figura 47-a e 47-b), pode-se verificar similaridade com os sistemas apresentados na seção 2.1.8, para a naftoquinona encapsulada na forma isolada. Para ambos os fármacos pode-se verificar comportamento independente, com rearranjo do lapachol no micro-ambiente micelar e

simultânea estabilidade dos derivados da clorofila. O mesmo não é apurado sobre os sistemas formulados em F-127. A característica do perfil lento de ligação e monomerização do lapachol nessas micelas resultou em vulnerabilidade do Pheid e Zn-Chld, fazendo com que os mesmos apresentem uma menor estabilidade. Analogias podem ser feitas para os formulados mistos compostos por  $\beta$ -lapachona, onde os encapsulados em micelas de F-127 apresentaram uma menor estabilidade para os derivados da clorofila, demonstrando que o processo de reorganização da naftoquinona influi na acomodação do fotossensibilizador. As discussões acerca dos sistemas formulados em P-123 para o lapachol, sobredito anteriormente, também são coerentes para os sistemas mistos compostos por  $\beta$ -lapachona/clorofila (não mostrado), atestando um processo de liberação independente.

Estudos prévios vinculados à estabilidade dos derivados da clorofila nas micelas não iônicas, desenvolvidos por Gerola (2013), demonstraram estabilidade do fotossensibilizador nos sistemas micelares por um período de 15 dias, sendo, portanto, correspondentes ao verificado para os sistemas mistos (Gerola, 2013).



## 4. Conclusão

Neste trabalho foram estudadas as propriedades físico-químicas e espectroscópicas das naftoquinonas Lapachol e  $\beta$ -Lapachona em meio homogêneo e micro-heterogêneo, constituído de micelas poliméricas da classe dos Plurônicos<sup>®</sup>, P-123 e F-127, bem como o formulado misto composto pelo encapsulamento simultâneo dos fotossensibilizadores, derivados da clorofila (Pheid e Zn-Chld), e as naftoquinonas. Os estudos espectroscópicos em meio homogêneo mostraram que o lapachol e a  $\beta$ -lapachona apresentam boa solubilidade em etanol, diclorometano, octanol e baixa solubilidade em meio aquoso, apresentando-se majoritariamente na forma auto-agregada neste meio. Inclusive, os coeficientes de absorvidade molar das principais bandas de absorção das naftoquinonas mostraram maior tendência de solubilização em solventes de menor polaridade. Deste modo, o etanol foi selecionado para o preparo das soluções estoques para os estudos subsequentes.

Nos estudos envolvendo misturas binárias homogêneas, constituídas de água e etanol, objetivando-se estudar as possíveis formas auto-agregadas das naftoquinonas em meios ricos de água, verificou-se o efeito da solvatação preferencial, com aumento das principais bandas de absorção eletrônica e emissão de fluorescência em proporções próximas 50% (V/V) de água. O comportamento auto-agregacional das naftoquinonas revelou maior sensibilidade e tendência a auto-agregação do Lapachol frente à  $\beta$ -lapachona, que não apresentou variações espectroscópicas consideráveis com o aumento da polaridade do meio.

O coeficiente de partição das naftoquinonas foi determinado objetivando-se estudar os fenômenos físico-químicos e biofísicos de distribuição dos fármacos nos sistemas carreadores ou nas membranas biológicas. Os resultados apontaram um

comportamento anfífilo para as naftoquinonas, evidenciando que as mesmas podem migrar tanto para a bicamada lipídica das membranas biológicas quanto se dissolver no plasma sanguíneo quando administradas *in vivo*, por exemplo.

Os estudos de pKa para o lapachol foram realizados com o intuito de identificar o estado de carga do fármaco em pH fisiológico, já que as diferentes formas protolíticas apresentam distintas taxas de difusão através da bicamada lipídica. Avaliou-se o pKa do lapachol em meio homogêneo (50% etanol) e em meio micro-heterogêneo, constituído de micelas copoliméricas P-123 e F-127. Os valores de pKa em meio micelar demonstraram menores variações para o lapachol em micelas de F-127, indicando que o mesmo encontra-se em uma região micelar externa, com polaridade semelhante a verificada em água/etanol. De forma análoga, as maiores variações observadas nos valores de pKa para o sistema em P-123 pode estar associadas à localização do fármaco na micela copolimérica e sua acessibilidade aos prótons do meio.

As avaliações a respeito da interação da naftoquinona com os copolímeros micelares, em pH ácido (4,5) e básico (8,0), revelaram que o lapachol na forma neutra apresenta maior interação com as micelas poliméricas, com provável localização na região interfacial corona hidrofílica/água. Já as avaliações com mistura de forma protolítica, em água destilada (pH 5,0), apontaram uma exacerbada afinidade primária induzindo a monomerização dos compostos no tempo inicial ( $T_0$ , medida imediata à adição do copolímero), com posterior rearranjo e auto-agregação no  $T_{eq}$  (após 48 horas) para a maioria dos sistemas, exceto para lapachol/P-123. Esses estudos no  $T_0$  e  $T_{eq}$  demonstraram a existência de uma dependência temporal na interação e estabilidade das naftoquinonas nos sistemas micelares.

Após os estudos termodinâmicos de interação naftoquinona/copolímero partiu-se para a incorporação das mesmas nestes sistemas nano-estruturados, utilizando-se do método de dispersão sólida. A partir das propriedades espectroscópicas desses sistemas, verificou-se que as naftoquinonas foram incorporadas eficientemente nos copolímeros coloidais, mesmo em posse da complexa interação verificada nos estudos de ligação. Para o sistema lapachol/F-127 foram verificadas alterações significativas nos espectros de absorção eletrônica, o que foi atribuído a efeitos da polaridade e/ou auto-agregação incitada pelo micro-ambiente complexo no qual a espécie está inserida. Os espectros de emissão de fluorescência demonstraram uma redução significativa na intensidade das principais bandas para os sistemas formulados, o que foi atribuído, mais uma vez, a efeitos de localização e acessibilidade a moléculas de água, supressoras de fluorescência.

A incorporação das naftoquinonas simultânea aos derivados da clorofila, Pheid e clorofilida de zinco, nos copolímeros micelares P-123 e F-127 foi eficaz, uma vez que houve a monomerização dos compostos fotossensibilizadores, condição necessária para aplicabilidade fotodinâmica.

Os estudos relacionados à estabilidade térmica dos sistemas formulados, compostos pela combinação entre o fotossensibilizador e a naftoquinona, mostraram que as espécies (naftoquinonas, Pheid e ZnChld) mantiveram seu comportamento característico individual, isto é, com redução do máximo em 250 nm com simultânea elevação na intensidade de absorção da banda em 273 nm do lapachol e inalterabilidade dos máximos para os derivados Pheid, Zn-Chld e  $\beta$ -lapachona. Esses efeitos foram atribuídos a variações na localização dos fármacos frente a dinâmica micelar.

A avaliação da estabilidade temporal do lapachol e  $\beta$ -lapachona formulado apontou efeito da reorganização (com provável monomerização) com variações na

localização dos fármacos com o passar dos dias. A combinação das naftoquinonas com os fotossensibilizadores não causou modificações na estabilidade das naftoquinonas, entretanto levaram os fotossensibilizadores incorporados em micelas copoliméricas de F-127 a apresentarem menor estabilidade. Esse efeito pode estar associado à competição pelo mesmo sítio de ligação, com acomodação de um dos fármacos prejudicada, visto que ambos fármacos encontram-se acomodados na região PEO da micela copolimérica.

Os experimentos relacionados à avaliação da estabilidade dos formulados frente a processos de liofilização e reidratação, demonstraram uma pequena redução na intensidade de absorção da banda Q (região de 600 a 670 nm) dos derivados da clorofila, com um aumento acentuado das bandas de absorção eletrônica das naftoquinonas. Esse comportamento foi atribuído, sobretudo, a efeitos de reorganização dos fármacos nos micro-ambientes micelares antes e após o stress térmico que precede a liofilização. Mesmo oferecendo uma redução na intensidade de absorção para a maioria dos fotossensibilizadores, a liofilização foi considerada vantajosa por não favorecer a formação de espécies auto-agregadas.

Os valores de rendimento quântico de fluorescência dos formulados obtidos pela combinação dos derivados da clorofila (Pheid e Zn-Chld) com as naftoquinonas expressaram uma redução significativa (superior a 45%) para os formulados obtidos a partir da  $\beta$ -lapachona, comparados aos valores obtidos em etanol. Esse comportamento, aliado ao  $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ , foi atribuído a despopulação do estado excitado por processos não radiativos, envolvendo colisões com moléculas do solvente, ou ainda ao favorecimento do cruzamento intersistemas (CIS). Os valores de rendimento quântico de oxigênio singleto para os formulados obtidos a partir da Zn-Chld foram elevados. Esse efeito foi associado a uma possível complexação entre o zinco (Zn-Chld) e a naftoquinona, agente

quelante bidentado, podendo favorecer o acoplamento spin-órbita e, conseqüentemente, o cruzamento inter-sistemas.

## 5. Referências

- Agostiano, A., Catucci, L., Colafemmina, G., Della Monica, M., & Scheer, H. (2000). Relevance of the chlorophyll phytyl chain on lamellar phase formation and organisation. *Biophysical Chemistry*, 84(3), 189–94.
- Agostiano, A., Cosma, P., Trotta, M., Monsu, L., Fisica, C., Messina, S., Messina, I. (2002). Chlorophyll a Behavior in Aqueous Solvents : Formation of Nanoscale Self-Assembled Complexes, 12820–12829.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Kessel, D. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer : An Update, 61, 250-281.
- Alakhova, D. Y., Rapoport, N. Y., Batrakova, E. V, Timoshin, A. a, Li, S., Nicholls, D., Kabanov, A. V. (2010). Differential metabolic responses to pluronic in MDR and non-MDR cells: a novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 142(1), 89–100.
- Alexandridis, P., Athanassiou, V., & Hatton, T. A. (1995). Pluronic-P105 PEO-PPO-PEO block-copolymer in aqueous urea solutions - Micelle formation, struture and microenvironment..*Langmuir*, 11, 2442–2450.
- Alexandridis, P., & Hatton, T. A. (1995). Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 96, 1–46.
- Allison, R., Moghissi, K., Downie, G., & Dixon, K. (2011). Photodynamic therapy (PDT) for lung cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(3), 231–9.
- Aruna, M., Babu, A., Thadanki, M., & Gupta, M. (2011). Solid dispersions—an approach to enhance the dissolution rate of irbesartan. *Int J Res Pharm Chem*, 1(4), 780–788.
- Bakshi, M. S., & Sachar, S. (2006). Influence of temperature on the mixed micelles of Pluronic F127 and P103 with dimethylene-bis-(dodecyldimethylammonium bromide). *Journal of Colloid and Interface Science*, 296, 309–315.

- Banerjee, S. (1980). Water Solubility and Octanol / Water Partition Coefficients of Organics . Limitations of the Solubility-Partition Coefficient Correlation, 14(10), 1227–1229.
- Barbosa, T. P., & Diniz Neto, H. (2013). Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de Química Orgânica Experimental. *Química Nova*, 36(2), 331–334.
- Basak, R., & Bandyopadhyay, R. (2013). Encapsulation of hydrophobic drugs in Pluronic F127 micelles: Effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. *Langmuir*, 29, 4350–4356.
- Basu Ray, G., Chakraborty, I., & Moulik, S. P. (2006). Pyrene absorption can be a convenient method for probing critical micellar concentration (cmc) and indexing micellar polarity. *Journal of Colloid and Interface Science*, 294(1), 248–54.
- Batistela, V. R., Pellosi, D. S., de Souza, F. D., da Costa, W. F., de Oliveira Santin, S. M., de Souza, V. R., ... Hioka, N. (2011). pKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV-Vis spectrophotometric data. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(5), 889–97.
- Batrakova, E. V., & Kabanov, A. V. (2008). Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 130(2), 98–106.
- Batrakova, E. V., Li, S., Brynskikh, A. M., Sharma, A. K., Li, Y., Boska, M., ... Kabanov, A. V. (2010). Effects of pluronic and doxorubicin on drug uptake, cellular metabolism, apoptosis and tumor inhibition in animal models of MDR cancers. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 143(3), 290–301.
- Bevilaqua, T., Gonçalves, T. F., Venturini, C. de G., & Machado, V. G. (2006). Solute-solvent and solvent-solvent interactions in the preferential solvation of 4-[4-(dimethylamino)styryl]-1-methylpyridinium iodide in 24 binary solvent mixtures. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 65(3-4), 535–42.
- Binghe Wang, Teruna J. Siahaan, R. A. S. (2005). *Drug Delivery*. (B. Wang, T. J. Siahaan, & R. Soltero, Eds.) (p. 464). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Bonnet, P.-A., Berleur, F., Roman, V., & Fatome, M. (1989). Stearic acid pH-dependent reactivity in dipalmitoyl phosphatidylcholine model membranes in L $\beta$ ' gel phase. An electron spin resonance and differential scanning calorimetry experiment. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 85(10), 3587.

- Bosch, E., & Roses, M. (1992). Relationship between E T polarity and composition in binary solvent mixtures. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 88(24), 3541.
- Bozzini, G., Colin, P., Betrouni, N., Nevoux, P., Ouzzane, A., Puech, P., ... Mordon, S. (2012). Photodynamic therapy in urology: what can we do now and where are we heading? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9(3), 261–73.
- Caetano, W., & Tabak, M. (1999). Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with ionic micelles: electronic absorption spectroscopy studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55(12), 2513–2528.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy : part one — photosensitizers , photochemistry and cellular localization, 1, 279–293.
- Chatterjee, D. K., Fong, L. S., & Zhang, Y. (2008). Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1627–37.
- Chen, Y., & Li, X. (2011). Near-infrared fluorescent nanocapsules with reversible response to thermal/pH modulation for optical imaging. *Biomacromolecules*, 12(12), 4367–72.
- Choi, H. J., Moon, J. H., Ko, B. M., Min, S. K., Song, a R., Lee, T. H., ... Park, S.-H. (2011). Clinical feasibility of direct peroral cholangioscopy-guided photodynamic therapy for inoperable cholangiocarcinoma performed by using an ultra-slim upper endoscope (with videos). *Gastrointestinal Endoscopy*, 73(4), 808–13.
- Chou, T. C., & Talaly, P. (1977). A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(18), 6438–42.
- Christian Reichardt. (2004). *Christian Reichardt Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. (Wiley-VCH, Ed.) (3 Edição.).
- Cohn, D., Sosnik, A., & Levy, A. (2003). Improved reverse thermo-responsive polymeric systems. *Biomaterials*, 24(21), 3707–3714.
- Correia, R. F., Andrade, S. M., & Viseu, M. I. (2012). Aggregation and disaggregation of anionic aluminum phthalocyanines in cationic pre-micelle and micelle media: A fluorescence study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 235, 21–28.
- Cosma, P., Fini, P., Rochira, S., Catucci, L., Castagnolo, M., Agostiano, A., ... Nardulli, M. (2008). Phototoxicity and cytotoxicity of chlorophyll a/cyclodextrins complexes on Jurkat cells. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 74(1), 58–61.



- Cuny, P., Romano, J.-C., Beker, B., & Rontani, J.-F. (1999). Comparison of the photodegradation rates of chlorophyll chlorin ring and phytol side chain in phytodetritus: is the phytyldiol versus phytol ratio (CPPI) a new biogeochemical index? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 237(2), 271–290.
- Da Silva, D. C., Ricken, I., Silva, M. A. do R., & Machado, V. G. (2002). Solute-solvent and solvent-solvent interactions in the preferential solvation of Brooker's merocyanine in binary solvent mixtures. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 15(7), 420–427.
- David, G., Armstrong April, Ehrin, A., & Tashjian Armen H. (2009). *PRINCÍPIOS de FARMACOLOGIA - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia*. (N. Guanabara, Ed.) (2 Edição., p. 914).
- De Lucas, N. C., Corrêa, R. J., Garden, S. J., Santos, G., Rodrigues, R., Carvalho, C. E. M., ... Miranda, M. a. (2012). Singlet oxygen production by pyrano and furano 1,4-naphthoquinones in non-aqueous medium. *Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 11(7), 1201–9.
- Delgado, D. R., Holguín, A. R., Almanza, O. A., Martínez, F., & Marcus, Y. (2011). Solubility and preferential solvation of meloxicam in ethanol+water mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 305(1), 88–95.
- Dentuto, P. L., Catucci, L., Cosma, P., Fini, P., & Agostiano, A. (2004). Photophysical and electrochemical properties of chlorophyll a-cyclodextrins complexes. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 63(1-2), 117–20.
- Dhami, S., Mello, A. J. De, Rumbles, G., Bishop, S. M., Phillips, D., & Beeby, A. (1995). Phthalocyanine Fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect? *Photochemistry and Photobiology*, 61(4), 341–346.
- Dhirendra, K., Lewis, S., Udupa, N., & Atin, K. (2009). Solid dispersions: a review. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(2), 234–46.
- Di Tommaso, C., Como, C., Gurny, R., & Möller, M. (2010). Investigations on the lyophilisation of MPEG-hexPLA micelle based pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 40(1), 38–47.
- Dos Santos, F. A. B., Uchoa, A. F., Baptista, M. S., Iamamoto, Y., Serra, O. A., Brocksom, T. J., & de Oliveira, K. T. (2013). Synthesis of functionalized chlorins sterically-prevented from self-aggregation. *Dyes and Pigments*, 99(2), 402–411.
- Dutt, G. B. (2005). How critical micelle temperature influences rotational diffusion of hydrophobic probes solubilized in aqueous triblock copolymer solutions. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 109(11), 4923–8.

- Eichwurzel, I., Stiel, H., & Röder, B. (2000). Photophysical studies of the pheophorbide a dimer. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 54(2-3), 194–200.
- Elion, G. B., Singer, S., & Hitchings, G. H. (1954). Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *The Journal of Biological Chemistry*, 208(2), 477–88.
- Etienne, T., Michaux, C., Monari, A., Assfeld, X., & Perpète, E. a. (2014). Theoretical computation of Betain B30 solvatochromism using a Polarizable Continuum Model. *Dyes and Pigments*, 100, 24–31.
- Farajtabar, A., Jaberi, F., & Gharib, F. (2011). Preferential solvation and solvation shell composition of free base and protonated 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin in aqueous organic mixed solvents. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 83(1), 213–20.
- Fendler, J. H. (1982). *Membrane mimetic chemistry: characterizations and applications of micelles, microemulsions, monolayers, bilayers, vesicles, host-guest systems, and polyions* (p. 522). Wiley.
- Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry*, Third Edition.
- Fernandez, M. S., & Fromherz, P. (1977). Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles. *The Journal of Physical Chemistry*, 81(18), 1755–1761.
- Freisinger, E. (2007). Spectroscopic characterization of a fruit-specific metallothionein: *M. acuminata* MT3. *Inorganica Chimica Acta*, 360(1), 369–380.
- Freitas-Neto, J. L., Presmich, G. M. A., Rolim, L. A., Alves, L. D. S., Albuquerque, M. M., & Rolim-Neto, P. J. (2012). Caracterização físico-química do potencial agente antineoplásico  $\beta$ -lapachona. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica E Aplicada*, 33(4), 545–553.
- Fromherz, P., & Masters, B. (1974). Interfacial pH at electrically charged lipid monolayers investigated by the lipoid pH-indicator method. *Biochimica et Biophysica Acta*, 356(3), 270–5.
- Gao, G. H., Li, Y., & Lee, D. S. (2013). Environmental pH-sensitive polymeric micelles for cancer diagnosis and targeted therapy. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 169(3), 180–4.
- George, A. (2011). *Advances in Biomimetics*.
- George, M. V., & Bhat, V. (1979). Photooxygenations of nitrogen heterocycles. *Chemical Reviews*, 79(5), 447–478.

- Gerola, A. P. (2010). Estudos Físico-Químicos de Derivados de Clorofila em Sistemas Homogêneos e Micro-Heterogêneos: Aspectos Fotofísicos, Fotodinâmicos e Fotoinativantes sobre Micro-Organismos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.
- Gerola, A. P. (2013). Estudos fotofísicos e fotodinâmicos da clorofila a e derivados formulados em micelas poliméricas e lipossomos. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá.
- Gerola, A. P., Santana, A., França, P. B., Tsubone, T. M., de Oliveira, H. P. M., Caetano, W., Hioka, N. (2011). Effects of metal and the phytyl chain on chlorophyll derivatives: physicochemical evaluation for photodynamic inactivation of microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 87(4), 884–94.
- Gerola, A. P., Tsubone, T. M., Santana, A., de Oliveira, H. P. M., Hioka, N., & Caetano, W. (2011). Properties of chlorophyll and derivatives in homogeneous and microheterogeneous systems. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 115(22), 7364–73.
- Ghoneim, N. (2001). Study of the preferential solvation of some betaine dyes in binary solvent mixtures. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57(9), 1877–84.
- Gomaa, I., Ali, S. E., El-Tayeb, T. a, & Abdel-kader, M. H. (2012a). Chlorophyll derivative mediated PDT versus methotrexate: an in vitro study using MCF-7 cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9(4), 362–8.
- Goulart, M. O. F., Falkowski, P., Ossowski, T., & Liwo, A. (2003). Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 59(1-2), 85–7.
- Gracetto, A. C., Batistela, V. R., Caetano, W., Oliveira, H. P. M. de, Santos, W. G., Cavalheiro, C. C. S., & Hioka, N. (2010). Unusual 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) spectrophotometric behavior in water/ethanol and water/DMSO mixtures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(8), 1497–1502.
- Gracetto, A. C., Tessaro, A. L., De Souza, V. R., Caetano, W., Pontes, R. M., Batistela, V. R., ... Hioka, N. (2011). Self-aggregation processes of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in water/ethanol mixtures with high water percentages. *Applied Spectroscopy*, 65, 604–610.
- Greco, W., Bravo, G., & Parsons, J. (1995). The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.*, 47(2), 331–385.
- Guiraud, P., Steiman, R., Campos-Takaki, G. M., Seigle-Murandi, F., & Simeon de Buochberg, M. (1994). Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and beta-lapachone. *Planta Medica*, 60(4), 373–4.

- Guo, J., Song, W., Ding, F., Zhang, J., & Sun, Z. (2012). Study on cytotoxicity and structure-activity relationship of HL-7702 cell exposed to naphthoquinones. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33(3), 408–13.
- Guo, J.-H., Luo, Y., Augustsson, a, Kashtanov, S., Rubensson, J.-E., Shuh, D., ... Nordgren, J. (2004). The molecular structure of alcohol-water mixtures determined by soft-X-ray absorption and emission spectroscopy. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 137-140, 425–428.
- Harada, S., & Okada, H. (1990). Micellar catalytic effect on the base dissociation of short-chain alkylamines studied by the ultrasonic adsorption method. *Journal of Physical*, 94 (19), 7648–7651
- Harmsen, S., Meijerman, I., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2007). The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. *Cancer Treatment Reviews*, 33(4), 369–80.
- Hendrich, A. B., Wesolowska, O., Motohashi, N., Molnár, J., & Michalak, K. (2003). New phenothiazine-type multidrug resistance modifiers: anti-MDR activity versus membrane perturbing potency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), 260–265.
- Hosseinzadeh, R., Maleki, R., Matin, A. A., & Nikkhahi, Y. (2008). Spectrophotometric study of anionic azo-dye light yellow (X6G) interaction with surfactants and its micellar solubilization in cationic surfactant micelles. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 69(4), 1183–7.
- Hussain, H., Krohn, K., Ahmad, U., & Miana, A. (2007). Lapachol : an overview, 2007(ii), 145–171.
- Ishii, K. (2012). Functional singlet oxygen generators based on phthalocyanines. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(15-16), 1556–1568.
- Ito, O., Ito, E., Yoshikawa, Y., Watanabe, A., & Kokubun, H. (1996). Preferential solvation studied by the fluorescence lifetime of acridine in water?alcohol mixtures. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 92(2), 227.
- Jakubowska, M., Szczygieł, M., Michalczyk-Wetula, D., Susz, A., Stochel, G., Elas, M., ... Urbanska, K. (2013). Zinc-pheophorbide a-highly efficient low-cost photosensitizer against human adenocarcinoma in cellular and animal models. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(3), 266–77.
- Janet Woodcock, M.D., Joseph P. Griffin, J.D., and Rachel E. Behrman, M.D., M. P. H. (2011). Development of Novel Combination Therapies. *The New England Journal of Medicine*, 364(11), 2011–2013.
- Joshi, S., & Pant, D. D. (2012). Ground and excited state dipole moments of quinine sulfate dication: Solvatochromic shift of absorption and fluorescence spectra. *Journal of Molecular Liquids*, 172, 125–129.

- Józefowicz, M. (2011). The influence of hydrogen bonds and preferential solvation on spectroscopic properties of methyl p-dimethylaminobenzoate and its ortho derivative in binary solvent mixture. *Chemical Physics*, 383(1-3), 19–26.
- Kabanov, A., Batrakova, E., & Alakhov, V. (2002). Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 82, 189–212.
- Kamogawa, E., & Sueishi, Y. (2014). A multiple free-radical scavenging ( MULTIS ) study on the antioxidant capacity of a neuroprotective drug , edaravone as compared with uric acid , glutathione , and trolox. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, In Press, , 1–4. doi:10.1016/j.bmcl.2014.01.045
- Kandioller, W., Balsano, E., Meier, S. M., Jungwirth, U., Göschl, S., Roller, A., ... Hartinger, C. G. (2013). Organometallic anticancer complexes of lapachol: metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(32), 3348–50.
- Kang, K.-H., Kim, H.-U., & Lim, K.-H. (2001). Effect of temperature on critical micelle concentration and thermodynamic potentials of micellization of anionic ammonium dodecyl sulfate and cationic octadecyl trimethyl ammonium chloride. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 189(1-3), 113–121.
- Kanofsky, J. R. (1990). Quenching of singlet oxygen by human plasma. *Photochemistry and Photobiology*, 51(3), 299–303.
- Khan, M. S., & Khan, Z. H. (2005). Ab initio and semiempirical study of structure and electronic spectra of hydroxy substituted naphthoquinones. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(4), 777–90.
- Kimura, K., Hirayama, F., Arima, H., & Uekama, K. (2000). Effects of aging on crystallization, dissolution and absorption characteristics of amorphous tolbutamide-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 48(5), 646–50.
- Konan, Y. N., Gurny, R., & Allémann, E. (2002). Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 233(1-2), 239–252.
- Koo, O. M., Rubinstein, I., & Onyuksel, H. (2005). Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: a novel nanomedicine. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1(1), 77–84.
- Kübler, A. C. (2005). Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*, 20(1), 37–45.
- Kumar, M. R. S., Aithal, K., Rao, B. N., Udupa, N., & Rao, B. S. S. (2009). Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1

- melanoma tumor cells. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 23(2), 242–50.
- Kumbhakar, M., Goel, T., Nath, S., Mukherjee, T., & Pal, H. (2006). Microenvironment in the corona region of triblock copolymer micelles: temperature dependent solvation and rotational relaxation dynamics of coumarin dyes. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 110(51), 25646–55.
- Kyrychenko, A., Sevriukov, I. Y., Syzova, Z. A., Ladokhin, A. S., & Doroshenko, A. O. (2011). Partitioning of 2,6-Bis(1H-Benzimidazol-2-yl)pyridine fluorophore into a phospholipid bilayer: complementary use of fluorescence quenching studies and molecular dynamics simulations. *Biophysical Chemistry*, 154(1), 8–17.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, Ed.) (3<sup>o</sup> edition., p. 540). New York.
- Lam, Y.M., Grigorieff, N., Goldbeck-Wood, G. (1999). Direct visualisation of micelles of Pluronic block copolymers in aqueous solution by cryo-TEM. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1, 3331 – 3334.
- Lamberti, M. J., Vittar, N. B. R., da Silva, F. de C., Ferreira, V. F., & Rivarola, V. A. (2013). Synergistic enhancement of antitumor effect of  $\beta$ -Lapachone by photodynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 20(11), 1007–12.
- Lázaro, G. S., Meneses, A. L., Macedo, O. F. L. de, Gimenez, I. de F., da Costa, N. B., Barreto, L. S., & Almeida, L. E. (2008). Interaction of pyrimethamine and sulfadiazine with ionic and neutral micelles: Electronic absorption and fluorescence studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 324(1-3), 98–104.
- Lee, I., Park, M., Kim, Y., Hwang, O., Khang, G., & Lee, D. (2013). Ketal containing amphiphilic block copolymer micelles as pH-sensitive drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 448(1), 259–66.
- Lee, T.-H., & Lin, S.-Y. (2011). Pluronic F68 enhanced the conformational stability of salmon calcitonin in both aqueous solution and lyophilized solid form. *Biopolymers*, 95(11), 785–91.
- Letchford, K., & Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 65(3), 259–69.
- Li, L., Xie, J., Zhang, X., Chen, J., Luo, Y., Zhang, L., & Luo, R. (2010a). Retrospective study of photodynamic therapy vs photodynamic therapy combined

- with chemotherapy and chemotherapy alone on advanced esophageal cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(3), 139–43.
- Li, Y., Scales, N., Blankenship, R. E., Willows, R. D., & Chen, M. (2012). Extinction coefficient for red-shifted chlorophylls: chlorophyll d and chlorophyll f. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817(8), 1292–8.
- Liu, K., Wang, Y., Yao, J., & Luo, Y. (2007). Origin of the Q-band splitting in the absorption spectra of aluminum phthalocyanine chloride. *Chemical Physics Letters*, 438(1-3), 36-40.
- Liu, P., Wang, B., & Weili Qiao, J. L. (2008). Multi-anticancer drugs encapsulated in the micelle: a novel chemotherapy to cancer. *Medical Hypotheses*, 71(3), 379–81.
- Loewe, S. (1957). Antagonisms and Antagonists. *Pharmacol. Rev.*, 9(2), 237–242.
- Loginova, L. P., Samokhina, L. V., Mchedlov-Petrosyan, N. O., Alekseeva, V. I., & Savvina, L. P. (2001). Modification of the properties of NaDS micellar solutions by adding electrolytes and non-electrolytes: investigations with decyl eosin as a pKa-probe. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 193(1-3), 207–219.
- Loh, W., & Volpe, P. L. . (1992). Interaction of alkyl p-hydroxybenzoates with micelles: Evaluation of their partition coefficients and ionization constants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 154(2), 369–377.
- Lopez Arbeloa, T., Lopez Arbeloa, F., Tapia, M. J., & Lopez Arbeloa, I. (1993). Hydrogen-bonding effect on the photophysical properties of 7-aminocoumarin derivatives. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(18), 4704–4707.
- Louro, S. R., Nascimento, O. R., & Tabak, M. (1994). Charge- and pH-dependent binding sites for dibucaine in ionic micelles: a fluorescence study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1190(2), 319–28.
- Lu, H.-L., Syu, W.-J., Nishiyama, N., Kataoka, K., & Lai, P.-S. (2011). Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance in vivo. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 155(3), 458–64.
- Macedo, L., Fernandes, T., Silveira, L., Mesquita, A., Franchitti, A. A., & Ximenes, E. A. (2013).  $\beta$ -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 21(1), 25–9.
- Machado, A. da H. (2000). Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 23(2), 237–243.

- Maeda, M., Murakami, M., Takegami, T., & Ota, T. (2008). Promotion or suppression of experimental metastasis of B16 melanoma cells after oral administration of lapachol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 229(2), 232–8.
- Manallack, D. T. (2008). The pK(a) Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 1, 25–38.
- Marsden, H. R., Tomatsu, I., & Kros, A. (2011). Model systems for membrane fusion. *Chemical Society Reviews*, 40(3), 1572–85.
- Martínez, M. A., Jiménez, M. C. L. de, Castellano, E. E., Piro, O. E., & Aymonino, P. J. (2005). Two isostructural complexes of Co(II) and Zn(II) with lapacholate, dimethylformamide and water, [M(Lap)<sub>2</sub>(DMF)(H<sub>2</sub>O)]. *Anales de La Asociación Química Argentina*, 93(4-6), 183–193.
- Medeiros, C. S., Pontes-Filho, N. T., Camara, C. A., Lima-Filho, J. V., Oliveira, P. C., Lemos, S. A., Leal, A. F., Brandão, J. O., Neves, R. P. (2010). Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. *Braz J Med Biol Res.*, 43(4), 345–9.
- Milla Sanabria, L., Rodríguez, M. E., Cogno, I. S., Rumie Vittar, N. B., Pansa, M. F., Lambertini, M. J., & Rivarola, V. A. (2013). Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1835(1), 36–45.
- Miranda, H. F., Puig, M. M., Prieto, J. C., & Pinardi, G. (2006). Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. *Pain*, 121(1-2), 22–8.
- Mogal, S. A., Gurjar, P. N., Yamgar, D. S., & Kamod, A. C. (2012). Solid dispersion technique for improving solubility of some poorly soluble drugs, 4(5), 1574–1586.
- Moon, D.-O., Choi, Y. H., Kim, N.-D., Park, Y.-M., & Kim, G.-Y. (2007). Anti-inflammatory effects of beta-lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *International Immunopharmacology*, 7(4), 506–14.
- Moore, S. A., Harris, A. A., & Palepu, R. M. (2007). Spectroscopic investigations on the binding of ammonium salt of 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid with non-ionic surfactant micelles in aqueous media. *Fluid Phase Equilibria*, 251(2), 110–113.
- Moreira, L. M., Lima, A., Soares, R. R. S., Batistela, V. R., Gerola, A. P., Hioka, N., ... Oliveira, H. P. M. De. (2009). Metallochlorophylls of Magnesium, Copper and Zinc: Evaluation of the Influence of the First Coordination Sphere on their Solvatochromism and Aggregation Properties. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20(9), 1653–1658.



- Moreira, L. M., Rodrigues, M. R., Oliveira, H. P. M. de, Lima, A., Soares, R. R. S., Batistela, V. R., ... Machado, A. E. da H. (2010). Influência de diferentes sistemas de solvente água-etanol sobre as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila  $\alpha$ . *Química Nova*, 33(2), 258–262.
- Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B., & Hamblin, M. R. (2011). Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2), 2516–39.
- Murakami, K. (2002). Thermodynamic and kinetic aspects of self-association of dyes in aqueous solution. *Dyes and Pigments*, 53(1), 31–43.
- Nakamura, H., Liao, L., Hitaka, Y., Tsukigawa, K., Subr, V., Fang, J., ... Maeda, H. (2013). Micelles of zinc protoporphyrin conjugated to N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer for imaging and light-induced antitumor effects in vivo. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 165(3), 191–8.
- Nascimento, O. R., & Tabak, M. (1994). charge-and pH-dependent binding sites for dibucaine in ionic micelles: a fluorescence study, 1190, 319–328.
- Nishiyama, N., & Kataoka, K. (2006). Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacology & Therapeutics*, 112(3), 630–48.
- Nomura, H., Onoda, M., & Miyahara, Y. (1982). Preferential Solvation of Dextran in Water–Ethanol Mixtures. *Polymer Journal*, 14(4), 249–253.
- Ossowski, T., Goulart, M. O. F., Abreu, F. C. de, Sant’Ana, A. E. G., Miranda, P. R. B., Costa, C. de O., ... Zarzeczanska, D. (2008). Determination of the pKa values of some biologically active and inactive hydroxyquinones. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(1), 175–183.
- Ough, M., Lewis, A., Bey, E. A., Gao, J., Ritchie, J. M., Bornmann, W., ... Cullen, J. J. (2005). Efficacy of beta-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. *Cancer Biology & Therapy*, 4(1), 95–102.
- Pale, V., Nikkonen, T., Vapaavuori, J., Kostianen, M., Kavakka, J., Selin, J., ... Helaja, J. (2013). Biomimetic zinc chlorin–poly(4-vinylpyridine) assemblies: doping level dependent emission–absorption regimes. *Journal of Materials Chemistry C*, 1(11), 2166.
- Peeters, D., & Leroy, G. (1994). Small clusters between water and alcohols. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 314(1-2), 39–47.
- Peetla, C., Stine, A., & Labhasetwar, V. (2009). Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), 1264–76.

- Pellosi, D. S., Estevão, B. M., Freitas, C. F., Tsubone, T. M., Caetano, W., & Hioka, N. (2013). Photophysical properties of erythrosin ester derivatives in ionic and non-ionic micelles. *Dyes and Pigments*, 99(3), 705–712.
- Pellosi, D. S., Estevão, B. M., Semensato, J., Severino, D., Baptista, M. S., Politi, M. J., Caetano, W. (2012). Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 247, 8–15.
- Pereira, E. M., Machado, T. de B., Leal, I. C. R., Jesus, D. M., Damaso, C. R. de A., Pinto, A. V., Santos, K. R. N. dos. (2006). Tabebuia avellanadae naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5(1), 5.
- Previdello, B., Carvalho, F., & Tessaro, A. (2006). O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. *Química Nova*, 29(3), 600–606.
- Rabello, B. R., Gerola, A. P., Pellosi, D. S., Tessaro, A. L., Aparício, J. L., Caetano, W., & Hioka, N. (2012). Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 238, 53-62.
- Raman, N., Selvaganapathy, M., & Radhakrishnan, S. (2014). Efficient interrupting skills of amino acid metallointercalators with DNA at physiological pH: Evaluation of biological assays. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 127C, 185–195.
- Rangel-Yagui, C. O., Hsu, H. W. L., Pessoa-Jr, A., & Tavares, L. C. (2005). Micellar solubilization of ibuprofen: influence of surfactant head groups on the extent of solubilization. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(2), 237–246.
- Ronsein, G. E., Miyamoto, S., Bechara, E., Di Mascio, P., & Martinez, G. R. (2006). Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29(3), 563–568.
- Roux, a. H., Douhéret, G., & Roux-Desgranges, G. (2005). Molar volumes and isentropic compressions of pluronics L64 and P123 in aqueous surfactant solutions, over the critical temperature range of aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 252(1), 43–50.
- Rudys, R., Kirdaitė, G., Bagdonas, S., Leonavičienė, L., Bradūnaitė, R., Streckytė, G., & Rotomskis, R. (2013). Spectroscopic assessment of endogenous porphyrins in a rheumatoid arthritis rabbit model after the application of ALA and ALA-Me. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 119, 15–21.
- Saez, A., Guzmán, M., Molpeceres, J., & Aberturas, M. (2000). Freeze-drying of polycaprolactone and poly(d,l-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle

- size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(3), 379–387.
- Sanabria, L. M., Rodríguez, M. E., Cogno, I. S., Belén, N., Vittar, R., Pansa, M. F., ... Rivarola, V. A. (2013). Biochimica et Biophysica Acta Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *BBA - Reviews on Cancer*, 1835(1), 36–45.
- Sarpietro, M. G., Pitarresi, G., Ottimo, S., Giuffrida, M. C., Ognibene, M. C., Fiorica, C., ... Castelli, F. (2011). Interaction between drug loaded polyaspartamide-poly lactide-polysorbate based micelles and cell membrane models: a calorimetric study. *Molecular Pharmaceutics*, 8(3), 642–50.
- Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. de L., & Pohlmann, A. R. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26(5), 726–737.
- Sena, M. M., Collins, C. H., Collins, K. E., & Scarminio, I. S. (2001). Aplicação de métodos quimiométricos na especificação de Cr(VI) em solução aquosa. *Quim. Nova*, 24(3), 331–338.
- Senge, M. O., & Radomski, M. W. (2013). Platelets, photosensitizers, and PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(1), 1–16.
- Sharma, P. K., & Bhatia, S. R. (2004). Effect of anti-inflammatories on Pluronic® F127: micellar assembly, gelation and partitioning. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(2), 361–377.
- Shi, N.-Q., Lei, Y.-S., Song, L.-M., Yao, J., Zhang, X.-B., & Wang, X.-L. (2013). Impact of amorphous and semicrystalline polymers on the dissolution and crystallization inhibition of pioglitazone solid dispersions. *Powder Technology*, 247, 211–221.
- Shin, H.-C., Alani, A. W. G., Rao, D. a, Rockich, N. C., & Kwon, G. S. (2009). Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 140(3), 294–300.
- Shiraishi, Y., Inoue, T., & Hirai, T. (2010). Local viscosity analysis of triblock copolymer micelle with cyanine dyes as a fluorescent probe. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 26(22), 17505–12.
- Shojaei, Z. A., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2007). Estimation of the oil water partition coefficient, experimental and theoretical approaches related to volatile behaviour in milk. *Food Chemistry*, 103(3), 689–694.
- Silva, C., Paula, D., Cláudio, A., Lucas, F., Mário, J., Vilela, C., ... Mosqueira, F. (2013). Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as

- photosensitisers : Photophysical and physicochemical characterisation , release and phototoxicity in vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3), 371–381.
- Simplicio, F., Maionchi, F., & Hioka, N. (2002). Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, 25(5), 801–807.
- Singh, I., Ogata, R. T., Moore, R. E., Chang, C. W. J., & Scheuer, P. J. (1968). Electronic spectra of substituted naphthoquinones. *Tetrahedron*, 24(18), 6053–6073.
- Singh, K., Dharaiya, N., Marangoni, D. G., & Bahadur, P. (2013). Dissimilar effects of solubilized p-toluidine on the shape of micelles of differently charged surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 521–529.
- Sinha, S., Ali, M., Baboota, S., Ahuja, A., Kumar, A., & Ali, J. (2010). Solid dispersion as an approach for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drug ritonavir. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 518–27.
- Smith, D. A., Charlotte, A., Kubinyi, H., Waterbeemd, H., Walker Don. K., Mannhold, R., & Gerd, F. (2012). *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design* (p. 268). Wiley-VCH; 3 edition.
- Song, L., Shen, Y., Hou, J., Lei, L., Guo, S., & Qian, C. (2011). Polymeric micelles for parenteral delivery of curcumin: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 390(1-3), 25–32.
- Su, Y., Wang, J., & Liu, H. (2002). FTIR Spectroscopic Investigation of Effects of Temperature and Concentration on PEO–PPO–PEO Block Copolymer Properties in Aqueous Solutions. *Macromolecules*, 35(16), 6426–6431.
- Tallarida, R. J. (1992). Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain*, 49(1), 93–7.
- Tallarida, R. J. (2001). Drug synergism: its detection and applications. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 865–72.
- Tang, P. M.-K., Zhang, D.-M., Xuan, N.-H. B., Tsui, S. K.-W., Waye, M. M.-Y., Kong, S.-K., ... Fung, K.-P. (2009). Photodynamic therapy inhibits P-glycoprotein mediated multidrug resistance via JNK activation in human hepatocellular carcinoma using the photosensitizer pheophorbide a. *Molecular Cancer*, 8, 56.
- Tardivo, J., & Giglio, A. Del. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodynamic Therapy*, 2(3), 175-191.

- Torchilin, V. P. (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), 137–172.
- Trubetskoy, V. (1999). Polymeric micelles as carriers of diagnostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 37(1-3), 81–88.
- Ulatowska-Jarza, A., Zychowicz, J., Hołowacz, I., Bauer, J., Razik, J., Wieliczko, A., ... Bindig, U. (2006). Antimicrobial PDT with chlorophyll-derived photosensitizer and semiconductor laser. *Medical Laser Application*, 21(3), 177–183.
- Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence Principles and Applications* (Vol. 8, 383).
- Van Nostrum, C. F. (2004). Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(1), 9–16.
- Vasconcelos, A. L. De, Feitosa, E. A., Maria, M., Xavier, H. S., & Randau, P. (2011). Controle de qualidade físico-químico e legalidade de matéria- prima vegetal e produto acabado contendo ipê-roxo ( *Tabebuia* sp . ). *Rev. Bras. Farm*, 92(3), 155–159.
- Vilsinski, B. H. (2013). Estudos das Propriedades Físico-Químicas e Fotodinâmicas da Ftalocianina de Alumínio cloro (AlPcCl) em Sistemas Homogêneos e Encapsulada em Copolímeros Micelares Plurônicos® P-123 E F-127. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Maringá.
- Wainwright, M. (2003). Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application. *Dyes and Pigments*, 57(3), 245–257.
- Wakisaka, A., Komatsu, S., & Usui, Y. (2001). Solute-solvent and solvent-solvent interactions evaluated through clusters isolated from solutions: Preferential solvation in water-alcohol mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 90(1-3), 175–184.
- Wakisaka, A., Matsuura, K., Uranaga, M., Sekimoto, T., & Takahashi, M. (2011). Azeotropy of alcohol–water mixtures from the viewpoint of cluster-level structures. *Journal of Molecular Liquids*, 160(2), 103–108.
- Wang, W. (2000). Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International journal of pharmaceutics* (Vol. 203, p. 1–60).
- Wang, Y., Wang, B., Qiao, W., & Yin, T. (2010). A novel controlled release drug delivery system for multiple drugs based on electrospun nanofibers containing nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(12), 4805–11.
- Wanka, G., Hoffmann, H., & Ulbricht, W. (1994). Phase diagrams and aggregation behavior of poly (oxyethylene)-poly (oxypropylene)-poly (oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules*, 4145–4159.

- Wei, H., Cheng, S.-X., Zhang, X.-Z., & Zhuo, R.-X. (2009). Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers. *Progress in Polymer Science*, 34(9), 893–910.
- Yang, B., Guo, C., Chen, S., Ma, J., Wang, J., Liang, X., Liu, H. (2006). Effect of acid on the aggregation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 110(46), 23068–74.
- Yoon, I., Li, J. Z., & Shim, Y. K. (2013). Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*, 46(1), 7–23.
- Zeiger, T. &. (2004). *Fisiologia Vegetal* (3 Edição., p. 693). Porto Alegre : Artmed.
- Zhang, X., Jackson, J. K., & Burt, H. M. (1996a). Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *International Journal of Pharmaceutics*, 132(1-2), 195–206.
- Zhao, Y.-Z., Sun, C.-Z., Lu, C.-T., Dai, D.-D., Lv, H.-F., Wu, Y., ... Li, X.-K. (2011). Characterization and anti-tumor activity of chemical conjugation of doxorubicin in polymeric micelles (DOX-P) in vitro. *Cancer Letters*, 311, 187–194.