



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

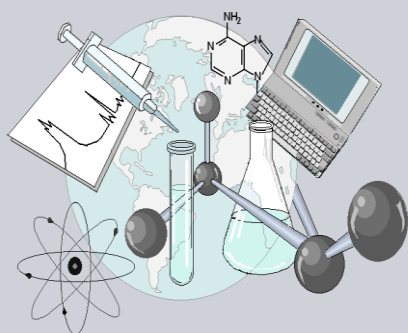
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudos das propriedades físico-químicas da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC visando aplicações em Terapia Fotodinâmica.”

CCE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, MARÇO/2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

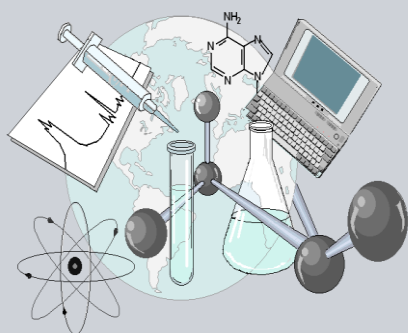
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudos das propriedades físico-químicas da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC visando aplicações em Terapia Fotodinâmica.”

Dissertação apresentada por **Flávia Amanda Pedroso de Moraes** 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

CEE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, MARÇO/2016

*“Quando seu coração está pleno de gratidão,
qualquer porta aparentemente fechada pode ser uma
abertura para uma bênção maior”.*

Osho

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD).....	1
1.2 Processos Foto Físicos e o Oxigênio Singlete.....	3
1.3 Fotossensibilizador (FS).....	6
1.4 Hipericina.....	8
1.5 Sistemas Carreadores de Fármacos.....	11
1.6 Lipossomos como Carreadores.....	12
2. Objetivos.....	15
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1 Materiais.....	15
3.2 Metodologia.....	16
3.2.1 Preparo das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	16
3.2.2 Encapsulamento da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC: Caracterização espectroscópica dos formulados.....	17
3.2.3 Estudos de interação Hip-bicamada lipídica de DPPC.....	18
3.2.3a Avaliação do perfil cinético de incorporação da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	18
3.2.3b Determinação da constante de ligação (K_b) da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC em diferentes temperaturas.....	18
3.2.3c Determinação da eficiência de encapsulamento ($E\%$) da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	19
3.2.4 Estudos de Localização da Hipericina em DPPC.....	20
3.2.4a Determinação da constante de Stern-Volmer (K_{sv}): Estudos de supressão de fluorescência.....	20

3.2.4b Estudos de Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET)	21
3.2.5 Estudos Foto físicos e Foto químicos do formulado Hip/DPPC....	23
3.2.5a. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	23
3.2.5b. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta^1O_2}$) da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC	24
3.2.5c. Estudo da estabilidade térmica do formulado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	25
3.2.5d. Estudo da estabilidade temporal do formulado hidratado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	25
3.2.5e. Estudo da estabilidade temporal do formulado liofilizado/reidratado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	26
3.2.6. Avaliação da atividade fotodinâmica do formulado contendo Hipericina encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	26
3.2.6a Ensaio com células B16-F10.....	26
3.2.6b Ensaio com <i>T. Cruzi</i>	28
4. Resultados.....	29
4.1. Estudos de interação Hip-bicamada lipídica de DPPC.....	29
4.1a Avaliação do perfil cinético de incorporação da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	29

4.1b. Caracterização dos formulados contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	36
4.1c. Determinação da constante de ligação (K_b) da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC em diferentes temperaturas.....	38
4.1d. Determinação da Eficiência do Encapsulamento ($EE\%$) da Hipericina em vesículas lipossomais de DPPC.....	48
4.2. Estudos de Localização da Hip em DPPC.....	50
4.2a. Determinação da constante de Stern-Volmer (K_{sv}): Estudos de supressão de fluorescência.....	50
4.2b. Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET).....	54
4.3. Estudos Fotofísicos e Fotoquímicos do formulado Hip/DPPC.....	59
4.3a. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais de DPPC a 30,0°C.....	59
4.3b. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta^1O_2}$) da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	62
4.3c. Estudo da influência da temperatura na organização estrutural da Hipericina encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC: Estabilidade Térmica.....	64
4.3d. Estudo da estabilidade temporal do formulado hidratado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	71
4.3e. Estudo da estabilidade temporal do formulado liofilizado/reidratado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	73

4.4. Avaliação da atividade fotodinâmica do formulado contendo Hipericina encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC.....	75
4.4a Ensaios com células melanoma B16-F10.....	75
4.4b Ensaios com <i>T. Cruzi</i>	78
5. Conclusão.....	81
6. Referências.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Medicamentos e estruturas químicas dos princípios ativos dos fármacos: A) <i>Visudyne</i> . B) <i>Photofrin</i>	2
Figura 2. Diagrama de Jablonski extraído de Sotomayor <i>et al.</i> , 2008.....	4
Figura 3. Exemplos de aplicação/ação fotodinâmica em pacientes lesionados. Em (A-D) tratamento de lesão bucal; e de (E-H) tratamento de onicomicose.....	5
Figura 4. Estrutura química das classes de corantes; A) Porfirinas, B) Clorinas, C) Ftalocianinas e D) Xantenos.....	7
Figura 5. Estruturas químicas da A) Hipericina e do B) Emodina.....	9
Figura 6. Espectros de absorção eletrônica e emissão ($\lambda_{exc}=525$ nm) de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em etanol.....	10
Figura 7. Figura ilustrativa da A) Membrana celular (Modelo Mosaico Fluído). B) Vesícula lipossomal. C) Estrutura química do DPPC.....	13
Figura 8. Ilustração esquemática da alteração na ordenação/movimentação dos fosfolipídios ao atingirem a Transição de Fase, passando da fase “gel” para a “cristal-liquido” ou fluída.....	14
Figura 9. Extrusor Avanti Polar Lipidics, Inc. utilizado no processo de extrusão para uniformização das vesículas lipossomais de DPPC sobre a plataforma aquecida	17
Figura 10. Ilustração do cultivo das tripomastigotas em células LLCMK2(Célula hospedeira), embebido meio de cultura DMEM.....	28
Figura 11. Cinética de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹) a 30,0°C. Em A)	

Espectros de emissão de fluorescência com o decorrer do tempo ($\lambda_{exc}=525\text{nm}$, fenda 10-5). Em B) Perfil cinético de ligação.....	30
Figura 12. A) Espectros de absorção eletrônica UV-Vis e B) Perfil cinético da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) a $30,0^\circ\text{C}$	32
Figura 13. Diâmetro médio das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) monitoradas via DLS, antes e após encapsulamento da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) a $30,0^\circ\text{C}$	34
Figura 14. (A) Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc}=525\text{nm}$, fenda 5-5), (B) Inseto absorção eletrônica UV-Vis e (C) Espalhamento de luz dinâmico da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), a $30,0^\circ\text{C}$	36
Figura 15. Espectros de absorção eletrônica e emissão de fluorescência normalizados da Hip em DPPC e etanol, respectivamente.....	37
Figura 16. Espectros de emissão de fluorescência e ajustes das isotermas de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em A) $20,0^\circ\text{C}$ B) $25,0^\circ\text{C}$ C) $30,0^\circ\text{C}$ ($\lambda_{exc}=525\text{nm}$, fendas 10-10 para todas temperaturas).....	39
Figura 17. Espectros de emissão de fluorescência e ajustes das isotermas de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em D) $35,0^\circ\text{C}$ E) $40,0^\circ\text{C}$ F) $45,0^\circ\text{C}$ ($\lambda_{exc}=525\text{nm}$, fendas 10-10 para todas temperaturas).....	40
Figura 18. Espectros de emissão de fluorescência e ajustes das isotermas de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em G) $50,0^\circ\text{C}$, ($\lambda_{exc}=525\text{nm}$, fenda 10-5).....	41
Figura 19. Ajustes das isotermas de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pela Equação do Duplo Recíproco a $25,0^\circ\text{C}$; $30,0^\circ\text{C}$; $40,0^\circ\text{C}$ e $45,0^\circ\text{C}$	44
Figura 20. Gráficos de $\ln K_b(\text{Hip}/\text{DPPC})$ vs $1/T$ para o processo de ligação da Hip ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC	

($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em A) Comportamento para todas temperaturas avaliadas. Em B) Em temperaturas abaixo da transição de fase do DPPC.....46

Figura 21. Gráficos de $\ln K_b(\text{Hip}/\text{DPPC})$ vs $1/T$ para o processo de ligação da Hip ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em temperaturas acima da transição de fase do DPPC ($40,0 \rightarrow 50,0^\circ\text{C}$).....47

Figura 22. Espectros de Absorção eletrônica UV-Vis de Hip em etanol, obtido pela destruição das vesículas de DPPC. Em A) Referente ao encapsulamento a $30,0^\circ\text{C}$ e B) a $50,0^\circ\text{C}$ 49

Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Variação espectral da Hip por emissão de fluorescência com I⁻ A) a $30,0^\circ\text{C}$, ($\lambda_{exc} = 525\text{nm}$, fenda 20-5) e em B) a $50,0^\circ\text{C}$, ($\lambda_{exc} = 525\text{nm}$ e fenda 10-5). A Direção das setas indicam a supressão de fluorescência da Hip com I⁻.....51

Figura 24. Determinação da Constante de Stern Volmer através da Equação 7, a $30,0^\circ\text{C}$52

Figura 25. Espectros de emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de supressor (1 mol L^{-1}) em função da temperatura.....53

Figura 26. Ilustração esquemática da disposição teórica das moléculas de DPH alocadas nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, ampliado.....55

Figura 27. Sobreposição espectral entre absorção Hip e emissão DPH normalizados pela área para o cálculo de J56

Figura 28. Espectros de emissão de fluorescência do DPH ($4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e da Hip ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, fendas 2-2,5 e 1,5-10 a $30,0$ e $50,0^\circ\text{C}$, respectivamente) em DPPC ($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), $\lambda_{exc}=335 \text{ nm}$ 57

- Figura 29.** Variação espectral da emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em DPPC ($5,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) com adição total de 1,5 mL de água destilada ao sistema, a 30,0°C.....60
- Figura 30.** Espectros de emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e etanol a 30,0°C, antes e após a elevação da temperatura do sistema para 50,0°C e posterior retorno ($\lambda_{exc} = 525$ nm e fenda 5-5).....61
- Figura 31.** Decaimento exponencial da fosforescência do oxigênio singlete em 1270nm da Hip encapsulada em P-123 e em DPPC.....63
- Figura 32.** Variação espectral da intensidade de emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) encapsulada em DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), com o aumento da temperatura de 27,0°C para 50,0°C ($\lambda_{exc} = 545$ nm e fenda 2,5-10)..... 65
- Figura 33.** Espalhamentos de Luz Ressonante (RLS) das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC contendo Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e livres de fármaco, a 30,0°C (fendas 1,5-1,5).....67
- Figura 34.** Espalhamentos de Luz Dinâmico: A) Antes e B) Após o encapsulamento da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em função da temperatura. As setas indicam a tendência do diâmetro e o surgimento das populações/perfis bimodais com o aumento da temperatura.....68
- Figura 35.** Monitoramento do diâmetro médio das vesículas unilamelares de DPPC contendo Hip encapsulada e livres dela após a estabilidade térmica.....71
- Figura 36.** Em A) perfil de DLS e inserto emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) ($\lambda_{exc} = 525$ nm, fenda 10-10), e em B) perfil de DLS das vesículas lipossomais unilamelares DPPC, ambos com o passar dos dias.....72
- Figura 37.** Perfil do formulado reidratado de Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) encapsulada nas vesículas lipossomais de DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹): Em A)

DLS no decorrer dos dias e em B) Emissão de fluorescência, ($\lambda_{exc}= 525\text{nm}$, fenda 10-10).....74

Figura 38. Viabilidade celular das células melanoma B16-F10 após 3 horas de incubação. Em A) Na presença da Hip em DMSO no escuro e com 40 min de iluminação. Em B) Na presença da formulação contendo Hip encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, no escuro e após 40 min de iluminação (Potência da fonte de LED de $3,5\text{mW cm}^2$).....76

Figura 39. Imagens de microscopia óptica de células aderentes, por exemplo a LLCMK2, antes e após sua infecção com *T. cruzi*.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de K_b da Hip em DPPC em diferentes temperaturas.....	42
Tabela 2. Valores de K_b obtidos pelo ajuste das isothermas pela Equação 14.....	44
Tabela 3. Valores de ΔG calculados via Equação 2.....	45
Tabela 4. Valores $\Phi_{\Delta^1O_2}$ e τ da Hipericina ($\lambda_{exc} = 600nm$) encapsulada em P-123 e em DPPC.....	63
Tabela 5. Valores de diâmetro médio, D10% e D50% das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC livres de fármaco, em função da temperatura. Os valores de PI foram inferiores a 0,3 para todas as análises.....	69
Tabela 6. Valores de diâmetro médio, D10% e D50% das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC contendo Hip, em função da temperatura. Os valores de PI foram inferiores a 0,3 em todas as análises.....	69
Tabela 7. Determinação da atividade fotodinâmica do formulado Hip/DPPC sobre a viabilidade de tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> , com tempo de iluminação de 20 min.....	80

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

TFD- Terapia Fotodinâmica

FS- Fotossensibilizador

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio Singlete

FDA/EUA- Food and Drug Administration- Estados Unidos

FS*- Fotossensibilizador Excitado

CIS- Conversão Intersistema

$^3\text{FS}^*$ - Estado Triplete Excitado

$^3\text{O}_2$ - Oxigênio Molecular

EROS- Espécies Reativas de Oxigênio

O_2^- - Ânion superóxido

OH- Hidroxil

H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio

Hip- Hipericina

HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana

S_0 - Estado Fundamental

S_1 - Primeiro Estado Excitado Singlete

S_2 - Segundo Estado Excitado Singlete

$\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ - Rendimento Quântico de Oxigênio Singlete

pKa- Constante de Dissociação Ácida

DPPE- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina

UV-Vis- Ultravioleta Visível

RLS- Espalhamento de Luz Ressonante

DLS- Espalhamento de Luz Dinâmico

P.A.- Grau de Pureza Analítico

K_b - Constante de Ligação

ΔG - Energia Livre de Gibbs

$EE\%$ - Eficiência de Encapsulamento

K_{sv} - Constante de Supressão de Stern-Volmer

KI- Iodeto de Potássio

FRET- Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência

DPH- Difenilhexatrieno

Φ_F - Rendimento Quântico de Fluorescência

P-123- (Óxido Etileno)₂₀(Óxido Propileno)₇₀(Óxido Etileno)₂₀

B16-F10- Linhagem de Células Melanoma de Camundongo (ATCC CRL-6475)

PBS- Tampão Fosfato Salino

LLCMK₂- Célula Epitelial de Rim de *Macaca mulata*

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®

SFB- Soro Fetal Bovino

LDL- Lipoproteínas de Baixa Densidade

HSA- Soro Albumina Humana

CTABr- Brometo de Cetiltrimetilamônio

NLS- Nanopartículas Lipídicas Sólidas

CMC- Concentração Micelar Crítica

ΔH° - Entalpia

ΔS° - Entropia

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade clínica baseada na interação de um composto Fotossensibilizador (FS) com luz, de comprimento de onda adequado, em presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), gerando espécies radicalares (EROS) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), responsáveis pela necrose e/ou apoptose celular, via transferência de energia. Esse tipo de tratamento vem sendo amplamente estudado devido à sua imensa gama de aplicação, que vai desde sistemas mais simples, como fungos e bactérias, até sistemas mais complexos, como os tumores malignos. A Hipericina (Hip) vem atraindo atenção como composto FS promissor para TFD, dado sua origem natural ou sintética, baixo fotobranqueamento e toxicidade. Sua elevada hidrofobicidade, torna necessário para aplicação *in vivo*, o uso de sistemas biotransportadores nanoestruturados os quais promovem uma maior solubilização e adicionalmente previnem a formação de espécies agregadas, inibitórias do processo fotossensibilização. Neste trabalho vesículas lipossomais unilamelares de DPPC foram utilizadas como sistemas carreadores de Hip, encapsulada via adição direta. Estudos envolvendo tamanho das partículas, revelaram um aumento do diâmetro médio das vesículas lipossomais com o processo de encapsulamento. A interação Hip/DPPC, mostrou-se maior com o aumento da temperatura (maiores valores de K_b), e possibilitou a determinação dos demais parâmetros de ativação do sistema (ΔG , ΔH° e ΔS°), que revelaram que além de espontâneo o processo de ligação Hip/DPPC é também endotérmico ($\Delta H^\circ > 0$). A Eficiência de Encapsulamento ($EE\%$) da formulação foi avaliada por meio da destruição das vesículas lipossomais com solvente orgânico, onde a Absortividade Molar (ϵ) da Hip é conhecida, revelando uma $EE\%$ cerca de 17% maior a $50,0^\circ\text{C}$ (74,3% e 89,3% a $30,0$ e $50,0^\circ\text{C}$, respectivamente). Nos estudos de localização, não foi possível obter um valor de K_{sv} para temperaturas mais elevadas utilizando um supressor aquosolúvel, indicando uma maior penetração da Hip na bicamada lipídica, enquanto que a $30,0^\circ\text{C}$ o valor de K_{sv} indicou a presença de duas populações acessíveis ao iodeto. Essa mudança de localização do FS com a temperatura foi confirmada com os estudos de Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência (FRET), que indicaram distâncias de 29,7 e $36,7\text{\AA}$ com relação ao DPH a $30,0$ e $50,0^\circ\text{C}$, respectivamente. Como esperada, a incorporação da Hip nas vesículas lipossomais à $50,0^\circ\text{C}$, provocou um leve aumento no valor de Φ_F para 0,30, que teve por consequência uma proporcional diminuição no $\Phi^1\text{O}_2$ para 0,26, apresentando porém um significativo aumento no tempo de vida do oxigênio singlete (τ),

essencial ao tratamento com TFD. Adicionalmente, a formulação apresentou grande estabilidade térmica e temporal quando hidratada. No entanto, quando liofilizada/reidratada, houve destruição da estrutura/tamanho original das vesículas lipossomais. Os estudos atividade fotodinâmica foram realizados em células do tipo B16-F10 e em protozoários *T. cruzi*. Os resultados tornaram evidente a potencialidade da formulação desenvolvida, que apresentou valores de viabilidade celular e IC₅₀ mesmo com baixas concentrações de fármaco (entre 3 a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) bastante satisfatórios, apontando a Hip como uma forte candidata a FS para tratamentos com TFD.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a clinical modality based on the interaction of a photosensitizer compound (PS) with light of appropriate wavelength in the presence of molecular oxygen ($^3\text{O}_2$), generating radical species (ROS) and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) responsible for necrosis and/or apoptosis, through energy transfer. This type of treatment has been widely studied due to its vast range of application, ranging from simpler systems, like fungi and bacteria, to more complex systems as malignant tumors. Hypericine (Hyp) has been attracting attention as a promising compound for PS in PDT, given its natural or synthetic origin, low photobleaching and low toxicity. Its high hydrophobicity, required for *in vivo* application, the use of biocarriers nanostructured systems which promote a greater solubilization and further prevent the formation of aggregated species, that inhibit the photosensitization process. In this work, unilamellar liposomal vesicles of DPPC were used as carrier systems of Hip encapsulated through direct addition. Studies involving particle size, showed an increase in diameter of the liposome vesicles after the encapsulation process. The Hyp/DPPC interaction was higher with temperature increasing (higher K_b values) and allowed the determination of other system activation parameters (ΔG , ΔH° and ΔS°), which showed the spontaneity of the binding Hip / DPPC and also that process is endothermic ($\Delta H^\circ > 0$). The encapsulation efficiency ($EE\%$) of the formulation has been evaluated through the destruction of the liposome vesicles with an organic solvent, where the molar absorptivity (ϵ) of the Hyp is known, revealing an $EE\%$ about 17% higher at 50,0 °C (74,3% and 89,3% to 30,0 and 50,0 °C, respectively). In localization studies, it was not possible to obtain a K_{SV} value in higher temperatures using a aquosolúvel quencher, indicating a higher penetration of the Hyp in the lipid bilayer, whereas the 30,0°C the K_{SV} value indicated the presence of two accessible populations to iodo. The changing in the PS location with temperature was confirmed with the Transfer Resonant Energy Fluorescence (FRET) studies, which indicated distances of 29,7 and 36,7Å regarding the DPH at 30,0 and 50,0°C respectively. As expected, the incorporation of Hyp in the liposomal vesicles at 50,0°C, caused a slight increase in Φ_F value to 0,30, which has resulted in a commensurate reduction in $\Phi_{\Delta^1\text{O}_2}$ to 0,26, but showing a significant increase in lifetime of singlet oxygen (τ), that is essential for treatment with PDT. Additionally, the formulation showed a high thermal stability and temporal when hydrated. However, after the freeze-drieyer/rehydrated, there destruction of the original structure/size of liposomal vesicles. The photodynamic activity

studies were conducted on B16-F10 cells and protozoa *Trypanosoma cruzi*. The results become evident the formulation ability, which showed cell viability values and IC₅₀ even with low drug concentrations (3 to 5 mmol L⁻¹) quite satisfactory, indicating the Hyp as a strong candidate PS for treatments using PDT .

1. Introdução

1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

Desde o Egito Antigo, civilizações indianas e chinesas utilizavam luz no tratamento de doenças como psoríase, raquitismo, vitiligo e câncer de pele, por meio da ingestão de plantas com posterior exposição ao sol¹. Entretanto, esta técnica começou a ser usada de forma sistemática científica apenas no final do século XIX, na Dinamarca, quando pesquisadores observaram que a combinação de luz com certos compostos induziam a morte celular^{1,2}.

Em 1900, o estudante de medicina alemão, Oscar Raab, relatou que certos comprimentos de onda eram letais para infusoria (protozoários ciliados, flagelados e com tentáculos), quando em presença de alaranjado de acridina (AL)^{3,4}. Neste mesmo ano J. Prime, neurologista Francês, notou que pacientes com epilepsia, quando tratados com eosina (EOS), desenvolviam dermatite nas áreas expostas ao sol. Essa descoberta levou H. Tappeiner e A. Jesionek tratarem tumores cutâneos com EOS e luz branca, os quais descreveram o fenômeno como “ação fotodinâmica”⁵.

Nesse contexto, experimentos realizados para testar combinações de compostos em presença de luz levaram ao surgimento da Terapia Fotodinâmica (TFD), que tem por base a combinação de três elementos fundamentais: o Fotossensibilizador (FS), Luz e Oxigênio Singlete ($^1\text{O}_2$). Compostos fotossensibilizadores, em geral, são estruturas macrocíclicas, que quando em presença de luz, de comprimento de onda correspondente com o de sua absorção (geralmente entre 600-800nm), interagem com o oxigênio molecular para gerar oxigênio singlete, espécie responsável pela morte celular⁶.

Os fármacos aplicáveis em TFD, preferencialmente, devem ser compostos puros (e não misturas complexas), o que por consequência facilita sua aprovação clínica pelas autoridades de saúde. Atualmente, existem diversos fármacos aceitos para uso em TFD em países como Canadá, Alemanha, Japão, França e Brasil, dentre eles podem ser citados o *Photofrin*, aprovado pela FDA/EUA (Food and Drug Administration- Estados Unidos) em 22 de dezembro de 1998, e o *Visudyne*, desenvolvido pela empresa QLT Inc. em associação com a University of British Columbia, sob supervisão do Professor Dr. D. Dolphin, para tratamento de degeneração macular da retina (Figura 1)^{3,7}.

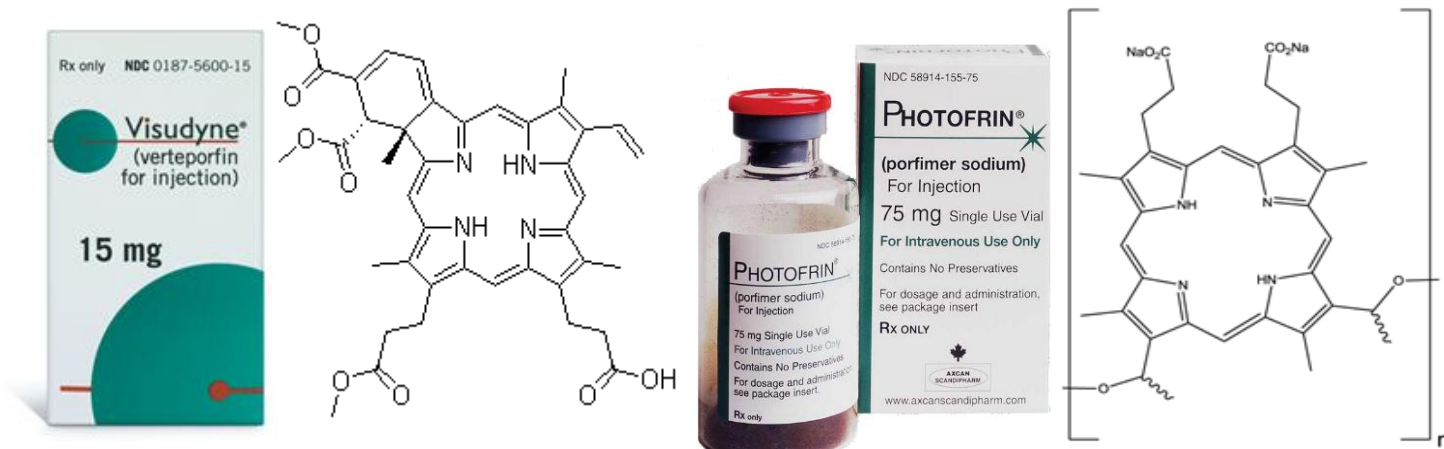


Figura 1. Medicamentos e estruturas químicas dos princípios ativos dos fármacos: A) *Visudyne*. B) *Photofrin*.

A TFD vem sendo amplamente explorada como modalidade clínica devido a sua imensa gama de aplicação, mostrando-se eficaz em tratamentos de fungos, bactérias, protozoários, vírus, dermatites e células tumorais^{8,9,10}. Além disso, o procedimento empregue no tratamento com TFD é bastante seguro, não invasivo e seletivo, sendo que esta seletividade pode ser melhorada com o aumento da concentração do FS no tecido alvo (desde que mantenha-se a forma monomérica) e limitando a irradiação a uma área

específica, ou ainda incorporando-se os FS em sistemas biotransportadores de fármacos, tais quais lipossomos, micelas poliméricas, anticorpos, nanopartículas de ouro, dentre outros, que além de permitir uma maior solubilização do fármaco, garante também um maior tempo de circulação do mesmo no organismo e em alguns casos, aumentam a especificidade na entrega do FS no local desejado^{1,3,5}.

1.2. Processos Foto Físicos e o Oxigênio Singlete

Conforme exemplificado pelo Diagrama de Jablonski (Figura 2), a interação do FS com a luz é considerada como base para a TFD, pois a partir desta o FS é promovido para o primeiro estado eletrônico singlete excitado (FS*). No estado excitado, apesar de ser um processo proibido por *spin*, o FS pode, em alguns casos, sofrer conversão intersistemas (CIS) e atingir o estado tripleto excitado (³FS*), onde é capaz de foto-oxidar substratos biológicos através da geração *in situ* de espécies citotóxicas, levando os tecidos biológicos à necrose e/ou apoptose^{2,8}.

Dessa forma, a presença do oxigênio molecular (³O₂) é imprescindível para que ocorra o efeito fotodinâmico, haja vista que este apresenta multiplicidade semelhantemente ao FS ao sofrer um decaimento por CIS (³FS, tripleto), sendo portanto, possível a transferência de energia entre ambos. Nesse sentido, dois tipos de mecanismos de destruição fotoinduzida podem ser observados: *Tipo I*; onde o FS foto excitado pode reagir com moléculas vizinhas produzindo espécies reativas de oxigênio (EROS), tais quais o ânion superóxido (O₂^{·-}), radical hidroxil (OH[·]) *via* reação de Fenton, e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e *Tipo II*; no qual ocorre a formação de oxigênio singlete (¹O₂)^{2,7,8,9}.

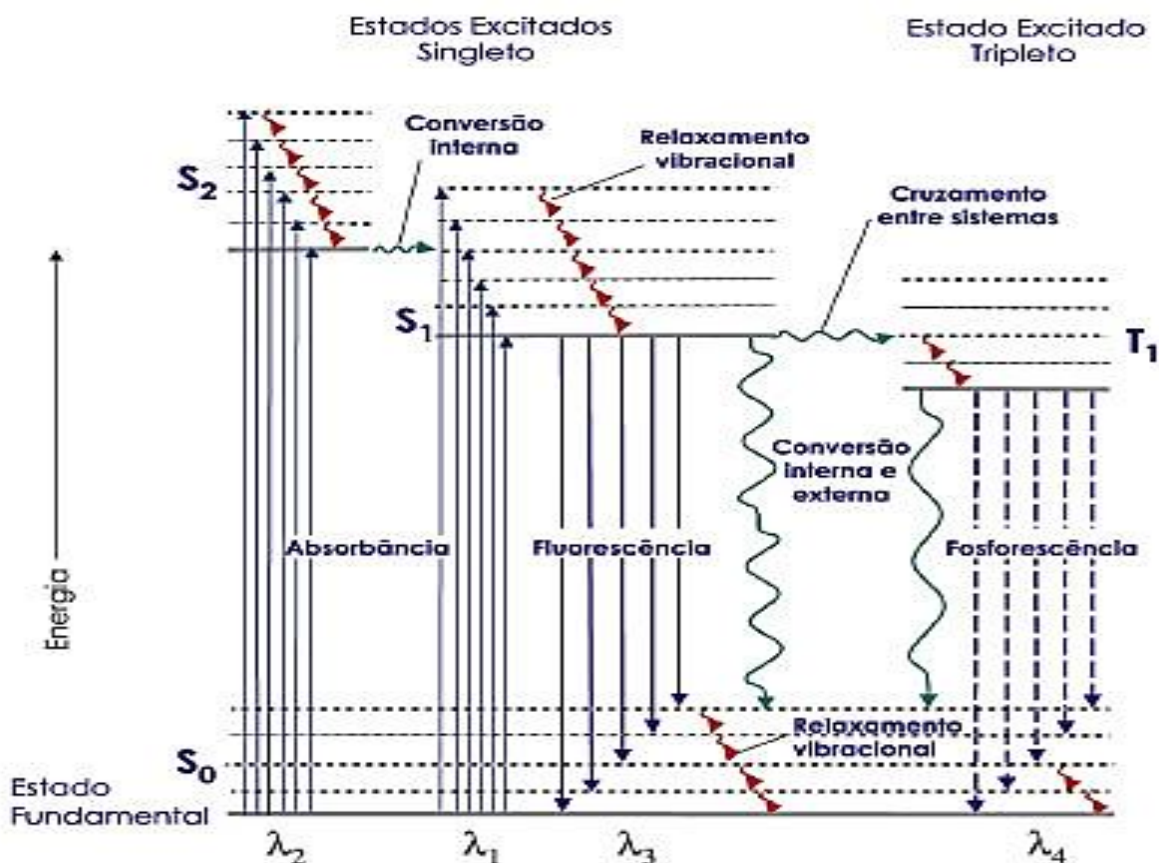


Figura 2. Diagrama de Jablonski extraído de Sotomayor *et al.*, 2008.

A preferência por um mecanismo de ação (*Tipo I ou II*), depende principalmente das características e propriedades físico-químicas do FS em solução, porém segundo a literatura, o principal mecanismo de ação passa pela geração do oxigênio singlete (*Tipo II*)^{8,10}.

Em geral, os alvos atacados no tratamento com TFD são organelas ou sítios de suma importância para a vida/reprodução celular, como mitocôndrias, lisossomos ou até mesmo membrana plasmática^{6,9,10}. Dessa forma, após a ação fotodinâmica, a região fotolisada fica necrosada, dado que a morte do tecido decorre, principalmente, pelo

comprometimento do sistema vascular (sistema de irrigação, responsável pela entrega de nutrientes para o mesmo), esse efeito acaba sendo propagado pelas regiões adjacentes ao tumor (Figura 3)^{9,11}.



Figura 3. Exemplos de aplicação/ação fotodinâmica em pacientes lesionados. Em (A-D) tratamento de lesão bucal; e de (E-H) tratamento de onicomicose.

Conhecidamente, o $^1\text{O}_2$ pode atuar em diversas reações com substratos biológicos, em especial com sítios de elevada densidade eletrônica, levando à interrupção de diversos processos. Embora seja rapidamente difundido através das membranas, o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é bastante baixo (13-35 μs em membranas lipídicas, dependendo do tipo de lipídio)¹. De acordo com a Equação de Difusão de Einstein-Smoluchovsky e usando o coeficiente de difusão do $^1\text{O}_2$ ($4,7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), a difusão do oxigênio singlete por um caminho calculado dentro de 1 μs é de aproximadamente 100 nm (~20 vezes a espessura de uma bicamada lipídica). Porém quando em meio aquoso, para esse mesmo percurso, este tempo cai para

aproximadamente $4 \mu\text{s}^{1,11}$. Por esse motivo, um dos primeiros testes que devem ser efetuados no desenvolvimento de novos fármacos aplicáveis à TFD, é a investigação da habilidade do composto FS em gerar $^1\text{O}_2$.

1.3. Fotossensibilizador (FS)

Atualmente, diversas classes de corantes fotossensíveis vem sendo estudados e testados para possíveis aplicações futuras em TFD, dentre elas podemos destacar as porfirinas, clorinas, ftalocianinas e xantenos, cujas estruturas encontram-se ilustradas na Figura 4.

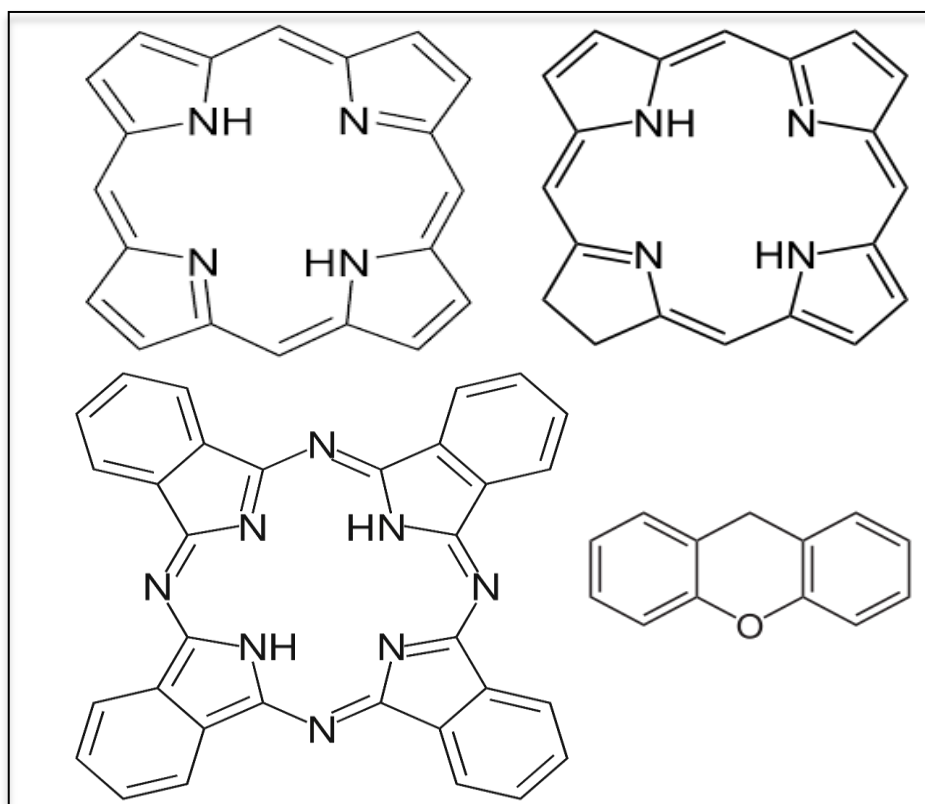


Figura 4. Estrutura química das classes de corantes; A) Porfirinas, B) Clorinas, C) Ftalocianinas e D) Xantenos.

No entanto, no que concerne à aplicação, um composto FS deve apresentar algumas características específicas, como ser quimicamente puro e de composição conhecida, ser citotóxico somente em presença de luz, ter mínima toxicidade no escuro, ser seletivo ao tecido doente, ser facilmente excretado, gerar oxigênio singlete e absorver luz, preferencialmente, entre 600 e 800 nm (Janela Terapêutica), dado que o grau de penetração da luz no tecido é maior nesta faixa de absorção⁸.

Compostos FS que absorvem em regiões de comprimento de onda menores (~400 nm, por exemplo), dificilmente são empregues em tratamentos internalizados, dado que a baixa penetração e grande espalhamento da luz comprometem a eficiência e seletividade da técnica, por outro lado, podem ser amplamente utilizados em tratamentos superficiais e/ou cutâneos.^{2,8}

Além disso, como o FS deve preferencialmente acumular-se nos tecidos lesados, é interessante que ele apresente certa afinidade com as lipoproteínas constituintes do plasma sanguíneo, que o transportará até as células tumorais¹¹. No entanto, um composto FS pode apresentar caráter hidrofílico, anfifílico ou lipofílico, sendo que a lipoflicidade tem por vantagem aumentar a interação com as membranas celulares, bem como facilitar sua incorporação por elas. Consequentemente, uma molécula de hidrofobicidade acentuada, tende a auto agregar-se, quando em meio aquoso, sendo que este processo além de prejudicar a solubilidade do fármaco, diminui seu tempo de vida no estado triplete excitado, comprometendo a geração de oxigênio singlete^{6,8,11,12}.

1.4. Hipericina

A Hipericina (Hip) ou 1,3,4,6,8,13-hexahidroxi-10,11-dimetilfenantro(1,10,9,8-opqra)perilen-7,14-diona (Figura 5A), é um composto de origem natural que pode ser obtido por meio de extração em plantas do gênero *Hypericum perforatum*, ou através de rota sintética, tendo como precursor a emodina (Figura 5B)¹². Estudos relatam o uso da Hip em tratamentos de transtorno depressivo, dor abdominal, infecção bacteriana, dor de cabeça, melhora no processo de cicatrização, além de um efeito fotodinâmico recém descoberto contra *squamous cell carcinoma (SCC)*, *glioma line A172* e retro vírus, ao qual pertence o vírus da imunodeficiência humana *VIH*^{13,14,15,16,17,18,19}.

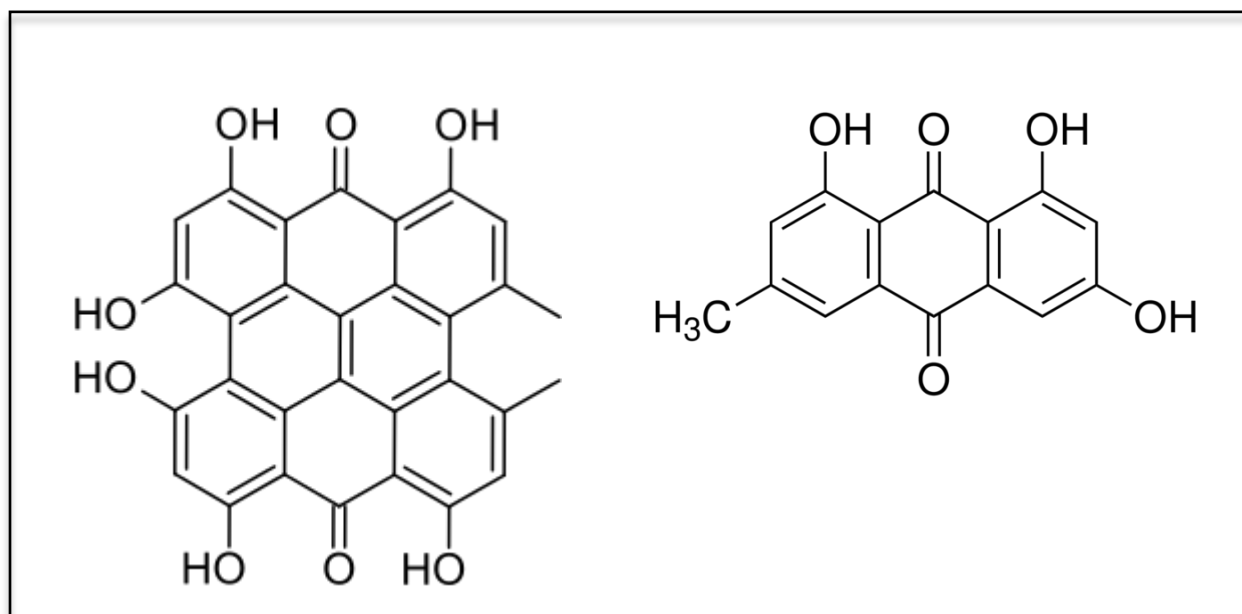


Figura 5. Estruturas químicas da A) Hipericina e da B) Emodina.

Em seu espectro de absorção eletrônica em etanol (Figura 6), onde conhecidamente a Hip encontra-se monomerizada, é notada a presença de diversas bandas de absorção e vibrônicas, sendo o domínio compreendido de 490 a 600 nm (absorção eletrônica UV-Vis)

atribuído à absorção para o estado eletrônico S_1 (Primeiro Singlete Excitado), relativo à transição $S_0 \rightarrow S_1$, enquanto que entre 400 a 490 nm (absorção eletrônica UV-Vis), tem-se uma absorção para o estado S_2 (emissão $S_2 \rightarrow S_0$)^{20,21,22}.

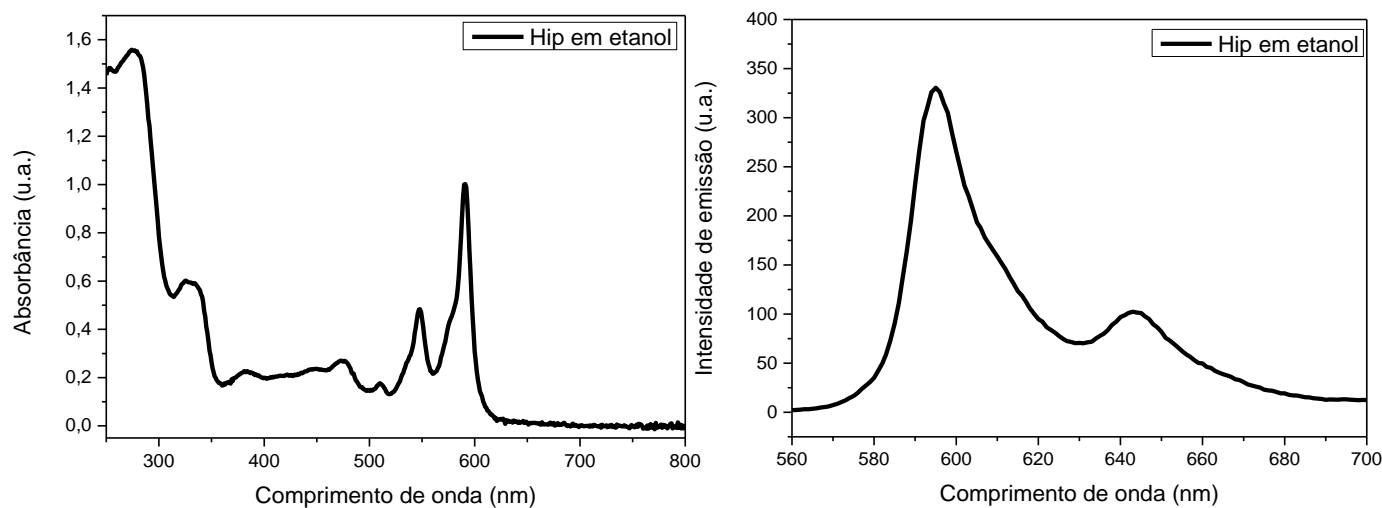


Figura 6. Espectros de absorção eletrônica e emissão ($\lambda_{exc}=525\text{nm}$, para $Abs_{596\text{nm}}=0,1$) de fluorescência da Hip $2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol.

Em fototerapia, a aplicação da Hip possui diversas vantagens sobre os FS habituais, devido ao seu substancial rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2=0,32$ (etanol)), intensa e ampla região espectral de absorção na região visível ($\lambda_{m\acute{a}x}=589 \text{ nm}$), pKa de 1,5 em condições fisiológicas (prevalecendo sua forma monoaniônica e dispensando o uso de soluções tampões), baixo grau de fotobranqueamento e baixa toxicidade, que são características fundamentais para aplicações biológicas e clínicas em TFD. Além disso, a Hip já vem sendo aplicada como medicamento ativo no tratamento de outras enfermidades, o que facilita sua aceitação pelos órgãos de saúde, somado ao fato de já ser empregada em Teranóstica (combinação de diagnóstico e tratamento), devido sua emissão de fluorescência e afinidade por células tumorais^{18,19,20,21,22}. No entanto, é conhecido que a Hip possui um caráter hidrofóbico acentuado, o que em um primeiro

momento inviabiliza a sua aplicação biomédica^{22,23,24,25}. Neste caso, torna-se necessária sua incorporação em sistemas carreadores de fármacos que, além de promover uma solubilização efetiva em fluídos biológicos, aumentam o tempo de circulação do mesmo no sistema e protegem as substâncias encapsuladas da degradação e de outros danos relacionados ao metabolismo, possibilitando também um maior acúmulo do fármaco nas células de interesse^{2,8,26}.

1.5 Sistemas Carreadores de Fármacos

Na tentativa de estabilizar compostos hidrofóbicos, bem como conduzi-los para região de interesse para aplicação biomédica, diversos tipos de sistemas carreadores de fármacos vem sendo desenvolvidos, estudados e testados. Dentre eles podem ser citados as micelas poliméricas, os nanotubos de carbono, a sílica mesoporosa, as vesículas lipossomais dentre outros^{1,4,10,26,27}. Todos esses sistemas carreadores apresentam como característica comum, a vantagem de proteger a substância encapsulada da degradação e eliminação pelo organismo, além de aumentar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos que quando encapsulados, tendem atingir sua forma monomérica, ideal para aplicação em TFD^{23,24,26}.

Além disso, dado que o principal sítio de ação fotodinâmica são as membranas celulares, é de grande importância que o sistema carreador seja similar ou que apresente certa interação com a mesma. Dado que a membrana celular é um sistema bastante complexo, composto por uma bicamada lipídica, constituída por diversos tipos de fosfolipídios, colesterol, glicolipídios e proteínas, há uma dificuldade em se encontrar um

sistema modelo que adequadamente mimetize o ambiente celular. Diante disso, os lipossomos têm se mostrado como os sistemas carreadores mais promissores para uma mimetização da membrana celular, dado a sua estrutura em bicamada e núcleo aquoso, o que remete ao Modelo Mosaico Fluído ilustrado na Figura 7A²⁶.

1.6 Lipossomos como carreadores

Os fosfolipídios além de ser constituintes básicos dos sistemas celulares de todos os tecidos, órgãos e articulações do organismo, são também a principal fonte de lubrificação, necessária para o desempenho de funções vitais e por diminuir o atrito entre as superfícies de cartilagem banhadas de fluído sinovial. Encontram-se em concentrações relativamente elevadas no organismo (0,1-0,2 mg mL⁻¹), formando sobre as superfícies de cartilagem estruturas em multicamadas fechadas, também conhecidas como vesículas lipossomais (Figura 7B)^{27,29,30}.

Atualmente, existem diversas técnicas disponíveis para obtenção de vesículas lipossomais de diferentes tamanhos e lamelas, dentre elas podemos destacar o Método de Bangham, Método de injeção de solvente orgânico, Método da roto-evaporação (filme fino) e a Separação supercrítica da fase inversa^{28,29,31,32,33}. A elevada similaridade com a membrana celular (Figura 7A e 7B) permite que as vesículas lipossomais incorporem em suas membranas substâncias hidrosolúveis (no seu interior), lipofílicas e anfifílicas, sendo a primeira diretamente relacionada com o volume do poço aquoso (tamanho da vesícula lipossomal)^{30,31,32}. Dentre os fosfolipídios saturados encontrados no organismo humano, o DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina) (Figura 7C) é o mais abundante deles

(50%) e, portanto, uma escolha promissora e de possível aceitação, haja vista que a entrega do fármaco poderá ser realizada não somente através do rompimento de suas vesículas, como também por meio de endocitose, fusão, adsorção e difusão (*flip-flop*) com a membrana biológica, sem promover danos ao organismo do paciente^{33,34,35}.

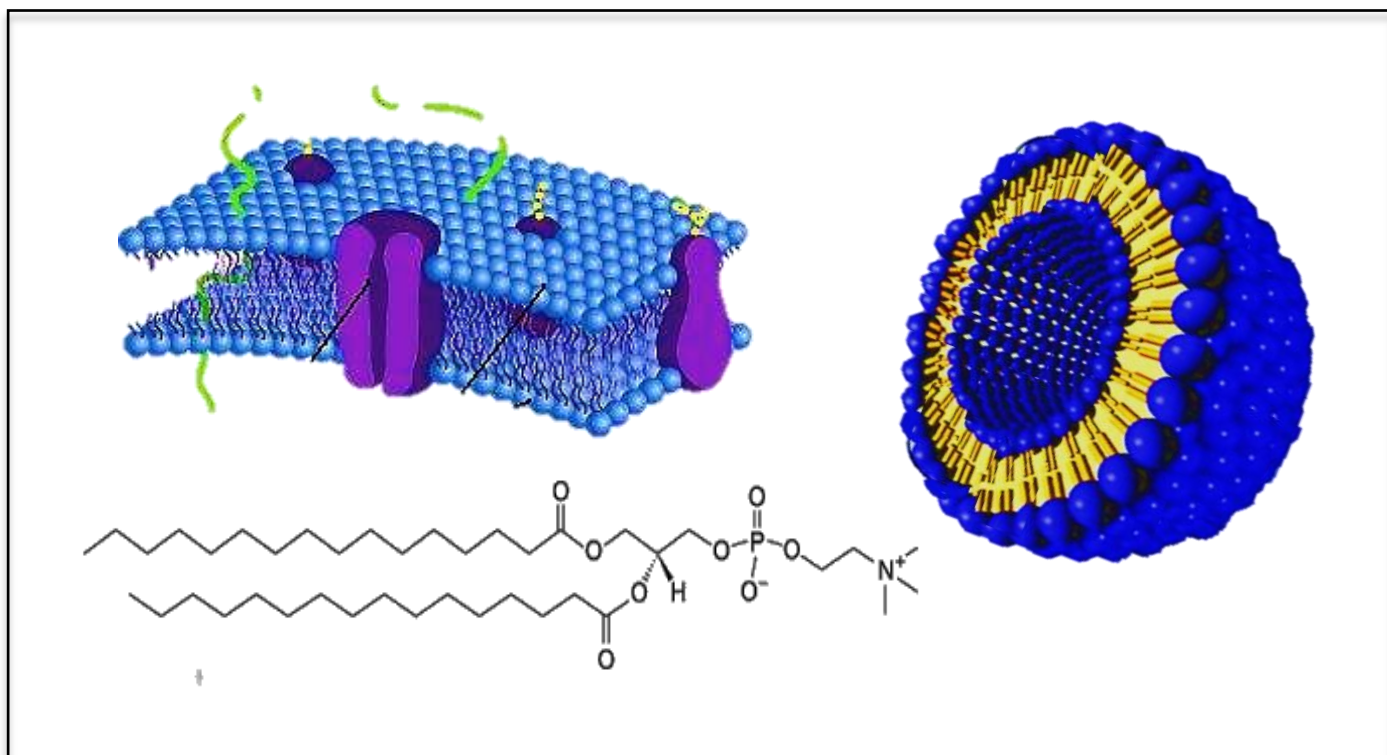


Figura 7. Figura ilustrativa da A) Membrana celular (Modelo Mosaico Fluído). B) Vesícula lipossomal. C) Estrutura química do DPPC.

As características dos lipossomos dependem de muitos fatores, sendo as mais importantes delas, o tipo de fosfolipídio (saturado/insaturado, com/sem carga) e a temperatura. A dependência com a temperatura se dá pela presença da Temperatura de Transição de Fase, que altera a ordenação e movimentação dos fosfolipídios que constituem as vesículas. Para o DPPC, por exemplo, na fase fluída ($>41,3^{\circ}\text{C}$) as cadeias de

fosfolipídios encontram-se mais desordenadas (transição trans-gauche) e suas propriedades são um pouco diferentes daquelas observadas na fase gel (Figura 8)^{34, 35,36}. Em S. Tristran-Nagle *et al.*, 2004 e Min Wang *et al.*, 2015, por exemplo, foi verificado que o aumento da temperatura da bicamada lipídica de DPPC resulta em uma menor rigidez e maior capacidade de movimentação dos fosfolipídios no estado líquido, em comparação com o estado de gel^{34,35,36}.

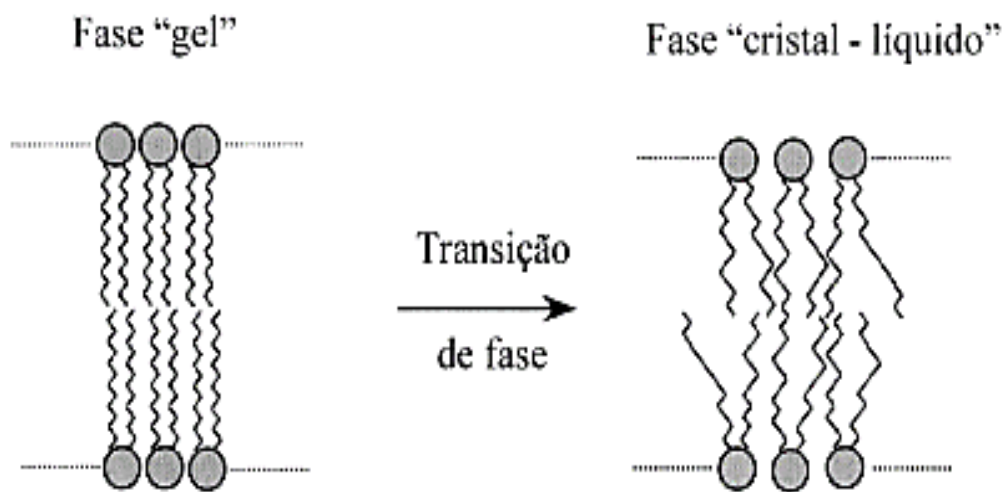


Figura 8. Ilustração esquemática da alteração na ordenação/movimentação dos fosfolipídios ao atingirem a Transição de Fase, passando da fase “gel” para a “cristal-liquido” ou fluída.

Mesmo com relativa ausência de estabilidade, os lipossomos apresentam diversas vantagens sobre os outros sistemas carreadores nanoestruturados, além da sua já mencionada similaridade com a membrana celular, são também biodegradáveis, não tóxicos e não imunogênicos e, por esse motivo, amplamente estudados e aplicados como biotransportadores de fármacos^{29,30,31,33}.

2. Objetivos

Estudar as propriedades físico-químicas e fotodinâmicas da Hip (ligação, solubilidade, organização estrutural, localização, estabilidades temporal e térmica, rendimentos quânticos de fluorescência e oxigênio singlete) com as vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, através da caracterização do formulado Hip/DPPC por técnicas ópticas (absorção eletrônica UV-Vis, emissão de fluorescência, espalhamento de luz ressonante (RLS) e espalhamento de luz dinâmico (DLS)), bem como verificar sua aplicabilidade, afim de desenvolver uma formulação estável e favorável para aplicações em TFD no estudo fotodinâmico da viabilidade de células de melanoma e de protozoários.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

A Hipericina ou 1,3,4,6,8,13-hexahidroxi-10,11-dimetilfenantro(1,10,9,8-opqra)perilen-7,14-diona (Hip) ($504,44 \text{ g mol}^{-1}$) foi sintetizada em nosso laboratório seguindo procedimentos descritos na literatura por Falk & Schoppel *et al.*, 1991, Kubin & Grünberger *et al.*, 2005 e Mazur & Lavie *et al.*, 1989^{12,36,38}. O fosfolípídeo zwitteriônico DPPC ou L- α - 1,2-Dipalmitoil-sn-3-Glicero-Fosfatidilcolina ($734,09 \text{ g mol}^{-1}$) utilizado no preparo das vesículas unilamelares e multilamelares, foi obtido comercialmente da Avanti Polar Lipidis Co. (Alabama, USA).

Os estudos espectroscópicos foram realizados através de um Espectrofotômetro DU-800, acoplado ao sistema controlador de temperatura do tipo Peltier da Beckman (absorção eletrônica UV-Vis), em um Espectrofluorímetro Cary-Eclipse com sistema Peltier para

controle da temperatura (emissão estática de fluorescência e espalhamento de luz ressonante (RLS)) e em um Nanoplus zeta/nano Particle Analyzer para medidas de espalhamento de luz dinâmico (medidas de DLS). Os solventes e demais reagentes empregues foram de grau analítico (P.A.) e utilizados sem purificação prévia.

3.2 Metodologia

3.2.1 Preparo das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

Para a obtenção das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC utilizou-se o método do filme fino descrito em Roslaniec *et al.*, 2000^{38,39}. Esta metodologia consiste na solubilização dos fosfolipídios ($5,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) em clorofórmio. Posteriormente, o solvente orgânico é removido por meio de evaporação rotativa em fluxo de nitrogênio (gás), formando-se um filme lipídico fino nas paredes do balão. Este filme é deixado em dessecador à pressão reduzida, durante de 24 horas, para remoção do solvente remanescente. Após este período, o filme é hidratado com água destilada por uma hora, com sonicação a 50,0°C (acima da temperatura de transição de fase do DPPC, 41,3°C). Afim de se reduzir e uniformizar o tamanho das vesículas lipossomais, a amostra é passada cerca de 20 vezes, por um extrusor (Avanti Polar Lipidics, Inc.) contendo filtros e membranas de policarbonato com poros de tamanho controlado de 100,0 nm (Figura 9). Em seguida, as vesículas lipossomais têm seu diâmetro médio avaliado via DLS.



Figura 9. Extrusor Avanti Polar Lipidics, Inc. utilizado no processo de extrusão para uniformização das vesículas lipossomais de DPPC sobre a plataforma aquecida.

3.2.2. Encapsulamento da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC: Caracterização espectroscópicas dos formulados

Após o preparo das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, uma alíquota (μL) de uma solução estoque de Hip ($7,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em etanol é adicionada à uma cubeta contendo 2 mL de vesículas em água destilada, sendo o sistema deixado em repouso a $30,0^\circ\text{C}$ por aproximadamente 1 hora (encapsulamento). A caracterização do sistema via absorção eletrônica UV-Vis, emissão de fluorescência, espalhamento de luz ressonante (RLS) e dinâmico (DLS) é realizada após esse período.

3.2.3. Estudos de interação Hip-bicamada lipídica de DPPC

3.2.3a Avaliação do perfil cinético de incorporação da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

Paralelamente à incorporação da Hip (item 3.2.2), investigou-se o perfil cinético de incorporação do FS ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), via espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc}=525\text{nm}$) e absorção eletrônica, bem como as alterações estruturais dos lipossomos na presença de Hip por espalhamento de luz dinâmica (DLS). Os experimentos foram realizados a 30,0°C.

3.2.3b Determinação da constante de ligação (K_b) da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC em diferentes temperaturas

Uma solução aquosa (2 mL) de Hip ($1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foi titulada com alíquotas (μL) de uma solução estoque contendo vesículas unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), a 25,0; 30,0 ;35,0 ;40,0 ;45,0 e 50,0°C. Os espectros de emissão de fluorescência foram monitorados após cada adição de DPPC, e corrigidos em função das diluições. Os valores das intensidades de emissão de fluorescência, em ($\lambda_{exc}=525\text{nm}$; $\lambda_{em}=601\text{nm}$) *versus* a concentração de DPPC, forneceram as isotermas de ligação do sistema, as quais foram ajustadas utilizando a Equação 1, extraindo-se os valores de K_b ⁴⁰.

$$F = F_f + \frac{(F_o - F_f)}{1/K_b [S] - cmc^N + 1} \quad (1)$$

Onde F corresponde a intensidade de emissão de fluorescência; F_f é a emissão do FS ligado ao DPPC; F_o a emissão do FS na ausência de vesículas; K_b é a constante de ligação; $[S]$ a concentração de DPPC, e N o número vesículas por molécula de FS.

Adicionalmente, a variação da Energia Livre de Gibbs (ΔG) do sistema foi determinada a partir dos valores de K_b e utilizando-se a Equação 2 ⁴¹.

$$\Delta G = -RT \ln K_b \quad (2)$$

Onde ΔG é referente a energia livre de Gibbs, R é a constante dos gases (8,314 J $K^{-1} mol^{-1}$), T é a temperatura (K) e K_b é a constante de ligação obtida via Equação 1.

3.2.3c. Determinação da eficiência de encapsulamento ($EE\%$) da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

A determinação da eficiência do encapsulamento ($EE\%$) da Hip ($2,8 \times 10^{-6} mol L^{-1}$) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,3 \times 10^{-3} mol L^{-1}$), foi avaliada a 30,0 e a 50,0°C (abaixo e acima da temperatura de transição de fase do fosfolipídio) através da destruição/ruptura das mesmas com um solvente orgânico (etanol), onde a Absortividade Molar (ϵ) da Hip é conhecida ($\epsilon_{etanol(591nm)} = 41500 L mol^{-1} cm^{-1}$)^{22,42}. Para isso, uma

alíquota de vesículas lipossomais contendo Hip encapsulada, foi adicionada à uma solução contendo etanol, sendo a amostra agitada e, posteriormente deixada em repouso. Após esse período, espectros de absorção eletrônica foram coletados e concentração de moléculas de FS determinada utilizando-se a Lei de Lambert-Beer⁴⁴.

$$Abs = b.c.\mathcal{E} \quad (3)$$

Onde, *Abs* é a absorbância, *b* é o caminho óptico (cm) e *c* a concentração do FS (mol L⁻¹). Em posse dos valores de concentrações, determinou-se a eficiência (*EE%*) por meio da Equação 4.

$$EE \% = \frac{Hip(encap)}{Hip(total)} \times 100 \quad (4)$$

Sendo *Hip(encap)* e *Hip(total)* referentes à concentração de Hip encapsulada em DPPC e à concentração total adicionada para realização do experimento, respectivamente.

3.2.4. Estudos de Localização da Hip em DPPC

3.2.4a. Determinação da constante de Stern-Volmer (K_{sv}): Estudos de supressão de fluorescência

A provável localização relativa do FS nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, foi estimada por meio de estudos de supressão de fluorescência, utilizando iodeto (I⁻

) como supressor aquosolúvel. Para isso, alíquotas de KI (1 mol L^{-1}) foram tituladas em uma solução contendo Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), encapsulada em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). O perfil espectral de emissão foi monitorado após cada adição de iodeto realizada. A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) foi obtida através da Equação 5, a $30,0^\circ\text{C}$ e $50,0^\circ\text{C}$ ⁴⁴.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [I^-] \quad (5)$$

Onde F_0 e F representam os valores de emissão de fluorescências na ausência e presença do supressor, respectivamente, e $[I^-]$ é a concentração de iodeto na solução.

3.2.4b. Estudos de Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET)

Uma solução contendo DPH ($4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) encapsulado previamente em DPPC ($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) conforme descrito em 3.2.2, foi titulada com alíquotas concentradas de Hip ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), coletando-se os espectros de emissão de fluorescência após cada adição de FS à solução.

A taxa de transferência de energia, entre o doador (DPH) e o aceptor (Hip), ocorre em função da distância entre eles e pode ser calculada pela Equação 6.

$$K_T = \frac{1}{\tau_d (R_0/R)^6} \quad (6)$$

Onde τ_d é o tempo de vida do doador encapsulado no estado excitado, na ausência do aceptor; R é a distância entre o par doador-aceptor (DPH-Hip); R_0 é a distância entre o par doador-aceptor, onde a eficiência da transferência de energia é 50% (distância de Förster). A distância de Förster pode ser determinada pela Equação 7.

$$R_0 = 8.8 \times 10^{-5} k^2 n^{-4} \Phi_F J \quad \text{em cm} \quad (7)$$

Onde k^2 é um fator que descreve a orientação relativa no espaço dos dipolos de transição do doador e aceptor; n é o índice de refração do meio; Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência do doador no sistema carreador, na ausência do aceptor; e J é a integral de sobreposição entre os espectros de emissão do doador e de absorção do aceptor, expresso pela Equação 8:

$$J = \int_0^{\infty} F_d(\lambda) \epsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (8)$$

Em que F_d é a intensidade de fluorescência do doador no comprimento de onda λ até $\lambda + \Delta\lambda$, com a intensidade total normalizada para a unidade; e ϵ_a é a absorvidade molar do aceptor na ausência de doador ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Em posse dos valores de F_d , e utilizando a Equação 6, determinou-se a eficiência de transferência de energia (E), que é proporcional à integral de sobreposição e à distância entre o par doador-aceptor.

$$E = 1 - (F_{da}/F_d) = 1 - (\tau_{da}/\tau_d) \quad (9)$$

Onde F_{da} e F_d correspondem à intensidade de fluorescência estática do doador na presença e ausência do acceptor, respectivamente; e τ_{da} e τ_d correspondem ao tempo de vida de fluorescência do doador na presença e ausência do acceptor, respectivamente. O experimento foi realizado a 30,0 e a 50,0°C⁴⁴.

3.2.5. Estudos Fotofísicos e Fotoquímicos do formulado Hip/DPPC

3.2.5a. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), foi obtido utilizando-se a Equação 10, utilizando-se Hip em etanol como padrão ($\Phi_F = 0,27$), a 30,0°C⁴².

$$\Phi_F = \frac{Abs_P F_C n_P^2}{Abs_C F_P n_C^2} \Phi_P \quad (10)$$

Onde p é referente ao padrão; c ao corante encapsulado; n é o índice de refração da solução; Abs é a intensidade de absorção no comprimento de onda de excitação; e F a área do espectro de emissão do composto.

3.2.5b. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1O_2$) da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

A determinação do $\Phi_{\Delta}^1O_2$ da Hip encapsulada em DPPC foi realizada utilizando a medida do decaimento da fosforescência do oxigênio no infravermelho próximo a 1270 nm. Para isso, a amostra foi excitada no comprimento de onda de 355 nm com Laser de Bombeamento (Nd:YAG) pulsado a 10 Hz, com pulsos de 5 ns. A radiação emitida pelo 1O_2 em 1270 nm foi detectada em ângulo reto por uma fotomultiplicadora (Hamamatsu R5509) resfriada em nitrogênio líquido ($-80^{\circ}C$).

Os valores de absorbâncias no comprimento de onda de excitação da amostra e do padrão (Hip em D_2O e Hip em P-123, respectivamente) foram registradas em um espectrofotômetro (Cary 50, Varian). O valor do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1O_2$) da Hip em DPPC foi calculado pela Equação 11^{19,45}:

$$\Phi_{\Delta} = \frac{Abs_P I_{Hip} \tau_P}{Abs_{Hip} I_P \tau_{Hip}} \Phi_P \quad (11)$$

Onde, P é o padrão; Hip a Hipericina em DPPC; I é a intensidade de fosforescência de 1O_2 em 1270 nm; Abs é a absorbância no $\lambda_{exc}=532$ nm; τ é o tempo de vida do oxigênio

singlete; e Φ_P é o rendimento quântico de oxigênio singlete do padrão ($\text{Hip}_{\text{P-123}} \Phi_{\Delta} = 0,38$)^{46,47}.

Os estudos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Maurício S. Baptista, no Laboratório de Processos Induzidos e Interfaces, no Instituto de Química da USP/SP.

3.2.5c. Estudo da estabilidade térmica do formulado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

O formulado contendo Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) encapsulada em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), foi submetido ao aumento gradativo de temperatura, partindo-se da solução a $25,0^\circ\text{C}$ (abaixo da transição de fase do DPPC) até atingir $50,0^\circ\text{C}$ (acima da transição de fase do fosfolípido), com posterior retorno à temperatura inicial.

A solução teve seu comportamento monitorado via espectros de emissão de fluorescência, espalhamento de luz ressonante (RLS) e espalhamento de luz dinâmico (DLS). As medidas foram realizadas após a obtenção do equilíbrio térmico.

3.2.5d. Estudo da estabilidade temporal do formulado hidratado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

O formulado hidratado (2 mL) contendo Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) encapsulada em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), teve suas propriedades espectroscópicas monitoradas por meio de

espectros de emissão de fluorescência e espalhamento de luz dinâmica (DLS), imediatamente após o seu preparo e por um período de dez dias.

3.2.5e. Estudo da estabilidade temporal do formulado liofilizado/reidratado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

Paralelamente ao item 3.2.5d, diversas amostras contendo Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) encapsulada em DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foram preparadas e posteriormente liofilizadas. Após 5, 10, 15, 20, 30 e 60 dias, as amostras foram reidratadas com água destilada (temperatura ambiente) e sonicação (~ 5 min). O monitoramento das propriedades espectroscópicas da solução foi realizado imediatamente após sua hidratação.

3.2.6. Avaliação da atividade fotodinâmica do formulado contendo Hipericina encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

3.2.6a Ensaio com células B16-F10

A linhagem celular empregue nos ensaios de atividade fotodinâmica da Hip encapsulada em DPPC, foi a de células de melanoma de camundongo B16-F10 (ATCC CRL-6475). Estas células foram cultivadas com meio Dulbecco modificado por Iscove (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (INVITROGEN), acrescido de penicilina 10 000 U.I. mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹. As células foram mantidas em incubadora a 37,0 °C, com 95,0 % de ar e 5,0 % de CO₂ (gás)⁴⁸.

Para os ensaios citotóxicos, as células (1×10^5 células mL^{-1}) foram acondicionadas em microplacas de 96 poços, em meio de cultura e incubadas a $37,0\text{ }^\circ\text{C}$ e $5,0\%$ de CO_2 (gás) por 24 hr. Após este período removeu-se o meio das placas e lavou-se as células com tampão PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com diferentes faixas de concentração de Hip por 3 hr (variando de 0 a $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ de Hip). Passado o período de incubação, retirou-se o meio contendo o FS, lavou-se as células com PBS, adicionou-se meio de cultura e irradiou-se as placas, com um sistema LED montado em nosso laboratório, que consistia em uma placa de aço contendo fitas de LED de $3,5\ \text{mW/m}^2$ do tipo branco, dispostas a cobrirem toda a superfície da placa de cultura (96 poços). Os tempos de iluminação foram de 20 e 40 min⁴⁸.

Paralelamente, afim de verificar a citotoxicidade da Hip no escuro, experimentos controle foram realizados através do monitoramento de células não irradiadas contendo FS. Para avaliação da viabilidade celular, utilizou-se o método colorimétrico com 3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), descrito por Denizot *et al.*, 1986⁴⁸. Esta metodologia é baseada na redução do número de hidrogenases mitocondriais das células, onde o MTT (amarelo), é reduzido a um produto azul de formazan, que absorve em 570 nm. A absorbância é então lida em um leitor de placas VersaMAX.

Para isso, após as 3 h de incubação com o meio com MTT, o excesso foi removido e os cristais de formazan dissolvidos em $50\ \mu\text{L}$ de álcool etílico. Após diluição completa dos cristais, adicionou-se $150\ \mu\text{L}$ de PBS com álcool isopropílico na proporção 1:1. Finalmente, a leitura da absorbância em 570 nm, de cada poço da placa, foi realizada em um leitor de placas (Versamax) e o cálculo do IC_{50} realizado através do programa CalcuSyn (Chou, 1996)⁴⁹. Para assegurar a não contaminação celular, todas as manipulações foram realizadas em uma capela de fluxo laminar à temperatura ambiente (25°C).

Estes estudos foram desenvolvidos em colaboração com o Grupo de Física Aplicada em Materiais e do laboratório de nanotecnologia farmacêutica, através da Profa. Tânia Toyomi Tominaga do Depto. de Física da UNICENTRO-Guarapuava/PR e do Prof. Najeh Maissar Khalil do Depto de Ciências Farmacêuticas da UNICENTRO-Guarapuava/Pr .

3.2.6b Ensaio com *T. cruzi*

Os experimentos foram realizados com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, sendo as formas tripomastigotas obtidas do sobrenadante de cultura de células LLCMK₂ (célula epitelial de rim de *Macaca mulatta*), infectadas na razão de 10:1 (tripomastigota por célula), as quais foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®), suplementado com 2% SFB e 50 mg mL⁻¹ de gentamicina em estufa a 37,0 °C com 5% de CO₂ (Figura 10).



Figura 10. Ilustração do cultivo das tripomastigotas em células LLCMK₂ (Célula hospedeira), embebido meio de cultura DMEM.

As formas tripomastigotas (1×10^7 parasitas mL^{-1}) foram ressuspensas em meio de cultura DMEM, suplementado com 20% SFB, tanto na ausência quanto na presença de diferentes concentrações de Hip (1×10^{-5} g mL^{-1} até $0,125 \times 10^{-6}$ g mL^{-1}). Os parasitas foram incubados em estufa a $37,0$ °C, com 5% de CO_2 por 24 hr em microplacas de 96 poços⁵⁰. O EC_{50} (concentração que lisa 50% dos parasitas) foi calculado de acordo com o método Pizzi-Brener, onde 5 μL da amostra (após homogeneização) foi adicionada em lâmina coberta com lamínula (22x22 mm), onde foram contados em 50 campos, o número de parasitas móveis⁵¹. Cada experimento foi realizado em duplicata e repetido pelo menos três vezes.

Para avaliar o efeito fotodinâmico do formulado, utilizou-se um sistema de luz de laser de diodo (LASER line[®]) para iluminação do sistema durante cerca de 300 s, sendo este laser de comprimento de onda máximo de 658 nm, potência de 100 mW e dose (D) de luz emitida de 153 Ws cm^{-2} ⁵². Onde o cálculo para estimar a dose de luz emitida foi realizado através da Equação 12:

$$D = \frac{t \cdot P}{A} \quad (12)$$

Onde D é a dose de luz emitida; P é a potência do laser (100 mW); t é o tempo (300 s) e A é área do feixe do laser ($A = 0,196 \text{ cm}^2$).

Após a irradiação dos poços durante 20 min, realizou-se o tratamento com diferentes concentrações de Hip. Todos os experimentos foram também realizados na ausência de luz como seu respectivo controle.

4. Resultados

4.1. Estudos de interação Hip-bicamada lipídica de DPPC

4.1a Avaliação do perfil cinético de incorporação da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

Os estudos de caracterização físico-química de um fármaco hidrofóbico, encapsulado em um sistema biotransportador, são de suma importância quando se visa obtenção de uma formulação aquossolúvel para aplicação. Dessa forma, a Hip encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, via adição direta, teve seu perfil espectral monitorado por emissão de fluorescência e absorção eletrônica UV-Vis, enquanto que as propriedades estruturais dos lipossomos foram analisadas via espalhamento de luz ressonante (RLS) e dinâmico (DLS). Para isso, buscou-se primeiramente avaliar o perfil cinético de incorporação do FS nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, através do monitoramento do perfil espectral de emissão de fluorescência da Hip em função do tempo, uma vez que somente os monômeros de Hip que resultam da solubilização do FS na bicamada lipídica durante o processo de incorporação, apresentam fluorescência⁴². Os espectros de emissão e o perfil cinético de ligação são apresentados na Figura 11.

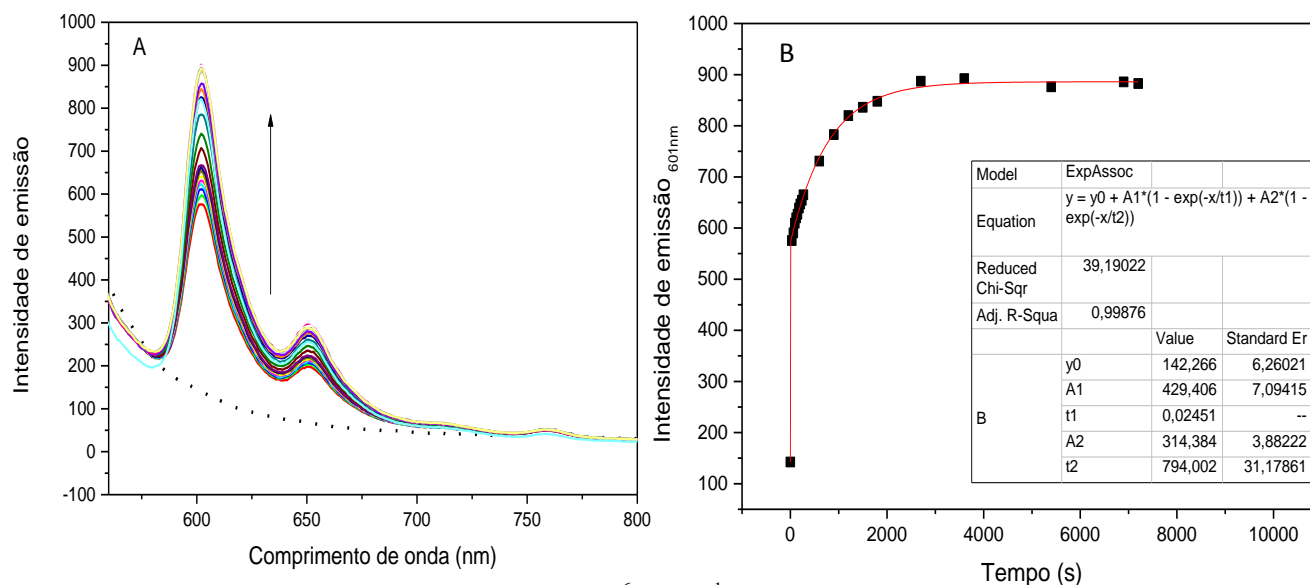


Figura 11. Cinética de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) a $30,0^\circ\text{C}$. Em A) Espectros de emissão de fluorescência com o decorrer do tempo ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, fenda 10-5). Em B) Perfil cinético de ligação.

Na Figura 11A, são apresentados os espectros de emissão de fluorescência referentes à taxa de incorporação da Hip no carreador lipossomal no decorrer do tempo, a $30,0^\circ\text{C}$. A linha preta em pontilhado, representa o perfil inicial de emissão das vesículas lipossomais livres de Hip, ou seja, o controle (t_0). Pode-se observar significativos aumentos nas intensidades de emissão no decorrer do tempo, indicando que o processo de encapsulamento apresenta uma cinética de ligação (Figura 11B), cujo perfil é descrito pela Equação 13:

$$y = y_0 + A1 * \left(1 - \exp\left(-\frac{x}{t1}\right)\right) + A2 * \left(1 - \exp\left(-\frac{x}{t2}\right)\right) \quad (13)$$

Onde $A1$ e $A2$, são fatores pré-exponenciais, t_1 e t_2 , os tempos da primeira e segunda etapa cinética, respectivamente, e x refere-se ao valor de emissão da Hip no tempo t .

Os valores de k_1 ($40,8 \text{ s}^{-1}$) e k_2 ($0,00126 \text{ s}^{-1}$), extraídos da Equação 13 fazendo ($k \approx \frac{1}{t}$), indicam que a associação da Hip com o DPPC é realizada em duas etapas distintas; *Primeira etapa*: concluída em poucos segundos ($\sim 0,02 \text{ s}$), é referente à adição e incorporação imediata do FS à solução lipossomal, especificamente resultante da associação primária da Hip, ainda que na sua forma auto agregada, com a interface membrana/meio aquoso, através da interação com o grupo cabeça polar zwitteriônica fosfatidilcolina e/ou cadeia hidrocarbônica; *Segunda etapa*: concluída em torno de ~ 14 minutos, é relativa à redistribuição das moléculas de Hip no sistema carreador (bicamada lipídica), maximizando sua monomerização. Este mesmo comportamento foi observado em L. Buriankova *et al.*, 2011, onde por meio de medidas de fluorescência resolvida no tempo e estado estacionário, o autor avaliou a taxa de incorporação da Hip em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), observando também a presença de duas etapas de incorporação do fármaco; onde a fase rápida apresenta segundos de duração ($0,1-0,2 \text{ s}$), enquanto que a fase lenta perdura por vários minutos e é responsável pela maior quantidade de moléculas de Hip incorporadas em LDL⁵³.

O mesmo procedimento foi realizado monitorando-se o perfil espectral de absorção eletrônica UV-Vis da Hip adicionada em DPPC em função do tempo. Os espectros de absorção eletrônica e o perfil cinético são mostrados na Figura 12.

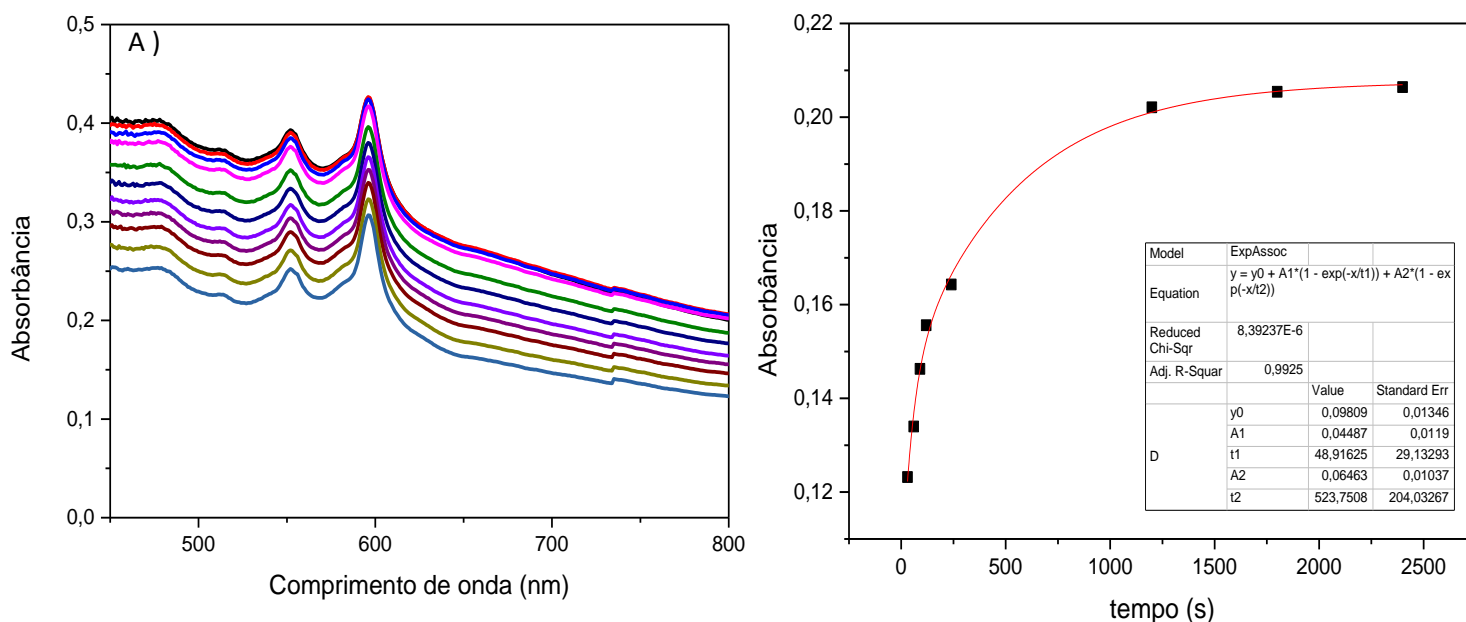


Figura 12. A) Espectros de absorção eletrônica UV-Vis e B) Perfil cinético da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) a $30,0^\circ\text{C}$.

Os espectros de absorção eletrônica (Figura 12A) apresentaram baixas intensidades e significativos desvios de linha base em todos os tempos analisados, principalmente para comprimentos de onda menores, ocasionados pelo pequeno valor de absorvidade molar da Hip ($\epsilon_{\text{etanol}} = 41500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e grande espalhamento de luz proporcionado pelas vesículas lipossomais, respectivamente⁵³. Desvios de linha base semelhantes, foram observados por Senthil *et al.*, 1992 na determinação da constante de ligação (K_b) via absorção eletrônica da Hip em HSA (soro albumina humana), TritonX-100 e CTABr, sendo estes também atribuídos, pelo autor, ao espalhamento de luz promovido pelos sistemas carreadores⁵⁴.

Uma vez que os desvios de linha base são menores para maiores comprimentos de onda (Lei de Dispersão de Rayleigh-Jeans), para a determinação da cinética de ligação via

absorção, tomou-se os pontos finais dos espectros (~ 800 nm) para obter a variação da absorção em função do tempo, e posteriormente realizou-se o tratamento cinético⁴⁴.

Observa-se que o perfil cinético obtido é o mesmo que descreve a emissão da Hip no sistema carreador com o decorrer do tempo (Figura 12B). O valor de k_1 determinado via absorção eletrônica UV-Vis ($0,020$ s⁻¹) mostrou-se extremamente menor que o determinado por emissão de fluorescência ($40,8$ s⁻¹), uma vez que a técnica de absorção pode não distinguir as espécies auto agregadas e das monomerizadas do fármaco. Por outro lado, os valores de k_2 para a segunda etapa foram bastante semelhantes ($0,0013$ s⁻¹ e $0,0019$ s⁻¹, emissão e absorção respectivamente), dado que esta refere-se à reorganização dos monômeros de Hip no sistema.

Observou-se ainda, um significativo aumento no tamanho médio das vesículas lipossomais com o processo de encapsulamento da Hip. Essa alteração no tamanho, foi comprovada monitorando-se o diâmetro médio das partículas, via DLS, antes e após o encapsulamento do fármaco a $30,0^\circ\text{C}$. O gráfico de intensidade de distribuição normalizada *versus* diâmetro médio das partículas é apresentado na Figura 13.

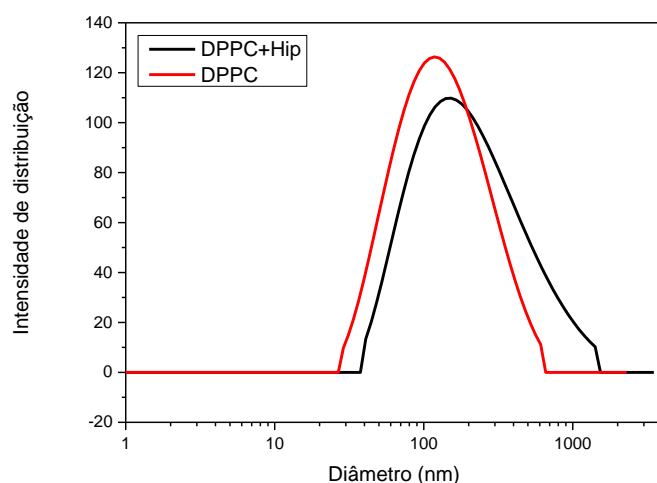


Figura 13. Diâmetro médio das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) monitoradas via DLS, antes e após encapsulamento da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) a $30,0^\circ\text{C}$.

Com o processo de extrusão as vesículas lipossomais foram uniformizadas, apresentando tamanho médio de 116,0 nm e índice de polidispersão (PI) de 0,28. Aguardado o tempo necessário para o processo de encapsulamento, observou-se um aumento no tamanho médio das partículas em solução, que chegam a atingir 174,0 nm com PI de 0,29. Essa variação no tamanho nas vesículas lipossomais, proporcionada pela entrada de Hip no sistema, foi observada em todos experimentos realizados no presente trabalho, sendo o aumento médio obtido de 50,0 nm, com desvio padrão de $\pm 10,1$ e PI sempre inferior a 0,30. Isso ocorre devido ao tamanho do FS ($\sim 12,3\text{\AA}$) com relação às cadeias de fosfolipídios de DPPC (Comprimento médio da cadeia = $\sim 21,57\text{\AA}$ e o Volume médio = $\sim 1209,0\text{\AA}^3$). Dado a grande quantidade de moléculas de Hip que podem ser encapsuladas (ainda que auto agregadas), as vesículas lipossomais são forçadas a aumentarem seu tamanho, isto é, expandir-se. Semelhantemente ao que foi observado por Lima *et al.*, 2015 em seus estudos com nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), onde estas mostraram tamanhos superiores a 150 nm após o encapsulamento da Hip neste sistema, sendo que em geral, uma NLS apresenta diâmetro médio inferior a 100 nm^{54,55}. Ou ainda, podemos citar os estudos realizados por Joakim *et al.*, 2014, onde através de cálculo teórico envolvendo a dinâmica molecular existente entre o par Hip/DPPC, o autor relata uma provável mudança no tamanho das vesículas lipossomais, especialmente para a monocamada interna, que aumenta de tamanho quando adicionado moléculas de Hip ao modelo⁵⁶. Esse aumento no tamanho das vesículas lipossomais, é por ele associada às moléculas de FS que podem penetrar no DPPC na forma auto agregada, forçando a expansão das vesículas a fim de incorporar e monomerizar as moléculas de fármaco^{56,57,58}.

Dessa forma, a técnica de absorção eletrônica UV-Vis mostrou-se ineficiente na quantificação de Hip neste sistema, uma vez que a correção da linha base com as vesículas

livres de Hip, não corresponde idealmente ao “branco” da amostra. Assim sendo, para a realização dos demais estudos de quantificação, utilizou-se somente as técnicas de emissão de fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espalhamento de luz ressonante (RLS), sempre aguardando estabilização necessária do sistema.

4.1b. Caracterização dos formulados contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

Após o encapsulamento da Hip nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, o perfil espectral do formulado foi avaliado por meio de espectros de emissão de fluorescência e espalhamento de luz dinâmico. Afim de comprovar que as moléculas de Hip encontram-se na sua forma monomérica quando encapsuladas em DPPC, monitorou-se o perfil espectral de absorção eletrônica UV-Vis do formulado. Os gráficos são apresentados na Figura 14.

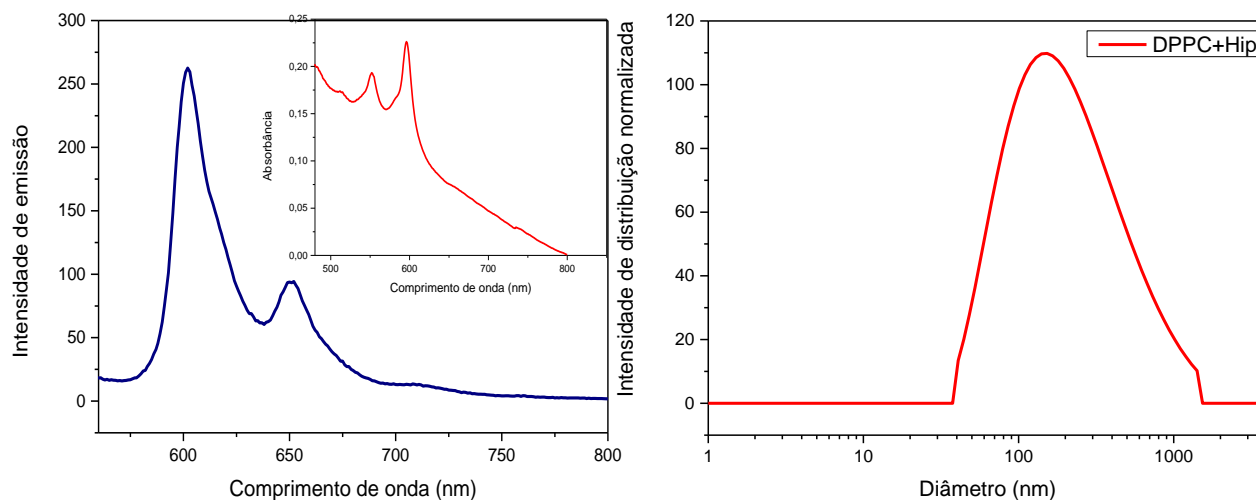


Figura 14. (A) Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc}= 525\text{nm}$, fenda 5-5), (B) Inseto absorção eletrônica UV-Vis e (C) Espalhamento de luz dinâmico da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), a $30,0^\circ\text{C}$.

O perfil espectral de emissão da Hip encapsulada em DPPC (Figura 14A), apresentou manutenção das principais bandas de emissão, referentes ao FS monomerizado, enquanto que o diâmetro médio das partículas (Figura 14C), manteve a alteração de 50% sobre o diâmetro observada em 4.1a, relativa ao processo de encapsulamento. Ainda que a técnica de absorção eletrônica UV-Vis seja ineficiente na quantificação de Hip neste sistema, através do perfil espectral de absorção é possível inferir que as moléculas de FS encontram-se monomerizadas em DPPC, dado a manutenção de suas principais bandas (Figura 14B). Além disso, a razão entre as principais bandas de absorção de um composto é um parâmetro sensível ao processo de agregação, e confirma a presença de monômeros no sistema. Para a água, onde sabidamente a Hip encontra-se na sua forma auto agregada, a razão A_1/A_2 é menor que 1, enquanto que em etanol, onde esta encontra-se monomerizada, o valor é superior a 2^{33,57,58}. A razão entre os máximos ($A_1 = 552\text{nm}$ e $A_2 = 596\text{nm}$) em meio lipossomal foi de 2,84, indicando a monomerização da Hip neste sistema. Verifica-se ainda, um pequeno deslocamento batocrômico nos máximos de absorção e emissão nos lipossomos (596nm e 601nm, respectivamente), se comparado com os mesmos em etanol (589nm e 596nm) (Figura 15).

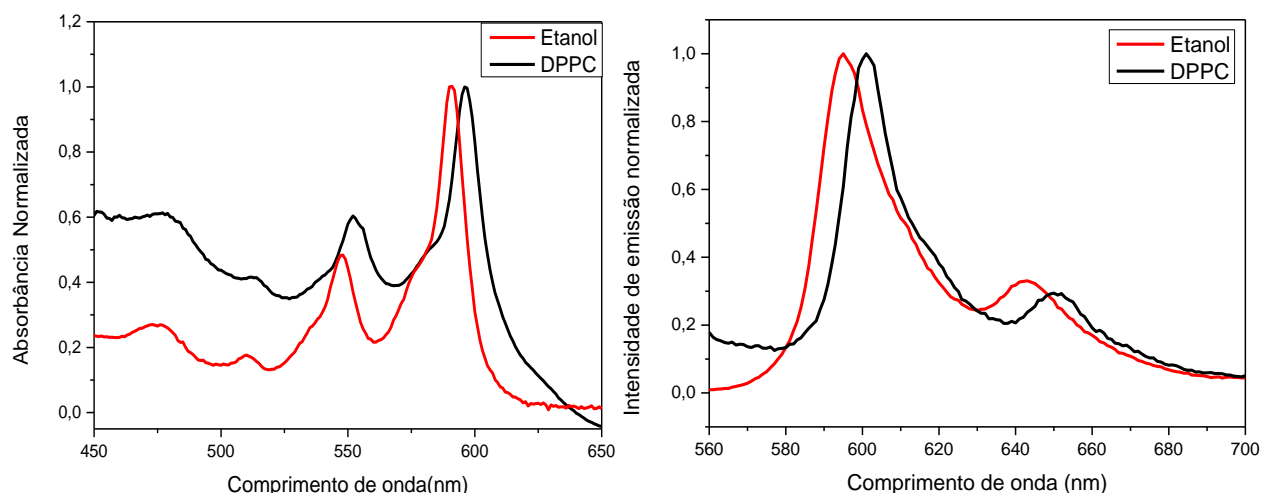


Figura 15. Espectros de absorção eletrônica e emissão de fluorescência normalizados da Hip em DPPC e etanol, respectivamente.

Estes deslocamentos podem ser associados à mudança de microambiente proporcionado pelas vesículas lipossomais de DPPC que garantem uma maior estabilização para Hip neste sistema. Um comportamento semelhante foi observado por G. B. Cesar *et al.*, 2014 e em H. Weitman *et al.*, 2001 para a Hip encapsulada em micelas copoliméricas do poloxâmero P-123, e em outros sistemas lipossomais, respectivamente, onde os deslocamentos batocrômicos, condizentes com a localização em um microambiente mais hidrofóbico observados, foram próximos aos obtidos em DPPC^{46,47}.

4.1c. Determinação da constante de ligação (K_b) da Hipericina nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC em diferentes temperaturas

Afim de avaliar o grau primário de interação do FS com as vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, bem como a sua influência com a temperatura, foram realizados experimentos de ligação acima e abaixo da transição de fase do fosfolipídio (43,1°C), dado as mudanças que ocorrem na ordenação dos fosfolipídios nessas diferentes condições. Para isso, variou-se a temperatura do sistema de 20,0 a 50,0°C, monitorando-se o perfil espectral de emissão após cada adição de lipossomo, sempre aguardando o equilíbrio térmico da solução. As isotermas de ligação foram ajustas pela Equação 1 e são apresentadas na Figura 16, 17 e 18 juntamente com seus respectivos espectros de emissão de fluorescência.

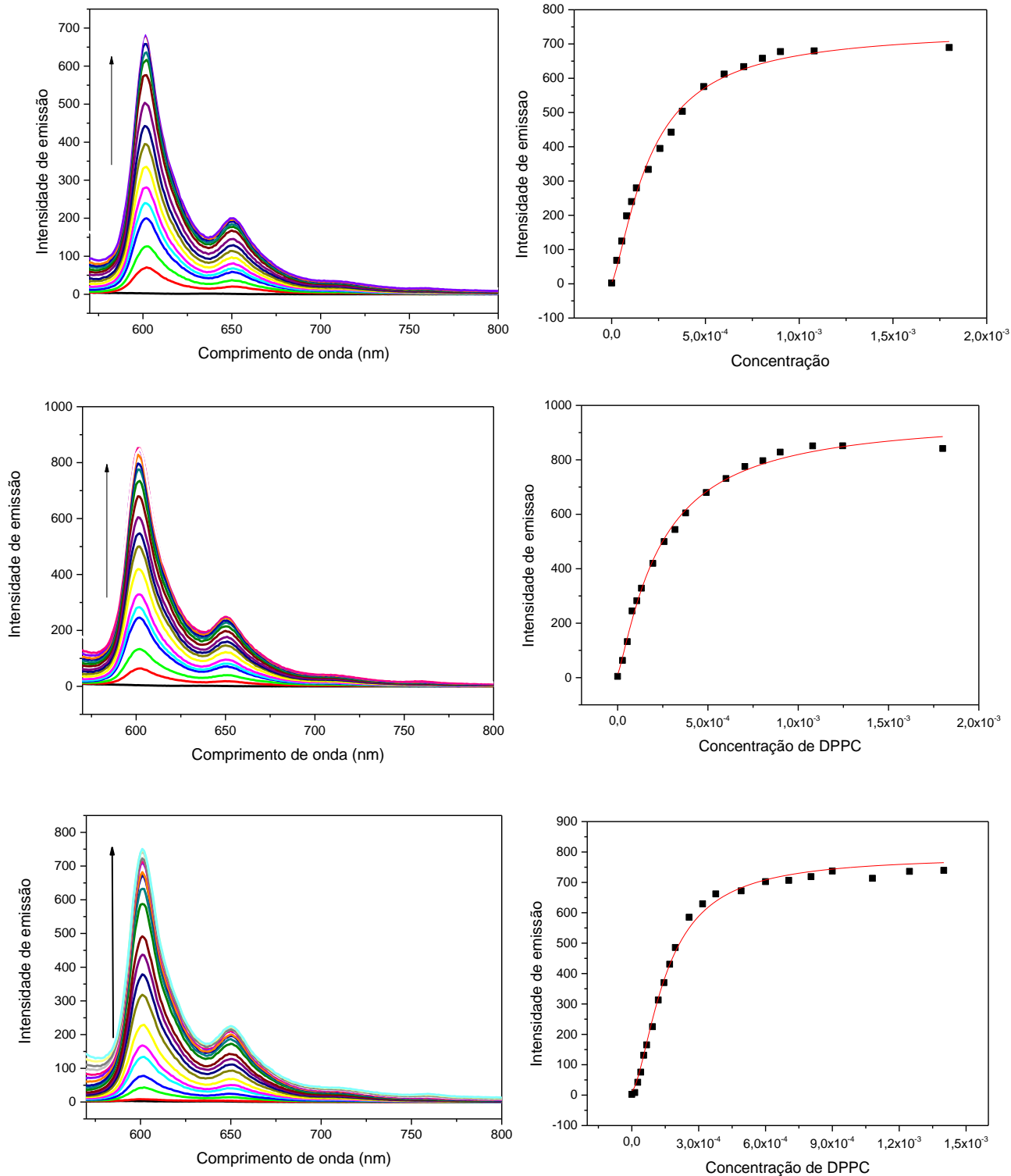


Figura 16. Espectros de emissão de fluorescência e ajustes das isotermas de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com estoques variando de 0 a $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em A) 20,0°C B) 25,0°C C) 30,0°C ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, fendas 10-10 para todas temperaturas).

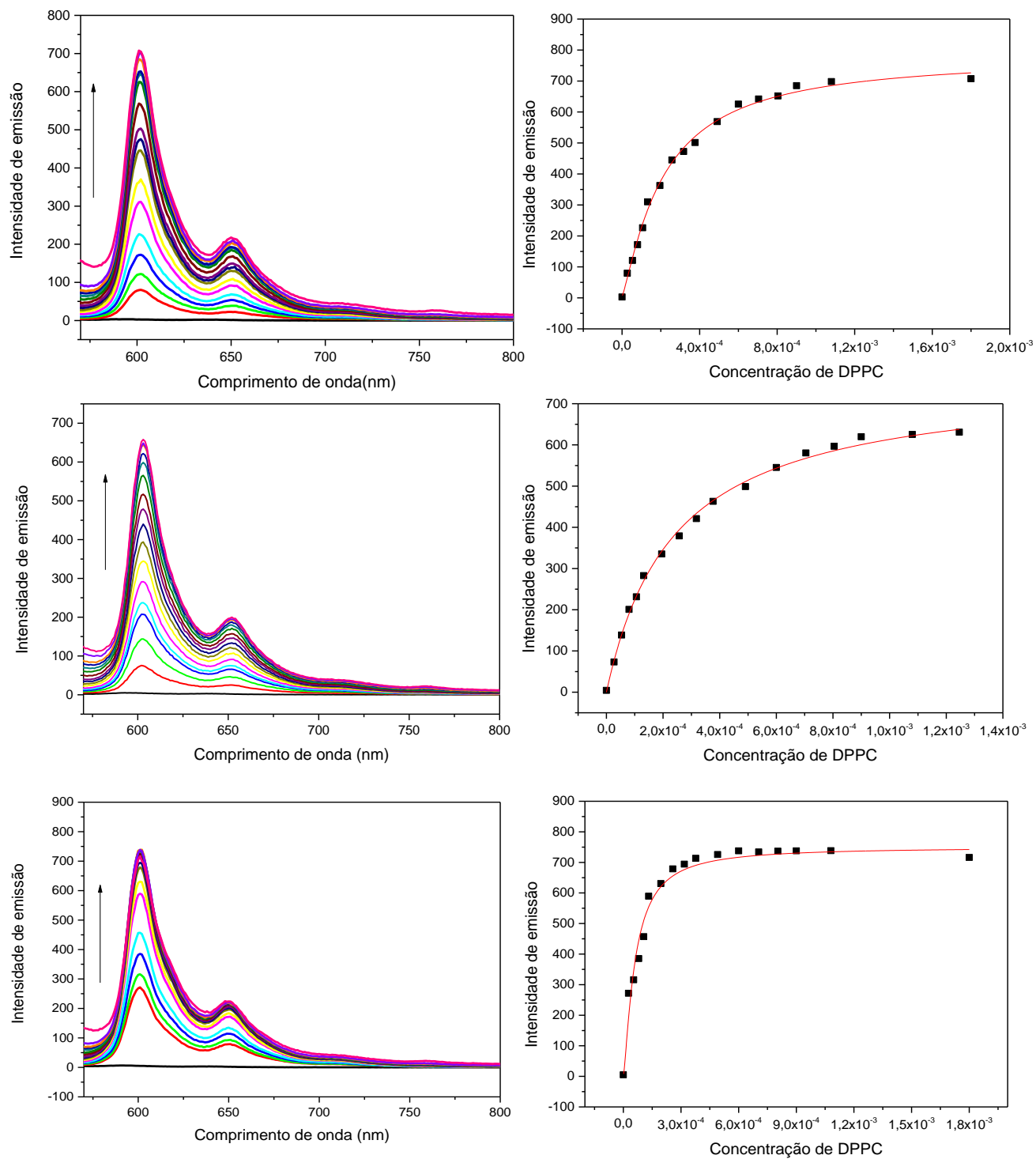


Figura 17. Espectros de emissão de fluorescência e ajustes das isothermas de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com estoques variando de 0 a $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em D) $35,0^\circ\text{C}$ E) $40,0^\circ\text{C}$ F) $45,0^\circ\text{C}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, fendas 10-10 para todas temperaturas).

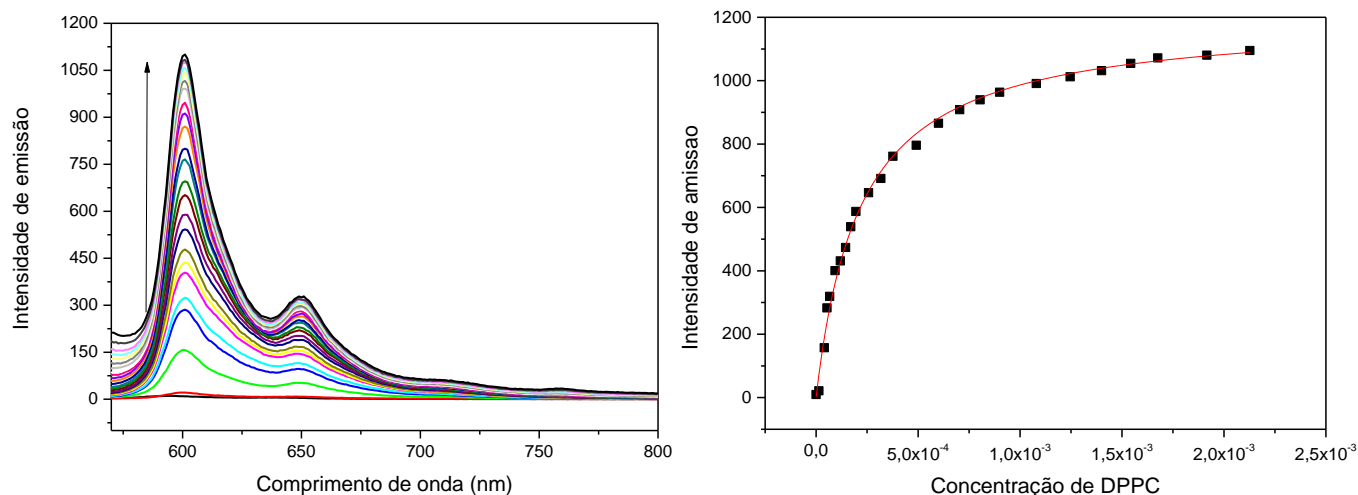


Figura 18. Espectros de emissão de fluorescência e ajustes das isotermas de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com estoques variando de 0 a $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em G) $50,0^\circ\text{C}$, ($\lambda_{\text{exc}} = 525\text{nm}$, fenda 10-5).

Em meio aquoso e sem adição de lipossomos ao sistema, não é possível verificar emissão das moléculas de Hip, haja vista que estas encontram-se na sua forma auto agregada^{22,25}. Com a adição das vesículas lipossomais à solução, é observado o surgimento de emissão de fluorescência, ocasionada pelo encapsulamento e consequente monomerização do FS. Essa emissão mostra-se maior em cada adição de vesículas, até atingirmos a saturação, ou seja, a intensidade de emissão é mantida/inalterada independente do volume de adição de DPPC na cubeta. Após a saturação do sistema, é realizado o tratamento matemático das isotermas de ligação através da Equação 1, sendo que para todas temperaturas avaliadas, a Hip apresentou interação com o DPPC (Figura 16, 17 e 18), onde acima da transição de fase ($<41,3^\circ\text{C}$), a intensidade de emissão mostrou-se maior, assim como os valores de constante de ligação (K_b) determinados⁴⁰. Os valores de N e de K_b , obtidos pelos ajustes das isotermas na Equação 1 são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de K_b da Hip em DPPC em diferentes temperaturas.

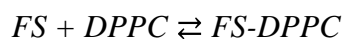
<i>Temperatura (°C)</i>	$K_b (10^3 L mol^{-1})$	$CMC (10^{-20} mol L^{-1})$	<i>N</i>
20,0	4,8±0,2	1±0	1,3±0,0
25,0	6,1±0	1±0	1,0±0,0
30,0	6,5±0,48	1±0	1,0±0,0
35,0	6,7±0	1±0	1,0±0,0
40,0	7,1±0,20	1±0	1,0±0,0
45,0	16,5±1,02	1±0	1,3±0,0
50,0	18,5±0	1±0	1,0±0,0

Através do ajuste das isotermas de ligação, é possível estimar diversos parâmetros do sistema, tais quais: concentração micelar crítica (CMC), número vesículas por moléculas de FS (N), energia livre de Gibbs (ΔG) e a constante ligação (K_b)^{40,41}.

Os valores de K_b mostraram-se gradativamente maiores com o aumento da temperatura, até atingirmos a temperatura de transição de fase do fosfolipídio (41,3°C). Acima desta temperatura, ocorre um significativo aumento no valor da constante de ligação (K_b), ocasionado pela maior fluidez do sistema, que possibilita uma reorganização e mudança de localização das moléculas de Hip para ambientes mais hidrofóbicos, garantindo uma maior interação entre o FS e a bicamada lipídica de DPPC⁶⁴. Muito acima da transição de fase do lipossoma (50,0°C), o valor de K_b continua aumentando, porém de modo menos significativo.

Para todas as temperaturas analisadas, os valores de CMC, F_0 e F_i , foram fixados ao realizar o ajuste da isoterma, haja vista que são valores conhecidos (experimentalmente), exceto para CMC, que foi fixada em $1,0 \times 10^{-20}$ mol L⁻¹, devido ao baixo valor da mesma em sistemas lipossomais, suficiente, porém, para a formação das vesículas. Dessa forma, buscou-se avaliar também o grau de interação do sistema Hip/DPPC através da Equação do Duplo Recíproco, que independe do valor de CMC do carreador⁵⁹.

Considerando o equilíbrio:



Onde *FS* é o composto fotossensibilizador e *DPPC* o sistema carreador. Será observada emissão de fluorescência quando *FS* ligar-se ao *DPPC*, e assumir sua forma monomérica.

Nesse sentido, ΔF representa a diferença na intensidade de emissão de fluorescência que ocorre na presença e na ausência de *DPPC* no sistema, *F* e *F₀* respectivamente, e corresponde à quantidade de *FS* associado ao *DPPC*.

Utilizando a Lei da Ação das Massas juntamente à Equação do Duplo Recíproco, conforme mostrado em P. M. Nassar *et al.*, 1997, aplicamos às isotermas a seguinte equação:

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{\text{máx}}} + \frac{1}{\Delta F_{\text{máx}} K_b [DPPC]} \quad (14)$$

Onde os gráficos de $1/\Delta F$ versus $1/[\text{DPPC}]$ fornecem os valores de K_b , livres da influência da CMC e são apresentados na Figura 19, assim como os valores de K_b (Tabela 2)⁵⁹.

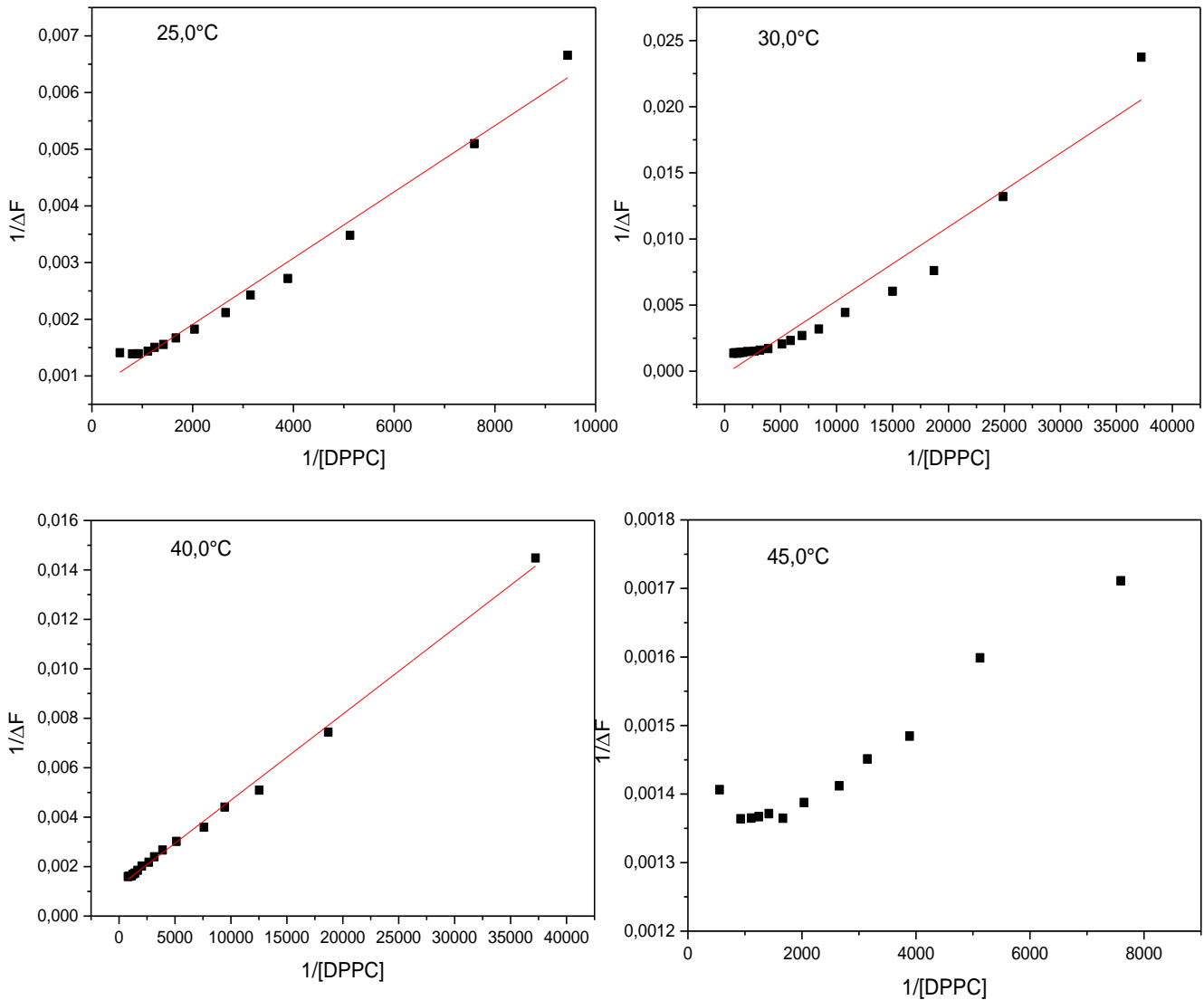


Figura 19. Ajustes das isotermas de ligação da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) pela Equação do Duplo Recíproco a $25,0^\circ\text{C}$; $30,0^\circ\text{C}$; $40,0^\circ\text{C}$ e $45,0^\circ\text{C}$.

Tabela 2. Valores de K_b obtidos pelo ajuste das isotermas pela Equação 14.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>$K_b (10^3 L mol^{-1})$</i>	<i>Slope (10^{-7})</i>	<i>Erro ($\pm 10^{-8}$)</i>
20,0	1,8	6,4	1,8
25,0	2,0	5,8	2,2
30,0	2,4	5,6	3,4
35,0	3,6	3,9	1,2
40,0	4,5	3,5	5,4
45,0	-	-	-
50,0	9,7	4,4	3,7

Os valores de K_b obtidos pela Equação do Duplo Recíproco mostraram-se significativamente menores do que aqueles determinados pela Equação 1, evidenciando a importância do parâmetro CMC para os estudos de interação neste sistema. Observou-se ainda grandes desvios de linearidade para o sistema a 45,0°C (Figura 19), não sendo possível obter valor de K_b pela Equação 14 nesta faixa de temperatura. Além disso, através dos valores de erro nos ajustes para as equações, é possível notar que a Equação 1 é mais adequada para indicar o grau de interação existente entre o par Hip/DPPC. Dessa forma, embora ambos ajustes tenham apresentado valores de K_b na mesma ordem de grandeza ($10^3 L mol^{-1}$) e gradativamente maiores com a elevação da temperatura do sistema (revelando que a interação Hip/DPPC é maior com o aumento da temperatura), a partir dos valores de K_b dispostos na Tabela 1 e utilizando a Equação 2, determinou-se os valores de ΔG deste sistema, que são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de ΔG calculados via Equação 2.

<i>Temperatura (K)</i>	<i>ln K_b</i>	<i>$\Delta G (10^3 J K^{-1} mol^{-1})$</i>
293,0	8,48	-20,6
298,0	8,72	-21,6
303,0	8,79	-22,1
308,0	8,81	-22,5
313,0	8,87	-23,1
318,0	9,71	-25,7
323,0	9,82	-26,4

A Tabela 3 mostra que todos valores de ΔG para o par Hip/DPPC foram negativos, evidenciando a espontaneidade deste FS em ligar-se às vesículas lipossomais unilamelares de DPPC. Em posse dos valores de ΔG e K_b , buscou-se obter informações adicionais com respeito aos demais parâmetros de ativação do sistema; como entalpia e entropia (ΔH e ΔS , respectivamente). Para isso, utilizou-se da Equação 15, cuja dependência linear de $\ln K_b$ *versus* $1/T$ nos permite extrair simultaneamente os valores de ΔH e ΔS relativo ao processo de ligação da Hip em DPPC⁴¹:

$$\ln K_b = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT} \quad (15)$$

Onde K_b é a constante de ligação; ΔS é a entropia do sistema; R é a constante dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T é a temperatura (K)⁴⁹. O gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$ é mostrado a seguir:

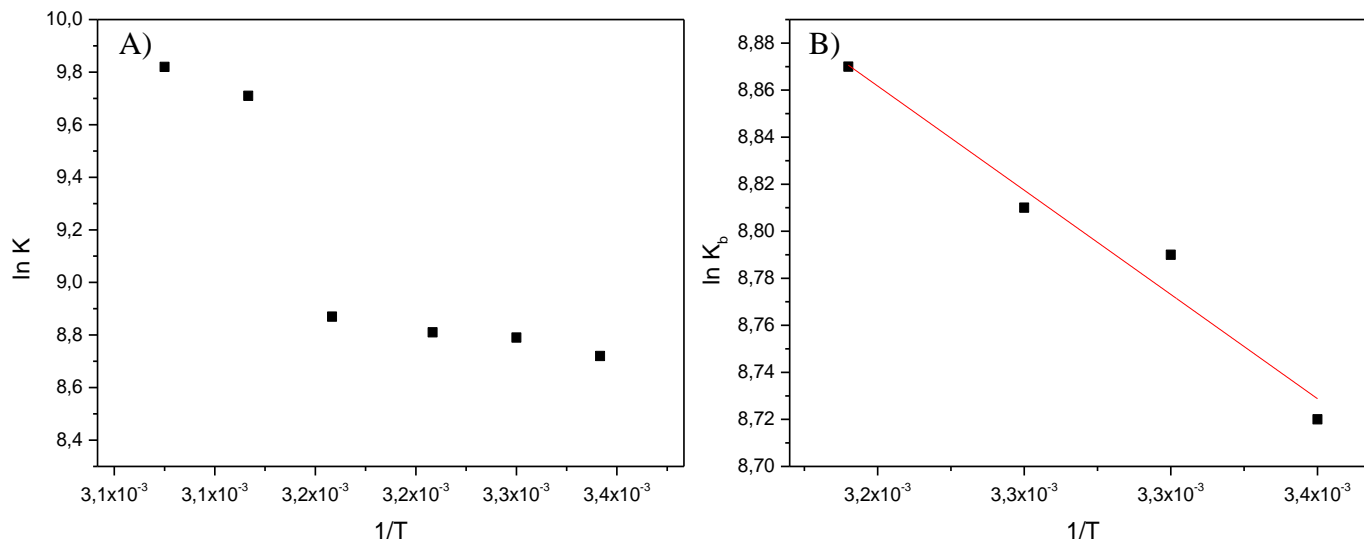


Figura 20. Gráficos de $\ln K_{b(\text{Hip/DPPC})}$ vs $1/T$ para o processo de ligação da Hip ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em A) Comportamento para todas temperaturas avaliadas. Em B) Em temperaturas abaixo da transição de fase do DPPC.

A Figura 20A mostra a presença de duas inclinações que requerem ajustes distintos da reta descrita pela Equação 15, ou seja, o comportamento da Hip durante o processo de ligação nas vesículas lipossomais de DPPC não pode ser descrito apenas por um valor de ΔH e ΔS neste intervalo de temperatura⁴⁶. Dado à tendência em que seguem-se os pontos, foi realizado o ajuste linear para as temperaturas mais elevadas utilizando-se os pontos acima e abaixo da transição de fase do fosfolípido ($40,0$, $45,0$ e $50,0^\circ\text{C}$), e determinou-se os valores de ΔH e ΔS referentes à faixa de temperatura abrangente entre $40,0^\circ$ e $50,0^\circ\text{C}$. O gráfico de $\ln K_b$ versus $1/T$ é apresentado na Figura 21.

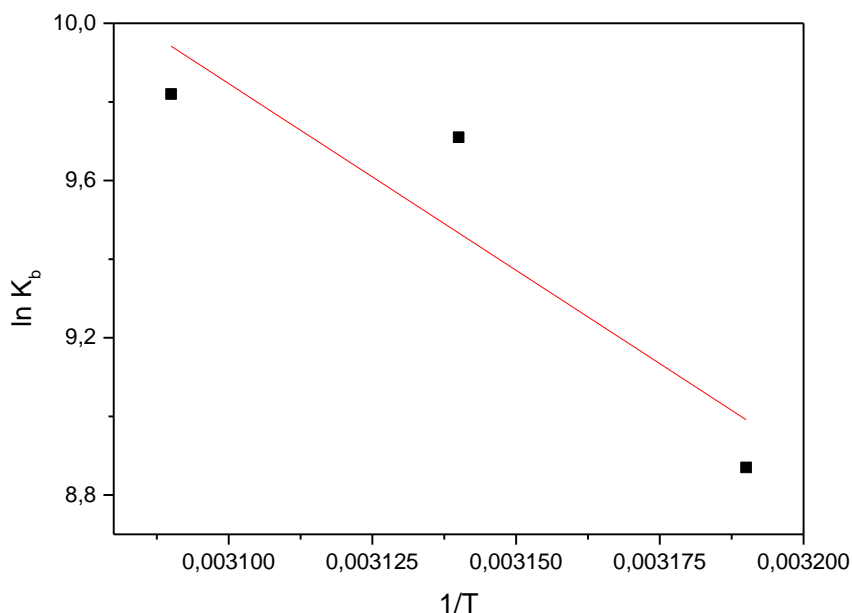


Figura 21. Gráficos de $\ln K_{b(\text{Hip/DPPC})}$ vs $1/T$ para o processo de ligação da Hip ($1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em temperaturas acima da transição de fase do DPPC ($40,0 \rightarrow 50,0^\circ\text{C}$).

No entanto, abaixo da transição de fase do fosfolípido, isto é, na faixa de temperatura compreendida entre $20,0$ e $40,0^\circ\text{C}$ (Figura 20), os valores de ΔH e ΔS foram de $7,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ e $97,3 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$, respectivamente, indicando que o processo de ligação da Hip no carreador lipossomal é endotérmico ($\Delta H > 0$) e de grande espontaneidade, dado a diminuição dos valores de ΔG com a temperatura (anteriormente determinados) e ao valor positivo de ΔS para o sistema. Para o sistema em elevadas temperaturas (Figura 21), em concordância com os resultados de K_b , observou-se uma diminuição dos valores de ΔG , que teve por consequência um aumento no valor de ΔH e ΔS do sistema, para $78,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ e

326, 6 J K⁻¹ mol⁻¹, respectivamente. Adicionalmente ao maior valor de ΔH do sistema Hip/DPPC com a temperatura, o notável aumento na entropia do sistema pode ser associado à transição trans-gauche do lipossomo, que permite maior movimentação e desordem dos fosfolipídios que e corrobora com o indicativo de que os mesmos tem sua espontaneidade termodinamicamente favorecida pela temperatura.

4.1d Determinação da Eficiência do Encapsulamento (*EE%*) da Hipericina em vesículas lipossomais de DPPC

Conhecer a Eficiência do Encapsulamento (*EE%*) de um composto FS em um meio carreador, é de grande importância para a formulação que se deseja aplicação em TFD, pois uma vez encapsulado, o FS irá monomerizar-se e, conseqüentemente gerar mais oxigênio singlete (¹O₂), além disso, juntamente com o K_b, evidencia a afinidade e portanto a viabilidade das vesículas lipossomais como carreadores^{16,17,60}. Tendo isso em mente, após o processo de encapsulamento a 30,0 e 50,0°C, as vesículas lipossomais foram destruídas com etanol e seus espectros de absorção eletrônica UV-Vis coletados, como ilustrado na Figura 22.

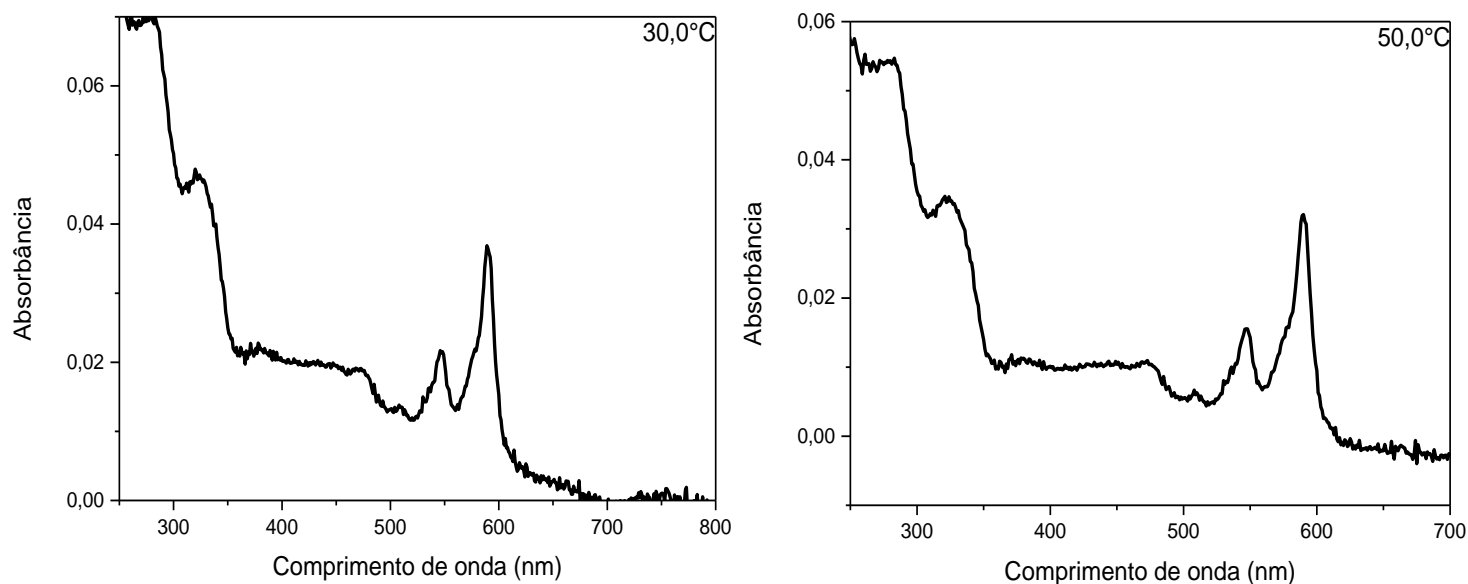


Figura 22. Espectros de absorção eletrônica UV-Vis de Hip em etanol, obtido pela destruição das vesículas de DPPC. Em A) Referente ao encapsulamento a 30,0°C e B) a 50,0°C.

A Figura 22 evidencia a monomerização das moléculas de Hip em etanol, dado a manutenção de suas principais bandas de absorção e razão entre A_1/A_2 superior a 2. Através do ϵ da Hip em etanol e das Equações 3 e 4, foi possível estimar o número de moléculas que encontravam-se encapsuladas nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC antes da sua destruição com solvente orgânico, em relação ao que foi previamente incorporado neste sistema. Em posse desse valor, determinou-se a Eficiência do Encapsulamento ($EE\%$), obtendo-se 74,3% e 89,3% a 30,0 e 50,0°C, respectivamente. Estes valores são bastante próximos aos relatados por Lima *et al.*, 2014, em seus estudos com Hip e Tetra-carboxifitalocianina de Zinco (FtZnT) encapsuladas em NLS ($EE\% > 80$)⁶¹. Embora elevados, sugerem que o processo de encapsulamento da Hip é cerca de 17% mais eficiente em temperaturas mais elevadas, isto é, acima da transição de fase do DPPC. Dessa forma, ao realizarmos o processo de encapsulamento a 50,0°C, além de garantir uma maior

interação da Hip com as vesículas (conforme mostrado em 4.1c), seria também uma maneira de otimizar a incorporação do FS neste sistema carreador, para sua posterior aplicação.

4.2. Estudos de Localização da Hip em DPPC

4.2a. Determinação da constante de Stern-Volmer (K_{sv}): Estudos de supressão de fluorescência

A provável localização relativa das moléculas de Hip encapsuladas nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC foi estimada através de estudos de supressão de fluorescência, utilizando iodeto como supressor aquosolúvel, em temperaturas abaixo e acima da transição de fase do fosfolípido (30,0°C e 50,0°C, respectivamente). Esse tipo de estudo é conveniente na interpretação da localização de fármacos encapsulados e ocorre através da acessibilidade ao FS (no seu estado excitado), por uma molécula supressora, estimando-se a constante de Stern-Volmer (K_{sv})⁴⁴. Nesse sentido, elevados valores de K_{sv} são associados à uma localização mais externa do fármaco, e portanto de maior acessibilidade ao supressor. Analogamente, baixos valores de K_{sv} são referentes à uma localização mais interna do FS no sistema carreador, onde o supressor aquosolúvel não teria seu acesso⁴⁴. Os espectros de emissão de fluorescência para o sistema a 30,0 e a 50,0°C foram coletados após cada adição de supressor e a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) determinada através da Equação 5 (Figura 23).

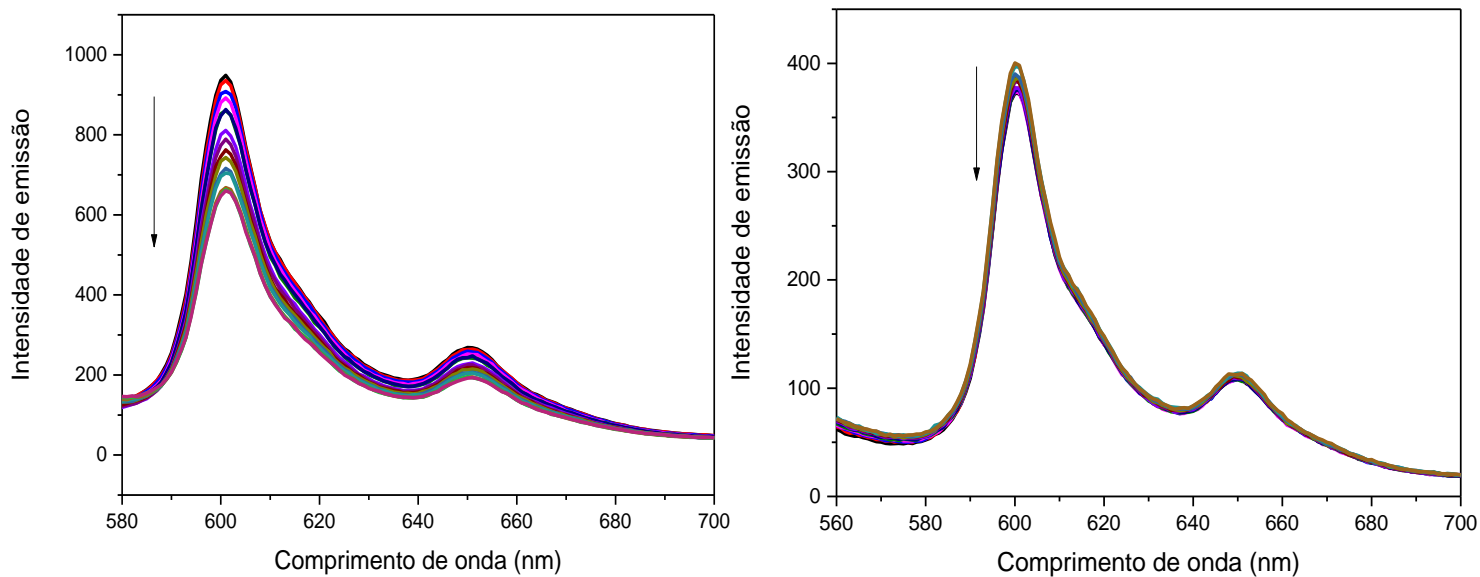


Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Variação espectral da Hip por emissão de fluorescência com Γ A) a $30,0^\circ\text{C}$, ($\lambda_{\text{exc}} = 525\text{nm}$, fenda 20-5) e em B) a $50,0^\circ\text{C}$, ($\lambda_{\text{exc}} = 525\text{nm}$ e fenda 10-5). A Direção das setas indicam a supressão de fluorescência da Hip com Γ .

A primeira vista, a Figura 23 já evidencia uma diferença na acessibilidade da Hip encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC a $30,0$ e a $50,0^\circ\text{C}$ ao iodeto, que pode ser justificada pelas diferentes características que o fosfolípido assume nessas temperaturas. Nota-se em 23A, uma queda de 30,6% da intensidade de emissão com a adição de supressor ao sistema, enquanto que a $50,0^\circ\text{C}$ (Figura 23B), não foram observadas alterações significativas nos espectros (7,0% de queda). Isso ocorre porque abaixo da transição de fase do fosfolípido, as vesículas lipossomais encontram-se mais rigidamente estruturadas, dificultando a mobilidade do fármaco, que se acomoda na região mais externa das vesículas, e portanto de maior acessibilidade ao supressor^{44,56,57}. A pequena queda na emissão de fluorescência, observada a $50,0^\circ\text{C}$ (Figura 23B), não foi suficiente para a determinação de um valor de constante de supressão e indica uma localização mais interna das moléculas de Hip em DPPC nesta temperatura.

Para supressão da Hip em DPPC a 30,0°C, o gráfico de F_0/F versus $[I]$, indicou a existência de duas populações distintas de FS, localizadas em regiões acessíveis ao supressor, conforme mostrado na Figura 24.

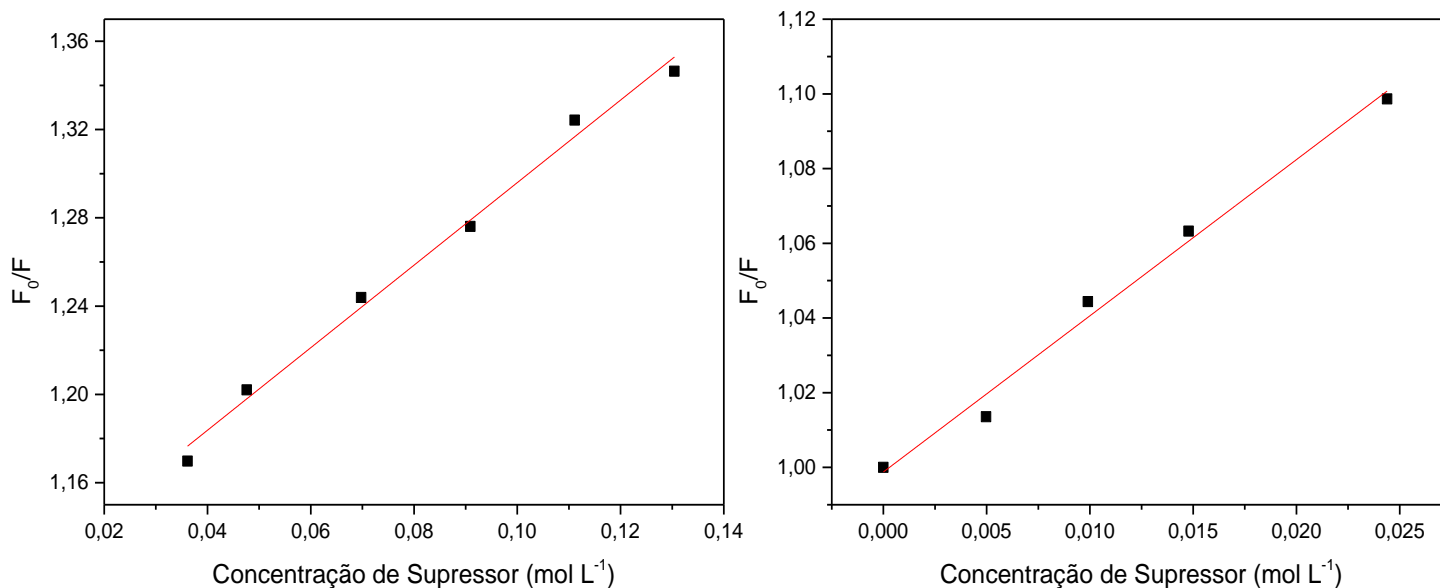


Figura 24. Determinação da Constante de Stern Volmer através da Equação 7, a 30,0°C.

Os valores de K_{sv} foram de 4,18 ($[I]$ variando de 0 a 0,025 mol L⁻¹) e 1,87 (de 0,025 à 0,150 mol L⁻¹), indicando uma maior acessibilidade do supressor para a primeira população (maior valor de K_{sv}). Afim de comprovar que a mudança de localização da Hip nas vesículas de DPPC ocorre com o aumento da temperatura do sistema, espectros de emissão de fluorescência de uma solução contendo Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) encapsulada em DPPC ($5,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), foram coletados em diferentes temperaturas. Para atingir a máxima supressão observada, adicionou-se iodeto (0,2 mol L⁻¹) ao sistema. Os espectros de emissão de fluorescência em função da temperatura são mostrados na Figura 25.

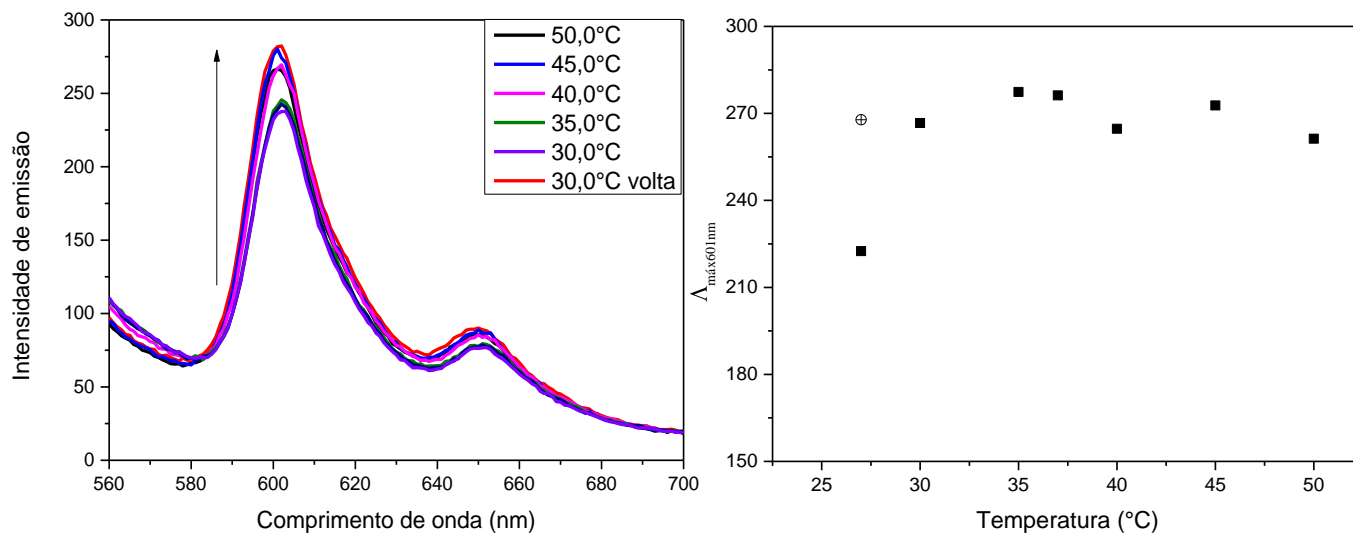


Figura 25. A) Espectros de emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em presença de supressor (1 mol L^{-1}) em função da temperatura. B) $\lambda_{\text{máx}(601\text{nm})}$ de emissão em função da temperatura.

A Figura 25 evidencia a mudança de localização das moléculas de Hip com o aumento da temperatura. Inicialmente a $30,0^\circ\text{C}$, verifica-se uma menor intensidade de emissão devido ao acesso do supressor ao FS, que encontra-se mais externamente alocado nas vesículas lipossomais. O aumento da temperatura do sistema resulta em uma maior intensidade de emissão, indicando a nova localização do fármaco em uma região mais interna nas vesículas, onde o supressor não possui acesso. Com o retorno a temperatura inicial, é observada uma manutenção do perfil espectral adotado a $50,0^\circ\text{C}$, indicando que as moléculas de Hip não voltam assumir sua localização anterior. Estes dados corroboram com os estudos teóricos de Joakim *et al.*, 2014, em que o autor relata a presença de duas populações de moléculas de Hip diferentemente alocadas no DPPC, enquanto que uma permanece sobre a superfície do fosfolipídio, a outra tende a penetrar na bicamada até

estabilizar-se⁵⁷. Para melhor compreensão destes resultados, experimentos de Transferência de Energia Ressonante por Fluorescência (FRET) foram conduzidos a 30,0 e 50,0°C (4.2b).

4.2b. Transferência de Energia Ressonante de Fluorescência (FRET)

Além dos estudos de supressão de fluorescência, a Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência (FRET), foi utilizada na análise de localização relativa no microambiente da bicamada lipídica, através de um processo foto físico caracterizado pela transferência de energia que ocorre entre um fluoróforo doador (no seu estado excitado) e um cromóforo acceptor (no seu estado fundamental), através de interações dipolo-dipolo de longo alcance (10-100 Å). Para isso, uma molécula doadora deve emitir fluorescência no comprimento de onda correspondente com o da absorção da espécie acceptora, onde o grau de transferência de energia é consequência da sobreposição espectral, do rendimento quântico de fluorescência do doador e da relativa orientação dos dipolos de transição, bem como da distância entre o par doador-acceptor⁴⁴. A dependência deste fenômeno com a distância, faz com que esse tipo de experimento seja bastante utilizado para medir a localização relativa entre a molécula doadora e acceptora.

Devido sua estrutura rígida e linear, é sabido que o DPH particiona-se espontaneamente para região hidrofóbica das membranas, sendo portanto amplamente utilizado em ambas técnicas de fluorescência; estática e resolvida no tempo, onde os estudos são normalmente realizados com controle de temperatura⁶². Neste sentido, para os estudos de localização da Hip encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, foi utilizado difenilhexatrieno (DPH) como sonda doadora de energia por emissão

de fluorescência, haja vista que estudos recentes relatam sua posição na bicamada lipídica de DPPC, sugerindo uma localização predominante no centro da bicamada lipídica (de modo perpendicular às mesmas), conforme ilustrado na Figura 26⁶².

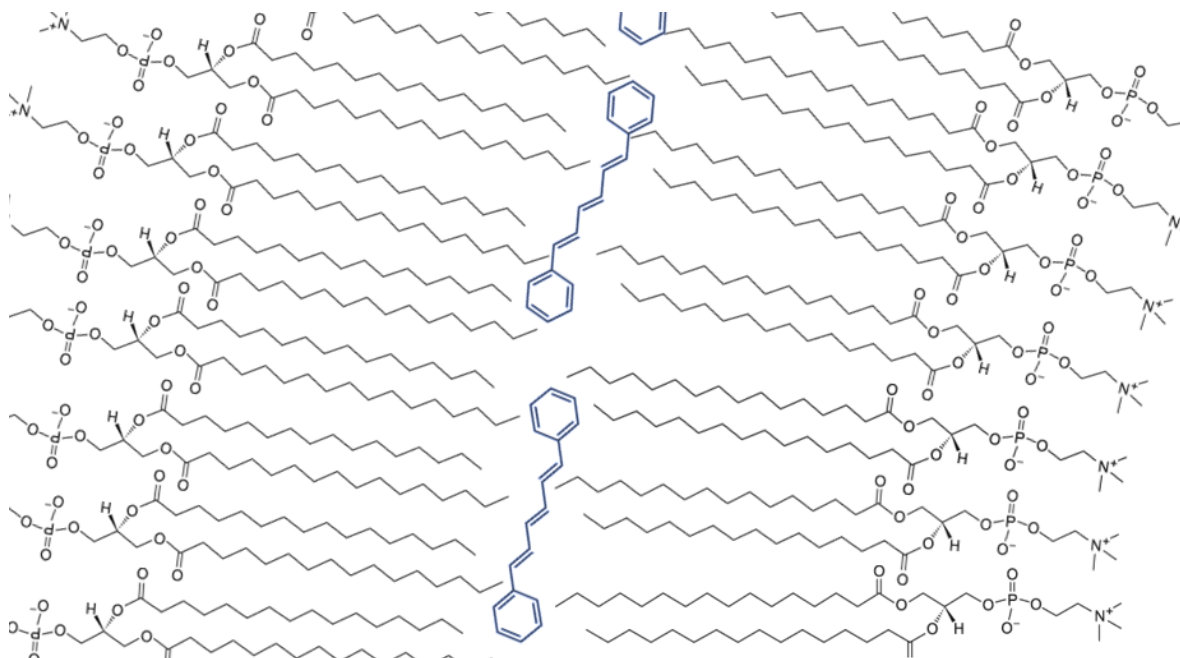


Figura 26. Ilustração esquemática da disposição teórica das moléculas de DPH alocadas nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, ampliado.

Uma das condições determinantes para que ocorra a transferência de energia por fluorescência (FRET), é que o par doador-aceptor envolvido no processo, tenha uma apreciável sobreposição espectral entre a emissão do doador (DPH), e a absorção do acceptor (Hip). Uma vez que essa sobreposição ocorra, é possível o cálculo da integral de sobreposição J , via Equação 8 a qual é de suma importância na determinação da distância de Förster para o sistema. Os espectros de absorção da Hip e emissão de fluorescência do DPH normalizados pela área são apresentados na Figura 27.

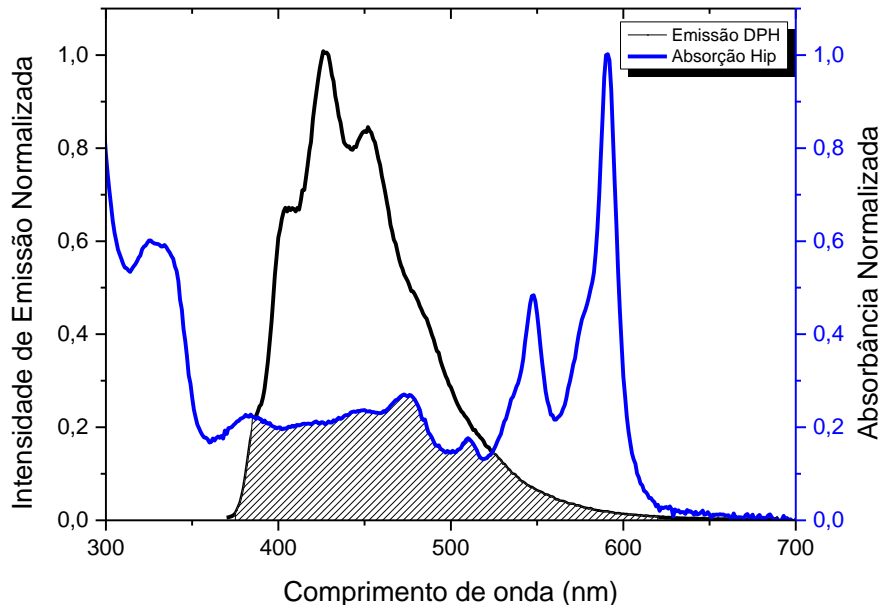


Figura 27. Sobreposição espectral entre absorção Hip e emissão DPH normalizados pela área para o cálculo de J .

Através da sobreposição espectral da absorção eletrônica da Hip e emissão de fluorescência do DPH normalizados pela área (Figura 27), calculou-se a integral de sobreposição J via Equação 8, obtendo-se um valor de $3,3 \times 10^{-13} \text{ cm}^2$. Em posse do valor de J , realizou-se o experimento de FRET, sendo os espectros de emissão de fluorescência coletados após cada adição de Hip à solução lipossomal contendo DPH encapsulado. Os espectros de emissão de fluorescência são apresentados na Figura 28, sendo que este experimento foi conduzido a 30,0 e 50,0°C.

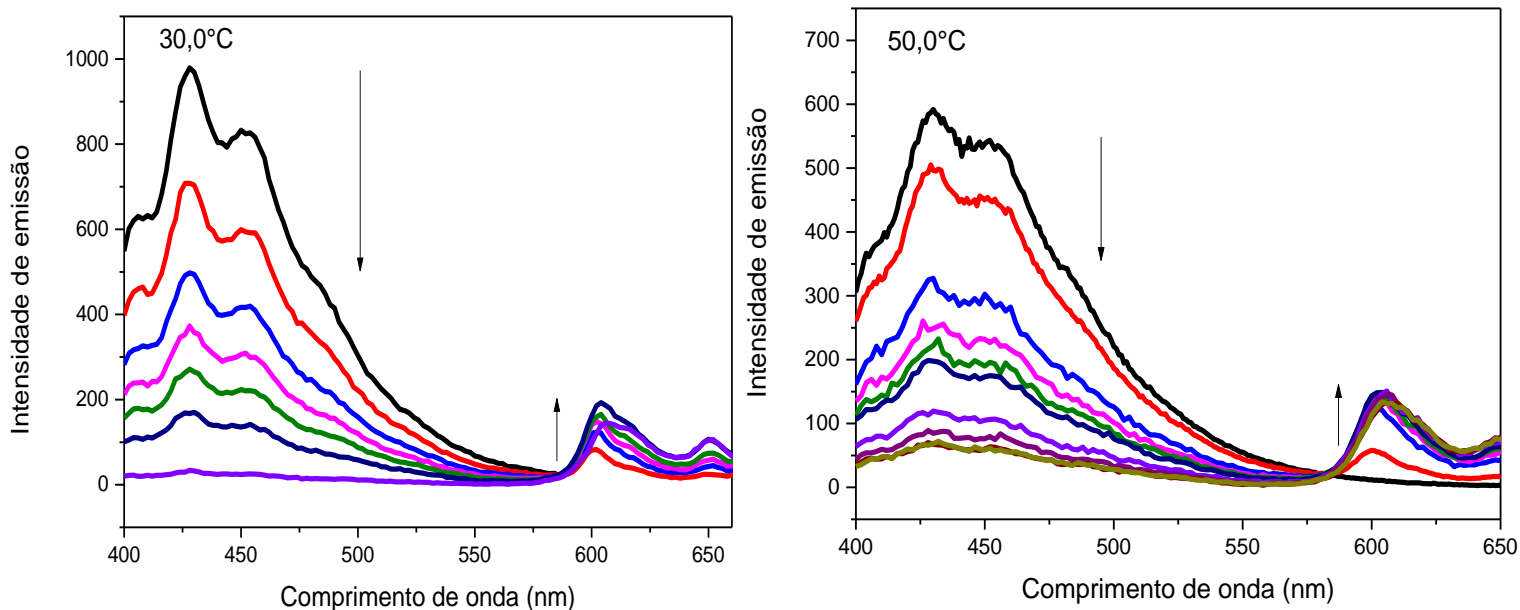


Figura 28. Espectros de emissão de fluorescência do DPH ($4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e da Hip ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $4,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, fendas 2-2,5 e 1,5-10 a 30,0 e 50,0°C, respectivamente) em DPPC ($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), $\lambda_{\text{exc}}=335 \text{ nm}$.

A Figura 28 mostra que inicialmente, sem adição de Hip ao sistema, é observado somente o perfil de emissão do DPH, caracterizado pela presença de três bandas na região de 400 nm. Com a adição do FS concentrado, ocorre uma diminuição na intensidade de emissão referente ao DPH e conseqüente surgimento da banda de emissão da Hip (~600nm), evidenciando a ocorrência de FRET. Esse fenômeno ocorre para o sistema a 30,0 e a 50,0°C (Figura 28). Nota-se que o comprimento de onda utilizado na excitação (335nm) promove apenas e seletivamente a emissão do DPH, dessa forma, o surgimento das bandas de emissão de fluorescência da Hip pode ser interpretado como resultado da transferência de energia que ocorre entre o par doador-aceptor (DPH-Hip).

Afim de determinar a máxima eficiência da transferência de energia (E) que ocorre entre o par doador-aceptor, as adições de FS ao sistema foram realizadas até que se

observasse somente a emissão da Hip. Assim sendo, por meio das diferenças de intensidades de emissão do DPH na presença e na ausência de Hip, determinou-se E , via Equação 9, obtendo-se valores de 96,5 e 88,4%, a 30,0 e 50,0°C, respectivamente. O maior valor de eficiência de transferência de energia, observado a 30,0°C, pode ser associado a uma localização mais próxima da Hip, com relação às moléculas de DPH, nesta faixa de temperatura, o que corrobora com os demais resultados até então apresentados. Nota-se que para o sistema a 50,0°C, mesmo após sucessivas adições concentradas de Hip, não foi possível atingir a saturação do DPH, indicando uma localização menos acessível deste para as moléculas de FS a 50,0°C.

Dessa forma, o Raio de Förster foi calculado utilizando a Equação 7, com $\eta=1,4$, $\Phi_{F(DPH)}=0,37$, $J=3,3 \times 10^{-13} \text{ cm}^2$ (ambos medidos experimentalmente) e $\kappa^2=2/3$, obtendo-se um valor de $51,5 \text{ \AA}^{43,61}$. Em posse dos valores de Eficiência e Raio de Förster, determinou-se a distância (r) entre o par doador-aceptor, a 30,0 e 50,0°C via Equação 6.

Os valores de r foram de 29,7 e 36,7Å com relação ao DPH, a 30,0 e a 50,0°C respectivamente, comprovando que ocorre uma mudança na localização das moléculas de Hip (com relação ao DPH), favorecida com o aumento da temperatura. Este resultado é de grande importância pra compreensão do sistema Hip/DPPC e mostrou-se concordante com os estudos teóricos de Joakim *et al.*, 2014, os quais revelam uma localização da Hip mais próxima aos grupos glicerol, que constituem a camada mais interna das vesículas de DPPC^{56,63,64,65}.

Estudos de FRET também foram recentemente realizados por Loren Nieto Trujillo *et al.*, 2015 em aplicações de Zeólitas L funcionalizadas com Ftalocianinas. Utilizando a absorção dos corantes catiônicos Pironina Y (PyY) e Tionina (Th), encapsulados em

Zeólitas L, o autor relata a transferência de energia via FRET para a ftalocianinas, que para as condições de estudo apresentavam absorções limitadas⁶³.

4.3. Estudos Foto físicos do formulado Hip/DPPC

4.3a. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais de DPPC a 30,0°C

O valor de rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) de um composto FS é de suma importância para TFD, haja vista que moléculas muito fluorescentes tendem a gerar menos oxigênio singlete, espécie de interesse nesta técnica⁸. O Φ_F da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) encapsulada em DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foi de 0,13 a 30,0°C.

Valores relativamente elevados de Φ_F , podem também indicar que o FS encontra-se encapsulado na sua forma monomérica^{2,5,8}. Por outro lado, em sistemas lipossomais, o rendimento quântico de fluorescência de compostos fotossensíveis costuma ser bastante baixo, haja vista o favorecimento de outros mecanismos de desativação do estado excitado, que são concorrentes com o processo de emissão²⁸. Dentre esses processos, podemos citar a formação de oxigênio singlete (¹O₂), as reações de fotobranqueamento e supressão de fluorescência por moléculas de água⁴⁴.

Afim de avaliar se a água pode estar atuando como supressor de fluorescência neste sistema, realizou-se o mesmo procedimento descrito em 3.2.4a, porém utilizando água como supressor, a 30,0°C. Os espectros de emissão de fluorescência são apresentados a seguir (Figura 29):

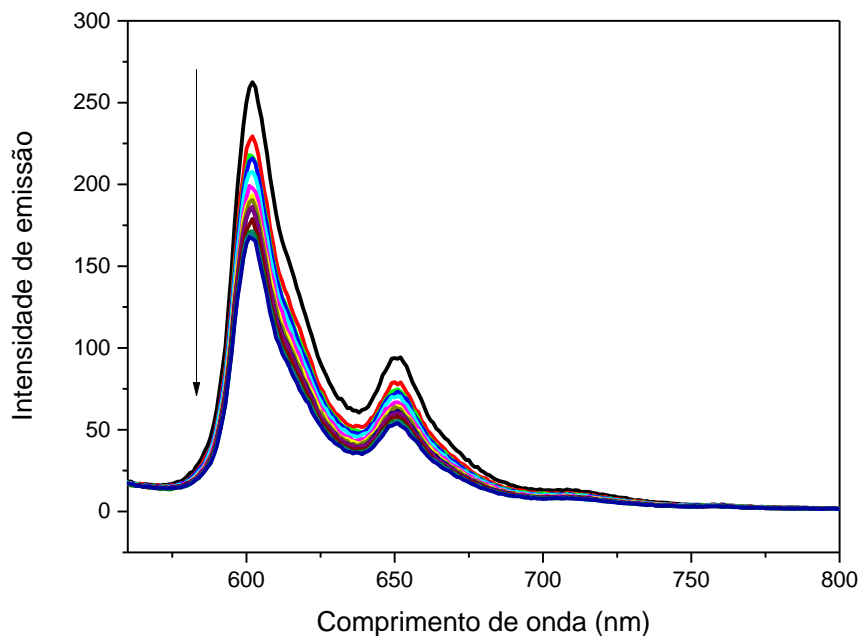


Figura 29. Variação espectral da emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com adição total de 1,5 mL de água destilada ao sistema, a $30,0^\circ\text{C}$.

Por meio da variação espectral observada na Figura 29, nota-se que a água atua como supressor de fluorescência para a Hip encapsulada em DPPC a $30,0^\circ\text{C}$, haja vista que logo nas primeiras adições, significativas diminuições nas intensidades de emissão foram observadas. Assim sendo, o baixo valor encontrado de Φ_F (0,13), pode estar associado à localização da Hip em uma região interfacial mais hidrofílica no fosfolípido, onde as moléculas de água teriam acesso.

Na tentativa de justificar o baixo valor de Φ_F (0,13) para a Hip em DPPC a $30,0^\circ\text{C}$, o experimento foi conduzido elevando-se a temperatura do sistema para valores acima da transição de fase do fosfolípido ($>43,1^\circ\text{C}$), com posterior retorno à temperatura inicial ($30,0^\circ\text{C}$). Esse procedimento foi realizado com a amostra e com o padrão, onde após a estabilização térmica, foram coletados os espectros de absorção eletrônica e emissão de

fluorescência, e determinado o novo valor de Φ_F para a amostra via Equação 10. Os espectros de emissão são apresentados na Figura 30.

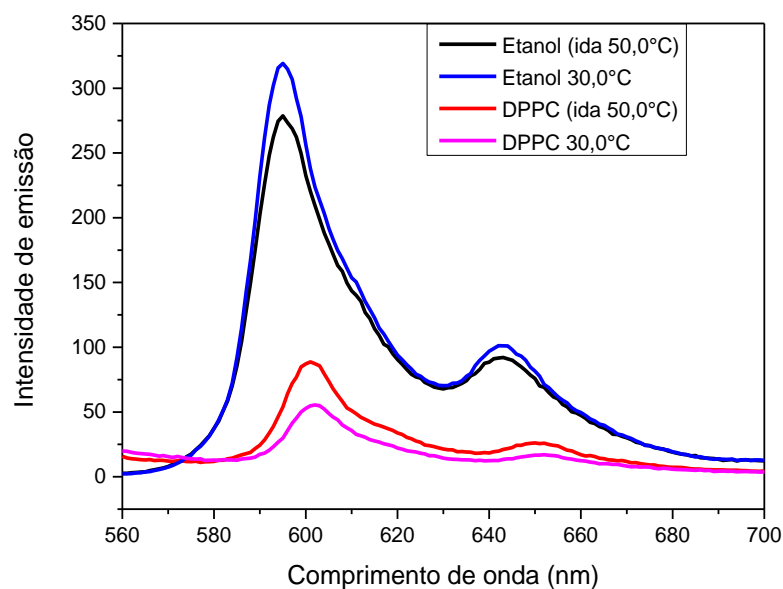


Figura 30. Espectros de emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e etanol a $30,0^\circ\text{C}$, antes e após a elevação da temperatura do sistema para $50,0^\circ\text{C}$ e posterior retorno ($\lambda_{\text{exc}} = 525\text{nm}$ e fenda 5-5).

Para as amostras que tiveram sua temperatura elevada, observou-se uma diminuição da intensidade de emissão do padrão em etanol e um aumento da mesma para a Hip em DPPC, se comparado com os perfis de emissão coletados a $30,0^\circ\text{C}$, sem mudança de temperatura (Figura 30). Essa variação na intensidade resultou em um aumento no valor de Φ_F para 0,30, e está associada à mudança de localização das moléculas de Hip para um ambiente mais interno nas vesículas lipossomais, com o aumento da temperatura do sistema, conforme observado nos experimentos 3.2.4a e 3.2.4b. Em termos de aplicação, uma elevada estabilidade térmica é extremamente vantajosa para um formulado, uma vez que torna possível esterilização do mesmo, sem que ocorra perda de suas propriedades.

Além disso, um baixo valor de Φ_F , pode também ser indicar um elevado $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$, o que torna o emprego da formulação em TFD extremamente promissor^{8,11,14}.

4.3.b. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) da Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

Após excitado o FS pode sofrer cruzamento inter-sistema (CIS) e reagir com o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) para formar $^1\text{O}_2$, espécie de interesse em TFD (Figura 2). Nesse sentido, visando avaliar a potencialidade da formulação contendo Hip encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, foram realizados experimentos de $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ utilizando Hip em P-123 como padrão, cujo valor de $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ é 0,38⁶⁶. Os gráficos de tempo de vida de decaimento por fosforescência do $^1\text{O}_2$, para o FS em P-123 e em DPPC, são mostrados na Figura 31.

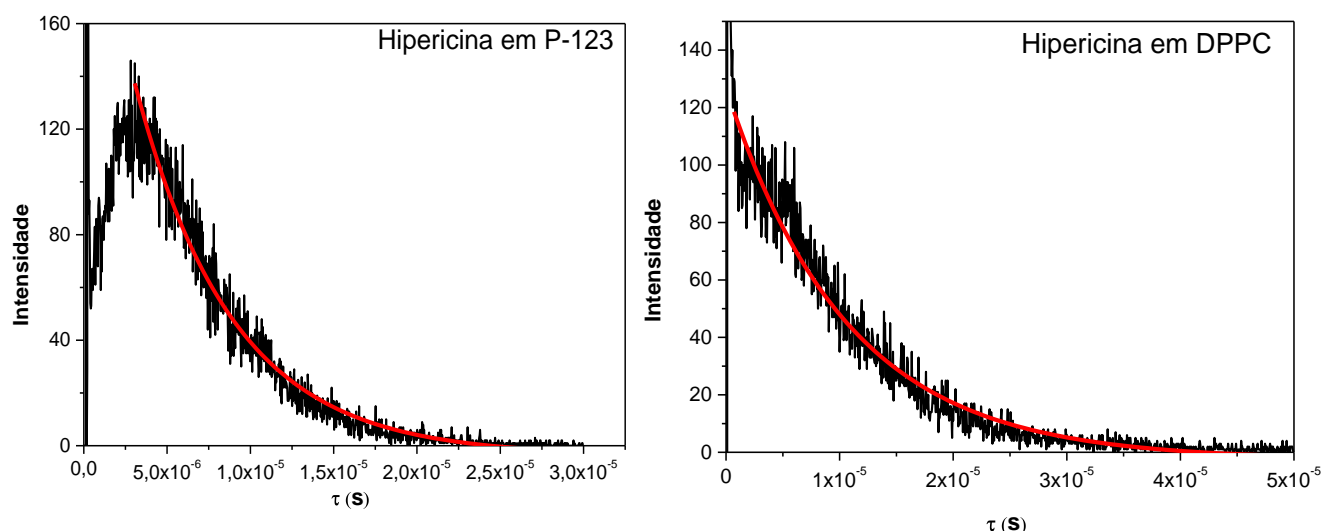


Figura 31. Decaimento exponencial da fosforescência do oxigênio singlete em 1270nm da Hip encapsulada em P-123 e em DPPC.

A Figura 31 mostra o decaimento temporal de fosforescência do oxigênio singleto $^1\text{O}_2$ obtido em 1270nm, para a Hip incorporada em P-123 e em DPPC, dos quais foram determinados/extraídos os valores de $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$, e tempo de vida do oxigênio singlete (τ), da amostra e do padrão, os quais encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ e τ da Hipericina ($\lambda_{\text{exc}} = 600\text{nm}$) encapsulada em P-123 e em DPPC.

Hipericina em:	τ (μs)	$I_{\text{máx}}$	Φ_{Δ}
P-123	$5,84 \pm 0,08$	129,5	0,30
DPPC	$10,64 \pm 0,16$	111	0,26

A Tabela 4 revela uma nítida diferença entre os valores de tempo de vida do oxigênio singlete (τ), produzidos pela amostra contendo Hip encapsulada em DPPC e pelo padrão em P-123. Os valores de τ podem ser relacionados com o ambiente ao qual o $^1\text{O}_2$ é gerado ou encontra-se inserido. Para Hip em etanol Darmanyán *et al.*, 1994, relatou em seus estudos, valores de τ de $\sim 14\mu\text{s}$, enquanto que em água esse valor cai para $\sim 4\mu\text{s}$, já para membranas lipídicas esses valores podem atingir até $35\mu\text{s}$ ^{1,11,67}. Dessa forma, em solventes de menor polaridade, ocorre o favorecimento da oxidação do substrato, o que justifica os elevados valores de τ obtidos nas soluções com carreadores DPPC e P-123, e indica um posicionamento mais interno da Hip dentro desses sistemas^{1,11}.

Ainda na Tabela 4, observou-se que o valor de $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ para a Hip em DPPC (0,26) foi bastante próximo ao padrão em P-123 (0,30 (experimental)), indicando que o processo de encapsulamento em DPPC não compromete significativamente a eficiência do FS para aplicações futuras em TFD. Essa pequena queda no valor de $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ para a Hip em DPPC pode ser associada com o aumento nos valores de Φ_F , anteriormente observados em 4.3a, dado à relação entre esses dois mecanismos previamente explicada através do Diagrama de Jablonski.

4.3c. Estudo da influência da temperatura na organização estrutural da Hipericina encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC: Estabilidade Térmica

Nas áreas onde estão localizados os tumores, a temperatura corporal costuma ser ligeiramente maior do que nas demais regiões do corpo. Além disso, uma elevada estabilidade térmica, permite que o fármaco seja liofilizado, hidratado ou esterilizado sem que perca sua aplicabilidade^{8,11,13}. Dessa forma, a investigação da influência da temperatura no comportamento de um FS encapsulado é de suma importância para compreensão do sistema que se deseja aplicação.

Na tentativa de avaliar a estabilidade térmica do formulado hidratado contendo Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), imediatamente após seu preparo, foram monitoradas as propriedades espectroscópicas via emissão de fluorescência, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espalhamento de luz ressonante (RLS), em função do aumento gradativo da temperatura, a partir de $27,0^\circ\text{C}$ até atingir $50,0^\circ\text{C}$, e posterior retorno para a temperatura inicial, sempre

aguardando a estabilização térmica do sistema. O comportamento espectral de emissão de fluorescência em função da temperatura da Hip em DPPC é apresentado na Figura 32.

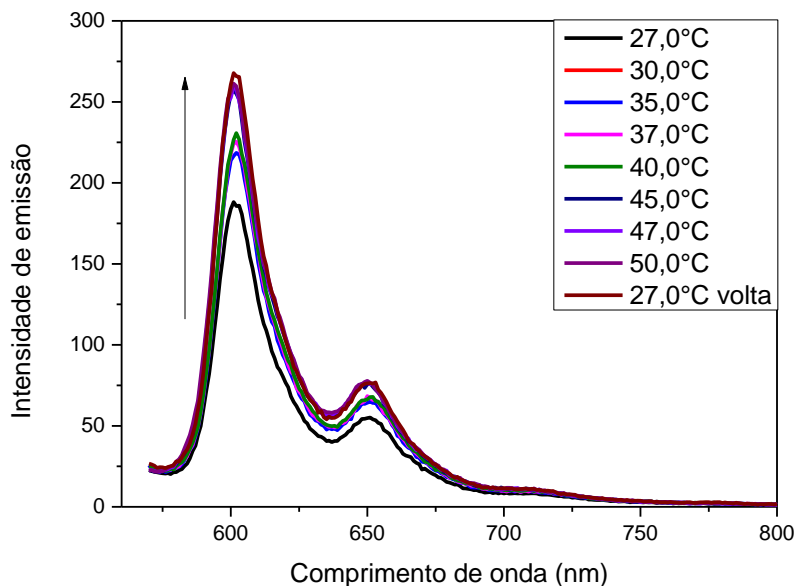


Figura 32. Variação espectral da intensidade de emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) encapsulada em DPPC ($5,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), com o aumento da temperatura de 27,0°C para 50,0°C ($\lambda_{exc} = 545$ nm e fenda 2,5-10).

A Figura 32 mostra o perfil espectral de emissão de fluorescência que a Hip encapsulada em DPPC assume com a variação da temperatura do sistema. Inicialmente, a 27,0°C, pode ser notada uma intensidade de emissão inferior a 200 (fenda 2,5-10). Com o aumento da temperatura do sistema, observa-se o conseqüente aumento da intensidade de emissão, que chega a atingir valores maiores que 250 (fenda 2,5-10). Mesmo com o retorno à temperatura inicial (27,0°C), o perfil de emissão adotado em 50,0°C é mantido. Este significativo aumento nas intensidades de emissão, mostrou-se semelhante ao que foi anteriormente observado nos estudos de supressão de fluorescência, realizados com iodeto de potássio em função da temperatura (Item 4.2a), onde a elevação da temperatura do

sistema mostrou por consequência um significativo aumento na emissão de fluorescência da Hip em DPPC. Esse comportamento pode ser associado à monomerização de espécies auto agregadas de Hip (dado que somente seus monômeros são capazes de emitir fluorescência), ou ainda, à mudança de localização do FS no carreador lipossomal (anteriormente relatada nos estudos de FRET (4.2b))³¹. Afim de monitorar a presença de possíveis auto agregados em solução, espectros de espalhamento de luz ressonante (RLS), foram coletados em cada temperatura, para as vesículas contendo Hip encapsulada e para aquelas livres de fármaco. Os gráficos de RLS dos sistemas são apresentados na Figura 33.

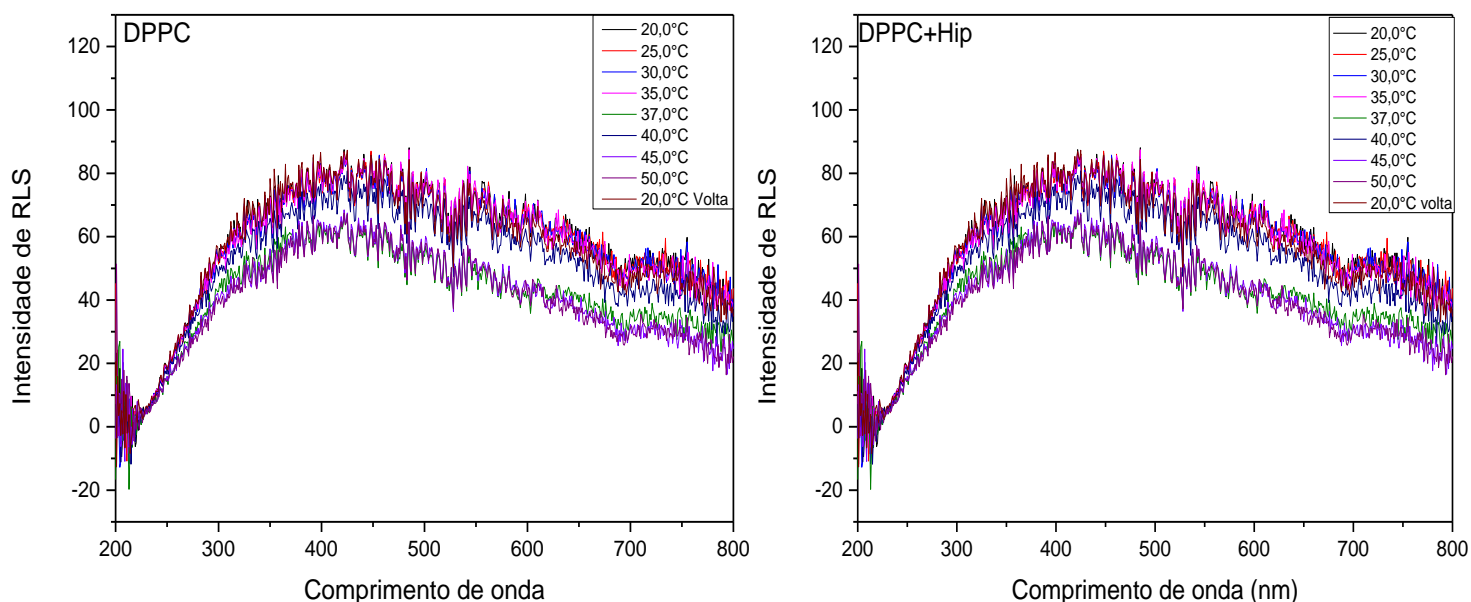


Figura 33. Espalhamentos de Luz Ressonante (RLS) das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC contendo Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e livres de fármaco, a 30,0°C (fendas 1,5-1,5).

A Figura 33 evidencia uma similaridade nos espalhamentos de luz ressonante, promovidos pelos formulados contendo Hip encapsulada em DPPC e pelas vesículas livres de fármaco, em todas temperaturas avaliadas. O RLS do sistema não revelou pico de

espécies auto agregadas de Hip em solução, confirmando que o aumento da emissão de fluorescência, anteriormente discutido, não pode ser atribuído à desagregação da mesma neste sistema, indicando que este aumento na intensidade de emissão deve estar ocorrendo em consequência da mudança de localização das moléculas de FS para uma região de maior hidrofobicidade, dentro das vesículas lipossomais.

Essa mobilidade da Hip dentro das vesículas de DPPC, é facilitada pelo aumento da temperatura do sistema, haja vista que em elevadas temperaturas, as vesículas lipossomais tornam-se mais fluídas dado sua condição “cristal-gel”(Figura 8). Para melhor compreensão destes resultados, monitorou-se, paralelamente, o espalhamento de luz dinâmico (DLS) das partículas, avaliando-se o tamanho médio das vesículas lipossomais unilamelares contendo Hip encapsulada e das vesículas livres de FS, em função da temperatura. Os gráficos são apresentados na Figura 34 e os valores de diâmetro das partículas mostrados nas Tabelas 5 e 6.

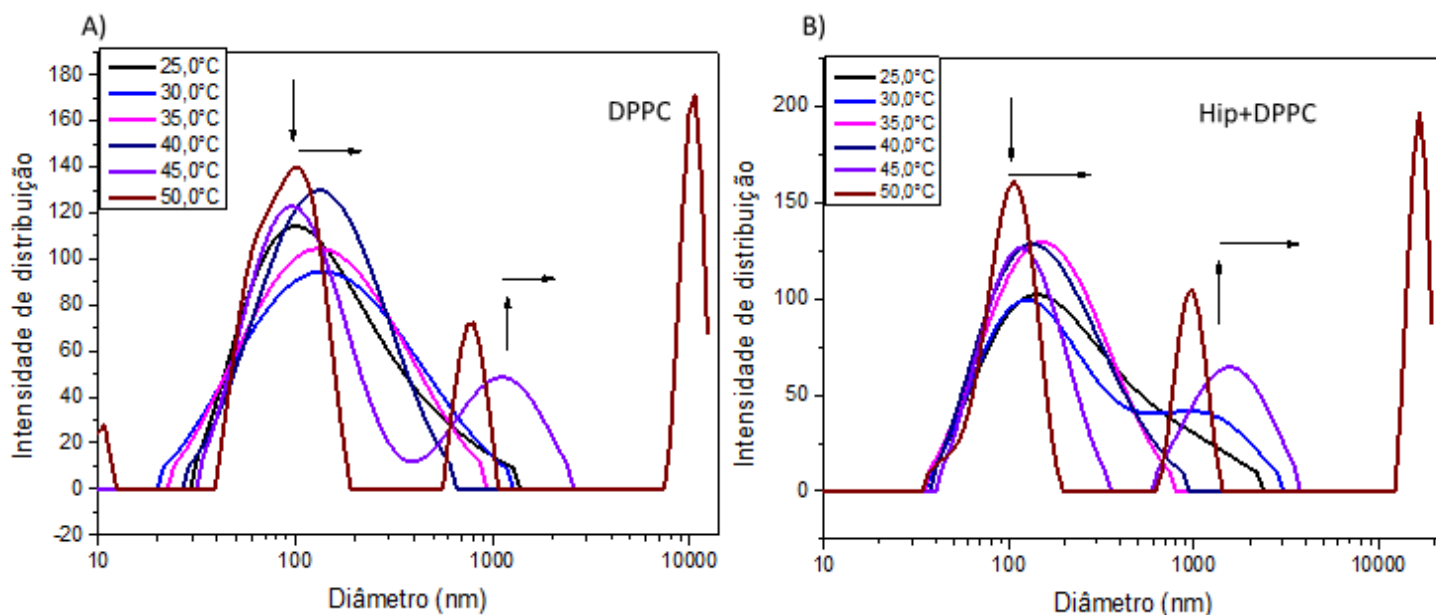


Figura 34. Espalhamentos de Luz Dinâmico: A) Antes e B) Após o encapsulamento da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em função da temperatura. As setas indicam a tendência do diâmetro e o surgimento das populações/perfis bimodais com o aumento da temperatura.

Tabela 5. Valores de diâmetro médio, D10% e D50% das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC livres de fármaco, em função da temperatura. Os valores de PI foram inferiores a 0,3 para todas as análises.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>	<i>D 10% (nm)</i>	<i>D 50% (nm)</i>
25,0	117,9	51,9	123,6
30,0	116,9	51,0	119,9
35,0	115,9	51,9	124,0
40,0	118,4	55,2	119,7
45,0	149,8	54,1	123,3
47,0	259,9	55,4	111,3
50,0	662,8	54,8	114,1

Tabela 6. Valores de diâmetro médio, D10% e D50% das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC contendo Hip, em função da temperatura. Os valores de PI foram inferiores a 0,3 em todas as análises.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Diâmetro médio (nm)</i>	<i>D 10% (nm)</i>	<i>D 50% (nm)</i>
25,0	146,7	64,7	141,3
30,0	147,0	62,9	146,0
35,0	145,3	63,6	145,8
40,0	147,4	63,1	144,8
45,0	240,4	69,1	154,7
47,0	468,7	67,5	144,3
50,0	-*	71,0	142,9

*Valor fora do limite de detecção do aparelho.

Até temperaturas inferiores a 40,0°C, as Tabelas 5 e 6 mostram que as vesículas lipossomais de DPPC apresentam valores de diâmetro médio relativamente inalterados com o aumento da temperatura do sistema, onde o valor de PI (~0,30) nos permite afirmar que estas encontravam-se uniformemente distribuídas com tamanho médio em torno de ~100 nm. Acima da transição de fase do fosfolípido, os valores de diâmetro médio oscilaram para valores extremamente elevados, até mesmo para fora do limite de detecção do aparelho. Os valores de D 10% e D 50% (referentes aos diâmetros de 10 e 50% das populações de vesículas presentes no sistema), também mostrados nas Tabelas 5 e 6, indicaram que mais da metade das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC não sofreram alterações significativas em seus tamanhos frente às variações de temperatura. Porém, conforme ilustrado na Figura 34, o aumento da temperatura do sistema promoveu o surgimento de perfis bimodais e de diversas populações de tamanhos maiores, sendo que ao atingirmos a temperatura de transição de fase do lipossoma (~45,0°C), foi observado um significativo aumento, tanto no tamanho quanto no número de populações, ocasionado pela maior fluidez do sistema, que assume sua forma “cristal-gel”^{28,34,35}.

Ainda que as vesículas lipossomais contendo Hip encapsulada apresentem maior diâmetro médio do que as vesículas livres de fármaco, o mesmo comportamento foi observado para ambos os casos com as variações de temperatura (Figura 34B e Tabela 5 e 6). Nos dois casos, o retorno à temperatura inicial restaurou o perfil adotado a 25,0°C, apresentando uma pequena diminuição no tamanho médio de todas as vesículas que continham Hip incorporada, conforme mostrado na Figura 35.

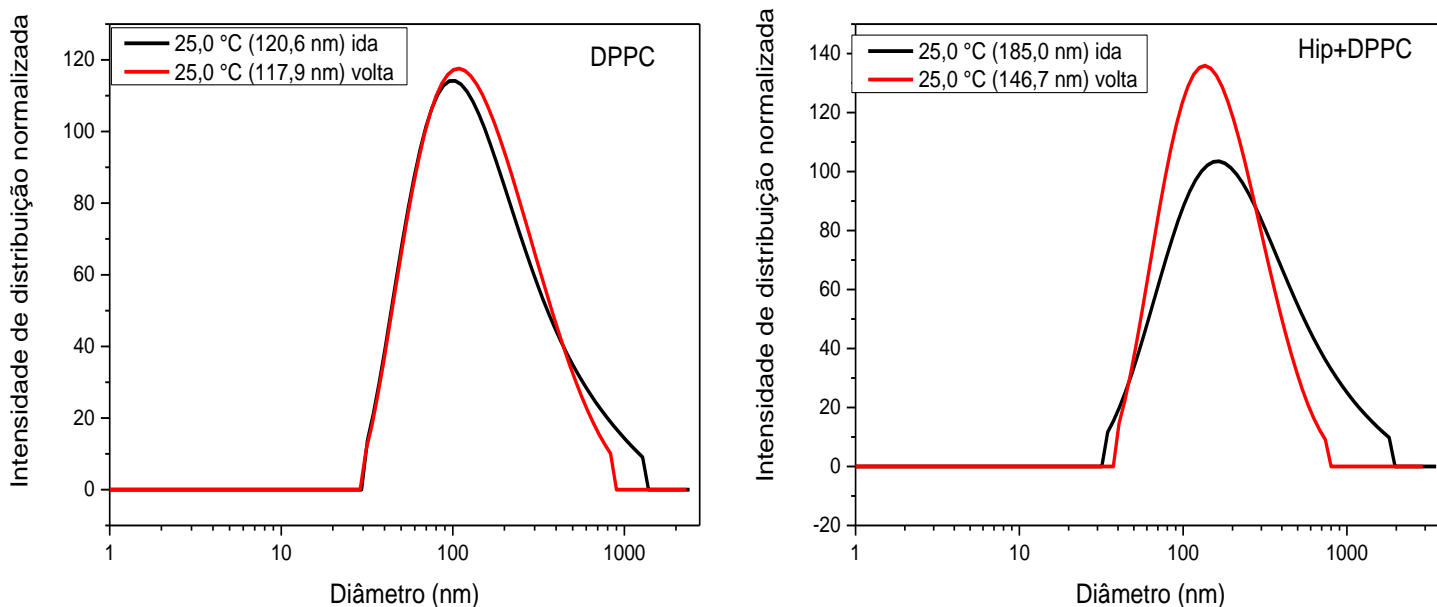


Figura 35. Monitoramento do diâmetro médio das vesículas unilamelares de DPPC contendo Hip encapsulada e livres dela após a estabilidade térmica.

Nota-se na Figura 35, que o retorno à temperatura inicial resultou em uma diminuição do diâmetro médio das vesículas lipossomais que continham moléculas de FS incorporadas (Figura 35B). Este resultado nos permite afirmar que as interações estabelecidas entre o par Hip/DPPC, além ser termodinamicamente favorecidas pelo aumento da temperatura, são mantidas, mesmo após o retorno a condição inicial (25,0°C).

4.3d. Estudo da estabilidade temporal do formulado hidratado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

É sabido que as vesículas lipossomais podem sofrer agregação, fusão ou ruptura membranar ao longo do tempo^{28,29,33}. Uma maneira de verificar a estabilidade relativa dos lipossomos é a através do monitoramento do diâmetro médio das vesículas contendo Hip

incorporadas no decorrer do tempo, em comparação com as mesmas “puras”, isto é, sem adição de fármaco. Nesse sentido, o formulado hidratado contendo Hip em DPPC, assim como as vesículas livres de fármaco, tiveram suas propriedades monitoradas imediatamente após o seu preparo e por um período de 10 dias consecutivos. Os gráficos de emissão de fluorescência e DLS são apresentados na Figura 36.

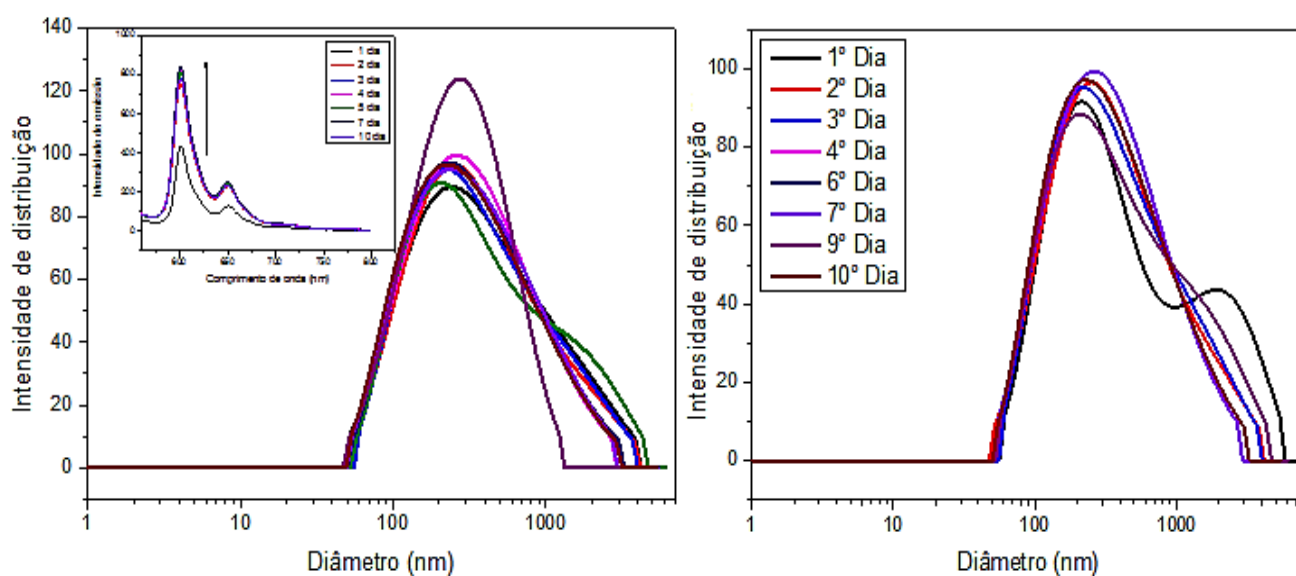


Figura 36. Em A) perfil de DLS e inserto emissão de fluorescência da Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, fenda 10-10), e em B) perfil de DLS das vesículas lipossomais unilamelares DPPC, ambos com o passar dos dias.

A Figura 36 mostra que tanto as vesículas livres de FS, quanto as que contém Hip encapsulada, mantiveram seu diâmetro médio inalterado por um período de 10 dias. É observado, do primeiro para o segundo dia (Figura 36A), um significativo aumento na emissão de fluorescência, indicando uma reorganização das moléculas de Hip no sistema com o passar do tempo. Como visto anteriormente em 4.1a, as moléculas deste FS possuem

um perfil cinético de ligação biexponencial com as vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, que pode ser termodinamicamente favorecido pelo aumento da temperatura do sistema. Isso ocorre porque, mesmo após incorporadas, as moléculas de Hip podem não acessar rapidamente o ambiente de maior hidrofobicidade do sistema, devido à rigidez do mesmo abaixo da transição de fase. Porém, uma vez que o sistema sofre variações de temperatura, para valores acima da transição de fase, a localização do fármaco é afetada e ele passa assumir uma localização em regiões de maior hidrofobicidade, mais internalizado nas vesículas.

4.3.e. Estudo da estabilidade temporal do formulado liofilizado/reidratado contendo Hipericina encapsulada em vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

O mesmo procedimento descrito em 4.3e foi realizado com os formulados mantidos liofilizados e acondicionados em freezer (-10 °C), por cerca de 60 dias. Após a reidratação com água destilada e sonicação por ~5min, foram monitorados os perfis espectrais de emissão de fluorescência e diâmetro médio das partículas. Os gráficos são apresentados a seguir (Figura 37).

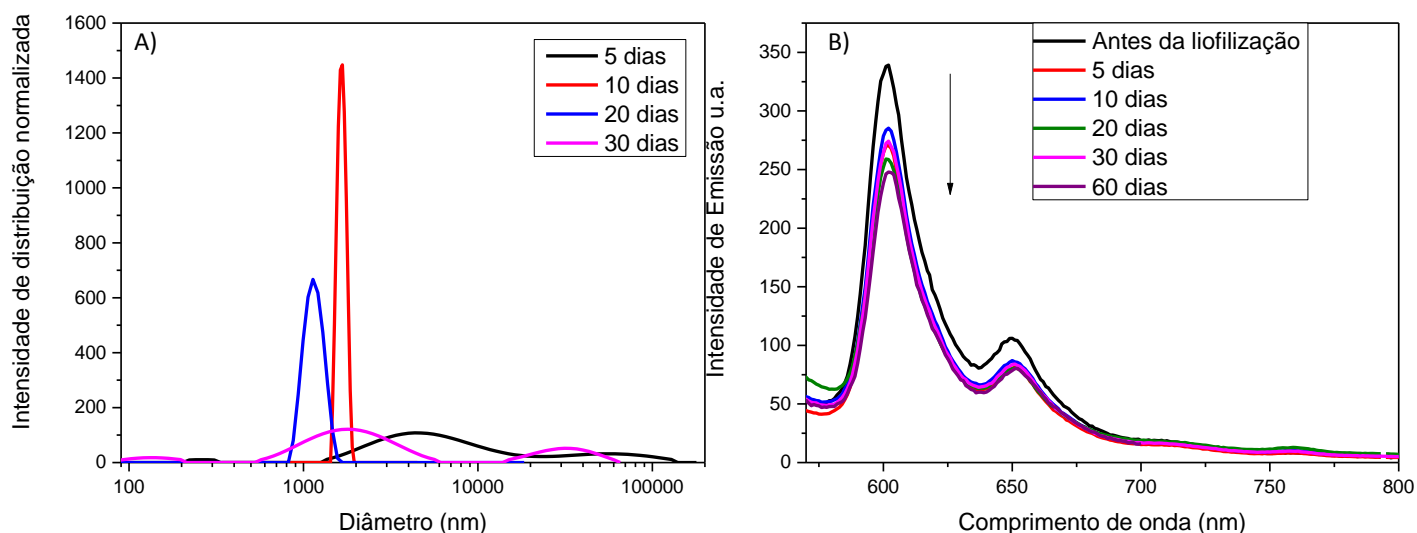


Figura 37. Perfil do formulado reidratado de Hip ($2,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) encapsulada nas vesículas lipossomais de DPPC ($5,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$): Em A) DLS no decorrer dos dias e em B) Emissão de fluorescência, ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, fenda 10-10).

Após a reidratação, as vesículas lipossomais tiveram seu tamanho alterado para valores superiores a 1000 nm (acima do limite de detecção do aparelho), apresentando diversas populações de tamanhos diferentes e evidenciando a perda de sua estrutura original (Figura 37A). Apenas uma pequena parcela de vesículas mantiveram seu tamanho inicial, indicando que o sistema não possui estabilidade frente o processo de liofilização. Isso ocorre porque, com o processo de liofilização, a água do sistema é sublimada até que obtenha a formulação na forma sólida (pó), sendo assim, a água do poço aquoso interno, que estrutura as vesículas lipossomais, é também removida durante o processo, o que não é verificado para micelas poliméricas constituídas de poloxâmeros P-123, por exemplo⁴⁴.

A estabilidade do formulado liofilizado também foi monitorada via espectros de emissão de fluorescência (Figura 37B). Inicialmente, o formulado apresentou uma queda na intensidade de emissão, ocasionada pela provável auto agregação das moléculas de Hip no carreador. Com o passar dos dias, é observado uma contínua queda nas intensidades de

emissão, porém menos significativa do que a primeira observada. Estas quedas podem ser associadas à perda do tamanho e forma original das vesículas lipossomais, mostrados nos gráficos de DLS (Figura 37A) e confirmam a ausência de estabilidade do sistema Hip/DPPC após o processo de liofilização/reidratação. Uma alternativa para contornar a ausência de estabilidade das vesículas lipossomais frente este processo, seria investigando sua estabilidade na presença de um crioprotetor, assegurando assim, que o poço aquoso que as constituem seja mantido, mesmo após a liofilização.

4.4. Avaliação da atividade fotodinâmica do formulado contendo Hipericina encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC

4.4a Ensaio com células melanoma B16-F10

O melanoma cutâneo metastático é conhecido por ser um dos tipos de câncer mais agressivos atualmente existentes e pode ser caracterizado pelo desenvolvimento e progressão das células do tipo B16-F10 no organismo^{61,68,69,71}. Atualmente, o arsenal terapêutico disponível para o tratamento desta doença, principalmente quando em seu estágio avançado, traz resultados bastante insatisfatórios, apresentando taxas de sobrevivência em 5 anos, inferiores à 5% e de sobrevivência mediana, em torno de 4 meses^{68,70}. Nesse sentido, buscou-se avaliar a potencialidade da Hip como FS aplicável em TFD, quando solubilizada em DMSO e encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC. Utilizando-se de diferentes concentrações de FS, a amostra foi avaliada no escuro (controle) e na

presença de luz, tendo sua atividade fotodinâmica estimada por meio da inibição das células. Os resultados de viabilidade celular são apresentados a seguir:

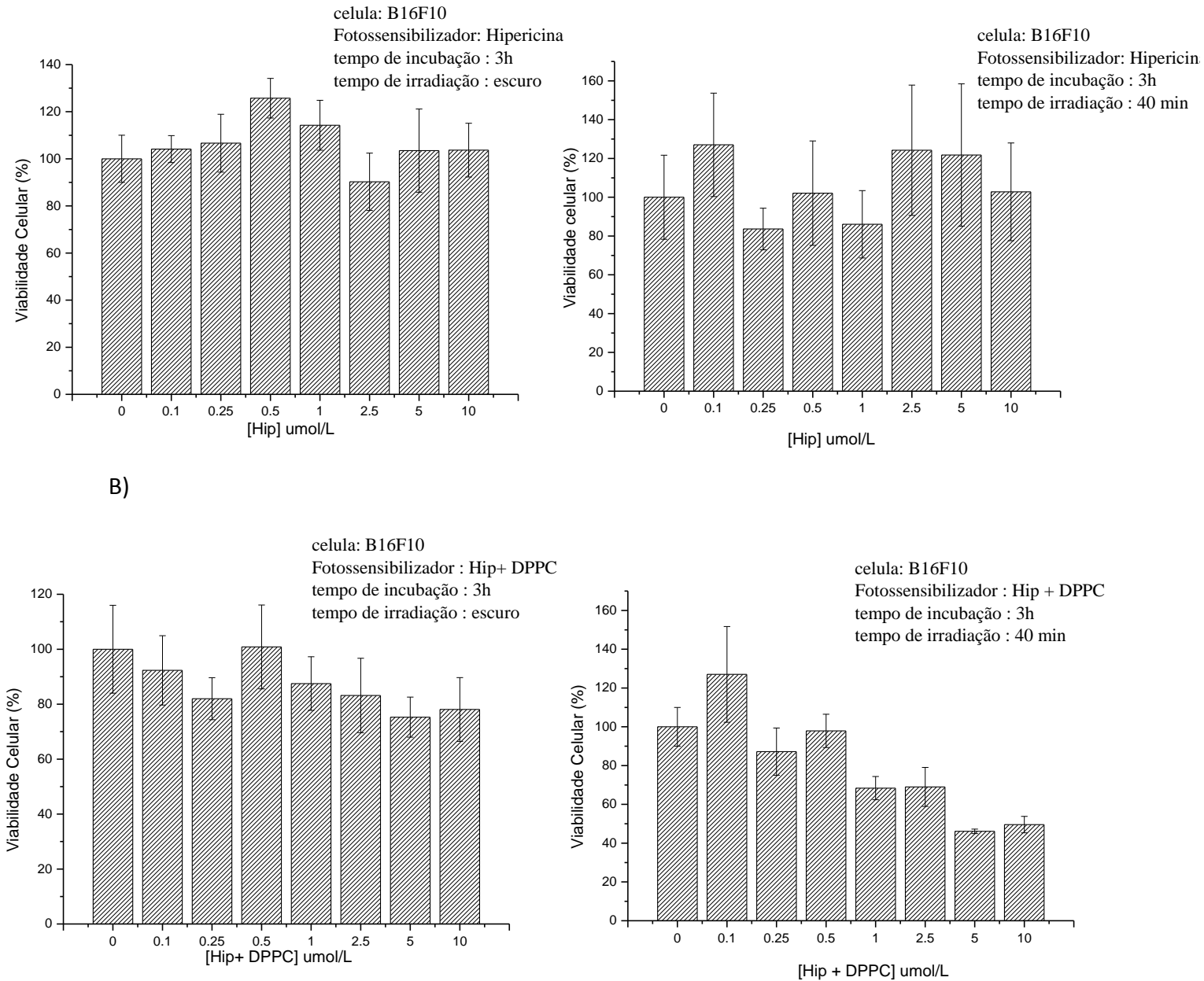


Figura 38. Viabilidade celular das células melanoma B16-F10 após 3 horas de incubação. Em A) Na presença da Hip em DMSO no escuro e com 40 min de iluminação. Em B) Na presença da formulação contendo Hip encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC, no escuro e após 40 min de iluminação (Potência da fonte de LED de 3,5 mW cm²).

Na Figura 38 são mostrados os gráficos referentes aos estudos de viabilidade celular realizados com as células de melanoma B16-F10, na presença de Hip em DMSO (Figura 38A) e encapsulada em DPPC (Figura 38B), no escuro e após 40 minutos de iluminação^{2,6,14}. Dado que a ação fotodinâmica ocorre a partir da excitação do composto FS com luz (de comprimento de onda correspondente com o de sua absorção), os gráficos ilustrados na primeira parte das Figuras 38A e B, foram utilizados como controle na avaliação da atividade fotodinâmica da Hip, e evidenciam a ausência de toxicidade da mesma quando no escuro, dada a relativa manutenção dos valores de viabilidade celular mesmo diante do aumento da concentração de Hip no sistema^{6,14,16,70}.

Para a Hip em DMSO, após a iluminação (Figura 38A), não foram observadas alterações significativas nos valores de viabilidade celular, dentro da incerteza. As exceções são as amostras com $0,25$ e 1×10^{-6} mol L⁻¹ de fármaco que apresentou uma ligeira queda nos valores de viabilidade (para ~85%). Para o FS encapsulado (segunda parte da Figura 38B), a viabilidade celular manteve-se inalterada na presença de baixas concentrações de Hip. No entanto, a partir de 1×10^{-6} mol L⁻¹ de Hip/DPPC, é observada uma significativa ação inibitória da formulação sobre as células melanoma, sendo maior para a mesma contendo 5×10^{-6} mol L⁻¹ de Hip (46,3% de viabilidade).

Estes resultados apontam para a potencialidade da formulação contendo Hip encapsulada em DPPC, agindo como FS na inativação das células melanoma B16-F10 via TFD, e mostra a Hip como fármaco ativo bastante promissor para aplicações futuras em TFD.

4.4a Ensaaios com *T. cruzi*

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é uma das 17 doenças negligenciadas, entre as quais encontram-se a malária, a leishmaniose visceral (LV), a filariose linfática, a dengue, esquistossomose entre outras⁵⁰. Essas doenças tropicais endêmicas são em geral acometidas por pessoas de baixa renda, e/ou que moram em países subdesenvolvidos, o que por consequência não desperta o interesse das indústrias farmacêuticas, que pouco investem em pesquisa para o desenvolvimento de fármacos para seu tratamento. Por esse motivo, cerca de 8 milhões de pessoas encontram-se atualmente infectadas com a doença de Chagas, sendo que, anualmente são registrados mais de 15 mil mortes de pacientes infectados com Chagas^{50,72}.

Diante disso, afim de desenvolver uma forma alternativa para o tratamento da doença, a formulação contendo Hip encapsulada em DPPC teve sua atividade fotodinâmica avaliada sobre o protozoário *T. cruzi*. Para isso, durante o cultivo do protozoário em laboratório, foram utilizadas células LLCMK2, que ficam aderidas ao fundo de uma garrafa, semelhante à ilustrada na Figura 10 (item 3.2.6b), de modo a serem mais facilmente infectadas pela forma tripomastigotas no DMEM. Dentro dessas células, as tripomastigotas vão então se modificar para a forma amastigotas (mais arredondada), para se multiplicarem e posteriormente retornar à forma tripomastigota⁷².

Devido à movimentação dos protozoários e à grande quantidade dos mesmos dentro das células, ocorre o rompimento celular, liberando as tripomastigotas para o DMEM^{48,50}. Nesse sentido, o líquido é então recolhido diariamente, para infectar novas

garrafas e realizar novos cultivos de protozoários. As imagens de microscopia óptica das células aderentes, antes e após sua infecção com *T. cruzi* são ilustradas na Figura 39.

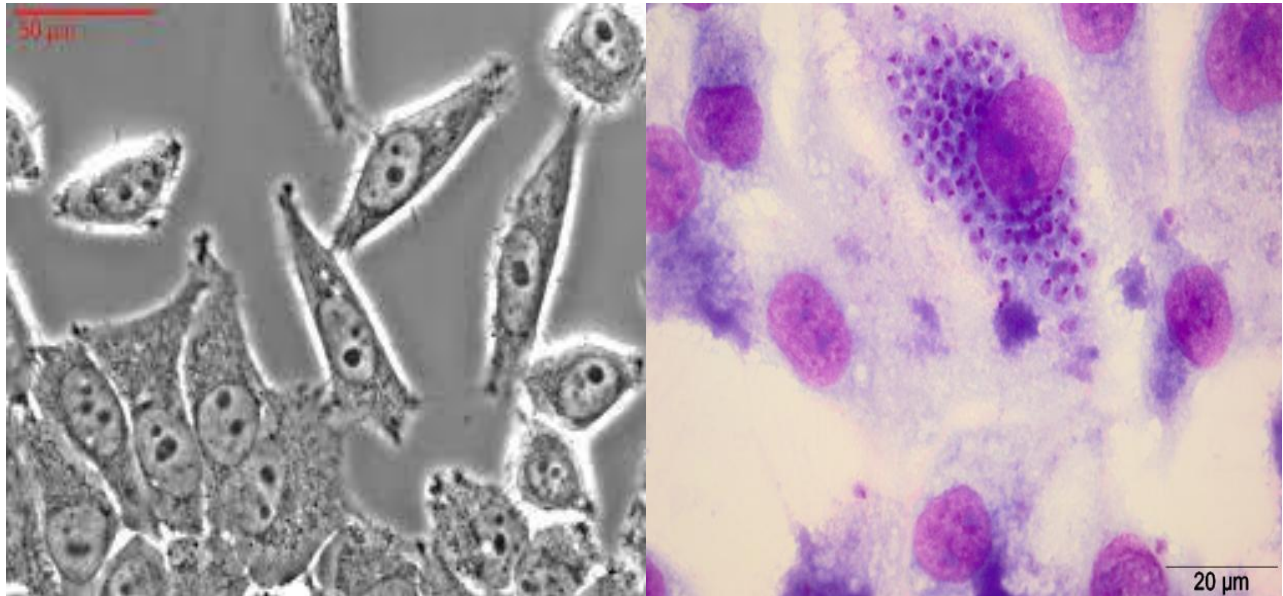


Figura 39. Imagens de microscopia óptica de células aderentes, por exemplo a LLCMK2, antes e após sua infecção com *T. cruzi*.

Na Figura 39 são ilustrados exemplos de imagens de células aderentes que são utilizadas para cultivo/reprodução do protozoário *T. cruzi* em laboratório. Na segunda parte da Figura 39, em uma versão mais ampliada e corada, podemos observar as células, o citoplasma e o núcleo. Também nessa imagem, pode-se notar que as formas tripomastigotas infectam preferencialmente o citoplasma celular.

Após a iluminação dos poços contendo *T. cruzi* na presença e na ausência da formulação de Hip/DPPC, os protozoários foram contabilizados e a viabilidade de tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* avaliada. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Determinação da atividade fotodinâmica do formulado Hip/DPPC sobre a viabilidade de tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, com tempo de iluminação de 20 min, fonte de laser diodo (LASER line[®]) de 100mW.

Hipericina	EC₅₀ (µmol/L) ± DP Presença de luz	EC₅₀ (µmol/L) ± DP Ausência de luz
Hipericina	0,38 ± 0,13	> 19,8
Hipericina + DPPC	3,01 ± 1,40	14,7 ± 1,27
Branco DPPC	> 5,29	> 5,29

A Tabela 7 mostra os valores EC₅₀, isto é, a concentração necessária para matar metade da população de protozoários de *T. cruzi* analisados. Na primeira linha da Tabela 7, são mostrados os valores de EC₅₀ para o FS livre de formulação, na presença e ausência de luz. Nota-se que a maior inativação dos protozoários ocorre quando a Hip é iluminada, ainda que não se encontre encapsulada, evidenciando o efeito fotodinâmico deste FS sobre o parasita na presença de luz.

Para Hip encapsulada em DPPC, foi observado um valor de EC₅₀ superior ao obtido em etanol, porém na mesma faixa de concentração na qual foram conduzidos os demais estudos relatados nesse presente trabalho, evidenciando uma potencialidade da formulação desenvolvida/estudada. O menor valor de EC₅₀ observado para a Hip em etanol, está associado à preferência deste protozoário em se alocar/interagir com o citoplasma, isto

é, há uma preferência por ambientes mais hidrofílicos, que por consequência promovem a auto agregação das moléculas de Hip. O sistema carreador livre de Hip, mostrou-se pouco tóxico para os protozoários, tanto na presença quanto na ausência de luz, indicando que as vesículas lipossomais de DPPC são adequadas e não interferem nos resultados obtidos. Visando a aplicação em TFD, a formulação contendo Hip encapsulada nas vesículas lipossomais unilamelares de DPPC mostrou-se bastante promissora no tratamento da doença de Chagas, utilizando-se de baixas concentrações de FS e pouco tempo de iluminação.

5. Conclusão

Neste trabalho, os estudos envolvendo tamanho das partículas via DLS, revelaram um aumento do diâmetro médio das vesículas lipossomais unilamelares de DPPC de cerca de 50 nm, com o processo de encapsulamento da Hip. O perfil cinético de ligação do FS no carreador lipossomal revelou a presença de duas etapas, relacionadas à incorporação e redistribuição do fármaco no sistema. Os espectros de absorção eletrônica e emissão de fluorescência apresentaram pequenos deslocamentos batocrômicos (~5 nm), devido à mudança de microambiente proporcionado pelas vesículas.

A interação entre o par Hip/DPPC, mostrou-se maior com o aumento da temperatura (maiores valores de K_b). Através dos valores negativos de ΔG , foram determinados os demais parâmetros de ativação do sistema, como ΔH e ΔS , acima e abaixo da transição de fase do fosfolipídio, que evidenciaram a espontaneidade da Hip em se incorporar no fosfolipídio DPPC, sendo este processo endotérmico ($\Delta H > 0$).

A Eficiência de Encapsulamento ($EE\%$) da formulação, comprovou que o processo é termodinamicamente favorecido pelo aumento da temperatura, sendo cerca de 17% mais eficiente em temperaturas mais elevadas (89,3% a 50,0°C), do que a 30,0°C (74,3%). Nos estudos de localização ficou evidente a maior penetração da Hip na bicamada lipídica acima da temperatura de transição do DPPC, não sendo possível estimar valor de K_{sv} a 50,0°C, utilizando iodeto como supressor aquosolúvel. No entanto, a 30,0°C os valores de K_{sv} revelaram a presença de duas populações distintas e acessíveis ao supressor, com valores de K_{sv} de 4,18 e 1,87. Essa mudança de localização do FS promovida pelo aumento da temperatura do sistema, foi confirmada nos estudos de FRET, que apontaram para distâncias de 29,7 e 36,7Å com relação ao DPH a 30,0 e 50,0°C, respectivamente.

A incorporação da Hip nas vesículas lipossomais de DPPC à 50,0°C, teve por consequência um leve aumento no valor de Φ_F para 0,30, proporcional diminuição no valor de $\Phi\Delta^1O_2$ para 0,26 e significativo aumento no tempo de vida do oxigênio singlete (τ). Adicionalmente, os estudo de estabilidade térmica mostrou que mesmo diante das variações de temperatura, o sistema foi capaz de restaurar o perfil das vesículas lipossomais e manter as alterações observadas na emissão. A estabilidade temporal dos formulados recém preparados de Hip/DPPC, foi avaliada por dez dias consecutivos, apresentando uma reorganização temporal do FS, verificada na emissão. No entanto, após o processo de liofilização/reidratação de diversas amostras, houve destruição e perda da estrutura e tamanho original das vesículas lipossomais.

Por fim, os estudos atividade fotodinâmica realizados com células de melanoma B16-F10 e em protozoários *T. cruzi* tornaram evidente a potencialidade da formulação desenvolvida, que apresentou valores de viabilidade celular e IC_{50} bastante promissores com concentrações da ordem de 3 a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de FS, apontando a Hip como uma forte

candidata a FS para tratamentos com TFD/IFDMO, devendo a temperatura formulação ser primeiramente elevada acima da transição de fase do fosfolipídio, antes de sua aplicação.

6. Referências

¹ Adina Lavi, Hana Weitman, Robert T. Holmes, Kevin M. Smith, Benjamin Ehrenberg. “The depth of porphyrin in a membrane and the membrane’s physical properties affect the photosensitizing efficiency”, *Biophysical Journal*, vol. 82, pp.2102-2110, 2002

² A. Ormond and H. Freeman, “Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy.” *Materials*, vol. 6, no. 3, pp. 817–840, Mar. 2013.

³ A. Lagutschenkov, O. Dopfer, “ Infrared spectrum of a protonated fluorescence dye: Acridine Orange”, *Journal of Molecular Spectroscopy*, vol. 268, pp. 66-77, 2011.

⁴ M. Ali, “ Topical delivery and photodynamic evaluation of a multivesicular liposomal Rose Bengal”, *Lasers in Medical Science*, vol. 26, pp. 267-275, 2011.

⁵ Thomas J. D Ougherty, Charles J. Gomer. Barbara W. Henderson, Giulio Jori, David Kessel, Mladen Korbelik, Johan Moan, Qian Peng, “Review: Photodynamic Therapy”, *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, pp. 889-905, 1998.

⁶ C.A. Robertson, D. Hawkins Evans, H. Abrahamse, “Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 96, pp.1-8, 2009.

- ⁷ D. Harryvan, W. Lubberhuizen, E. Faassen “ Characterization of the magneto-optical properties of eosin Y and erythrosin”, *Chemical Physics Letters*, vol. 257, pp. 190-196, 1996.
- ⁸ I. Macdonald, T. Dougherty, “ Basic principles of photodynamic therapy”, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines (JPP)*, vol. 05, pp. 105-129, 2001.
- ⁹ D. Bechet, S. Mordon, F. Guilemin, “ Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies”, *Cancer Treatment Reviews*, vol. 40, pp. 229-241, 2014.
- ¹⁰ A. Gerola, B. Estevão, W. Caetano, “ Estudos quimiométricos da pheo formulada em pluronics® : Ação fotodinâmica sobre Artemia salina”, *Quimica Nova*, vol. 36, pp. 97-101, 2013.
- ¹¹ Fischkoff, S., and J. M. Vanderkooi.” Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene”. *J. Gen. Physiol.* 65:663– 676, 1975.
- ¹² H. Falk, G. Schoppel, “ A synthesis of emodin anthrone”, *Monatshefte Chemie Chemical Monthly*, vol. 122, pp. 739-744, 1991.
- ¹³ Y. Mazur, H. Bock, D. Lavie, “Preparation of hypericin”, *United States Patent US5120412A*, 1989.
- ¹⁴ R. Sanovic, T. Verwanger, A. Hartl, B. Krammer, “ Low dose hypericin-PDT induces complete tumor regression in BALB/c mice bearing CT26 colon carcinoma”, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 8, pp. 291-296, 2011.
- ¹⁵ Willian T. Couldwell MD, Amy A. Surnock, Alfonso J. Tobia, Bernard E. Cabana, Charles B. Stillerman, Peter A. Forsyth, Alan J. Appley, Alexander M. Spence, David R.

Hinton, Thomas C.Chen. "A phase ½ study of orally adinistration synthetic hypericin for treatment of recurrent malignant gliomas" *Cancer*, vol. 117, pp. 4905-4915, 2011.

¹⁶ M. Olivo, C Fu, V. Raghavan. "New frontier in hypericin-mediated diagnosis of cancer with current optical Technologies". *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 40, pp. 460-473, 2012.

¹⁷ S. Kascakova, M. Refregiers, D. Jancura, F. Sureau, J. C. Maurizot, P. Miskovsky, "Fluorescence spectropic study of hypericin-photosensitized oxidation of low-density lipoproteins", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 81, pp. 1395-1403, 2005.

¹⁸ C. Head, Q. Luu,J. Sercarz,"Photodynamic therapy and tumor imaging of hypericin-treated squamous cell carcinoma", *World Journral of surgical oncology*, vol.4, pp.87, 2006.

¹⁹ N. Durán, P. Song, "Hypericin and its photodynamic action", *Photochemistry and photobiology*, vol. 43, pp. 677-680, 1986.

²⁰ G. Kitanov, "Hypericin and pseudohypericin in some Hypericum species", *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 29, pp. 171-178, 2001.

²¹ H. Sim, W. Lau, M. Olivo, P. H. Tan, C. W. S. Cheng, "Is photodynamic diagnosis using hypericin better than White-light cystoscopy for detecting superficial bladder carcinoma?", *BJU International*, vol. 95, pp. 1215-1218, 2005.

²² S.M. Arabei, J.P. Galaup, P. Jardon,"Analysis of the site selected fluorescence and the phosphorescence spectrum of hypericin in ethanol" *Chemical Physics Letters*, vol.270, pp.31-36, 1997

- ²³ P. Agostinis, A. Vantieghem, W. Merlevede, De W. Peter, ” Hypericin in câncer treatment: more light on the way”, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 34, pp. 221-241, 2002.
- ²⁴ J. Wynn, T. Cotton, “ Spectroscopic Properties of Hypericin in Solution and at Surfaces”, *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 99, pp. 4317-4323, 1995.
- ²⁵ T. Yamazaki, N. Ohta, I. Yamazaki, P. S. Song, “ Excited-State properties of hypericin: electronic spectra and fluorescence decay kinetics”, *The Journal of Chemistry*, vol. 97, pp. 7870-7875, 1993.
- ²⁶ A. Lima, C. Pizzol, F. Monteiro.”Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles : Phototoxicity and photodynamic efficiency”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 125, pp.146-154, 2013.
- ²⁷ Y. Ho, M. Wu, B. Cheng, Y. W. Chen, M. C. Shih, “Lipid-mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes”, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, vol. 1788, pp. 1287-1295, 2009.
- ²⁸ A. Conceição, C. Matos, C. Moutinho, “ Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares”, *Revista da Faculdade de Ciências e Saúde*, vol. 6, pp. 50-59, 2009.
- ²⁹ A. Bangham, “Lipossomas e as suas aplicações na atualidade”, *Universidade de Évora- Departamento de Química*, pp 1-3, 1960.
- ³⁰ C. Batista, C. Carvalho, N. Magalhães, “ Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte”, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 43, pp. 167-179, 2007.
- ³¹ S. Gnoatto,”Lipossomas aplicados em farmacologia: Uma revisão da literatura“, *Estud. Biol.*, vol 29, pp.215-224, 2007.

³² N. Santos, M. Castanho, “Lipossomas: a bala mágica acertou?”, *Química Nova*, vol. 25, pp. 1181-1185, 2002.

³³ H. Ferreira, M. Lúcio, C. Siquet, S. Reis, “Utilização de modelos membranares na avaliação da atividade de fármacos” *Química*, vol. 99, pp. 39-51, 2005.

³⁴ Stephanie Tristram-Nagle, John F. Nagle, “Lipid bilayers: thermodynamics, structure, fluctuations and interactions”, *Chemistry and Physics of Lipids*, vol.127, pp. 3-14, 2004.

³⁵ Min Wang, Thomas Zander, Xiaoyan Liu, Chao Liu, Akanksha Raj, D.C. Florian Wieland, Vasil M. Garamus, Regine Willumeit-Romer, Per Martin Claesson, Andra Dedinaite, “The effect of temperature on supported dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers: Structure and Lubrication Performance” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol 445, pp.84-92, 2015.

³⁶ K. Sakai, H. Tomizawa. K. Tsuchiya, “Characterizing the structural transition of cationic DPPC liposome from the approach of TEM, SAXS and AFM measurements”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 67, pp. 73-78, 2008.

³⁷ Kubin, F. Wierrani, U. Burner, G. Alth, W. Grünberger, “Hypericin: the facts about a controversial agent”, *Current pharmaceutical design*, vol.11, pp. 233-253, 2005.

³⁸ M. Roslaniec, H. Weitman, D. Freeman, Y. Mazur, B. Ehrenberg, “Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of hypericin, tetrahydroxy helianthone and their derivatives: Studies in organic solutions and in liposomes”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 57, pp. 149-158, 2000.

³⁹ Martin, F. e Lasic, D.D. “Stealth Liposomes” Editado por Martin F. e Lasic, D.D., CRC Press, New York, 1995.

- ⁴⁰ W. Caetano, M. Tabak, “Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with ionic micelles: electronic absorption spectroscopy studies”, *Spectrochimica Acta Part*, vol. 55, pp. 2513-2528, 1999.
- ⁴¹ Castellan, G.W. *Fundamentos de Fisico Química*, Livros Tecnicos e Cientificos, Rio de Janeiro, 1986.
- ⁴² T. Yamazaki, N. Ohta, I. Yamazaki, P. S. Song, “Excited-state properties of hypericin: eletronic spectra and fluorecence decay kinetics”, *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 97, pp. 7870-7875, 1993.
- ⁴³ Skoog, A. D., West, D. M., Holler, F. J., Chouch, R. S. “Fundamentos de Quimica Analitica” *Thonson, Learningf*, Tradução da 8^a ed norte americana, 2006.
- ⁴⁴ Lakowicz JR, Masters BR. Principles of fluorecence spectroscopy. *Journal of biomedical optics* 2008.
- ⁴⁵ Rabello, B. R., Gerola, A. P., Pellosi, D. S., Tessaro, A. L., Aparício, J. L., Caetano, W., & Hioka, N. “Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation”. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2012.
- ⁴⁶ G. B. Cesar, “Estudos Físico-Químicos da Hipericina Encapsulada em Micelas Copoliméricas do Polaxâmero P-123: Aspectos Fotofísicos e Fotoinativantes sobre Microorganismos”, *Programa de Pós Graduação em Química*, 2014.
- ⁴⁷ H. Weitman, M. Roslaniec, a. Frimer, M. Afri, D. Freeman, Y. Mazur, B. Ehrenberg, “Solvatochromic effects in the electronic absroption and nuclear magnetic resonance spectra of hypericin in organic solvntes and in lipid bilayers”, *Photochemistry and Photobiology*, vol. 73, pp. 110-118, 2001.
- ⁴⁸ Denizot, F. and Lang, R. “Rapid colorimetric assay for cell growth and survival”. *J. Immunol. Methods* vol. 89, pp. 271, 1986.

- ⁴⁹ Choo, T.C. and Hayball, M.P. "CalcuSyn Windows Software for Dose Effect Analysis Biosoft" Cambridge, MA, 1996.
- ⁵⁰ Valdez, R. H.; Tonin, L. T. D.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Morgado-Diaz, J. A.; Sarragiotto, M. H.; Nakamura, C. V. "Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*". *Acta Tropica*, v. 110, p. 7-14, 2009.
- ⁵¹ Brener, Z. "Therapeutic activity criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, p. 386-396, 1962.
- ⁵² Sliney, D. H. "Radiometric quantities and units used in photobiology and photochemistry: recommendations of the commission internationale de l'Eclairage (International commission on illumination)". *Photochemistry and Photobiology*, v. 83, p. 425-432, 2007.
- ⁵³ L. Buriankova, D. Buzova, D. Chorvat, "Kinetics of hypericin association with low-density lipoproteins", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 87, pp. 56-63, 2011.
- ⁵⁴ V. Senthil, J. Longworth, C. Ghiron, L. I. Grossweiner, "Photosensitization of aqueous model systems by hypericin", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1115, pp. 192-200, 1992.
- ⁵⁵ A. M. Lima, "Encapsulação de Fotossensibilizadores em nanoparticulas lipídicas solidas para maximização da eficiência fotodinâmica e fototoxicidade", *Instituto IQSC*, 2015.
- ⁵⁶ Joakim P. M. Jambeck, Emma S. E. Eriksson, Aatto Laaksonen, Alexander P. Lyubartsev, Leif A. Eriksson, "Molecular Dynamics Studies of Liposomes as Carriers for Photosensitizing Drugs: Development, Validation and Simulations with a Coarse-Grained Model" *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 10, pp.5-12, 2014

- ⁵⁷ M. Pietrzak, M. Maciejczyk, M. Szabelski, A. Kasparek, Z. Wieczorek, “ Self-association of hypericin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulations”, *Chemical Physics Letters*, vol. 601, pp. 39-44, 2014.
- ⁵⁸ F. Lenci, N. Angelini, F. Ghetti, A. Sgarbossa, A. Losi, A. Vecchi, C. Viappiani, P. Taroni, A. Pifferi, R. Cubeddu, “Spectroscopic and photoacoustic studies of hypericin embedded in liposomes as a photoreceptor model”, *Photochemistry and Photobiology*, vol. 62, pp. 199-204, 1995.
- ⁵⁹ P. M. Nassar, L. E. Almeida, M. Tabak, “ Binding of dipyrindamole to phospholipid vesicles: a fluorescence study”, *Biochimica and Biophysica acta*, vol. 1328, pp. 140-150, 1997.
- ⁶⁰ E. Güzel, A. Atsay, S. Nalbantoglu, N. Şaki, Dogan, G. Lale, K. Ahmet, B. Makbule, “ Synthesis, characterization and photodynamic activity of a new amphiphilic zinc phthalocyanine”, *Dyes and Pigments*, vol. 97, pp. 238-243, 2013.
- ⁶¹ F. T. Stephania, “Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele”, *Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto*, 2009.
- ⁶² Repáková J, Capková P, Holopainen JM, Vattulainen I. “Distribution, orientation, and dynamics of DPH probes in DPPC bilayer”. *The Journal of Physical Chemistry B*, vol 108, pp. 13438-13448, 2004.
- ⁶³ Loren Nieto Trujillo, “Estudo da transferência de energia tipo Forster em sistemas hóspede-hospedeiro a partir de corantes encapsulados em Zeolitas L”, *Instituto São Carlos da USP*, 2015.

⁶⁴ Yunn-Fang Ho, Ming-Huang, Bor-Her Cheng, Yar-wen Chen, Ming-Chih Shih. “Lipid-mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes”, *Bichimica et Biophysica Acta*, vol.1788, pp.1287-1295,2009.

⁶⁵ L. C. Machado, S. A. Gnoatto, M. L. W. Klüppel, “Liposomes applied in pharmacology: a review”, *Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade*, vol. 29, pp. 215-224, 2007.

⁶⁶ Redmond, R.W. and Gamlin, J. N. *Photochemistry and Photobiology*, vol. 70, pp. 391-475, 1999.

⁶⁷ Darmany, A. P., Burel, L.; Eloy, D.; Jardon, P. “Singlet oxygen production by hypericin in various solvents”. *J. Chim. Phys.* Vol, 91, pp. 1774-1785, 1994.

⁶⁸ Sandra Burghoff, Zuan Gong, Claudia Viethen, Christoph Jacoby, Ulrich Flogel, Sabine Bongardt, Anne Schorr, Andreas Hippe, Bernhard Homey and Jurgen Schrader, “Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice”, *BMC Cancer*, vol 14, pp 898, 2014.

⁶⁹ K. Ishii, A. Takayanagi, S. Shimizu, “In vitro photodynamic effects of phthalocyaninosilicon covalently linked to 2,2,6,6-tetramethyl-1—piperidinyloxy radicals on cancer cells”. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 38, pp. 920-927, 2005.

⁷⁰ M. Olivo, S. Lucky, J. Kent Mancer.” Altered expression. Of cell adhesion molecules leads to differential uptake of hypericin in urothelial cancer”, *Urologic Oncology : Seminars and Original Investigations*, vol. 30, pp.624-634, 2012.

⁷¹ A. Raz, W. L. McLellan, I. R. Hart, C. D. Bucana, L. C. Hoyer, B-A. Sela, P. Dragsten and I. J. Fidler, “Cell Surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential”, *Cancer Research*, vol. 40, pp. 1645-1651, 1980.

⁷² Ferreira, E. I., "Planejamento de fármacos na área de doença de Chagas: Avanços e Desafios", *Revista Virtual de Química*, vol. 4(3), pp. 225-246., 2012.
