

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Química

**PAULO ROGÉRIO DA SILVA**

**Estudo da imobilização de porfirinas em sílica  
nanoparticulada e da sua interação com  
oxigênio e ferro: possíveis aplicações  
biomédicas e analíticas**

São Paulo  
Data do Depósito na SPG:  
03/11/2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

PAULO ROGÉRIO DA SILVA

**Estudo da imobilização de porfirinas em sílica  
nanoparticulada e da sua interação com  
oxigênio e ferro: possíveis aplicações  
biomédicas e analíticas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Química (Química Analítica).*

*Orientadora: Profa. Dra. Liane Márcia Rossi*

São Paulo  
2008

Paulo Rogério da Silva

**Estudo da imobilização de porfirinas em sílica nanoparticulada e da sua interação com oxigênio e ferro: possíveis aplicações biomédicas e analíticas**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química (Química Analítica).*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

A meus pais, Paulo e Joelina por todo amor e carinho e por acreditarmos sempre que tudo é possível para quem tem fé.

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial à professora Liane Márcia Rossi, não só pelos conselhos e pela orientação acadêmica, mas sim pela amizade, compreensão, paciência e respeito, sempre disposta a ajudar em qualquer situação, e se não fosse sua valiosa presença em todas as etapas deste trabalho, o mesmo jamais teria se concretizado.

Aos professores Breno Pannia Espóstio e Maurício da Silva Baptista pela valiosa colaboração em meu trabalho.

Ao professor Pedro K Kiyohara (IF-USP) pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos amigos Adjaci U. Fernandes, Dayane B. Tada e Lucas L. R. Vono, por me auxiliarem em experimentos e compartilhar seus conhecimentos.

A todos os colegas e técnicos do laboratório pelos bons momentos que passamos juntos.

A todos os amigos da Oficina Pedagógica da Diretoria de Ensino Campinas Leste, em especial Dilma Soares Nichiama, por todo carinho, apoio e afeto.

Às minhas irmãs Juliana Correia da Silva, Rosângela Maria Correa e meu grande amigo Márcio Kugelmeier por todo apoio e compreensão.

Ao Governo do Estado de São Paulo - Secretaria de Estado da Educação pela Bolsa Mestrado.

À FAPESP e ao CNPQ, pelo financiamento à pesquisa.

“...pois não há nada de escondido que não venha a ser revelado, e não existe nada oculto que não venha a ser conhecido.”

Mateus, 10, 26

## RESUMO

Silva, P.R. **Estudo da imobilização de porfirinas em sílica nanoparticulada e da sua interação com oxigênio e ferro: possíveis aplicações biomédicas e analíticas**. 2008. (81p). Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O presente estudo teve por objetivo desenvolver metodologias para imobilização de sondas moleculares fluorescentes em matrizes de sílica de tamanho controlado, bem como estudar a interação das sondas livres e imobilizadas com oxigênio e ferro. A classe de fluoróforos escolhida foi a das porfirinas, que apresentam baixa solubilidade em água e têm seu uso limitado, apesar de apresentarem pelo menos duas propriedades interessantes: (i) interagem com oxigênio formando oxigênio singlete, sendo candidatas a drogas para terapia fotodinâmica, e (ii) têm sua fluorescência suprimida ao complexarem metais, podendo atuar como sondas fluorescentes. A imobilização de porfirinas em esferas de sílica de tamanho inferior a 100 nm foi realizada através de um processo sol-gel ou pelo uso de microemulsões. O método sol-gel exigiu a modificação prévia da molécula da porfirina com reagente organossilano e resultou em esferas na faixa de 70 nm. O método da microemulsão dispensou a modificação da porfirina e resultou em esferas na faixa de 30 nm, muito estáveis em água. Os fluoróforos imobilizados preservaram suas propriedades óticas e a sua capacidade de gerar oxigênio singlete. Os estudos envolvendo a detecção de oxigênio singlete foram realizados pelo método físico direto, a partir do registro da fosforescência característica no infravermelho-próximo, e pelo método químico indireto usando a sonda 1,3-difenilisobenzofurano. O tempo de vida do oxigênio singlete obtido quando uma suspensão, em acetonitrila, de esferas de sílica carregadas com porfirinas foi excitada em 532 nm foi de 52  $\mu$ s e está de acordo com o valor determinado para uma solução padrão contendo azul de metileno sob as mesmas condições. As porfirinas imobilizadas em sílica apresentaram eficiência de geração de oxigênio singlete similar ou até superior ao rendimento quântico das porfirinas livres. Após estudos concluiu-se que a elevada geração de oxigênio singlete pode ser atribuída a mudanças no equilíbrio monômero-dímero após a imobilização das porfirinas na matriz de sílica. O emprego das porfirinas imobilizadas em esferas de sílica como sondas fluorescentes para detecção de ferro também foi investigado. Estudos da interação da hematoporfirina IX livre e imobilizada com ferro apresentaram sítios de forte e fraca interação de acordo com a faixa de concentração de ferro utilizada. A supressão da fluorescência da Hp IX livre e imobilizada em sílica obedece a um comportamento linear na faixa de concentração de ferro de 0 a 60  $\mu$ M. Portanto, a imobilização de porfirinas em nanoesferas de sílica permitiu a dispersão de porfirinas insolúveis em água e manteve as moléculas acessíveis ao oxigênio molecular e aos íons ferro, preservando suas propriedades e ampliando a possibilidade de aplicações.

**Palavras-chave:** porfirinas, nanomateriais, sílica, oxigênio singlete, ferro.



## ABSTRACT

Silva, P.R. **Study of the immobilization of porphyrins in silica nanoparticles and their interaction with oxygen and iron: possible biomedical and analytical applications.** 2008. (81p). Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The present study is focused on developing methodologies for the immobilization of fluorescent molecular probes in size controlled silica matrixes, and studying the interactions of free and entrapped molecules with molecular oxygen and iron. This study was based on porphyrins, a class of compounds with low solubility in water and limited use, but with at least two very interesting properties: (i) interaction with molecular oxygen to yield singlet oxygen, potential drug for use in photodynamic therapy; and (ii) fluorescence quenching by metal ions, potential fluorescent probe. The immobilization of porphyrins in silica spheres of size < 100 nm was achieved by the sol-gel or microemulsion approach. The sol-gel method required the modification of porphyrin molecules with an organosilane reagent and resulted in spheres of about 70 nm. The microemulsion method did not require the modification of porphyrin molecules and resulted in spheres of about 30 nm, very stable in aqueous solution. The immobilized porphyrins preserved their optical properties and the capacity to generate singlet oxygen. Singlet oxygen was detected by a direct method from its characteristic phosphorescence decay curve at near-infrared and by a chemical method using 1,3-diphenylisobenzofuran to trap singlet oxygen. The lifetime of singlet oxygen, when a suspension of porphyrin-loaded silica spheres in acetonitrile was excited at 532 nm, was determined as 52  $\mu$ s, which is in good agreement with the value determined for a standard methylene blue solution under the same conditions. The porphyrin-loaded silica spheres have an efficiency of singlet oxygen generation similar or even higher than the quantum yield of free porphyrins. This high efficiency of singlet oxygen generation was attributed to changes on the monomer-dimer equilibrium after photosensitizer immobilization in the silica matrix. The use of the immobilized porphyrins as fluorescent probes for iron sensing was also investigated. The interaction of free and silica immobilized hematoporphyrin IX with iron resulted in sites of strong and weak interaction according to the concentration range. The fluorescence quenching of Hp IX, free and immobilized in silica spheres follows a linear correlation with the iron concentration from 0 to 60  $\mu$ M. In conclusion, the immobilization of porphyrins in silica nanospheres allowed the dispersion of insoluble porphyrins in water, while preserving the accessibility to molecular oxygen and metal ions and broadening the scope of applications.

**Keywords:** porphyrins, nanomaterials, silica, singlet oxygen, iron.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\lambda_{em}$ : Comprimento de onda de emissão

$\lambda_{exc}$ : Comprimento de onda de excitação

$^1O_2$ : Oxigênio singlete

**AOT**: Sulfosucinato dioctílico sódico

**APTES**: 3- aminopropiltriétoxisilano

**CIS**: Cruzamento Inter Sistemas

**DMF**: Dimetilformamida

**DPBF**: 1,3-difenil-isobenzofurano

**Dtpa**: Ácido dietilenotriaminopentaacético

**FAS**: Sulfato ferroso amoniacal

**FITC**: Isotiocianato de fluoresceína

**Fs**: Fotossensibilizador

**HBS**: Solução tampão salina de HEPES

**Hp IX**: Hematoporfirina IX

**IV**: Infravermelho

**MET**: Microscopia eletrônica de transmissão

$n_{\Delta}$ : Eficiência de geração de oxigênio singlete

$n_{\Delta_{particula}}$ : Eficiência de geração de oxigênio singlete de fotossensibilizador  
imobilizado em partículas

**PDT**: Terapia fotodinâmica

**PM**: Fotomultiplicadora

**Pp IX**: Protoporfirina IX

**RMN:** Ressonância magnética nuclear

***t*:** Tempo de decaimento da sonda DPBF pela reação com o oxigênio singlete

**TEOS:** Tetraetilortosilicato

**$\Phi_{\text{DPBF}}$ :** Rendimento quântico da foto-reação da sonda DPBF

**$\Phi_{\Delta}$ :** Rendimento quântico de oxigênio singlete

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1 Geral .....	30
2.2 Específicos.....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Materiais .....	31
3.2 Métodos .....	31
3.2.1 Funcionalização da Pp IX com grupos alcoxilanos.....	31
3.2.2 Preparação de esferas de sílica carregadas com Protoporfirina IX pelo processo sol-gel .....	32
3.2.3 Preparação de esferas de sílica carregadas com Hematoporfirina IX pelo processo da microemulsão .....	32
3.3 Caracterização Estrutural do dimetil-8,13divinil-3,7,12,17-tetrametil- 21H,23H-porfirina-2,18-dipropil-amidopropiltriétoxisilano .....	33
3.4 Equipamentos e Dispositivos .....	34
3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	34
3.4.2 Espectroscopia eletrônica .....	34
3.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	34
3.4.4 Medidas de Fluorescência .....	34
3.4.5 Espalhamento de luz .....	35
3.5 Detecção de $^1\text{O}_2$ .....	35
3.5.1 Determinação de $^1\text{O}_2$ pelo método direto.....	35
3.5.2 Determinação de $^1\text{O}_2$ pelo método indireto.....	36
3.5.3 Determinação do rendimento quântico do $^1\text{O}_2$ .....	39
3.6 Detecção de ferro .....	40

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
4.1 Síntese e caracterização de esferas de sílica contendo porfirinas .....	42
4.1.1 Método sol-gel .....	42
4.1.2 Método da Microemulsão.....	48
4.2. Estudo da interação de porfirinas imobilizadas em esferas de sílica com oxigênio molecular .....	52
4.2.1. Caracterização do <sup>1</sup> O <sub>2</sub> gerado por foto-excitação de porfirinas imobilizadas .....	53
4.2.2. Estimativa da eficiência de entrega de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> gerado por foto- excitação de porfirinas imobilizadas .....	56
4.3 Estudo da interação de porfirinas livres e imobilizadas em esferas de sílica com ferro .....	65
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>71</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>
<b>ANEXO A - SÚMULA CURRICULAR</b> .....	<b>81</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de Jablonski simplificado.....	27
Figura 2 Representação esquemática da matriz de sílica porosa e permeável à entrada de oxigênio e saída de oxigênio singlete. ....	28
Figura 3 Representação esquemática do sistema de emissão no infravermelho para detecção de oxigênio singlete por pulso de laser .....	36
Figura 4 Representação da reação do DPBF com oxigênio singlete e formação de endoperóxido. ....	37
Figura 5 Síntese do dimetil-8,13divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropil-amidopropiltriétoxissilano.....	43
Figura 6 Espectro eletrônico de absorção de soluções de diclorometano: (a) Protoporfirina IX; (b) Protoporfirina IX-sililada.....	45
Figura 7 (a) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das esferas de sílica contendo Pp IX preparadas por sol-gel e (b) Histograma de distribuição de tamanho de partículas.....	46
Figura 8 Espectro de absorção de (a) Pp IX-sililada em solução de diclorometano e (b). suspensão de esferas de sílica carregadas com Pp IX em diclorometano Detalhe: Espectro de absorção da (a') Pp IX-sililada em solução aquosa e (b') suspensão de esferas de sílica carregadas com Pp IX em solução aquosa.....	47
Figura 9 Espectro de emissão da Pp IX-sililada em solução aquosa (a) e esferas de sílica carregadas com Pp IX em solução aquosa (b) para as amostras excitadas em 500 nm. ....	48
Figura 10 Fórmula estrutural da molécula da Hematoporfirina IX.....	49
Figura 11 (a) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das esferas de sílica contendo Hp IX preparadas por microemulsão (b) Histograma de distribuição de tamanho de partículas. ....	50
Figura 12 Espectro de absorção de (a) Hp IX livre em solução aquosa e (b) uma suspensão de esferas de sílica carregadas com Hp IX em solução aquosa. ....	51

Figura 13	Espectro de emissão de (a) Hp IX livre em solução aquosa (b) uma suspensão de esferas de sílica carregadas com Hp IX em solução aquosa, para as amostras excitadas em 500 nm. ....	52
Figura 14	Espectro de emissão gerado após fotoexcitação em 532 nm de uma suspensão de esferas de sílica contendo Pp IX preparadas por sol-gel em acetonitrila. ....	54
Figura 15.	Espectro de emissão gerado após fotoexcitação em 532 nm de uma suspensão de esferas de sílica contendo Hp IX preparadas por microemulsão em acetonitrila. ....	54
Figura 16	Transiente de emissão em 1270 nm obtido após fotoexcitação em 532 nm, de uma suspensão de esferas de sílica contendo Pp IX em acetonitrila.....	55
Figura 17	Transiente de emissão em 1270 nm obtido após fotoexcitação em 532 nm, de uma suspensão de esferas de sílica contendo Hp IX em acetonitrila.....	55
Figura 18	Espectro de absorção do DPBF na presença de esferas de sílica carregadas com Pp IX preparadas por sol-gel, em acetonitrila, após diferentes tempos de irradiação com laser de 532nm.....	57
Figura 19	Espectro de absorção do DPBF na presença de esferas de sílica carregadas com Hp IX preparadas por microemulsão, em acetonitrila, após diferentes tempos de irradiação com laser de 532nm.....	57
Figura 20	Absorção da Pp IX em 424 nm como função do tempo de irradiação em 532 nm. ....	58
Figura 21	Absorção de DPBF em 424 nm como função do tempo de irradiação em 532 nm. ....	59
Figura 22	Curva de decaimento da absorção da DPBF em 424 nm na presença de esferas de sílica carregadas com Pp IX preparadas por sol-gel como função do tempo de irradiação com laser de 532nm.....	60
Figura 23	Curva de decaimento da absorção da DPBF em 424 nm na presença de esferas de sílica carregadas com Hp IX preparadas	

por microemulsão como função do tempo de irradiação com laser de 532nm. ....	60
Figura 24 Curva de supressão de fluorescência de uma solução contendo Hp IX livre e ferro nas concentrações 0, 7, 21 e 64 $\mu\text{M}$ . ....	66
Figura 25 Curva de supressão de fluorescência de uma suspensão de esferas de sílica contendo Hp IX e ferro nas concentrações 0, 7, 21 e 64 $\mu\text{M}$ . ....	66
Figura 26 Curva do decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX livre (1,12 $\mu\text{M}$ ) com concentrações de ferro na faixa de 0 a 320 $\mu\text{M}$ após 20 min. de reação.....	67
Figura 27 Curva do decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX imobilizada em sílica com concentrações de ferro na faixa de 0 a 320 $\mu\text{M}$ após 20 min. de reação.....	68
Figura 28 Curva do decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX livre (7,14 $\mu\text{M}$ ) com concentrações de ferro na faixa de 0 a 60 $\mu\text{M}$ após 20 min. de reação ( $R^2=0,991$ ). ....	69
Figura 29 Curva do decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX imobilizada em esferas de sílica com concentrações de ferro na faixa de 0 a 60 $\mu\text{M}$ após 20 min. de reação ( $R^2=0,999$ ). ....	69
Figura 30 Supressão e recuperação da fluorescência de amostras de Hp IX livre e Hp IX imobilizada em esferas de sílica com adição de ferro e posterior adição do quelante dtpa. ....	70



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo de decaimento da sonda DPBF em presença do Pp IX e azul de metileno.....	62
Tabela 2. Tempos de decaimento da sonda DPBF e eficiência de entrega de $^1\text{O}_2$ .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

Em investigações na área biológica e biomédica, o domínio da amostra é reduzido a dimensões micro ou sub-micrométricas, como por exemplo, as células vivas e seus sub-compartimentos, onde a medida em tempo real dos parâmetros físicos e químicos com elevada resolução espacial e pequena perturbação da amostra torna-se essencial (Buck et al, 2004).

Neste contexto, a detecção de espécies, por exemplo, cálcio, potássio e oxigênio; em domínios micrométricos é uma tarefa desafiadora considerando a complexidade do meio biológico e as possíveis interferências. Tradicionalmente, a detecção por sistemas óticos ou eletroquímicos consegue minimizar a interferência química pelo uso de matrizes ou interfaces inertes miniaturizadas (Lu, J; Rosenzweig, Z, 2000). Porém, quando a questão é penetrar células individuais, mesmo a introdução de sondas micrométricas pode causar danos biológicos. Por um lado, o uso de sondas moleculares não deve causar dano físico, porém está susceptível à interferência química com os componentes celulares, como por exemplo, ligação com proteínas, que podem mascarar resultados (Clark, H. A, 1999).

A minimização das interações entre células e as sondas são um objetivo comum para o desenvolvimento de novos sensores (Buck et al, 2004). Para se realizar uma análise intracelular não invasiva, o sensor deve ser cerca de 100 vezes menor que as células a serem analisadas e para

impedir a citotoxicidade após a inserção do sensor dentro da célula, os mesmos devem ser isoladas do ambiente celular através de uma matriz biocompatível seletiva. Além disso, sensores fluorescentes miniaturizados podem ser utilizados para medidas em sítios intracelulares específicos, uma vez que os problemas associados com a heterogeneidade do ambiente celular e da distribuição da sonda fluorescente na célula são eliminados (Lu, J; Rosenzweig, Z, 2000). O campo de sondas fluorescente para este tipo de análise tem crescido continuamente ao longo dos últimos 20 anos, resultando em uma variedade de sondas fluorescentes permeáveis às células. Digno de nota são as numerosas sondas fluorescentes para medida de pH intracelular e íons cálcio livre (Johnson, I; De Silva, A; Eilers, J; Zlokarnik, G, 1998). Em 1997, Shalom e colaboradores relataram o primeiro caso bem sucedido de desenvolvimento de um sensor fluorescente sub-micrométrico para íons cálcio em solução aquosa. Este foi baseado em um puxador de micropipeta, preenchido com um vidro condutor poroso sol-gel que foi dopado com corante fluorescente (cálcio verde-1). O sensor foi utilizado para estimar concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos de ratos. Em 1998, Xin e Wightman conjugaram dextrina com cálcio verde-1 para imobilizar na ponta miniaturizada de um eletrodo de carbono e produziram um microsensor duplo para medidas de íons cálcio e catecolamina simultaneamente. Em 1998, Tan inseriu sondas óticas em células para monitorar o nível de flutuações de íons cálcio durante a estimulação celular.

O emprego de sensores com tamanho na escala nanométrica são ideais para minimizar interferências no monitoramento invasivo de células

(Qhobosheane, M. et al, 2001.; Vo-Dish, T. et al, 2001.;Cullum, B, M.; Stokes, D. L.; 2001.; McNamara, K. P. et al, 2001.; Clark, H. A. et al, 1999.; Brassuel, M. et al, 2001; Xu, H. et al, 2001). O emprego de uma única nanopartícula fluorescente com um sensor ótico foi demonstrado pela primeira vez por Sasaki e colaboradores em 1996. O corante fluoresceína foi imobilizado em nanopartículas de poliacrilamida e utilizado para medir a distribuição de pH em uma interface água-vidro. O recente desenvolvimento de sensores nanométricos denominados PEBLLES (do inglês Probes Encapsulated By Biologically Localized Embedding) por Kopelman e colaboradores, prevê uma metodologia não invasiva que é aplicável para medidas celulares. Estes sensores têm sido preparados para potássio (Brassuel, M. et al, 2001), magnésio (Park, E. J. et al, 2003), zinco (Sumne, J. P. et al, 2002), cálcio (Clark, H. A. et al, 1998) e oxigênio (Xu, H. et al 2001). Estes pequenos dispositivos esféricos com diâmetro menor que 200 nm são ideais para medidas celulares porque causam pouca perturbação física. Adicionalmente, o pequeno tamanho permite uma resposta rápida e maior resolução espacial, pois permite fácil subtração da fluorescência de fundo em uma área de foco limitada.

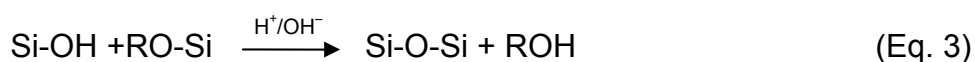
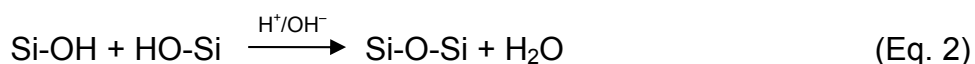
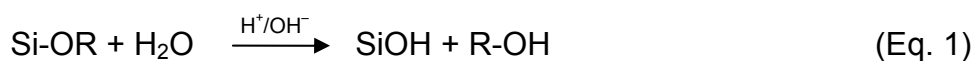
Surge então o desenvolvimento de uma área de pesquisa que utiliza matrizes sólidas; por exemplo, sílica, polímeros, metais, etc., em escala nanométrica para a imobilização de sondas moleculares (Monson, E. et al, 2003.; Tan, W. et al, 2004). A matriz serve como uma capa protetora para o fluoróforo e minimiza a interferência, por exemplo, ligação com proteínas ou organelas, que inevitavelmente alterariam a resposta da sonda fluídica. Além

disso, abre a possibilidade do uso de sondas potencialmente tóxicas ou mesmo hidrofóbicas em meio celular, uma vez que esta estará protegida ou isolada na matriz do nanomaterial. Uma matriz bastante empregada é a sílica na forma de nanoesferas ou microesferas contendo sondas para aplicações bioanalíticas (Tan, W. et al, 2004).

Materiais nanométricos têm encontrado aplicações nas mais diversas áreas, como odontologia, cosmética, medicina, terapia e diagnóstico de câncer, entre outras. Assim, uma grande variedade de metodologias de síntese de nanopartículas e nanocompósitos está sendo desenvolvida. O material escolhido, bem como o método de síntese, depende do tamanho, das características da superfície e da aplicação das partículas que se pretende obter (Tada, D. B, 2007). Métodos envolvendo reações sol-gel podem ser utilizados para preparação de novos materiais híbridos principalmente para aplicações em sistemas óticos onde são requeridas grandes homogeneidade e transparência dos materiais (Wen, J; Wilkes, G. L, 1996).

Para obtenção de nanopartículas de sílica, destacam-se as reações sol-gel que ocorrem a partir de precursores inorgânicos do tipo  $R'Si(OR)_3$  em que R` pode ser igual a OR ou, alternativamente, ser um grupo orgânico não hidrolisável. As reações envolvidas neste processo são a hidrólise (equação 1), em meio ácido ou básico, na qual os grupos OR são substituídos por grupos silanol (Si-OH). Estes grupos silanol podem reagir entre si, (equação 2) ou com outros grupos OR (equação 3) através de reações de condensação formando ligações siloxano, dando origem a uma rede

tridimensional de sílica. À medida que a condensação vai ocorrendo o solvente fica retido no interior dos poros da estrutura, e obtém-se um gel que se torna progressivamente mais denso (Krishnamoorti, R; Vaia, R. A; Giannelis, E. P, 1996)



A morfologia e tamanho das partículas são controlados durante o processo de síntese e as características finais dos nanocompósitos são influenciadas por vários parâmetros experimentais, tais como a concentração relativa dos reagentes ou o pH. O compósito resultante pode ser disperso em solventes orgânicos e processado, por exemplo, para preparar filmes poliméricos (Schottner, G; 2001). Existem disponíveis no mercado diversos precursores inorgânicos de  $\text{SiO}_2$ , como por exemplo, o tetraetoxissilano ou tetraetilortossilicato (TEOS), que por hidrólise controlada origina partículas inorgânicas de  $\text{SiO}_2$  de elevada pureza (Kickelbick, G; 2003). Os tetraalcoxissilanos são freqüentemente usados, pois tendem a formar uma rede tridimensional de sílica altamente ramificada, que resulta em nanocompósitos mais densos e resistentes. A metodologia desenvolvida por Stöber e seus colaboradores em 1968 empregam TEOS e hidróxido de amônio em meio alcoólico e leva à preparação de sílica esférica de tamanho controlado. Este método também foi empregado para a imobilização de sondas fluorescentes em esferas de sílica na faixa de 100 a 800 nm (Rossi, L. M. et al; 2005). Os trialcoxissilanos do tipo  $\text{R}'\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$  em regra, não

formam uma rede tão densa, mas têm sido também utilizados na preparação de híbridos com matrizes poliméricas. Uma vez que o grupo R' não é hidrolisável, fica livre para reagir quimicamente. Estes organosilanos são empregados também para funcionalizar a superfície de sílica para o ancoramento de biomoléculas ou moléculas direcionadoras (Rossi, L. M. et al, 2006; Santra, S. et al, 2001; Bagwe, R. P. et al, 2003; Schuetz, W. et al, 2002; Zhao, X. et al, 2003; Tapeç, R. et al, 2002; He, X. et al, 2003; Zhao, X. et al, 2004).

Métodos envolvendo microemulsões também têm sido utilizados na preparação de nanoesferas de sílica. Microemulsões podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo-água (Friberg, S. E; Bothorel, P, 1988; Constantinides, P. P. et al, 1994, 1995, 1996; Lee, M. et al, 1995; Ho, H. et al, 1996; Lawrence, M. J, 1996; Dalmora, M. E; Oliveira, A. G, 1999). Entretanto, a possibilidade de formar uma microemulsão depende do balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada não somente pela sua estrutura química, mas também por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença de co-tensoativo. A mistura de tensoativos com equilíbrio hidrófilo-lipófilo adequado proporciona a condição máxima de “solubilização” do óleo e da água (Formariz, T. P. et al, 2005). Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e, quando necessário, o co-tensoativo (Lawrence, M.

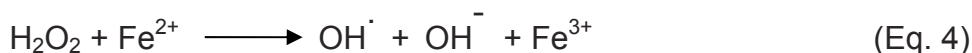
J, 1996; Dalmora, M. E; Oliveira, A. G, 1999), sendo que a formação de sistemas óleo/água ou água/óleo é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções tensoativo e co-tensoativo, e entre as proporções água e óleo (Constantinides, P. P. et al., 1994). A principal característica desses sistemas é formar uma emulsão muito fina, cujas dimensões das gotículas da fase interna são da ordem de nanômetros. As microemulsões são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, possuindo tempo de vida útil muito mais amplo (Constantinides, P. P. et al, 1995; Dalmora, M. E; Oliveira, A. G, 1999). Em geral, partículas de sílica sintetizadas através do processo da microemulsão apresentam uma estreita distribuição de tamanho com valor médio entre 25 e 70 nm (Chang, C; Fogler, H. S, 1997). O controle da morfologia nessas dimensões é melhor via microemulsão do que pelo processo sol-gel clássico. Muitos exemplos do emprego de matrizes de sílica para obtenção de nanopartículas (via microemulsão ou sol-gel) são encontrados na literatura. Por exemplo, Blaaderen e colaboradores, ligaram covalentemente o isotiocianato de fluoresceína (FITC) com o 3-aminopropiltriétoxissilano e a incorporaram com sucesso dentro de uma matriz de sílica (Van Blaaderen, A; B; Vrij, A, 1992). Wang e Tan (2006) criaram nanopartículas de sílica dopadas com três diferentes corantes orgânicos, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina 6G (R6G) e 6-



carboxil-X-rodamina (ROX) para uso em transferência da energia por ressonância (FRET). Deng e colaboradores (2006) doparam uma matriz de sílica com um corante fluorescente no infravermelho-próximo, o azul de metileno, e as nanoesferas de sílica foram funcionalizadas com o anticorpo como um marcador para câncer. Zhao e colaboradores (2004) doparam nanopartículas de sílica com Rubpy e modificaram as superfícies com um anticorpo específico para *E. coli 0157.H7*, o que levou ao aumento do limite de detecção para uma única bactéria. He e colaboradores (2004) prepararam nanopartículas de sílica dopadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) marcadas com anticorpo HAb 18 para câncer de fígado, permitindo que as células cancerosas do fígado fossem facilmente distinguidas das outras células. Santra e colaboradores (2004) também realizaram imagens de células usando nanoesferas de sílica dopadas com FITC preparadas via microemulsão. Outros corantes fluorescentes como o tetrametilrodamina e Alex Fluor 647 foram encapsulados com sucesso em nanopartículas de sílica (Yan, J. et al, 2007). De fato, uma grande variedade de nanosensores fluorescentes tem surgido na literatura utilizando fluoróforos dopados em matrizes de sílica para a detecção de pH,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}_2$ , NO e glicose (Monson, E. et al, 2003).

A detecção de metais de transição; por exemplo, Zn, Cu, Fe, e mesmo metais pesados; por exemplo, Hg, Pb, Cd, em sistemas celulares usando sondas moleculares fluorescentes também tem recebido atenção (Domaille D. W. et al, 2008). Metais de transição são essenciais em ambientes biológicos e permitem as diversas funções de enzimas, como

transferência de cargas, metabolismo e catálise (Sumner, J. P; Kopelman, R; 2005). Espécies de grande importância a serem detectadas em células vivas e em fluidos biológicos são as várias formas lábeis de ferro. A aplicação de sondas fluorescentes como ferramentas analíticas para avaliar ferro lábil, mecanismos de transporte de ferro e a eficiência de ferro quelante em solução e sistemas biológicos foram reportados (Espósito, B. P. et al, 2002). O ferro é um íon metálico integrante em vários processos fisiológicos envolvendo transferência de elétrons e oxidação. Numerosas enzimas usam ferro como um co-fator para hidroxilação, transporte de oxigênio, síntese de DNA, hidrólise e etc (Sumner, J. P; Kopelman, R; 2005). A atividade redox do ferro lhe permite participar em múltiplas funções enzimáticas, porém pode ser prejudicial e catalisar a formação de radicais (Keyer, K; Imlay, J. A; 1996) através da reação de Fenton (equação 4).



Esta dualidade do ferro, podendo ser benéfico e citotóxico, tem conduzido a uma série de estudos da homeostase de ferro. Por ter um papel vital em uma série de proteínas, a deficiência de ferro durante as fases de desenvolvimento pode levar a perda irreversível das aptidões motoras e tem sido associada às alterações comportamentais em ratos. O acúmulo de ferro no sistema nervoso central tem sido associado com uma série de doenças. Estas incluem doença de Huntington, Parkinson e Alzheimer, todas correlacionadas com o aumento do volume de ferro no cérebro (Burdo, J. R; Connor, J. R, 2003). Radicais hidroxila produzidos por ferro têm sido considerados a principal causa dos sintomas associados a estas doenças

(Keyer, K; Imlay, J. A, 1996; Crichton, R. R, 2002; Lubec, G, 1996). Na verdade, durante a isquemia, a imobilização de ferro com a conseqüente geração de radical tem sido demonstrada como a principal causa de danos ao coração (Sumner, J. P; Kopelman, R; 2005).

Os métodos para determinação de ferro incluem as técnicas colorimétricas e mais comumente, as técnicas de absorção atômica e emissão atômica por plasma indutivamente acoplado em associação à espectroscopia de massas (ICP-MS). Ambos medem ferro total e destroem a amostra (Szpunar, J. 2000). O desenvolvimento de corantes fluorescentes tem permitido medidas *in situ* de ferro lábil (LIP, do inglês, labile iron pool) em células (Petrat, F; De Groot, H; Rauen, U, 2000; Espósito, B. P. et al, 2002; Domaille, D. W. et al. 2008). Os corantes fluorescentes mais comumente usados para medidas de ferro lábil são Phen Green SK e Calceína, ambos com limite de detecção da ordem de  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Resultados de experimentos celulares sugerem que há níveis micromolares de quelação de  $\text{Fe}^{2+}$  (Petrat, F; De Groot, H; Rauen, U, 2000; Espósito, B. P. et al, 2003). O uso de sondas fluorescentes imobilizadas em nanoesferas de sílica para detecção de ferro, um dos objetivos deste trabalho, não foi ainda reportada na literatura.

Além do grande interesse na preparação de nanopartículas contendo fluoróforos ou cromóforos imobilizados para atuarem como sensores, outra área que tem crescido muito é a da imobilização de drogas em nanomateriais. Atualmente, vários estudos clínicos e em pesquisas básicas são centrados na obtenção e no uso de nanopartículas em terapia

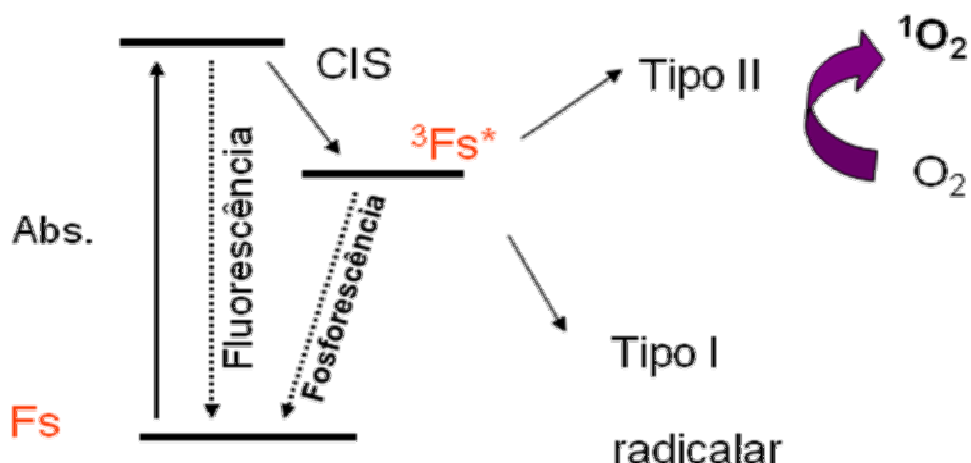
fotodinâmica (PDT, do inglês Photodynamic therapy), como por exemplo, Roy e colaboradores (2003) relataram a obtenção de nanopartículas carregadas com drogas para PDT.

A terapia fotodinâmica parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com um fotossensibilizador e oxigênio resultam em espécies reativas capazes de induzir a morte celular. A reação envolvida decorre primariamente da excitação eletrônica do fotossensibilizador pela luz, seguida de dois mecanismos principais de reação a partir do seu estado excitado (Jori, G, 1997).

I - Transferência de elétron entre o fotossensibilizador no estado triplete excitado e componentes do sistema, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados.

II - Transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete para o oxigênio molecular, com a geração de oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico.

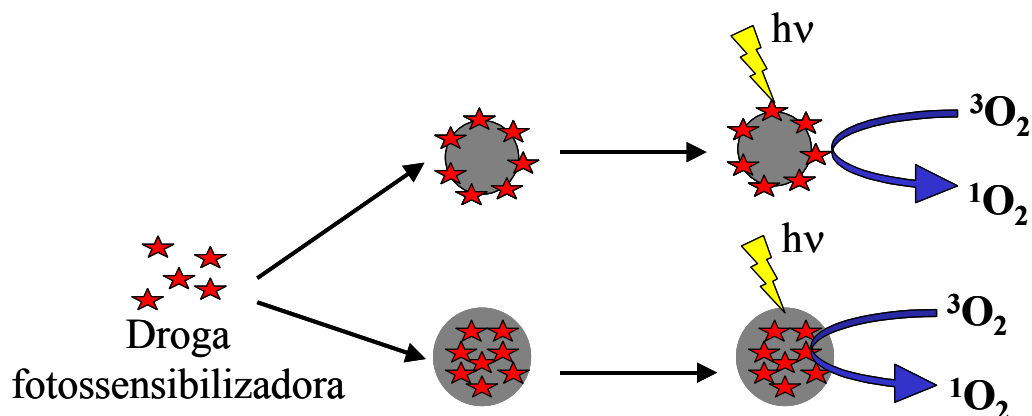
Como ilustra o diagrama de Jablonski simplificado (Figura 1), os processos de desativação dos fotossensibilizadores são simultâneos e competitivos entre si, sendo importante determinar a contribuição de cada processo, ou seja, o rendimento quântico de cada processo (Fernandes, A. U, 2007).



**Figura 1** Diagrama de Jablonski simplificado

Na grande maioria dos casos, as nanopartículas empregadas em PDT são carregadoras de fotossensibilizadores hidrofóbicos como uma forma de melhorar a dispersão destes em sistemas aquosos. Estes carregadores incluem micelas, lipossomas, lipoproteínas de baixa densidade, micelas poliméricas e complexos poliméricos (Konan, Y. N; Gurny, R; Allémann, E; 2002). Em relação a outros materiais, foi demonstrado que a sílica possui maior taxa de incorporação de fotossensibilizadores, porém outros nanomateriais poliméricos, metálicos e cerâmicos também têm sido utilizados (Wang, S. et al, 2004). A sílica sol-gel pode ter uma aplicação especialmente importante em PDT, já que, devido à sua transparência e estabilidade química, os fotossensibilizadores poderão ser irradiados e não serão liberados mesmo em condições extremas de pH e temperatura. Uma particularidade dos sistemas carregadores de drogas para PDT, que difere de outros sistemas de entrega controlada de drogas, é que os fotossensibilizadores não precisam ser entregues no local de uso, mas

apenas a difusão de oxigênio molecular, bem como de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) através da porosidade do material deve ocorrer para garantir o efeito fototóxico nas células cancerígenas (Figura 2).



**Figura 2** Representação esquemática da matriz de sílica porosa e permeável à entrada de oxigênio e saída de oxigênio singlete.

Entre os compostos mais promissores para uso em terapia fotodinâmica pode-se destacar as porfirinas e seus derivados (Tardivo, J. P. et al, 2005). O primeiro fotossensibilizador a ser aprovado pelas autoridades de saúde para tratamento de câncer através da PDT foi o Photofrin<sup>®</sup>, que é uma formulação que contém formas poliméricas de hematoporfirina IX (Hp IX) de constituição indefinida. A Hp IX é um derivado da Pp IX, uma porfirina de origem natural, constituinte da hemoglobina, citocromo C e outras moléculas (Fernandes, A. U, 2007). O uso prático das porfirinas em terapia fotodinâmica é limitado pela baixa solubilidade em meio fisiológico, baixa pureza, baixa seletividade por tecidos doentes, baixo coeficiente de extinção molar, que requer grande dosagem para obter uma resposta foto-terapêutica satisfatória e acúmulo na pele, que pode causar queimaduras por exposição ao sol.

Ainda, o anel porfirínico tem grande afinidade por íons ferro e a sua complexação com este e outros metais leva à supressão da sua fluorescência (Kipp, R. A. et al, 1999), podendo atuar como uma sonda molecular. Esta última possível aplicação de porfirinas é ainda muito pouco explorada.

Neste contexto, no presente trabalho vamos desenvolver metodologias para imobilização de porfirinas em nanopartículas de sílica de tamanho controlado e inferior a 100 nm, bem como o estudo da interação das moléculas imobilizadas com oxigênio e ferro.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O objetivo geral deste projeto é o desenvolvimento de metodologias para a imobilização de porfirinas em nanoesferas de sílica e o estudo da interação das moléculas imobilizadas com ferro e oxigênio.

### 2.2 Específicos

Os objetivos específicos são:

- preparar nanoesferas de sílica de tamanho na ordem de <100 nm;
- empregar metodologias que mantenham a morfologia esférica e uma estreita faixa de distribuição de tamanhos;
- imobilizar porfirinas pouco solúveis em água em nanoesferas de sílica;
- preparar dispersões estáveis de nanoesferas de sílica;
- estudar a interação das porfirinas imobilizadas com oxigênio molecular;
- avaliar a geração de  $^1\text{O}_2$  por porfirinas imobilizadas em nanomateriais para uso em PDT;
- estudar a interação das porfirinas imobilizadas com ferro;
- avaliar a possibilidade de detecção de ferro por porfirinas imobilizadas em nanomateriais.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de alta pureza. Azul de Metileno, Hematoporfirina IX e Protoporfirina IX foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. Tetraetoxisilano (TEOS), trietoxivinilsilano, 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. Dimetilformamida (DMF), APTES e cloreto de oxalila (Sigma-Aldrich) foram destilados antes do uso. O tampão HBS foi preparado utilizando NaCl e HEPES (Vetec Química) com pH ajustado para 7,4. Sulfato Ferroso Amoniacal (FAS) foi preparado na hora do experimento para evitar problemas com a hidrólise do ferro. Os outros solventes usados foram de grau analítico.

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Funcionalização da Pp IX com grupos alcóxissilanos

Foram refluxados sob atmosfera de nitrogênio seco e 30 minutos de agitação, 100 mg de Pp IX ( $1,65 \cdot 10^{-4}$  mol) com excesso de cloreto de oxalila (2 mL) previamente destilado. A solução púrpura obtida foi refluxada por 30 minutos, seguida de evaporação com excesso do cloreto de oxalila para obtenção de um filme cor púrpura (produto clorado) (Taima, H. et al, 2005). Este foi submetido à agitação com excesso de APTES (1 mL) previamente destilado, por 2 horas sob atmosfera de nitrogênio seco para obtenção do produto: dimetil-8,13divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropil-amidopropiltrietoxisilano (Figura . O produto final foi purificado por

destilação do excesso de APTES e caracterizado por espectroscopia no IV e RMN.

### 3.2.2 Preparação de esferas de sílica carregadas com Protoporfirina IX pelo processo sol-gel

Esferas de sílica contendo Pp IX foram preparadas pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de Pp IX funcionalizada com grupos silanóis obtidas em 3.2.1 a uma solução de etanol (100 mL) contendo hidróxido de amônio (6 mL) e TEOS (4,2 mL) sob agitação. A mistura permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. As esferas foram separadas por centrifugação (7000 rpm, 10 minutos) e lavadas 3 vezes com etanol, 2 vezes com água e novamente com etanol.

### 3.2.3 Preparação de esferas de sílica carregadas com Hematoporfirina IX pelo processo da microemulsão

Esferas de sílica contendo Hp IX foram preparadas pela adição de sulfosucinato dioctílico sódico (AOT) (0,44 g) e 1-butanol (800  $\mu\text{L}$ ) em 20 mL de água deionizada sob agitação. Depois de alguns minutos foram acrescentados 30  $\mu\text{L}$  de TEOS e 30  $\mu\text{L}$  (15 mmol/L) de Hp IX. Depois de 1 hora de agitação foram adicionados APTES (10  $\mu\text{L}$ ) e as reações foram mantidas sob agitação por mais 20 horas. As esferas de sílica contendo Hp IX foram purificadas por diálise e mantidas em solução, sendo separadas por centrifugação conforme necessário.



### 3.4 Equipamentos e Dispositivos

#### 3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de MET foram obtidas em um microscópio Philips CM 200 operando a uma voltagem de 200kV (IF-USP). As amostras foram preparadas aplicando-se uma gota de uma suspensão aquosa de esferas de sílica carregadas com porfirinas em uma grade de cobre revestida por carbono. Os diâmetros médios foram calculados pela medida do diâmetro de aproximadamente 200 partículas observadas em uma imagem ampliada através do Programa Image Tool. O diâmetro médio e o desvio padrão foram calculados usando o programa Origin 7.0.

#### 3.4.2 Espectroscopia eletrônica

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

#### 3.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram determinados em um equipamento BRUKER 500 MHz e em um Varian 300 MHz e sendo inspecionados com a ajuda do *software* MestRe-C (versão 5.0).

#### 3.4.4 Medidas de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos num espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500, em cubetas de quartzo.

As medidas da intensidade de fluorescência em microplacas de 96 poços foram obtidas em um leitor de placas FLUOstar OPTIMA da BMG LABTECH com  $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 620 \text{ nm}$ .

#### 3.4.5 Espalhamento de luz

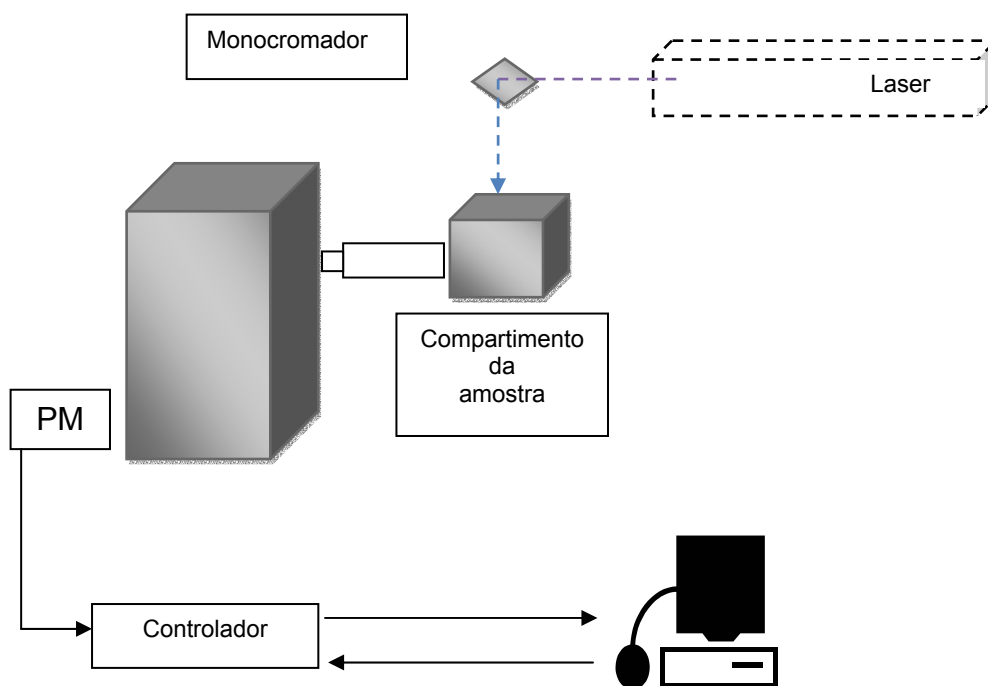
As medidas de espalhamento de luz foram realizadas em equipamento da Brookhaven Instruments e os cálculos de diâmetro efetivo foram realizados com auxílio do programa Dynamick Scattering Software.

### 3.5 Detecção de $^1\text{O}_2$

#### 3.5.1 Determinação de $^1\text{O}_2$ pelo método direto

O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  foi determinado através de medidas de fluorescência no infravermelho próximo (NIR) em um fluorímetro composto por um laser Nd:Yag Continuum Surelite III, para amostras com excitação em 532 nm, com tempo de duração de pulso de 5 ns e energia  $\leq 5 \text{ mJ/pulso}$ ; um monocromador e uma fotomultiplicadora (PMT) Hamamatsu modelo R5509 resfriada a  $-80^\circ\text{C}$ ; um sistema de detecção composto por uma placa rápida modelo Becker & Hickl GmbH MAS – 300, com programa de aquisição de dados LP900 (da Edinburg) e TRS da Logos Eletrônica (Figura 3), de acordo com a metodologia descrita anteriormente (Junqueira, H. C. et al 2003). Os transientes de emissão foram obtidos em 1270 nm após a fotoexcitação ( $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$ ) de suspensões de partículas e soluções de um padrão conhecido (azul de metileno) em acetonitrila. O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  gerado

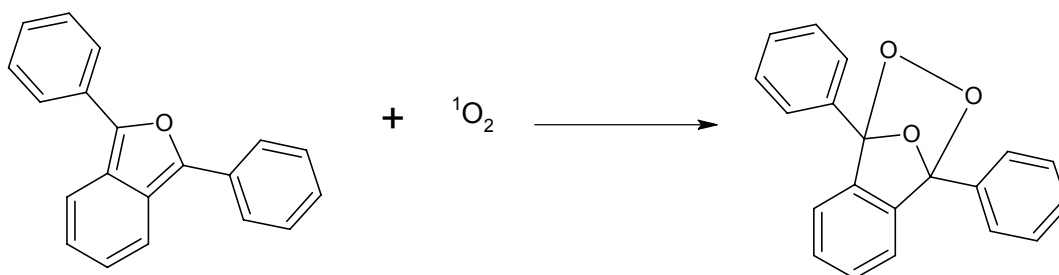
pela fotoexcitação das amostras foi determinado através do ajuste do transiente de emissão em 1270 nm para um decaimento exponencial de primeira ordem utilizando o programa Origin 7.0.



**Figura 3** Representação esquemática do sistema de emissão no infravermelho para detecção de oxigênio singlete por pulso de laser

### 3.5.2 Determinação de $^1\text{O}_2$ pelo método indireto

A medida indireta da formação do  $^1\text{O}_2$  foi realizada através da reação desta espécie com a sonda química 1,3-difenil-isobenzofurano (DPBF). Conforme apresentado na Figura 4, o DPBF é oxidado por  $^1\text{O}_2$  para formar o correspondente endoperóxido.



**Figura 4** Representação da reação do DPBF com oxigênio singlete e formação de endoperóxido.

O DPBF apresenta uma banda de absorção bastante intensa em torno de 400 nm que desaparece com a formação do endoperóxido. Assim, o  $^1\text{O}_2$  gerado fotoquimicamente pode ser monitorado espectrofotometricamente pela variação da absorbância na faixa de 400 nm. As amostras foram preparadas imediatamente antes do uso, adicionando-se em uma cubeta de quartzo 40  $\mu\text{L}$  de solução estoque de DPBF (8mM) a 2 mL de suspensão de partículas carregadas com porfirinas ou uma solução de azul de metileno, usado como padrão. O azul de metileno foi escolhido como padrão porque possui alta solubilidade em acetonitrila, enquanto que as porfirinas são menos solúveis e podem agregar, e conseqüentemente; diminuir o rendimento quântico de geração de  $^1\text{O}_2$  (Tada, D. B, 2007). A absorção das soluções de azul de metileno (padrão) e da suspensão de esferas de sílica carregadas com porfirinas, em acetonitrila, foram igualadas para a mesma absorbância em 532 nm. Para tanto, assume-se que o a absorção real da porfirina imobilizada na sílica possa ser determinada subtraindo-se o espalhamento de luz (causado pelos particulados) através de uma correção de múltiplos pontos da linha base. Os experimentos foram realizados irradiando-se as amostras com laser de 532 nm (Morgoton) em

ciclos de 2 segundos. Após cada ciclo foram registrados os espectros de absorção em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2401 PC. As amostras foram constantemente agitadas e resfriadas a 18°C. Foram assim obtidas as curvas de decaimento da sonda DPBF em função do tempo de irradiação. Coletando-se dados de absorbância para um comprimento de onda próximo da absorção máxima do DPBF foram construídos gráficos de absorbância versus tempo de irradiação. O tempo de decaimento da sonda DPBF ( $t$ ) foi calculado através do ajuste exponencial de primeira ordem utilizando-se o programa Origin 7.0, para cada comprimento de onda escolhido.

O tempo de decaimento da sonda DPBF é inversamente proporcional à sua taxa de reação com o oxigênio singlete ( $k$ , em  $s^{-1}$ ). Portanto, conhecendo-se o rendimento quântico e o tempo de decaimento de uma solução padrão, pode-se usar o tempo de decaimento e calcular a eficiência de geração de oxigênio singlete para uma amostra desconhecida. Assim, a equação 5 pode ser utilizada para o cálculo de eficiência de geração do  $^1O_2$  de partículas carregadas com fotossensibilizadores ( $\eta_{\Delta partícula}$ ). (Tada, D. B. et al, 2007):

$$\eta_{\Delta partícula} = \frac{\Phi_{\Delta AM} \times t_{AM}}{t_{partícula}} \quad (\text{eq. 5})$$

onde  $t_{AM}$  = tempo de decaimento da sonda DPBF na presença de azul de metileno livre, em acetonitrila (padrão);  $t_{partícula}$  = tempo de decaimento da sonda DPBF na presença de partículas de sílica carregadas com fotossensibilizador, em acetonitrila e  $\Phi_{\Delta AM}$  = rendimento quântico de  $^1O_2$  gerado por azul de metileno, em acetonitrila.



### 3.5.3 Determinação do rendimento quântico do $^1\text{O}_2$

O valor absoluto do rendimento quântico do  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) em acetonitrila não foi encontrado na literatura. Assim, foi determinado neste trabalho empregando-se o método fotoquímico com a sonda DPBF relatado por Spiller e colaboradores (1998). As amostras foram preparadas em acetonitrila imediatamente antes do uso, transferindo-se 40  $\mu\text{L}$  de solução estoque de DPBF (3 mM) a 2 mL de uma solução de azul de metileno em uma cubeta de quartzo. A cubeta foi introduzida em um espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu UV-2401 PC), sendo a solução resfriada a 18° C e constantemente agitada. A irradiação da amostra foi efetuada com um laser de 532 nm e intensidade de luz ajustada para  $5,4 \times 10^{-16}$  fótons  $\text{cm}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Espectros de absorção foram registrados após cada ciclo de 2 segundos de irradiação. Os valores de absorbância em 411 nm foram usados para calcular a concentração de DPBF com base no seu coeficiente de extinção  $\epsilon = 22500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  em acetonitrila (Engelmann, F. M. et al 2004). O rendimento quântico da fotoreação do DPBF ( $\Phi_{\text{DPBF}}$ ) para cada ciclo de irradiação foi calculado usando a equação 6:

$$\Phi_{\text{DPBF}} = \frac{c_t - c_o}{\frac{I_{\text{abs}} \times t}{V_R}} \quad (\text{eq. 6})$$

onde  $c_o$  e  $c_t$  são as concentrações de DPBF antes e depois da irradiação, respectivamente.  $V_R$  é o volume de reação,  $t$  é o tempo de irradiação por ciclo e  $I_{\text{abs}}$  é definido pela equação 7.

$$I_{abs} = \alpha \times \frac{A \times P}{N_A} \quad \text{com } \alpha = 1 - 10^{-E} \quad (\text{eq.7})$$

onde  $E$  é a absorção do fotossensibilizador no comprimento de onda da irradiação,  $A$  é a área irradiada ( $2,2 \text{ cm}^2$ ),  $P$  é a intensidade da luz ( $5,4 \times 10^{-16} \text{ fótons cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e  $N_A$  é a constante de Avogadro.

O rendimento quântico do  $^1\text{O}_2$  foi calculado através do rendimento quântico da fotoreação,  $\Phi_{DPBF}$ , de acordo com a equação 8 :

$$\frac{1}{\Phi_{DPBF}} = \frac{1}{\Phi_{\Delta}} + \frac{1}{\Phi_{\Delta}} \times \frac{k_d}{k_a} \frac{1}{[DPBF]} \quad (\text{eq. 8})$$

onde  $k_d$  é a constante de decaimento do oxigênio singlete no respectivo solvente e  $k_a$  é a constante da reação de DPBF com  $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ . O valor de  $1/\Phi_{\Delta}$  é o intercepto obtido a partir do gráfico de Stern-Volmer ( $1/\Phi_{DPBF} \times 1/[DPBF]$ ). Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

### 3.6 Detecção de ferro

A supressão de fluorescência de soluções de porfirinas causada pela presença de ferro foi determinada em um leitor de microplacas. Os experimentos foram realizados em microplacas de 96 poços com soluções contendo esferas de sílica carregadas com Hp IX e Hp IX livre em solução tampão de HBS.

Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de esferas de sílica carregadas com Hp IX e 100  $\mu\text{L}$  de tampão HBS em 12 poços, em triplicata. Em seguida

foram adicionados em cada poço, 10  $\mu\text{L}$  de solução de FAS variando a concentração de ferro do 1º ao 12º poço de 0 a 320  $\mu\text{M}$ . O mesmo procedimento foi realizado para as soluções de Hp IX livre. No primeiro poço de cada solução, também em triplicata, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de água (definido como branco). Num primeiro experimento, a supressão da fluorescência da porfirina pela presença de ferro foi acompanhada em função do tempo. Nos experimentos seguintes, as microplacas permaneceram em repouso no escuro durante 30 minutos à temperatura ambiente antes da medida de fluorescência. As intensidades de fluorescência nos poços foram determinadas em um leitor de fluorescência com comprimento de onda de absorção, emissão e ganhos ajustados de acordo com cada tipo de solução analisada. A intensidade de fluorescência de cada solução foi normalizada pelo valor do branco em cada situação. Gráficos da intensidade de fluorescência versus a concentração de ferro foram construídos utilizando o programa Origin7.0, para cada amostra estudada.

Estuda da reversibilidade da reação de ferro com as porfirinas foram realizados. Inicialmente foram preparadas soluções contendo Hp IX livre e imobilizada em esferas de sílica que foram submetidas a 50  $\mu\text{M}$  de ferro para causar supressão da fluorescência da porfirina. Depois de 30 minutos, foram adicionados a cada solução 200  $\mu\text{M}$  do quelante ácido dietilenotriaminopentaacético (dtpa). A recuperação da fluorescência foi avaliada após 30 min e após 24h.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese e caracterização de esferas de sílica contendo porfirinas

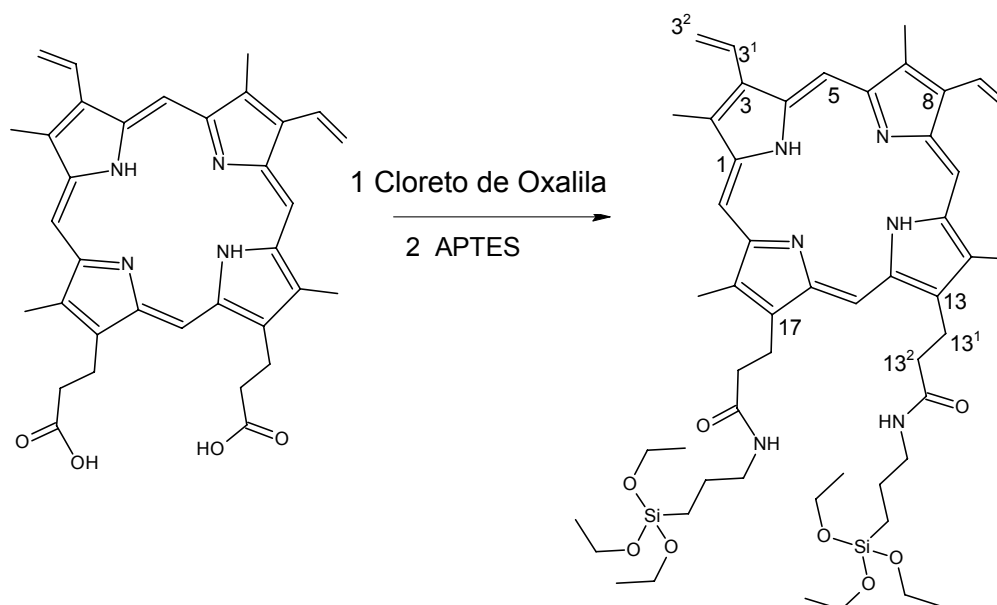
#### 4.1.1 Método sol-gel

A primeira tentativa de preparação de esferas de sílica contendo Hp IX pelo processo sol-gel não foi satisfatória, pois a Hp IX não se fixava na matriz de sílica. Isto se verificou quando as esferas de sílica foram separadas por centrifugação e toda a Hp IX permanecia em solução. Após lavagem com etanol, esferas de sílica brancas foram recuperadas sem nenhuma quantidade de porfirina detectável por UV-vis e fluorescência.

A estratégia empregada para a solução do problema de baixa afinidade da porfirina pela matriz de sílica envolveu a modificação da molécula de porfirina com grupos alcóxissilanos (porfirina-Si(OR)<sub>3</sub>), que permitem a ligação covalente da porfirina à matriz de sílica, após hidrólise e condensação dos grupos OR da porfirina modificada. A modificação de moléculas orgânicas por esta estratégia tem sido reportada na literatura. Pode-se citar o exemplo de um derivado da fluoresceína, conhecido sensor de pH, que foi modificado com grupos alcóxissilanos para imobilização em sílica (Lobnik, A. et al, 1998).

A molécula escolhida para modificação foi a Pp IX uma porfirina de origem natural, precursora da Hp IX. A modificação de moléculas de Pp IX com reagente organossilano foi realizada pela estratégia apresentada na Figura 5. O primeiro passo foi a ativação da função ácido carboxílico com o

cloreto de oxalila, seguido pela condensação com o APTES para a obtenção da porfirina sililada, através da formação de uma ligação amida.



**Figura 5** Síntese do dimetil-8,13divinil-3,7,12,17-tetrametil-21H,23H-porfirina-2,18-dipropil-amidopropiltriétoxissilano.

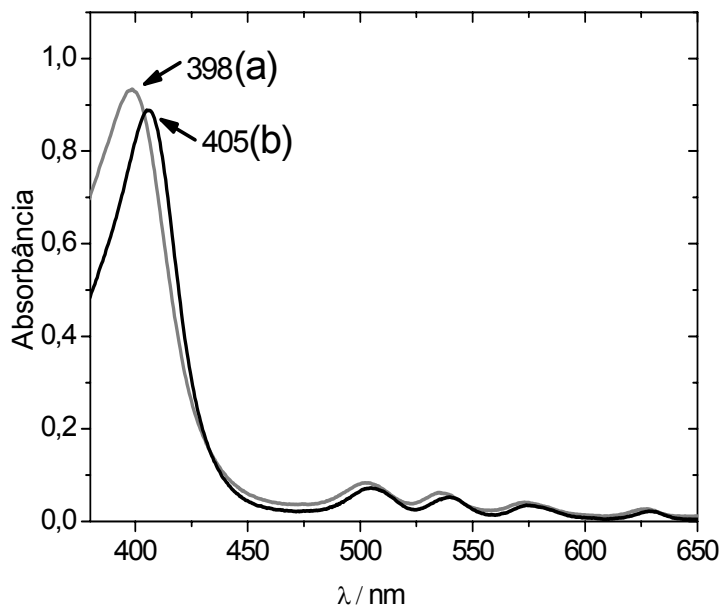
A Pp IX-sililada foi caracterizada através de IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN. O espectro de infravermelho mostrou uma banda adicional em  $1632\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde à deformação axial da banda  $\text{C}=\text{O}$ , característica de derivados da amida na Pp IX. O espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostrou os picos característicos das porfirinas, de acordo com outros espectros previamente reportados para esta família de compostos (Fernandes; A. U, 2007), e uma série de picos característicos do novo grupo inserido. Os picos em  $\delta$  2,76, 1,65 e 0,56 ppm correspondem às posições  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  dos grupos inseridos com o respectivo grupo amida. Os picos em  $\delta$  3,67-3,66 e 1,06 ppm correspondem aos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  dos seis grupos etóxi ligados ao Si, respectivamente. O espectro de  $^1\text{H}$  RMN do ciclo interno do anel porfirínico, usualmente com picos entre  $\delta$ -3 e -4 ppm, foi deslocado para -5,53 ppm após a modificação

da porfirina. O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN também mudou de acordo com a presença do grupo adicional. Os picos em  $\delta$  43,91 e 43,93 ppm correspondem a dois átomos de C dos grupos inseridos na posição  $\alpha$  com respeito às amidas. Os picos em  $\delta$  25,18 e 25,14 ppm correspondem à posição  $\beta$  e em  $\delta$  8,65 e 7,55 ppm, à posição  $\gamma$ . Os átomos de carbono dos grupos etóxis aparecem em  $\delta$  58,39 e 18,26 ppm correspondendo ao  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente.

A Pp IX-sililada também foi caracterizada por espectroscopia eletrônica e fluorescência, mostrando as mesmas características de outras moléculas de porfirinas conhecidas, com absorção máxima correspondente a banda Soret próxima de 400 nm e outras 4 bandas Q entre 500 e 620 nm. A Figura 6 mostra o espectro eletrônico de uma solução de Pp IX e da Pp IX-sililada em diclorometano. A absorção máxima da Pp IX que aparece em 398 nm se deslocou para 405 nm após a funcionalização com grupos alcoxisilanos. A posição da banda Soret é muito sensível aos estados de agregação das porfirinas, sendo que sistemas agregados (dímeros, trímeros, etc.) apresentam um deslocamento do máximo de absorção para o azul (Hutener, C. A; Sanders, J. K. M, 1990; Borissevitch, I. E. et al, 1996). Assim, a Pp IX-sililada parece estar menos agregada do que a porfirina Pp IX precursora.

A molécula de Pp IX-sililada foi usada para síntese de esferas monodispersas de sílica através da modificação da metodologia desenvolvida por Stöber e colaboradores (1968) e recentemente reportada

por Rossi e colaboradores (2005), que resultou em esferas de sílica com o fluoróforo distribuído homogeneamente na matriz inorgânica.

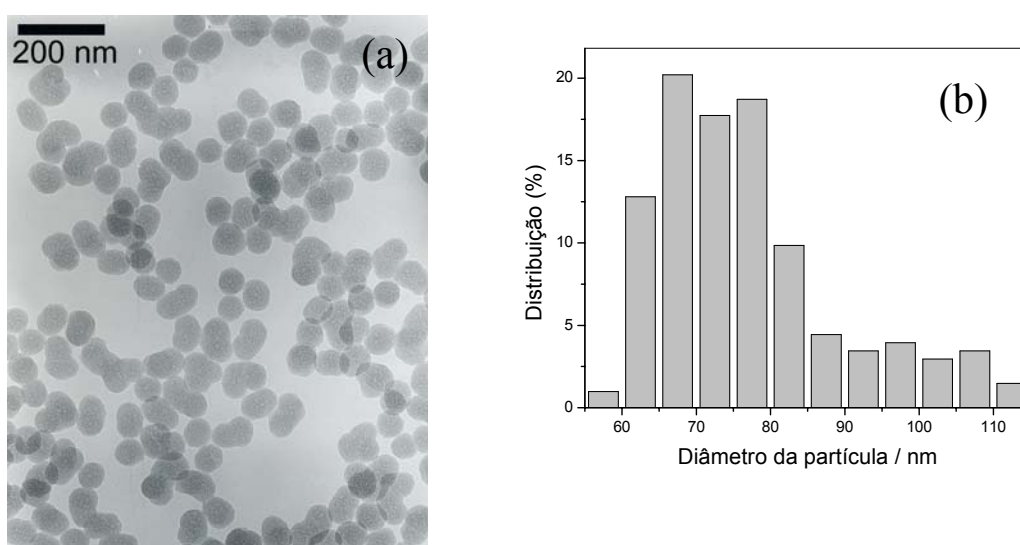


**Figura 6** Espectro eletrônico de absorção de soluções de diclorometano: (a) Protoporfirina IX; (b) Protoporfirina IX-sililada

A morfologia do material obtido foi investigada através de MET. As imagens revelam que o material é composto por partículas com forma esférica (Figura 7), embora fique evidenciada a presença de agregados com mais de uma partícula. Através da medida do diâmetro de cerca de 200 partículas, selecionadas aleatoriamente em imagens ampliadas da MET utilizando o programa Image Tool, foi calculado o diâmetro médio das esferas de  $77 \pm 12$  nm. A presença de agregados foi também verificada por experimentos de espalhamento de luz que permitiram o cálculo de um diâmetro efetivo de 260 nm com dispersão de 0,122.

As propriedades fotofísicas das esferas de sílica carregadas com Pp IX foram investigadas. Os espectros de absorção e emissão de uma suspensão de esferas de sílica carregadas com Pp IX e da Pp IX-sililada

livre em solução de diclorometano são apresentados na Figura 8. As absorções correspondentes à banda Soret (400 nm) e às bandas Q (entre 500–650 nm) foram razoavelmente mantidas após a imobilização da porfirina, apesar do espectro ter sido alargado pelo espalhamento de luz causado pelas partículas sólidas, conforme pode ser observado na curva b. Comportamento similar foi encontrado quando as esferas de sílica foram suspensas em solução aquosa, como apresentado no detalhe do gráfico na Figura 8. Observa-se que a solubilidade da Pp IX em água é muito baixa, o que dificulta a obtenção do espectro e a comparação com o sistema imobilizado.

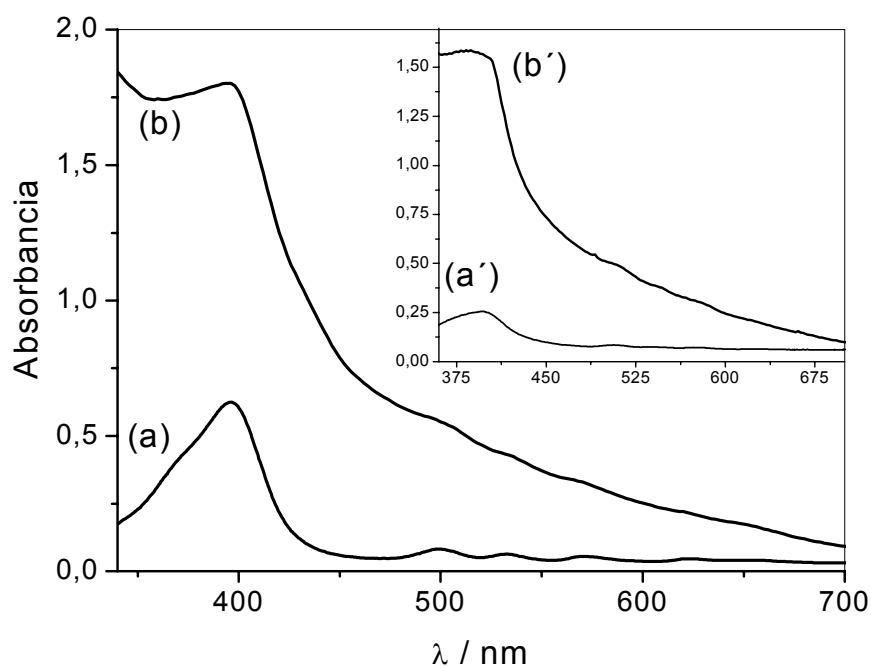


**Figura 7** (a) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das esferas de sílica contendo Pp IX preparadas por sol-gel e (b) Histograma de distribuição de tamanho de partículas.

As propriedades fotofísicas das esferas de sílica carregadas com Pp IX foram investigadas. Os espectros de absorção e emissão de uma suspensão de esferas de sílica carregadas com Pp IX e da Pp IX-sililada livre em solução de diclorometano são apresentados na Figura 8. As



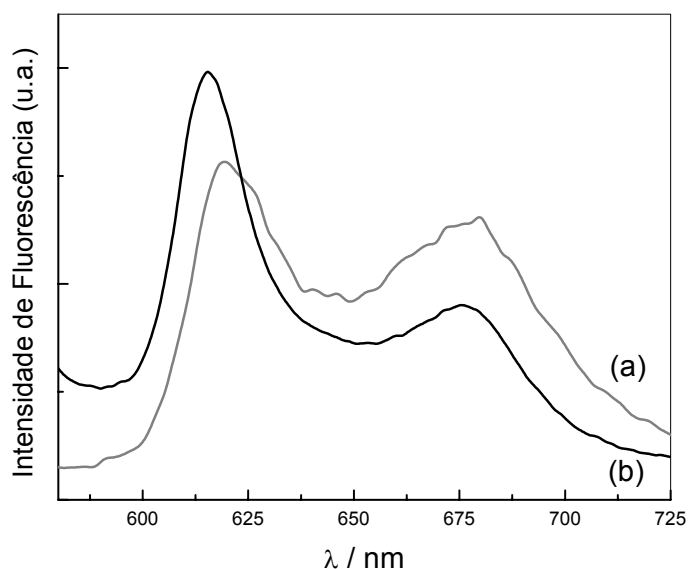
absorções correspondentes à banda Soret (400 nm) e às bandas Q (entre 500–650 nm) foram razoavelmente mantidas após a imobilização da porfirina, apesar do espectro ter sido alargado pelo espalhamento de luz causado pelas partículas sólidas, conforme pode ser observado na curva b. Comportamento similar foi encontrado quando as esferas de sílica foram suspensas em solução aquosa, como apresentado no detalhe do gráfico na Figura 8. Observa-se que a solubilidade da Pp IX em água é muito baixa, o que dificulta a obtenção do espectro e a comparação com o sistema imobilizado.



**Figura 8** Espectro de absorção de (a) Pp IX-sililada em solução de diclorometano e (b). suspensão de esferas de sílica carregadas com Pp IX em diclorometano Detalhe: Espectro de absorção da (a') Pp IX-sililada em solução aquosa e (b') suspensão de esferas de sílica carregadas com Pp IX em solução aquosa.

Como pode ser visto na Figura 9, as bandas de emissão da porfirina imobilizada em esferas de sílica foram levemente deslocadas para região do azul ( $\lambda_{em} = 615$  e  $676$  nm) em comparação com as bandas de emissão da Pp

IX-sililada livre em solução aquosa ( $\lambda_{em}$ = 620 e 679 nm). Novamente problemas de solubilidade da Pp IX em água dificultam a comparação, pois a porfirina livre pode estar muito agregada em água.



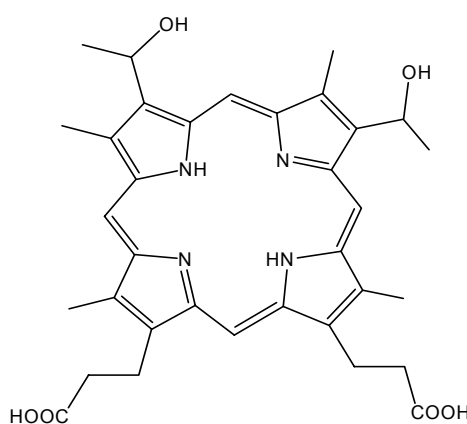
**Figura 9** Espectro de emissão da Pp IX-sililada em solução aquosa (a) e esferas de sílica carregadas com Pp IX em solução aquosa (b) para as amostras excitadas em 500 nm.

#### 4.1.2 Método da Microemulsão

Apesar do sucesso na imobilização de porfirinas em esferas de sílica pelo processo sol-gel com diâmetro médio na ordem de 70 nm, estimado por MET, apresentadas no item 4.1.1, as mesmas não apresentaram estabilidade coloidal em água. Na verdade, indícios de agregação de partículas em solução aquosa foram obtidos nos experimentos de espalhamento de luz. Uma alternativa encontrada para solucionar o problema de baixa estabilidade e sedimentação em solução aquosa foi diminuir e controlar o tamanho das esferas de sílica utilizando a metodologia da microemulsão.

Muita atenção tem sido dada as microemulsões por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de fármacos e por melhorarem a solubilização dos mesmos em água, protegendo-os contra a hidrólise enzimática, além de aumentar o potencial de absorção devido à presença de tensoativo. Como estratégia de síntese de nanomateriais, o uso de microemulsões promete um maior controle do tamanho das nanopartículas preparadas dentro dos nanoreatores formados pelo tensoativo, água e óleo. Neste trabalho, adaptamos a formulação de uma microemulsão formada por AOT, água, TEOS e o fluoróforo dissolvido em DMF (Roy, I. et al, 2003) para a preparação de nanoesferas de sílica carregadas com Hp IX.

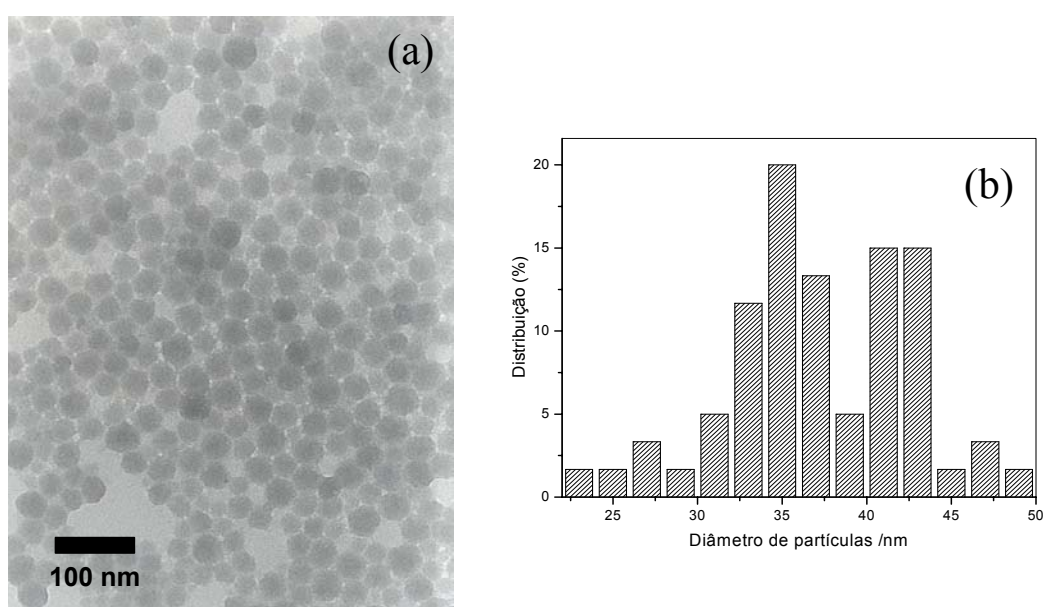
Esferas monodispersas de sílica contendo Hp IX (Figura 10) foram preparadas com a estratégia da microemulsão. A droga foi homogeneamente distribuída na matriz de sílica sem a necessidade de modificação da sua estrutura; portanto, traz uma vantagem sobre o uso do processo sol-gel.



**Figura 10** Fórmula estrutural da molécula da Hematoporfirina IX.

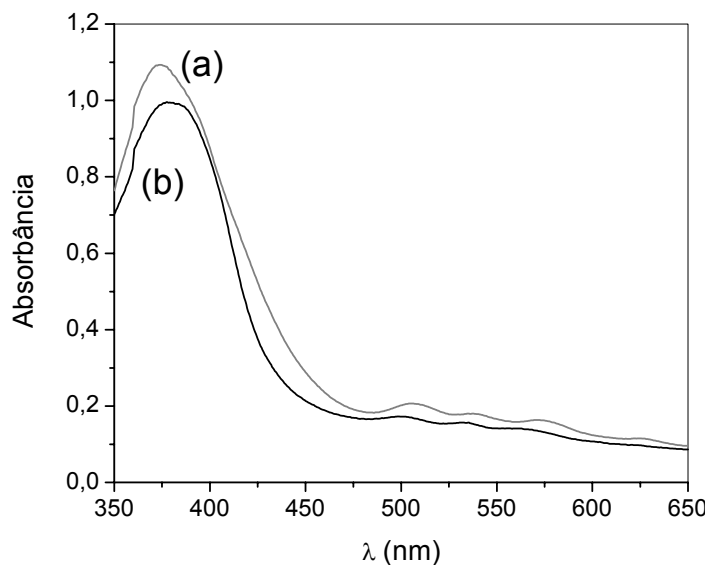
Imagens de MET da Hp IX imobilizada em sílica via microemulsão revelaram a presença de partículas na forma esférica (Figura 11). A medida

do diâmetro das partículas, selecionadas aleatoriamente em imagens ampliadas da MET utilizando o programa Image Tool, permitiu o cálculo do diâmetro médio das esferas de  $37 \pm 5$  nm. Experimentos de espalhamento de luz permitiram o cálculo de um diâmetro efetivo de 80 nm com dispersão de 0,005 para a amostra preparada por microemulsão. Portanto, a amostra apresenta menores agregados e ficou bem mais estável em solução aquosa do que aquela preparada pelo método sol-gel.



**Figura 11** (a) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das esferas de sílica contendo Hp IX preparadas por microemulsão (b) Histograma de distribuição de tamanho de partículas.

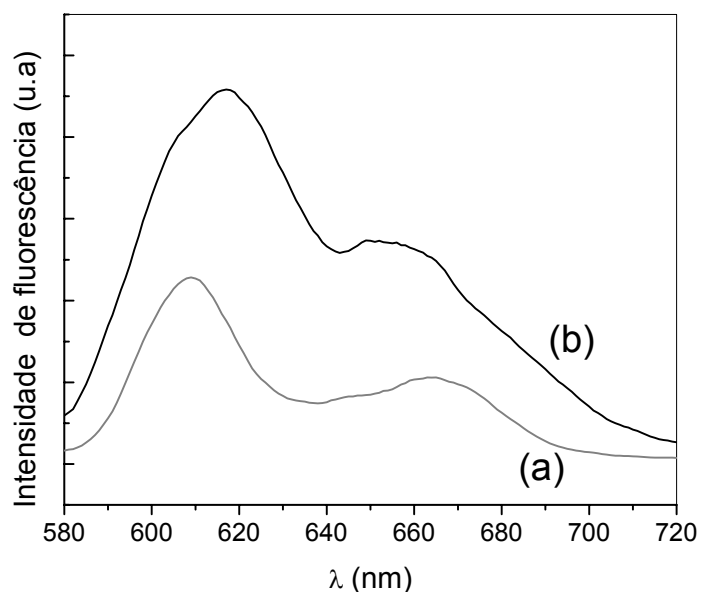
As propriedades fotofísicas das esferas de sílica carregadas com Hp IX foram investigadas. Os espectros de absorção de uma suspensão de esferas de sílica carregadas com Hp IX e da Hp IX livre em solução aquosa são apresentados na Figura 12. A absorção correspondente à banda Soret (400 nm) e às bandas Q (entre 500–650 nm) foram mantidas após a imobilização da porfirina.



**Figura 12** Espectro de absorção de (a) Hp IX livre em solução aquosa e (b) uma suspensão de esferas de sílica carregadas com Hp IX em solução aquosa.

Observa-se nesta amostra a ausência de espalhamento de luz pelas partículas sólidas, o que era muito evidente nas amostras preparadas pelo processo sol-gel. Ainda, a solução manteve-se estável sem a formação aparente de precipitados por mais de 12 meses. Portanto, o método da microemulsão mostrou-se mais adequado para a preparação de nanoesferas de sílica resultando no maior controle do tamanho e elevada estabilidade coloidal.

Como pode ser visto na Figura 13, as bandas de emissão da porfirina imobilizada em esferas de sílica foram levemente deslocadas para região do vermelho ( $\lambda_{em}$  = 616 e 656 nm) em comparação com as bandas de emissão da Hp IX livre em solução aquosa ( $\lambda_{em}$  = 610 e 665 nm). Novamente problemas de solubilidade da Hp IX em água dificultam a comparação, pois a porfirina livre pode estar muito agregada em água.



**Figura 13** Espectro de emissão de (a) Hp IX livre em solução aquosa (b) uma suspensão de esferas de sílica carregadas com Hp IX em solução aquosa, para as amostras excitadas em 500 nm.

#### 4.2. Estudo da interação de porfirinas imobilizadas em esferas de sílica com oxigênio molecular

O primeiro passo no estudo da possibilidade de aplicação de porfirinas imobilizadas em uma matriz de sílica na detecção de espécies de interesse, neste caso ferro, ou mesmo para uso como um agente para PDT envolve estudos da acessibilidade da molécula após a imobilização. Espera-se que a matriz de sílica seja porosa o suficiente para permitir que a porfirina interaja com oxigênio molecular. O oxigênio molecular deve difundir através dos poros e, em contato com a porfirina e em presença de luz, permitir a formação de  $^1\text{O}_2$ , que deve então difundir para fora da matriz para produzir o efeito citotóxico em células doentes. Portanto, além da porfirina ligada à matriz de sílica ser capaz de gerar  $^1\text{O}_2$ , é importante que este seja entregue

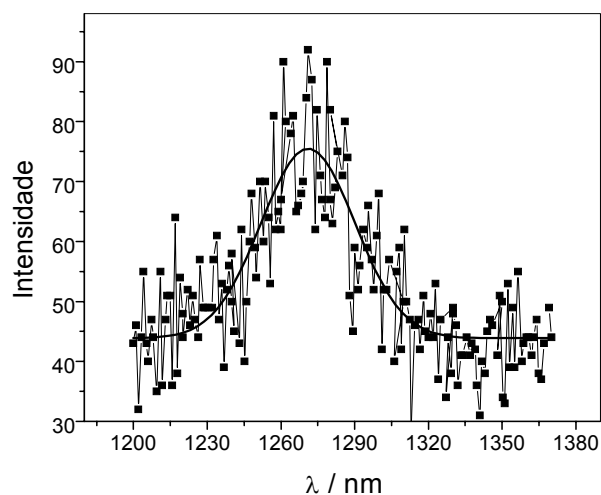
ao meio. Para que isso aconteça, não deve haver nenhum tipo de supressão de  $^1\text{O}_2$  por parte da sílica, nem mesmo por parte da própria molécula de porfirina. Vários estudos foram realizados para elucidar a interação de porfirinas imobilizadas com oxigênio molecular.

#### 4.2.1. Caracterização do $^1\text{O}_2$ gerado por foto-excitação de porfirinas imobilizadas

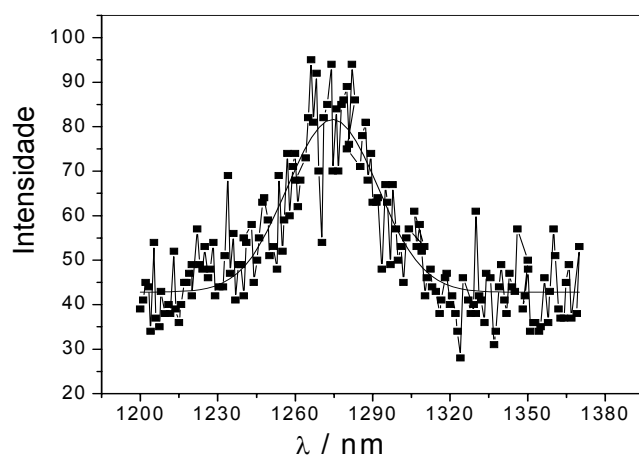
A foto-excitação das amostras contendo porfirinas imobilizadas em esferas de sílica levou à formação de  $^1\text{O}_2$ . Este foi caracterizado através do espectro característico da fosforescência com o máximo em 1270 nm, obtido através do monitoramento da intensidade de emissão entre 1200 e 1370 nm após a foto-excitação de uma suspensão de esferas de sílica carregadas com porfirinas, em acetonitrila. O solvente acetonitrila foi escolhido para estes estudos para facilitar a detecção de  $^1\text{O}_2$ , pois o tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  é maior em acetonitrila (52  $\mu\text{s}$ ) do que em água (3  $\mu\text{s}$ ), como apresentado por Tada e colaboradores (2007).

Os espectros obtidos para as amostras de esferas de sílica carregadas com Pp IX preparadas pelo processo sol-gel e esferas de sílica carregadas com Hp IX preparadas pelo processo da microemulsão são apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente. O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  gerado após foto-excitação de suspensões contendo as esferas de sílica carregadas com porfirinas foi determinado a partir do transiente de emissão em 1270 nm. Os espectros contendo o ajuste para um decaimento exponencial de primeira ordem são apresentados nas Figuras 16 e 17, para as esferas de sílica carregadas com Pp IX preparadas pelo processo sol-gel

e esferas de sílica carregadas com Hp IX preparadas pelo processo da microemulsão, respectivamente. O tempo de vida de  $^1\text{O}_2$  calculado para as duas amostras foi de 52  $\mu\text{s}$ .

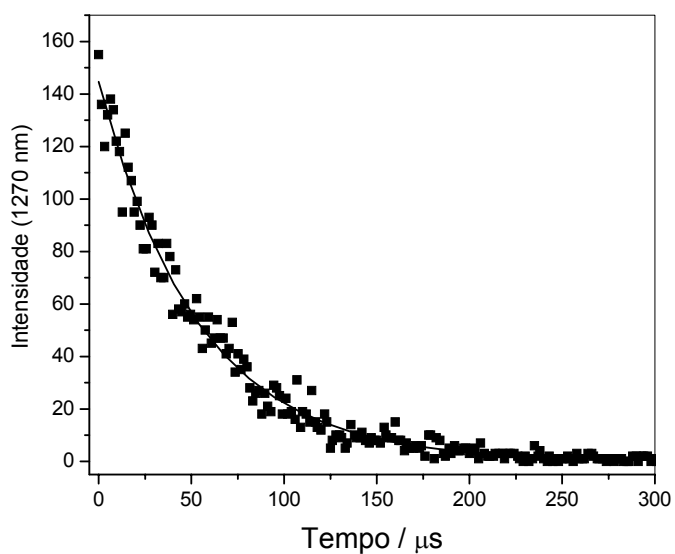


**Figura 14** Espectro de emissão gerado após fotoexcitação em 532 nm de uma suspensão de esferas de sílica contendo Pp IX preparadas por sol-gel em acetonitrila.

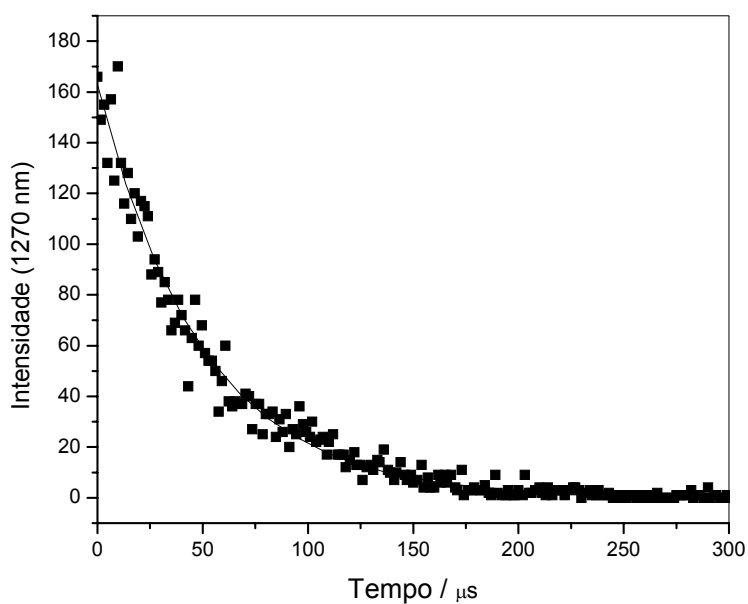


**Figura 15.** Espectro de emissão gerado após fotoexcitação em 532 nm de uma suspensão de esferas de sílica contendo Hp IX preparadas por microemulsão em acetonitrila.





**Figura 16** Transiente de emissão em 1270 nm obtido após fotoexcitação em 532 nm, de uma suspensão de esferas de sílica contendo Pp IX em acetoneitrila.



**Figura 17** Transiente de emissão em 1270 nm obtido após fotoexcitação em 532 nm, de uma suspensão de esferas de sílica contendo Hp IX em acetoneitrila.

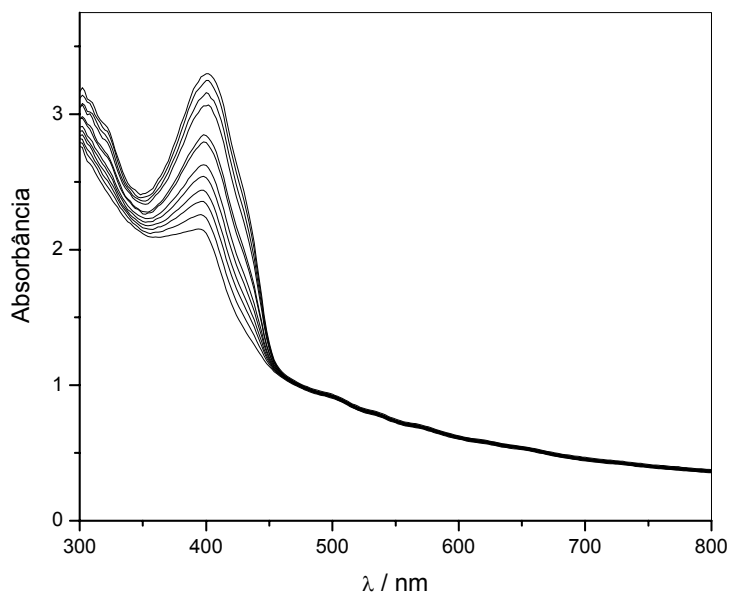
Paralelamente à análise das porfirinas imobilizadas, foi realizado um experimento para determinar o tempo de vida de  $^1\text{O}_2$  gerado pela foto-

excitação de uma solução de azul de metileno, um fotossensibilizador muito estudado por sua capacidade de gerar  $^1\text{O}_2$ . Este foi usado como fotossensibilizador padrão sendo preparado no mesmo solvente e sob as mesmas condições das porfirinas em estudo. Para a amostra de azul de metileno também foi obtido um tempo de vida de 52  $\mu\text{s}$ . Portanto, o sinal obtido nos estudos das porfirinas refere-se à emissão do  $^1\text{O}_2$ . O valor obtido está abaixo do tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  em acetonitrila estabelecido na literatura de 70-80  $\mu\text{s}$  (Wilkinson, F; Helman, W. P; Ross, A. B, 1995). Porém, sabendo-se que o azul de metileno não suprime  $^1\text{O}_2$  e que o tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  é dependente do solvente (Severino, D. et al, 2003), a diminuição observada no valor do tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  medido em acetonitrila deve ter relação com a presença de umidade no solvente ou outros problemas na detecção do  $^1\text{O}_2$ .

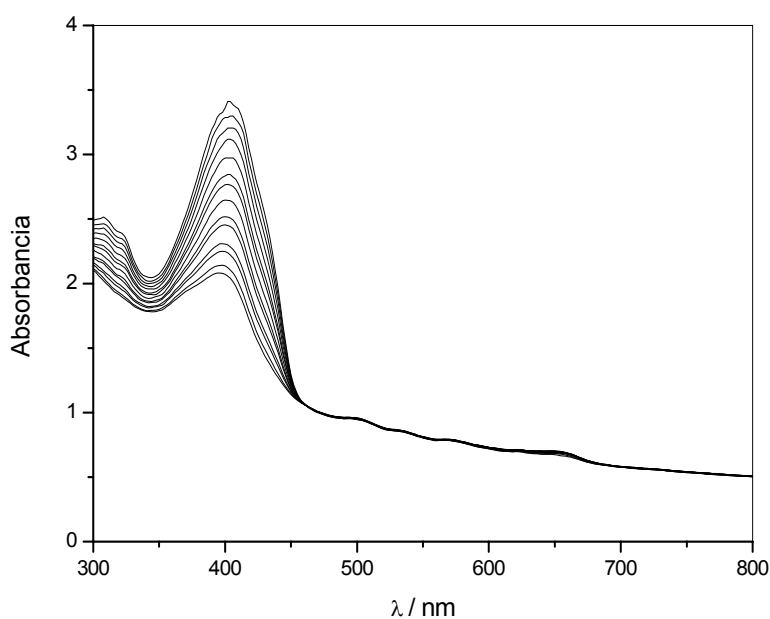
#### 4.2.2. Estimativa da eficiência de entrega de $^1\text{O}_2$ gerado por foto-excitação de porfirinas imobilizadas

A eficiência de entrega de  $^1\text{O}_2$  gerado por foto-excitação de suspensões de esferas de sílica carregadas com porfirinas foi avaliada pelo método químico indireto usando 1,3 – difenilisobenzofurano (DPBF) como uma sonda química para o  $^1\text{O}_2$  (Spiller, W. et al, 1998). O DPBF reage irreversivelmente com o oxigênio singlete gerado pela fotoexcitação de um fotossensibilizador e a reação pode ser facilmente acompanhada espectrofotometricamente através da obtenção do decaimento da intensidade de absorção da DPBF em aproximadamente 400 nm. As mudanças no espectro de absorção da sonda DPBF com o tempo de

irradiação na presença de esferas de sílica carregadas com Pp IX preparadas por sol-gel e carregadas com Hp IX preparadas por microemulsão são apresentadas nas Figuras 18 e 19, respectivamente.



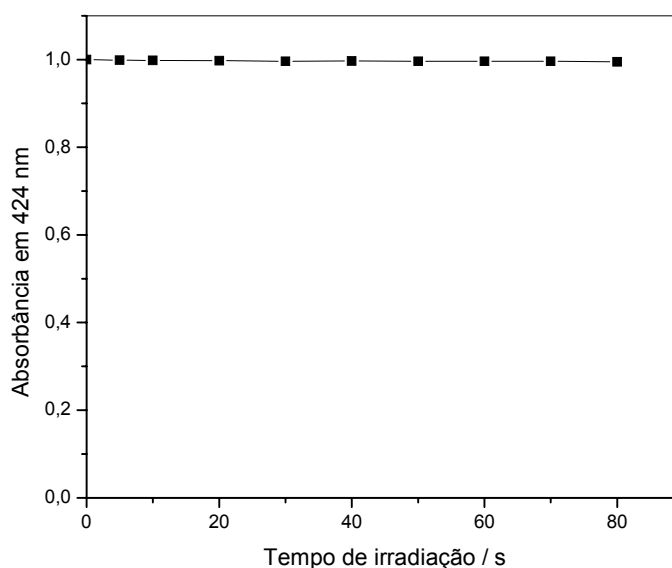
**Figura 18** Espectro de absorção do DPBF na presença de esferas de sílica carregadas com Pp IX preparadas por sol-gel, em acetonitrila, após diferentes tempos de irradiação com laser de 532nm.



**Figura 19** Espectro de absorção do DPBF na presença de esferas de sílica carregadas com Hp IX preparadas por microemulsão, em acetonitrila, após diferentes tempos de irradiação com laser de 532nm.

Para avaliar se o decréscimo da absorção da sonda DPBF foi realmente induzido pela reação com o  $^1\text{O}_2$  gerado por foto-excitação das porfirinas, testes controle foram realizados exatamente nas mesmas condições experimentais para avaliar a foto-estabilidade do DPBF e da estabilidade das porfirinas frente ao  $^1\text{O}_2$ .

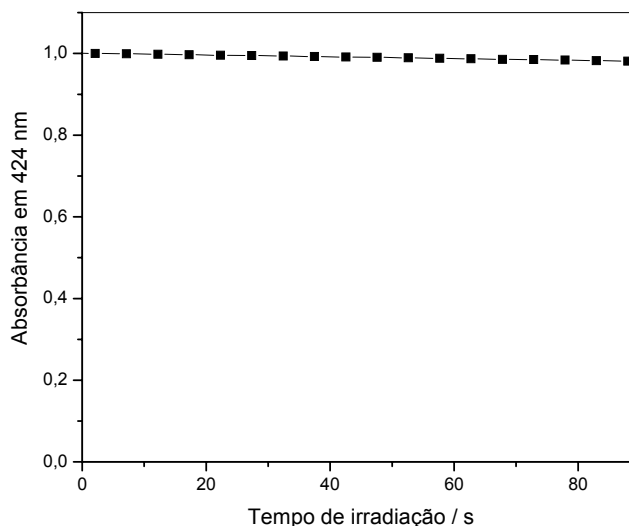
A estabilidade das porfirinas na presença do  $^1\text{O}_2$  gerado por foto-excitação de uma solução contendo Pp IX em acetonitrila foi avaliada. O máximo de absorção da porfirina em 424 nm foi monitorado após intervalos de 2 segundos de irradiação com laser de 532 nm, como apresentado na Figura 20. Não foi observada mudança no máximo de absorção após foto-excitação; portanto, o  $^1\text{O}_2$  gerado não causa a oxidação da porfirina quando irradiada pelo período de tempo acompanhado.



**Figura 20** Absorção da Pp IX em 424 nm como função do tempo de irradiação em 532 nm.

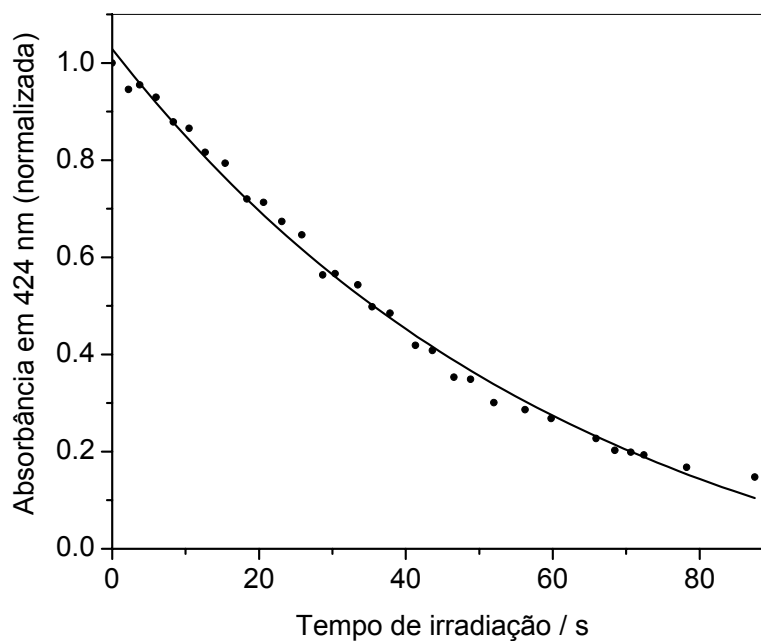
A foto-estabilidade de uma solução de DPBF em acetonitrila quando irradiada com laser de 532 nm, na ausência de fotossensibilizador, foi

avaliada. A absorção do DPBF em 424 nm foi monitorada após intervalos de 2 segundos de irradiação, como apresentado na Figura 21. Não foi observada alteração no máximo de absorção após foto-excitação; portanto, o DPBF mostrou-se estável pelo período de irradiação acompanhado.

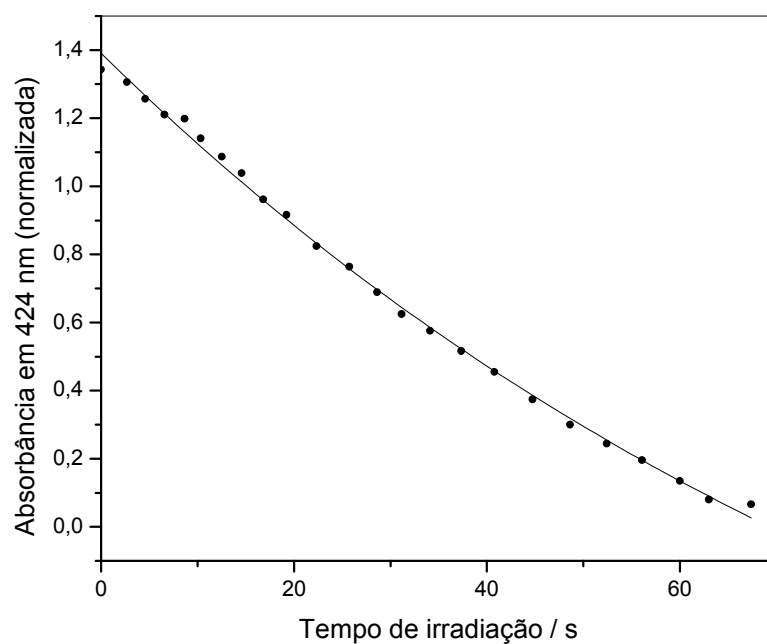


**Figura 21** Absorção de DPBF em 424 nm como função do tempo de irradiação em 532 nm.

Assim, ficou demonstrado que não houve alteração na absorção da sonda DPBF na ausência de fotossensibilizador, nem na absorção da Pp IX em solução quando irradiadas com laser de 532 nm por aproximadamente 80 s. Portanto, o DPBF é fotoestável e a Pp IX não é oxidada pelo  $^1\text{O}_2$  gerado mediante irradiação em 532 nm e as curvas de decaimento do DPBF em presença de esferas de sílica carregadas com Pp IX e Hp IX obtidas a partir dos dados das Figuras 18 e 19, e apresentadas nas Figuras 22 e 23, respectivamente, só poderiam ser causadas pela presença simultânea de fotossensibilizador, DPBF e luz.



**Figura 22** Curva de decaimento da absorção da DPBF em 424 nm na presença de esferas de sílica carregadas com Pp IX preparadas por sol-gel como função do tempo de irradiação com laser de 532nm.



**Figura 23** Curva de decaimento da absorção da DPBF em 424 nm na presença de esferas de sílica carregadas com Hp IX preparadas por microemulsão como função do tempo de irradiação com laser de 532nm.

Em sistemas onde o fotossensibilizador está imobilizado em sílica, o  $^1\text{O}_2$  gerado por um processo de foto-excitação poderia ser eventualmente suprimido pela matriz de sílica. Para verificar a interação do  $^1\text{O}_2$  gerado com sílica foram registrados os espectros de emissão do  $^1\text{O}_2$  gerados por Hp IX em solução de acetonitrila, e de duas amostras onde foram adicionadas diferentes porções de esferas de sílica puras. Os resultados mostraram não haver mudanças na intensidade de emissão em 1270 nm para Hp IX em solução de acetonitrila anterior,  $I_{1270 \text{ nm}} = 569 \pm 4$ , e depois da adição da primeira,  $I_{1270 \text{ nm}} = 568 \pm 5$ , e da segunda,  $I_{1270 \text{ nm}} = 574 \pm 8$ , porção de sílica na solução contendo o fotossensibilizador. Assim, descartam-se problemas de supressão de  $^1\text{O}_2$  por sílica nos sistemas propostos.

A estimativa da eficiência de entrega de  $^1\text{O}_2$  gerado por foto-excitação da porfirina imobilizada pode ser calculada admitindo-se que o tempo de decaimento observado nas Figuras 22 e 23 é inversamente proporcional à velocidade de reação do DPBF com o  $^1\text{O}_2$ . Para isso, deve-se conhecer o rendimento quântico e o tempo de decaimento do DPBF em presença de uma solução padrão, e usar o tempo de decaimento do DPBF em presença da porfirina para calcular a eficiência de geração de  $^1\text{O}_2$ . Assim, a equação 5 (parte experimental) foi utilizada para o cálculo de eficiência de geração do  $^1\text{O}_2$  por partículas carregadas com porfirinas ( $\eta_{\Delta\text{particula}}$ ), usando uma solução de azul de metileno (AM) em acetonitrila como padrão.

Embora muito empregado em estudos fotoquímicos, o valor de rendimento quântico do azul de metileno no solvente escolhido, acetonitrila, não foi encontrado na literatura. Assim, o método descrito por Spiller e

colaboradores (1998) foi empregado para estimar o valor absoluto do rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  do azul de metileno em acetonitrila, utilizando a metodologia e as equações 6 a 8 descritas na parte experimental. O valor encontrado foi  $\Phi_{\text{MB}} = 0.6 \pm 0.04$ , que é um pouco maior que o valor dado por Spiller e colaboradores (1998) para o rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  gerado por azul de metileno em metanol ( $\Phi_{\text{MB}} = 0.49 \pm 0.06$ ).

Um outro aspecto investigado foi a possibilidade de utilização de uma solução de azul de metileno (que não apresenta absorção em 400 nm) como padrão para o fotossensibilizador imobilizado em sílica (que apresenta absorção na região causada pelo espalhamento de luz) sem com isso incorrer em erros nas medidas do tempo de decaimento de sonda DPBF. Assim, curvas de decaimento de DPBF foram construídas, a partir dos dados da Figura 18 e do padrão azul de metileno, tomando os dados de absorbância em diferentes comprimentos de onda para o cálculo dos tempos de decaimento que são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Tempo de decaimento da sonda DPBF em presença do Pp IX e azul de metileno

$\lambda$ (nm)	$t$ (s)	
	Pp IX	AM
380	64,4	111,7
390	65,6	112,0
410	67,0	112,2
424	63,0	112,6
440	63,0	112,0
Média e desvio	64,6 $\pm$ 1,7	112,1 $\pm$ 0,3



Os tempos de decaimento da sonda DPBF foram obtidos com um erro de 0,3 % quando calculado nos diferentes comprimentos de onda para uma solução de azul de metileno e 2,6 % para suspensões de sílica carregadas com Pp IX. O maior erro encontrado para o fotossensibilizador imobilizado é provavelmente devido ao pronunciado espalhamento de luz (cerca de 1 unidade de diferença na absorbância foi encontrada entre  $A_{380}$  a  $A_{440}$ ), mas ainda muito pequeno para resultar em erro significativo no método empregado para a determinação da eficiência na geração de  $^1O_2$  por fotossensibilizadores imobilizados.

As curvas de decaimento da absorção de DPBF em 424 nm em função de tempo de irradiação na presença de esferas de sílica carregadas com Pp IX (sol-gel) (Figura 18), Hp IX(microemulsão) (Figura 19) e azul de metileno (padrão) em solução de acetonitrila foram ajustadas a decaimento exponencial de primeira ordem para determinar o tempo de decaimento da sonda DPBF (Tabela 2). A eficiência da entrega do oxigênio singlete ( $\eta_{\Delta}$ ) por partículas de sílica carregadas com porfirinas foi calculada através da equação 5 (parte experimental) usando os tempos de decaimento da sonda DPBF e o valor absoluto do rendimento quântico do  $^1O_2$  do azul de metileno em acetonitrila determinada neste trabalho,  $\Phi_{\Delta} = 0,6 \pm 0,04$ . Os dados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Apesar das dificuldades experimentais; por exemplo, em estimar a influência do espalhamento de luz na determinação da concentração de porfirina imobilizada, acredita-se que os valores apresentados na Tabela 2 são acurados, pois não foi observado efeito considerável do espalhamento

de luz nos valores de tempo de decaimento do DPBF, conforme discutido anteriormente.

**Tabela 2.** Tempos de decaimento da sonda DPBF e eficiência de entrega de  $^1\text{O}_2$ .

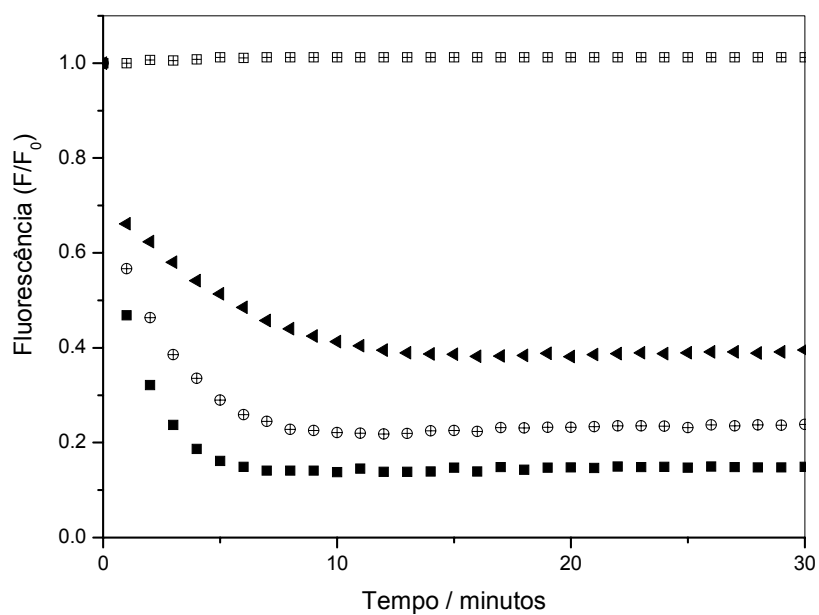
Material	t (s)		$\eta_{\Delta}$
	Padrão (AM)	Amostra	
Pp IX (sol-gel)	101 s	64 s	$0,9 \pm 0,06$
Hp IX (microemulsão)	101 s	99 s	$0,6 \pm 0,04$

Os valores de  $\eta_{\Delta}$  obtidos para as porfirinas imobilizadas são similares ou até maiores que o rendimento quântico encontrados na literatura para porfirinas livre ( $\Phi_{\Delta} = 0,77$  em  $\text{CCl}_4$ ;  $\Phi_{\Delta} = 0,60$  em solução aquosa TX100) (Redmond, R. W. et al, 1999), o que indica que o  $^1\text{O}_2$  gerado pelo fotossensibilizador imobilizado na matriz de sílica difunde de forma eficiente através da matriz de sílica e pode ser detectado em solução. O aumento na eficiência pode ser uma consequência de mudanças nos equilíbrios monômero-dímero presentes em solução, pois a porfirina está firmemente ligada à matriz de sílica, especialmente na amostra que foi modificada por grupos alcóxissilanos. É conhecido que a formação de agregados (dímeros, trímeros, etc.) que ocorrem em solução, principalmente em função da concentração, reduzem a produção e o tempo de vida do estado tripleto excitado da porfirina e, conseqüentemente, devem reduzir o rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  (Aggarwal, L. P. F; Gamlin, J. N, 2007; Borissevitch, I. E, Tominaga, T. T., Schimitt, C. C. J, 1998).

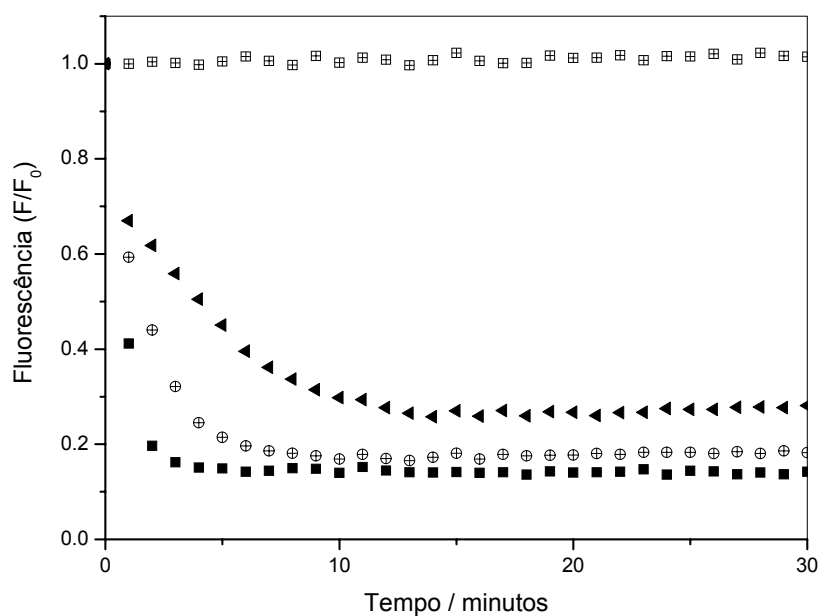
### 4.3 Estudo da interação de porfirinas livres e imobilizadas em esferas de sílica com ferro

A aplicação de sondas fluorescentes para analisar ferro em sistemas biológicos tem sido reportada, devido à importância do ferro em vários processos fisiológicos e em múltiplas funções enzimáticas (Keyer, K, Imlay, J. A, 1996), mas especialmente em caso de sobrecarga de ferro, que está associada à talassemia, hemocromatose e siderose transfusional (Espósito et al, 2002). Neste contexto, a investigação de sondas fluorescentes para detecção de ferro torna-se relevante (Domaille, D. W. et al. 2008). Estudos relativos ao uso de sondas imobilizadas em nanomateriais com o objetivo de detectar ferro, considerando todas as vantagens do uso de sondas nanométricas, ainda não são encontrados na literatura. Assim, a avaliação da capacidade de complexação da Hp IX livre e imobilizada em esferas de sílica frente ao ferro e o potencial uso como uma sonda nanométrica foi investigada.

Com base nas curvas de supressão de fluorescência da Hp IX livre e imobilizada em esferas de sílica (Figuras 24 e 25, respectivamente) pode-se observar que a Hp IX possui sítios capazes de complexar ferro, já que a emissão em 629 nm ( $\lambda_{exc} = 405$  nm) foi suprimida na presença de ferro e se manteve estável na ausência do metal. O comportamento observado foi similar para a porfirina livre e imobilizada, mostrando que a porfirina está acessível ao ferro após imobilização. O tempo necessário para atingir o equilíbrio da reação foi de aproximadamente 15 minutos para a faixa de concentração investigada.

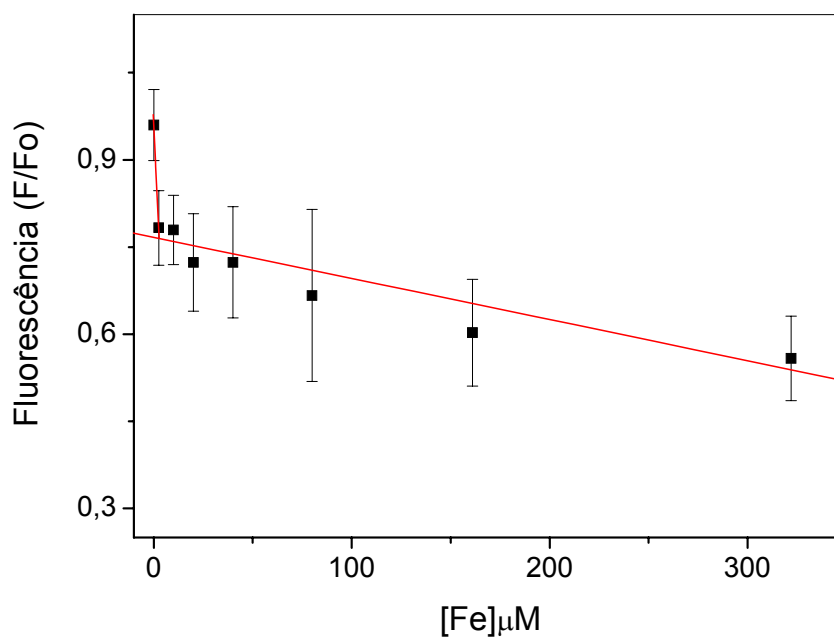


**Figura 24** Curva de supressão de fluorescência de uma solução contendo Hp IX livre e ferro nas concentrações 0, 7, 21 e 64 μM.

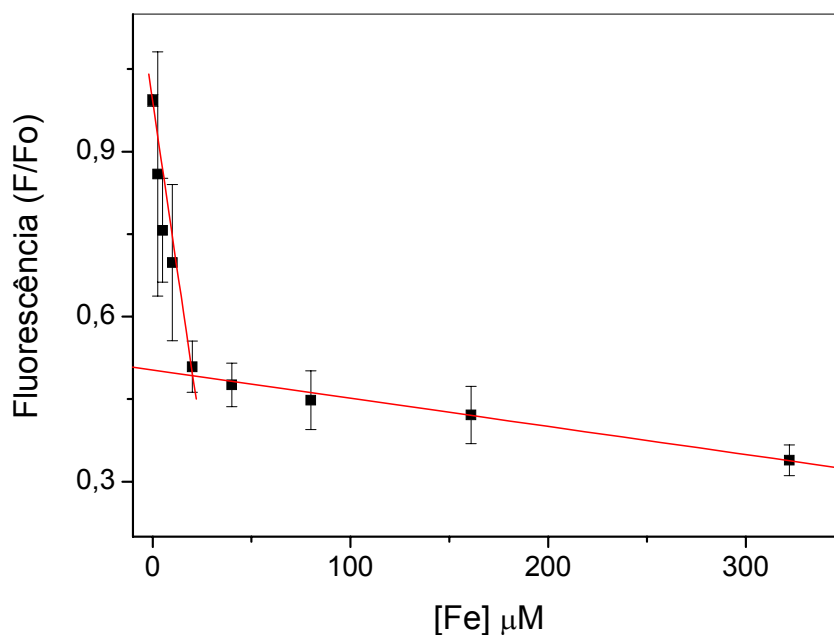


**Figura 25** Curva de supressão de fluorescência de uma suspensão de esferas de sílica contendo Hp IX e ferro nas concentrações 0, 7, 21 e 64 μM.

Os dados de supressão de fluorescência da Hp IX livre e imobilizada em esferas de sílica em função de diferentes concentrações de ferro após 20 minutos de reação são apresentados nas Figuras 26 e 27, respectivamente. Os dados de decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX foram ajustados para duas retas de diferentes inclinações. Pode-se sugerir pela observação da reta com maior inclinação, que neste intervalo de concentração de ferro existem sítios de forte interação ferro-porfirina, enquanto que a reta com menor inclinação sugere sítios de fraca interação.



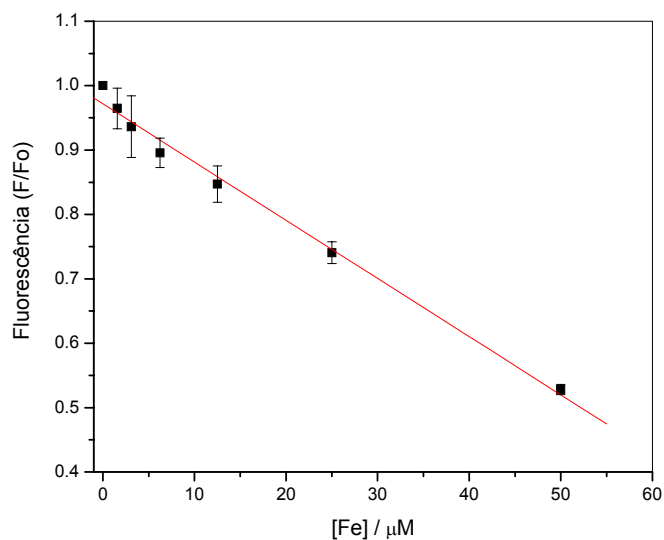
**Figura 26** Curva do decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX livre (1,12 μM) com concentrações de ferro na faixa de 0 a 320 μM após 20 min. de reação.



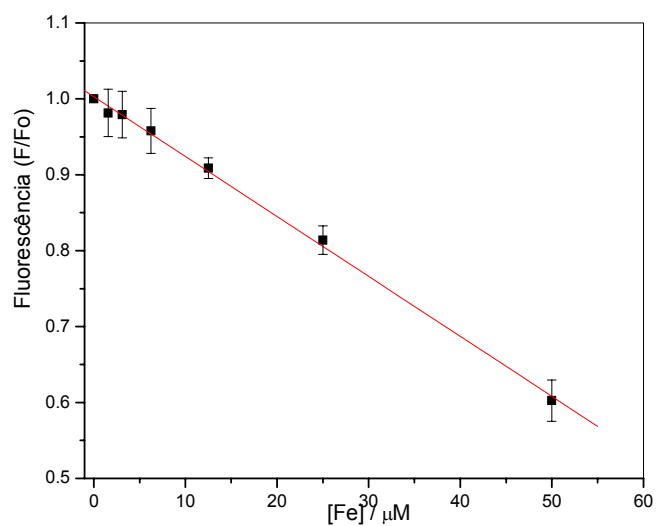
**Figura 27** Curva do decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX immobilizada em sílica com concentrações de ferro na faixa de 0 a 320  $\mu\text{M}$  após 20 min. de reação.

Para melhor avaliar a supressão da fluorescência da Hp IX livre e immobilizada em esferas de sílica frente ao ferro foram realizados novos testes com maior concentração de porfirina e na faixa de concentração de ferro compreendida entre 0 e 60  $\mu\text{M}$ . Os resultados demonstraram que a supressão de fluorescência para Hp IX livre e para Hp IX immobilizada em esferas de sílica obedecem um comportamento linear nesta faixa de concentração (Figuras 28 e 29, respectivamente), que corresponde a uma faixa de concentração relevante para determinação de ferro em meio biológico normalmente menor de 20  $\mu\text{M}$  (Espósito, B. P. et al 2003). Pode-se observar também que a intensidade de fluorescência sofre um decaimento de 50% para Hp IX livre e de 40% para Hp IX immobilizada em esferas de

sílica para a maior concentração de ferro estudada após 20 minutos de reação.

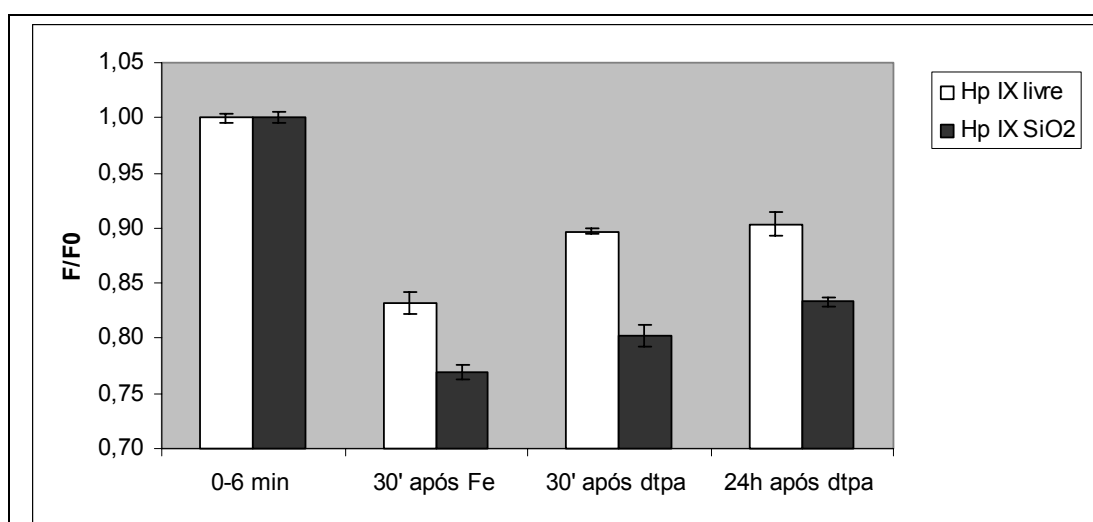


**Figura 28** Curva do decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX livre (7,14  $\mu\text{M}$ ) com concentrações de ferro na faixa de 0 a 60  $\mu\text{M}$  após 20 min. de reação ( $R^2=0,991$ ).



**Figura 29** Curva do decaimento da intensidade de fluorescência da Hp IX immobilizada em esferas de sílica com concentrações de ferro na faixa de 0 a 60  $\mu\text{M}$  após 20 min. de reação ( $R^2=0,999$ ).

Estudos foram realizados para avaliar se a fluorescência suprimida pela presença de ferro poderia ser recuperada pela adição de um ligante quelante com grande afinidade pelo ferro. Inicialmente foram preparadas soluções contendo Hp IX livre e imobilizada em esferas de sílica, que foram submetidas a 50  $\mu\text{M}$  de ferro, para causar supressão da fluorescência da porfirina. Depois de 30 minutos, foram adicionados a cada solução 200  $\mu\text{M}$  do quelante ácido dietilenotriaminopentaacético (dtpa). A recuperação da fluorescência foi avaliada após 30 min e após 24h, conforme apresentado no gráfico da Figura 30.



**Figura 30** Supressão e recuperação da fluorescência de amostras de Hp IX livre e Hp IX imobilizada em esferas de sílica com adição de ferro e posterior adição do quelante dtpa.

Não houve recuperação de 100% de fluorescência nas amostras contendo porfirina livre e imobilizada em sílica, mas isso pode ser devido à elevada estabilidade das ferroporfirinas formadas. Portanto a supressão não é totalmente reversível, o que seria muito indicado para o uso das porfirinas como uma sonda para ferro.



## 5. CONCLUSÕES

Neste estudo foram desenvolvidas metodologias para a imobilização de porfirinas em nanoesferas de sílica de tamanho inferior a 100 nm. O emprego do método sol-gel foi possível apenas com a modificação prévia das moléculas de porfirina com grupos alcoxisilanos, que promovem a ligação covalente da porfirina à matriz de sílica pela condensação simultânea da porfirina sililada e do tetraetoxisilano. Também foi possível imobilizar porfirinas, sem a necessidade de modificação prévia, em esferas de sílica via microemulsão.

As porfirinas imobilizadas em sílica preservaram suas propriedades óticas e a capacidade de interagir com oxigênio molecular. As amostras irradiadas foram capazes de gerar oxigênio singlete com uma eficiência similar ou até superior ao rendimento quântico das porfirinas livres. Isto foi atribuído à maior dispersão das porfirinas na matriz de sílica e a menor taxa de formação de agregados, já que em solução os equilíbrios dímero-monômeros levam à redução do rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$ . Ainda, as porfirinas originalmente pouco solúveis em água puderam ser dispersas em solução aquosa, o que caracteriza outra vantagem para possíveis aplicações biomédicas e bioanalíticas. Além disso, a sílica é muito versátil como material de apoio estruturalmente mais estável, biocompatível, e quimicamente mais resistente do que os materiais poliméricos orgânicos, oferecendo maior facilidade de modificação de superfície e biodirecionamento para entrega em sítios específicos.

Quanto à avaliação da interação das porfirinas imobilizadas em sílica com ferro, foi observada a supressão da fluorescência tanto da porfirina livre quanto da imobilizada. Foram detectados dois tipos de interação em função da faixa de concentração de ferro, atribuídos a sítios de forte e fraca interação ferro-porfirina. Um comportamento linear da supressão da fluorescência em função da concentração de ferro foi alcançado na faixa de 0 a 60  $\mu\text{M}$  de ferro. O processo não é totalmente reversível, já que a fluorescência não foi totalmente recuperada pela adição de um quelante. Ainda assim, os nanomateriais carregados com porfirinas são candidatos a sensores nanométricos para ferro.

Os resultados gerados neste trabalho foram importantes para estabelecer metodologias para (i) sintetizar esferas sílica carregadas com porfirinas, (ii) avaliar a acessibilidade das moléculas imobilizadas numa matriz inorgânica, (iii) avaliar a geração e eficiência de entrega de oxigênio singlete por porfirinas imobilizadas tanto pelo método direto quanto pelo método indireto, e o potencial uso em terapia fotodinâmica (iii) avaliar a supressão de fluorescência de porfirinas imobilizadas pela presença de ferro, e o potencial uso na detecção de metais.

As metodologias sintéticas e analíticas aqui relatadas são muito gerais e poderão ser aplicadas a vários outros fotossensibilizadores para a preparação de nanoesferas de sílica como carregadores de drogas ou sensores.

## 6. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, L. P. F.; BAPTISTA, M. S.; BORISSEVITCH, I. E. Effects of NaCl upon TPPS4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 186(2-3), 187-193 **2007**.

BAGWE, R. P.; ZHAO, X.; TAN, W. Bioconjugated luminescent nanoparticles for biological application *Journal of Dispersion Science and Technology*, 24(3-4), 453-464, **2003**.

BORISSEVITCH, I. E.; TOMINAGA, T. T.; IMASATO, H.; TABAK, M. Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation *Journal of Luminescence*, 69(2), 65-76, **1996**.

BORISSEVITCH, I. E.; TOMINAGA, T. T.; SCHMITT, C. C. Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 114(3), 201-207, **1998**.

BRASUEL, M.; KOPELMAN, R.; MILLER, T. J.; TJALKENS, R. N; PHILBERT, M. A. Fluorescent nanosensors for intracellular chemical analysis: Decyl methacrylate liquid polymer matrix and ion-exchange-based potassium PEBBLE sensors with real-time application to viable rat C6 glioma cells. *Analytical Chemistry* 73(10), 2221-2228, **2001**.

BUCK, S. M.; KOO, Y. L.; PARK, E.; XU, H.; PHILBERT, M. A.; BRASUEL, M. A.; KOPELMAN, R. Optochemical nanosensor PEBBLEs: photonic explorers for bioanalysis with biologically localized embedding. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(5), 540-546, **2004**.

BURDO, J. R.; CONNOR, J. R. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *BioMetals*, 16(1), 63-75, **2003**.

CHANG, C.; FOGLER, H. S. Controlled Formation of Silica Particles from Tetraethyl Orthosilicate in Nonionic Water-in-Oil Microemulsions. *Langmuir*, 13(13), 3295-3307, **1997**.

CLARK, H. A.; BARKER, S. L. R.; BRASUEL, M.; MILLER, M. T.; MONSON, E.; PARUS, S.; SHI, Z.; SONG, A.; THORSRUD, B.; KOPELMAN, R.; ADE, A.; MEIXNER, W.; ATHEY, B.; HOYER, M.; HILL, D.; LIGHTLE, R.; PHILBERT, M. A. Subcellular optochemical nanobiosensors: probes encapsulated by biologically localized embedding (PEBBLEs). *Sensors and Actuators, B: Chemical*, B51(1-3), 12-16, **1998**.

CLARK, H. A.; HOYER, M.; PARUS, S.; PHILBERT, M. A.; KOPELMAN, R. Optochemical nanosensors and subcellular applications in living cells. *Mikrochimica Acta*, 131(1-2), 121-128, **1999**.

CLARK, H. A.; HOYER, M.; PHILBERT, M. A.; KOPELMAN, R. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 1. Fabrication, characterization, and methods for intracellular delivery of PEBBLE sensors. *Analytical chemistry*, 71(21), 4831-6, **1999**

CONSTANTINIDES, P. P.; LANCASTER, C. M.; MARCELLO, J.; CHIOSSONE, D. C.; ORNER, D.; HIDALGO, I.; SMITH, P. L.; SARKAHIAN, A. B.; YIV, S. H.; Enhanced intestinal absorption of an RGD peptide from water-in-oil microemulsions of different composition and particle size. *Journal of Controlled Release*, 34(2), 109-16, **1995**.

CONSTANTINIDES, P. P.; SCALART, J.; LANCASTER, C.; MARCELLO, J.; MARKS, G.; ELLENS, H.; SMITH, P. L. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. *Pharmaceutical Research*, 11(10), 1385-90, **1994**.

CONSTANTINIDES, P. P.; WELZEL, G.; ELLENS, H.; SMITH, P. L.; STURGIS, S.; YIV, S. H.; OWEN, A. B. Water-in-oil microemulsions containing medium-chain fatty acids/salts: formulation and intestinal absorption enhancement evaluation. *Pharmaceutical research*, 13(2), 210-5, **1996**.

CRICHTON, R. R.; WILMET, S.; LEGSSYER, R.; WARD, R. J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1), 9-18, **2002**.

DALMORA, M. E.; OLIVEIRA, A. G. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. *International journal of pharmaceuticals*, 184(2), 157-64, **1999**.

DE SILVA, A. P.; EILERS, J.; ZLOKARNIK, G. Emerging fluorescence sensing technologies: from photophysical principles to cellular applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), 8336-7, **1999**.

DENG, T.; LI, J.; JIANG, J.; SHEN, G.; YU, R. Preparation of near-IR fluorescent nanoparticles for fluorescence-anisotropy-based immunoagglutination assay in whole blood. *Advanced Functional Materials*, 16(16), 2147-2155, **2006**.

DOMAILLE, D. W.; QUE, E. L.; CHANG, C. J. Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals. *Nature Chemical Biology*, 4(3), 168-175, **2008**.

ENGELMANN, F. M.; MAYER, I.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.; BAPTISTA, M. S.; MAEDA, H.; OSUKA, A.; FURUTA, H. Photochemistry of doubly *N*-confused porphyrin bonded to non-conventional high oxidation state Ag(III) and Cu(III) ions *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 163(3), 403-411, **2004**.

ESPOSITO, B. P.; BREUER, W.; SIRANKAPRACHA, P.; POOTRAKUL, P.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*, 102(7), 2670-2677, **2003**.

ESPOSITO, B. P.; EPSZTEJN, S.; BREUER, W.; CABANTCHIK, Z. I. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 304(1), 1-18, **2002**.

FERNANDES, A. U. Síntese, Caracterização e Fotoatividade de Fotossensibilizadores derivados de Protoporfirina IX e Clorofilina. 2007, 222f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. **2007**.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JUNIOR, A.A; GREMIÃO, M. P. D; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(3), 301-313, **2005**.

FRIBERG, S. E.; BOTHOREL, P. Microemulsions: Structure and dynamics. New York: CRC, 219p, **1988**.

HE, X.; DUAN, J.; WANG, K.; TAN, W.; LIN, X.; HE, C. A novel fluorescent label based on organic dye-doped silica nanoparticles for HepG liver cancer cell recognition. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4(6), 585-589, **2004**.

HE, X.; WANG, K.; TAN W.; LIU, B.; LIN, X.; HE, C.; LI, D.; HUANG, S.; LI, J. Bioconjugated Nanoparticles for DNA Protection from Cleavage *Journal of the American Chemical Society*, 125(24), 7168-7169, **2003**.

HO, H.; HSIAO, C.; SHEU, AND MING-THAU. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(2), 138-43, **1996**.

HUTENER, C. A.; SANDERS, J. K. M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 5525, **1990**.  
JOHNSON, I. Fluorescent probes for living cells. *Histochemical Journal*, 30(3), 123-140, **1998**.

JORI, G. Novel therapeutic modalities based on photosensitized processes. *EPA Newsletter*, 60, 12-18, **1997**.

JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. Modulation of Methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics* 4(11), 2320-2328, **2002**.

KEYER, K.; IMLAY, J. A. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13635-13640, **1996**.

KICKELBICK, G. Concepts for the incorporation of inorganic building blocks into organic polymers on a nanoscale. *Progress in Polymer Science*, 28(1), 83-114, **2002**.

KIPP, R. A.; LI, Y.; SIMON, J. A.; SCHMEHL, R. H. A tetra-( bipyridylphenyl ) porphyrin for luminescence sensing of divalent metal ions. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 121(1), 27-36, **1999**.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(2), 89-106, **2002**.

KRISHNAMOORTI, R.; VAIA, R. A.; GIANNELIS, E. P. Structure and Dynamics of Polymer-Layered Silicate Nanocomposites. *Chemistry of Materials*, 8(8), 1728-1734, **1996**.

LAWRENCE, M. J. Microemulsions as drug delivery vehicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1(6), 826-832, **1996**.

LEE, M.; LEE, M.; SHIM, C. Inverse targeting of drugs to reticuloendothelial system-rich organs by lipid microemulsion emulsified with poloxamer 338. *International Journal of Pharmaceutics*, 113(2), 175-87, **1995**.

LOBNIK, A.; OEHME, I.; MURKOVIC, I.; WOLFBEIS, O. S.; pH optical sensors based on sol-gels: Chemical doping versus covalent immobilization. *Analytica Chimica Acta*, 367, 159-165, **1998**.

LU, J.; ROSENZWEIG, Z. Nanoscale fluorescent sensors for intracellular analysis. *Fresenius journal of analytical chemistry*, 366(6-7), 569-75, **2000**.

LUBEC, G. The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 44(6), 324-46, **1996**.

MCNAMARA, K. P.; NGUYEN, T.; DUMITRASCU, G.; JI, J.; ROSENZWEIG, N.; ROSENZWEIG, Z. Synthesis, characterization, and application of

fluorescence sensing lipobeads for intracellular pH measurements. *Analytical Chemistry*, 73(14), 3240-3246, **2001**.

MONSON, E.; BRASUEL, M.; PHILBERT, M. A.; KOPELMAN, R. PEBBLE nanosensors for in vitro bioanalysis. *Biomedical Photonics Handbook*, 59/1-59/14, **2003**.

PARK, E. J.; BRASUEL, M.; BEHREND, C.; PHILBERT, M. A.; KOPELMAN, R. Ratiometric optical PEBBLE nanosensors for real-time magnesium ion concentrations inside viable cells. *Analytical Chemistry*, 75(15), 3784-3791, **2003**.

PETRAT, F.; DE GROOT, H.; RAUEN, U. Determination of the Chelatable Iron Pool of Single Intact Cells by Laser Scanning Microscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376(1), 74-81, **2000**.

QHOBOSHEANE, M.; SANTRA, S.; ZHANG, P.; TAN, W. Biochemically functionalized silica nanoparticles. *Analyst*, Cambridge, United Kingdom, 126(8), 1274-1278, **2001**.

REDMOND, R. W.; GAMLIN, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 70(4), 391-475, **1999**.

ROSSI, L. M.; SHI, L.; QUINA, F. H.; ROSENZWEIG, Z. Stober synthesis of mono-dispersed luminescent silica nanoparticles for bioanalytical assays. *Langmuir*. v.21, p.4277 - 4280, **2005**.

ROSSI, L. M.; SHI, L.; ROSENZWEIG, N.; ROSENZWEIG, Z. Fluorescent silica nanospheres for digital counting bioassay of the breast cancer marker HER2/neu. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(10), 1900-1906, **2006**.

ROY, I.; OHULCHANSKY, T. Y.; PUDAVAR, H. E.; BERGEY, E. J.; OSEROFF, A. R.; MORGAN, J.; DOUGHERTY, T. J.; PRASAD, P. N. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 125(26), 7860-7865, **2003**.

SANTRA, S.; ZHANG, P.; WANG, K. M.; TAPEC, R.; TAN, W. H. Conjugation of Biomolecules with Luminophore-Doped Silica Nanoparticles for Photostable Biomarkers *Analytical Chemistry* 73(20), 4988-4993, **2001**.

SASAKI, K.; SHI, Z.; KOPELMAN, R.; MASUHARA, H. Three-dimensional pH microprobing with an optically-manipulated fluorescent particle. *Chemistry Letters* (2), 141-2, **1996**.

SCHOTTNER, G. Hybrid Sol-Gel-Derived Polymers: Applications of Multifunctional Materials. *Chemistry of Materials*, 13(10), 3422-3435, **2001**.

SCHUETZ, W.; CARUSO, F. Electrostatically Assembled Fluorescent Thin Films of Rare-Earth-Doped Lanthanum Phosphate Nanoparticles *Chemistry of Materials*, 14(11), 4509-4516, **2002**.

SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H. C.; GABRIELLI, D. S.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue *Photochemistry and Photobiology* 77(5), 459-468, **2003**.

SHALOM, S.; STRINKOVSKI, A.; PELEG, G.; DRUCKMANN, S.; KRAUSS, A.; LEWIS, A.; LINIAL, M.; OTTOLENGHI, M. An optical submicrometer calcium sensor with conductance sensing capability. *Analytical Biochemistry*, 244(2), 256-259, **1997**.

SPILLER, W.; KLIESCH, H.; WOHRELE, D.; HACKBARTH, S.; RODER, B.; SCHNURPFEIL, G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions *Journal of Porphyrin Phthalocyanines*, 2(2), 145-158, **1998**.

STOBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62-9, **1968**.

SUMNER, J. P.; AYLOTT, J. W.; MONSON, E.; KOPELMAN, R. A fluorescent PEBBLE nanosensor for intracellular free zinc. *Analyst*, Cambridge, United Kingdom, 127(1), 11-16, **2002**.

SUMNER, J. P.; KOPELMAN, R. Alexa Fluor 488 as an iron sensing molecule and its application in PEBBLE nanosensors. *The Analyst*, 130(4), 528-33, **2005**.

TADA, D. B. *Desenvolvimento de Nanopartículas Fotossensibilizadoras*. 2007, 104f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. **2007**.

TADA, D. B.; VONO, L. L. R.; DUARTE, E. L.; ITRI, R.; KIYOHARA, P. K.; BAPTISTA, M. S.; ROSSI, L. M. Methylene Blue-Containing Silica-Coated Magnetic Particles: A Potential Magnetic Carrier for Photodynamic Therapy *Langmuir*, 23(15), 8194-8199, **2007**.

TAIMA, H.; OKUBO, A.; YOSHIOKA, N.; INOUE, H. Synthesis of cationic water-soluble esters of chlorin e6. *Tetrahedron Letters*, 46(24), 4161-4164, **2005**.

TAN, W. Optical measurements on the nanometer scale. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 17(8+9), 501-513, **1998**.



TAN, W.; WANG, K.; HE, X.; ZHAO, X. J.; DRAKE, T.; WANG, L.; BAGWE, R. P. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Medicinal Research Reviews*, 24(5), 621-638, **2004**.

TAPEC, R.; ZHAO, X. J.; TAN, W. Development of Organic Dye-Doped Silica Nanoparticles for Bioanalysis and Biosensors *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2(3), 405-409, **2002**.

TARDIVO, J. P.; DEL GIGLIO, A.; SANTOS DE OLIVEIRA, C.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIello, R. D. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3), 175-191, **2005**.

VAIA, R. A.; ISHII, H.; GIANNELIS, E. P. Synthesis and properties of two-dimensional nanostructures by direct intercalation of polymer melts in layered silicates. *Chemistry of Materials*, 5(12), 1694-6, **1993**.

VAN BLAADEREN, A.; VRIJ, A. Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres. *Langmuir*, 8(12), 2921-31, **1992**.

VO-DINH, T.; CULLUM, B. M.; STOKES, D. L. Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, B74(1-3), 2-11, **2001**.

WANG, L.; TAN, W. Multicolor FRET Silica Nanoparticles by Single Wavelength Excitation. *Nano Letters*, 6(1), 84-88, **2006**.

WANG, S.; GAO, R.; ZHOU, F.; SELKE, M. Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 14(4), 487-493, **2004**.

WEN, J.; WILKES, G. L. Organic/Inorganic Hybrid Network Materials by the Sol-Gel Approach. *Chemistry of Materials*, 8(8), 1667-1681, **1996**.

WILKINSON, F.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B.; *J. Phys. Chem*, 24, 663, **1995**.

XIN, QUAN.; WIGHTMAN, R. M. Simultaneous Detection of Catecholamine Exocytosis and Ca<sup>2+</sup> Release from Single Bovine Chromaffin Cells Using a Dual Microsensor. *Analytical Chemistry*, 70(9), 1677-1681, **1998**.

XU, H.; AYLOTT, J. W.; KOPELMAN, R.; MILLER, T. J.; PHILBERT, M. A. A real-time ratiometric method for the determination of molecular oxygen inside living cells using sol-gel-based spherical optical nanosensors with applications to rat C6 glioma. *Analytical Chemistry*, 73(17), 4124-4133, **2001**.

YAN, J.; ESTÉVEZ, C.; SMITH, J. E.; WANG, K.; HE, X.; WANG, L.; TAN, W. Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nanotoday*, 2(3), 44-50, **2007**.

ZHAO, X.; BAGWE, R. P.; TAN, W. Development of Organic-Dye-Doped Silica Nanoparticles in a Reverse Microemulsion *Advanced Materials*, 16(2), 173-176, **2004**.

ZHAO, X.; HILLIARD, L. R.; MECHERY, S. J.; WANG, Y.; BAGWE, R. P.; JIN, S.; TAN, W. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42), 15027-15032, **2004**.

ZHAO, X.; TAPEC-DYTIOCO, R.; TAN, W. Ultrasensitive DNA Detection Using Highly Fluorescent Bioconjugated Nanoparticles *Journal of the American Chemical Society*, 125(38), 11474-11475, **2003**.

ZPUNAR, J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*, Cambridge, United Kingdom, 125(5), 963-988, **2000**.

## ANEXO A - SÚMULA CURRICULAR

Nome: Paulo Rogério da Silva

Nascimento: Barbosa – SP em 17/06/1980

### EDUCAÇÃO

Colégio: Organização Cultural das Escolas Unidas (OCEU), Curso técnico em processamento de dados – Penápolis – São Paulo: 1997.

Graduação: Universidade Estadual de Londrina (UEL), curso de química – Londrina – Paraná: 2003.

### OCUPAÇÃO

Professor, EE. Carlos Lencastre, 2006-2008

### PUBLICAÇÕES

#### Resumos em Congressos

- SILVA, P. R., BAPTISTA, M. S., KIYOHARA, P. K., ROSSI, L. M. Imobilização da hematoporfirina em sílica nanoparticulada: potencial uso em PDT In: II workshop de Terapia Fotodinâmica, 2007, São Pedro. Livro de Resumos. , 2007. p.167.
- FERNANDES, A. U., SILVA, P. R., TADA, D. B., KIYOHARA, P. K., BAPTISTA, M. S., ROSSI, L. M. Protoporfirina imobilizada em esferas de sílica: preparação, propriedades óticas e geração de oxigênio singlete In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia, SP. Livro de Resumos, 2007

#### Artigos completos

- ROSSI, L. M.; SILVA, P. R.; VONO, L. L. R.; FERNANDES, A..U.; TADA, D. B.; BAPTISTA, M. S., Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: preparation, optical properties and singlet oxygen generation, *Langmuir*, 2008,24, 12534-12538.

# 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](#)