

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

DAYANE BATISTA TADA

**Desenvolvimento de Nanopartículas
Fotossensibilizadoras**

São Paulo

1º de novembro de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DAYANE BATISTA TADA

**Desenvolvimento de Nanopartículas
Fotossensibilizadoras**

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

São Paulo

2007

Dayane Batista Tada

Desenvolvimento de Nanopartículas Fotossensibilizadoras

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

A meus pais, Euclides e Marlene, e
à minha irmã, Erika.

Por ter vocês, nenhuma
dificuldade é impedimento e
toda alegria é completa.

Agradecimentos

Ao professor Mauricio, pela amizade, pelos conselhos e pela orientação acadêmica.

Aos colegas de laboratório: Adjaci, Carla, Chris, Dino, Divinomar, Décio, Elisa, Milton, Nasser, Moisés, Magali, Mandela, Patricia, Rodrigo, Tathyana, Tatiane e Vivi, pelas colaborações no trabalho e na bagunça.

À amiga Helena, com quem eu sempre pude contar desde o meu primeiro dia neste instituto.

À amiga Carla Oliveira, por me auxiliar em experimentos e compartilhar seus conhecimentos desde a minha iniciação científica.

Aos professores Alicia Kowaltowski, Liane Rossi, Luiz Henrique Catalani, Koiti Araki, Rosangela Itri, e a seus alunos e técnicos, Erick, Fernando, Lucas, Evandro, Luis e Camile, por compartilharem materiais e equipamentos.

Ao professor Alexandre Barbuto, a todo o pessoal de seu laboratório, em especial à Célia, por ter me ensinado a cultivar células.

À professora Denise Siqueira Petri e à sua aluna, Lizandra, pelas medidas de microscopia de força atômica e elipsometria.

À amiga Giselle, por todo o esforço “em busca do superóxido”.

Aos amigos do CEA, em especial, ao Thierry, Roberto e Manú, por toda atenção que dedicaram à mim durante meu estágio em seu laboratório.

À professora Liane Rossi, por sua grande colaboração em meu trabalho.

Aos “meninos de casa”, por conversas à toa, risadas e companhia, que amenizaram os momentos de muito cansaço.

A todos os amigos, por todas as vezes que disseram: “calma, vai dar tudo certo!”.

À minha família, que está sempre torcendo por mim.

À FAPESP, que financiou este trabalho.

“Não há dúvida: pensar me irrita,
pois antes de começar a pensar eu
sabia muito bem o que eu sabia.”

Clarice Lispector
Aprendendo a viver

Resumo

Tada, D.B. **Desenvolvimento de Nanopartículas Fotossensibilizadoras**. 2007. (119p). Tese. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

No presente trabalho são apresentadas a síntese e a caracterização estrutural, fotofísica, fotoquímica e fotobiológica de nanopartículas contendo os fotossensibilizadores (FS) Azul de Metileno (AM) e Tionina. AM e Tionina foram incorporados nas nanopartículas sil-AM e sil-Tio pelo processo sol-gel. Nas nanopartículas Cab-Tio, Tionina foi ligada à superfície de sílica CabOsil[®] através de ligação covalente com reagentes bifuncionais. Todas as nanopartículas mostraram-se esféricas e com de diâmetro médio na faixa de 30 a 60nm. A imobilização dos FS induziu a agregação destes em extensões diferentes para cada tipo de nanopartícula. Foi observado que a maior presença de dímeros de FS leva à menor eficiência de geração de ¹O₂. Constatou-se que as nanopartículas sofrem pouca influência do meio, uma vez que os FS a elas ligadas não sofreram redução química por NADPH, nem supressão do estado tripleto por íons ascorbato e a supressão de fluorescência por íon brometo foi diminuída. Foi testado também o efeito do recobrimento destas nanopartículas com lipídios dioleilfosfatidil colina (DOPC) e fosfatidilglicerol (PG) e com Polietileno glicol (PEG). A adsorção das nanopartículas sobre membranas miméticas foi reduzida após os recobrimentos, resultado que foi explicado pelas interações de carga superficial (potencial zeta) e pela força de hidratação. As nanopartículas sil-AM e Cab-Tio apresentaram fototoxicidades *in vitro*, 38% e 20% maiores que os respectivos FS livres. A modificação das nanopartículas de sil-AM com lipídios e com PEG diminuiu a fototoxicidade das mesmas e no caso do recobrimento com lipídios levou ao aumento da toxicidade no escuro. Imagens de microscopia confocal mostraram que as nanopartículas com e sem recobrimento de lipídios entram em células B16. No caso das nanopartículas recobertas, observou-se um perfil de distribuição difuso por todo o citoplasma e no caso de nanopartículas sem recobrimento, estas encontraram-se em poucas regiões vacuolares do citoplasma. O perfil de distribuição homogênea por todo o citoplasma no caso de nanopartículas recobertas com lipídios pode ser o responsável pelo aumento de toxicidade no escuro. Concluiu-se que a ligação dos FS em nanopartículas com diferentes graus de agregação pode ser uma estratégia para obtenção de sistemas com capacidade modulada de geração de ¹O₂ e com reduzida susceptibilidade às composições do meio. As atividades fototóxicas das nanopartículas contra células B16 mostraram que estas podem ser úteis em Terapia Fotodinâmica de Câncer.

Palavras-chave: Nanopartículas, oxigênio singlete, Azul de Metileno, Tionina, Terapia Fotodinâmica, PDT.

Abstract

Tada, D.B., **Development of photosensitizing nanoparticles**. 2007. 119p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work we present the synthesis and the characterization (structural, photophysical, photochemical and photobiological) of nanoparticles with incorporated photosensitizers (PS) Methylene Blue (MB) and Thionin. MB and Thionin were incorporated in sil-MB and sil-Th nanoparticles through sol-gel process. In the case of Cab-Th nanoparticles Thionin was linked to the surface of CabOsil[®] nanoparticles through cross-linking reactions. All nanoparticles were spherical and presented average diameter in the range of 30 to 60nm. Different extension of PS aggregation was observed in each nanoparticle. It was characterized that the higher the proportion of dimers to monomers the smaller the efficiency of singlet oxygen (¹O₂) generation. It was shown that nanoparticles can protect PS from external interferences, since NADPH did not reduce them, neither were their triplet state quenched by ascorbate ions. Besides, fluorescence quenching by bromide ions was reduced compared to free PS. The effect of covering the nanoparticles with lipids, i.e., di-oleil phosphatidylcholine (DOPC) and phosphatidylglycerol (PG), and with Polyethylene glycol was also tested. The nanoparticle adsorption over membrane mimics was reduced, which was explained by the interaction among surface charges (zeta potential) and by hydration forces. Sil-MB and Cab-Th nanoparticles presented *in vitro* phototoxicity 38% and 20% higher than the respective free PS. It was observed that the nanoparticle coating with lipids and with PEG reduced their phototoxicity. Nanoparticles coated with lipids showed higher toxicity in the dark. Confocal fluorescence images of B16 cells showed that nanoparticles with or without lipid coating enter the cells. In the case of lipid-coated nanoparticles a diffuse distribution profile was observed and in the case of nanoparticles without coating, they concentrated in specific vacuolar regions of the cytoplasm. The homogeneous cytoplasmic distribution profile of lipid-coated nanoparticles can explain the increased toxicity in the dark. It has been concluded that immobilization of PS with different aggregation degrees is a strategy to obtain systems in which the modulated efficiency of ¹O₂ generation is not affected by the external medium. Finally, based on the observed *in vitro* phototoxicity activity against B16 cells, these systems can be useful in Photodynamic Therapy of Cancer.

Keywords: Nanoparticles, singlet oxygen, Methylene Blue, Thionin, Photodynamic Therapy, PDT.

Lista de abreviaturas e siglas

AM: Azul de Metileno

Cab-Tio: nanopartículas Cab-O-sil contendo Tionina ligada covalentemente à superfície

D/M: razão dímero/monômero do fotossensibilizador nas nanopartículas

DOPC: dioleilfosfatidilcolina

DPBF: 1,3-difenilisobenzofurano

FS: Fotossensibilizadores

HOMO: orbital molecular ocupado de maior energia

IV: infravermelho

LUMO: orbital molecular não ocupado e menor energia.

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

¹O₂ : Oxigênio singlete

PDT: Terapia Fotodinâmica.

PEG: Polietilenoglicol.

PG: fosfatidilcolina

sil-AM: nanopartículas sol-gel contendo Azul de Metileno

sil-AMPC: nanopartículas sil-gel contendo Azul de Metileno recobertas com bicamada de dioleilfosfatidilcolina

sil-AMPCPG: nanopartículas sil-gel contendo Azul de Metileno recobertas com bicamada de dioleilfosfatidilcolina e fosfatidilglicerol na proporção molar de 1:1

sil-AMPEG: nanopartículas sil-gel contendo Azul de Metileno recobertas com Polietilenoglicol por ligação covalente

Sil-APTS: nanopartículas Cab-O-sil contendo aminopropiltriétoxisilano ligado covalentemente à superfície.

Silício-APTS: placas de silício contendo aminopropiltriétoxisilano ligado covalentemente à superfície.

Sil-APTS-glut: nanopartículas Cab-O-sil contendo aminopropiltriétoxisilano e glutaraldeído ligados covalentemente à superfície.

Silício-APTS-Glut: placas de silício contendo aminopropiltriétoxisilano e glutaraldeído ligados covalentemente à superfície.

Silício-APTS-Glut-tionina: placas de silício contendo aminopropiltriétoxisilano, glutaraldeído e Tionina ligados covalentemente à superfície.

sil-Tio: nanopartículas sol-gel contendo Tionina

SPR: *Surface Plasmon Resonance*; Ressonância Plasmônica de Superfície.

SPRi : Surface Plasmon Resonance imaging ; Ressonância Plasmônica de Superfície com imagem

TDI: toluenodisocianato.

K_{sv}: Constante de Stern-Volmer.

λ_{máx}: comprimento de onda de máxima absorção/fluorescência.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1-Terapia Fotodinâmica.....	1
1.2.Nanopartículas em terapia de câncer: importância do tamanho e das características da superfície	6
1.3.Nanopartículas em PDT.....	9
1.4.Métodos de síntese de nanopartículas	11
1.5. O processo sol-gel	12
1.6. Processo de oxidação em chama e sílica Cab-O-Sil.....	14
1.7. Modificações de superfícies vítreas.....	14
2.Objetivos	16
3.Materiais	16
4.Métodos	17
4.1.Preparação de partículas de sílica-gel contendo AM e Tionina:	17
4.2. Quantificação de FS nas nanopartículas sol-gel	18
4.2.1.Quantificação de AM nas partículas sil-AM	18
4.2.2.Quantificação de tionina nas partículas sil-Tio	18
4.3.Funcionalização de sílica Cab-O-Sil com Tionina	19
4.3.1. Quantificação de APTS na superfície da sílica Cab-O-sil.....	21
4.4.Estudos sobre a superfície do silício.....	23
4.4.1.Funcionalização do silício	23
4.4.2.Medidas Elipsométricas.....	23
4.4.3. Microscopia de força atômica (AFM)	24
4.4.4. Espectroscopia Raman.....	24
4.4.5. Simulações de teoria de densidade funcional	24
4.5.Microscopia eletrônica de transmissão.....	25
4.6. Detecção de $^1\text{O}_2$	25
4.6.1.Determinação do tempo de vida $^1\text{O}_2$	25
4.6.2.Obtenção do espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado pelas partículas.....	26
4.7. Determinação de eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ (S)	26
4.7.1. Método Direto	26
4.7.2 Método Indireto	27
4.8.Estudos de supressão de fluorescência	28
4.9.Recobrimento de partículas	29

4.9.1. Recobrimento com lipídios.....	30
4.9.1.b.Curva padrão para determinação da concentração de fósforo	31
4.9.2.Modificação com PEG	32
4.10. Medidas de Potencial Zeta.....	34
4.11. Estudos de interação entre nanoparticulas e membranas de bicamadas híbridas	34
4.11.1Preparação de MBH.....	34
4.11.2.Preparação de vesículas	35
4.11.3.Medidas de variação de reflectância por SPRi	35
4.12.Estudos de Viabilidade Celular	40
4.13. Microscopia de fluorescência confocal	42
4.13.1.Partículas com ruteniofenantrolina.....	42
4.13.2. Aquisição de imagens.....	42
5.Resultados e discussões	43
5.1. Síntese de nanopartículas.....	43
5.1.1. Estudos sobre superfície do silício	49
5.2. Caracterização fotofísica	53
5.3. Estabilidade dos FS imobilizados nas nanopartículas	63
5.3.1. Redução por NADPH	63
5.3.2.Supressão por íons brometo	65
5.3.3. Supressão por Ascorbato	67
5.4. Caracterização Fotoquímica	69
5.5. Recobrimento e Interação de partículas com MBHs	75
5.5.1. Recobrimento de partículas sil-AM.....	75
5.5.2.Estudos de interações por SPRi.....	78
5.6. Estudos Biológicos	83
5.6.1. Viabilidade Celular.....	83
5.6.2.Microscopia de Fluorescência Confocal	88
6.Conclusões	93
7. Referências	96

Índice de Figuras

Figura 1.1- Representação do funcionamento da PDT.....	2
Figura 1.2- Estrutura molecular plana de AM e Tionina.....	3
Figura.1.3- Mecanismos fotoquímicos do FS	4
Figura 1.4- Representação das nanopartículas funcionalizadas	6
Figura 1.5- Esquema representativo da reação de polimerização sol-gel	13
Figura 4.1- Representação da formação das nanopartículas com AM encapsulado	17
Figura 4.2- Representação das etapas sintéticas para obtenção das partículas Cab-Tio.	20
Figura 4.3- Representação da funcionalização da superfície da sílica CabOsil	21
Figura 4.4- Curva padrão para a quantificação de APTS na sílica Cab-O-Sil.	22
Figura 4.5- Transiente de emissão em 1270nm	26
Figura 4.6- Estrutura de lipídios e PEG	29
Figura 4.7- Curva padrão para determinação da concentração de fósforo.	32
Figura 4.8- Etapas reacionais na ligação do PEG na superfície das partículas.....	33
Figura 4.9- Representação da membrana de bicamada híbrida	34
Figura 4.10- Esquema de excitação do plasma de superfície.....	36
Figura 4.11- Curvas de variação de intensidade de luz refletida em função do ângulo de incidência.....	37
Figura 4.12- Medidas da reflectividade em um ângulo de trabalho fixado (θ t).	38
Figura 4.13 – Representação do sistema de SPRi.	39
Figura 4.14 –Curvas de variação de reflectância para cada região selecionada do prisma em função do tempo.....	40
Figura 5.1- Histogramas e imagens de TEM das partículas.....	44
Figura 5.2- Espectros de infravermelho das nanopartículas Cab-O-Sil.....	48

Figura 5.3- Representação das monocamadas sobre a superfície do silício.....	50
Figura 5.4- Imagem de microscopia de força atômica do silício.....	51
Figura 5.5- Espectros Raman	52
Figura 5.6- Espectros Raman da superfície do silício	52
Figura 5.7- Espectros normalizados de absorção de AM livre e sil-AM	54
Figura 5.8- Espectros de absorção de Tionina e nanopartículas.....	55
Figura 5.9- Espectros de absorção de Tionina e Cab-Tio	56
Figura 5.10- Espectros de Absorção e Emissão de fluorescência de AM e sil-AM	60
Figura 5.11- Espectros de Absorção de Tionina, sil-Tio e Cab-Tio.....	61
Figura 5.12- Espectros de Emissão de fluorescência de Tionina, sil-Tio e Cab-Tio.....	62
Figura 5.13- Reações de formação das formas incolores de AM.....	63
Figura 5.14 – Espectros de absorção de AM e sil-AM após adição de NADPH.....	64
Figura 5.15- % de absorção dos FS e de nanopartículas na presença de NADPH.....	65
Figura 5.16- Curvas de Stern-Volmer e para AM e Tio e para partículas.....	67
Figura 5.17- Porcentagem de emissão de $1O_2$ gerado por AM e sil-AM.....	68
Figura 5.18. Espectro de emissão de $1O_2$ gerado por nanopartículas sil-AM.....	69
Figura 5.19- Reação do DPBF com oxigênio singlete e formação do endoperóxido.	70
Figura 5.20 - Espectros de absorção de AM na presença de DPBF.....	73
Figura 5.21. Espectros de IV das nanopartículas sil-AM sem recobrimento	76
Figura 5.22- Valores de potencial zeta para vesículas e nanopartículas em água	77
Figura 5.23- Valores da variação de reflectividade após duas injeções de nanopartículas..	80
Figura 5.24- Valores médios da variação de reflectividade por minuto.....	81
Figura 5.25- Viabilidade celular para AM e nanopartículas sil-AM.....	84
Figura 5.26- Valores de viabilidade celular para Tionina e sil-Tio e Cab-Tio.....	86
Figura 5.27. Imagens de fluorescência confocal de células incubadas com nanopartículas recobertas com lipídios.....	91
Figura 5.28 - Imagens de microscopia de fluorescência das células incubadas com nanopartículas sem recobrimento.....	92

Índice de Tabelas

Tabela 1- Valores de % de C,N, e S para partículas modificadas.....	46
Tabela 2- Valores das espessuras das camadas formadas sobre silício.....	49
Tabela 3-Valores das razões D/M para as nanopartículas.....	57
Tabela 4-Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescência e absorção para sil-AM e AM.....	58
Tabela 5- Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescência e absorção para sil-Tio, Cab-Tio e Tionina.	59
Tabela 6-Valores de constante de Stern-Volmer para AM, Tionina e nanopartículas.....	66
Tabela 7- Valores de tempo de vida de $^1\text{O}_2$ em diferentes solventes.....	70
Tabela 8-Valores de rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$.....	74
Tabela 9-Valores de potencial Zeta para vesículas e partículas recobertas.....	78

1. Introdução

1.1-Terapia Fotodinâmica

Embora existam muitos tratamentos de rotina para o câncer (cirurgia, quimioterapia e radioterapia), terapias alternativas estão sendo constantemente propostas na área de oncologia, devido aos graves efeitos colaterais e à eficiência limitada dos tratamentos tradicionais. Dentre as terapias alternativas, destaca-se a Terapia Fotodinâmica (**PDT**, do inglês “Photodynamic Therapy”) (Kessel D., 1998; Simplício F. I. et.al., 2002; Henderson B. W., 1992), um procedimento clínico relativamente novo no tratamento de câncer. Outras moléstias tais como degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, restenosis, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose, que têm como característica comum um crescimento anormal de tecidos, têm sido também tratadas com PDT. Por isso, a PDT é investigada em nível mundial no tratamento dessas e outras doenças correlatas na origem (Simplício F.I. et.al., 2002).

A PDT é baseada na fotooxidação de compostos biológicos no tecido alvo. É necessária a presença de um fotosensibilizador (**FS**), o qual é capaz de gerar espécies tóxicas (como oxigênio singlete; $^1\text{O}_2$) ao receber irradiação luminosa no tecido a ser tratado (Fig.1.1). Embora existam FS naturais em células e tecidos, no caso da PDT, eles devem ser introduzidos no organismo como primeiro passo do tratamento. Na maioria das aplicações, essas drogas são injetadas na corrente sanguínea do paciente e percorrem todo o corpo, concentrando-se nas células cancerosas até 20 vezes mais que nas células saudáveis (Kessel D., 1998). As quantidades aplicadas de medicamento e as características do laser (tipo, dosagem de potência e tempo de iluminação) dependem do FS aplicado e da espécie e gravidade da doença tratada (Kessel D., 1998).

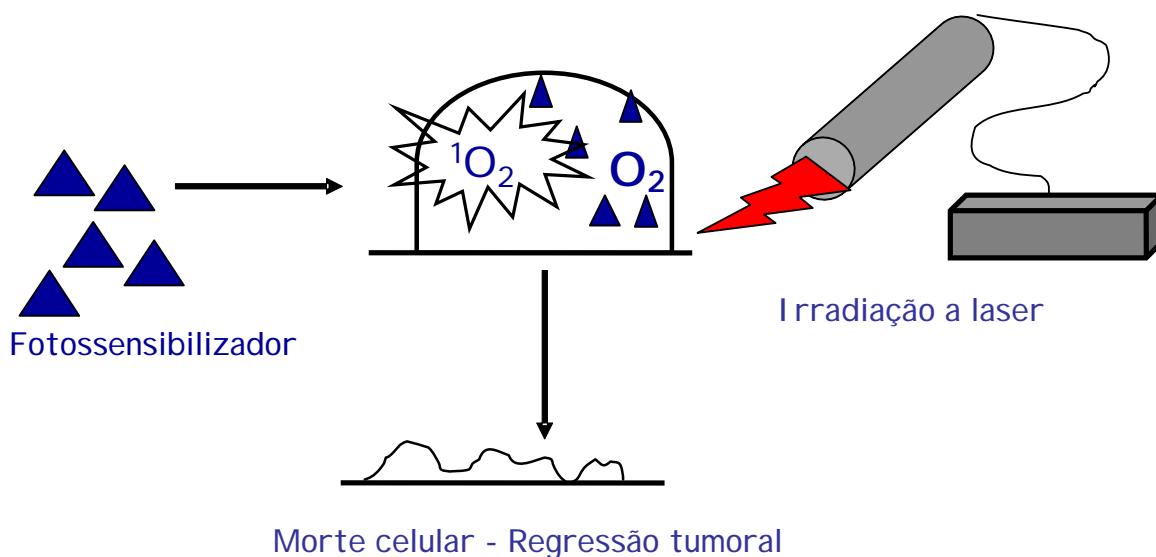


Figura 1.1-Representação do funcionamento da PDT. O fotossensibilizador é aplicado ao tecido tumoral, onde, após receber irradiação luminosa, transfere energia para oxigênio molecular, formando espécies tóxicas (principalmente $^1\text{O}_2$) capazes de levar células cancerosas à morte.

O primeiro FS aprovado pelas autoridades de saúde para o tratamento de câncer por PDT foi o derivado de hematoporfirina, Photofrin[®]. Posteriormente, foram aprovados os medicamentos Levulan Kerastick para tratamento de lesões na pele e Visudyne para tratamento de degeneração macular da retina. No entanto, algumas limitações destes FS como, baixa seletividade tumoral, baixo coeficiente de extinção, o que requer a administração de altas quantidades do FS, e elevado acúmulo na pele, levaram ao desenvolvimento de novos FS.

As atuais pesquisas na área de PDT concentram-se no desenvolvimento de novos FS, por exemplo, derivados de porfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas e clorinas. Além disso, muitas pesquisas têm sido dedicadas ao desenvolvimento de sistemas carregadores de drogas e à compreensão dos mecanismos de ação dos FS (Yu C.L. et.al.,2002; Wainwright M. et.al., 1996; Junqueira H. C. et.al., 2002). No ramo de desenvolvimento de novas drogas, diversos compostos estão em fase de testes (Tardivo et.al,2005; Yu C.L. et.al.,2002; Wainwright M. et.al., 1996; Junqueira H. C. et.al., 2002) a fim de reduzir os efeitos colaterais do tratamento e aumentar sua eficiência, como na cura do paciente com aplicação de doses menores da droga.

Dentre os fotossensibilizadores que podem ser úteis em PDT, estudamos os corantes

fenotiazínicos, Azul de Metileno (**AM**) e Tionina (figura 1.2), os quais possuem baixo custo, forte absorção de luz na região acima de 600nm (onde a luz apresenta maior penetração no tecido), alto rendimento quântico de estado tripleto e de geração de oxigênio singleto.

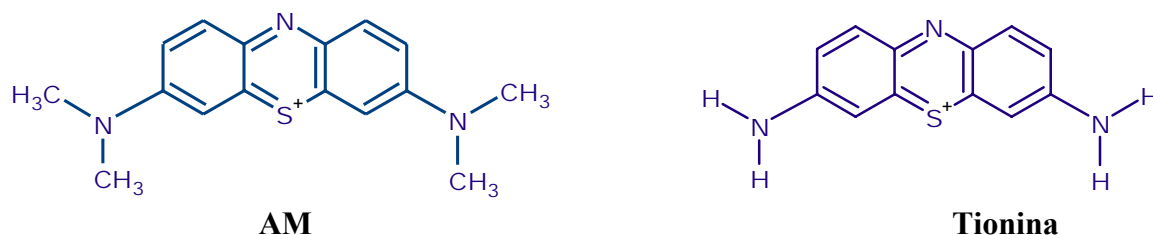


Figura 1.2- Estrutura molecular plana de AM e Tionina

O Azul de Metileno tem sido usado extensivamente por mais de um século na coloração de células e bactérias, empregada em diagnósticos clínicos de uma variedade de doenças e como um marcador tumoral em cirurgias. Outro destaque é o uso de AM contra vírus, área em expansão importante para a desinfecção de sangues doados (Wainwright, M, 1996; Wagner J.S., 1998). Em PDT, a atividade do AM contra certos tipos de tumores foi observada através da aplicação local. Orth et.al.(1998) demonstrou a fototoxicidade de AM em tumores transplantados em animais e em tumores recorrentes de esôfago. Tardivo et.al.(2004) mostrou a eficiência do AM em tratamento de melanomas. Em estudos *in vitro* com células de camundongo, Mellish et.al.(2002), mostrou que a Tionina apresenta fototoxicidade equivalente ao AM.

Apesar dos resultados promissores já demonstrados, o uso de AM no tratamento clínico em PDT foi poucas vezes publicado (Tardivo J.P. et. al. 2005). Uma das razões é a fácil redução de AM a leuco AM pelas coenzimas celulares (NADH e FADH₂), o que diminui a eficácia da fotossensibilização, já que a espécie leuco AM é incolor. Além disso, a sua alta toxicidade no escuro também contribui para a relutância no uso de AM em PDT. No entanto, estes dois empecilhos (redução e toxicidade no escuro) podem ser superados pela aplicação direta da droga no tumor ou através do uso de carregadores de drogas. A eficácia do tratamento por PDT de vários tipos de tumores utilizando AM tem sido

demonstrada tanto em animais quanto em pacientes (Wainwright, M., 1996; Tardivo J.P. et al. 2005).

Em PDT, o dano nas biomoléculas pode ocorrer através de dois mecanismos químicos principais: Tipo I e Tipo II (**Fig 1.3**) (Simplício F. I. Et.al. 2002; Henderson B. W. Et.al. 1992). Quando o FS absorve um fóton, ele passa do seu estado fundamental (singlete; FS) para um estado singlete energeticamente excitado ($^1\text{FS}^*$). Este estado pode ser desativado por colisão, fluorescência ou através de cruzamento entre sistemas, levando a um estado tripleto ($^3\text{FS}^*$). O estado singlete excitado e o estado tripleto podem reagir diretamente com moléculas de substratos biológicos, transferindo hidrogênio ou elétrons, formando radicais e íons radicalares, os quais poderão interagir com o oxigênio para gerar espécies reativas de oxigênio, principalmente superóxido e derivados deste. Este mecanismo é conhecido como mecanismo tipo I. O estado tripleto pode ainda transferir energia diretamente para o oxigênio, formando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), processo chamado de mecanismo tipo II. As espécies reativas de oxigênio são responsáveis pelos danos irreversíveis a várias membranas celulares, incluindo plasmática, mitocondrial, lisossomal e nuclear. Podem também causar modificação em proteínas, desencadeando mudanças no metabolismo celular e mecanismos de sinalização que levam a célula à morte.

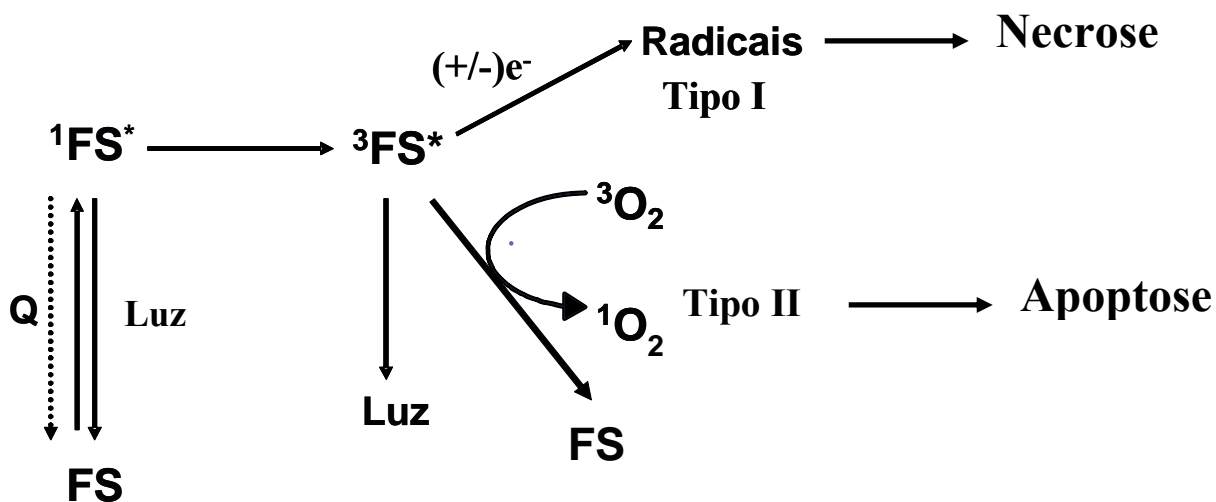


Figura.1.3- Mecanismos fotoquímicos do FS, formação de espécies excitadas e tipos de morte celular envolvidos.

A morte celular ocorre por diversos processos sendo os dois principais, a necrose e a apoptose. A necrose é uma forma de degeneração violenta e rápida que afeta populações celulares extensas e é caracterizada pelo inchamento do citoplasma, destruição de organelas e lise de membrana plasmática, resultando na liberação do conteúdo celular e na inflamação (Castano et. Al. 2005). A apoptose é um processo programado de morte celular que envolve mudanças bioquímicas, como nos mecanismos de sinalização celular, e morfológicas, como encolhimento da célula e posterior fragmentação. Os fragmentos formados, corpos apoptóticos, são captados por fagócitos evitando a inflamação. Todas estas transformações celulares requerem muita energia. Células que sofreram oxidação muito intensa perdem a capacidade de gerar energia (produção de ATP) e não são capazes de iniciar ou finalizar um processo apoptótico. Assim, a definição do processo de morte celular depende principalmente do nível energético das células, além de depender de outros fatores como, tipo celular, localização subcelular do FS, espécie reativa que é gerada e mecanismo de ação do FS (Kiesslich T. et al., 2005). No trabalho de Kochevar et.al.(2000) com células HL-60, a autora mostrou que $^1\text{O}_2$ é capaz de desencadear o processo de apoptose enquanto que, radicais livres são capazes de induzir a morte celular principalmente por necrose.

Após ser incorporado em células e tecidos, o FS interage com macromoléculas e/ou membranas. Esta interação pode causar diversas alterações nas propriedades do estado fundamental do sensibilizador, como por exemplo, a formação de agregados, o que pode reduzir drasticamente a capacidade da droga de gerar $^1\text{O}_2$. Este comportamento foi constatado para o AM (Junqueira et.al., 2002). Determinou-se que AM forma agregados (dímeros) ao interagir com surfactante aniônico ou mitocôndrias e, na presença dessas estruturas, tem seu mecanismo fotoquímico alterado para a transferência de elétron entre moléculas de AM formando espécies de AM semi-reduzidas e semi-oxidadas, enquanto que, em solução isotrópica, o mecanismo principal de desativação é transferir energia para o oxigênio, formando oxigênio singlete (mecanismo tipo II). Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de sistemas em que a eficiência de formação de oxigênio singlete e a geração de radicais não dependam da interação direta com interfaces ou proteínas. Com este intuito, foi proposta neste projeto a construção de sistemas constituídos de nanopartículas de sílica com AM e Tionina (fig.1.4). Espera-se que além de proteger os FS

contra interferentes do meio, as nanopartículas permitam a modulação de geração de espécies excitadas por conterem os FS em grau controlado de agregação (fig.1.4).

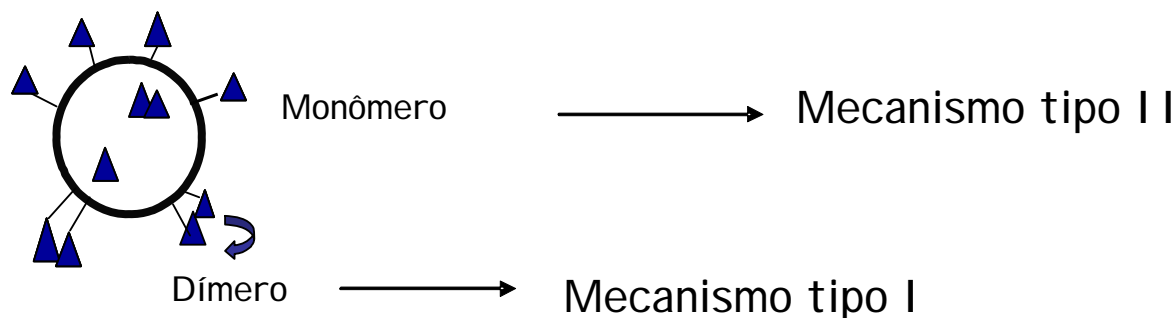


Figura 1.4- Representação das nanopartículas funcionalizadas com FS. O grau controlado de incorporação de FS (\blacktriangle) pode controlar o mecanismo de ação destes.

1.2.Nanopartículas em terapia de câncer: importância do tamanho e das características da superfície

Para que um agente terapêutico contra o câncer seja eficiente, algumas barreiras fisiológicas e bioquímicas devem ser superadas: resistência do tumor à droga, distribuição, biotransformação e inativação da droga no organismo. A principal limitação das terapias de câncer é o efeito colateral conseqüente da ampla distribuição das drogas que são tóxicas, tanto para células normais, quanto para células cancerígenas.

Mecanismos não celulares de resistência à droga podem ser resultado da existência de regiões de baixa vascularização, que reduzem o acesso da droga ao tumor, protegendo as células do efeito citotóxico. Outros fatores de resistência são a acidez do ambiente tumoral, que confere resistência a drogas básicas, e a alta pressão intersticial e baixa pressão microvascular, que retardam ou impedem a entrada de moléculas na região tumoral.

Mecanismos celulares de resistência compreendem as alterações nas atividades de alguns sistemas enzimáticos específicos na regulação de apoptose e nos mecanismos de transporte. Dentre estes mecanismos destaca-se o MDR (do inglês “multidrug resistance”), um dos principais problemas da quimioterapia, que consiste no efluxo das drogas para fora

das células, devido principalmente à superexpressão de uma proteína da membrana plasmática chamada P-glicoproteína (Pgp), a qual transporta inespecificamente diversas moléculas para o exterior da célula (Bradley et al., 1988; Roninson, 1987).

A ligação de drogas em sistemas coloidais (carregadores de drogas) tem sido uma estratégia para superar mecanismos de resistência celular e não celular e aumentar a seletividade da droga para células cancerígenas, diminuindo efeitos colaterais. Dentre estes sistemas destacam-se os lipossomos, os quais apresentaram efeitos significativos na superação de mecanismos de resistência celular (Thierry et al., 1992; Warren et al., 1992, Reszka et.al., 1996). Outra forma de superar os mecanismos de resistência a drogas é a adsorção destas em nanopartículas de diferentes materiais, como poliaquilcianoacrilatos, óxido de titânio e sílica gel (Cuvier et al., 1992; Bennis et al.,1993; Nematì et al., 1994; Reszka, R.,1996).

A biodistribuição das nanopartículas é dependente das características dos capilares sanguíneos nos órgãos e tecidos, bem como, do sítio de administração, do tamanho da nanopartícula e das propriedades da superfície das nanopartículas (Fukumori & Ichikawa, 2005). Carregadores de drogas com diferentes propriedades de superfície podem permitir o acúmulo específico da droga em determinados tipos de tumores. As nanopartículas geralmente se associam a órgãos reticuloendoteliais, o que diminui o tempo de permanência destas na circulação sanguínea e sua baixa hidrofobicidade pode aumentar o acúmulo da droga na vasculatura do tumor sólido tal como o melanoma (Fukumori & Ichikawa, 2005, Reska et.al. 1996). Em contraste, a longa permanência no sangue de sistemas compostos de lipossomos e polímeros, permite o tratamento de leucemia, tipo de câncer onde as células tumorais são circulantes. Mesmo para administrações intratumorais, a compreensão do mecanismo de extravasamento é crítica para manter as nanopartículas no sítio onde estas foram injetadas. Além disso, a difusão das nanopartículas nos tecidos, associação e internalização nas células e distribuição intracelular são fatores importantes em terapia de câncer e diagnóstico e são atualmente temas de estudos.

O tamanho da partícula deve ser menor do que alguns micrômetros para que ela possa circular nos vasos sanguíneos, os quais possuem poucos micrometros de diâmetro. Tecidos normais possuem paredes de vasos estreitas, contínuas, com poros de 50nm em quantidades 100 a 1000 vezes menor que os de 9nm. Portanto, pequenas moléculas podem

facilmente penetrar em todos os tipos de tecidos em contraste com moléculas grandes que o fazem muito lentamente. No entanto, tecidos tumorais, inflamatórios e órgãos ricos em sistema reticuloendoteliais, como fígado, baço e medula óssea, apresentam características diferentes: paredes capilares descontínuas, ausência de lâmina basal e grande número de poros de aproximadamente 100nm de diâmetro. Desta forma, estes tecidos permitem a fácil penetração de partículas de 50-100nm (Fukumori Y & Ichikawa H., 2006).

Outro diferencial dos tecidos tumorais é que estes não possuem sistema linfático para eliminar materiais lipofílicos e poliméricos (Maeda H., 1992; Maeda et.al., 1992), assim, uma vez que as partículas penetram nos tecidos tumorais, estas não podem ser eliminadas facilmente. Portanto, tumores apresentam maior penetração e retenção para partículas de 50-100nm (Qi. X.,1997), este evento é conhecido como **EPR**, do inglês “Enhanced Permeability and Retention effect”. Partículas de longa permanência na circulação têm oportunidades mais frequentes de encontrar capilares tumorais e extravasar dentro do tecido tumoral.

Além do tamanho propício para penetrar nos tecidos tumorais, as nanopartículas, apresentam a possibilidade de modificação das suas características superficiais, a fim de aumentar sua permanência na circulação, aprimorar sua interação com células e superar os mecanismos de resistência a drogas. É conhecido que a modificação da superfície de lipossomos com polietilenoglicol (PEG) aumenta o tempo de permanência na circulação sanguínea (Allen T.M. et.al, 1991; Hodoshima N. 1996). Isto parece ser consequência do impedimento estérico com o PEG na superfície do lipossomo (Allen T.M., 1991), o que evita seu reconhecimento por imunoglobulinas e complementos intermediários da interação com órgãos reticuloendoteliais. O recobrimento de nanopartículas com lipídios pode aumentar a afinidade destas por membranas celulares além de contornar os mecanismos celulares de resistência a drogas através da modificação da fluidez de membrana, facilitação da incorporação de drogas no interior da célula ou inibição direta de proteínas responsáveis pelo efluxo de drogas (Thierry et al., 1992; Warren et al., 1992).

1.3. Nanopartículas em PDT

Atualmente, vários estudos clínicos e em pesquisa básica são centrados na obtenção e no uso de nanopartículas em PDT. Na grande maioria dos casos, as nanopartículas são carregadores de fotossensibilizadores hidrofóbicos, melhorando a dispersão destes em sistemas aquosos. Estes carregadores incluem micelas, lipossomos, lipoproteínas de baixa densidade, micelas poliméricas e complexos poliméricos (Konan et.al.,2001; Joriet.al.; 1996; Urizzi et.al.2001). Sistemas micelares apresentaram maior incorporação em tumores em relação a drogas livres. No entanto, agentes emulsificantes levaram a reações anafiláticas *in vivo* (MichaudL.B.,1997). Lipossomos são muito utilizados porque sua estrutura particular, bicamadas lipídicas concêntricas, encapsulando compartimentos aquosos, facilita o transporte de drogas hidrofóbicas e hidrofílicas para o ambiente celular. Por exemplo, Jori G. et.al.(1986) observou maior acúmulo no tumor de hematoporfirina incorporada em lipossomos preparados com dipalmitoilfosfatidilcolina em comparação a hematoporfirina livre em solução tampão. Algumas drogas lipossômicas estão no mercado na Europa e na América, entre elas, AmBisome e Visudyne (Konan et.al., 2002).

Apesar das vantagens apresentadas, alguns problemas no uso de lipossomos persistem, como a dificuldade de formar lipossomos com as características desejadas de maneira reprodutível, a dificuldade para manter a estabilidade dos produtos em função do processo de manufatura, o elevado tempo do processo, a baixa incorporação de fotossensibilizador e aumento de agregação deste (Fukumori&Ichikawa, 2006; Roy et.al.,2003). Além disso, lipossomos são também facilmente capturados pelo sistema de defesa do corpo (sistema reticuloendotelial). Outro sistema nanométrico estudado é o de micelas poliméricas. Embora tenha sido observado o aumento da fototoxicidade *in vitro*, estudos *in vivo* resultaram em baixa regressão tumoral e alto acúmulo em tecidos normais (Taillefer J., 2001).

Muitos estudos têm sido feitos com nanopartículas poliméricas biodegradáveis. Estas possuem como vantagem a alta taxa de incorporação, liberação da droga controlada e grande variedade de materiais que podem ser empregados, como os polímeros PLA (ácido poliláctico), PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico), poli(ϵ -caprolactone), quitosana e polialquilcianoacrilato. Por exemplo, Vargas et.al. mostrou maior efeito fotodinâmico em estudos *in vitro* para porfirina meso-tetra(p-hidroxifenil) incorporada em partículas de

PLGA em relação a droga livre. Resultados semelhantes foram obtidos por Ricci-Junior que utilizou este polímero para a incorporação de Zn(II) ftalocianina.

O uso de lipoproteínas de baixa densidade (**LDL**, do inglês “low density lipoprotein”) é baseado na alta expressão de receptores de LDL nas células tumorais o que pode facilitar a seletividade destas partículas para o tumor. Além disso, graças a seus componentes naturais, não são reconhecidas pelo sistema de defesa do organismo. Candide et.al. mostrou que é possível incorporar Photofrin II em LDL e manter seu reconhecimento pelo receptor no tecido tumoral. No trabalho de Urizzi et. al., foi observado o aumento na fototoxicidade *in vitro* de alumínio sulfonofalocianina ligada a LDL.

A principal desvantagem comum entre os sistemas mencionados acima é que todos permitem a liberação do FS de seu interior, o que pode levar a efeitos colaterais, como o acúmulo de FS na pele e nos olhos após o tratamento (Dillon J., 1988). Uma forma de superar este efeito é a construção de sistemas, dos quais o FS não é liberado. Exemplos destes sistemas são as partículas metálicas, por exemplo de ouro e magnetita (Wieder et. al., Tada et.al,2007). Nanopartículas de magnetita funcionalizadas com FS combinam a propriedade de superparamagnetismo e fotoatividade, podendo ser usadas em tratamento de câncer por hipertermia e/ou PDT. Podem ainda ser usadas em diagnóstico por imagem de ressonância magnética. Wieder et.al. investigou a ligação de FS na superfície de nanopartículas de ouro e constatou que a eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ para FS na nanopartícula, foi maior que a eficiência do FS livre. Gu et. al. apresentou a ligação de porfirina em nanopartículas de magnetita e a incorporação destas em células HeLa, as quais, após irradiação, mostraram indícios de apoptose. No entanto, a ligação de FS através de moléculas âncoras possui a desvantagem de baixa incorporação da droga na nanopartícula.

Em um trabalho recente, apresentamos um novo método de síntese de nanopartículas magnéticas recobertas com AM encapsulado em sílica. Os resultados encontrados mostraram a capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ destas nanopartículas que além da atividade fototerapêutica podem apresentar melhor o direcionamento ao tumor, uma vez que podem ser movidas por campo magnético externo (Tada et.al.2007).

Em relação a outros materiais, foi demonstrado que a sílica possui maior taxa incorporação de drogas (Tang et.al., 2005). Especialmente em PDT a sílica sol- gel pode ter

uma aplicação interessante, já que, devido à estabilidade do material, os FS não são liberados mesmo em condições extremas de pH e temperatura. No entanto, os poros devem permitir a difusão de oxigênio molecular, bem como, de oxigênio singlete, garantindo o efeito fototóxico nas células cancerígenas. Alguns sistemas estão sendo desenvolvidos com base neste princípio. Tang et.al. apresentou a incorporação de AM em partículas de sílica ORMOSIL (do inglês “organically modified silica”) e sílica sol-gel. Partículas ORMOSIL também foram empregadas no trabalho de Roy et.al.(2003) para a incorporação do FS 2-devinil2-(1-hexiletilpiroforbida). Ambos autores demonstraram a capacidade dos FS de gerar $^1\text{O}_2$, mesmo estando ocluídos nas partículas.

No presente trabalho, apresentamos a síntese de nanopartículas de sílica gel com Tionina e AM incorporados em nanopartículas de sílica sol-gel e partículas de sílica CabOsil com Tionina ligada à superfície. Nos trabalhos comentados acima, foi demonstrado apenas a capacidade de gerar oxigênio singlete e, em alguns casos, o efeito citotóxico. Neste trabalho, os estudos foram concentrados nos mecanismos de proteção dos fotossensibilizadores e na modulação da eficiência de geração de oxigênio singlete através do controle do grau de recobrimento e agregação dos FS.

1.4.Métodos de síntese de nanopartículas

Atualmente materiais nanométricos, tais como nanopartículas, são aplicados em diversas áreas, como catalise química, química analítica, aplicação odontológica e terapia e diagnóstico de câncer. Para cada uma destas aplicações, uma grande variedade de métodos de síntese de nanopartículas está sendo desenvolvida. Em terapia de câncer, encontram-se estudos com partículas de materiais lipossômicos, micelares, inorgânicos e poliméricos, conforme mencionado no item 1.2. O material escolhido, bem como o método de síntese, depende do tamanho, das características da superfície e da aplicação da partícula que se pretende obter.

As nanopartículas lipossômicas são preparadas pela solubilização de um lipídio ou mistura de lipídios em solvente orgânico ou mistura de solventes altamente voláteis. Após evaporação do solvente, o filme seco de lipídio é hidratado com solução aquosa escolhida. Sob agitação os lipídios se organizam em estruturas fechadas esféricas.

A produção de sistemas micelares emprega óleos polioxetilados não iônicos como Tween-80 e Chremophor-EL (CRM) que permitem a solubilização de fotossensibilizadores hidrofóbicos.

Na área de partículas poliméricas, encontram-se os mais variados polímeros e métodos de síntese. Por exemplo, Monson et.al.(2003) sintetizou nanopartículas de poli(acrilamida) para a incorporação de drogas hidrofílicas, através da solubilização da droga em meio aquoso e acrilamida (precursor do polímero) e posterior adição de surfactante, solvente orgânico e iniciadores de polimerização. O solvente orgânico é extraído após agitação por evaporação a pressão reduzida.

A síntese de nanopartículas inorgânicas envolve uma enorme variedade de materiais e, para cada um deles, uma rota sintética diferente. Alguns exemplos são partículas de ouro, cádmio, zinco, apatita, magnetita e sílica. Em Tada D. et.al. apresentamos a síntese de partículas de magnetita pelo método da coprecipitação de Fe^{3+} e Fe^{2+} em solução aquosa e meio ácido. Para a obtenção de partículas de sílica, principal foco deste trabalho, destaca-se o processo sol gel pela simplicidade e flexibilidade do processo, além da geração de sílica porosa de alta pureza, transparência óptica e homogeneidade do material (Monson E. et.al. 2003).

1.5. O processo sol-gel

O processo de sol-gel trata-se de qualquer rota de síntese de materiais, em que, num determinado momento, ocorre transição do sistema *sol* para o sistema *gel*. O termo *sol* é empregado para definir uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100nm) estável em um fluido, enquanto o termo *gel* é empregado para descrever sistemas formados por estruturas rígidas de partículas coloidais ou de cadeias poliméricas que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios (Alfaya & Kubota, 2001).

O uso de precursores alcóxidos envolve a hidrólise de uma solução de tetraalcóxidos em um solvente orgânico, como o álcool, levando à formação de partículas com função silanol, as quais formam um sol pela polimerização. A continuação do processo resulta num gel, que após secagem forma uma estrutura chamada xerogel.

As características e propriedades do produto final dependem de vários fatores que afetam as reações de hidrólise e condensação, como pH, temperatura e tempo de reação,

concentração de reagentes, natureza e concentração do catalisador e razão molar entre água e alcóxido (Brinker C.J., 1990). Na obtenção de nanopartículas de sílica, destaca-se o método Stöber por gerar nanopartículas esféricas e monodispersas. Este método consiste na reação catalisada por amônia, de tetraetilortosilicato (TEOS) com água em álcool de baixo peso molecular. Esta reação, representada na figura 1.5. tem sido empregada na obtenção de diversas nanopartículas para a aplicação na área de sensores e diagnóstico e terapia de câncer (Alfaya A.A.S.& Kubota L., 2002; Monson et.al., 2003).

Os ajustes nas concentrações dos reagentes, especialmente na proporção água/álcool permitem a obtenção de partículas de diversos tamanhos na escala nanométrica e micrométrica (Brinker C.J., 1990; Alfaya & Kubota, 2002; Nozawa et.al., 2005).

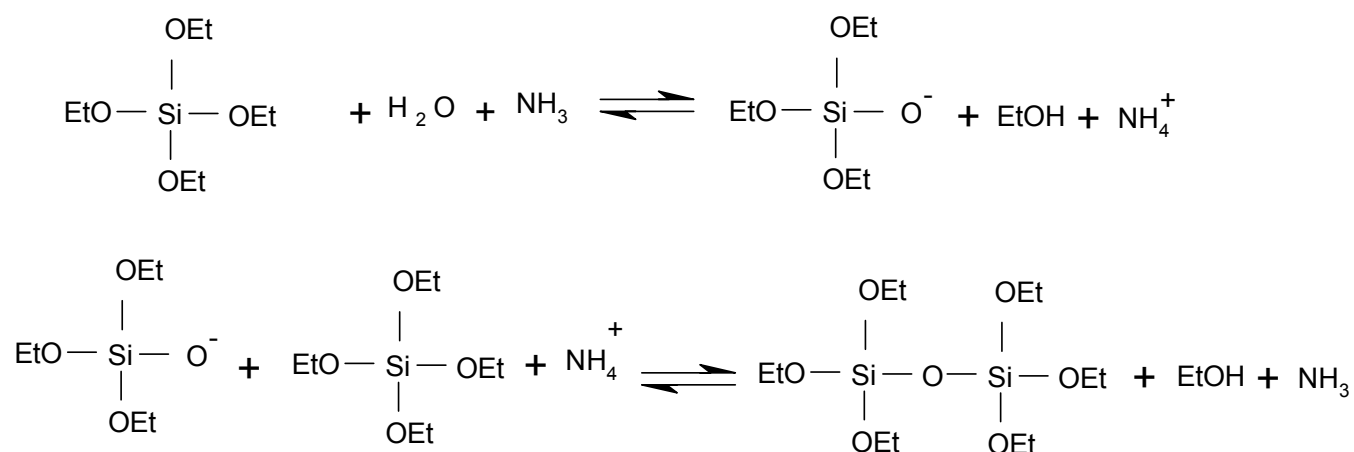


Figura 1.5- Esquema representativo da reação de polimerização sol-gel pelo método Stöber (hidrólise de TEOS catalisada por amônia em etanol). A hidrólise do TEOS resulta em grupos reativos silanol que após sofrerem condensação, resultam em partículas esféricas.

O método de Stöber foi utilizado neste trabalho, como base no desenvolvimento da síntese de nanopartículas contendo AM e Tionina. Uma outra nanopartícula de sílica com características superficiais diferentes da sílica sol gel, a sílica Cab-O-Sil, foi utilizada para a ligação de Tionina na superfície. O método de obtenção destas partículas está descrito no item a seguir.

1.6. Processo de oxidação em chama e sílica Cab-O-Sil

Um método comercialmente importante na produção de óxidos em pó é a oxidação de haletos em chama. Este processo geralmente é chamado de hidrólise em chama, entretanto, esta denominação é errônea. Embora os haletos reajam vigorosamente com água à temperatura ambiente, a reação de oxidação é mais rápida que a hidrólise a altas temperaturas da chama (Brinker & Sherer, 1990). Atualmente existem no mercado, duas sílicas produzidas por este processo: Aerosil[®], e Cab-O-Sil[®], comercializadas por Degussa e Cabot Corporation, respectivamente. O método utilizado na obtenção de partículas Cab-O-Sil[®], envolve a oxidação na fase de tetracloreto de silício em uma chama de hidrogênio. A reação ocorre na fase vapor e as gotas do líquido do óxido sofrem rápida nucleação e coalescem, formando partículas. A morfologia das partículas depende do tempo de permanência na chama. Quanto maior o tempo de permanência, maior será o tamanho das esferas.

As partículas de sílica Cab-O-Sil[®] são partículas de alta pureza, extremamente pequenas, com enorme área superficial e superfície de maior regularidade, recoberta em 40% por grupos hidroxilas (Manual Cab-O-Sil). Estas características podem facilitar a modificação da superfície gerando novos materiais.

1.7. Modificações de superfícies vítreas

Várias técnicas para a modificação de superfícies foram desenvolvidas durante as últimas décadas (Rodrigues M.A et.al., 2000; Mallouk E.T. et.al., 1987; Mitchell et.al., 2002; Gun'ko M. et.al., 2002). Na maioria das vezes, os métodos utilizados são uma combinação de um ou mais modos de ligação, visando a fixação do substrato na superfície, sendo estes: a) ligação covalente; b) adsorção; c) policondensação e d) revestimento do suporte. Dentre os suportes mais usados, a sílica tem atraído muito interesse pela sua natureza biocompatível e facilidade de modificação da superfície com uma variedade de grupos funcionais.

Em Rodrigues et.al.(2002), descrevemos a modificação da superfície de partículas de sílica com moléculas fotoativas (naftalenodiimida e porfirina), através da química de

fosfonato e sulfonato de zircônio. O material resultante apresentou características fotofísicas e fotoquímicas distintas das moléculas livres em solução. Esta diferença foi justificada pela formação de agregados das moléculas no estado fundamental e excitado. Foi demonstrado que as moléculas ligadas sofrem reações de transferência de elétrons com maior eficiência que moléculas livres, o que confere às partículas possíveis aplicações como fotocatalisadores e sensores químicos.

Atualmente, modificações de superfície empregando reagentes organosilanos comercialmente disponíveis, têm tido destaque na área de novos materiais. Os silanos mais utilizados são do tipo bifuncional: $Y_3Si-R-X$ cuja aplicabilidade é determinada pelas reatividades dos grupos X, função orgânica no extremo da cadeia alquila R ligada ao átomo de silício. O grupo Y pode ser um haleto ou mesmo um grupo amina (NH_2), porém mais comumente é encontrado como grupo alcoóxido (RO), o qual reage facilmente com substratos hidroxilados (Molnar et.al., 2006). Como resultado dessa reatividade, forma-se uma ligação covalente entre as moléculas do silano e a superfície hidroxilada de um suporte, com conseqüente eliminação do correspondente álcool. Após a ligação do organosilano no suporte, o grupo X pode sofrer diversas reações, dependendo de suas propriedades químicas, viabilizando diversas possibilidades de funcionalização.

Um dos principais interesses nesta área, atualmente é a construção de biossensores através da ligação de enzimas em superfícies sólidas (Mitchell D.T, 2002). Para isto, o método mais amplamente utilizado baseia-se na formação de ligações entre os grupos amino do suporte com os grupos amino de enzimas, ou na formação de ligações cruzadas intermoleculares com a formação de partículas insolúveis, pela utilização de reagentes bi ou multifuncionais.

Em PDT, a ligação de FS à superfície de partículas não foi muito explorado. A maioria dos trabalhos publicados emprega métodos de incorporação dos FS e não ligação covalente. No entanto, a ligação do FS na superfície da partícula pode ser vantajosa em comparação com partículas com FS ligados não covalentemente, uma vez que o oxigênio singlete não teria a necessidade de se difundir através da partícula para provocar morte celular.

2. Objetivos

Sintetizar nanopartículas de sílica contendo AM e Tionina e estudar as propriedades estruturais, fotofísicas, fotoquímicas e fotobiológicas destas partículas.

-Caracterizar uma possível geração de $^1\text{O}_2$ em função do grau de funcionalização da nanopartícula.

-Investigar a capacidade da nanopartícula em proteger o FS de interferentes do meio.

-Modificar a superfície das nanopartículas funcionalizadas com lipídios e PEG e estudar a adsorção destas partículas em modelos de membranas.

-Avaliar a fototoxicidade das nanopartículas funcionalizadas em células B16 e comparar com outros parâmetros.

-Caracterizar a localização sub-celular das nanopartículas.

3. Materiais

Sílica Cab-O-Sil L-90 foi obtida da Cabot Corporation.

Meios de cultura RPMI1640, DMEM e tripsina foram obtidos da Cultilab. Azul de Tripán foi obtido da Sigam-Aldrich. Tampão fosfato de sódio (PBS) foi preparado utilizando fosfato de sódio, fosfato de potássio, cloreto de sódio e cloreto de potássio da Synth.

Azul de Metileno e Tionina foram obtidos da Sigma-Aldrich e Carlo Erba, respectivamente. MitoTracker Green, para marcação de mitocôndrias foi obtido da Invitrogen. Toluenediisocianato (2,4/2,6-80:20) e Polietilenoglicol foram obtidos da Sigma-Aldrich. DMSO anidro foi obtido da Acros, outros solventes usados foram de grau analítico obtidos da Synth. Os lipídios dioleilfosfatidilcolina e fosfatidilglicerol foram obtidos da Sigma-Aldrich e Avant polar lipids, respectivamente.

4. Métodos

4.1. Preparação de partículas de sílica-gel contendo AM e Tionina:

Partículas contendo AM (**partículas sil-AM**) foram preparadas através do método de Stöber modificado (Stöber W., 1968) descrito em *Beck C.; Hartl W. and Hempelmann R.; 1999* (fig. 4.1). Uma mistura de 100mL de etanol, 20mL de uma solução de AM em etanol ($[AM] = 0,4mM$), 6,0mL de amônia 25% e 4,2mL de TEOS foi agitada por 24 horas a temperatura ambiente. Após esta agitação a mistura foi centrifugada a 15000rpm e lavada com água e etanol até que não fosse mais detectado AM no sobrenadante. O mesmo procedimento foi seguido para o preparo das partículas com Tionina (partículas sil-Tio) apenas substituindo a solução de AM por solução etanólica de Tionina (0,4mM). As partículas foram centrifugadas e lavadas até que não fosse mais detectada Tionina no sobrenadante.

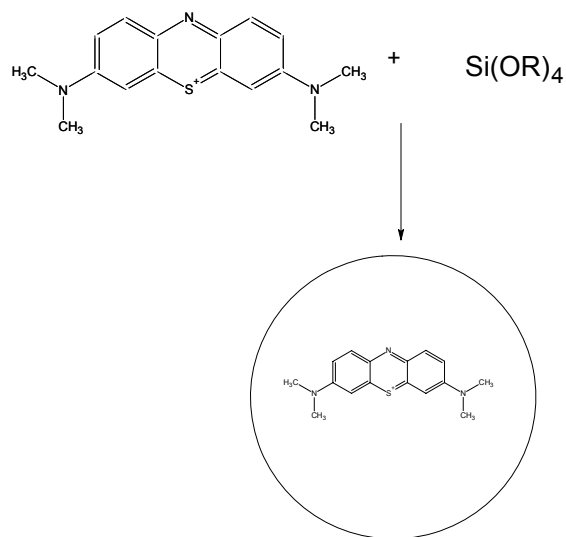


Figura 4.1-Representação da formação das nanopartículas com AM encapsulado. A encapsulação da Tionina é feita substituindo-se AM por Tionina.

4.2. Quantificação de FS nas naopartículas sol-gel

As partículas de sílica foram solubilizadas em solução altamente alcalina e a quantidade de FS liberado determinada por espectroscopia UV-Vis.

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-240-PC) em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm.

4.2.1. Quantificação de AM nas partículas sil-AM

6,4mg de sil-AM foram solubilizadas em 2mL de NaOH 3M, a 70°C e submetidas a tratamento com ultra-som por 30min. Durante este processo o AM liberado sofre desmetilações formando Tionina (Singhal, G.S., 1967), portanto a determinação da concentração da Tionina na solução resultante permite obter a concentração do AM na partícula. A solução resultante foi neutralizada com ácido acético concentrado. O espectro de absorbância determinado correspondeu ao espectro da Tionina (AM após sofrer 4 desmetilações). O valor da Absorbância em 600nm foi utilizado para determinação da concentração da Tionina na solução resultante:

$$\text{Abs } 600 = 39830 \times 1 \times [\text{Tionina}].$$

$$0,2 = 39830 \times 1 \times [\text{Tionina}]$$

$$[\text{Tionina}] = 5 \mu\text{M}$$

numero de mols totais de Tionina = 10^{-8} mols = numero de mols totais de AM em 6.4mg.

Portanto:

$$\% \text{massa de AM} = \frac{10^{-8} \times 373,09}{6,7 \cdot 10^{-3}} \times 100 = 0,05\%$$

Obteve-se um valor de **0,05% em massa de AM**

4.2.2. Quantificação de tionina nas partículas sil-Tio

4,6mg de sil-Tio foram solubilizadas em 1,0mL de NaOH 3M. A solução resultante foi neutralizada com HAc concentrado e o seu espectro de absorbância foi determinado. O valor da absorbância em 600nm foi utilizado para calcular a [Tionina] e o número de mols de Tionina liberados na solução:

$$\text{Abs } 600 = 39830 \times 1 \times [\text{Tionina}]$$

$$0,03 = 39830 \times 1 \times [\text{Tionina}]$$

$$[\text{Tionina}] = 0,75\mu\text{M}$$

$$N \text{ tionina} = 0,75 \cdot 10^{-6} \times 1,3 \cdot 10^{-3} = 0,97 \text{ nmols}$$

$$\% \text{massa de Tionina} = \frac{0,97 \cdot 10^{-9} \times 287}{4,6 \cdot 10^{-3}} \times 100 = 0,006\%$$

A porcentagem em massa de Tionina presente nas partículas **sil-Tio** é de **0,006%**.

4.3. Funcionalização de sílica Cab-O-Sil com Tionina

Tionina foi ligada covalentemente a superfície de sílica Cab-O-Sil através de uma seqüência de quatro reações, representadas na figura 4.2. As partículas resultantes são denominadas **Cab-Tio** (fig 4.3).

Antes das reações, como a sílica Cabosil é muito higroscópica, 4g desta foram pré tratadas por 8h a 150° C.

Reação com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS): A sílica pré-tratada foi mantida em refluxo sob agitação com 150mL de tolueno, 1,5mL de APTS por 6h. Após resfriar, a sílica foi rotoevaporada, e mantida em estufa a vácuo a 150°C por 12h. Uma amostra de 0,17g desta sílica foi submetida à análise elementar (tabela 1) e infravermelho (fig 5.2). Outra amostra de 5mg foi utilizada para quantificar APTS ligado (item 4.2.1).

Reação com glutaraldeído: uma solução de 0,5mL de glutaraldeído ($5 \cdot 10^{-3}$ mols) e 50mL de DMSO anidro foi adicionada a 100mL de suspensão de sílica aminada em DMSO anidro. Após agitação de 40min a 78°C, uma alíquota de 20ml do gel formado foi centrifugado, lavado com DMSO duas vezes e sêco em estufa a 70°C. Esta amostra foi submetida a análise elementar (tabela1) e IV (fig5.2). O restante do gel foi utilizado na próxima etapa da reação.

Reação com Tionina: ao gel obtido na reação anterior foram adicionados 100mL de uma solução $1,2 \cdot 10^{-3}$ mols.L⁻¹ de Tionina em DMSO. Após agitação de 40min a 78°C, ultracentrifugou-se a sílica três vezes. A sílica foi ressuspensa em DMSO e sêca por rotoevaporação.

Redução com Na BH₄: A sílica sêca foi adicionada a 100mL de metanol anidro. 4g de NaBH₄ foram adicionados sob agitação. Após refluxo de 30 min e resfriamento a sílica

foi sêca por rotoevaporação. Uma amostra desta sílica foi submetida à análise elementar (tabela1) e infravermelho (fig.5.2).A sílica foi lavada dez vezes por agitação em solução de SDS e ultracentrifugação.

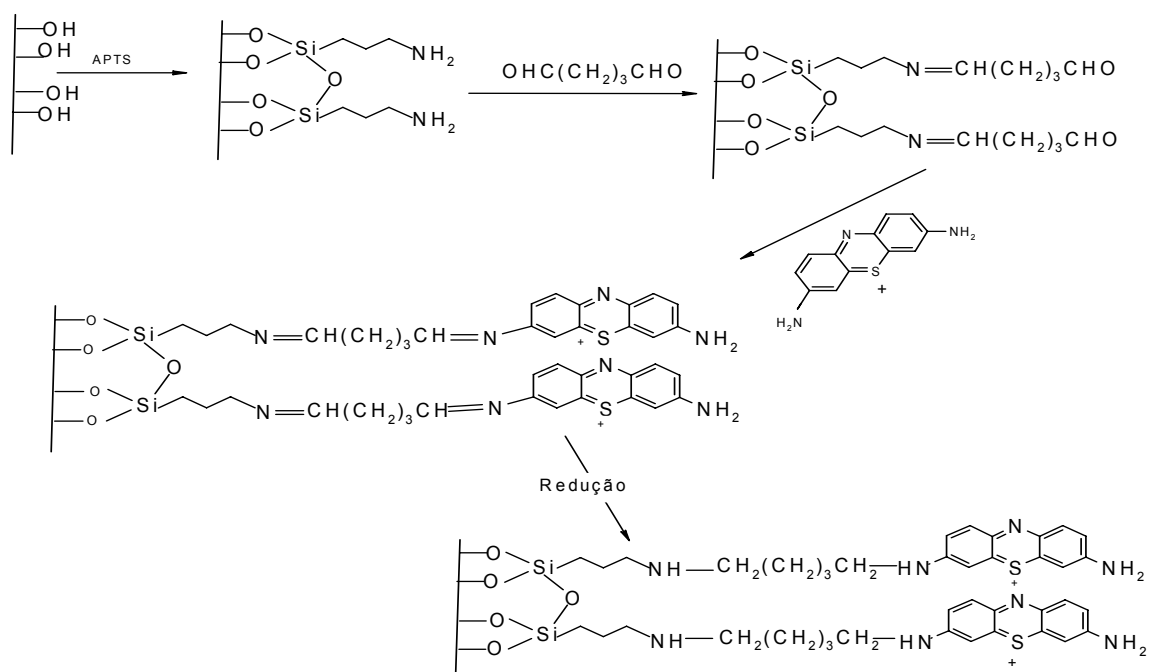


Figura 4.2- Representação das etapas sintéticas para obtenção das partículas Cab-Tio.

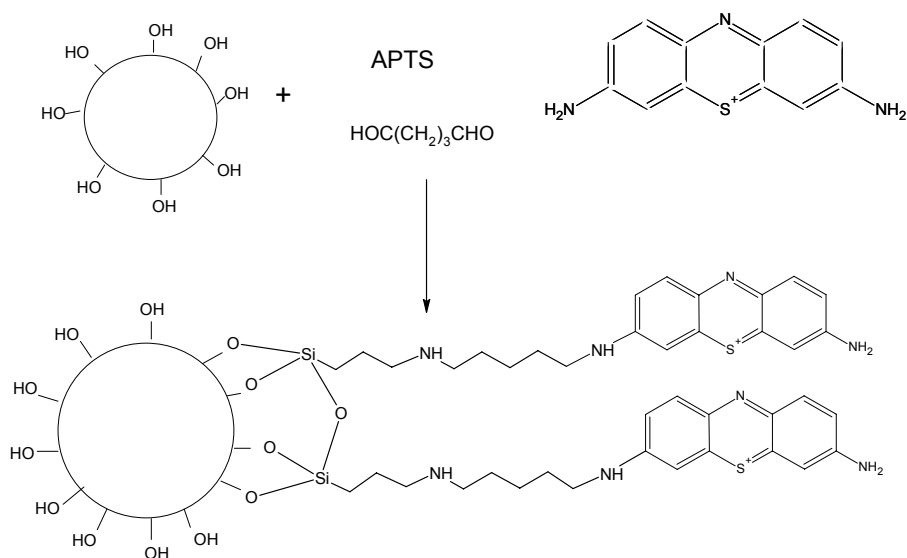


Figura 4.3- Representação da funcionalização da superfície da sílica CabOsil com Tionina.

4.3.1. Quantificação de APTS na superfície da sílica Cab-O-sil

5mg de sílica aminada foram mantidas sob agitação com 10mL de etanol e 30 μ L de aldeído salicílico por 1h. A reação de APTS com aldeído salicílico envolve a formação de uma imina responsável pela banda de absorção em 404nm (K.C. Vrancken et al, 1995). Centrifugou-se a sílica e mediu-se a absorção do sobrenadante. Como nenhuma banda de absorção característica foi determinada, a sílica foi agitada por mais 1h em etanol e aldeído salicílico. Centrifugou-se e mediu-se a absorção do sobrenadante e da sílica decantada. Não foi determinada nenhuma banda de absorção em 404nm no sobrenadante. No entanto, o espectro da sílica centrifugada apresentou uma banda em 404nm, comprovando que o APTS estava na superfície da sílica e foi capaz de reagir com o aldeído salicílico formando a imina responsável pela absorção em 404nm. Esta absorção ($A=0.64$) foi utilizada para a quantificação aproximada de número de mols de APTS por grama de sílica, baseada na construção de uma curva padrão (fig.4.5).

Para a construção da curva padrão de absorbância em 404nm em função da [APTS] foram feitas oito soluções de concentrações crescentes de APTS em etanol, a cada uma delas foram adicionados 0,8mL de aldeído salicílico. Todas as soluções foram agitadas em vortex e deixadas em repouso por 1h. Obtiveram-se os espectros de absorção destas soluções e as absorbâncias em 404nm foram utilizadas para a construção da curva (fig.4.5). Foi feita uma regressão linear da curva obtida, gerando a seguinte equação da reta:

$$\text{Abs}_{404} = 0,08614 + 1,0626 [\text{APTS}]$$

Sendo a absorção da suspensão de 5mg de sílica aminada igual a 0,64, temos:

$$[\text{APTS}] \text{ na sílica} = 0,5\text{mM}$$

número total de mols de APTS em 10ml de suspensão = $5 \cdot 10^{-6}$ mols (em 5mg de sílica)

número de mols de APTS em 1g de sílica = 10^{-3} mols/g sílica.

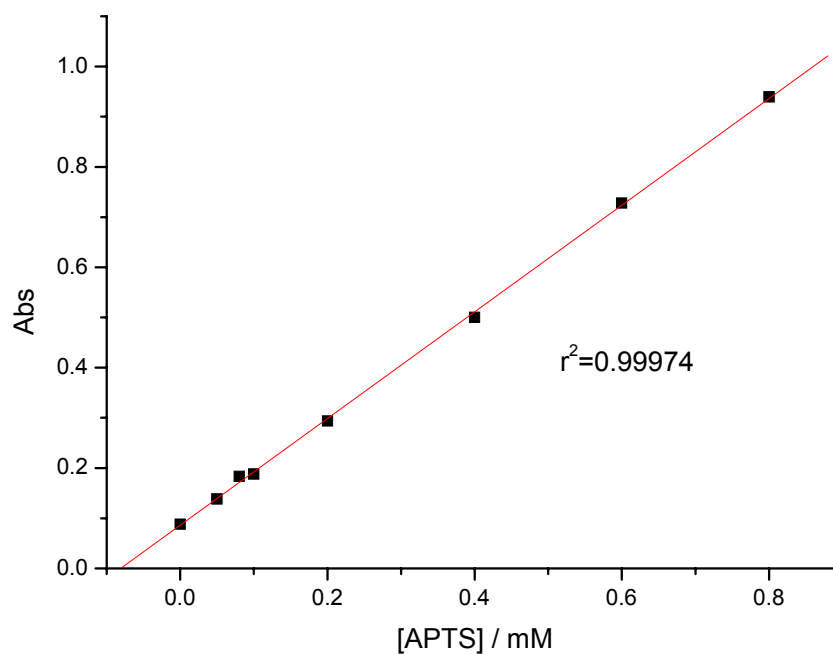


Figura 4.4- Curva padrão para a quantificação de APTS na sílica Cab-O-Sil.

4.4. Estudos sobre a superfície do silício

4.4.1. Funcionalização do silício

Placas de silício(1:0:0) ($1 \times 1 \text{ cm}^2$) foram mantidas em solução oxidativa composta de 1:1:5 (v:v:v) H_2O_2 (30% v) e NH_3 (25% v) e água destilada por 20 min a 70°C . Em seguida, foram lavadas com tolueno, secas com N_2 e submetidas a medidas de elipsometria (tabela 2). As monocamadas amino terminal foram obtidas mergulhando-se as placas em solução 1% (v:v) de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) em tolueno 65°C por 5min. Após 3 lavagens com tolueno, as placas foram secas com N_2 e submetidas a medidas de elipsometria (tabela2).

O grupo amino na superfície do silício reagiu com glutaraldeído mergulhando-se as placas em solução de glutaraldeído ($6,2 \cdot 10^{-2}\text{M}$) em dimetilsulfóxido (80mL) a 78°C por 40min. Após lavagens com tolueno as placas foram secas com N_2 . Mediu-se a espessura da camada formada por elipsometria (tabela2). As placas funcionalizadas com glutaraldeído foram mergulhadas em solução de Tionina em dimetilsulfóxido de diferentes concentrações ($7,0 \cdot 10^{-3}\text{mols.L}^{-1}$) a 78°C por 40min. Estas placas foram submetidas a medidas de elipsometria (tabela 2). Em seguida, para reduzir as ligações duplas das imidas formadas, as placas foram mergulhadas em metanol anidro (10mL) com 0,63g de borohidreto de sódio a 70°C por 30min. Por fim, as placas foram lavadas com metanol e secas com argônio.

4.4.2. Medidas Elipsométricas

Medidas elipsométricas foram feitas em um elipsômetro DRE-EL02 (Ratzeburg, Alemanha) acoplado a um computador. O ângulo de incidência foi ajustado para 70° e o comprimento de onda usado foi de 632,8nm. Através de um polarizador motorizado é gerada uma luz incidente de polarização elíptica. Após a reflexão pela placa de silício a luz torna-se linearmente polarizada. A intensidade de luz refletida é extinta por um segundo polarizador, do qual a posição é automaticamente ajustada para que o mínimo de luz alcance a fotomultiplicadora. São obtidos os ângulos de elipsometria Δ e ψ , os quais contêm informações sobre o deslocamento de fase relativo e atenuação das componentes de onda perpendicular e paralela ao plano de incidência, respectivamente. Δ e ψ foram medidos e gravados em períodos de 4s. Para a interpretação dos dados, um modelo de multicamada composto pelo substrato, camada desconhecida e ambiente ao redor foi

utilizado. A espessura das monocamadas foi calculada, através da equação fundamental da elipsometria (equação 1) e cálculos iterativos com matrizes de Jones, assumindo os seguintes índices de refração (Fujimoto J. & Petri D.F.S., 2001): óxido de silício $n= 1,462$, APTS $n= 1,424$, glutaraldeído e tionina $n=1,500$.

$$\rho = \tan \psi (e)^{i\Delta} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: ρ é a razão entre as amplitudes das componentes paralelas e perpendiculares da luz incidente na amostra.

4.4.3. Microscopia de força atômica (AFM)

As medidas de microscopia de força atômica foram feitas em um microscópio Nanoscope IIIA (Veeco) no ar a temperatura ambiente. As alavancas foram operadas um pouco abaixo da sua frequência de ressonância de aproximadamente 315kHz. As imagens topográficas são originais, sem filtros e em escala linear de cinza. Os valores de rugosidade rms foram calculados para uma área de varredura de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ utilizando programa Nanoscope IIIA. As imagens foram obtidas pela prof. Dra. Denise Siqueira Petri em um trabalho em colaboração.

4.4.4. Espectroscopia Raman

Foi utilizado um sistema Micro Raman espectrômetro comercial triplo (Jobin Yvon, modelo T64000) equipado com detector CCD. As amostras foram iluminadas com luz 514nm de um laser íon de argônio. As medidas foram feitas a temperatura ambiente e potência óptica na ordem de 10mW.

4.4.5. Simulações de teoria de densidade funcional

O cálculo das espessuras das camadas formadas na funcionalização do silício através de simulações teóricas foi realizado em colaboração com o prof. Ronei Miotto (Universidade de Brasília, Instituto de Física). Para investigar as propriedades estruturais e vibracionais das monocamadas formadas na funcionalização do silício com Tionina, foi empregado o método de estado de arte pseudopotencial com aproximação de gradiente generalizado para a teoria de densidade funcional. A descrição completa do procedimento teórico está descrita em Miotto et.al. (2002).

4.5. Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas em um microscópio Philips CM200 operando a uma voltagem de 200kV. As amostras foram preparadas aplicando-se uma gota da suspensão de nanopartículas em etanol numa grade de carbono. Os diâmetros foram calculados por uma média de 100 partículas observadas em uma imagem ampliada através do programa Image Tool. Utilizando todos os valores de diâmetros medidos através das imagens, foram construídos histogramas e feitos ajustes de curvas Gaussianas para cada tipo de partícula (fig.5.1).

4.6. Detecção de $^1\text{O}_2$

Oxigênio singlete foi detectado através de medidas de fluorescência no infravermelho próximo em um equipamento composto por um laser Nd:YAG Continuum Surelite III pulsado em 532 nm, com tempo de duração de pulso de 5 ns e energia ≤ 5 mJ/pulso; um monocromador e uma fotomultiplicadora (PMT) Hamamatsu modelo R5509 resfriada a -80°C ; um sistema de detecção composto por uma placa de aquisição rápida modelo Becker & Hickl GmbH MSA – 300. O sistema foi montado pela *Endinburg Analytical Instruments*.

4.6.1. Determinação do tempo de vida $^1\text{O}_2$

Foram obtidos transientes de emissão de fluorescência em 1270nm após a fotoexcitação em 532nm de suspensões de partículas e soluções de FS em diferentes solventes (água, etanol, acetonitrila e acetona). O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ foi calculado pelo ajuste da curva para decaimento de primeira ordem (fig. 4.5).

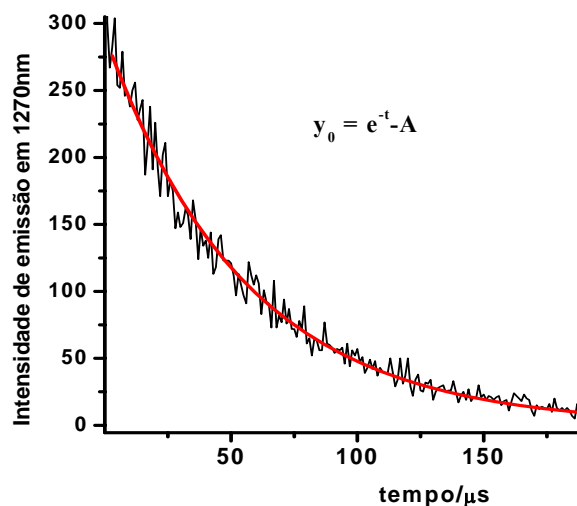


Figura 4.5- Transiente de emissão em 1270nm obtido após a fotoexcitação de solução de AM (Abs532=0,2) em acetonitrila e ajuste para decaimento de primeira ordem (—).

4.6.2. Obtenção do espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado pelas partículas

Foram preparadas suspensões de partículas sil-AM (7mg), sil-Tio (37mg) e Cab-Tio (2mg) em acetonitrila (2mL). Após irradiar estas amostras com laser de 532nm obtiveram-se transientes de emissão de luz no infravermelho próximo variando-se o comprimento de onda do monocromador de 1200 a 1380nm. Para cada partícula, construiu-se um gráfico de intensidade de luz 10 μ s após o pulso do laser em função do λ da luz captada pela fotomultiplicadora.

4.7. Determinação de eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ (S)

A eficiência das partículas em gerar de $^1\text{O}_2$ foi calculada em relação aos respectivos FS livres, cujos valores de rendimento quântico eram conhecidos como 0,50 para AM e 0,59 para Tionina (Aryeh, 2000).

4.7.1. Método Direto

A eficiência de geração de oxigênio singlete das partículas ($S_{\text{partícula}}$) foi calculada através da obtenção de transientes de emissão de luz gerados pelas partículas e por AM e

Tionina em solução. A absorção das soluções padrão (AM ou Tionina) e suspensão de partículas foram normalizadas para o mesmo valor em 532nm. Os valores de intensidade de emissão em 1270nm, 10 μ s após o pulso do laser foram aplicados na equação abaixo:

$$S_{partícula} = \phi_{padrão} \times \frac{I_{partícula}}{I_{padrão}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde, $I_{padrão}$ = intensidade de emissão de 1O_2 em 1270 nm gerado por AM ou Tionina livres em acetonitrila, $I_{partícula}$ = intensidade de emissão de 1O_2 em 1270 nm gerado por suspensão de partículas em acetonitrila e $\phi_{padrão}$ = rendimento quântico de geração de 1O_2 de AM ou Tionina em acetonitrila.

4.7.2 Método Indireto

Foram preparadas soluções de AM (3 μ M), Tionina e suspensões de partículas em acetonitrila. As absorbâncias foram normalizadas em 532nm e a mesma concentração (8mM) da sonda 1,3-difenilisobenzofurano (**DPBF**) foi adicionada em todas as soluções. Foram obtidos espectros de absorbância após diferentes períodos de irradiação em 532nm (fig.5.21).

Para cada suspensão de partículas e solução de FS livre foi construída uma curva de decaimento da absorção em 410nm função do tempo de irradiação da amostra (fig.5.21). As curvas obtidas foram ajustadas para decaimentos de exponencial de primeira ordem, pelo programa Origin 6.0. Obtiveram-se assim, valores de tempo de consumo de DPBF (**t**).

Sendo estes valores inversamente proporcionais ao rendimento quântico de geração de oxigênio singlete a seguinte equação foi utilizada para o cálculo de eficiência de geração de 1O_2 das partículas (**Spartícula**):

$$S_{partícula} = \phi_{padrão} \times \frac{t_{padrão}}{t_{partícula}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: $t_{padrão}$ = por AM ou Tionina livres em acetonitrila, $t_{partícula}$ = tempo de decaimento de Abs410 devido ao consumo de DPBF pela reação com 1O_2 gerado por partículas em acetonitrila e $\phi_{padrão}$ = rendimento quântico de geração de 1O_2 de AM ou Tionina em acetonitrila.

4.8. Estudos de supressão de fluorescência

A equação de Stern-Volmer (equação 4) relaciona a diminuição da intensidade de fluorescência ou tempo de vida com a concentração de supressor colisional:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{t_0}{t} = 1 + k_{sv}[Q] \quad \text{Equação 4}$$

Nesta equação t_0 e t são respectivamente, os tempos de vida de fluorescência na ausência e na presença de supressor. F_0 e F são respectivamente, as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de supressor e K_{sv} é a constante de Stern-Volmer para o processo de supressão colisional. Esta constante é a razão entre a constante de supressão bimolecular e a constante de decaimento unimolecular e implica na competição entre dois processos de decaimento tendo um caráter de constante de equilíbrio. Note que a supressão pode ser acompanhada tanto pelo decréscimo no tempo de vida, medindo-se fluorescência resolvida no tempo, quanto pelo decréscimo da intensidade de fluorescência medindo-se fluorescência no estado estacionário (Rohatgi; 1986). Um gráfico da razão de intensidade de fluorescência na ausência de supressor e intensidade de fluorescência na presença de supressor em função da concentração de supressor resultará em uma reta se a supressão ocorrer apenas pelo processo colisional, como previsto pela equação de Stern-Volmer. O coeficiente angular desta reta corresponde ao valor de K_{sv} .

Para determinar K_{sv} correspondente à supressão dos sensibilizadores livres e ligados as nanopartículas, foram preparadas soluções de AM e Tionina e suspensões de nanopartículas com mesma absorbância em 580nm (λ de excitação). Espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em concentrações crescentes de NaBr na faixa de concentração de 0-5M. A regressão linear das curvas de intensidade de emissão em função da concentração de NaBr forneceu os valores K_{sv} (tabela6). As curvas de Stern-Volmer de AM e Tionina não apresentarem linearidade em altos valores de concentração de brometo de sódio estudada, indicando que o mecanismo de supressão deve envolver outros processos além do mecanismo colisional (Laws & Contino; 1992). Sendo assim, as regressões lineares foram feitas utilizando apenas a parte linear das curvas para a obtenção das constantes de velocidade de supressão, K_{sv} .

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Spex (Fluorolog 0.81m) em modo ângulo reto.

4.9. Recobrimento de partículas

Partículas de sil-AM foram recobertas pela adsorção de lipídios dioleilfosfatidilcolina (DOPC) e fosfatidilglicerol (PG) e pela ligação covalente do polímero polietilenoglicol (PEG) (fig4.5).

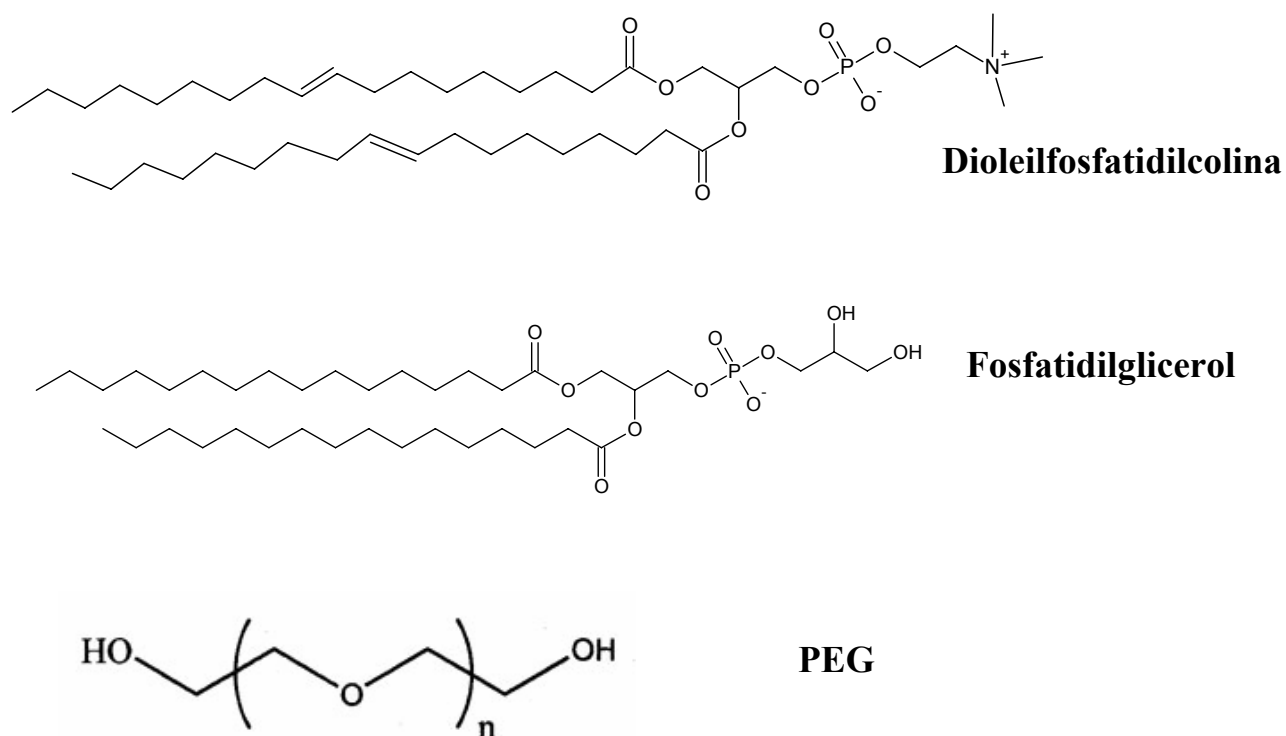


Figura 4.6- Estrutura de lipídios e PEG utilizados no recobrimento de partículas sil-AM

4.9.1. Recobrimento com lipídios

Partículas sil-AM foram recobertas com bicamadas de fosfolipídios DOPC (**partículas sil-AMPCPG**) e mistura de DOPC:PG na proporção em massa de 1:1 (**partículas sil-AMPG**) através de um método semelhante ao descrito em Moura et.al, (2005). 2,3 ou 1,3 mg de cada lipídio (para recobrimento 1:1) foram solubilizadas em clorofórmio e secos com argônio. Adicionou-se 10mL de tampão Tris-HCl (10mM; pH 7.4) contendo 140mM de NaCl. Após vortexar, sonicou-se por 2horas. Foram feitas duas filtrações consecutivas em filtro Millipore de poro 0,2 μ m. A 1mL desta suspensão de vesículas (0,3mM) foram adicionados 6mg de partículas. Após agitação de 12horas as partículas foram centrifugadas e ressuspensas em 1mL de Tris Hcl (pH=7.4). O sobrenadante desta centrifugação foi usado no teste de molibdato para determinação da concentração de lipídios.

As escolhas do tampão e concentração de sal foram feitas baseadas nos trabalhos de Moura et.al.(2005) e Pereira et.al (2002), os quais observaram que a fusão de vesículas é favorecida nestas condições, obtendo-se máxima adsorção de bicamadas lipídicas nas nanopartículas.

4.9.1.a.Determinação das % de lipídios adsorvidos às partículas

A concentração de lipídios foi determinada no sobrenadante da centrifugação de uma alíquota da suspensão de lipídios que permaneceu em agitação na ausência de partículas e de uma alíquota da suspensão de lipídios que permaneceu sob agitação na presença de partículas. A diferença entre as duas concentrações foi usada para determinar a porcentagem de lipídios adsorvidos nas partículas. Para tal determinação foi utilizado o teste do molibdato descrito em Rouser et.al. (1969) Após a quebra dos lipídios com ácido perclórico, os átomos de fósforo liberados formam complexo com molibdato que ao ser acidificado com ácido ascórbico possui coloração azul e $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção de 800nm.

A 250 μ L de sobrenadante de lipídios adicionaram-se 325 μ L de HClO₄. Após aquecimento a 160°C por 20min, a solução foi resfriada e adicionaram-se 1,65mL de H₂O destilada, 250 μ L de solução de molibdato de sódio (2,5% em massa) e 250 μ L de solução de ácido ascórbico (10% em massa). A solução permaneceu 5minutos em banho-maria a

100°C. Após resfriar, foram obtidos espectros de absorção e o valor de absorção em 800nm (Abs_{800}) foi utilizado para a determinação da concentração de fósforo e conseqüentemente de fosfolipídios na solução. Estes cálculos foram repetidos seis vezes para cada tipo recobrimento e a cada calculo foi construída uma curva padrão no mesmo dia.

4.9.1.b. Curva padrão para determinação da concentração de fósforo

Foram preparadas soluções de fosfato de sódio dibásico em diferentes concentrações na faixa de 0-256 μ M em tampão tris HCl (pH = 7.4). A 250 μ L de solução adicionaram-se 325 μ L de HClO₄. Após aquecimento a 160°C por 20min, a solução foi resfriada. Adicionaram-se 1,65mL de H₂O destilada, 250 μ L de solução de molibdato de sódio (2,5% em massa) e 250 μ L de solução de ácido ascórbico (10% em massa). A solução permaneceu 5 minutos em banho-maria a 100°C. Após resfriar, foram obtidos espectros de absorção. Os valores de absorção em 800nm foram utilizados para a construção da curva padrão de absorção em 800nm (Abs_{800}) em função da concentração de fósforo (fig.4.6). A regressão linear desta curva gerou a equação usada para determinação da concentração de fosfato.

$$Abs_{800} = A + B [PO_4^-]$$

Foram construídas diversas curvas, uma para cada experimento e as porcentagens de adsorção nas partículas calculadas pela diferença entre a concentração de fósforo no sobrenadante da suspensão de lipídios que permaneceu em agitação na ausência de partículas ($[P]^{Slip}$) e no sobrenadante da suspensão de lipídios que permaneceu em agitação na presença de partículas ($[P]^{Spart}$):

$$[P]^{Slip} - [P]^{Spart} = [P]^{part}$$

Como para cada mol de fósforo temos um mol de lipídio: $[P] = [\text{lipídio}]$.

$$\% \text{ adsorção} = \frac{[P]^{part}}{[P]^{Slip}} \times 100$$

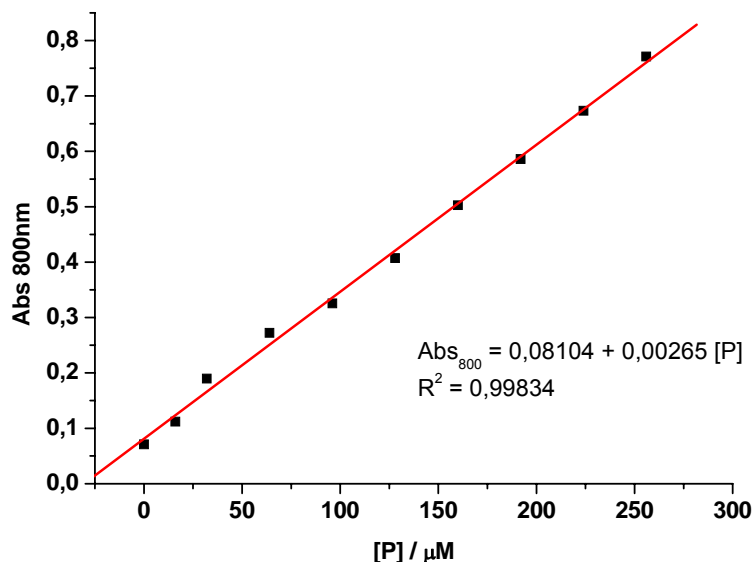


Figura 4.7- Curva padrão para determinação da concentração de fósforo.

4.9.2. Modificação com PEG

A ligação de Polietilenoglicol à superfície de partículas sil-AM (**partículas sil-AMPEG**) foi realizada através da ligação com Toluenodiisocianato (**TDI**), seguindo-se o protocolo descrito em Guo et. al. 2005.

0,2g de sil-AM foi sonificado em 10mL tolueno. Adicionou-se 0,28g de PEG (2000) em 20mL de tolueno. Sob atmosfera de argônio, a 65°C, adicionou-se 50 μL de TDI (2,4/2,6-Toluenodiisocianato 80:20). Após agitação de 7horas, foram adicionados 10mL de metanol. A suspensão foi rotoevaporada e as partículas ressuspensas em etanol. Para eliminação do excesso de PEG, as partículas foram lavadas 3 vezes em etanol e secas a temperatura ambiente. A reação está representada na figura 4.7.

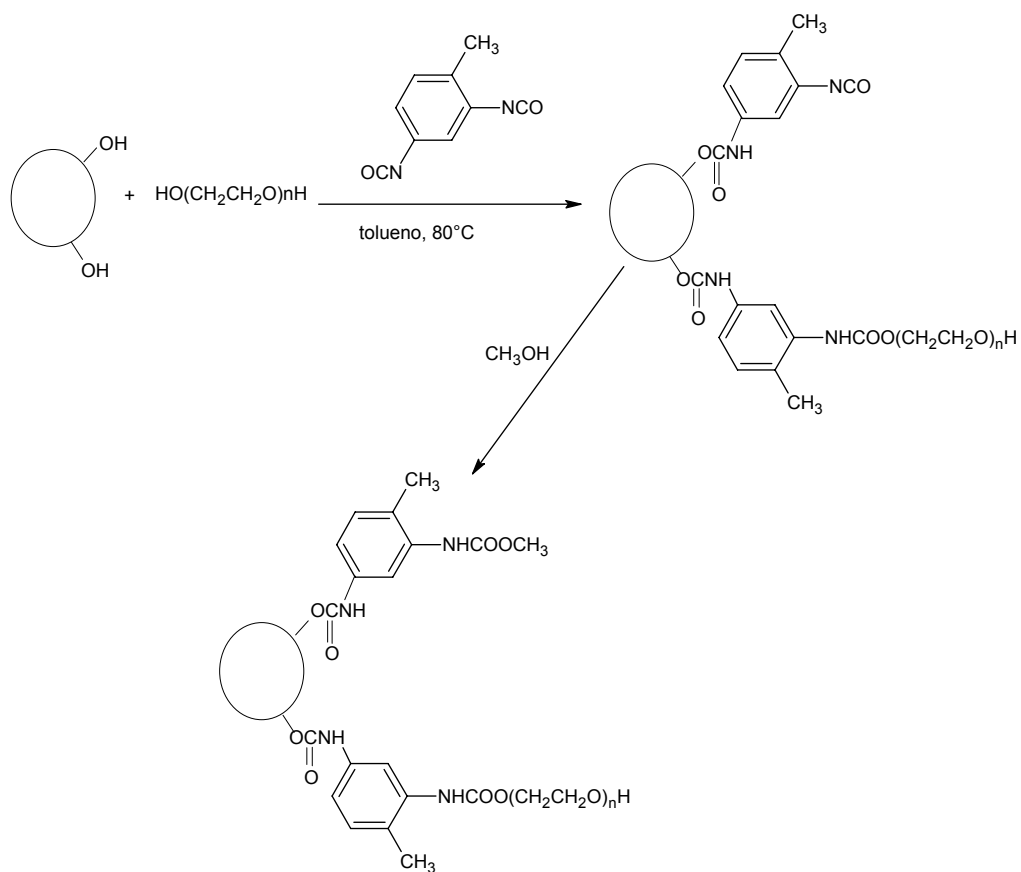


Figura 4.8- Etapas reacionais na ligação do PEG na superfície das partículas sil-AM através da reação com TDI.

4.10. Medidas de Potencial Zeta

Para determinar o potencial Zeta médio das nanopartículas foi usado um equipamento Brookhaven ZetaPlus-Zeta Potential analyzer (Brookhaven Instruments Corp, Hostville, NY) contendo um laser de 677nm. A determinação dos potenciais de vesículas de DOPC e DOPC:PG (1:1) foi realizada com alíquotas das mesmas suspensões de vesículas preparadas para o recobrimento das partículas. As medidas de potencial foram realizadas, adicionando-se 50 μL de suspensões de vesículas e 50 μL de suspensões de partículas (6mg/mL) em 2mL de água bidestilada (MILI-Q) filtrada em membrana de 0,2 μm .

4.11. Estudos de interação entre nanopartículas e membranas de bicamadas híbridas

A adsorção de nanopartículas sil-AM não recobertas e recobertas com lipídios e PEG sobre membranas de bicamadas híbridas (MBH) foi investigada através da técnica de Ressonância Plasmônica de Superfície com imagens (SPRi).

4.11.1 Preparação de MBH

Membranas de bicamadas híbridas (fig.4.9.) são membranas biomiméticas compostas de uma monocamada de dodecanotiol e uma monocamada de fosfolipídios (Suraniti et.al,2007).

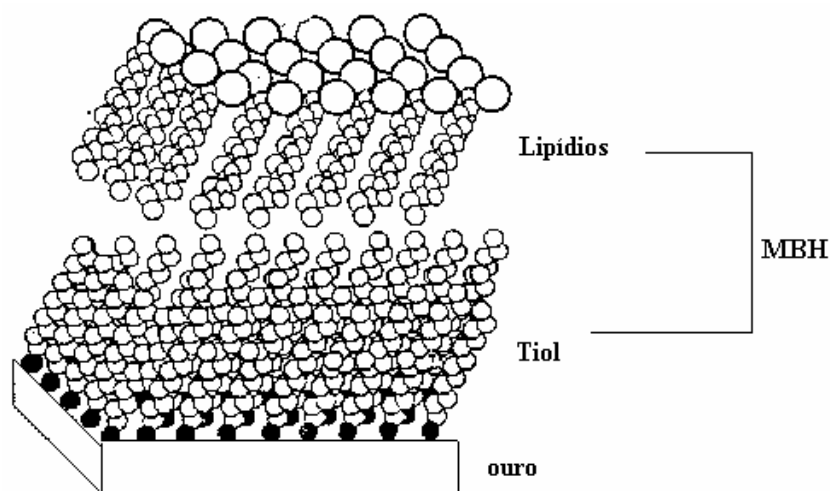


Figura 4.9- Representação da membrana de bicamada híbrida formada sobre a superfície do ouro.

Estas membranas foram preparadas sobre prismas de borosilicato com superfície de ouro. Primeiramente, estes prismas permaneceram em repouso por 12 horas em solução etanólica de dodecanotiol (10mM) após serem lavados com solução piranha ($H_2SO_4:H_2O_2$; 7:1; v:v). Para retirada do excesso de tiol, que não estava ligado no ouro, os prismas foram lavados várias vezes com etanol e permaneceram em etanol por no mínimo 12 horas. Imediatamente antes dos experimentos, os prismas foram retirados do etanol, e a superfície foi seca com argônio ou nitrogênio. As monocamadas de lipídios sobre a camada de tiol foram construídas injetando-se 1mL de suspensão de vesículas de DOPC:PG 4:1 ou DOPC:PG 1:4 na concentração (5mg/mL) em tampão Tris-HCl (pH 7.4). A variação de 3-5% de reflectância indica a formação da monocamada (Lingler S, et.al.1997).

4.11.2.Preparação de vesículas

As suspensões de vesículas foram preparadas da seguinte maneira: soluções de lipídios DOPC e PG nas proporções molares de 1:4 e 4:1 foram preparadas em clorofórmio em um tubo de vidro. As soluções foram secas sob fluxo de argônio, formando um filme lipídico. Adicionou-se solução tampão Tris-HCl (10mM, pH=7.4), aquecida a 30°C e submeteu-se a tratamento com ultrassom, obtendo-se uma suspensão de vesículas de 5mg/mL. A suspensão foi filtrada 6 vezes com filtro Milipore de 0,2 μ m.

4.11.3.Medidas de variação de reflectância por SPRi

Princípios da técnica

A técnica de ressonância de plasma de superfície (SPR; do inglês *Surface Plasmon Surface*) é baseada na ressonância entre o campo elétrico de um feixe luminoso e os elétrons livres de uma superfície de metal (Frutos,1998).

O efeito de ressonância de plasma de superfície é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo interface de dois meios de constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é um dielétrico e outro um metal, o qual deve ter elétrons livres (plasma).

Para que o efeito ressonante ocorra, o plasma deve ser excitado, por exemplo, por um feixe de luz polarizada. Quando a luz polarizada atravessa um meio óptico denso e

alcança a interface entre este meio e o meio de densidade menor, ela é refletida de volta para o meio mais denso. No entanto uma componente da radiação incidente penetra na interface do meio menos denso até uma distancia de 1λ (fig.4.10).

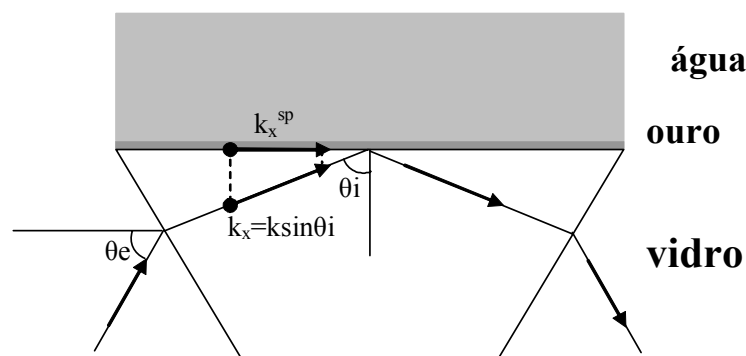


Figura 4.10- Esquema de excitação do plasma de superfície. Um feixe de luz polarizada incide em um meio de maior densidade óptica (vidro) e atinge a interface do meio de densidade óptica menor (água/ouro). O feixe de luz é refletido, mas uma componente se acopla com os elétrons livres. Em um determinado ângulo de incidência de luz o vetor de onda da componente é igual ao vetor de onda da oscilação dos elétrons, ocorrendo o efeito de ressonância plasmônica.

Em um determinado ângulo de incidência o vetor de onda da componente se iguala ao vetor de onda da oscilação dos elétrons do plasma. Assim, parte da radiação acopla com os elétrons livres oscilantes, fenômeno chamado de ressonância de plasma de superfície. A luz incidente perde então, energia para os elétrons e a intensidade da luz refletida é menor. Uma curva típica de variação de luz refletida em função do ângulo da luz incidente em condição de ressonância (**curva plasmônica**) é apresentada na figura 4.10 . O valor do ângulo de incidência da luz a partir do qual se observa o efeito ressonante depende do índice óptico nas proximidades da camada do metal é, portanto, alterado pela adsorção de moléculas, polímeros e partículas sobre a superfície, fato que pode ser observado pelo deslocamento da curva plasmônica (fig. 4.11) e variação no valor do ângulo onde o efeito ressonante é máximo (mínima reflectância). A diferença entre o ângulo de ressonância

máxima inicial (θ_{pi}) e o final (θ_{pf}), fornece uma indicação sobre a extensão da adsorção (fig4.11). Este é o princípio de um dos sistemas de SPR mais utilizados, o Biacore.

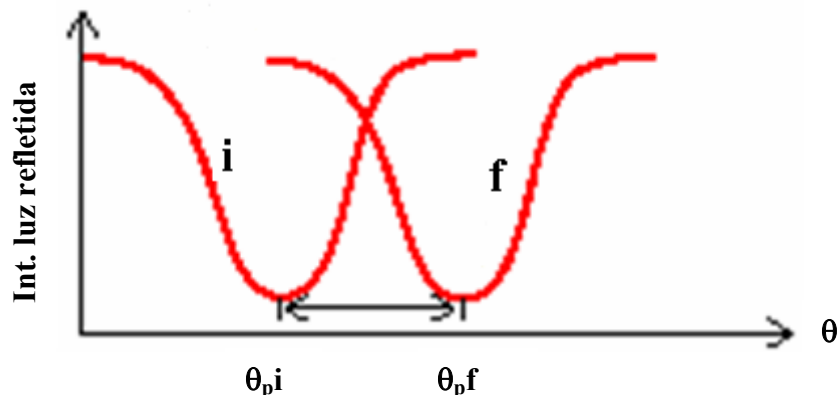


Figura 4.11- Curvas de variação de intensidade de luz refletida em função do ângulo de incidência da luz antes (i) e após (f) a adsorção de moléculas na superfície do metal. θ_{pi} e θ_{pf} , representam os valores de ângulo onde o efeito ressonante é máximo nas duas situações.

O sistema utilizado neste trabalho (Genoptics©, Orsay, França) não é baseado na determinação da variação do ângulo θ_p e sim na variação de intensidade de luz refletida em um determinado ângulo, chamado de ângulo de trabalho (θ_t ; figura 4.12). Este ângulo é escolhido de forma que a variação do índice de refração causada pela adsorção de espécies sobre a superfície do ouro resulte na maior variação de reflectância possível. Neste ângulo a reflectividade é uma função praticamente linear do índice de refração nas proximidades da superfície do ouro, e a sua variação permite acompanhar processos de adsorção/desorção sobre a superfície. A técnica de **SPRi** consiste no acompanhamento simultâneo da superfície por variações de reflectância e imagens geradas pela captação da luz refletida por uma câmera CCD acoplada ao sistema.

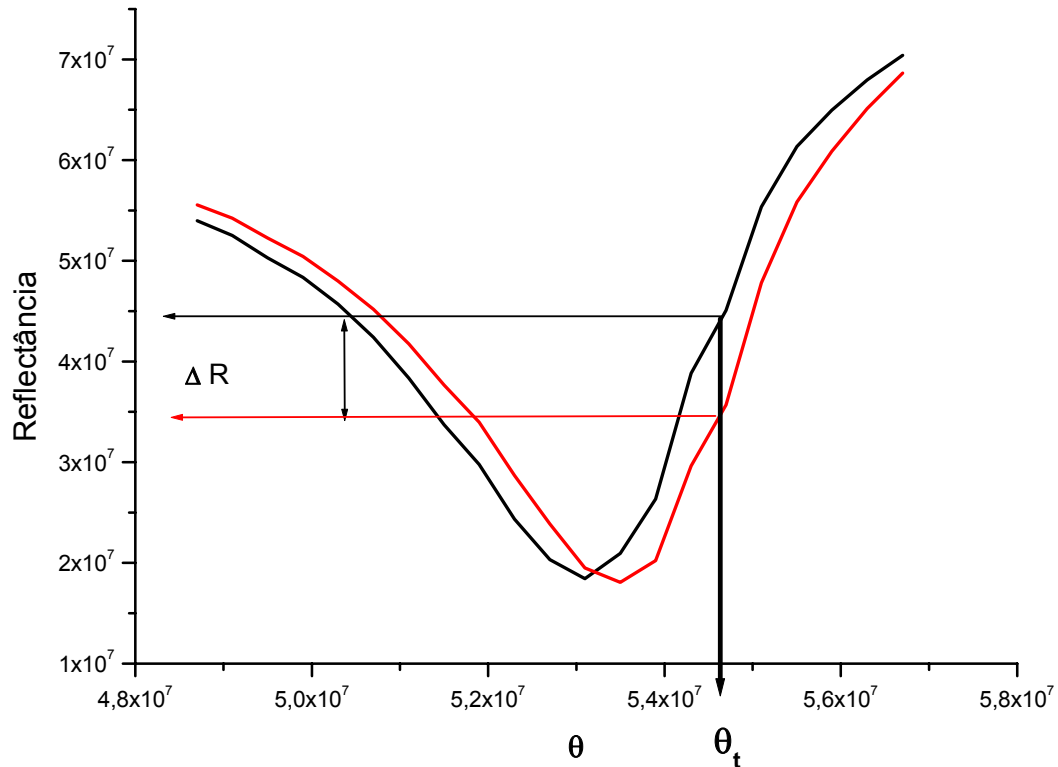


Figura 4.12- Medidas da reflectividade em um ângulo de trabalho fixado (θ_t). A variação de reflectividade (ΔR), causada pelo aumento ou diminuição do índice de refração, permite avaliar os processos de adsorção/desorção na superfície do ouro.

Uma representação simplificada do sistema utilizado no trabalho encontra-se na figura 4.13. Um prisma de borosilicato recoberto por uma superfície de ouro é iluminado por um feixe de laser de diodo de 660nm. Um espelho permite o controle do ângulo de incidência do feixe de laser (A). O campo elétrico deste feixe entra em ressonância com os elétrons livres na superfície do ouro. Obtém-se uma curva plasmônica (B). A variação de reflectância no ângulo de trabalho é determinada em função do tempo, em diferentes regiões da superfície (C). Uma câmara CCD permite a obtenção de imagens da superfície (D).

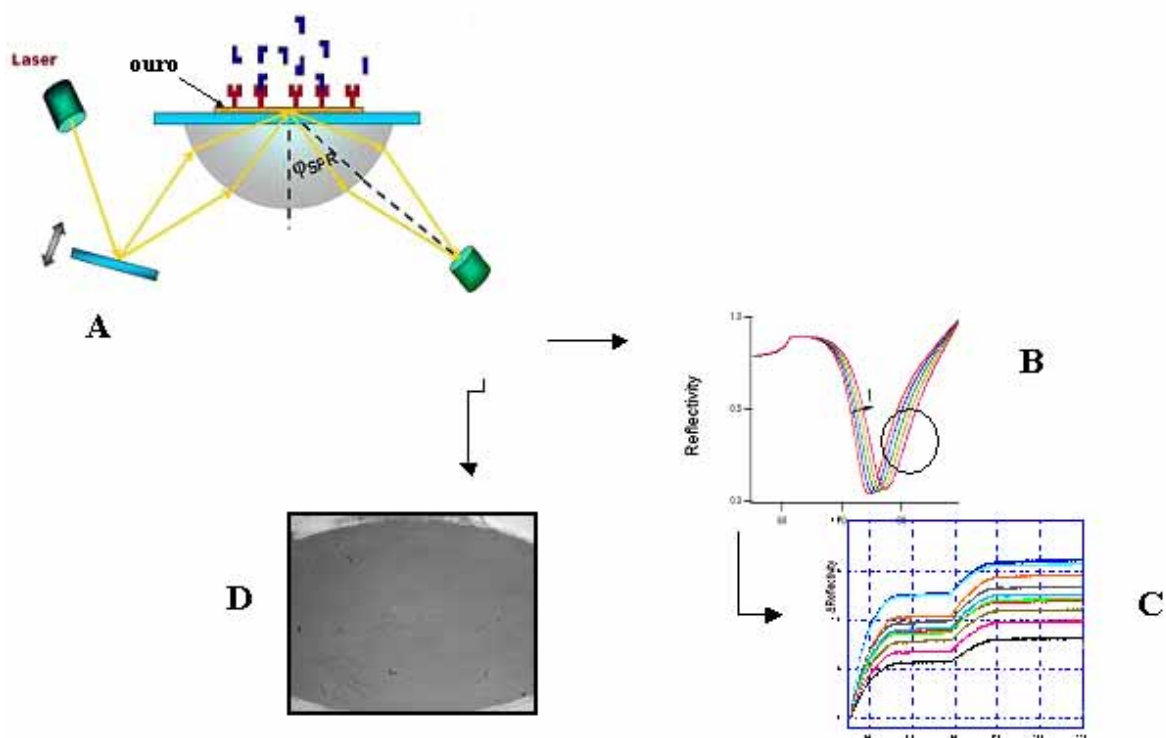


Figura 4.13 – Representação do sistema de SPRi.

Procedimento Experimental

Foram realizadas injeções consecutivas de suspensões de nanopartículas em tampão Tris-HCl (0,5 mg/mL) sobre HBM. Antes do início de cada experimento foram escolhidas 10 regiões da superfície a ser analisada. Para cada região do prisma foi obtida uma curva de variação de reflectância em função do tempo (fig4.14). O valor de variação de reflectância utilizado na análise de dados, para cada partícula, foi calculado como média e desvio padrão entre os valores obtidos em todas as regiões selecionadas do prisma.

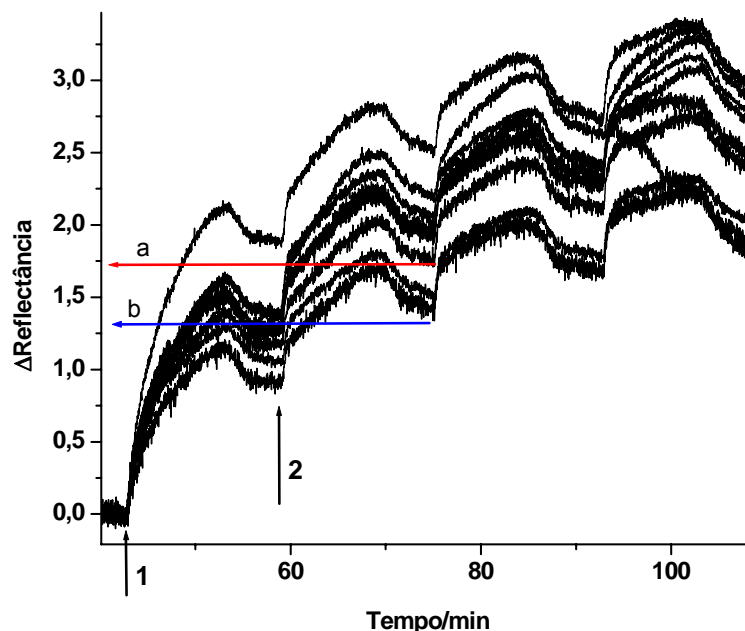


Figura 4.14—Curvas de variação de reflectância para cada região selecionada do prisma em função do tempo após injeção de partículas. Setas 1 e 2 indicam o tempo em que foram realizada a 1^a e a 2^a injeção, respectivamente. Após cada injeção, a superfície foi lavada com tampão. Para cada curva é obtido um valor de variação de reflectância, exemplificado pelas setas **a** e **b**. Os dados apresentados no trabalho correspondem à média e o desvio padrão destes valores.

4.12. Estudos de Viabilidade Celular

Células B16 foram cultivadas em meio RPMI1640 e plaqueadas na concentração de 10^5 células por poço (1mL). Após 12 horas, o sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas com partículas (0,5mg/mL) ou FS em solução em 1mL de meio RPMI sem indicador de pH. Para os experimentos de AM e nanopartículas sil-AM as absorbâncias foram normalizadas em 665nm ($Abs_{665} = 5 \cdot 10^{-2}$). No caso da Tionina, a incubação foi feita com 10 μ M. Optou-se por não normalizar as absorbâncias diluindo-se a solução de Tionina, uma vez que, na concentração utilizada já não foi possível observar efeito tóxico deste FS. Assim, as absorbâncias foram de 0,20 em 532nm e 0,45 em 590nm. Para as nanopartículas Cab-Tio as absorbâncias foram de 0,02 em 532nm e de 0,07 em 590nm. As absorbâncias das suspensões de nanopartículas sil-Tio ($Abs_{532} \cong 10^{-4}$, $Abs_{590} = 0,01$) não puderam ser igualadas às absorbâncias das suspensões de Cab-Tio porque a incubação das células com

concentrações maiores que 0,5mg/mL causariam morte celular por processos físicos. Para cada experimento foram incubados 3 poços com cada tipo de partícula ou FS. Após 4 horas de incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com tampão fosfato (pH 7,4) para retirada das partículas e FS que não penetraram nas células. Após adicionar 1mL de tampão fosfato os poços foram irradiados com laser de 665, 532 ou 590nm por 3min (potencia de 3mW, dose $0,3\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$). O tampão foi retirado e as células permaneceram em 1mL de meio RPMI com indicador de pH durante 24horas. Após este período as células foram soltas e a contagem de células vivas foi feita através da marcação com corante azul de Tripán. Este corante penetra mais facilmente em células lesadas acarretando em intensa coloração azul. Utilizando uma câmara de Neubauer e microscópio óptico, foram contadas como vivas todas as células que não apresentavam coloração azul. Em cada experimento, foram feitos três poços controles onde as células não receberam nem droga nem luz e três poços controles onde as células não receberam droga, mas foram irradiadas com laser de 665, 532 ou 590nm por 3min. A porcentagem de células vivas foi calculada considerando as células vivas presentes nos poços que não receberam luz ou droga como 100% de viabilidade.

Foram realizados 3 experimentos para cada partícula e FS. Utilizando todos os valores de % de células vivas para cada experimento realizado, foram calculados valores médios e desvios padrões apresentados no item 5.6.

4.13. Microscopia de fluorescência confocal

4.13.1. Partículas com ruteniofenantrolina

As partículas com AM e Tionina em estudo neste projeto não possuem emissão intensa o suficiente para serem vistas através da microscopia confocal. Sendo assim, para investigar se estas partículas são capazes de penetrar nas células e qual a citolocalização, foram sintetizadas partículas semelhantes contendo o complexo cloreto de tris(1,10-fenantrolina)rutênio(II) ($[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$), o qual apresenta forte fluorescência em 590nm. Para isto utilizou-se o mesmo procedimento para síntese de partículas sil-AM e sil-Tio. 4,8mg de ruteniofenantrolina ($\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$) foram adicionados a 120mL de etanol, 4,2mL de TEOS e 6,0mL de amônia. Após 24hs de agitação a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada (13000rpm, 20min) e as partículas lavadas com etanol (3X).

O recobrimento destas partículas com lipídios dioleilfosfatidilcolina (DOPC) e fosfatidilglicerol (PG) (1:1) foi feito da mesma forma que o recobrimento de partículas sil-AM (seção 4.2), apenas substituindo partículas sil-AM por partículas com ruteniofenantrolina.

4.13.2. Aquisição de imagens

Para obtenção de imagens de microscopia confocal células B16 (10^5 células/mL) foram cultivadas sobre lamínulas de vidro. Após 18 horas as células foram incubadas com partículas contendo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ na concentração de 0,5mg/mL durante 4 horas. No mesmo meio 1 μL ($10 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) de Mitotracker green (marcador de mitocôndria) foi incubado por 30min. As lamínulas foram então lavadas com PBS gelado e colocadas sobre uma lâmina de vidro. As lâminas foram analisadas no microscópio confocal (Zeiss, modelo Confocor 2 LSM510) irradiando a amostra em 458 e detectando emissão acima de 560nm, para visualização das partículas e excitando em 488 e detectando emissão em 510-540nm para visualização do marcador. As imagens foram obtidas e tratadas através do programa LSM image browser.

5. Resultados e discussões

5.1. Síntese de nanopartículas

Visando possíveis aplicações em sistemas biológicos, dentre elas PDT, procurou-se sintetizar nanopartículas com tamanho propício para acúmulo seletivo no tecido tumoral, que deve ser na faixa de 30-100nm (Fukumori & Ichikawa, 2005). Para isto, as proporções de reagentes na síntese sol-gel de nanopartículas com AM e Tionina incorporados foram ajustadas e para a ligação de Tionina à superfície optou-se partir da nanopartícula Cab-O-sil® de 20nm. O histograma na figura 5.1 mostra a distribuição de tamanho das partículas e embora o ajuste para curva gaussiana não tenha apresentado boa correlação em todos os casos, foi possível observar a existência de uma população de partículas com tamanho uniforme.

A morfologia e o tamanho das nanopartículas sintetizadas foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão. As imagens (fig.5.1) mostraram que as partículas são esféricas com pequena polidispersidade (0.3). O diâmetro calculado para as nanopartículas sil-AM foi de 60 ± 13 nm e para as nanopartículas sil-Tio de 52 ± 9 nm. No caso das partículas Cab-Tio a imagem mostra que estas nanopartículas agregam, mas foi possível observar os contornos de partículas individuais, cujo diâmetro calculado médio foi de 34 ± 7 nm. Conforme o esperado, o método sol gel não sofreu interferência da mudança de FS e, portanto as nanopartículas sil-AM e sil-Tio apresentaram tamanhos equivalentes. A nanopartícula com Tionina ligada à superfície apresentou um tamanho menor, já que partimos da nanopartícula de 20nm de diâmetro e a funcionalização da superfície causou apenas um pequeno aumento.

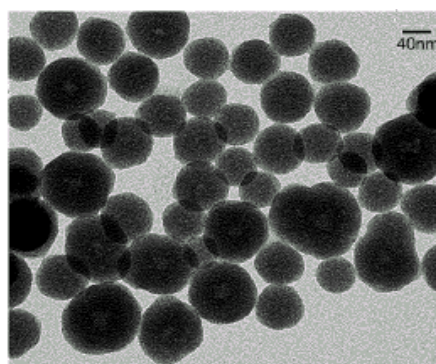
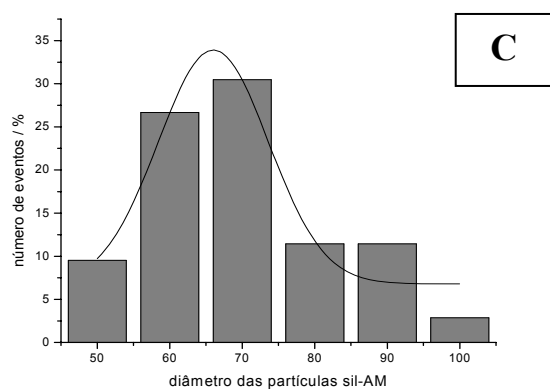
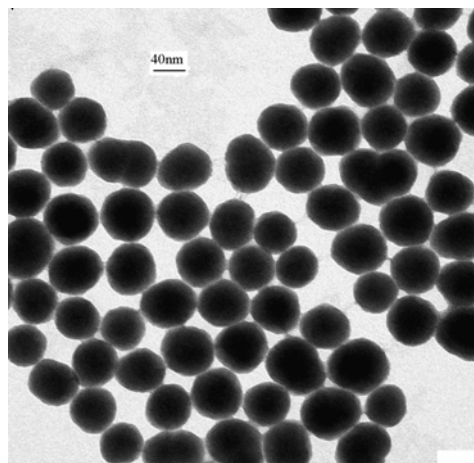
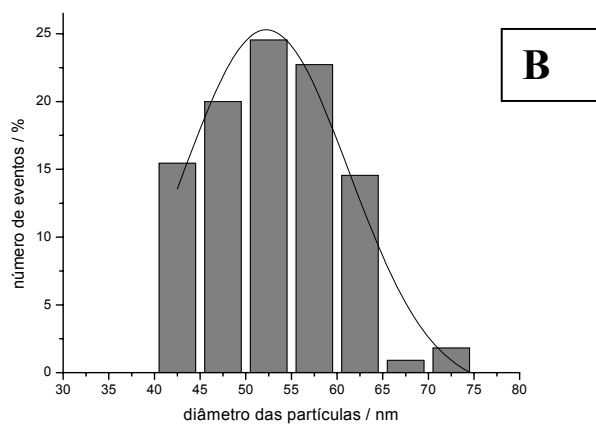
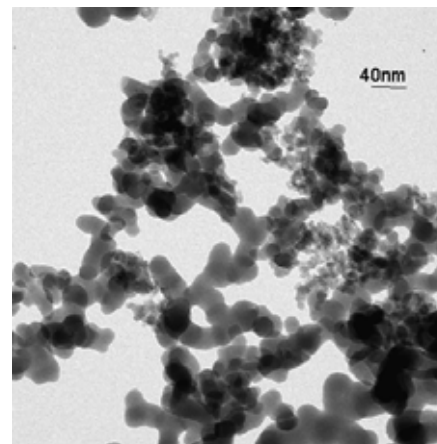
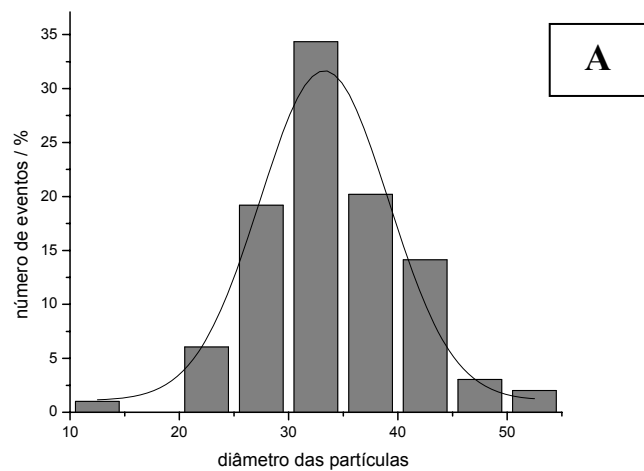


Figura 5.1- Histogramas e imagens de TEM das partículas (A) Cab-Tio; (B) sil-Tio; (C) sil-AM.

A presença de FS nas nanopartículas de sílica sol-gel foi comprovada pelos espectros de absorção UV-vis e de fluorescência, nos quais foram observadas bandas características AM e Tionina. Estes espectros serão discutidos detalhadamente na seção 5.2. Através da solubilização destas nanopartículas em solução altamente alcalina, foi possível quantificar os FS incorporados (vide item 4.2). A solubilização das nanopartículas Cab-Tio não permitiu a quantificação de Tionina presente na partícula, uma vez que, o FS liberado correspondeu ao aduto Tionina-glutaraldeído cujo coeficiente de extinção molar é desconhecido. Determinaram-se valores de 0,05% de AM e 0,006% de Tionina em massa para as nanopartículas de sil-AM e sil-Tio, respectivamente. A maior incorporação do AM pode ser consequência de sua menor solubilidade em etanol, quando comparada à solubilidade da Tionina, o que facilita sua incorporação nas nanopartículas, a medida em que elas se formam.

Tang et.al.(2005) apresentou a síntese de nanopartículas sol-gel com AM utilizando método Stöber, e duas filtrações sucessivas para obtenção de partículas monodispersas, entretanto, as nanopartículas resultantes ainda apresentaram um tamanho maior que o conhecido para acúmulo seletivo em tumores (190nm). No trabalho de Roy et.al., nanopartículas de sílica de diâmetro de 30nm contendo FS hidrofóbico foram obtidas pela hidrólise de dois silanos (trietoxi e aminopropil) em sistema micelar de AOT/1-butanol/água, seguida de diálise e filtração. O método sol-gel apresentado neste trabalho foi eficiente na obtenção de nanopartículas com tamanho de 50-60nm com pequena polidispersidade. Além de extremamente simples (não envolve mais que um passo reacional, e emprega reagentes comercialmente disponíveis), não houve necessidade de filtrações sucessivas.

As partículas com Tionina ligada à superfície também apresentaram tamanho propício para aplicação terapêutica. A análise dos passos reacionais desta síntese foi realizada através de diversos métodos: espectroscopia UV-vis, fluorescência, análise elementar, espectroscopia de infravermelho, elipsometria e espectroscopia Raman.

Os espectros de UV-vis e fluorescência comprovaram a presença de Tionina nas partículas uma vez que foi possível observar as bandas de absorção e de fluorescência deste FS. Estes espectros serão apresentados e discutidos em detalhes posteriormente (item 5.2).

A técnica de análise elementar foi utilizada para investigar cada passo reacional empregado na funcionalização da partícula. Os valores de C/N/S (**tabela 1**) comprovam a eficiência do método na imobilização da Tionina. Conforme o esperado, após a incorporação de APTS (**sil-APTS**; fig 4.2) há aumento na % tanto de C quanto de N e a razão C/N é de 3,27. A reação com glutaraldeído (**sil-APTS-glut**) eleva o número de moléculas de C na superfície da sílica como pode ser visto pelo aumento da % de C e diminuição da % de N. A ligação de moléculas de Tionina (**Cab-Tio**) deve aumentar o número de átomos de C e N, entretanto, a diminuição da % de C e N pode ser explicada pelo alto peso molecular do S, também presente na molécula de Tionina. O aumento da % de S comprova a ligação da Tionina à partícula de sílica.

Tabela 1-Valores de % de C,N e S e razão C/N para as nanopartículas de sílica modificadas.

amostra	%C	%N	C/N	%S
Sílica CabOsil	0,04	0,04	1	-
Sil-APTS	3,76	1,15	3,27	-
Sil-APTS-Glut	14,01	0,39	35,92	-
Cab-Tio	4,37	0,48	9,10	1,12

Os passos reacionais também foram acompanhados por espectroscopia de infravermelho (fig.5.2). No entanto, esta técnica apenas permitiu a análise da ligação do APTS e do glutaraldeído. As bandas de absorção dos grupos funcionais destes compostos e da sílica mascararam as bandas de absorção características da molécula de Tionina.

A sílica possui bandas de absorção intensas na região de 460-1100 cm^{-1} correspondentes aos modos vibracionais da ligação Si-O-Si e na região de 3500-1635 cm^{-1} correspondentes as moléculas de água de hidratação, já que esta sílica é um material bastante higroscópico. Desta forma, algumas bandas características das moléculas ligadas não puderam ser detectadas com boa resolução (fig.5.2A). Após a reação com APTS observou-se o aumento de intensidade nas bandas de 3500 e 1500 cm^{-1} o que pode ser atribuído a vibrações do grupo funcional NH_2 com bandas características em 3300; 3200; 1560 e 1490 cm^{-1} . Estas duas últimas tornam-se mais nítidas através da ampliação nos espectros na região de 1500 cm^{-1} (fig 5.2B), confirmando a ocorrência deste primeiro passo reacional. A presença de APTS também foi comprovada e quantificada (10^{-3} mols/g sílica) através da reação com aldeído salicílico e detecção do produto formado por espectroscopia UV-vis (vide item 4.3.1). A ligação do glutaraldeído pôde ser comprovada pelo deslocamento e aumento de intensidade da banda na região de 1600 cm^{-1} (fig.5.2C) atribuído à formação de imina entre o grupo C=O do glutaraldeído e NH_2 da superfície da partícula. O aumento da intensidade na região de 2500 cm^{-1} comprova a presença de grupos CH_2 ($\nu = 2600$ e 2700 cm^{-1}) da cadeia do glutaraldeído. A observação da Tionina (fig.5.2D) ligada foi dificultada pelo fato de suas bandas características de 1600 cm^{-1} (C=N); 1240-1060 cm^{-1} (C-C), 850 cm^{-1} (C-N) e 3000 cm^{-1} (aromáticos; NH_2), coincidirem com as bandas já presentes nestas regiões devido a presença de grupo carbonílico de moléculas de glutaraldeído que não reagiram com Tionina, grupos C-C da cadeia do APTS e do glutaraldeído e grupos NH_2 de moléculas de APTS que não reagiram com glutaraldeído. Além da presença de grupos da sílica, conforme já mencionado anteriormente. Desta forma, como a espectroscopia de IV não forneceu informações sobre a estrutura da Tionina ligada, a alternativa encontrada para esta análise foi reproduzir as reações sobre a superfície do silício (vide item a seguir).

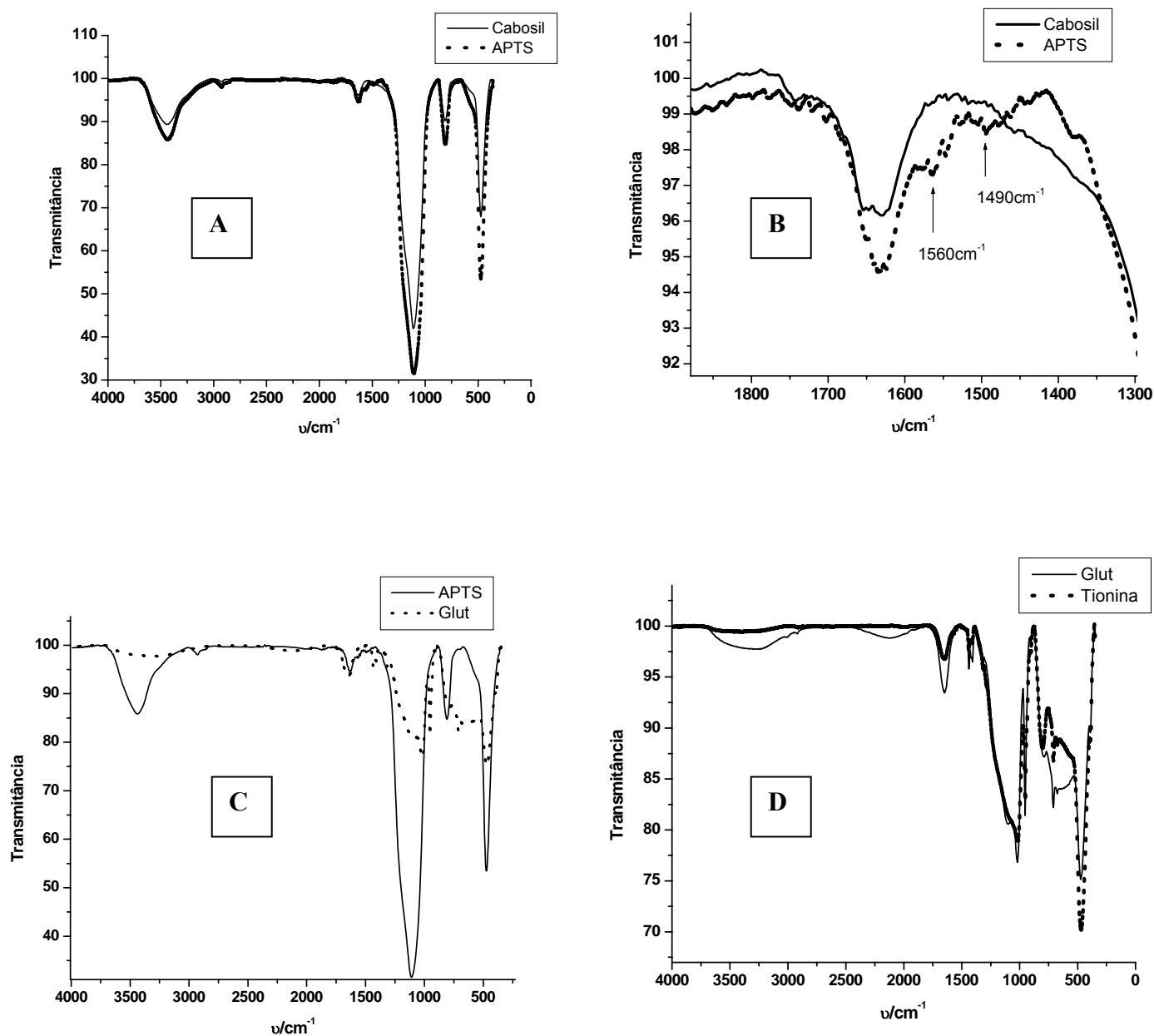


Figura 5.2- Espectros de infravermelho das nanopartículas Cab-O-Sil em pastilhas de KBr após cada etapa de reação: (A) antes e depois de APTS; (B) ampliação de A ressaltando as bandas de 1560 e 1490 cm^{-1} ; (C) antes e depois de Glutaraldeído; (D) antes e depois de Tionina.

5.1.1. Estudos sobre superfície do silício

O estudo sobre a superfície plana permitiu o uso de diferentes técnicas de análise (elipsometria, AFM e espectroscopia Raman) que forneceram informações sobre a estrutura da Tionina quando ligada a uma superfície (Miotto, R. et al., 2006). O monitoramento dos passos reacionais realizado por medidas elipsométricas (tabela 2) permitiu a determinação das espessuras das camadas formadas (fig. 5.3). Os valores de espessura obtidos após a reação com APTS são característicos de formação de uma monocamada de APTS assumindo conformação estendida perpendicular à superfície (Petri, D.F.S., 1999; Haller, I., 1978). A formação de outras monocamadas também foi constatada após as reações com glutaraldeído e Tionina. Os valores obtidos por elipsometria foram comparados com valores teóricos calculados por simulações de densidade funcional. Os valores calculados foram próximos aos valores obtidos por elipsometria (tabela 2). A concordância entre os valores de espessura determinados experimentalmente e os valores calculados por simulação indica a formação de uma monocamada de Tionina bem organizada na superfície do silício.

Tabela 2. Valores médios de aumento de espessura após cada etapa de reação obtidos experimentalmente e calculados.

Superfície	espessura média/nm	
	elipsometria	calculado
Silício	2,2 ±0,2	-
Silício-APTS	2,2 ±0,3	2,4
Silício-APTS-Glut	0,7 ±0,2	0,7
Silício-APTS-Glut-tionina	1,0 ±0,4	0,9

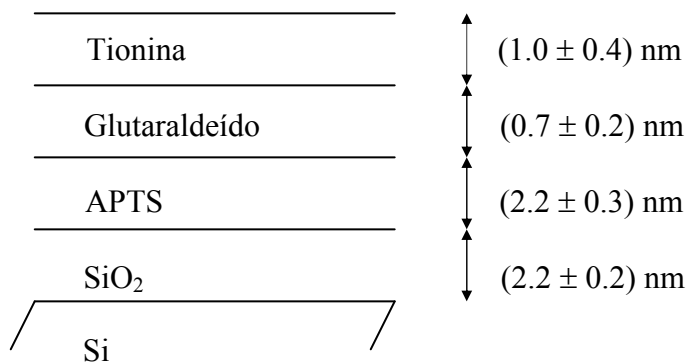


Figura 5.3- Representação das monocamadas sobre a superfície do silício e as respectivas espessuras médias determinadas por elipsometria.

A idéia de formação de monocamada também foi sustentada pela imagem de microscopia de força atômica do silício funcionalizado com Tionina (fig. 5.4). Através desta imagem observou-se uma superfície homogênea na escala nanométrica e aproximadamente plana. A rugosidade calculada foi de 0,5nm, valor próximo aos valores encontrados na literatura (Fujimoto, J. & Petri, D.F.S., 2001) para silício puro e monocamada de APTS (0,1 e 0,2nm respectivamente).

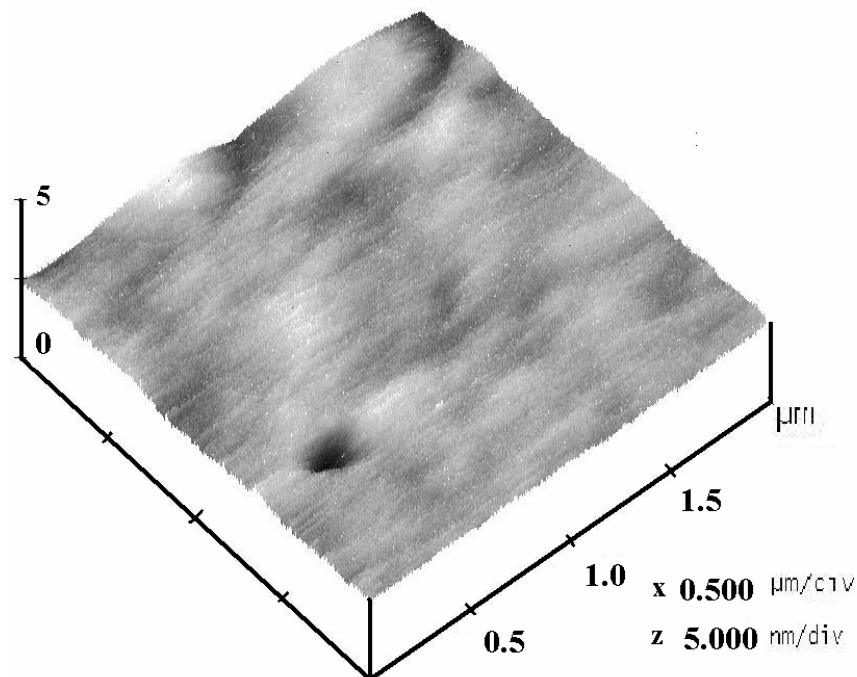


Figura 5.4- Imagem de microscopia de força atômica do silício funcionalizado com tionina.

Através da espectroscopia Raman foram determinadas as propriedades da Tionina quando ligada à superfície do silício. Foram obtidos espectros Raman da Tionina sólida e em solução. Estes espectros foram comparados com espectros Raman do silício não funcionalizado e do silício com superfície modificada com Tionina. A Tionina em pó apresentou duas bandas vibracionais largas entre 1200 e 1600cm^{-1} e uma pequena banda na região de 670cm^{-1} (fig.5.5). No espectro Raman do silício funcionalizado, os picos vibracionais da Tionina em 485 e 806cm^{-1} são mascarados pelos modos vibracionais do silício, como pode ser observado na figura 5.6 (inserto). Ampliando-se a escala na região de 1200 à 1700cm^{-1} foi possível observar dois picos, um em 1380 e outro em 1431cm^{-1} . O pico de 1431cm^{-1} pode ser atribuído ao DMSO, uma vez que este foi o solvente utilizado na funcionalização e algum traço pode ter permanecido na superfície. O pico em 1380cm^{-1} é atribuído à Tionina devido ao estiramento C=S do anel, indicando que a molécula de Tionina está intacta na superfície do silício.

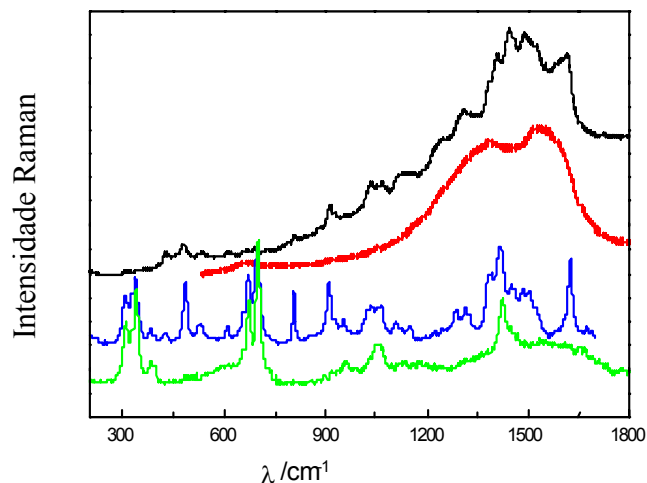


Figura 5.5- Espectros Raman do DMSO (—) e tionina em: água (—), pó (—) e em DMSO (—).

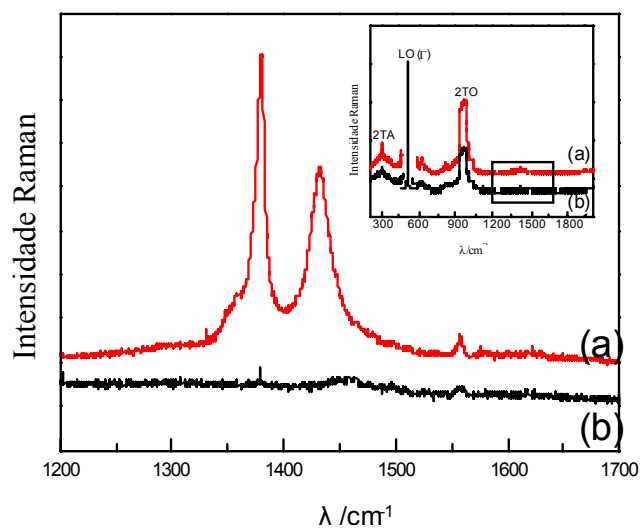


Figura 5.6- Espectros Raman da superfície do silício antes (—) e após a modificação com Tionina (—). Ampliação da escala na região de $1200\text{-}1700\text{cm}^{-1}$ do espectro raman de $300\text{-}1800\text{cm}^{-1}$ (inserto).

A combinação das técnicas espectroscópicas e de superfície para estudo de superfície funcionalizada consiste num diferencial do presente trabalho, uma vez que a literatura existente na área de modificação de partículas de sílica com FS baseia-se em espectroscopia Uv-Vis e não fornece informações sobre a estrutura das moléculas ligadas (Wieder et.al 2006; Gu et.al. 2005).

5.2. Caracterização fotofísica

A caracterização fotofísica das nanopartículas foi feita através da obtenção de espectros de absorção UV-vis e emissão de fluorescência de suspensões de nanopartículas. Estes espectros foram comparados com espectros dos FS livres em água e outros solventes.

AM em solução aquosa apresenta duas bandas de absorção características, uma em 660nm atribuída ao monômero e outra em 580nm atribuída ao dímero (Junqueira et.al.2002). Em baixas concentrações AM encontra-se predominantemente na forma monomérica conforme observado na figura 5.7. O espectro de absorção das nanopartículas sil-AM suspensas em água apresentou uma banda intensa em 580nm demonstrando que ao imobilizar AM na sílica ocorreu grande formação de agregados do FS (fig.5.7).

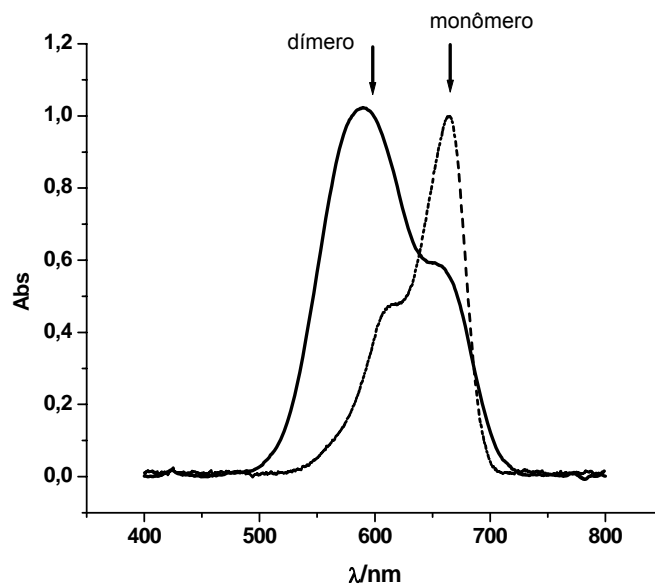


Figura 5.7- Espectros normalizados de absorção de AM livre (---) e de nanopartículas sil-AM (___) em água. Sil-AM (2,0mg/mL); AM (1 μ M).

As nanopartículas sil-Tio apresentaram espectro de absorção UV-vis em água com banda máxima em região coincidente com monômero da Tionina, com máximo de absorção em 594nm (fig.5.8). Não se observou a banda de absorção característica de dímero de Tionina (560nm), indicando que a incorporação deste FS em nanopartículas de sílica, na concentração utilizada, não induz agregação.

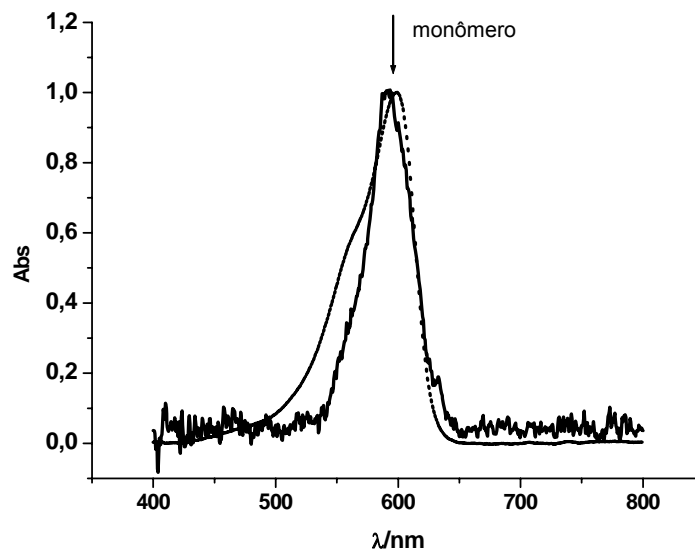


Figura 5.8- Espectros de absorção de Tionina (---) e de nanopartículas sil-Tio (___) em água. Sil-tio (5,0mg/mL); Tionina (2 μ M).

No espectro de absorção das nanopartículas Cab-tio, foram observadas tanto a banda atribuída ao monômero quanto a banda atribuída ao dímero de Tionina (fig.5.9). A banda de absorção do monômero foi deslocada para a região do vermelho em comparação com espectro da Tionina livre. O máximo de absorção que, para monômero de Tionina em solução aquosa, é localizado em 598nm encontra-se em 614nm no espectro das nanopartículas Cab-Tio. Tal deslocamento pode ser justificado pela ligação covalente da Tionina à nanopartícula de sílica através da reação com glutaraldeído, levando à substituição de um hidrogênio da sua molécula por um grupo alquila no átomo de nitrogênio ligado ao anel, o que diminui a diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO. Note que o mesmo acontece quando comparamos AM e Tionina. AM, que possui dois grupos dimetilamino em sua estrutura, apresenta maior $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do que a Tionina, a qual possui dois grupos amino.

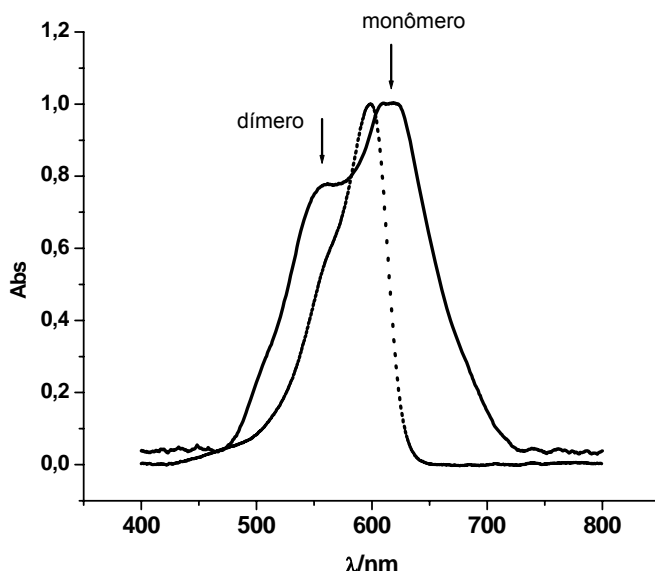


Figura 5.9- Espectros de absorção de Tionina (---) e partículas Cab-Tio (___) em água. Cab-Tio (1,5mg/mL); Tionina (2 μ M).

Para quantificar a presença de agregados nas nanopartículas e facilitar a comparação entre elas, calculou-se a razão entre a intensidade de absorção máxima do dímero (D) e do monômero (M) do FS para cada uma das nanopartículas, obtendo-se o parâmetro D/M (tabela 3). Quanto maior essa razão, maior é a proporção de agregados do FS na nanopartícula. Analisando-se os valores obtidos observou-se que as nanopartículas sil-AM apresentaram maior proporção de dímeros de FS, tendo um valor de 1,6. Seguidas de Cab-Tio (D/M= 0,76) e sil-Tio (D/M=0,0). A formação de dímeros pode ter sido favorecida pela proximidade das moléculas de sensibilizadores quando estes estão ligados nas nanopartículas. Quando a concentração de sensibilizador ligado é menor, como no caso das nanopartículas sil-Tio, a banda correspondente ao dímero do sensibilizador é nula e o valor de D/M para esta nanopartícula é zero. Para as nanopartículas Cab-tio a formação de dímero pode ter sido favorecida pelo fato do FS estar ligado apenas na superfície enquanto que nas nanopartículas sil-Tio, a Tionina está distribuída pelo interior e superfície da nanopartícula.

Tabela 3. Valores da razão D/M para as partículas

	Sil-AM	Cab-Tio	Sil-Tio
D/M	1,6	0,76	0,0

A indução da formação de agregados de AM pela interação com superfícies já havia sido observada em micelas (Junqueira et.al.2002) e em mitocôndrias (Gabrielli et.al.,2006). Tang et.al.(2002) também mencionou a formação de dímero em nanopartículas de sílica sol-gel, porém em menor extensão do que a observada nas nanopartículas sil-AM, provavelmente por ter sintetizado nanopartículas maiores desfavorecendo a proximidade de moléculas. No entanto, a obtenção de sistemas de nanopartículas semelhantes entre si, mas com diferentes graus de agregação de FS ainda não havia sido demonstrada. O fato das nanopartículas possuírem quantidades diferentes de agregados pode fazer com que elas apresentem propriedades fotoquímicas bastante distintas umas das outras. Esta influência do grau de agregação nas propriedades das nanopartículas foi investigada e os resultados estão apresentados em seção posterior (item 5.4).

Para caracterizar as propriedades dos FS ligados nas nanopartículas, foram realizados estudos do efeito do solvente sobre os espectros de absorção UV-vis e de fluorescência dos FS livres e das nanopartículas em água, etanol, acetonitrila e acetona.

Nos espectros de absorção, observaram-se apenas pequenos deslocamentos nos comprimentos de onda do máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorção tanto nos espectros de FS livres, quanto nos espectros dos FS ligados nas nanopartículas, conforme os solventes foram variados (fig.5.10; 5.11). Este pequeno efeito do solvente sobre os espectros de absorção, já havia sido observado para AM e Tionina livres (Parkányi & Boniface, 1993). A comparação direta dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção é dificultada pelo fato de que dois efeitos ocorrem com a variação do solvente: a alteração da razão dímero-monômero e o efeito solvatocrômico. O efeito da alteração da razão dímero-monômero é evidente no caso das nanopartículas sil-AM e deve influenciar também os resultados no caso das nanopartículas Cab-Tio. Note na tabela 4 que para AM livre, ocorre aumento no $\lambda_{\text{máx}}$ com o aumento da polaridade do solvente. Este efeito é esperado para o caso de monômero de AM, devido à diminuição da diferença de energia entre os orbitais HOMO e LUMO da

molécula. Como o momento dipolar do AM no estado excitado singlete é maior que o momento dipolar do AM no estado fundamental (Parkányi & Boniface, 1993), solventes polares são capazes de estabilizar com maior eficiência o estado excitado em relação ao estado fundamental e a mudança de um solvente apolar para solvente polar reduz a diferença de energia este estado e o fundamental, deslocando o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção para a região do vermelho. No entanto, para as nanopartículas sil-AM, a variação espectral é oposta. Ocorre diminuição de $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção de 598nm em acetona para 590nm em água. Esta mudança é acompanhada da diminuição na razão D/M como pode ser observado na figura 5.10(A₂).

Nos espectros de emissão de fluorescência, os deslocamentos foram mais pronunciados do que nos espectros de absorção do FS livres e ligados nas nanopartículas. Isto pode ser explicado pelo fato dos espectros de fluorescência não serem influenciados pelos equilíbrios dímero/monômero, uma vez que os dímeros não são fluorescentes (Junqueira et. al., 2002). Em ambos os casos, foram observados deslocamentos do $\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescência (tabelas 4 e 5) da região do vermelho para a região do azul com o aumento da polaridade e da capacidade de ligação de hidrogênio do solvente (fig.5.10; 5.12). Para AM livre e sil-AM, podemos observar que em água o $\lambda_{\text{máx}}$ determinado em 681nm para AM e 677nm para sil-AM foi deslocado em acetonitrila, para 672nm e 665nm, respectivamente.

Tabela 4. Valores de λ_{Max} de emissão de fluorescência e absorção para as nanopartículas sil-AM e AM em solução

Solvente	Sil-AM		AM	
	λ_{Max} (nm)		λ_{Max} (nm)	
	Emissão	Abs	Emissão	Abs
Água	677	590	681	664
Etanol	676	593	685	653
Acetonitrila	665	595	671	654
Acetona	665	598	672	656

No caso da Tionina, o $\lambda_{\text{máx}}$ que em água foi determinado em 621nm foi deslocado em acetona para 611nm. Deslocamentos similares foram observados para as nanopartículas sil-Tio e Cab-Tio. O $\lambda_{\text{máx}}$ que em água foi determinado em 614nm para sil-Tio e em 633nm para Cab-Tio, foi deslocado em acetona para 612nm para ambas as nanopartículas.

Tabela 5. Valores de λ_{Max} de emissão de fluorescência e absorção para as nanopartículas e Tionina em solução.

Solvente	Sil-Tio		Cab-Tio		Tionina	
	λ_{Max} (nm)		λ_{Max} (nm)		λ_{Max} (nm)	
	Emissão	Abs	Emissão	Abs	Emissão	Abs
Água	614	592	633	617	621	599
Etanol	619	599	623	616	623	604
Acetonitrila	613	592	610	615	611	592
Acetona	612	600	612	615	611	599

Analisando os dados de variação espectrais em diferentes solventes, foi possível concluir que a imobilização dos FS não alterou a solvatação de forma significativa em comparação com sua forma livre. O efeito solvatocrômico em moléculas incorporadas em partículas foi observado também por Descalzo et.al. no sistema composto por partículas de sílica mesoporosa com corante fenoxazinona ligado covalentemente. Os autores sugerem o uso destas partículas como sensores para vapores orgânicos, demonstrando o deslocamento do espectro de emissão da sonda conforme a polaridade dos vapores é alterada.

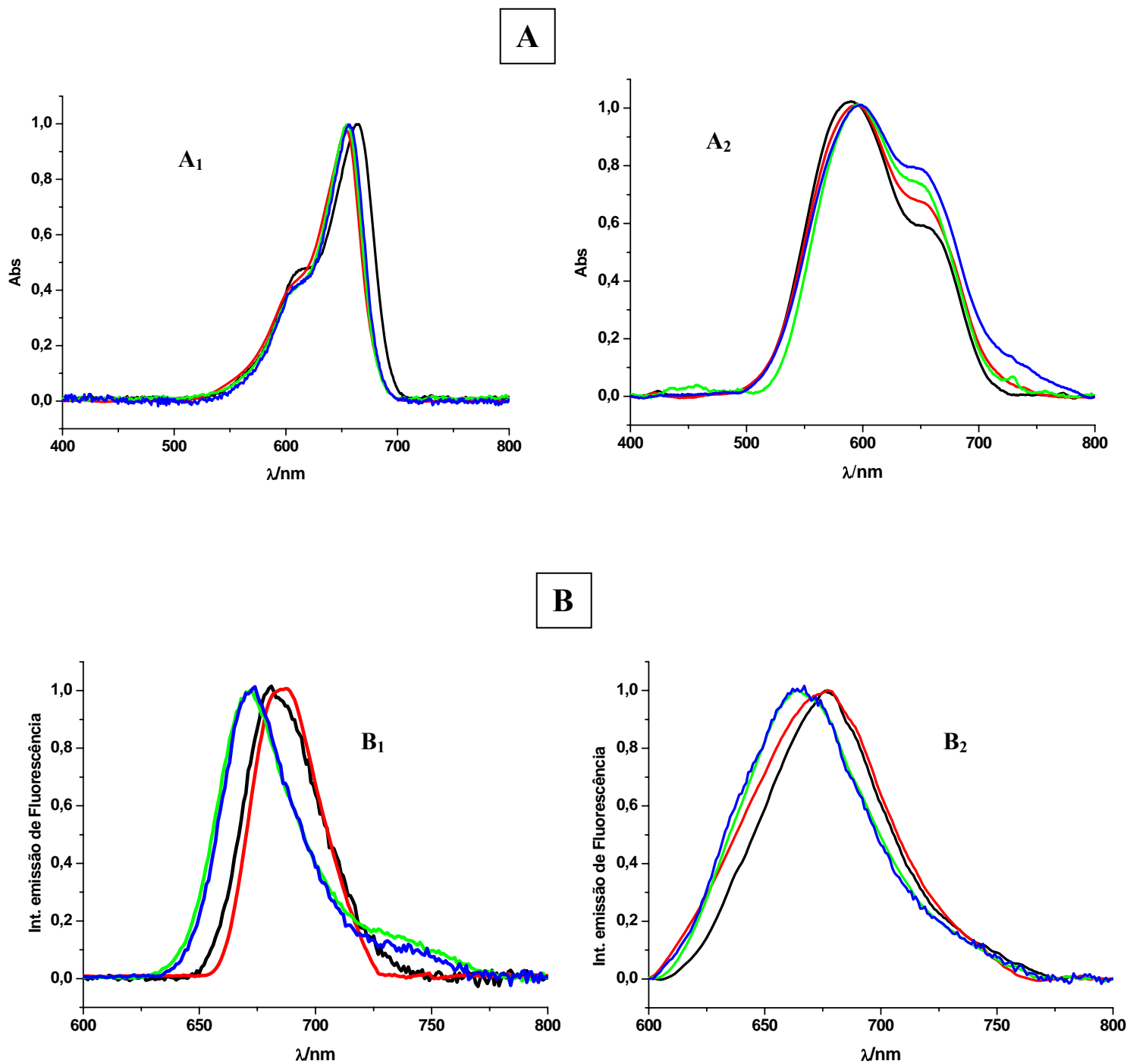


Figura 5.10- Espectros de Absorção (A) e Emissão de fluorescência (B) de AM (A1; B1) e nanopartículas sil-AM (A2; B2) em diferentes solventes: Água (—); Etanol (—); Acetonitrila (—) e Acetona (—). Sil-AM (2,0mg/mL); AM (1 μ M).

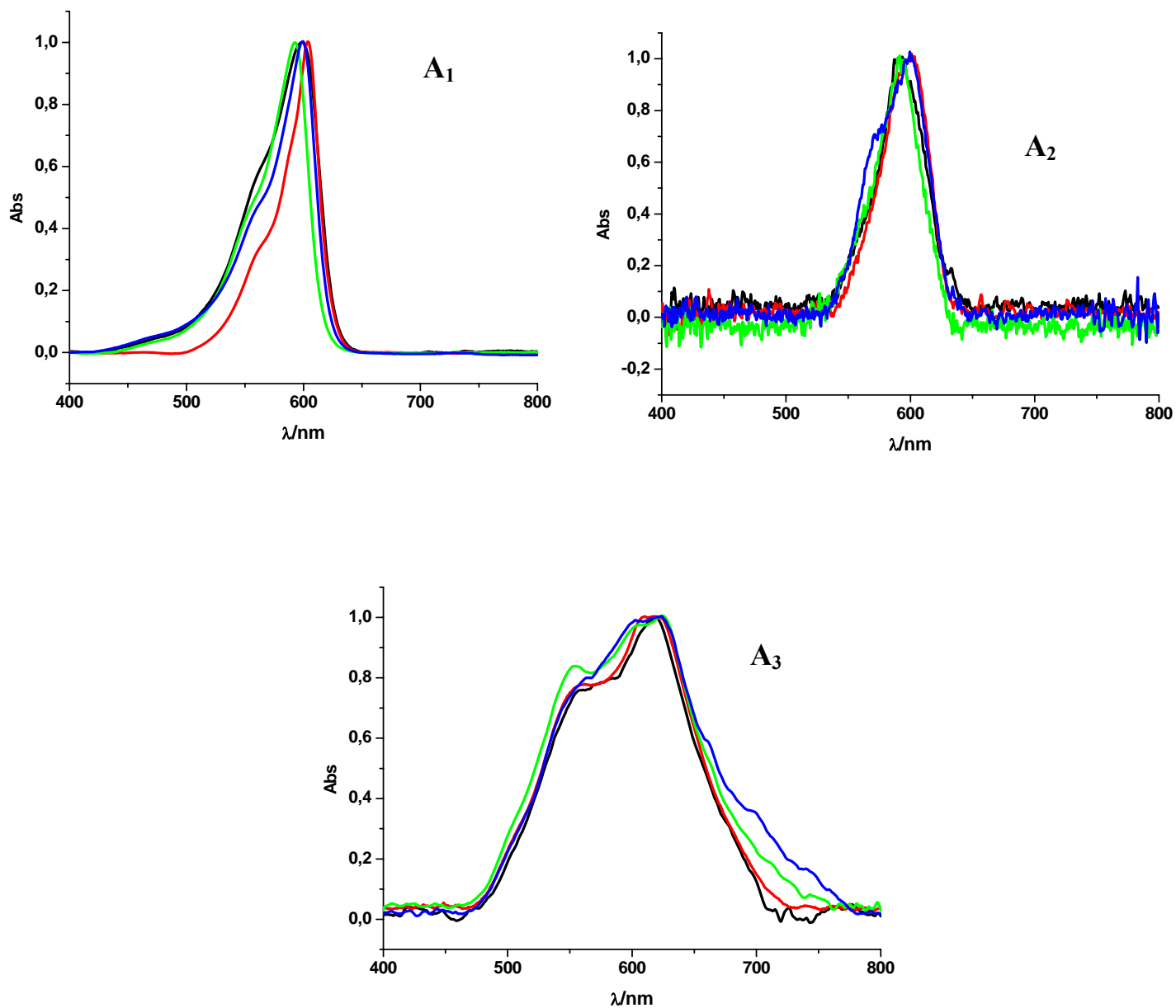


Figura 5.11- Espectros de Absorção de Tionina (A₁), nanopartículas sil-Tio (A₂) e nanopartículas Cab-Tio (A₃) em diferentes solventes: Água (—); Etanol (—); Acetonitrila (—) e Acetona (—). Cab-Tio (1,5mg/mL); Sil-Tio (5,0mg/mL); Tionina (2μM).

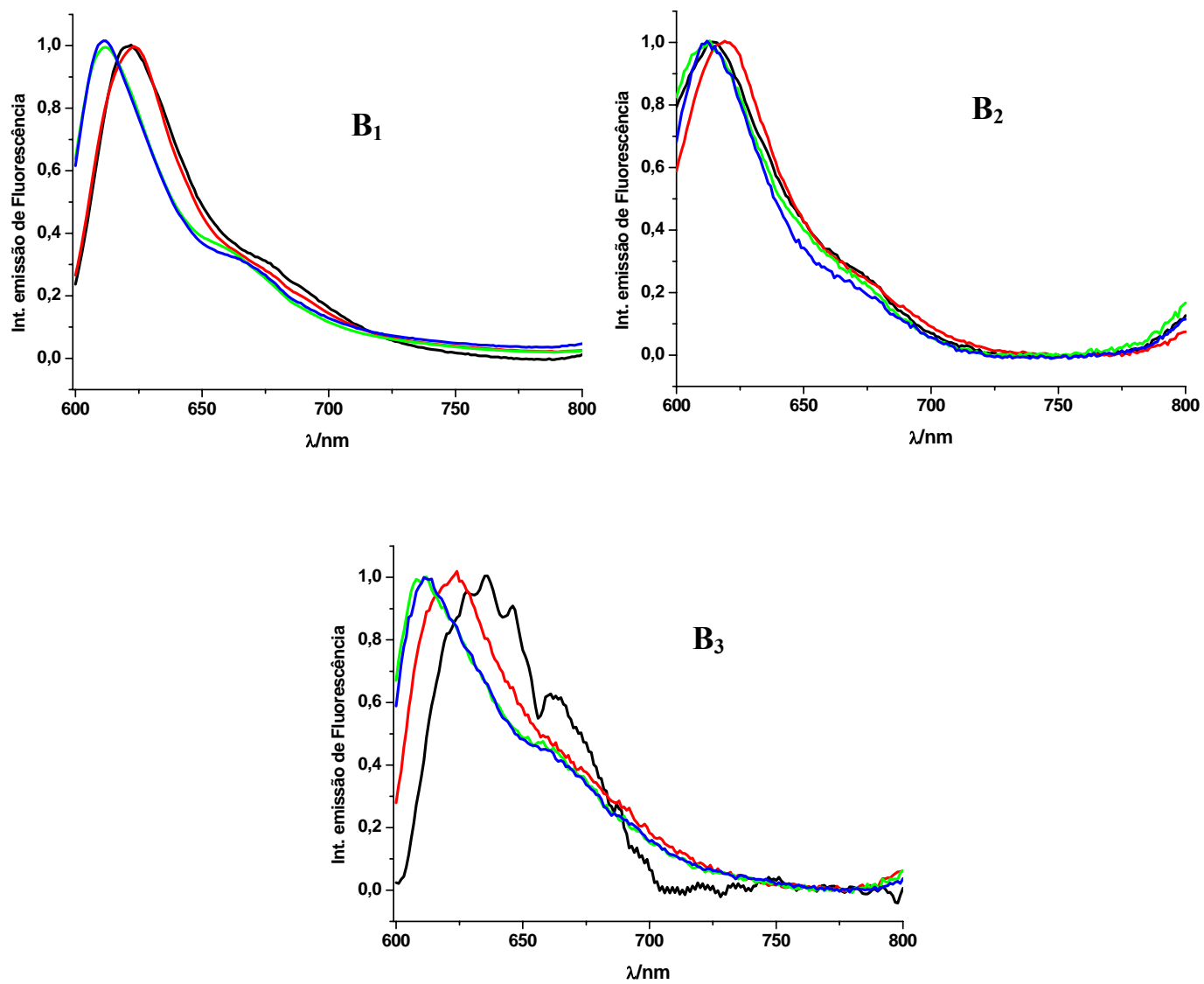


Figura 5.12- Espectros de Emissão de fluorescência de Tionina (B₁), nanopartículas sil-Tio (B₂) e nanopartículas Cab-Tio (B₃) em diferentes solventes: Água (—); Etanol (—); Acetonitrila (—) e Acetona (—). Cab-Tio (1,5mg/mL); Sil-Tio (5,0mg/mL); Tionina (2μM).

5.3. Estabilidade dos FS imobilizados nas nanopartículas

Para investigar a possibilidade de que a estrutura das nanopartículas possa oferecer proteção aos FS em relação a redução e supressão de estado excitado, compararam-se a redução química, a supressão de fluorescência e a desativação do estado tripleto excitado dos FS livres e ligados em nanopartículas.

5.3.1. Redução por NADPH

O estudo sobre a proteção contra redução química é de grande importância para a caracterização destas nanopartículas, pois a fácil redução de AM em leuco AM pelas coenzimas celulares (NADH e FADH₂) é um dos principais fatores que diminui a eficácia da fotossensibilização, uma vez que leuco AM é incolor (fig.5.13). Vale ressaltar que a forma Leuco e o radical semi-reduzido podem voltar à forma oxidada através de reações com oxigênio (fig.5.13), consequentemente a redução dos FS pode ser observada apenas na ausência de oxigênio.

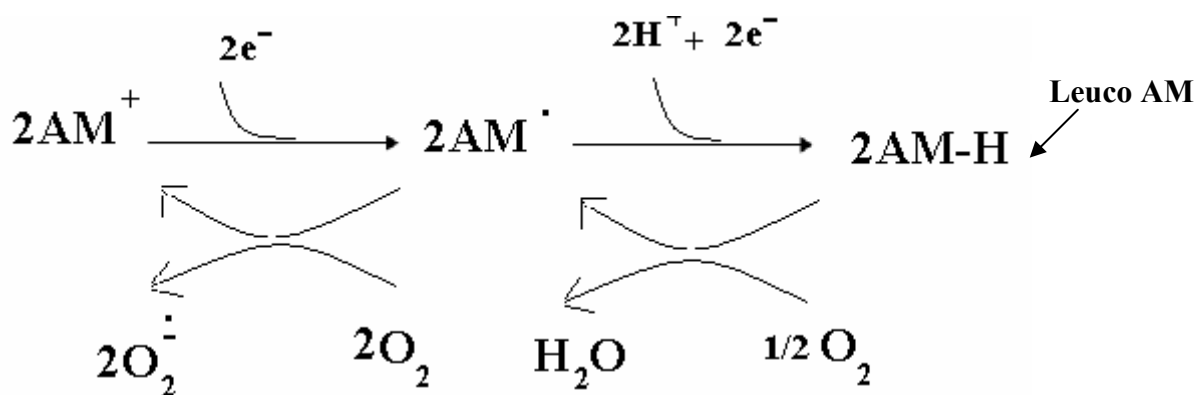


Figura 5.13-Reações de formação das formas incolores de AM (radical semi-reduzido e leuco -AM) e reações destas formas com oxigênio.

Adicionou-se NADPH em soluções aquosas de AM (fig5.14A) e em suspensões de sil-AM (fig5.14B). Na ausência de oxigênio, a solução com AM livre sofre redução de 90%, efeito não observado quando este FS está incorporado na sílica (fig5.14A). Conforme pode ser visto na figura fig5.14B, não há alteração na intensidade de absorção das

nanopartículas sil-AM após a adição de NADPH na ausência ou presença de oxigênio. O mesmo resultado foi observado para suspensões de nanopartículas sil-Tio e Cab-Tio. Enquanto a solução de Tionina livre apresentou redução de 95% após a adição de NADPH, para as nanopartículas nenhuma alteração foi observada (fig.5.15). Este experimento demonstra que o acesso de moléculas como NADPH é dificultado pela imobilização dos FS nas partículas de sílica, evitando-se assim a redução dos mesmos.

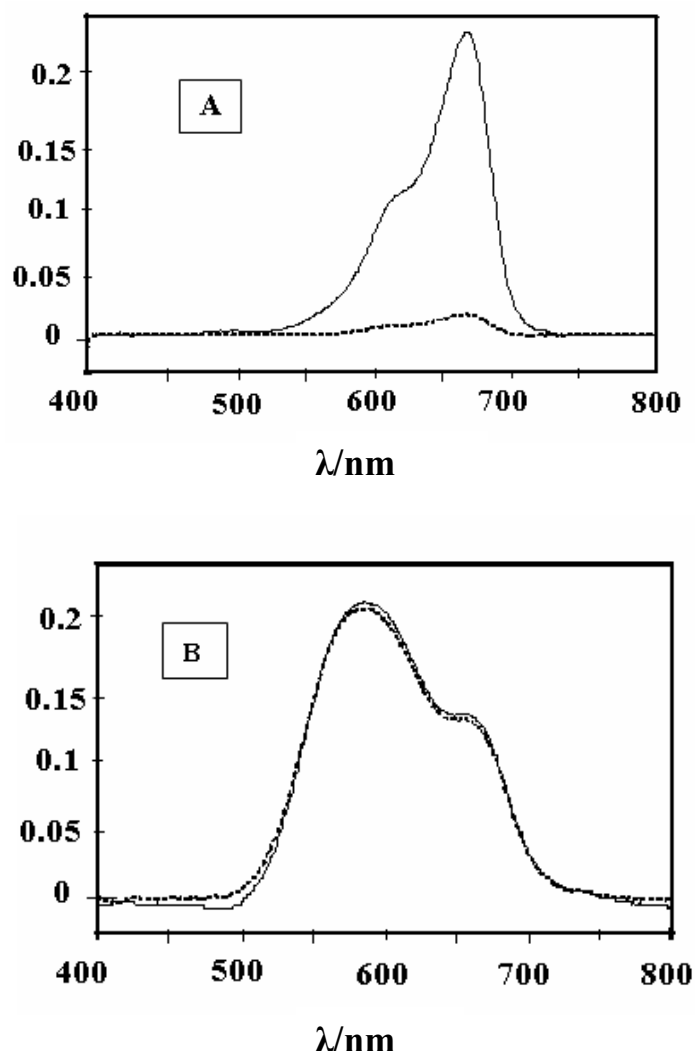


Figura 5.14 – Espectros de absorção de AM (A) e sil-AM (B) após adição de NADPH (1mM) em pH=7,2, na presença (—) e ausência (---) de O_2 . Sil-AM (7,0mg/mL); AM(3 μ M).

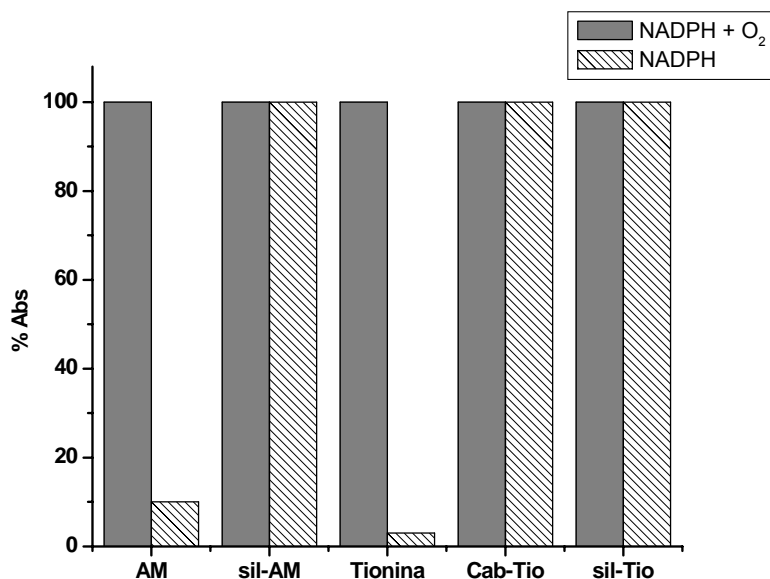


Figura 5.15- %Absorção dos FS em solução e em nanopartículas na presença de NADPH antes (cinza) e depois de retirar O₂ (hachurado). Sil-AM (7,0mg/mL); AM(3μM);Cab-Tio (1,5mg/mL); Sil-Tio (5,0mg/mL); Tionina (2μM). pH= 7,2.

5.3.2.Supressão por íons brometo

Além de proteger o FS no estado fundamental contra redução química, é importante que o estado excitado singlete também esteja protegido contra supressores para que não sofra desativação antes de passar para o estado tripleto, responsável pela formação de oxigênio singlete. A proteção dos FS contra supressores foi investigada através da obtenção de espectros de emissão de fluorescência de soluções de AM, Tionina e de suspensões de nanopartículas de sil-AM, sil-tio e Cab-tio em concentrações crescentes de brometo de sódio.

Foi observado que na faixa de 0 a 5 M de brometo de sódio, os FS são suprimidos, tanto na forma livre em solução, quanto na forma imobilizada nas nanopartículas de sílica. Conforme pôde ser observado através das curvas de Stern-Volmer, que relacionam o decaimento na intensidade de emissão de fluorescência e concentração de supressor (item 4.8) (fig 5.16), para uma mesma faixa de concentração de brometo, a supressão das nanopartículas é menos intensa que a supressão dos FS livres. Os valores de constantes de

supressão obtidos são mostrados na tabela 6. Para Tionina em solução, a constante de supressão, K_{sv} , obtida foi igual a $1,7\text{mM}^{-1}$; um valor quase 6 vezes maior que o encontrado para as nanopartículas Cab-tio ($K_{sv} = 3,2 \cdot 10^{-1}\text{mM}^{-1}$) e 300 vezes maior que o valor obtido para as nanopartículas sil-tio ($K_{sv} = 6,4 \cdot 10^{-2}$). No caso do AM, o valor de K_{sv} encontrado, $0,8\text{mM}^{-1}$, foi 22 vezes maior que o valor encontrado para as nanopartículas sil-AM ($K_{sv} = 3,2 \cdot 10^{-2}\text{mM}^{-1}$). Como todas as partículas foram capazes de diminuir a supressão causada pelos íons brometo, podemos concluir que estas protegem os FS no estado excitado singlete de interferências externas. Note que as nanopartículas sil-tio e sil-AM foram mais eficientes em evitar a supressão por brometo em relação as partículas Cab-tio. Este resultado já era esperado, uma vez que nas partículas Cab-tio as moléculas de Tionina encontram-se ligadas à superfície das nanopartículas de sílica, estando assim mais suscetíveis a efeitos causados por componentes do meio.

Tabela 6- Valores de constantes de Stern-Volmer para AM, Tionina e partículas.

	AM	sil-AM	Cab-Tio	Tionina	sil-Tio
K_{sv}/mM^{-1}	0,8	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-1}$	1,7	$6,4 \cdot 10^{-2}$

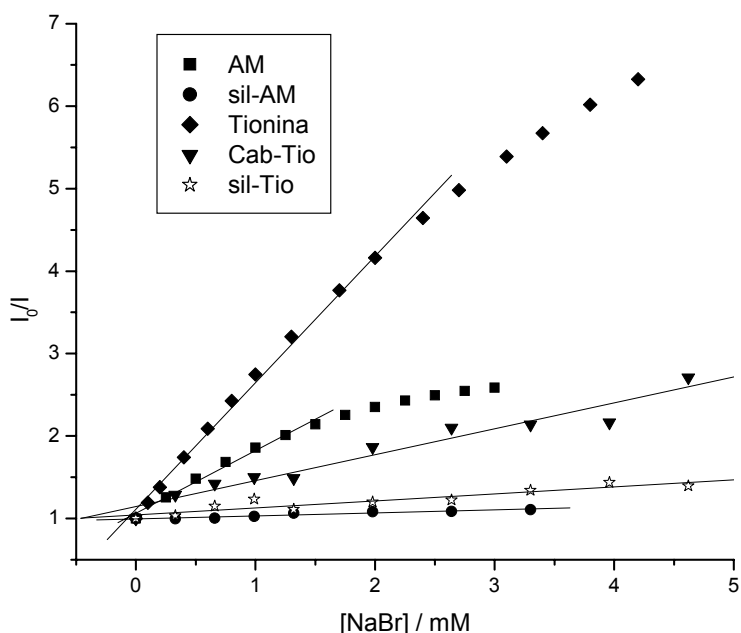


Figura 5.16- Curvas de Stern-Volmer e ajustes lineares para AM e Tio em solução e nas partículas.

5.3.3. Supressão por Ascorbato

A ligação dos FS nas nanopartículas pode também garantir a geração de oxigênio singlete, evitando que o estado excitado triplete dos FS sofra outros processos de desativação. Sabendo-se que o íon ascorbato reage com estado triplete de AM, impedindo que este gere $^1\text{O}_2$ (Harmatz et.al.,1983), foi investigado se esta supressão pode ser evitada quando AM encontra-se incorporado nas partículas sil-AM. Este estudo foi realizado através do acompanhamento da geração de $^1\text{O}_2$ por AM livre e sil-AM, em D_2O , na ausência e na presença de ascorbato de sódio. O $^1\text{O}_2$ foi detectado pela obtenção de transientes de emissão em 1270nm (máximo de emissão do $^1\text{O}_2$) após excitação dos sistemas (vide item 5.4). Para a solução de AM, observou-se redução de 99% na intensidade de emissão em 1270nm após a adição de ascorbato, demonstrando que a geração de $^1\text{O}_2$ por AM foi suprimida. Para sil-AM, não foi observada nenhuma alteração na intensidade de emissão em 1270nm após a fotoexcitação das partículas na presença de ascorbato(fig.5.17), indicando que a incorporação do FS na partícula de sílica proporciona proteção do seu estado triplete frente ao íon ascorbato.

É importante notar que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ não foi alterado, indicando que na concentração de ascorbato utilizada ($200\mu\text{M}$) não ocorreu nenhum efeito de supressão direta de $^1\text{O}_2$ por ascorbato e, portanto o efeito observado para o AM livre inclui apenas a supressão do tripleto de AM.

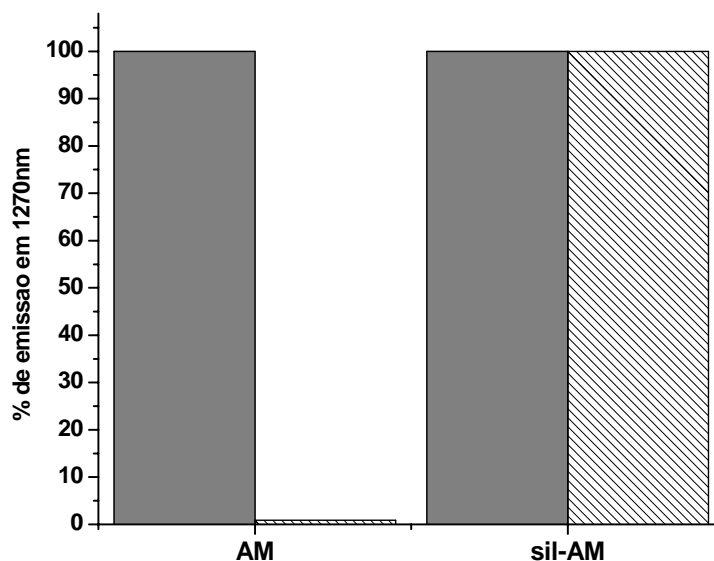


Figura 5.17- Porcentagem de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado por AM ($10\mu\text{M}$) e nanopartículas sil-AM ($4,0\text{mg/mL}$) na ausência (cinza) e na presença de $200\mu\text{M}$ de ascorbato (hachurado) em D_2O .

A literatura não apresenta estudos semelhantes sobre a estabilidade de FS imobilizados em partículas. Em estudos de supressão de fluorescência, trabalhos de San Roman et.al. investigam a supressão do FS ligado pela própria matriz da partícula. No desenvolvimento de nanosensores para oxigênio, MacCraith et.al.(1995) e Xu et.al.(2001), estudaram a supressão de fluorescência do composto $\text{Ru(II)tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)}$ incorporado em partículas de sílica sol gel causada por oxigênio. Os estudos sobre supressão por íons brometo são principalmente empregados para investigar a exposição de resíduos de triptofanos em proteínas.

5.4. Caracterização Fotoquímica

A caracterização fotoquímica das nanopartículas foi realizada pela obtenção de espectros de emissão no infra-vermelho próximo após irradiação em 532nm das suspensões de nanopartículas em acetonitrila. Estes espectros com λ máximo em 1270nm (fig.5.18), característico de $^1\text{O}_2$, confirmaram a geração desta espécie pelas partículas.

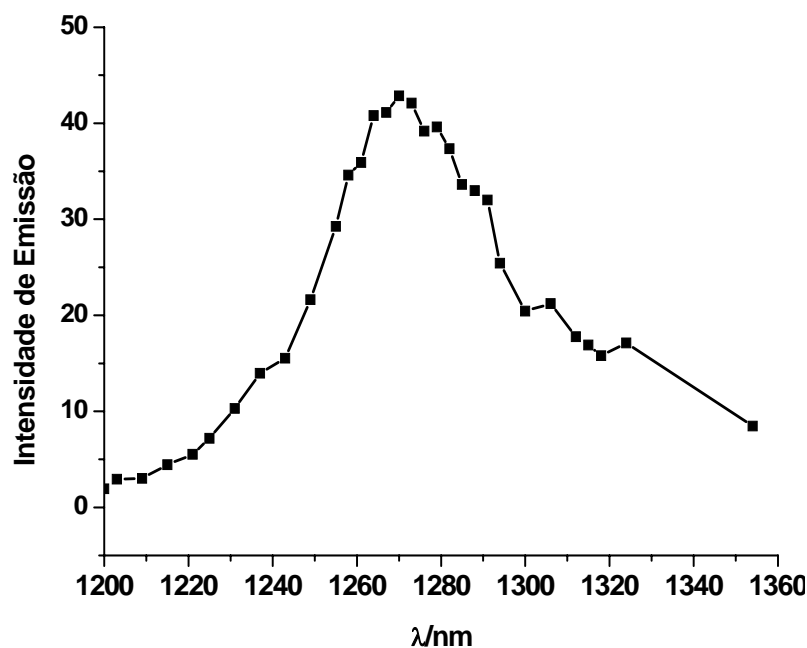


Figura 5.18. Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ gerado por nanopartículas sil-AM (3,5mg/mL) em acetonitrila. λ_{exc} = 532nm; 10mJ/pulso; 10Hz.

Além do FS ligado à nanopartícula ser capaz de gerar $^1\text{O}_2$, é muito importante que esta espécie seja entregue ao meio. Para investigar esta possibilidade, comparou-se o efeito do solvente sobre o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado pelas nanopartículas com o efeito sobre o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado por FS livres (tabela 7). Os valores de tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado pelas partículas são próximos aos valores de tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado pelos FS em solução (tabela7), os quais correspondem aos tempos de vida característicos do $^1\text{O}_2$ nestes solventes (Wilkinson; 1995). Estes resultados mostram que o oxigênio molecular pode se

difundir pelo solvente internalizado na nanopartícula e atingir o FS excitado, o que leva à geração de $^1\text{O}_2$, que, por sua vez, também pode se difundir pela solução.

Tabela 7. Valores de tempo de vida de $^1\text{O}_2$ em diferentes solventes.

Solvente	Sil-Tio t/ μs	Cab-Tio t/ μs	Sil-AM t/ μs	$^1\text{O}_2$ em solução t/ μs
Etanol	19	13	12	14
Acetona	48	48	46	51
Acetonitrila	73	63	57	65
Água	3	3	6	5

Em complementação ao experimento anterior, realizou-se a fotoexcitação das nanopartículas na presença da sonda 1,3-difenilisobenzofurano (**DPBF**), para confirmar que o $^1\text{O}_2$ gerado pelas partículas é capaz de atingir o meio externo à partícula. Sabe-se que a reação entre DPBF e $^1\text{O}_2$ envolve a formação de um endoperóxido e a perda de absorbância da sonda na região de 410nm (fig.5.19). O acompanhamento da intensidade de absorção da sonda DPBF após a fotoexcitação das partículas mostrou perda da intensidade de absorção em 410nm com o aumento do tempo de irradiação das suspensões. Este resultado confirma o fato de que o $^1\text{O}_2$ gerado pelos FS imobilizados nas partículas é capaz de se difundir ao meio externo e reagir com moléculas que nele se encontram.

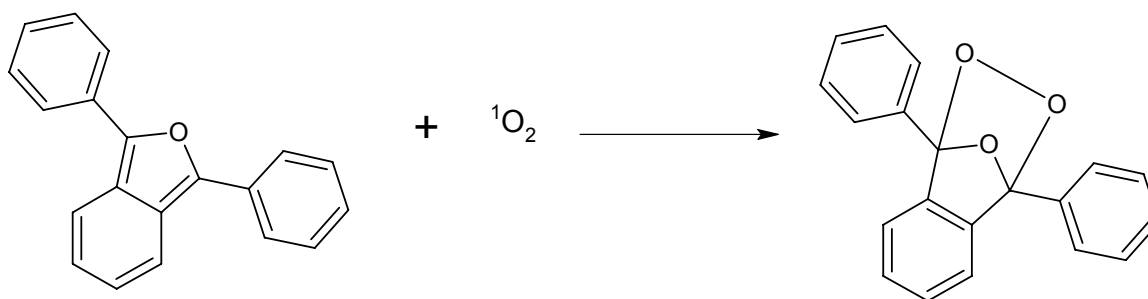


Figura 5.19- Reação do DPBF com oxigênio singlete e formação do endoperóxido.

O uso de sondas que sofrem reação com $^1\text{O}_2$, bem como a determinação do tempo de vida de $^1\text{O}_2$ gerado por FS imobilizados em nanopartículas como ferramentas para avaliar a entrega de $^1\text{O}_2$ ao meio já foi apresentado em outros trabalhos e resultados semelhantes foram obtidos (Tada et.al, 2007; Ohulchansky et.al. 2007). Em Tada et.al. (2007), foi determinado que AM incorporado em camada de sílica sol gel recobrendo nanopartículas magnéticas gera $^1\text{O}_2$ com tempo de vida próximo ao tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado por AM livre em solução. A perda de absorção da sonda DPBF também foi constatada após a fotoexcitação das nanopartículas magnéticas em acetonitrila. Utilizando outra sonda, o ácido antraceno 9,10-dipropiônico, Ohulchansky et.al.(2007) também provou que $^1\text{O}_2$ gerado por FS ligado a nanopartículas de sílica é capaz de se difundir para a solução.

Após a constatação de que os FS imobilizados nas partículas mantêm a capacidade de gerar $^1\text{O}_2$, determinou-se qual a eficiência desta geração e sua relação com o grau de agregação do FS na partícula. Vale lembrar que um dos objetivos centrais do projeto foi a construção de sistemas, em que a geração de $^1\text{O}_2$ pudesse ser modulada pela proporção de agregados.

As eficiências de geração de $^1\text{O}_2$ das nanopartículas quando irradiadas foram determinadas através de dois métodos diferentes, um método indireto, baseado na reação entre $^1\text{O}_2$ e a sonda DPBF, e outro direto, baseado na obtenção de transientes de emissão de luz em 1270nm. Como padrões nesta determinação empregaram-se AM e Tionina livres, cujos rendimentos quânticos de geração de $^1\text{O}_2$ são conhecidos: 0.50 e 0.59 respectivamente (vide item 4.7).

No método indireto, a irradiação de suspensão das nanopartículas e de soluções dos FS em acetonitrila na presença de DBPF levou à diminuição da intensidade de absorção em 410nm, como exemplificado na figura 5.20A para AM livre. Em todos os casos, a intensidade de absorção dos FS permaneceu constante, indicando que nenhuma reação direta entre FS e a sonda ocorreu. É importante ressaltar que a irradiação da solução de DBPF na ausência de partículas e de sensibilizadores livres não resultou em nenhuma mudança em seu espectro de absorção. A diminuição da intensidade de absorção em função do tempo de irradiação da partícula e do FS livre pôde ser ajustada para decaimento de primeira ordem em todos os casos, como, por exemplo, o decaimento para AM em acetonitrila (fig.5.20B). Utilizando os valores de tempo de decaimento (t) resultantes,

calcularam-se os valores de eficiência de geração de oxigênio singlete (**S indireto**) para as nanopartículas (vide item 4.7). Estes valores estão apresentados na tabela 8. As nanopartículas sil-AM e Cab-Tio apresentaram valores de eficiência menores que os respectivos FS livres. Para partículas sil-AM, a redução foi de 10 vezes e, para partículas Cab-Tio, de 7 vezes. As partículas sil-Tio apresentaram valor de eficiência 1,5 vezes maior que a Tionina livre.

A redução da eficiência de geração de pelo FS, quando este se encontra imobilizado em partícula, já havia sido determinada para partículas semelhantes, como, por exemplo, para nanopartículas magnética recobertas com sílica e AM, as quais apresentaram eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ 16 vezes menor que AM em solução (Tada, D. et.al.2007). Utilizando outra sonda, Tang et.al. calculou a eficiência das nanopartículas sol-gel com AM em gerar $^1\text{O}_2$ como sendo 7 vezes menor do que AM em solução. Esta redução pode ser consequência de efeitos como espalhamento de luz pelas partículas, desativação local do $^1\text{O}_2$ pela matriz da nanopartícula e agregação do FS incorporado. O aumento de eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ em relação ao FS livre foi reportado por Wieder et.al. (2006) para partículas de ouro ligadas a ftalocianina. O autor justifica este aumento pela associação de brometo de tetraoctilamônia à partícula, o qual aumentou a transferência de energia do tripleto para o O_2 . No caso das partículas sil-Tio, a baixa agregação do FS pode ter contribuído para o aumento da eficiência de geração de $^1\text{O}_2$.

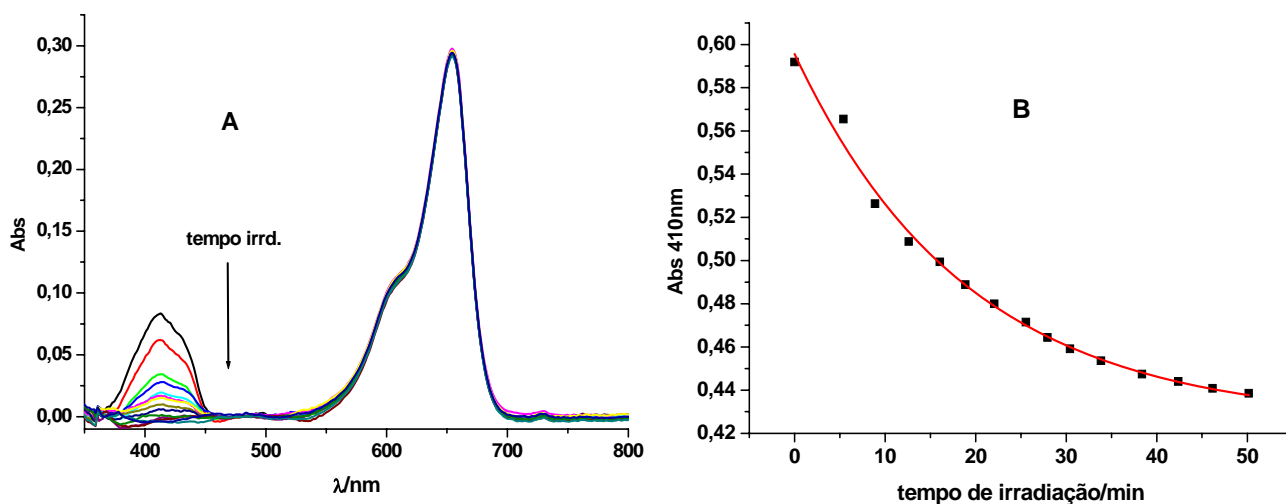


Figura 5.20 – (A) Espectros de absorção de AM (4 μ M) na presença de DPBF (8mM) após diferentes tempos de irradiação com laser de 532 nm laser. (B) Curva de decaimento de absorção em 410nm de DPBF como função do tempo de irradiação da solução de AM em acetonitrila.

No método direto, as eficiências de geração de $^1\text{O}_2$ das nanopartículas foram calculadas através da comparação da intensidade de emissão em 1270nm após a fotoexcitação dos FS livres e após a fotoexcitação das suspensões de nanopartículas. Transientes de emissão em 1270nm gerados pela fotoexcitação das nanopartículas apresentaram intensidade mais baixa em relação aos transientes gerados pelos respectivos FS livres em solução. Seguindo os cálculos descritos na seção 4.7, foram determinados os valores de eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ para cada partícula (**Sdireto**; tabela 8). Obtiveram-se valores de eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ duas vezes menores que os valores obtidos pelo método indireto para todas as partículas. Vale ressaltar que estas medidas geram valores aproximados, uma vez que os efeitos de espalhamento de luz não foram considerados quantitativamente.

É interessante notar que a relação entre as eficiências das nanopartículas é equivalente nos dois métodos. Esta concordância pôde ser avaliada através do parâmetro S/S_0 (tabela 8). Este parâmetro foi calculado dividindo-se os valores de eficiência de cada nanopartícula (S) pelo maior valor entre eles (S_0), o qual correspondeu ao valor da

eficiência das nanopartículas sil-Tio. Deste modo, para ambos os métodos, os valores de S/S_0 foi igual a 1 para nanopartículas sil-Tio, e valores 10 e 20 vezes menores foram obtidos para nanopartículas Cab-Tio e sil-AM, respectivamente.

Para investigar se as diferenças de eficiência de geração de 1O_2 estavam relacionadas às diferenças nos graus de agregação do FS para cada partícula, foi feita uma comparação entre os valores de S/S_0 e os valores de D/M (descritos em 5.1). Observou-se que quanto maior a razão D/M, menor a eficiência de geração de 1O_2 . Para as nanopartículas de sil-AM, que apresentaram maior valor de D/M, 1,6, a eficiência de geração de 1O_2 foi 20 vezes menor que a eficiência das partículas sil-Tio, cujo valor de D/M é zero. O fato da agregação de FS levar à diminuição de geração de 1O_2 é consequência da desativação do estado excitado de agregados por outro mecanismo que não a transferência de energia para o oxigênio molecular. Para dímero de AM o mecanismo proposto em Junqueira et.al.(2002) envolve a transferência de elétrons de uma molécula de AM para a outra, formando radicais de AM semi-oxidado e semi-reduzido. O radical semi-reduzido pode doar um elétron ao oxigênio formando superóxido, voltando ao estado singlete fundamental.

Tabela 8. Valores e desvios padrões de rendimento quântico de geração de 1O_2 das partículas.

Partícula	D/M	Sdireto	S/S₀direto	S indireto	S/S₀indireto
Sil-AM	1,6	0,017± 0,007	0,04	0,04	0,05
Cab-Tio	0,76	0,05 ± 0,01	0,13	0,08	0,1
Sil-Tio	0,0	0,4 ± 0,1	1	0,8	1

O decréscimo na geração de 1O_2 pela agregação de FS já foi constatado para outros FS em solução (Zenkevich E. et.al 2002; Kim S. et.al. 2007; Junqueira et.al. 2002). Em nanopartículas a relação entre a agregação de FS e a redução na eficiência de geração de 1O_2 já havia sido mencionada no trabalho de Tang et.al., porém não havia na literatura um estudo comparando a geração de 1O_2 por nanopartículas com FS incorporados com diferentes graus de agregação.

A correlação entre eficiência de geração de 1O_2 e razão D/M do sensibilizador na nanopartícula mostra que a síntese de nanopartículas funcionalizadas com sensibilizadores

em grau conhecido de agregação no estado fundamental levou à obtenção de sistemas com capacidade controlada e conhecida de geração de $^1\text{O}_2$. Vale ressaltar que esta capacidade sofre pouca influência do meio, como demonstrado nos item 5.3, diminuindo a possibilidade de mudança de mecanismo de desativação do FS conforme o ambiente ao redor da partícula é variado.

5.5. Recobrimento e Interação de partículas com MBHs

5.5.1. Recobrimento de partículas sil-AM

A modificação da superfície de nanopartículas tem sido uma estratégia para contornar mecanismos celulares e não celulares de resistência, bem como, de aumentar o tempo de circulação destas nanopartículas em sistemas biológicos. Considerando o possível uso das nanopartículas sintetizadas neste projeto em PDT, foram empregados diferentes recobrimentos para a modificação da superfície destas nanopartículas. O efeito dos recobrimentos sobre as propriedades das partículas, como a interação destas com membranas biomiméticas, atividade fototóxica *in vitro* e incorporação em células B16 foi investigado.

Os três recobrimentos empregados foram: lipídios neutros (DOPC); lipídios neutros (DOPC) e negativos (PG) na proporção 1:1 e polímero polietilenoglicol (PEG). O recobrimento com lipídios foi avaliado através de quantificação de fosfato ligado à nanopartícula (item4.9.1). O recobrimento com PEG foi acompanhado através de espectros de infravermelho.

A adsorção média de lipídios nas nanopartículas foi de 52% para vesículas de DOPC e de 70% para vesículas de DOPC:PG (1:1). Assim, apesar da carga negativa, as vesículas mistas de DOPC:PG puderam se adsorver melhor na superfície da nanopartícula sil-AM do que as vesículas neutras. Provavelmente, a adsorção de DOPC:PG é favorecida por dois fatores, a adsorção da fração de lipídios neutros por interações de van der Waals e a atração eletrostática entre a fração de lipídios negativos e AM imobilizado na nanopartícula carregado positivamente.

Espectros de IV antes e após o recobrimento com PEG confirmam a ligação deste polímero à partícula através do tolueno diisocianato (TDI; item4.9.2) (fig 5.21). Apesar da

sílica já possuir uma banda de absorção larga nas regiões de 3000cm^{-1} e $1000\text{-}2000\text{cm}^{-1}$ dificultando a detecção de bandas características do TDI, foi possível observar pequenas bandas na região de $1300\text{-}1600\text{cm}^{-1}$, devido à presença dos grupos aromáticos e uretanoamida (1341 , 1460 , 1508 e 1633cm^{-1}). Além disso, foi possível observar o aparecimento de banda em 2898cm^{-1} a qual pode ser atribuída aos grupos CH_2 do PEG, confirmando a presença deste polímero na partícula.

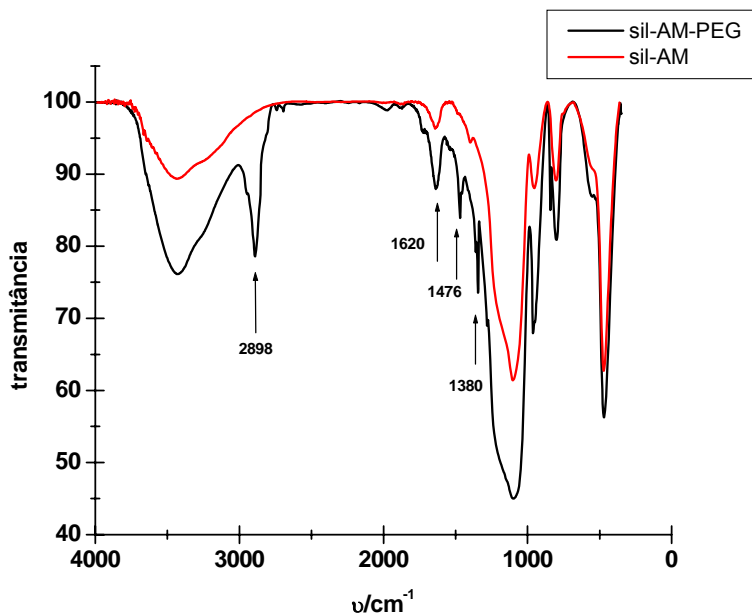


Figura 5.21. Espectros de IV das nanopartículas sil-AM sem recobrimento (—) e com recobrimento de PEG (—) em pastilhas de KBr.

Para estudar como os recobrimentos modificaram as características superficiais das nanopartículas, foram realizadas medidas do potencial Zeta das vesículas de DOPC e DOPC:PG, da sílica sem FS e das nanopartículas sil-AM antes e após os recobrimentos (tabela 9; fig 5.22). Apesar de o DOPC ser formalmente neutro, as vesículas formadas por este lipídio possuem potencial positivo (16mV), devido à adsorção preferencial de cátions nos fosfatos do lipídio, localizados numa região de baixa polaridade na interface da vesícula (Baptista & Politi; 1991). As nanopartículas com AM incorporado apresentaram carga menos negativa (-29mV), àquela observada para sílica sem FS (-53mV), resultado já esperado, uma vez que o AM é carregado positivamente. Este valor não sofre variação significativa após o recobrimento da superfície com PEG (**sil-AMPEG**), já que PEG é um polímero neutro. Partículas sil-AM recobertas com lipídio DOPC (**sil-AMPC**)

apresentaram potencial mais negativo (-40mV), quando comparadas com as mesmas partículas não recobertas e potencial menos negativo quando comparadas com partículas de sílica sem FS. Este resultado pode ser explicado pela provável formação de pares iônicos do fosfato do lipídio com moléculas de AM que se encontra na superfície, causando uma neutralização das cargas (Junqueira et.al., 2002). O aumento da carga negativa foi ainda mais pronunciado para nanopartículas recobertas com DOPC:PG/1:1 (**sil-AMPCPG**) (-65mV), pela contribuição da carga negativa do lipídio PG.

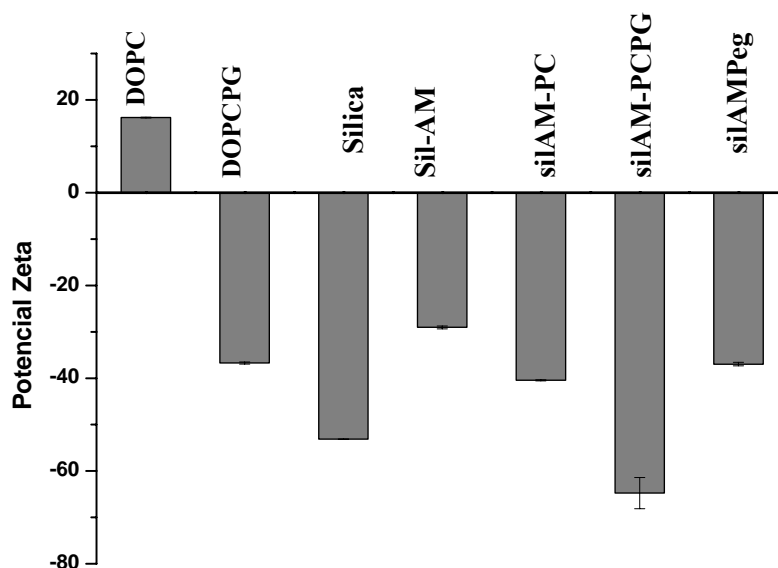


Figura 5.22- Valores de potencial zeta para vesículas e nanopartículas em água.

Tabela 9. Valores de potencial Zeta para vesículas e partículas recobertas.

Partícula/Vesícula	DOPC	DOPC:PG 1:1	Silica	SilAM	SilAM- PC	SilAM- PCPG	SilAM- Peg
Potencial Zeta(mV)	16±1	-37±4	-53,1±0,8	-29,±6	-40±2	-65±1	-37±7

Não há estudos na literatura de determinação de potencial Zeta de partículas com FS recobertas com lipídios. Moura et. al mostrou que nanopartículas de sílica apresentam potencial menos negativo que nanopartículas de sílica recobertas com DOPC, em concordância com os resultados apresentados aqui.

A carga superficial pode interferir na atração e na afinidade das nanopartículas por superfícies carregadas, como por exemplo, nas superfícies de membranas celulares. O efeito destes recobrimentos na interação destas partículas com superfícies de diferentes cargas que mimetizam membranas celulares foi estudado por SPRi.

5.5.2. Estudos de interações por SPRi

Partículas de sil-AM recobertas e sem recobrimento foram injetadas sobre membranas de bicamadas híbridas (MBH) de carga neutra (DOPC:PG 4:1) e de carga negativa (DOPC:PG; 1:4). A determinação da variação de reflectância (vide item 4.11.3) causada pela adsorção das nanopartículas sobre as superfícies fornece informações sobre a afinidade destas nanopartículas pelas MBH. Quanto maior a variação de reflectância, maior a adsorção das nanopartículas sobre a superfície e, portanto, maior sua afinidade pela MBH em estudo.

Após duas injeções consecutivas de nanopartículas sobre MBH de DOPC:PG 4:1 obtiveram-se valores médios de variação de reflectância de 1,3; 1,7 e 1,9, para nanopartículas recobertas com DOPC, DOPC:PG (1:1), PEG, respectivamente, e de 12,7, para nanopartículas sil-AM sem recobrimento. Nos estudos com MBH de DOPC:PG 1:4 obtiveram-se os seguintes valores após duas injeções consecutivas de nanopartículas: 1,7;

0,9; 0,06 e 4,9 para partículas recobertas com DOPC, DOPC:PG (1:1), PEG e sem recobrimento, respectivamente.

Tanto para MBH de DOPC:PG 4:1, como para MBH de DOPC:PG 1:4, nanopartículas não recobertas apresentaram maior adsorção do que as partículas recobertas (fig 5.23). Por exemplo, os valores de variação de reflectância causadas pela adsorção das nanopartículas sem recobrimento sobre MBH de DOPC:PG 4:1 foram cerca de 10 vezes maiores que aqueles detectados pela adsorção de nanopartículas recobertas. As 3 nanopartículas recobertas apresentaram adsorção semelhantes sobre MBH de DOPC:PG 4:1. Entretanto, sobre MBH de DOPC:PG 1:4 houve variação mensurável, comparando-se nanopartículas com diferentes recobrimentos. A adsorção das nanopartículas variou na seguinte ordem decrescente: sil-AMPC > sil-AMPCPG > sil-AMPeg, conforme pode ser observado na figura 5.22 (barras hachuradas). Provavelmente, há uma repulsão entre os grupos fosfatos das nanopartículas sil-AMPCPG e os grupos fosfatos da membrana. No caso das nanopartículas sil-AMPeg, a menor interação com a superfície carregada pode ser explicada pela maior contribuição das forças de hidratação devido à alta hidratação das cadeias de polietilenoglicol. Para uma mesma nanopartícula, a magnitude da diferença de variação de reflectância causada pela sua adsorção sobre as duas MBHs, fornece uma indicação da sua especificidade de adsorção. Nanopartículas recobertas com PEG apresentaram maior especificidade de adsorção: 93% maior sobre MBH de DOPC:PG 4:1 do que sobre MBH de DOPC:PG 1:4. (fig.5.23). A adsorção de nanopartículas não recobertas sobre as MBHs com maior proporção de lipídio neutro (DOPC:PG 4:1) foi 60% maior que a adsorção sobre membrana de DOPC:PG 1:4. Uma adsorção 53% maior sobre DOPC:PG 1:4 em relação à adsorção sobre DOPC:PG 4:1 foi observada para nanopartículas recobertas com DOPC:PG (1:1). As nanopartículas sil-AMPC foram as que apresentaram menor especificidade de adsorção: apenas 22% maior sobre MBH de DOPC:PG 1:4.

As variações de especificidade podem ser explicadas parcialmente pelas cargas superficiais das nanopartículas. As nanopartículas sil-AMPCPG com potencial Zeta mais negativo mostraram menor adsorção sobre MBH de DOPC:PG 1:4 em relação à adsorção sobre DOPC:PG 4:1, mas apresentaram menor especificidade quando comparadas às nanopartículas sil-AMPeg e sil-AM. Nestas duas últimas, além dos efeitos de carga

superficial, ocorre também maior contribuição dos efeitos de forças de hidratação, uma vez que, estas nanopartículas são mais hidratadas do que as nanopartículas recobertas com lipídios.

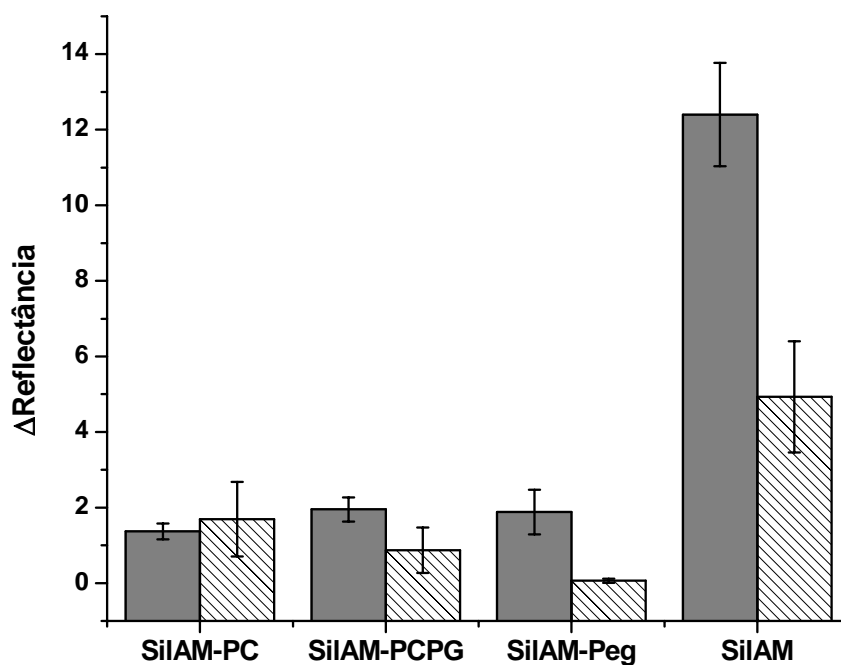


Figura 5.23- Valores da variação de reflectividade após duas injeções de nanopartículas sobre membranas de DOPC:PG 4:1 (cinza) e DOPC:PG 1:4 (hachurado).

O grande valor de variação de reflectância apresentado pelas nanopartículas sil-AM pode ser conseqüência não só da interação nanopartícula-MBH, mas também da interação nanopartícula-nanopartícula, levando à agregação destas sobre a membrana lipídica. Sendo assim, para melhor comparar o comportamento das partículas, foi calculada também a velocidade média de adsorção nos primeiros 4 minutos após a injeção, quando a agregação de nanopartículas é mínima (fig.5.24 inserto). A velocidade média de adsorção é calculada como valor médio de variação de reflectância/min. Os valores médios de velocidade de adsorção sobre MBH de DOPC:PG 4:1 foram calculados como: 0,08; 0,30; 0,15 e 1,3 para partículas recobertas com DOPC, DOPC:PG (1:1), PEG e sem recobrimento, respectivamente. Em estudos sobre MBH de DOPC:PG 1:4, os valores obtidos foram de

0,1; 0,24; 0,05 e 0,32 para partículas recobertas com DOPC, DOPC:PG (1:1), PEG e sem recobrimento, respectivamente.

Comparando-se os valores de velocidade média de adsorção calculados (fig.5.24), foi possível observar a maior velocidade de adsorção das nanopartículas sil-AM não recobertas sobre MBH de DOPC:PG 4:1 e DOPC:PG 1:4, comprovando que o alto valor de variação de reflectância observado após duas injeções é resultado da maior afinidade das nanopartículas sil-AM por esta MBH, sendo, portanto, mínima a contribuição da agregação das partículas. Além disso, os dados de velocidade média de adsorção confirmam maior afinidade das nanopartículas sil-AM por MBH de DOPC:PG 4:1, uma vez que a velocidade de adsorção sobre esta membrana foi 4 vezes maior que a velocidade de adsorção sobre MBH de DOPC:PG 1:4.

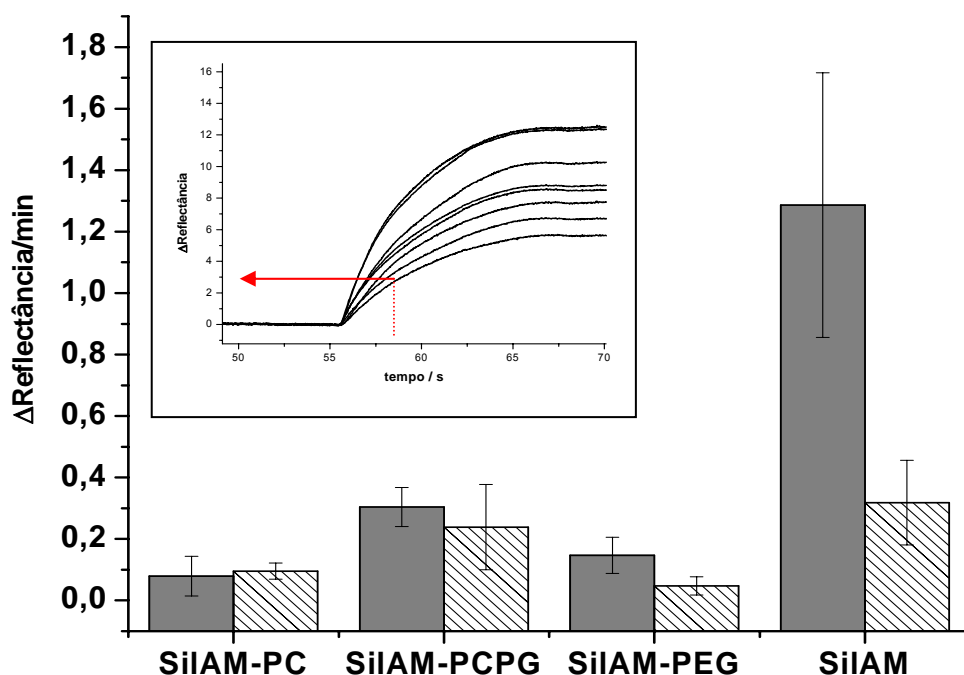


Figura 5.24- Valores médios da variação de reflectividade por minuto após injeção de partículas sobre MBH de DOPC:PG 4:1 (cinza) e DOPC:PG 1:4 (hachurado). Inseto: Curvas de variação de reflectância em função do tempo após 1ª injeção de nanopartículas silAM. Cada curva corresponde a uma região diferente do prisma. A seta indica o valor da variação de reflectância 4 minutos após a injeção. Dividindo-se estes valores por 4 obtiveram-se os valores de velocidade de adsorção (reflectância/min) cujo valor médio e desvio padrão estão representados no gráfico de barras.

Embora existam diversos estudos sobre a capacidade dos recobrimentos com PEG e lipídios em proteger as partículas do reconhecimento por proteínas envolvidas no mecanismo de resistência celular (Bourdon et.al.2000; Nematí et.al.1996), o estudo sobre como estes recobrimentos alteram a afinidade entre partículas e membranas ainda não havia sido feito. No presente trabalho, apresentamos estes estudos empregando a técnica de SPRi. Esta técnica, geralmente utilizada em estudos sobre interação entre proteínas e membranas e reconhecimento de antígeno e anticorpo, jamais havia sido reportada como ferramenta para estudos sobre interação de nanopartículas e membranas.

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que, embora o recobrimento de partículas possa ser importante para modificar o perfil de interação com sistemas biológicos, este pode diminuir a afinidade das nanopartículas por membranas. A determinação de como essas diferenças de afinidades podem ser refletidas na toxicidade e incorporação celular destas partículas foi realizada através de experimentos *in vitro* com células B16.

5.6. Estudos Biológicos

5.6.1. Viabilidade Celular

As toxicidades dos sensibilizadores livres e ligados às nanopartículas foi investigada através de experimentos de viabilidade celular, utilizando células de melanoma B16. Considerando-se a taxa de sobrevivência de 100% para as células que não receberam nenhum tratamento, foram calculadas as taxas de sobrevivência para células incubadas com FS livres e com nanopartículas na ausência e na presença de irradiação.

A incubação de células com AM livre levou a uma taxa média de sobrevivência de 110% na ausência de irradiação e de 90% após irradiação com laser de 665nm. O aumento de viabilidade causado pela presença do AM no escuro já foi observado em estudos com outras linhagens celulares (Atamna et.al., 2007). Células incubadas com nanopartículas sil-AM na ausência de irradiação apresentaram taxa média de sobrevivência de 78%. Esta taxa foi reduzida a 55% quando as células incubadas com a mesma concentração de partículas foram irradiadas com laser de 665nm (fig.5.25).

Comparando-se as toxicidades no escuro de AM livre e incorporado em nanopartículas, foi possível observar que as nanopartículas sil-AM apresentaram redução de 28% na taxa de sobrevivência (fig.5.25). A análise das taxas obtidas na presença de irradiação mostra que a incorporação do AM nas partículas resultou no aumento de 38% na sua atividade fototóxica.

Com o intuito de investigar quais os efeitos dos recobrimentos sobre a toxicidade das partículas sil-AM, foram realizados experimentos de viabilidade celular com concentrações equivalentes (05mg/mL) de nanopartículas recobertas com DOPC, DOPC:PG (1:1) e PEG. No escuro, a incubação de células com partículas sil-AM recobertas com DOPC, DOPC:PG e PEG resultou em taxas de sobrevivência de 66%, 52% e 81%, respectivamente. Em comparação com a nanopartícula sem recobrimento, as nanopartículas sil-AM recobertas com DOPC e DOPC:PG apresentaram maior toxicidade, enquanto que o recobrimento com PEG não alterou a taxa de sobrevivência de forma significativa (fig.5.25).

Os experimentos realizados com irradiação (fig 5.25, barras hachuradas) resultaram em taxas de sobrevivência de 56%, 54% e 96% para os recobrimentos com DOPC,

DOPC:PG e PEG, respectivamente. Para as nanopartículas recobertas com DOPC e DOPC:PG, estes valores são praticamente iguais aos obtidos com a nanopartícula sem recobrimento. Uma diferença de taxa de sobrevivência foi observada apenas para o recobrimento com PEG, o qual diminuiu a fototoxicidade da partícula.

Os estudos sobre interações de nanopartículas e MBH mostraram que a maior afinidade por membranas ocorre para as partículas sil-AM as quais também apresentaram maior fototoxicidade. Esta correlação sugere que a interação com membranas deve ter um papel importante na eficiência fototóxica das nanopartículas. Assim, diferenças de toxicidade entre as nanopartículas não recobertas e recobertas com polímero e lipídios pode estar relacionada com diferenças na capacidade destas partículas em penetrar nas células bem como, com suas diferentes citolocalizações. Estudos sobre a incorporação de partículas nas células foram realizados através de microscopia de fluorescência (item 5.6.2).

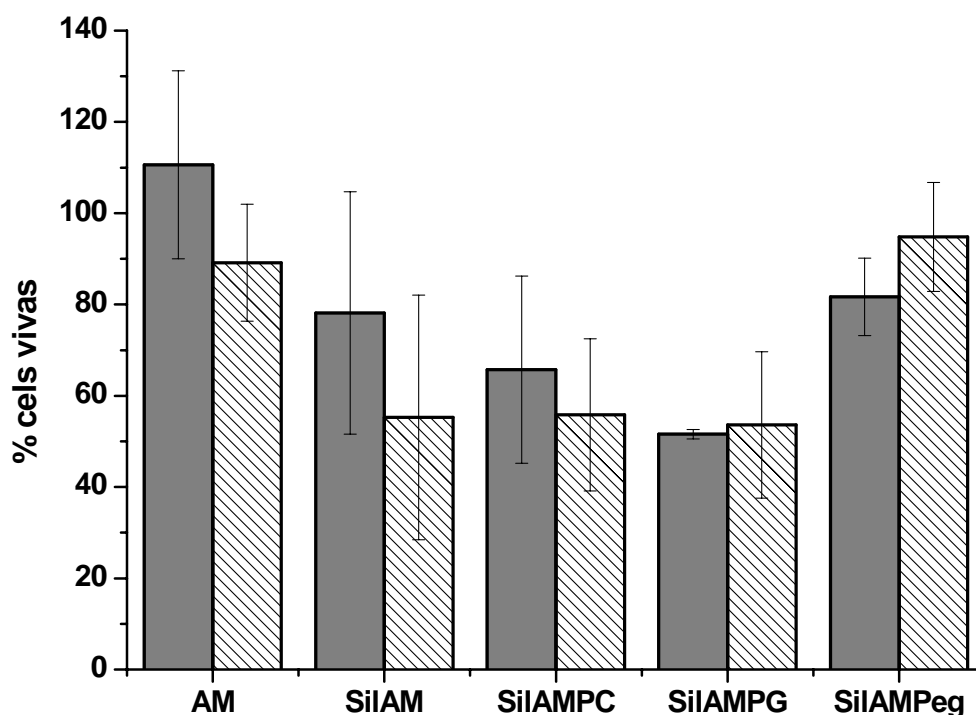


Figura 5.25- Valores médios e desvios padrões de viabilidade celular após incubação com AM ($1\mu\text{M}$) e nanopartículas sil-AM ($0,5\text{mg/mL}$) na ausência (cinza) e presença de irradiação 665nm ($0,3\text{J/cm}^2$) (hachurado).

Experimentos de viabilidade celular também foram realizados com Tionina livre e ligada às nanopartículas sil-Tio e Cab-Tio com irradiação de 532nm e 590nm.

Na ausência de irradiação, a incubação de células com Tionina livre e nanopartículas sil-Tio e Cab-Tio resultou em taxas de sobrevivência de 99; 113 e 110 % respectivamente. Desta forma, podemos concluir que na concentração estudada, Tionina não é tóxica no escuro, estando livre ou ligada às nanopartículas.

Após irradiação de 532nm (fig.5.26) a taxa de sobrevivência de células incubadas com Tionina livre, foi de 97% e, para células incubadas com as nanopartículas sil-Tio e Cab-Tio, de 98%. Portanto, não há diferença significativa entre as porcentagens de células vivas após irradiação com laser de 532nm para células incubadas com partículas e com Tionina em solução. Nos experimentos com irradiação em 590nm obtiveram-se taxas de sobrevivência de 111% para Tionina livre, 97% para as partículas sil-Tio e 88% para partículas Cab-Tio. A incubação de células com partículas Cab-Tio, seguida de irradiação de 590nm levou à diminuição de 20% de viabilidade comparada com a incubação com Tionina em solução.

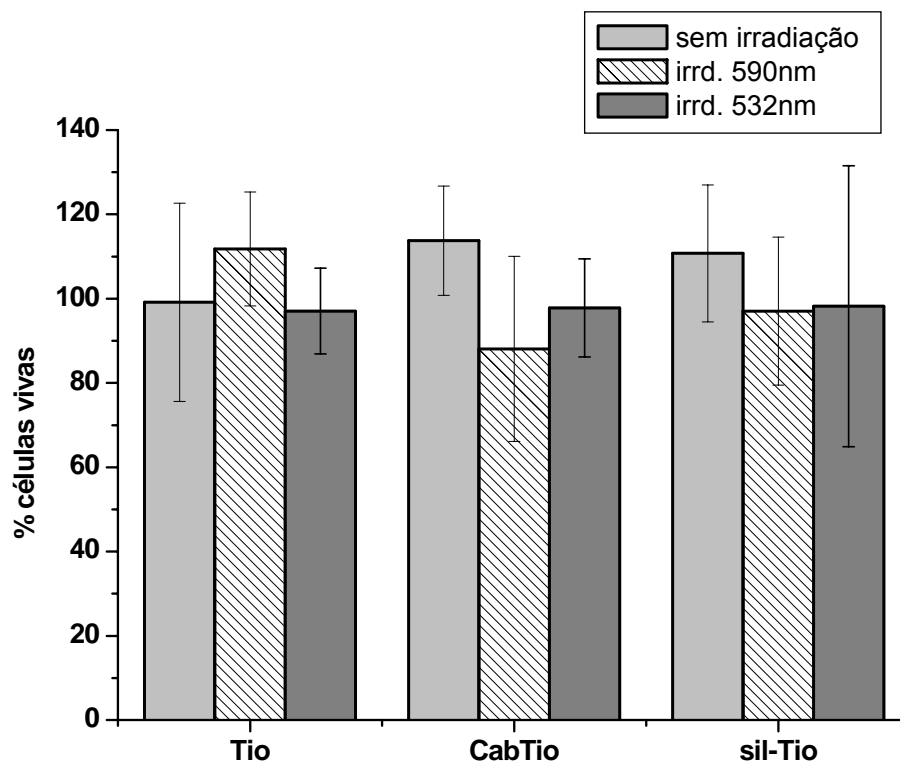


Figura 5.26- Valores de viabilidade celular após incubação com Tionina ($10\mu\text{M}$) e nanopartículas sil-Tio e Cab-Tio ($0,5\text{mg/mL}$) na ausência (cinza claro) e presença de irradiação de 532nm (hachurado) e 590nm (cinza-escuro). Irradições de $0,3\text{J/cm}^2$.

A maior fototoxicidade das nanopartículas Cab-tio após irradiação com laser de 590nm comparada com a sua fototoxicidade após irradiação de 532nm é explicada pela maior absorção de luz da suspensão incubada ($0,5\text{mg/mL}$) em 590 em comparação com a absorção em 532nm. No caso das partículas sil-Tio uma limitação encontrada no experimento foi a impossibilidade de aumentar a concentração de partículas na suspensão incubada para valores acima de $0,5\text{mg/mL}$, uma vez que isto causa a morte celular por processos físicos (dados não mostrados). Desta forma, a concentração das suspensões incubadas foi de $0,5\text{mg/mL}$ tanto para as partículas Cab-Tio quanto para as partículas sil-Tio. Entretanto, a absorção da suspensão de partículas Cab-Tio é maior que a intensidade de absorção da suspensão das partículas sil-Tio. Sendo assim, a maior taxa de sobrevivência observada para partículas sil-Tio em relação às partículas Cab-Tio pode ser justificada por sua menor intensidade de absorção de luz.

Como já mencionado, a incorporação do AM nas nanopartículas sil-AM levou a um aumento de 38% na sua atividade fototóxica, enquanto que a ligação de Tionina na superfície de nanopartículas Cab-Tio resultou num aumento de atividade fototóxica de 20%. Em comparação com as nanopartículas de Sil-AM, as nanopartículas de Cab-Tio têm maior eficiência de geração de $^1\text{O}_2$, que pode estar relacionado com a morte celular pelo processo de apoptose, mais lento do que a morte por necrose. No método que foi empregado para medir viabilidade celular, células em processo de apoptose não são diferenciadas das vivas. Assim, na determinação da taxa de sobrevivência das células incubadas com Cab-Tio, número de células vivas pode ter incluído células em apoptose, o que explicaria a menor atividade fototóxica observada.

Embora a comparação com trabalhos de outros grupos de pesquisa seja dificultada pelos diversos métodos de análise adotados, pode-se dizer que os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos descritos na literatura, uma vez que os aumentos de fototoxicidade do FS imobilizado nas partículas foram próximos. Wieder et.al (2006), Ricci-Júnior et.al.(2005), Bourdon et.al.(2000) e Roy et.al (2003), por exemplo, avaliaram a atividade de partículas funcionalizadas com FS através de medidas de atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT (do inglês “3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide”). Estudos comparativos entre FS livres e imobilizados de Wieder et.al., demonstraram que a ligação de ftalocianina em nanopartículas de ouro aumenta a fototoxicidade do composto em 43% nos experimentos *in vitro* com células Hela. Bourdon et. Al constatou um aumento de aproximadamente 20% na fototoxicidade para a incorporação de meta-tetrahidroxifenil clorina em sistemas coloidais de água/óleo e ácido poliláctico em células HT29. Ricci-Júnior et.al. e Roy I. et.al. demonstraram a atividade fototóxica das nanopartículas, mas não realizaram análise quantitativa em relação aos respectivos FS livres e sim em relação a soluções salinas. No trabalho de Ricci-Júnior et. al., foi observada morte de 61% para células tumorais P388-D1 incubadas com Zinco(II) ftalocianina em nanopartículas de ácido poli (D,L-lactico-co-glicolico). Roy et.al., nos estudos com partículas de sílica ORMOSIL com o FS 2-devinil2-1-hexiloxietil pirofeorforbida incorporado, determinou viabilidade de 10 e 20% em experimentos com células Hela e UCI 107, respectivamente. Utilizando microscopia de fluorescência, Gu et.al.(2005) e Tang W.et.al. determinaram a fototoxicidade de partículas com FS

incorporados. Gu et.al. constatou atividade fototóxica de partículas de óxido de ferro contendo Diaminoporfirina através da observação da morfologia das células Hela, o que indicou processo de apoptose após irradiação na presença de partículas. Nos estudos de Tang W. et. al (2002), células C6 marcadas com iodeto de propídio foram irradiadas na presença de partículas de poliacrilamida com AM incorporado. Foi observada a perda de fluorescência nas células que sofreram irradiação, o que é resultado da liberação do marcador do interior das células como consequência de sua morte. Especificamente com relação ao recobrimento com PEG, para o qual nenhum efeito significativo foi observado no presente trabalho, Bourdon et. al (2000) constatou diminuição de fototoxicidade de 20% após recobrir os sistemas coloidais com o mesmo polímero, em concordância com nossos resultados.

5.6.2. Microscopia de Fluorescência Confocal

As diferentes toxicidades das nanopartículas sil-AM com e sem recobrimento, observadas nos experimentos de viabilidade celular podem estar relacionadas com as diferenças de incorporação das nanopartículas nas células. Para investigar como as partículas interagem com células em cultura, foram realizados estudos de microscopia confocal com nanopartículas sem recobrimento e partículas recobertas com lipídios DOPC:PG (1:1). Nestes experimentos, foram utilizadas nanopartículas contendo rutênio-fenantrolinea $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ em vez de AM, uma vez que eram necessárias partículas fluorescentes e AM não possui fluorescência intensa o suficiente para permitir estes estudos.

As micrografias de fluorescência foram sobrepostas com as micrografias da transmissão de luz. A confirmação de que as células com nanopartículas incorporadas estavam vivas pôde ser feita pela observação da fluorescência de Mitotracker green utilizado como marcador de mitocôndria, o qual é conhecido por interagir apenas com células íntegras. Foi possível observar que as nanopartículas são capazes de penetrar nas células, independentemente de possuírem ou não recobrimento de lipídios. No entanto, a distribuição das nanopartículas no interior das células apresentou diferenças. No caso das

nanopartículas recobertas, observou-se um perfil de distribuição difuso por todo o citoplasma (fig.5.27). Já no caso de nanopartículas sem recobrimento, estas se encontraram em poucas regiões vacuolares do citoplasma (fig.5.28).

A diferença no perfil de distribuição das nanopartículas no interior das células pode ser consequência de diferentes interações das partículas. Os resultados obtidos por SPRi indicam a capacidade das nanopartículas em se adsorverem sobre as superfícies das membranas miméticas. Em células, entretanto, a adsorção sobre a membrana é seguida de outras interações que podem influenciar a internalização das nanopartículas. Assim, apesar dos resultados obtidos por SPRi terem mostrado que nanopartículas recobertas com lipídios apresentam menor adsorção sobre as MBH, os lipídios do recobrimento podem aumentar a interação das nanopartículas com as membranas celulares, facilitando a penetração destas nas células. No caso das nanopartículas sem recobrimento, apesar da alta taxa de adsorção sobre MBH, estas partículas podem apresentar baixa interação com as membranas celulares, permanecendo adsorvidas em sua superfície mas com maior dificuldade de penetrar nas células. Desta forma, as nanopartículas adsorvidas na superfície da membrana podem ser fagocitadas, resultando na sua localização em regiões vacuolares no interior das células, conforme observado na figura 5.28. Os resultados obtidos nas imagens de microscopia confocal podem explicar a diferença de comportamento das nanopartículas observada nos experimentos de viabilidade celular. A maior toxicidade no escuro das partículas sil-AM quando recobertas por lipídios pode estar relacionada com sua maior incorporação e distribuição difusa no interior das células.

Comparando-se as imagens de microscopia confocal obtidas das células incubadas com nanopartículas sol-gel com imagens apresentadas na literatura de (Wieder et.al 2006; Roy et.al.2003; Gu et.al. 2005; Konan et.al.2001) nanopartículas de diferentes materiais (magnetita, ouro, sílica, ácido polilático), podemos perceber que as nanopartículas de sílica em estudo apresentam comportamento semelhante, distribuindo-se por todo o citoplasma e não sendo detectadas no núcleo. Além disso, outro fato interessante, foi a alteração da incorporação do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$. Foi observado que este complexo é incapaz de penetrar em células intactas, sendo detectado no núcleo (devido à sua alta afinidade com ácidos nucleicos) apenas após as células terem sofrido fotodano (Dobruki, 2001), entretanto, nas imagens obtidas com $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ incorporado nas partículas de sílica, foi

possível observar a distribuição das partículas por todo o citoplasma de células vivas com membranas intactas. Espera-se que partículas com AM e Tionina tenham o mesmo comportamento que as partículas com $[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$ uma vez que estas foram sintetizadas pelo mesmo procedimento, tendo tamanho e características superficiais semelhantes às das partículas sil-Tio e sil-AM (Rossi et.al., 2005). Desta forma, podemos afirmar que nanopartículas de sílica com AM e Tionina penetram nas células B16 e que os efeitos fototóxicos observados são causados pela geração de espécies tóxicas no citoplasma.

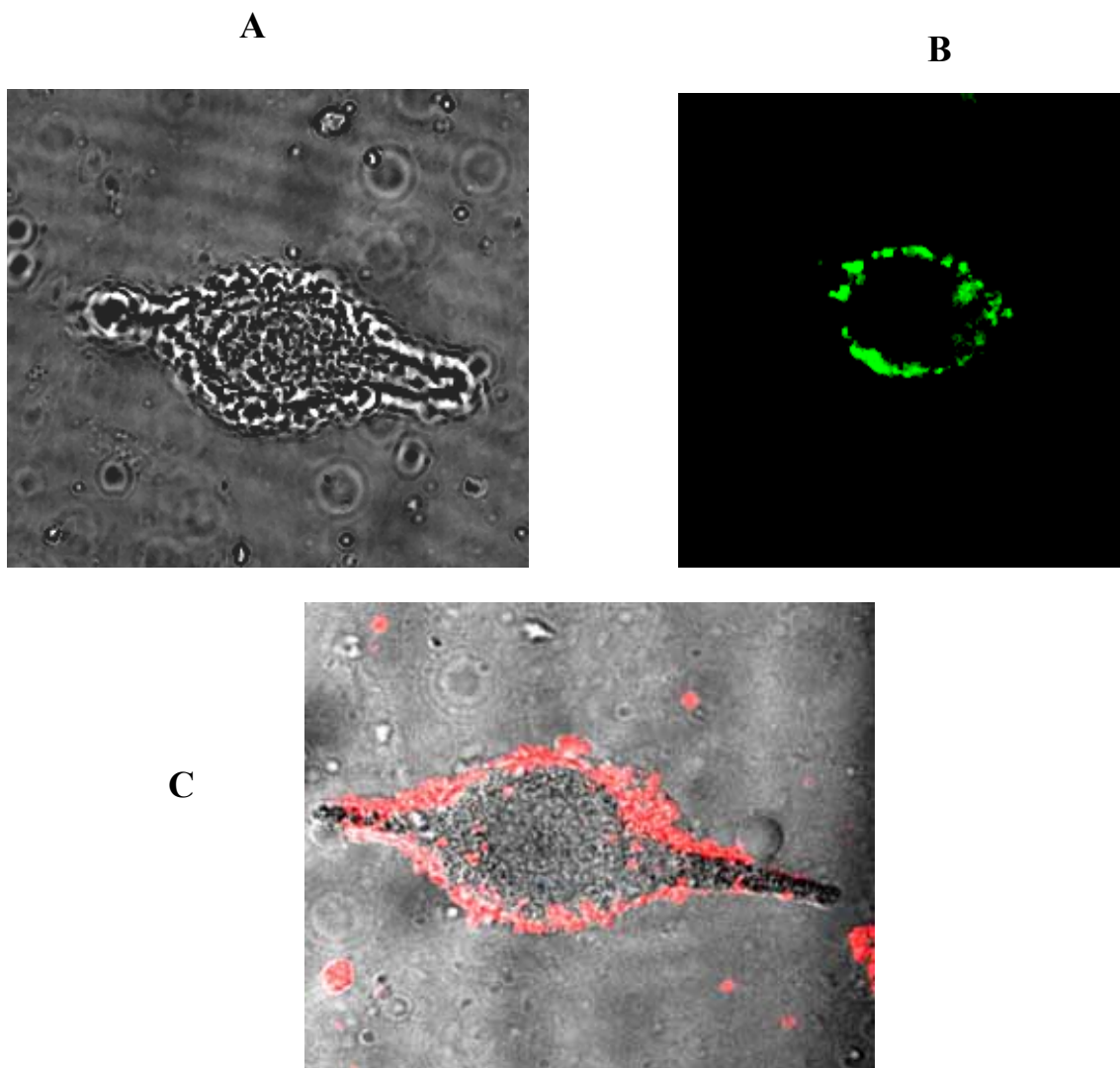


Figura 5.27. Imagens de fluorescência confocal de células incubadas com nanopartículas recobertas com lipídios (DOPC:PG 1:1). (A) Imagen transmitida. (B) Mitotracker Green (C) Nanopartículas.

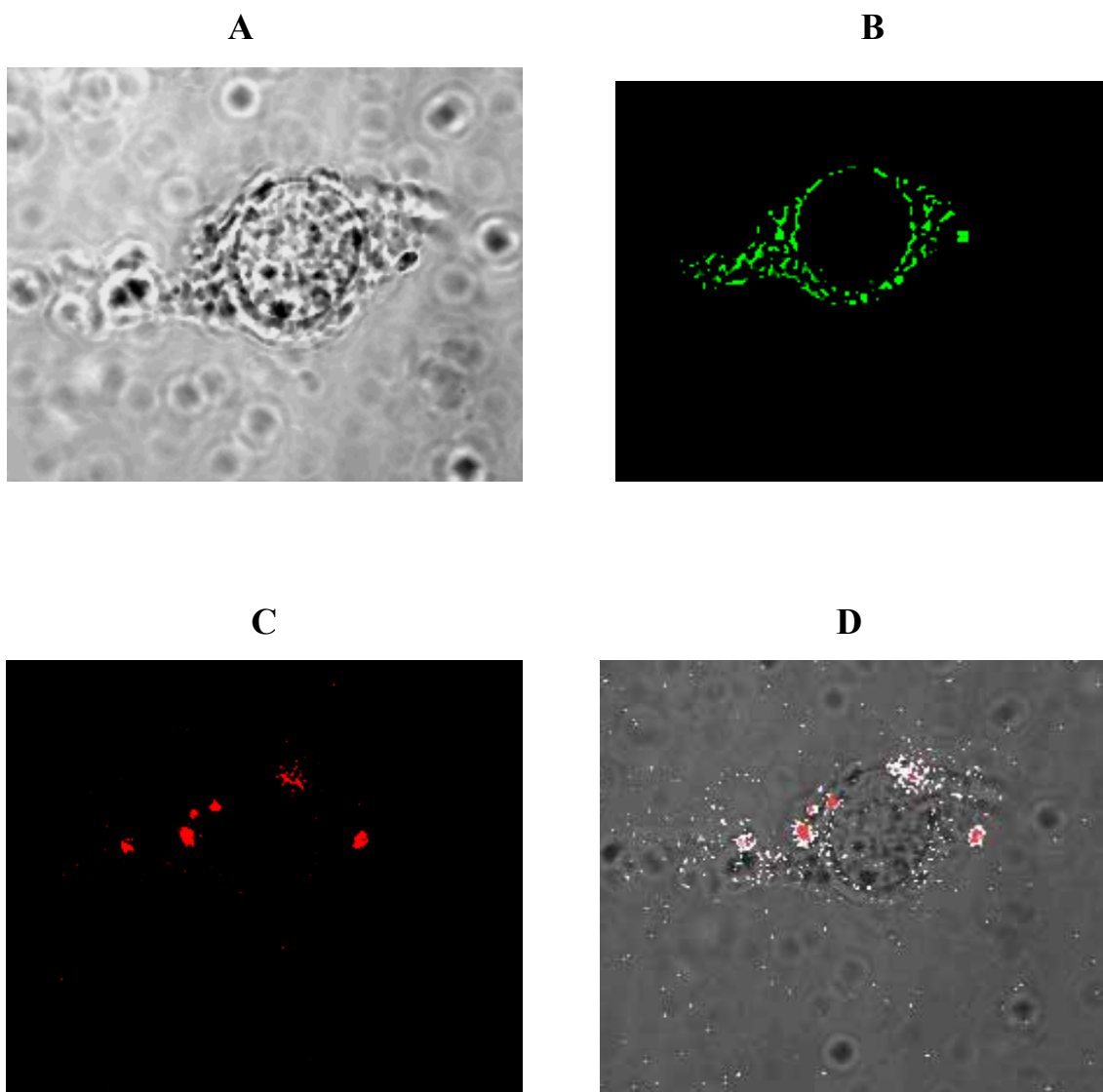


Figura 5.28-Imagens de microscopia de fluorescência das células incubadas com nanopartículas sem recobrimento. (A) Transmitida (B) Mititracker Green. (C) Nanopartículas. (D) Sobreposição de imagens (A) e (C).

6. Conclusões

O objetivo do presente trabalho foi a construção de sistemas onde a geração de espécies reativas de oxigênio pudesse ser conhecida e controlada, ou seja, não vulnerável a interferências do meio, independente de interações entre FS e membranas e proporcional a razão de dímeros e monômeros dos FS nas nanopartículas. Em busca destes sistemas foram sintetizadas nanopartículas de sílica com AM incorporado (nanopartículas sil-AM), Tionina incorporada (nanopartículas sil-Tio) e Tionina ligada à superfície (Cab-Tio).

A incorporação de AM e Tionina nas nanopartículas sil-AM e sil-Tio ocorreu durante o processo sol gel e no caso de Cab-Tio, Tionina foi ligada covalentemente na superfície de sílica Cab-O-Sil® através de reações com reagentes bifuncionais. Os métodos de síntese adotados foram eficientes na obtenção de nanopartículas de sil-AM com diâmetro médio de 60nm e nanopartículas sil-Tio e Cab-Tio de 52 e 34nm, respectivamente. Estes diâmetros permitem interação com células e são propícios para acúmulo seletivo no tecido tumoral. (Fukumori & Ichikawa,2005) A ligação e a integridade da Tionina nas nanopartículas de Cab-Tio, bem como, as espessuras das monocamadas formadas após cada etapa de funcionalização foram verificadas através da reprodução das reações sobre a superfície de silício e análises de elipsometria, microscopia de força atômica e espectroscopia Raman.

Os trabalhos publicados na literatura sobre nanonanopartículas funcionalizadas com FS são centralizados na determinação das suas atividades fototóxicas (Vargas et.al.,2004; Bourdon et.al, 2000; Ohulchanskyy et.al., 2007, Tang et.al., 2005; Roy et.al., 2003). Com enfoque diferente, o presente trabalho concentrou-se principalmente nos estudos das propriedades dos FS ligados e nos mecanismos de alteração das propriedades fotoquímicas, na interação com membranas e na fototoxicidade e incorporação em células.

Os espectros de absorção UV-vis mostraram que a imobilização dos FS induziu a agregação destes em extensões diferentes para cada partícula. Foi determinada maior concentração de dímeros nas nanopartículas sil-AM, seguidas das nanopartículas Cab-Tio, enquanto que, nas nanopartículas sil-Tio, não foi detectada a presença de dímeros. Os espectros de emissão de fluorescência em diferentes solventes mostraram os deslocamentos de λ máximo da região do vermelho para o azul com o aumento da polaridade e capacidade em fazer ligações de hidrogênio do solvente, tanto para FS livres quanto para

nanopartículas. Sendo assim, a solvatação dos FS não foi alterada de forma significativa quando estes foram imobilizados nas nanopartículas.

Foi possível observar que as nanopartículas sofrem menor interferência do meio que FS livres. AM e Tionina não sofreram redução química por NADPH quando imobilizados nas nanopartículas sol gel ou Cab-O-Sil. A supressão de fluorescência por íons brometo foi menor para as nanopartículas em comparação com FS livres. Nanopartículas sil-AM apresentaram constante de supressão 22 vezes menor que AM em solução. Para nanopartículas sil-Tio e Cab-Tio, as constantes de supressão foram reduzidas 300 e 6 vezes, respectivamente, em relação a Tionina livre. A geração de $^1\text{O}_2$ para as nanopartículas sil-AM não foi alterada pela presença de ânion ascorbato, o qual suprimiu a geração de $^1\text{O}_2$ por AM livre em 99%. Esta menor interferência pode ser explicada pelo menor acesso das espécies do meio aos FS imobilizados comparado aos FS livres.

A obtenção de transientes de emissão em 1270nm mostrou que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado pelas nanopartículas é próximo ao tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado pelos FS livres, comprovando que $^1\text{O}_2$ gerado pelas nanopartículas é capaz de se difundir para o meio. A difusão do $^1\text{O}_2$ gerado pelas nanopartículas foi também constatada pela reação entre $^1\text{O}_2$ e sonda DPBF dissolvida no meio após fotoexcitação das nanopartículas.

Foram calculadas as eficiências de geração de $^1\text{O}_2$ das nanopartículas a partir das intensidades de transientes de emissão em 1270nm e através da cinética de reação de $^1\text{O}_2$ e DPBF após fotoexcitação de FS livres e nanopartículas. Ambos os métodos geraram valores de eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ distintos para sil-AM, sil-Tio e Cab-Tio, o que pode ser atribuído às diferentes razões de D/M presentes nas nanopartículas. Nanopartículas sil-AM com maior razão D/M apresentaram eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ 20 vezes menor que a eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ das nanopartículas sil-Tio, que contêm Tionina apenas na forma monomérica.

Três recobrimentos foram empregados para modificação da superfície de nanopartículas sil-AM: DOPC, DOPC:PG (1:1) e PEG. As adsorções das nanopartículas com e sem recobrimento, foram avaliadas por SPRi sobre duas MBH de cargas distintas. Estas MBH foram preparadas com DOPC e PG em diferentes proporções molares: 4:1 e 1:4. Para as duas MBH a maior variação de reflectividade foi observada após a injeção de nanopartículas sil-AM sem recobrimento. A variação média de reflectância causada pela

adsorção de nanopartículas sil-AM foi cerca de 10 e 5 vezes maior que a variação média de reflectância causada pela adsorção das nanopartículas recobertas sobre MBH de DOPC:PG 4:1 e DOPC:PG 1:4, respectivamente. Estes resultados mostraram que, apesar das vantagens apresentadas por outros autores, os recobrimentos com PEG e lipídios podem comprometer a adsorção das nanopartículas em membranas.

Estudos *in vitro* mostraram diferentes fototoxicidades das nanopartículas em relação aos FS livres. As nanopartículas sil-AM e Cab-Tio apresentaram fototoxicidades 38% e 20% maiores que os respectivos FS livres. A avaliação da fototoxicidade das nanopartículas sil-Tio foi prejudicada pela sua baixa intensidade de absorção no comprimento de onda de irradiação. Este problema não pôde ser contornado pelo aumento da concentração das suspensões já que, concentrações maiores que a utilizada causam morte celular por processos físicos de adsorção.

Estudos de viabilidade celular com nanopartículas sil-AM mostraram que os recobrimentos alteraram a toxicidade das nanopartículas. Na presença de irradiação as nanopartículas sil-AM sem recobrimento e recobertas com lipídios apresentaram toxicidade próximas e superiores às observadas para as nanopartículas recobertas com PEG. Na ausência de irradiação, o recobrimento com PEG não alterou a toxicidade das nanopartículas sil-AM, a qual foi aumentada pelo recobrimento com lipídios DOPC e DOPC:PG (1:1). Este resultado pôde ser explicado pelas imagens de microscopia confocal, as quais mostraram que nanopartículas recobertas com lipídios possuem distribuição difusa pelo citoplasma, enquanto que nanopartículas sem recobrimento foram detectadas apenas em pequenas regiões vacuolares.

A demonstração de que sistemas de nanonopartículas funcionalizadas com FS podem ser utilizados como métodos de modulação do mecanismo de ação dos FS através do controle da agregação dos mesmos e garantindo que estes não sofram alterações causadas por interferentes externos é a principal contribuição deste trabalho para a ciência de novos materiais, uma vez que estes sistemas de geração modulada de oxigênio singlete poderão ser usados em diferentes áreas dentre estas, promissora em PDT, conforme indicaram os resultados dos experimentos *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que a modificação das superfícies das nanopartículas pode modular as propriedades de adsorção em membranas e a internalização e toxicidade em células.

7. Referências

ALFAYA, A.A.S. & KUBOTA, L.T.; *Quimica Nova*, 25,5,835-841, **2002**.

ALLEN, T.M.; HANSEN, C. ; MARTIN, F.; REDEMANN, C.; TAU-YOUNG, A.;
Biochem. Biophys. Acta 1066 (1), 29-36, **1991**.

ARYEH, F., *Singlet O₂*, vol1, 183-184, **2000**.

ATAMNA, H.; NGUYEN, A.; SCHULTZ, C.; BOYLE, K.; NEWBERRY, J.; KATO, H.;
AMES, J.N.; *Faseb J.*, oct ,**2007**.

BECK, C.; HARTL, W.; HEMPELMANN, R.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, 9,**1999**.

BAPTISTA, M.S. & POLITI, M.J.; *J.Phys.Chem.*, 95, 5936, **1991**.

BOURDON, O.; MOSQUEIRA, V.; LEGRAND, Ph.; *J. Photochem. Photobiol. (B):*
*Biol.*55, 164-171, **2000**.

BRADLEY, G., JURANKA, P.J.; LING, V.; *Biochim. Biophys. Acta*, 948, 87-112, **1988**.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54,
631-651, **2002**.

BRINKER, C.J. & SCHERER, G.W., *Sol-Gel Science*, Academic Press, New York, **1990**.

CABOT CORPORATION[®], Fabricação, Propriedades e funções da Sílica Pirogênica Cab-
O-Sil.[®]

CANDIDE, C.; MOLIERE, P.; GOLDSTEIN, S.; SANTUS,R.; DUBERTRET, L.; REYFTMAN, J.P; POLONOVSKI, J.; *FEBS Lett.* 207, 133-138, **1986**.

CASTANO, A.P.; DEMINOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R.; *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2**, 1—23, **2005**.

CUVIER, C.; ROBLLOT-TREUPEL, L.; MILLT, J.M.; LIZARD, G.; CHVILLARD, S; MANFAIT, M., COUVREUR, P.; POUPON, M.F.; *Biochem Pharmacol.*, 4; 44(3):509-17 **1992**.

DILLON, J.; KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; ROBERTS, J. E.; *Photochem. Photobiol*, 48, 235-238, **1988**.

FUJIMOTO, J. & Petri, D.F.S.; *Langmuir*,17,56, **2001**.

FUKUMORI, Y. & ICHIKAWA, H.; *Advanced Powder Technology*, vol 17, (1), pp. 1-28 **2006**.

GABRIELLI, D.S.; BAPTISTA, M.S.; KOWALTOWSKI, A.; SEVERINO, D.; BELISLE,E.; *Photochem. Photobiol.*, 77 (5), 227-232, **2004**.

GU, H.; XU, K.; YANG, Z.; CHANG, C. K.; XU, B. *Chem. Commun.* 4270, **2005**.

GUN'KO, M.; ZARKP, V. I. SHEERAN, D. J. ; BLITZ, J. P. ; LEBODA, R.; JANUSZ, W. ; CHIBOWSKI, S. ; *J. Colloid and Interface Sc.*, 252, 109-118, **2002**.

GUO,Z;, LIU, W.; LI, Y;, YU, J; *Journal of Macromolecular Science Part A- Pure and Applied Chemistry*, 42:221-230, **2005**.

HALLER, I.; *J. Am Chem Soc*, 100:26,20, **1978**.

HENDERSON, B.W. & DOUGHERTY, T.J.; *Photochem. Photchem.*, 55, 145-157, **1992**.

HODOSHIMA, N.; UDAGAWA, T.; FUKUYASU, H.; WATANABE, H.; NAKABAYASHI, S.; *International Journal of Pharmaceutics*, 146, 81-92, **1997**.

JORI, G.; REDDU, E.; COZZANI, I; TOMIO, L.; *British Journal of Cancer* 53, 615-621, **1986**.

JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M.; BAPTISTA, M. S., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4, 2320-2328, **2002**.

KESSEL, D.; *Science & Medicine*, 46-55, **1998**.

KIESSLICH, T.; PLAETZER, K.; OBERDANNER, C.; BERLANDA, J.; OBERMAIR, F.; KRAMMER, B.; *FEBS Letters*, 579, 185-190, **2005**

KIM, S.; OHULCHANSKY, T. Y.; PUDAVAR, H. E.; PANDEY, R. K.; PRASAD, P. N.; *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2669, **2007**.

KOCHEVAR, I.E.; LYNCH, M.C.; ZHYANG, S.G.; LAMBERT, C.R., *Photochem. Photobiol.*, 72, 548-553, **2000**.

KONAN, Y. N.; GRUNY, R.; ALLEMANN, E.; *J. Photochem. Photobiol., B*, 66, 89-106, **2002**.

LAVILLE, I.; FIGUEIREDO, T.; LOOCK, B.; PIGAGLIO S.; MAILLARD PH., GRIERSON, D.S.; CARREZ, D.; CROISY, A.; BLAI, J., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 1643-1652, **2003**.

LAWS, R.W. & CONTINO, B.P.; cap. 21, *Methods in Enzymology*, vol. 20, Academic Press, **1992**.

LI, J.& TAN, S.N.; *Anal. Lett.*, 33 (8), 1467-1477, **2000**.

LINGLER, S., RUBSTEIN, I.; KNOLL, W.; OFFENHAUSER, A. ; *Langmuir*, 13, 7085-7091, **1997**.

MACCRAITH, B.D.; MCDONAGH, C.M.; O'KEEFE, G.; MXEVOY, A.K.; BUTLER, T.; SHERIDAM, F.R., *Sensors and Actuators B*, vol.29, 51-57, **1995**.

MAEDA H.; *Journal of Controlled Release*, 19, 315-324, **1992**.

MAEDA H.; SEYMOUR, L.W.; MIYAMOTO, Y.; *Bioconjugate Chemistry*, 3, (5), 351-362, **1992**.

MALLOUK, E.T.; LEE, H.; HONG, H.; AKHTER, S.; *J. Phys. Chem.*, 92, 2597, **1987**.

MARTIN, C.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 11864-11865, **2002**.

MELLISH, K. J.; COX, R. D.; VERNON, D. I.; GRIFFITHS, J.; BROWN, S. B.; *Photochemistry and Photobiology*, 75(4), 392-397, **2002**.

MICHAUD, L.B., *Ann. Pharmacother.* 31, 1402-1404, **1997**.

MIOTTO, R.; CUNHA, J.F.R.; DA SILVA S.W.; SOLER, M.A.G.; MORAIS, P.C.; FERRAZ, A.C.; TADA, D. B.; PETRI, D.F.S.; BAPTISTA, M. S; *Applied Surface Science*, v.253, p. 1978-1982, **2006**.

MIOTTO, R.; SRIVASTAVA G.P.; FERRAZ, A.C.; *Phys Rev. B.*, 65, 75402, **2002**.

MITCHELL, D.T.; LEE, S.B.; TROFIN, L.; LI, N.; NEVANEN, T.K.; SÖDERLIND, H.; MARTIN, C.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 11864-11865, **2002**.

MOLNAR, A.; BULCSU, R.; *Current Organic Chemistry*, 10, 13, 30, 1697-1726, **2006**.

MONSON, E.; BRASUEL, M., PHILIBERT, M.A.; KOPELMAN, R.; *Biomedical Photonics Handbook*, capitulo 59, 59.1-59.14, CRC Pressm Boca Raton, FL, **2003**.

MOURA, S.P. & CARMONA-RIBEIRO, A.M.; *Langmuir*, 21,10160-10164, **2005**.

NEMATI, F.; DUBERET C.; FESSE, H.; COLIN de VERDIERE, A.; POUPON, M.F.;
PUISIEUX, F.; COUVREUR, P.; *International Journal of Pharmaceutics*, 138, 237
246, **1996**.

NOZAWA, K.; GAILHANOU, H.; RAISON, L.; PANIZZA, P.; USHIKI, H.; SELLIER,
E.; DELVILLE, J.P. ; DELVILLE, M.H. ; *Langmuir*, 21,1516-1523, **2005**.

OHULCHANSKY, T.Y.; ROY, I.; GOWSWAMI, L.N.; CHEN, Y.; BERGEY, E.J.;
PANDEY, R. K.; OSEROFF, A.L.; PRASAD, P.N.; *Nano Letters*, 9, 2835-2842,
2007.

ORTH, K.; RUCK, A.; STANESCU, A.; BEGER, H. G.; *Lancet* 345, 519-520, **1995**.

ORTH, K., RUSS, D.; BECK, G.; RUCK, A.; BERGER, H. G.; *Langenbeck's Arch. Surg.*
383, 276-281, **1998**.

PEREIRA, E.M.A.; PETRI, D.F.S.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; *J.PHYS.CHEM.B*, 106,
8762-8767, **2002**.

PARKÁNYI, C. & BONIFACE, C., *Spectrochimica Acta*, Vol. 49^a, 12,1715-1725, **1993**.

- QI, X. ; MAITANI, Y. ; NAGAI, T. ; WEI, S. ; *Int. J. Pharm.* 146, (1), 31-39, **1997**.
- RAPUANO, R. & CARMONA-RIBEIRO, A.M.; *Journal of Colloid and Interface Science*, 226, 299-307, **2000**.
- RESKA, R.; BECK, P.; FICHTNER,I.; HENTSCHEL, M.; RITCHER, J., KREUTER, J.; *J. Pharmacol. Exper.Therap.*, 280(1), 232-237, **1996**.
- RICCI-JÚNIOR, E. & MARCHETTI, P.M.; *International Journal of Pharmaceutics*, 310, 187–195, **2006**.
- RODRIGUES, M. A.; BEMQUERER,M; TADA, D.B.; POLITI, M. J.; BAPTISTA, M. S.; Bastos, E.L; *Adsorption-Journal of the International Adsorption Society*, Netherlands, v.11,n.5-6,p.59,602,**2005**.
- RODRIGUES, M. A.; TADA, D.B.; BAPTISTA, M. S.; BROCHSZTAIN, S.; POLITI, M. J.; *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.304, p.116 - 125, **2002**.
- RODRIGUES, M.A.; PETRI, D.F.S.; POLITI, M.J.; BROCHSZTAIN, S.; *Thin Solids Films*, 371,109, **2000**.
- ROHATGI-MUKHERJEE, K.K.; *Fundamentals of Photochemistry*, New Age International limited publishers, **1986**.
- RONINSON, I.B.; *Clin. Physiol. Biochem.*, 5, 140- 151, **1987**.
- ROSSI, L.M.; LIFANG, S. ;QUINA, F.H.;ROSENWEIGH, Z.; *Langmuir*, 21 (10), 4277 - 4280, **2005**.
- ROUSER, G.; FLEISCHER, S.; YAMAMMOTO, A.; *Lipids*, vol. 5, n°5, **1969**.
- ROY, I.; OHULCHANSKY, T. Y.; PUDAVAR, H. E.; BERGEY, E. J.; OSEROFF, A.

R.; MORGAN, J.; DOUGHERTY, T. J.; PRASAD, P. N. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 7860.; **2003**

SANTOS, N.C.& CASTANHO, M.A.R.B., *Química Nova*, vol.25, nº6B, 1181-1185, **2002**.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, C.C.; MORRIEL, C. T.; *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*, Guanabara Koogan, **1994**.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N., *Química Nova*, vol.25, nº5, 801-807, **2002**.

SINGHAL, G.S. & RABINOWITCH, E.; *Journal of Physical Chemistry*, Vol 71, 10, 3347-3349, **1967**.

STÖBER, W.& Fink, A.; *Journal of Colloid and Interface Science* 26, 62-69, **1968**.

SURANITI, E.; TUMOLO, T.; BAPTISTA, M.S.; LIVACHE, T.; CALEMCZUK, R.; *Langmuir*, 23, 6835-6842, **2007**.

TADA, D. B.; VONO, L.L.R.; DUARTE, E. L.; ITRI, R.; KIYOHARA, P. K.; BAPTISTA, M. S.; ROSSI, L.M. ; *Langmuir*, 23, 8194-8199, **2007**.

TAILLEFER, J. ; BRAUSSER, N. ; VAN LIER, J. ; LENEARTES, V. ; LE GARREC, D. ; LEROUX, J.C. ; *J.Pharm.Pharmacol.*, 53, 155-166, **2001**.

TANG, W.; X, H.; KOPELMAN, R.; PHILBERT, M. A. *Photochem. Photobiol.*, 81, 242, **2005**.

TARDIVO, JP; DEL GIGLIO, A.; PASCHOAL, L.H.; ITO, A.S; BAPTISTA, M.S.;
Photodiagnostic Photodynamic Therapy,1:345—6, **2004**.

TARDIVO, J.P., DEL GIGLIO,A., DE OLIVEIRA,C.S., GABRIELLI, D.S.,
JUNQUEIRA,H.C. TADA,D.B., SEVERINO, D., TURHIELLO, R.F.,
BAPTISTA, M.S. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3):165-238, 2005.

THIERRY, A.R., DRITSCHILO, A.; RAHAMAN, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
187 1098-1105, **1992**.

URIZZI, P. ; ALLEN, C. M. ; LANGLOIS, R. ; OUELLET, R. ; LA MADELEINE, C. ;
VAN LIER, J.E., *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 5: 154—160, **2001**.

VARGAS, A. ; PEGAZ, B. ; DEBEFVE, E. ; KONAN-KOUAKOU, Y. ; LANGE, N. ;
BALLINI, J.P. ; VAN DEN BERGH, H. ; GURNY, R. ; DELIE, F. ; *International
Journal of Pharmaceutics*, 286, 131—145, **2004**.

VRANKEN,K.C. ; POSSEMIERS, K. ; DER VOORT, V. ; VANSANT, E.F. ; *Colloids
and Surfaces A : Phys. Eng. Asp.* 98, 235-241, **1995**.

XU, H.; AYLOTT, J. W. ; KOPELMAN, R. ; MILLER, T. J. ; PHILIBERT, M. A. , *Anal.
Chem.*, 73, 4124-4133, **2001**.

YU, C.L.; XU, S.J.; CHEN, S.; ZHANG, M.; SHEN, T., *J. Photochem. Photobil. B*, 68,73-78,
2002.

WAGNER S.J., SKRIPCHENKO, A.; ROBINETTE, D.; FOLEY, J.W.; CINCOTTA, L.;
Photochemistry and Photobiology, 67 (3), 343-349, **1998**.

WANWRIGHT, M., *Chem. Soc. Reviews*, 351-359, **1996**.

WARREN, L., JARDILLIER, J.C., MALARSKA, A; AKELI, M.G., *Cancer Res.*, 52 3241
3245, **1992**.

WIEDER, M.E.; HONE, D.C.; COOK, J.M.; HANDSLEY, M.M.; GAVRILOVIC, J.;
RUSSEL, D.A.; *Photochem. Photobiol. Sci.*, 5, 727-735, **2006**.

WILKINSON, F.; HELMAN, W.P.; ROSS,A.B.; *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 22, 1, 113-262,
1993.

ZENKEVICH, E.; SAGUN, E.; KNYUKSHTO, V.; SHULGA, A.; MIRONOV, A.;
EFREMOVA, O.; BONNET, R.; SONGCA, S. P.; KASSEM, M.; *J. Photochem.*
Photobiol. B, 33, 171, **1996**.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)