

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA

Análise Físico-Química e Fotodinâmica de Clorofila em
Dendrímeros de Poliglicerol

Luciana Veríssimo Militão

Itajubá, dezembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA

Luciana Veríssimo Militão

Análise Físico-Química e Fotodinâmica de Clorofila em
Dendrímeros de Poliglicerol

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Não metais

Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. Alencar de Queiroz

Dezembro de 2013

Itajubá

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá
Bibliotecária Jacqueline Rodrigues de Oliveira Balducci- CRB_6/1698

M644a

Militão, Luciana Veríssimo.

Análise Físico-Química e fotodinâmica de clorofila em dendrímeros de poliglicerol. / Luciana Veríssimo Militão. – Itajubá, (MG) : [s.n.], 2013.

125 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Dentrímero de Poliglicerol. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Clorofila. 4. Câncer da cavidade oral. I. Queiroz, Alvaro Antonio Alencar de, orient. II. Universidade Federal de Itajubá. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA

Luciana Veríssimo Militão

Análise Físico-Química e Fotodinâmica de Clorofila em
Dendrímeros de Poliglicerol

Dissertação aprovada por banca examinadora em 11 de dezembro de 2013, conferindo ao autor o título de *Mestre em Materiais para Engenharia*.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Álvaro A. Alencar de Queiroz (Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Gonçalves Vivas

Prof. Dra. Daniela Sachs

Itajubá

2013

Dedico este trabalho à minha mãe que mesmo de tão longe sempre esteve presente em minha vida, por ter sorrido pra mim até o último momento. Muito obrigada por tudo.

Agradecimentos:

Ao Professor Álvaro, por ter sido um excelente orientador, tão dedicado e compreensivo, por ter me acolhido com tanta presteza, ter me dado a oportunidade de trabalhar com um tema que muito me encantou, por ter sido paciente e atencioso sempre que precisei.

À pessoa que tanto me faz feliz, Thiago, por ser tão companheiro todos os dias, por sempre me apoiar das mais diversas formas, por nunca me deixar desanimar, por estar sempre ao meu lado para dividir as conquistas, os fracassos, as alegrias, as tristezas, até mesmo o cansaço; por todas as vezes que me explicou pacientemente teoria de orbitais, mesmo que eu fizesse sempre as mesmas perguntas, e todo seu esforço pra que eu conseguisse bons resultados na simulação computacional, por todo conhecimento compartilhado.

Ao meu pai, sua esposa e minha irmã, que são pra mim a família que eu preciso, por ter me dado todo o carinho e apoio para que eu pudesse realizar este trabalho.

A todos os meus amigos, em especial Lidi e Carina, pelas conversas divertidas e encorajadoras, por compartilharem suas experiências me incentivando sempre a seguir em frente.

À Tessa pela parceria, desde o primeiro dia em que nos conhecemos vivemos os mesmos “perrengues”, passamos pelas mesmas alegrias, viajamos, tivemos as mesmas preocupações, e mesmo nas preocupações, demos sempre muitas risadas.

Ao Professor Dr. Décio dos Santos Pinto Junior e sua aluna de doutorado Renata Mendes Moura da Faculdade de Odontologia da USP pela disponibilização da infraestrutura e o todo apoio necessário para realização dos ensaios biológicos.

Ao Professor Dr. Elcio Rogerio Barrak e Amanda de Carvalho Pereira pela contribuição nas análises térmicas.

Aos professores membros da banca examinadora pela atenção e contribuição dedicadas a este trabalho.

À Agencia de Fomento CAPES pela bolsa de estudos.

Lista de abreviaturas e siglas

ALA	Ácido 5-aminolevulínico
Ar	Argônio
C	Carbono
CCD	Cromatografia de camada delgada
Chl	Chlorophyll (clorofila)
Chl-a	Chlorophyll a (clorofila a)
Chl-b	Chlorophyll b (clorofila b)
Cl	Cloro
DFT	Density functional theory (teoria do funcional de densidade)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (calorimetria exploratória diferencial)
DTG	Termogravimetria derivada
EPR	Enhanced permeability and retention (permeabilidade e retenção aumentada)
F	Flúor
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier transform infrared (infravermelho por transformada de Fourier)
G0	Geração 0
G1	Geração 1
G2	Geração 2
G3	Geração 3
G4	Geração 4
G5	Geração 5
H	Hidrogênio
He	Hélio
Hp	Hematoporfirina
HPV	Papilomavírus humano
IC	Internal conversion (conversão interna - processo de decaimento energético)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISC	Intersystem crossing (cruzamento intersistemas - processo de decaimento energético)
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação)
Laser KTP	Potassium titanyl phosphate laser
Laser Nd:YAG	Neodymium-doped yttrium aluminum garnet (neodímio dopado granada de ítrio e alumínio)
LASIK	Laser-assisted in situ keratomileusis
Mg	Magnésio
MTS	Sal de tetrazólio - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H- tetrazolium)
Nd	Neodímio
Ne	Neônio

OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma (células de câncer humano da cavidade oral)
PAMAM	Poli (amido aminas)
PDT	Photodynamic Therapy (terapia fotodinamica)
PGLD	Poliglicerol dendrítico
PGLD-Chl-a	Dendrímero de poliglicerol ligado a clorofila a
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPIX	Protoporfirina IX
OS	Photosensitizer (fotossensibilizador)
QSAR	Quantitative structure–activity relationship
QSR	Laser de rubi Qswitched
RET	Resonant energy transfer (transferência de energia ressonante - decaimento energético)
R _f	Retention factor (fator de retenção)
ROS	Reactive oxygen species
S ₀	Estado fundamental
Sigla	Significado
S _x	Estado singleto excitado (x=1, 2, 3, ...)
T ₁	Estado tripleto excitado
TFD	Terapia fotodinâmica
TG	Termogravimetria
T _g	Transição vítrea
UNIFEI	Universidade Federal de Itajubá
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
VR	Vibrational relaxation (relaxamento vibracional -decaimento energético)
Xe	Xenônio

Lista de Figuras

Figura 3.1	Fórmula estrutural de hematoporfirina	15
Figura 3.2	Fórmula estrutural do Photofrin	15
Figura 3.3	Interações entre luz e tecido: (a) refração, (b) reflexão, (c) absorção, (d) espalhamento.	20
Figura 4.1	Estrutura química de: (a) porfirina; (b) anel pirrol; (c) clorina	25
Figura 4.2	Estrutura química de: (a) ciclopentanona; (b) fitol.	26
Figura 4.3	Estrutura química da clorofila <i>a</i>	26
Figura 4.4	Espectro de absorção (linha azul) e fluorescência (linha vermelha) da clorofila <i>a</i>	28
Figura 5.1	Polímeros dendríticos: subclasses da quarta maior nova classe de arquitetura molecular	33
Figura 5.2	Representação da geração 4 de um dendrímero	35
Figura 5.3	Métodos de crescimento de dendrímeros: (a) divergente e (b) convergente	36
Figura 5.4	a) Molécula hóspede encapsulada na “caixa dendrítica”; b) molécula hospede ligada covalentemente na periferia do dendrímero.	37
Figura 5.5	Dendrímero de poliglicerol de geração 4, as esferas vermelhas representam o oxigênio e as pretas o carbono	40
Figura 6.1	Um segundo fóton pode estimular o átomo a emitir em um tempo menor que o tempo de vida espontâneo	42
Figura 6.2	A luz do laser faz muitas viagens de ida e volta entre os espelhos, devido a isso emerge com uma divergência muito pequena.	43
Figura 6.3	Exemplo de tipos de laser: (a) laser para cirurgia dentaria; (b) laser cirúrgico de CO ₂ .	45
Figura 6.4	Esquema simplificado de um laser de diodo.	48
Figura 7.1	Ilustração do processo de síntese do PGLD utilizando a rota sintética de Williamson modificada. Gly = glicerol, TBABr = Brometo de tetrabutyl amônio. À direita é ilustrada a purificação cromatográfica do produto obtido.	50
Figura 7.2	Ilustração do processo de síntese do conjugado PGLD-Chla através do método de Steglich em reação de esterificação catalisada por N,N-Diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e 4-Dimethylaminopyridine (DMAP).	51
Figura 7.3	Destacamento de células do fundo da garrafa de cultura: (a) células ainda fixas no fundo da garrafa, (b) celas destacadas do fundo da garrafa de cultura.	55

Figura 7.4	Aplicação do laser nos grupos selecionados.	56
Figura 8.1	Incorporação da Chl-a no PGLD em função do número de gerações do dendrímero (G).	58
Figura 8.2	(a) CCD dos PGLD's G0, G2 e G4, PGLD-Chl e Clorofila a; (b) valores de R_f das amostras	59
Figura 8.3	Espectroscopia FTIR do PGLD G0 (preto), PGLD G2 (vermelho), PGLD G4 (azul). Os valores destacados no gráfico são referentes ao PGLD G4.	60
Figura 8.4	Espectro de absorção FTIR da Clorofila <i>a</i>	61
Figura 8.5	(a) Espectro de absorção FTIR do PGLD-Chl (vermelho), Clorofila <i>a</i> (azul), PGLD G4 (preto); (b) zoom do espectro na faixa de número de onda de 1860 a 600 cm^{-1}	62
Figura 8.6	Espectro de absorção UV vis de PGLD: G0 (preto), G2 (vermelho) e G4 (azul).	63
Figura 8.7	(a.) Espectro de absorção UV vis de PGLD G4 (vermelho), PGLD-Chl (preto) e clorofila <i>a</i> (azul); (b.) Estrutura que permite que a clorofila absorva luz nas bandas de Soret e a banda Q.	65
Figura 8.8	Curva TG e DTG de composição do (a) PGLD G0; (b) PGLD G2;	66
Figura 8.8	Curva TG e DTG de composição do (c) PGLD G4, e (d) PGLD-Chl-a.	67
Figura 8.9	(a) Espectro FTIR do PGLD-Chl antes da análise termogravimétrica (preto) e após a análise TG (vermelho); (b) Foto do resíduo após a análise TG.	69
Figura 8.10	Comparação entre as gerações do PGLD e PGLD-Chl	70
Figura 8.11	Energia de ativação dos dendrímeros PGLD's em função do número de gerações	72
Figura 8.12	Curva DSC de determinação de Tg	73
Figura 8.13	Curva DSC normalizada do segundo aquecimento do poliglicerol, com razão de aquecimento de 10°C/min, sendo (a) PGLD G0; (b) PGLD G2; (c) PGLD G4; e (d) PGLD-Chl.	75
Figura 8.14	Relação entre Tg e a geração do dendrímero de poliglicerol.	76
Figura 8.15	(a) Exemplo de volume hidrodinâmico de macromolécula (neste caso é um polímero linear)	76
Figura 8.16	Estrutura otimizada da Clorofila <i>a</i> pelo método PM3 de dois ângulos diferentes (a), destaque para as distâncias (em angstroms) das extremidades da molécula (b) e de seu centro (c).	79
Figura 8.17	(a) Estrutura do PGLD de quarta geração, otimizada pelo método PM3 (b) PGLD G4 visto de outro ângulo com destaque para distancia (em angstroms) dos extremos da molécula.	80
Figura 8.18	Estrutura otimizada do PGLD-Chl pelo método PM3 de dois ângulos diferentes (a);	81

Figura 8.18	Estrutura otimizada do PGLD-Chl pelo método PM3 com destaque para as distâncias (em angstroms) das extremidades da molécula (b) e do centro referente à estrutura da clorofila no interior do PGLD (c).	82
Figura 8.19	Representação dos orbitais HOMO (a.) e LUMO (b.) para a molécula de clorofila <i>a</i> . As esferas cinzas representam o átomo de carbono, as brancas o hidrogênio, vermelhas o oxigênio e amarela o magnésio	83
Figura 8.20	Representação dos orbitais HOMO (a) e LUMO (b) para a molécula de PGLD de quarta geração. As esferas cinzas representam o átomo de carbono, as brancas o hidrogênio, e as vermelhas o oxigênio.	84
Figura 8.21	Representação dos orbitais HOMO (a) e LUMO (b) para a molécula de PGLD-Chl. As esferas cinzas representam o átomo de carbono, as brancas o hidrogênio, vermelhas o oxigênio e amarela o magnésio.	85
Figura 8.22	Mapa de potencial eletrostático do PGLD G0	87
Figura 8.23	Mapa de potencial eletrostático da clorofila <i>a</i> .	87
Figura 8.24	Mapa de potencial eletrostático do PGLD-Chl	88
Figura 8.25	Viabilidade das células OSCC-09 avaliada pelo ensaio de MTS, após 3 horas do tratamento. Os dados de densidade ótica (viabilidade celular) foram obtidos em quadruplicata para o tempo experimental de cada grupo e representados como média \pm erro padrão da média.	91
Figura 8.26	Influência da concentração do PGLD-Chl na viabilidade celular considerando-se o tempo de irradiação: 3 min (B) e 10 min (C). Em (A) representa-se o grupo controle (escuro).	92
Figura 8.27	Análise de marcação TUNEL-positiva (fluorescência verde) de fragmentos nucleares correspondentes a corpos apoptóticos no grupo controle, PGLD-Chl no escuro (A) e após exposição ao laser por 3 minutos (B). As células viáveis estão em azul. Barra de escala=10 μ m.	93
Figura 8.28	Relação entre a porcentagem de células apoptóticas e a concentração de PGLD-Chl considerando-se a irradiação com laser por 3 min (A) e 10 min (B). O grupo controle, células contendo PGLD-Chl no escuro são representadas em (C).	94

Resumo

O presente estudo tem o objetivo de demonstrar os resultados iniciais da utilização do dendrímero de poliglicerol (PGLD) como sistema transportador de clorofila a (Chl-a) para utilização como agente fotossensibilizador na terapia fotodinâmica (TFD) do câncer epidermóide de cabeça e pescoço. O câncer na cavidade oral foi escolhido, uma vez que as estatísticas apontam que essa é considerada hoje um problema de saúde pública a nível mundial, requerendo urgentemente o desenvolvimento de novas tecnologias para sua terapia clínica. O dendrímero PGLD foi sintetizado a partir da síntese de Williamsom e a Chl-a foi imobilizada na periferia do PGLD utilizando o método de Steglich em reação de esterificação catalisada por N,N-Diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e 4-Dimethylaminopyridine (DMAP). O sistema PGLD-Chl-a foi caracterizado por técnicas espectroscópicas (espectroscopia no infravermelho por transformadas de Fourier-FTIR, e espectroscopia ultravioleta-visível-UV/Vis), térmicas (análise termogravimétrica-TG, calorimetria exploratória diferencial-DSC) e cromatográficas (cromatografia de camada delgada-CCD). O estudo da citotoxicidade e atividade fotodinâmica do conjugado PGLD-Chl-a foi efetuado utilizando linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral SCC9 em ensaios *in vivo*. Os métodos físico-químicos de análise indicaram que o acoplamento químico entre a clorofila e o PGLD foi atingido com sucesso em um nível bom de rendimento e parece não alterar significativamente as características óticas de Chl-a, mantendo a absorção em aproximadamente 660nm, considerado adequado para a “janela fototerapêutica” da TFD. Os resultados das análises térmicas indicaram que a estabilidade térmica e temperatura de transição vítrea do sistema PGLD-Chl-a são adequadas para utilização na TFD. Os resultados preliminares da química quântica computacional indicam que o PGLD-Chl-a é uma molécula hidrofílica, ideal para o direcionamento do conjugado para o tecido alvo. O ensaio-TUNEL sugere que o sistema PGLD-Chl-a pode atuar como um eficiente fotossensibilizador na TFD de carcinomas epidermoide de cabeça e pescoço (SCC9), causando a morte celular por apoptose. Entretanto, estudos futuros são necessários com o objetivo de se avaliar a nível molecular a atuação do PGLD-Chl-a na redução/eliminação do tumor.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica; Dendrímero de Poliglicerol; Clorofila a; Câncer da Cavidade Oral.

Abstract

The aim of this present study is to show the initial results of the use of polyglycerol dendrimer (PGLD) as the transporter system of chlorophyll a (Chl-a) for using as a photosensitizing agent in photodynamic therapy (PDT) type of epidermoid cancer on the head and neck . Cancer on the oral cavity was chosen, since statistics show that this kind of cancer is now considered a public health problem worldwide, urgently requiring the development of new technologies for clinical therapy. The PGLD dendrimer was synthesized by Williamson's synthesis and Chl-a was immobilized on the PGLD board using the Steglich method on catalyzed esterification reaction of N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP). The PGLD-Chl-a system was characterized by spectroscopic techniques (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - FTIR and visible ultraviolet spectroscopy - UV/Vis), thermal (thermogravimetric analysis - TG, differential scanning calorimetry - DSC) and chromatographic (thin layer chromatography - TLC). The study of cytotoxicity and photodynamic activity of conjugate PGLD-Chl-a was performed using cells derived from oral epidermoid carcinoma SCC9 *in vivo* assays. The physical-chemistry methods of analysis indicated that chemical coupling between chlorophyll and PGLD successfully reached a good level of income and does not seem to significantly alter the optical characteristics of Chl-a, keeping the absorption at approximately 660nm, considered suitable for "phototherapeutic window" of PDT. The results of thermal analyzes indicated that thermal stability and glass transition temperature of the PGLD-Chl-a system are suitable for use in PDT. Preliminary results of computational quantum chemistry indicate that PGLD-Chl-a is a hydrophilic molecule, ideal for the direction of conjugate to the target tissue. The TUNEL assay suggests that the PGLD-Chl-a system can act as an efficient photosensitizer in PDT for epidermoid carcinomas cells of the head and neck (SCC9), causing cell death by apoptosis. However, future studies are necessities in order to evaluate the role of PGLD-Chl-a reduction/elimination tumor at the molecular level.

Keywords: Photodynamic Therapy; Polyglycerol Dendrimer; Chlorophyll a; Oral Cavity Cancer.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
Lista de Figuras	ix
Resumo.....	xii
Abstract	xiii
Sumário	xiv
Capítulo 1. A natureza desse trabalho.....	1
1. Introdução	1
Capítulo 2. Objetivos a serem atingidos	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
Capítulo 3. Fundamentais teóricos que norteiam esse trabalho	5
3.1. Propagação de uma epidemia: o câncer.....	5
3.1.1 O câncer da cavidade oral.....	6
3.2. Terapia fotodinâmica: uma nova tecnologia para tratamentos oncológicos.....	6
3.2.1 O agente fotossensibilizador	9
3.2.2. A interação entre o laser e o fotossensibilizador	15
3.2.3. Interação da radiação laser com o tecido biológico	18
3.2.4. Dose fotodinâmica e efeito fotodinâmico.....	22
Capítulo 4. A clorofila como agente fotossensibilizador	24
4.1. Introdução	24
4.2. A estrutura química da Clorofila	25
4.2.1. Estrutura química da Clorofila <i>a</i>	26
4.3. Espectro eletrônico das Clorofilas.....	27
4.4. A clorofila <i>a</i> usada como fotossensibilizador	31
Capítulo 5. Dendrímeros: propriedades e aplicações.....	32
5.1. Introdução	32
5.2. A estrutura dendrítica	33
5.3. Os métodos de síntese dos dendrímeros	35

5.4. Aplicações clínicas de dendrímeros	36
5.5. Aplicações de dendrímeros na terapia fotodinâmica.....	39
5.6. O poliglicerol dendrítico.....	39
Capítulo 6. O laser como ferramenta para a terapia fotodinâmica	41
6.1. Introdução	41
6.2. Emissão espontânea e emissão estimulada	42
6.3. Propriedades do laser.....	43
6.4. Áreas da medicina nas quais o laser pode ser empregado	44
Capítulo 7. Materiais e Métodos.....	50
7.1. Síntese do PGLD.....	50
7.2. Síntese e caracterização físico-química do conjugado PGLD-Chl-a	51
7.2.1. Simulação computacional das propriedades eletrônicas do conjugado PGLD-Chla	53
7.3. Estudo de bioatividade e citotoxicidade	53
7.3.1. Preparo da linhagem celular para cultura	54
7.3.2. Avaliação da citotoxicidade.....	55
7.3.3. Ensaio-TUNEL	57
Capítulo 8. Resultados e Discussão	58
8.1. Caracterização do conjugado PGLD-Chla.....	58
8.1.1. Imobilização do Chl-a no PGLD	58
8.1.2. Cromatografia de camada delgada	59
8.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	60
8.1.4. Espectroscopia Eletrônica (UV-Vis).....	63
8.1.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....	65
8.1.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	72
8.1.7. Simulação computacional do conjugado PGLD-Chla	76
8.2. Estudo de bioatividade e citotoxicidade	90
Capítulo 9. Conclusões	95
Capítulo 10. Perspectivas Futuras.....	96
Referências Bibliográficas	98

Capítulo 1. A natureza desse trabalho

1. Introdução

A estimativa mundial mais recente para o câncer na cavidade oral é do ano de 2008 e apontou cerca de 264 mil novos casos e 128 mil óbitos, para esse ano [1]. No Brasil para o ano de 2012 estimou-se cerca 9.900 novos casos em homens e 4.180 em mulheres [1]. Os principais fatores de risco para o câncer na cavidade oral são o tabagismo, alcoolismo e infecções pelo HPV. O fumo é o responsável por 42% dos óbitos e o alcoolismo corresponde a 16% [1]. As taxas de incidência para o câncer na cavidade oral aumentam entre adultos jovens em ambos os sexos. Já as taxas de mortalidade na população masculina tem apresentado declínio na maioria dos países, o que não se pode observar para a população do sexo feminino [1].

Os resultados clínicos apontam que a terapia fotodinâmica (TFD) é um promissor tratamento para o câncer e outras doenças não oncológicas [2-5] baseando-se no princípio de que uma substância fotoativa denominada de fotossensibilizador (PS - photosensitizer), se acumula preferencialmente em células tumorais. A irradiação local, com radiação eletromagnética de um comprimento de onda adequado, conduz à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são espécies de vida curta que desencadeiam uma série de eventos oxidativos que causam a morte das células tumorais [6,7].

A terapia fotodinâmica é um procedimento minimamente invasivo de modo que, dentre suas grandes vantagens em comparação com os métodos tradicionais estão a seletividade e a baixa toxicidade dos fármacos administradas [8], podendo ser reaplicado caso seja necessário, além da possibilidade de se tratar várias lesões simultaneamente. No geral os procedimentos da TFD são ambulatoriais dispensando a internação do paciente [9].

O tratamento através da TFD pode atingir um elevado nível de cura, em particular para tumores em sua fase inicial, podendo prolongar a sobrevivência de pacientes com câncer inoperável e melhorar significativamente sua qualidade de vida [6]. Características da TFD como a mínima toxicidade a tecidos normais e os insignificantes efeitos sistêmicos, reduzida morbidade a longo prazo, a falta de mecanismos de resistência intrínseco ou adquirido, a preservação dos órgãos sadios e da estética, fazem da TFD uma opção terapêutica válida para tratamentos combinados com a radioterapia ou quimioterapia [6].

Em contraste com a quimioterapia, a TFD parece não ter efeitos colaterais significativos. Entretanto, após o tratamento por TFD os pacientes têm de ficar em luz difusa por um determinado período e devem evitar exposição à luz solar por alguns dias [10,11].

Neste trabalho a clorofila *a* (Chl-*a*) foi escolhida como fotossensibilizador por apresentar características que são ideais para a terapia fotodinâmica a saber: absorção de luz num comprimento de onda dentro da janela fototerapêutica (660nm); capacidade de transferir energia de excitação de uma molécula de clorofila para outra com 90% de eficiência; bom rendimento quântico de fluorescência e estado tripleto de longa duração que aumenta a eficiência de produção de espécies reativas de oxigênio [12–14].

Para melhorar o sistema de vetorização da Chl-*a* para a região tumoral, o poliglicerol dendrítico (PGLD) foi escolhido como macromolécula transportadora. O PGLD é caracterizado pela presença de grupos hidroxilas e ligações éter além de apresentar comportamento hidrofílico quando possui baixa massa molecular (ou número de gerações) [15].

Atualmente, a utilização de macromoléculas altamente ramificadas a exemplo dos dendrímeros no transporte de compostos com atividade farmacológica está amplamente difundido na literatura devido especialmente ao fato de possuírem estrutura similar à de proteínas globulares a exemplo da albumina, sendo por esse motivo; conhecidas como “proteínas artificiais” [15,16].

Ao mesmo tempo; as propriedades bioquímicas, no que diz respeito à biocompatibilidade tais como hemocompatibilidade e não citotoxicidade a células de mamíferos torna o PGLD adequado para utilização *in-vivo*, podendo atuar como sistema transportador de fármacos ou agentes fotossensibilizantes diretamente na corrente sanguínea ou tecido biológico [17].

Os pigmentos fotossintéticos clorofila (*a*,*b*) e β -caroteno localizados nos cloroplastos absorvem a energia luminosa, responsável pela fotossíntese das plantas. As clorofilas *a* (maior quantidade) e *b* (pigmento acessório) têm o máximo de absorção de fótons (λ_{\max}) na região de 428 e 660 nm (clorofila *a*) e na região de 452 e 641,8 nm (clorofila *b*) [18,19]. Os valores de λ_{\max} , os quais variam com o tipo de solvente utilizado, correspondem à região do azul e vermelho do espectro eletromagnético, respectivamente [18,19]. Os valores de λ_{\max} indicam que a luz verde não é absorvida mas refletida e transmitida, o que evidencia a coloração verde

destes pigmentos e portanto, a coloração verde das folhas. Ambas as clorofilas são componentes das membranas dos cloroplastos e ocorrem na razão clorofila a/clorofila b de aproximadamente 3 para 1 [18,19]. Plantas expostas a grande incidência de luz (elevados fluxos de fótons fotossintéticos) apresentam razões clorofila a/b em torno de 3,2 a 4,0 e plantas crescendo em ambientes com reduzida incidência de luz possuem razões a/b em torno de 2,5 a 2,9 [20].

As moléculas de clorofila absorvem fótons e alteram temporariamente as suas configurações eletrônicas, passando do estado fundamental para o estado excitado (nível de energia mais alto), denominado de singlete 1. Este estado excitado é muito instável e de vida muito curta ($\approx 10^{-8}$ s). Desta maneira, estes pigmentos fotossintéticos, após receberem a energia dos fótons, dissipam esta energia proveniente da luz através de dissipação fotoquímica, fluorescência ou dissipação de calor na forma de radiação infravermelha [21].

Devido à sensibilidade das moléculas de clorofila à luz, é na dissipação fotoquímica que a energia luminosa é convertida em energia química, havendo a doação do elétron proveniente da molécula de água para um aceptor denominado **NADP** (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Esta energia dissipada é usada para a formação do poder redutor e da molécula de ATP (Trifosfato de adenosina), os quais serão utilizados na fase bioquímica do processo fotossintético. Na temperatura ambiente (25 °C), a fluorescência exibe um ponto máximo de emissão na faixa de 682 nm e outro ponto menos pronunciado em 740 nm [22]. Entretanto, os três processos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofila são competitivos, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação de calor causará alterações complementares na emissão da fluorescência.

Até o presente momento não há relatos sobre experimentos clínicos que envolvam o sistema Chl-a/PGL e a TFD para o tratamento de câncer humano da cavidade oral (linhagem OSCC-09). As características hidrofóbicas da Chl-a é um limitador para sua aplicação nos sistemas biológicos. Por outro lado, as propriedades hidrofílicas e biocompatíveis do PGLD favorecem sua aplicação como macromolécula transportadoras de Chl-a. Frente ao exposto, é de particular interesse o estudo do sistema PGLD-Chl-a quanto ao seu potencial para o tratamento do câncer de cavidade oral uma vez que a TFD pode ser utilizada de forma localizada e sem efeitos colaterais para o paciente.

Capítulo 2. Objetivos a serem atingidos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar as propriedades físico-químicas do conjugado PGLD-Chl-a com vistas a sua aplicação em terapia fotodinâmica.

2.2 Objetivos específicos

Para atingir as realizações apontadas no objetivo geral, acima descrito; o trabalho desenvolvido teve os seguintes objetivos específicos:

1. Desenvolver metodologia de acoplamento químico entre PGLD e Chl-a.
2. Avaliar as propriedades espectroscópicas (eletrônica e vibracional) do conjugado PGLD/Chl-a.
3. Analisar a estabilidade térmica do conjugado PGLD/Chl-a.
4. Estudar a citotoxicidade contra células de mamífero do conjugado PGLD/Chl-a.
5. Investigar a estrutura do conjugado PGLD/Chl-a através de técnicas da química quântica computacional.
6. Identificar a propriedade físico-química coeficiente de partição óleo-água do conjugado PGLD/Chl-a.
7. Avaliar a efetividade da TFD com o conjugado PGLD/Chl-a em células da linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral (OSCC-09).

Capítulo 3. Fundamentais teóricos que norteiam esse trabalho

3.1. Propagação de uma epidemia: o câncer

Já é um fato observável clinicamente que o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos denomina-se de câncer [23]. Essas células dividem-se muito rapidamente e devido à sua falta de especialização metabólica podem ser bastante agressivas ao organismo humano levando à formação de tumores denominados de malignos. Tais tumores possuem uma elevada capacidade de difusão, podendo espalhar-se rapidamente para outras regiões do corpo em um processo conhecido como metástase [23].

Existem no Brasil oito tipos de câncer na lista das doenças que mais matam, sendo elas, em ordem decrescente: câncer de pulmão, estômago, mama, próstata, cólon, fígado, esôfago e pâncreas [24]. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a estimativa para 2012-2013 aponta que haverá 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma. Esses dados alertam para o fato de que, no Brasil, o câncer já é um problema de saúde pública [1].

No total estima-se 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. O câncer de pele não melanoma é o que se espera maior incidência na população brasileira (134 mil novos casos). A Tabela 3.1 traz a distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em homens e mulheres para 2012.

Tabela 3.1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais comum estimados para 2012 [1].

Homens		Mulheres	
Localização primária	Novos casos	Localização primária	Novos casos
Próstata	60.180	Mama feminina	52.680
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	Colo do Útero	17.540
Cólon e Reto	14.180	Cólon e Reto	15.960
Estômago	12.670	Glândula Tireoide	10.590
Cavidade Oral	9.990	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110
Esôfago	7.770	Estômago	7.420
Bexiga	6.210	Ovário	6.190
Laringe	6.110	Corpo do Útero	4.520
Linfoma não Hodgkin	5.190	Linfoma não Hodgkin	4.450
<i>Pele não melanoma</i>	<i>62.680</i>	<i>Pele não melanoma</i>	<i>71.490</i>

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

3.1.1 O câncer da cavidade oral

A estimativa mundial mais recente para o câncer na cavidade oral é do ano de 2008 e apontou cerca de 264 mil novos casos e 128 mil óbitos, para esse ano. No Brasil para o ano de 2012 estimou-se cerca 9.900 novos casos em homens e 4.180 em mulheres, desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o câncer na cavidade oral em homens é o quarto mais frequente na região Nordeste, o quinto mais frequente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, e nas regiões Sul e Norte é o sexto mais frequente [1].

Os principais fatores de risco para o câncer na cavidade oral são o tabagismo, alcoolismo e infecções pelo HPV. O fumo é o responsável por 42% dos óbitos e o alcoolismo corresponde a 16%. O hábito de beber e fumar estabelece um sinergismo entre esses dois fatores de risco, o que pode aumentar o risco de desenvolvimento desse tipo de câncer em 30 vezes. As taxas de incidência para o câncer na cavidade oral aumentam entre adultos jovens em ambos os sexos, o que pode ser atribuído a mudanças no comportamento sexual. Já as taxas de mortalidade na população masculina tem apresentado declínio na maioria dos países, o que não se pode observar para a população do sexo feminino.

Uma inspeção visual, feita pelo próprio indivíduo ou por dentistas e médicos, pode levar a descobrir precocemente anormalidades pré-malignas do câncer da cavidade oral. Se diagnosticado precocemente, esse tipo de câncer apresenta um bom prognóstico, com possibilidade de cura em 80% dos casos [25].

3.2. Terapia fotodinâmica: uma nova tecnologia para tratamentos oncológicos.

Os três tipos de tratamento clínico de cânceres mais comumente utilizados são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O tratamento cirúrgico é utilizado para ressecção da massa tumoral e outros tecidos envolvidos, como linfonodos. As cirurgias podem ter consequências como mutilação e alterações fisiológicas severas como danos no sistema digestivo, excretor, entre outros. A função da radioterapia e quimioterapia é inibir o crescimento de células que se dividem rapidamente, no entanto este tratamento não diferencia células saudáveis das células neoplásicas [26]. Por essa razão células como a da mucosa bucal e medula óssea, que proliferam rapidamente, também são afetadas provocando vários efeitos colaterais tais como a perda de cabelos, náuseas, vômitos, diarreia, prostração física, e

desnutrição, que faz com que, durante o tratamento, os pacientes tenham uma qualidade de vida muito abaixo do aceitável incentivando assim, a busca por novas tecnologias para o tratamento clínico dessa enfermidade [27,28].

A TFD parece ser um promissor tratamento clínico para o câncer e outras doenças não oncológicas [2–5]. Esta técnica baseia-se no fato de que uma substância fotoativa, denominada de fotossensibilizador (PS), se acumula preferencialmente em células tumorais. A irradiação local, com um comprimento de onda adequado, conduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são espécies de vida curta que desencadeiam uma série de eventos oxidativos que causam a morte das células tumorais [6,7].

Os mecanismos pelos quais as ROS levam a morte das células tumorais são: indução da apoptose e/ou necrose, e ainda danos à vasculatura dos vasos do tumor (que resulta na morte indireta por hipóxia ou inanição). A apoptose é um fenômeno em que ocorre uma retração da célula causando perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. Nesse processo as organelas mantêm sua morfologia, apenas as mitocôndrias eventualmente podem ter sua membrana externa rompida. A membrana celular permanece intacta e junto a ela se concentra a cromatina que sofreu condensação. Em seguida é formado prolongamentos da membrana celular e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Então são formados corpos apoptóticos, que são estruturas que contêm o conteúdo celular originadas com o rompimento da membrana celular que foi aumentada em tamanho e número. Os corpos apoptóticos não causam um processo inflamatório, rapidamente são fagocitados por macrófagos e removidos [29,30]. A necrose acontece quando a célula recebe algum estímulo causando o aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda de integridade da membrana e consequente ruptura celular. Durante a necrose o conteúdo celular é liberado causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória no local [29,30].

A literatura indica que a TFD é um procedimento minimamente invasivo, podendo-se destacar dentre suas grandes vantagens em comparação aos métodos tradicionais a seletividade e a baixa toxicidade dos fármacos administradas [8]. Adicionalmente, pode ser reaplicada caso seja necessário, sendo também possível tratar várias lesões simultaneamente além dos procedimentos serem geralmente em escala ambulatorial dispensando assim a internação do paciente, o que reduz significativamente os custos clínicos associados à essa terapia [9].

Há vários fatores que influenciam a eficácia da TFD tais como o tipo de fotossensibilizador, concentração do fármaco, localização intracelular, taxa de fluência e disponibilidade de oxigênio são alguns desses fatores [31]. As células tumorais são destruídas rapidamente e qualquer dano causado às células saudáveis vizinhas é curado em poucas semanas [32].

Atualmente a TFD possui elevado índice de cura, em particular em tumores em fase inicial [6], também pode prolongar a sobrevivência de pacientes com câncer inoperável e melhorar significativamente a qualidade de vida. A mínima toxicidade a tecidos normais, insignificantes efeitos sistêmicos, reduzida morbidade, falta de mecanismos de resistência intrínseco ou adquirido, a preservação de órgãos e da estética, fazem da TFD uma opção terapêutica válida para tratamentos combinados com outras metodologias clínicas [6].

Quando a iluminação for superficial a TFD como tratamento primário é indicada para tumores pequenos, enquanto que para tumores grandes a TFD pode ser utilizada em combinação com a remoção cirúrgica.

As fibras óticas podem facilitar o transporte da luz no comprimento de onda e fluência adequados, para qualquer parte do corpo. Como por exemplo, para o tratamento de câncer de bexiga pode-se empregar um feixe fibras ótica com um difusor esférico montado na extremidade, que faz com a distribuição de luz no seu interior da bexiga seja mais eficiente [33]. Apesar da TFD causar severa ulceração na área iluminada logo após o tratamento, o tecido biológico se recupera rapidamente e sem cicatrizes [34]. Uma vez determinado o tipo de câncer a ser tratado é estabelecido um protocolo clínico para utilização da TFD de modo seguro e de forma a se atingir uma eficiência máxima [35].

Comparativamente à quimioterapia e radioterapia, a TFD parece não envolver grandes efeitos colaterais. Entretanto, após o tratamento o paciente deve ficar em luz difusa por um determinado período e evitar exposição à luz solar alguns dias devido à fotossensibilidade desenvolvido após o tratamento. Contudo, para evitar o aumento da sensibilidade da pele e minimizar outras possibilidades de efeitos colaterais a literatura aponta como necessidades importantes para a eficiência do método uma dosimetria adequada da potência irradiada no local e concentração adequada do agente fotossensibilizador [10,11].

3.2.1 O agente fotossensibilizador

As características clinicamente relevantes dos agentes fotossensibilizadores que devem ser analisadas quanto à sua viabilidade para utilização na TFD são a toxicidade, mutagenicidade/carcinogenicidade, eliminação, seletividade, ativação, fotossensibilização pela luz solar, administração, indicação, confiabilidade, facilidade de uso ambulatorial, disponibilidade, custo, segurança e janela ótica [35].

Um fotossensibilizador (PS) ideal não deve ser tóxico sem que ocorra a incidência de luz. Nem a fotodegradação nem a metabolização celular do PS devem gerar produtos de degradação tóxicos para o paciente [14]. Ao mesmo tempo, também é muito importante que o PS não cause efeitos mutagênicos, independentemente de ser irradiado ou não [36].

É altamente desejável que o agente PS seja eliminado após o tratamento por fotodegradação, metabolização ou excreção o mais rápido possível para minimizar o período de fotossensibilidade geral do paciente [9]. Contudo, em alguns casos, como em múltiplos tratamentos fotodinâmicos, a retenção do PS em tecidos alvo pode ser necessária para evitar a readministração do fármaco [31,37].

Uma importante característica de um PS é sua seletividade, ou seja, a capacidade de acumular no tecido alvo e não em células saudáveis, restringindo assim o dano fotoinduzido ao tecido circundante [37]. A localização do PS na célula vai determinar o mecanismo de ação. Alvos intracelulares tais como membranas mitocondriais leva à morte intracelular por apoptose, um processo rápido e que não gera inflamação, desejável clinicamente. Por outro lado, a morte celular via membrana celular ou extracelular poderá levar à necrose [30].

Quanto à ativação e confiabilidade; o PS só deve ser ativado com a incidência de luz num comprimento de onda adequado, evitando-se assim a destruição de células saudáveis localizadas em outras áreas do tecido biológico [35]. A literatura aponta que maioria dos PSs acabam por se alojar na pele, o que leva o paciente a se proteger da exposição à luz solar por algum período após o tratamento pela TFD. Entretanto, o ideal seria que a pele não ficasse fotossensível por semanas ou meses, o que contribuiria para a qualidade de vida do paciente [16,18].

Normalmente a administração do agente PS pode ser tópica, por ingestão, inalação ou intravenosa, dependendo da situação clínica. Para qualquer um dos casos, a facilidade na administração é uma característica bastante importante [35]. Quando o PS é sistemicamente

injetado é necessário um cuidado com a biodistribuição do agente fototerapêutico, a nível celular ou dos tecidos envolvidos [39].

Atualmente uma grande ênfase é dada ao desenvolvimento de agentes PS que não causem dor e sejam adequados para a terapia ambulatorial. Relatos sobre dores durante a irradiação, tem sido observado quando usado o fotossensibilizador ácido 5-aminolevulínico (ALA) [14]. Caso o PS cause dor durante e/ou após o procedimento será necessário o uso de sedativos, o que impede o tratamento ambulatorial. Um procedimento ambulatorial através da TFD, por não incluir internação nem necessitar de todo o aparato cirúrgico e salas totalmente esterilizadas, torna-se menos dispendiosa relativamente à hospitalização [35].

O fenômeno de seletividade do agente PS pode se dar por: 1) permeabilidade vascular elevada do PS em tumores; 2) pH baixo no compartimento extracelular do tumor; 3) reduzida drenagem linfática no tumor ou então 4) um grande número de macrófagos associados a tumores que exercem a fagocitose e monomerização do PS agregado [40]. O acoplamento de PS a anticorpos ou outros portadores específicos para tumores pode melhorar a seletividade. Uma molécula anfifílica garante tanto o transporte no sangue como também uma efetiva penetração através da camada lipídica da membrana celular [35].

A janela ótica dos agentes PS também deve ser considerada na TFD. O PS ideal deve ser ativado num comprimento de onda que esteja dentro dos limites da janela fototerapêutica (entre 600 e 1000nm) onde a membrana celular tem considerável transparência à radiação eletromagnética na região do visível, com risco mínimo de destruição de células sadias que não contem o agente PS [33]. Por sua vez, o agente PS deve possuir habilidade integrativa, ou seja; não deve impedir a utilização de formas complementares de tratamento, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia [35].

Em resumo, as características do agente PS ideal indicam que este deve ser facilmente administrado e de forma segura, deve evitar os tecidos normais, ativar quando necessário até que a estrutura em questão seja destruído e, em seguida, eliminar-se sem causar danos permanentes para o resto do corpo [35]. As moléculas de PS também não devem formar agregados, pois isso pode reduzir sua capacidade de absorver luz e diminuir o tempo de vida e rendimento quântico do estado tripleto excitado [37].

Uma molécula de fotossensibilizador no seu estado normal é caracterizada pelo par de elétrons com spin total $S=0$ e multiplicidade igual a 1. Essa configuração é chamada de estado

singleto e a configuração com todos os elétrons em seus estados de menor energia possível é chamado de estado fundamental S_0 . A maior parte das moléculas permanecem no estado fundamental S_0 à temperatura ambiente. Com a absorção da luz, com energia apropriada, um desses elétrons é deslocado para um orbital de maior energia. Dependendo da energia transferida, o fotossensibilizador sofre uma transição para um estado singleto excitado S_x (com $x = 1, 2, 3, \dots$, em ordem crescente de estados energéticos). Como o estado excitado é energeticamente instável, a molécula retorna ao estado fundamental após um curto período de tempo, e são muitos os mecanismos para desativação de S_x [41].

Chama-se conversão interna (internal conversion IC) a transição não-radioativa permitida por spin entre dois estados de mesma multiplicidade ($S_x \rightarrow S_1$ e $T_x \rightarrow T_1$) [42]. O estado S_1 pode ser desativado de três formas diferentes. No primeiro caso há emissão de luz, chamado de fluorescência, através de decaimento radioativo de estados de mesma multiplicidade, dando origem ao estado S_0 . Uma segunda maneira, também há perda de energia entre estados de mesma multiplicidade ($S_1 \rightarrow S_0$), porém é um decaimento energético não radioativo. O terceiro modo é um processo não radioativo, neste caso estão envolvidos estados com diferentes multiplicidades, ao qual se dá o nome de cruzamento inter-sistemas (*intersystem crossing* ISC). A partir de S_1 pode ocorrer a transição para o primeiro estado tripleto excitado, T_1 , onde dois elétrons são desemparelhados e tem o mesmo spin. O estado T_1 é desativado de maneira similar ao de S_1 , podendo ser um processo radioativo chamado fosforescência, ou então um processo não radioativo de cruzamento inter-sistemas que também leva ao estado fundamental S_0 [43].

A razão entre o número de moléculas excitadas que decaem por esse processo e o número total de moléculas excitadas é chamado de rendimento quântico (ou eficiência quântica). Porém o rendimento quântico é mais frequentemente definido como sendo a razão entre o número de moléculas que sofre um determinado processo, considerando também os processos fotoquímicos, pelo número total de fótons absorvidos, é definido assim, pois o número de moléculas excitadas é originado através da absorção de fótons [44]. A maioria dos fotossensibilizadores tem uma elevada eficiência quântica para transição $S_1 \rightarrow T_1$. Embora a transição de estados excitados de multiplicidades diferentes seja uma transição proibida por spin, esta pode ocorrer em casos em que existe acoplamento spin-orbital. Neste fenômeno acontece o acoplamento entre os campos magnéticos gerados pelo movimento do spin e pelo movimento angular do orbital do elétron que promove a mistura quântica dos estados

excitados [45]. Estados tripletos são geralmente caracterizados por uma relativa vida longa (podendo chegar a segundos) [14].

Após a iluminação todos os fotossensibilizadores são quimicamente modificados ou até mesmo degradado. Esse resultado provem do ataque das ROS ou oxigênio singlete a as moléculas do PS. A fotodegradação é a destruição química da molécula do fotossensibilizador que resulta na divisão do PS em pequenos fragmentos, que não absorvem na região do espectro visível. Como consequência as moléculas perdem sua função fotodinâmica [14,46]. Outros dois processos podem ocorrer com o PS após ser exposto à luz: a fototransformação e fotorrelocalização. Na fototransformação o PS passa a absorver em um comprimento de onda diferente do inicial, pois acontecem mudanças em grupos laterais ou no esqueleto molecular do PS. Já na fotorrelocalização do PS, a iluminação pode contribuir para uma alteração na mobilidade do PS na célula. Para alguns fotossensibilizadores, a fotorrelocalização acontece de lisossomos para o núcleo, resultando em dano ao DNA [47,48].

Depois da TFD, a eliminação por fotodegradação, metabolização ou excreção do PS deve ser o mais rápido possível para minimizar o período de fotossensibilidade geral do paciente [9]. Contudo, em alguns casos, como em múltiplos tratamentos fotodinâmicos, a retenção do PS em tecidos alvo pode ser necessária para evitar a readministração do fármaco [31,37].

Não apenas as propriedades físicas, químicas e biológicas são suficientes na escolha de um PS, mas também características que vão de encontro às necessidades do paciente precisam ser consideradas. As substâncias empregadas atualmente em TFD pode não seguir todas as propriedades fotofísicas descritas a seguir. Para isso o médico deve escolher o PS mais adequado, com as melhores características para o tratamento de cada paciente, diminuindo assim efeitos indesejáveis [14].

Entre as características fotofísicas, a eficiência quântica para o estado tripleto e o comprimento de onda são as mais importantes. Entre 650nm e 850nm a penetração no tecido é bastante elevada e também fornece energia suficiente para produção de oxigênio singlete. Uma elevada eficiência quântica para ISC, e um estado tripleto de longa duração, resultará, provavelmente, em uma alta eficiência de formação de produtos citotóxicos [14].

Corantes fotoestáveis, ou seja, fotossensibilizadores com baixa fotodegradação são, por um lado, ideais para longos tempos de exposição, porem dependendo da excreção do PS

de células e tecidos, a baixa fotodegradação pode causar fotossensibilidade no paciente por um período prolongado de tempo [35].

Muitos produtos tem sido usados com fotossensibilizadores e muitos outros tem sido descobertos, no entanto ainda há poucos disponíveis comercialmente. A Tabela 3.2 mostra alguns desses agentes PS [35].

Os agentes fotossensibilizadores podem ser categorizados por sua estrutura química dividindo-os em famílias. A primeira família descoberta é baseada em hematoporfirinas (Hp), Figura 3.1, e seus derivados. Após purificação e manipulação, derivados de hematoporfirinas foram transformados em produtos comerciais diferentes, como por exemplo, Photofrin® (Figura 3.2), Photosan e Photocan [49]. Esses produtos são compostos de diferentes frações de monômeros, dímeros e oligômeros de porfirina, que são necessários para terapia bem sucedida [35]. Ao adicionar, subtrair ou substituir estruturas no anel porfirínico, fotossensibilizadores adicionais podem ser criados [50].

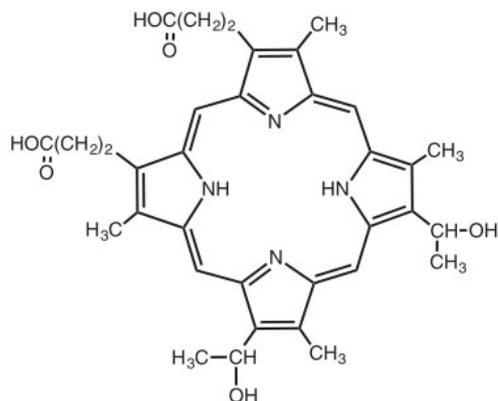


Figura 3.1 – Fórmula estrutural de hematoporfirina [51].

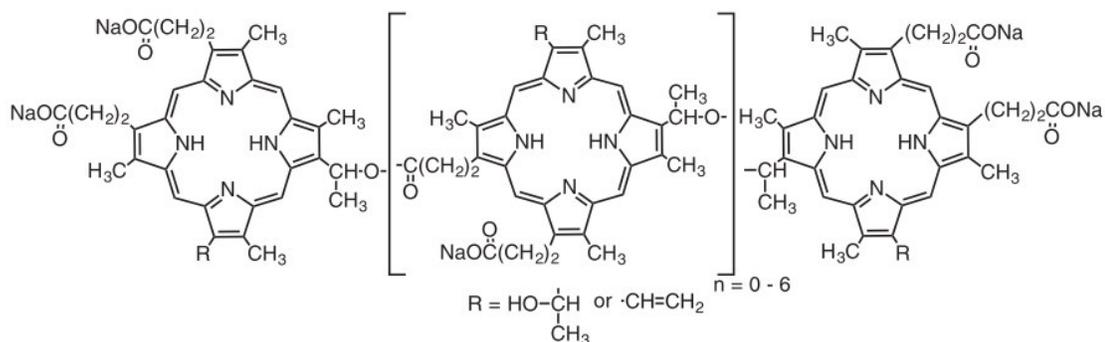


Figura 3.2 – Fórmula estrutural do Photofrin [51].

Tabela 3.2 – Agentes fotossensibilizadores atualmente usados na aplicação clínica [14]

Nome genérico	Nome químico	Aprovação	(Potencial) Indicações
Benzvix	Ácido Benzil- δ -aminolevulinico	Não ^a	Tumores gastrointestinais
BOPP	Protoporfirina borada	Não ^a	Tumores cerebrais
Hexvix	Ácido Hexil- δ -aminolevulinico	Sim ^b	Câncer de bexiga
Levulan	Ácido δ -Aminolevulinico	Sim ^c	Queratose actínica
		Não ^a	Câncer de cabeça e pescoço, tumores ginecológicos
Lu-TeX	Lutetium texaphyrin	Não ^a	Câncer cervical, câncer de próstata, tumores cerebrais
Metvix	Ácido metil δ -aminolevulinico	Sim ^d	Carcinoma basocelular
Pc-4	Ftalocianina 4	Não ^a	Lesões cutâneas/subcutâneas de diversas origens de tumor solido
Photofrin, Porfimer sodium	Derivado da hematoporfirina (polihematoporfirina)	Sim ^e	Barrett dysplasia de alto grau
		Sim ^f	Displasia e câncer cervical
		Sim ^g	Câncer endobrônquico
		Sim ^h	Câncer de esofago
		Sim ⁱ	Câncer gástrico
		Sim ^l	Câncer de bexiga papilar
		Não ^a	Carcinomas de vias biliares (colangiocarcinoma), tumores cerebrais
Photosense	Ftalocianina de alumínio	Sim ^j	Câncer de cabeça e pescoço
Foscan, Verteporfin	Cloroato de mseo-tetrahidroxifenila	Sim ^k	Tratamento paliativo de câncer de cabeça e pescoço
		Não ^a	Câncer de próstata, câncer de pâncreas, colangiocarcinoma
Visudyne, Verteporfin	Derivado da benzoporfirina	Não ^a	Carcinoma basocelular

^a Ainda não aprovado; ^b União Europeia (UE); ^c UE, Estados Unidos da America (EUA); ^d UE, Austrália; ^e Canadá, EU, Reino Unido, EUA; ^f Japão; ^g Canadá, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Irlanda, Japão, Holanda, Reino Unido, EUA; ^h Canadá, Dinamarca, Finlândia, França, Irlanda, Japão, Holanda, Reino Unido, EUA; ⁱ Canadá; ^j Rússia; ^k UE, Islândia, Noruega.

Na natureza encontra-se uma série de eventos fotoquímicos realizados pelas plantas superiores chamados fotossíntese. As clorofilas assim como as substâncias denominadas clorinas tem excelentes propriedades fotossensibilizantes [52]. Muitos fármacos têm sido criadas a partir de PS já disponíveis comercialmente. Estas incluem modificações de clorofila e de estruturas quimicamente sintetizados [50].

Os agentes PS clinicamente relevantes são m-THPC, MACE, e NpE6 [32,53]. As purinas, um produto de degradação da clorofila também são relevantes, a exemplo da

purpurina SNET2 [54]. Corantes de ftalocianina também tem grande potencial assim como as naftalocianinas [32,33].

As porfirinas são chamadas de fotossensibilizadores de primeira geração e foram desenvolvidas no início da década de 80 [35]. A segunda geração de fotossensibilizadores se refere a outros derivados de porfirina ou sintéticos fabricados a partir do final da década de 80. A terceira geração de PS são os fotossensibilizadores modificados por acoplamento com anticorpos ou outros conjugados biológicos [35].

Os fotossensibilizadores de primeira geração tem dominado o campo da TFD, porem esses PS apresentam como efeito colateral a fotossensibilidade da pele [55]. Como resultado, novos PS , incluindo segunda geração de porfirinas e derivados de porfirinas e PS de terceira geração, a exemplo de mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6), surgiram com o objetivo de aliviar os problemas encontrados nas porfirinas de primeira geração, melhorando assim a eficácia da TFD [31,55].

As propriedades fotofísicas e fotoquímicas podem ditar a especificidade do fotossensibilizador para aplicação em oncologia. Por exemplo, fotossensibilizadores com absorvência em comprimentos de onda na região do ultravioleta devem ser utilizados para tratamento de neoplasias superficiais, enquanto que fotossensibilizadores com absorvência em um comprimento de onda na região do infravermelho (> 700nm) podem ser usados em tumores mais profundos [56].

3.2.2. A interação entre o laser e o fotossensibilizador

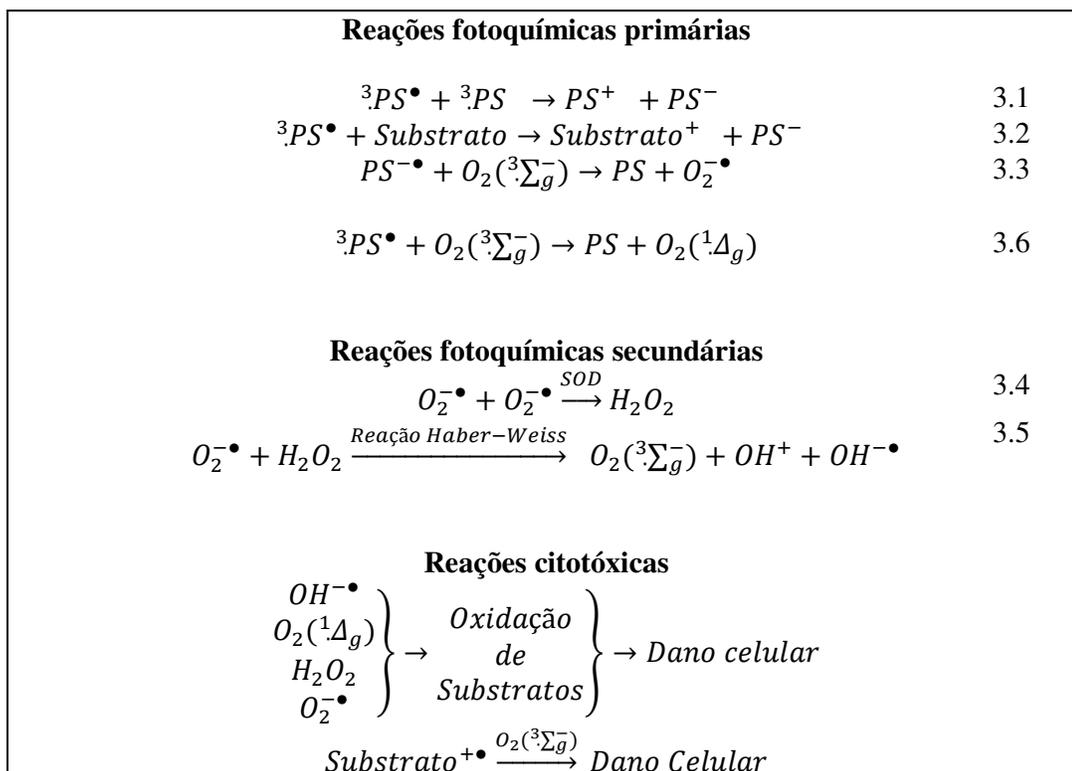
Ao ser irradiado o PS absorve energia do laser e vai para um estado eletrônico excitado. Depois de excitado o fotossensibilizador tem grande probabilidade de ir para o estado tripleto. A ativação do PS em estado tripleto excitado pode induzir mudanças químicas na vizinhança da molécula por dois caminhos, são reações fotoquímicas do Tipo I e Tipo II. Em reações fotoquímicas do tipo I (Equações 3.1, 3.2, 3.2 do Quadro 3.1), acontece a transferência de elétrons (ou prótons) para o oxigênio ou para moléculas adjacentes para formar radicais ânions ou cátions, respectivamente. Esses radicais tem preferência por reagir com moléculas de oxigênio para produzir ROS. Esse tipo de reação frequentemente resulta em formação de ânions superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) por transferência de elétron do PS para molécula de oxigênio[57,58]. Ânions superóxidos não são muito reativos com os sistemas biológicos,

porem eles podem reagir produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode passar facilmente pelas membranas (Equação 3.4 do Quadro 3.1). O H_2O_2 é bastante importante para destruição celular, pois os danos causados não estão restritos a um compartimento celular [14,59,60].

Em altas concentrações o peróxido de hidrogênio pode reagir com o ânion superóxido formando o radical hidroxila que é muito reativo, chamado de reação Haber Weiss (equação 3.5 do Quadro 3.1). Este pode atacar e oxidar qualquer molécula dentro da célula, a energia de ativação pra este íon reagir é muito baixa. Os radicais hidroxila atravessam facilmente membranas, assim, o dano também não é limitado a um compartimento celular [61].

A transferência de energia para a molécula de oxigênio é uma reação fotoquímica do tipo II (Equação 3.6 do Quadro 3.1). O oxigênio molecular em seu estado fundamental tem a configuração tripleto (3O_2) [62]. Durante a transferência de energia na reação do tipo II é formado oxigênio singleto (1O_2), uma espécie muito reativa. Os dois tipos de reação ocorrem em paralelo e a proporção em que ocorre depende de muitos fatores, o fotossensibilizador utilizado e a concentração de oxigênio são os mais importantes [57]. Para muitos fotossensibilizadores usados em TFD as reações do tipo II representam o processo dominante [63].

Quadro 3.1 – Reações fotoquímicas que ocorrem durante a TFD. Alguns tipos de reações primárias e secundárias desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio que causam dano celular. H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; $O_2(^1\Delta_g)$, oxigênio singlete (estado excitado); $O_2(^3\Sigma_g^-)$, oxigênio tripleto (estado fundamental); $O_2^{\bullet-}$, ânion superóxido; OH^{\bullet} , radical hidroxila; SOD, enzima superóxido dismutase (catalizador); X^\pm , espécies ânions e cátions; X^{\bullet} , espécies radicalares [14].



No estado fundamental, o oxigênio molecular tem dois elétrons desemparelhados com spins paralelos em dois orbitais antiligantes degenerados, π_x^* e π_y^* , esses elétrons tendem a possuir o mesmo spin de forma produzir multiplicidade 3, que significa que o estado fundamental do oxigênio é o estado tripleto. Já o oxigênio singlete tem elétrons no orbital π^* emparelhados, e sua multiplicidade é 1 [33,62].

Durante a TFD para formação de oxigênio singlete, o PS é excitado para o estado singlete com energia de aproximadamente $170-190 \text{ kJ.mol}^{-1}$, que corresponde ao comprimento de onda $620-690 \text{ nm}$. Após o cruzamento inter-sistemas é formado PS no estado tripleto com energia próxima a $110-130 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Essa molécula transfere energia para as moléculas de oxigênio, fazendo com que o oxigênio saia do estado tripleto e vá para o estado singlete, com energia de aproximadamente $94,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$, acima do estado fundamental. O limite de comprimento de onda para produção eficiente de 1O_2 é de 850 nm [64,65].

Quase todos os agentes PS empregados em TFD tem alto rendimento quântico (ϕ) para formação de oxigênio singleto. O rendimento quântico para reação do tipo II pode ser calculado pela Equação 3.7:

$$\phi = \frac{k_{React(T)}[T_1][S]}{k_{Phosp}[T_1] + k_{ISC(T)}[T_1] + k_{React(T)}[T_1][S]} \quad 3.7$$

Sendo que k_{React} é a constante de velocidade da reação, T_1 é o estado tripleto da molécula, S é o estado singleto da molécula, k_{Phosp} é constante de velocidade de fosforescência, k_{ISC} constante de velocidade de cruzamento inter-sistemas [14].

O oxigênio singleto pode difundir através do citoplasma e membranas biológicas, seu tempo de vida em água pura é estimado em 3.10^{-6} s [14,66]. No citoplasma esse tempo de vida é reduzido em mais de uma ordem de grandeza, passando a ter tempo de vida máximo de 1.10^{-7} s [67], e em função disso seu raio de ação é extremamente reduzido ($<0,02.10^{-6}$ m) [33].

Os mecanismos do tipo I e tipo II são controlados por difusão. As ROS que são formadas se difundem nos arredores do tecido afetado, o que desencadeia uma sequencia de reações bioquímicas, que atinge as células cancerosas causando danos de diferentes proporções, fazendo com que o tumor seja inviabilizado. Os sítios ricos elétrons que se encontram nas células-alvo, são os que se modificam mais facilmente, causando danos à mitocôndria, parede celular, e lisossomos, o que compromete a estrutura celular, levando à sua destruição [33].

3.2.3. Interação da radiação laser com o tecido biológico

Assim como acontece com a radiação ionizante, a atenuação da radiação eletromagnética na região espectral que se estende do UV até o IR no tecido é determinada por dispersão e absorção. Enquanto a radiação ionizante é desviada do seu caminho original principalmente por um espalhamento inelástico (efeito Compton), o espalhamento da radiação não ionizante é elástico. Nesse processo, a onda incidente muda sua direção, mas nenhuma energia é transferida. A dispersão, que se origina a partir da estrutura heterogênea do tecido, é determinada pelas variações do índice de refração entre as diferentes partes da própria célula e pela diferença das propriedades óticas entre as células e os meios circundantes. No processo de espalhamento o campo elétrico da luz varia periodicamente induzindo uma polarizabilidade que oscila com a mesma frequência que a luz incidente. O tecido em seguida,

atua como uma fonte secundária e a luz é reemitida em varias direções. O fenômeno de dispersão tem como impacto sobre a distribuição da luz no tecido biológico o aumento da reflexão, aumento da absorção e a distribuição de luz mais isotrópica na região distal (mais afastada) à superfície [68].

De acordo com o a primeira lei da fotoquímica, apenas a radiação absorvida é importante para a indução de uma resposta biológica. No processo de absorção o fóton incide sobre o material, a energia é transferida e o fóton deixa de existir. O principal efeito de um fóton absorvido é sobre os elétrons orbitais. Se um fóton absorvido tem alta energia, como os fótons de raios-X, o elétron exterior pode ser arrancado do átomo em um processo de ionização [68]. No entanto, se a energia do fóton é baixa (comprimentos de onda ultravioleta ou visível) o resultado pode ser a excitação de um elétron a partir da sua orbita regular para um estado de maior energia, aumentando a energia do átomo de seu estado fundamental para o estado singlete excitado [68].

Para absorver a luz de um determinado comprimento de onda, a molécula deve ter uma diferença de energia entre o seu estado fundamental e um dos seus possíveis estados eletronicamente excitados igual à energia do fóton. Se o fóton não tem a energia correta ele passa através do campo da molécula sem nenhuma transferência de energia. Ao contrario da radiação ionizante, a radiação não ionizante (para o laser ainda pode ser classificada como radiação ótica) é altamente seletiva em suas interações com biomoléculas.

A molécula em que a radiação eletromagnética é absorvida é chamada de cromóforo. Em um tecido normal, a absorção da luz, na parte do espectro visível ou infravermelho próximo, é determinado por cromóforos tal como melanina e hemoglobina. A absorção da radiação infravermelha com comprimentos de ondas maiores que 2000 nm ocorre na água do tecido [68].

Os pigmentos naturais como hemoglobina e melanina podem absorver a luz e interferir no tratamento por TFD. Órgãos altamente pigmentados e vísceras maciças, como medula óssea, rim, baço e fígado, podem impedir a penetração da luz e assim impossibilitar a terapia fotodinâmica. Na “janela fototerapêutica” compreendida entre 600 e 1000 nm a membrana celular apresenta uma considerável transparência à radiação eletromagnética. O fotossensibilizador adequado deve ter uma banda de absorção dentro nos limites da janela fototerapêutica [33]. Muitos fotossensibilizadores são ativados num intervalo de

comprimentos de onda que variam entre 630 e 700nm, este intervalo corresponde a uma profundidade de penetração de 0,5cm a 1,5 cm [69].

A fonte de luz deve ser monocromática com comprimento de onda próximo ao que o PS absorve, fornecendo apenas a energia necessária para que ocorra o efeito fotodinâmico. Caso contrário será depositada no tecido grande quantidade de energia além da que excitará o PS, podendo causar aquecimento e outros danos [9]. Em geral, para terapia fotodinâmica, lasers são utilizados como fonte de luz, por serem de baixo custo e fornecerem a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do fotossensibilizador, sem efeitos térmicos significativos [33].

Para se discutir a interação entre a luz e o tecido biológico na TFD torna-se necessário considerar os tecidos do corpo como o meio de propagação. A interação entre cada meio implica em processos de refração, reflexão, absorção e espalhamento (Figura 3.3) [70].

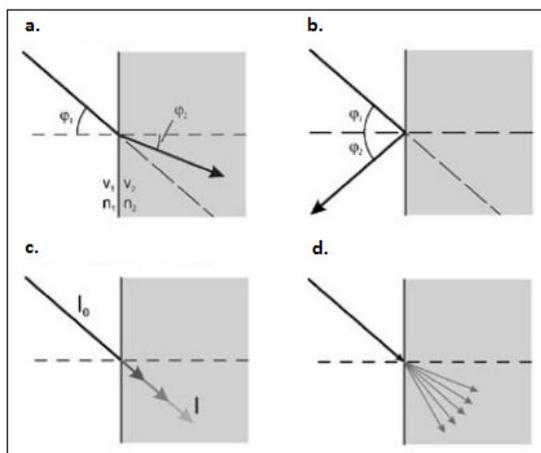


Figura 3.3– Interações entre luz e tecido: (a) refração, (b) reflexão, (c) absorção, (d) espalhamento.

A reflexão a partir da interface entre dois meios e a refração são regidos pelas leis de Fresnel (Equação 3.8) e Snell (Equação 3.9) respectivamente. O seu impacto na perda de intensidade são determinados pelos valores relativos dos seus índices de refração. Uma vez que ambos os processos são proporcionais aos ângulos de incidência, é possível minimizá-los mediante a aplicação do feixe de luz perpendicular a interface entre os dois meios [14].

$$\frac{\sin \varphi_1}{\sin \varphi_2} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad 3.8$$

$$\varphi_1 = \varphi_2 \quad 3.9$$

A dispersão da luz no tecido tem o efeito mais pronunciado na intensidade e na direção da luz. O espalhamento causa, juntamente com a refração, um alargamento do feixe de luz, resultando em uma perda da taxa de fluência e mudança no direcionamento do feixe. Os tipos de espalhamento são inelástico e elástico. No espalhamento inelástico alguns fótons ao se chocarem com a matéria causa excitação das moléculas e podem iniciar movimentos nos átomos, o que resulta em perda de parte da energia inicial do fóton. O espalhamento inelástico não desempenha um papel importante no presente processo. Para o espalhamento elástico temos duas possibilidades: a) quando as partículas são muito menores que o comprimento de onda da luz incidente, chamado de espalhamento Rayleigh; e b) quando o tamanho das partículas são próximo ou maior que o comprimento de onda luz incidente, chamado espalhamento Mie [14,71].

Além do espalhamento, a absorção da luz é o efeito mais relevante para a perda de intensidade com a profundidade da penetração. A redução na intensidade é causada por dois processos que podem ser descritos matematicamente por uma função exponencial similar a lei de Lambert Beer. A intensidade de uma dada profundidade x pode ser calculada pela equação 3.10, com I_x sendo a intensidade na profundidade x e I_0 a intensidade incidente [14]. Os parâmetros α_{abs} e α_{sca} representa os coeficientes de absorção e espalhamento respectivamente.

$$I_x = I_0 e^{-(\alpha_{abs} + \alpha_{sca})x} \quad 3.10$$

Os cromóforos mais importantes no tecido biológico são a água, oxi-hemoglobina, desoxi-hemoglobina (hemoglobina reduzida), melanina e citocromos. A absorção dessas moléculas define a janela ótica para terapia fotodinâmica [72].

Para que a TFD tenha um bom resultado a luz utilizada deve ser escolhida levando em consideração, além da excitação do fotossensibilizador, a intensidade e o poder de penetração, para garantir que a luz chegue ao tecido doente. A isso dá-se o nome de “dose fotodinâmica”, que pode ser definida como a área sob a curva de nível de sensibilizador traçado como uma função da dose de luz. A eficiência e a toxicidade estão ligadas à quantidade de luz entregue. Enquanto o modo de ação de vários agentes PS tem sido estudada intensivamente; a dosimetria de aplicação de luz é um pouco mais difícil, pois a luz passa através de meios com diferentes propriedades óticas (fibra de vidro, ar, água, tecido) [73].

Embora a dosimetria da TFD esteja em estágio inicial de desenvolvimento, a FDA tem aprovado parâmetros de doses de luz e de fármaco com margens de segurança que estão bem

documentados e são baseados em dados estatisticamente significantes obtidos a partir de ensaios clínicos. A seleção da dose de luz é o fator que se tem o maior controle na TFD, sua dose depende especificamente do tecido alvo [53].

3.2.4. Dose fotodinâmica e efeito fotodinâmico

O efeito fotodinâmico é proporcional ao produto fármaco/luz ou dose TFD, representado pela Equação 3.11 [53]:

$$D_{PDT} = \varepsilon C \psi \Phi t \quad (3.11)$$

em que ε é o coeficiente absorvidade molar do fotossensibilizador e representa a eficiência que um fotossensibilizador particular absorve luz.; C é a concentração de fotossensibilizador no tecido alvo; ψ é a intensidade; Φ representa o rendimento quântico do oxigênio singleto de um sensibilizador particular e t é o tempo em que o tecido é iluminado com a luz. Esta equação não leva em consideração a fotodegradação do fármaco durante a aplicação da luz.

A diminuição do fotossensibilizador, que pode ser resultado da fotodegradação, apresenta vantagens e alguns problemas em potencial. Se os níveis de fotossensibilizador no tumor não forem suficientemente elevados ou se a taxa de degradação for rápida, é possível que o fármaco seja consumido antes de acontecer a erradicação total do tumor. Contudo, com o acúmulo preferencial do fotossensibilizador em tecidos tumorais, a concentração tecidos saudáveis é baixa e, portanto os danos causados pela luz também são pequenos, levando a efeitos colaterais reduzidos [53]. A equação para a dose fotodinâmica que considera a fotodegradação pode ser expressa como [53]:

$$D_{PDT} = \varepsilon (C_0 \varepsilon^{-\beta J}) \psi \Phi t \quad (3.12)$$

em que ε é o coeficiente absorvidade molar do fotossensibilizador, β é o valor da constante de decaimento para um dado fármaco em um tecido específico, C_0 o nível inicial do fármaco no tecido, J a dose de luz, ψ é a taxa de fluência da luz, Φ representa o rendimento quântico do oxigênio singleto e t é a duração do tempo em que o tecido é iluminado com luz [74].

No caso de C_0 no tumor ser superior ao limiar de danos irreparáveis e C_0 no tecido normal circundante estar abaixo do limiar de danos irreparáveis, então, teoricamente, a exposição à luz pode ser aumentada sem um limite específico o que aumentaria a profundidade de penetração [74,75]. Entretanto, existem outros fatores a serem pesquisados,

como retroespalhamento da luz, concentração de radicais oxidantes no local, concentração exata do fármaco no tecido alvo, e concentração de oxigênio no tecido [53].

Os pressupostos acima indicados são compatíveis com o conceito de “fluência eficaz total”, que leva em conta as características de emissão espectral mais amplas de varias fontes de luz e as tentativas para definir a taxa de fluência eficaz em determinadas profundidades do tecido biológico [76]. Este modelo pode proporcionar uma medida de fluência eficaz, a uma profundidade escolhida no tecido, com base em medidas de suas características óticas e assim oferecer um medidor da dose absorvida. Teoricamente, pode-se incluir a função de profundidade de transmissão nos tecidos na determinação da dose na aplicação em TFD [53]. No entanto, atualmente nenhuma dessas características de atenuação (isto é transmissão ótica através da pele e absorção do fotossensibilizador) podem ser clinicamente medidas de modo exato [74]. Adicionalmente, a variação individual de cada paciente, tais como a pigmentação da pele, altera a transmissão ótica do tecido e parâmetros de refletância [53]. Dado o enorme desafio de medir estes fatores e incluí-los na prática da dosimetria de cada doente, o médico que trata o paciente pode, na prática, considerar apenas dois fatores; a dose do fármaco administrada e a dose de total de luz administrada. O médico tem que assegurar que a quantidade adequada de luz chegue ao local de destino, e que a energia e o tempo de exposição à luz é superior a um valor que foi determinado por ensaios clínicos prévios e está em conformidade com as doses de luz padrão já aprovados [53].

Uma das principais vantagens que a TFD possui em comparação com a quimioterapia e radioterapia é que possui boa reprodutibilidade e existe uma janela ótica razoável para a ativação do fármaco após a administração. Além disso, uma dose de luz insuficiente pode ser corrigida dentro de dias com a continuação da iluminação. Os erros mais comumente cometidos na aplicação de luz envolvem doses de luz insuficientes na TFD, que quando diagnosticado no prazo de uma janela de tratamento, pode ser retificável. A consequência de uma baixa dosagem, além do desperdício de tempo e recursos, é ausência de um tratamento efetivo observado nas primeiras 48h após a exposição ao laser. Caso uma segunda exposição ao laser ainda seja insuficiente é possível iniciar um novo protocolo de TFD com a readministração do fotossensibilizador [53]. Inversamente, uma sobredosagem de luz não é possível de se corrigir e apenas pode-se limitar os danos, dependendo da aplicação específica e o grau de sobredosagem. Contudo um aumento do efeito de profundidade pode resultar em consequências mínimas, dependendo da localização do tumor e da dose do PS que foi administrado.

Capítulo 4. A clorofila como agente fotossensibilizador

4.1. Introdução

É fato reconhecido que, sem os organismos fotossintetizantes, principalmente as plantas e algas; o reino animal morreria rapidamente e o planeta como conhecemos não seria possível. Apenas as formas de vida aquática mais simples sobreviveriam.

A fotossíntese é realizada para produção fotoquímica de matéria orgânica e para liberação de oxigênio em todos os seres vivos que são capazes de sintetizar seu próprio alimento, chamados autótrofos. Os seres autótrofos realizam a fotossíntese utilizando a energia química que foi convertida a partir da absorção de luz visível. As clorofilas são responsáveis por essa absorção, definindo assim a sua importância para sobrevivência de praticamente todas as formas de vida [77].

O químico Pierre-Joseph Pelletier juntamente com o farmacêutico Joseph Bienaimé Caventou foi quem deu o nome “clorofila” para o material de cor verde presente nos cloroplastos das folhas de plantas em 1818. Entre 1906 e 1914 Willstätter teve sucesso pela primeira vez em preparar a clorofila pura, e mostrou que havia dois pigmentos verdes, clorofila *a* e *b*, presente nas folhas das plantas. Essas clorofilas puderam ser separadas, pela solubilidade preferencial da clorofila *a* em éter de petróleo e a clorofila *b* em 90% de álcool metílico [78]. Além disso Willstätter encontrou que a relação entre a clorofila *a* e *b* era notavelmente constante nas plantas superiores, cerca três pra um e determinou a fórmula empírica correta para clorofila *a* $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$, provando pela primeira vez a presença de magnésio na molécula de clorofila [78].

Existem várias formas diferentes de clorofila. As clorofilas *a*, *b* e *c* foram identificadas no século XIX, a clorofila *d* foi relatada em 1943 e a clorofila *f* somente em 2010 [79]. A clorofila *a* (Chl-a) está presente em praticamente todos os organismos que realizam a fotossíntese oxigênica e é o pigmento utilizado pra realizar a fotoquímica (primeiro estágio do processo de fotossíntese). Também nas plantas existem os pigmentos acessórios, pigmentos que auxiliam a absorção de luz e transferência de energia para os centros de reação. Esses pigmentos incluem outras formas de clorofila, como a clorofila *b* (Chl-b) que está presente nos vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias, e a clorofila *c* em feófitas (algas

castanhas ou algas pardas) e diatomáceas (organismos unicelulares) [80]. A clorofila *d* é encontrada em algas vermelhas, enquanto a clorofila *f* é sintetizada na cianobactéria *Halomicronema hongdechloris* [79,80].

Desde as épocas mais antigas os corantes naturais, derivados de plantas, vêm sendo utilizados na indústria tanto de fármacos quanto de alimentos. O interesse por pesquisas em fontes de extração, estabilidade e rendimento desses corantes vem se expandindo cada vez mais a fim de explorar seu potencial biológico e suas propriedades físico-químicas [81]. A clorofila tem se mostrado excelente antioxidante e agente terapêutico no combate a diversas doenças. Além disso, suas características espectroscópicas indicam que a clorofila possui boas propriedades de um agente fotossensibilizador, como será discutido ao longo deste capítulo.

4.2. A estrutura química da Clorofila

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados de porfirina. As porfirinas (Figura 4.1-a) são ciclos tetrapirrólicos (4 anéis de pirrol- Figura 4.1-b), ligados por pontes metínicas (-CH-), formando um macrociclo. Seu centro é um espaço propício para um íon metálico. Na classificação de derivados porfirínicos, a clorofila pertence à classe das clorinas (Figura 4.1-c) [77,80]. As porfirinas estão presentes em muitos sistemas biológicos, como por exemplo, nos citocromos e nas hemoglobinas, cujos papéis são transferir elétrons na cadeia respiratória e transportar oxigênio na corrente sanguínea [82].

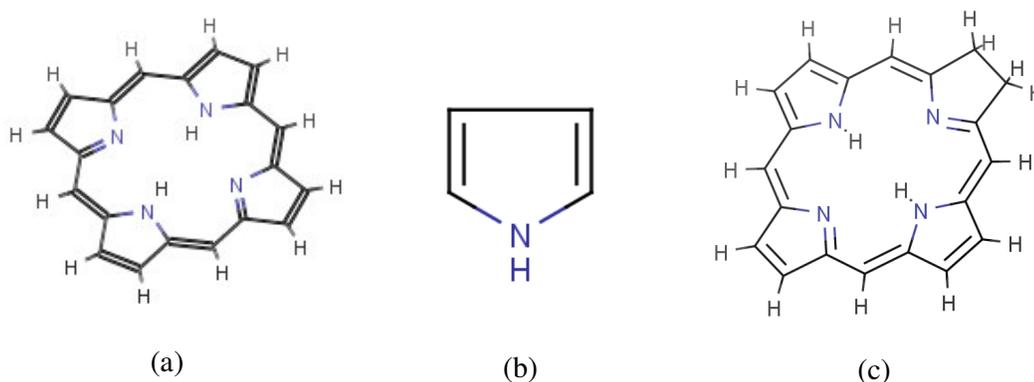


Figura 4.1 – Estrutura química de: (a) porfirina; (b) anel pirrol; (c) clorina.

Basicamente as moléculas de clorofila são ciclos tetrapirrólicos conjugados, em que um anel ciclopentanona (Figura 4.2-a) foi adicionado em conjunto com anel pirrol III [83,84]. A presença da ciclopentanona no anel porfirínico é suficiente para caracterizar o composto

como clorofila, independente do estado de oxidação ou das cadeias laterais. O macrociclo é planar, e tem complexado em seu centro o íon de magnésio (Mg^{2+}). A clorofila também tem, geralmente, um álcool de cadeia longa (normalmente o fitol – Figura 4.2-b). A molécula de clorofila tem uma parte hidrofílica que é o macrociclo, onde o segmento mais hidrófilo é o anel ciclopentanona e o ácido propanoico (localizado no quarto anel pirrólico). Há também na molécula uma parte hidrofóbica, atribuída a cadeia fitol [83,84].

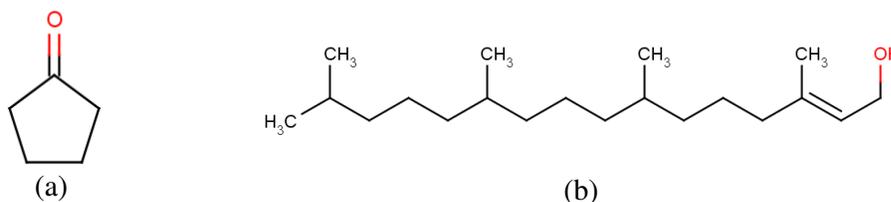


Figura 4.2 – Estrutura química de: (a) ciclopentanona; (b) fitol.

4.2.1. Estrutura química da Clorofila *a*

A clorofila *a* (Figura 4.3), é a mais frequente na família das clorofilas, correspondendo a 75% dos pigmentos encontrados em vegetais [85]. Somente a Chl-*a* é indispensável na fotossíntese aeróbica, exibindo um duplo papel; absorção de luz bem como conversão de energia dos fótons absorvidos em energia química [86].

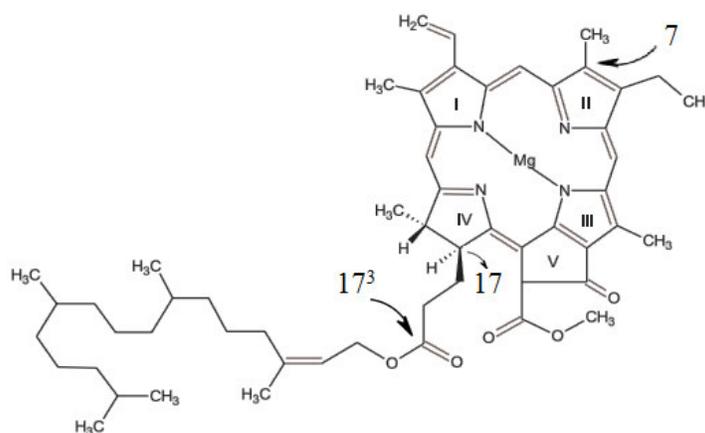


Figura 4.3 – Estrutura química da clorofila *a* [85].

A longa e apolar cadeia fitólica (relacionado ao álcool fitol), fixada no carbono 17³, confere a Chl-*a* um elevado caráter hidrofóbico e por isso a Chl-*a* e seus derivados não são solúveis em meio aquoso. Essa característica é a responsável pela tendência à auto-agregação apresentada por essas moléculas em solventes polares [84]. O fenômeno de auto-agregação é um fator limitante da aplicação da clorofila em TFD, pois diminui o tempo de vida médio do

estado excitado, reduzindo a sua eficiência como fotossensibilizador. Para evitar que aconteça a auto-agregação, seu transporte seja mais eficiente e a clorofila possa acumular preferencialmente nos tecidos-alvos esse trabalho propõe o uso da Chl-a transportada pelo dendrímero de poliglicerol (PGLD).

4.3. Espectro eletrônico das Clorofilas

A absorção de luz de baixa frequência na extremidade do espectro visível (400-700 nm) necessita de uma extensa rede de ligações conjugadas e isso significa uma molécula relativamente grande, como as porfirinas e seus derivados [86]. As porfirinas absorvem fortemente na região azul do espectro visível (380-500 nm) [87], enquanto as clorinas absorvem fortemente em ambas; azul e vermelho (próximo a 650nm) [88] do espectro eletromagnético [89]. Fótons azuis tem mais energia que fótons vermelhos cuja energia pode ser calculada pela relação de Planck:

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (4.1)$$

em que E é energia do fóton, h a constante de Planck, c a velocidade da luz no vácuo, e λ é o comprimento de onda da luz [86].

O primeiro modelo a fornecer uma imagem satisfatória das propriedades óticas de clorinas foi o modelo de Gouterman [12,90]. Nesse modelo apenas os dois maiores orbitais ocupados (HOMO-1, HOMO) e os dois orbitais moleculares não ocupados mais baixos (LUMO e LUMO+1) são considerados. Em clorinas, a saturação de uma das subunidades pirrol reduz a simetria da molécula e isso faz com que os níveis de energia HOMO e LUMO se afastem [13].

As clorofilas apresentam um circuito fechado de ligações conjugadas que lhes permitem absorver luz, são duas bandas de absorção no espectro visível, uma na região do vermelho correspondente ao primeiro estado excitado, e outra no azul que corresponde ao segundo estado excitado. A clorofila pode voltar ao estado fundamental emitindo fluorescência principalmente do primeiro estado excitado. Isso acontece, pois o estado singleto excitado decai inicialmente para o estado tripleto.

O grande anel macrocíclico é a base para as propriedades óticas da clorofila. A estrutura eletrônica é baseada em um macrociclo planar de 20 átomos de carbono em torno de um núcleo central de quatro átomos de nitrogênio. Esta configuração suporta uma estrutura

eletrônica muito estável com orbital π , em que as ligações alternam entre simples e duplas ligações entre os átomos de carbono. Devido ao anel macrocíclico ser planar a sobreposição é máxima entre os orbitais π adjacentes. Portanto, os elétrons π são livres para se moverem para o orbital π vizinho resultando numa deslocalização de elétrons π ao redor de todo o anel macrocíclico [13].

Em particular, o espectro da Chl-a (em éter dietílico) (Figura 4.4) mostra quatro bandas na região do vermelho do espectro eletromagnético (região Q) em 660, 612, 572 e 519 nm, e outras quatro bandas na região do azul do espectro (região Soret - ou região B) em 428, 409, 379 e 326 nm. De acordo com Gouterman [12], essas bandas tem origem na transição singlete π - π^* entre dois maiores orbitais ocupados (HOMO) e os dois menores orbitais desocupados (LUMO) [86,91]. Esses estados são originados a partir da excitação dos elétrons dos orbitais do nitrogênio não ligado dos anéis pirrol aos orbitais excitados do anel macrocíclico [13]. A Tabela 4.1 mostra a as diferenças no espectro de absorção e fluorescência em dois diferentes ambientes moleculares para Chl-a.

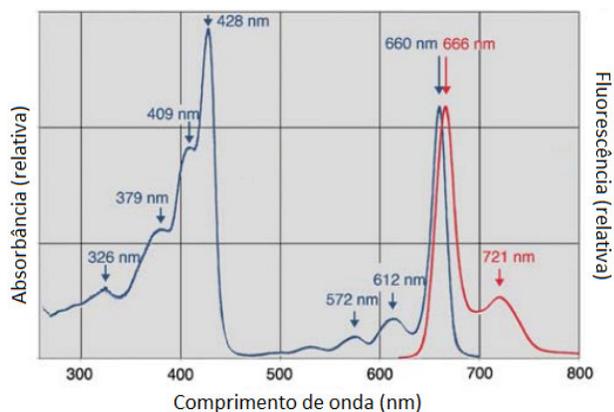


Figura 4.4 - Espectro de absorção (linha azul) e fluorescência (linha vermelha) da clorofila *a* [86].

Tabela 4.1 – Espectro máximo de absorção e fluorescência da clorofila [13].

Chl-a	Absorção em solução (nm)	Emissão em solução (nm)
Acetona	430; 662	668
Éter dietílico	430; 662	666

Nas plantas, são os carotenóides, lipídios, proteínas e lipoproteínas que protegem a clorofila da fotodegradação durante a fotossíntese enquanto estão nas células vegetais. Contudo, fora das células vegetais as clorofilas perdem essa proteção e na presença de luz e oxigênio ficam suscetíveis a fotodegradação [92].

Na fotodegradação das clorofilas acontece o rompimento do anel tetrapirrólico e a fragmentação em compostos de menor massa molecular. A degradação começa pelo anel com a abertura em uma das pontes metino e forma tetrapirróis lineares oxidados. Quando expostas à luz, em presença de oxigênio, a clorofila pode gerar oxigênio singleto e/ou radicais hidroxila, que podem reagir com os tetrapirróis formando peróxidos e mais radicais livres, que levam a destruição da estrutura porfirínica sendo o glicerol o principal produto de fotodegradação das clorofilas [92].

As moléculas de clorofila são os mais eficientes pigmentos “antenas” (que captura energia luminosa) encontradas na natureza. Elas exibem uma notável capacidade para transferir a energia de excitação para outra molécula de clorofila com 90% de eficiência [13].

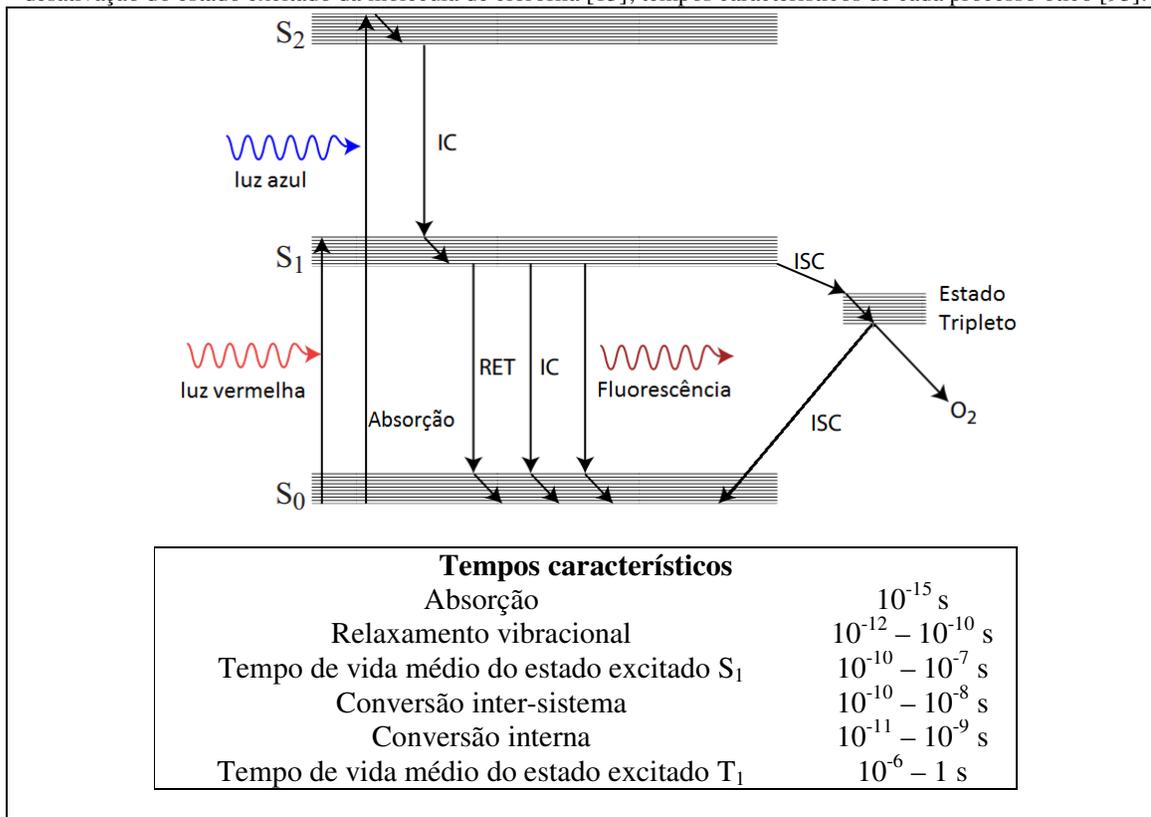
O Quadro 3.2 mostra a representação esquemática dos níveis de energia da clorofila e sua dinâmica de excitação e relaxamento. É notório que existem somente dois comprimentos de onda dominantes para excitação molecular correspondente às bandas de absorção Soret ($S_0 \rightarrow S_2$) e Q ($S_0 \rightarrow S_1$). Uma vez que o elétron é excitado do estado fundamental S_0 para o primeiro estado excitado S_1 ou para o segundo estado excitado S_2 , uma parte da energia pode ser liberada por relaxamento vibracional (VR) para o menor nível do mesmo estado excitado ou por conversão interna (IC) para um estado de mais baixa energia [13,92]. A partir do primeiro nível de energia S_1 o elétron tem alguns caminhos possíveis para voltar ao estado fundamental, que são IC, fluorescência, transferência de energia ressonante (RET) para outra molécula, ou sua energia decai para um estado tripleto por conversão inter-sistema (ISC). O estado tripleto pode produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) ou decair para S_0 por ISC [13,92].

De acordo com o Quadro 3.2 o rendimento quântico de fluorescência (ϕ) pode ser expresso utilizando as constantes de velocidade como:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{RET}} \quad (4.2)$$

em que k_F é a probabilidade de emissão espontânea $S_1 \rightarrow S_0$, k_{IC} é a probabilidade de transição não radioativa $S_1 \rightarrow S_0$, k_{ISC} é a probabilidade de transição $S_1 \rightarrow T_1$ e k_{RET} é a probabilidade de transferência de energia para outra molécula. Por exemplo, quando duas moléculas se aproximam uma da outra, k_{RET} e k_{ISC} aumentam enquanto ϕ_F diminui.

Quadro 3.2 – Diagrama de Jablonski simplificado que ilustra os possíveis mecanismos de excitação e desativação do estado excitado da molécula de clorofila [13]; tempos característicos de cada processo ótico [93].



Por isso, as propriedades óticas da clorofila são sensíveis a ambientes moleculares (constante dielétrica do meio). A Tabela 4.2 apresenta o tempo de vida médio da Chl-a *in vitro*. O tempo de vida médio é da ordem de nanosegundos, esses longos tempos de estado singlete excitado justificam a alta probabilidade de ocorrer ISC e favorece a formação de espécies reativas de oxigênio.

Tabela 4.2 - Tempo de vida médio da Chl a [94].

Chl a <i>in vitro</i>	Fluorescência Tempo de vida médio τ_F (ns)
Benzeno	7,8
Éter etílico	5,1
metanol	6,9

4.4. A clorofila a usada como fotossensibilizador

Para a terapia fotodinâmica o fotossensibilizador ideal deve absorver luz com comprimentos de onda entre 650 e 1000nm, região em que o tecido é consideravelmente transparente e a energia são suficientes para formação de oxigênio singlete, sem causar danos às células que não contenham o fotossensibilizador. A absorção da Chl-a acontece em 660nm atendendo a esse parâmetro. A capacidade de transferência de energia de uma molécula para outra também favorece o uso da clorofila como fotossensibilizador, além de possuir um bom rendimento quântico de fluorescência [13].

Outra característica importante é a elevada eficiência quântica para ISC, e um estado tripleto de longa duração, pois aumenta a eficiência de formação de ROS, garantindo a eficiência da terapia fotodinâmica.

Portanto, as características óticas discutidas anteriormente sobre a Chl-a indicam que a molécula possui características adequadas para sua aplicação como agente fotossensibilizador para terapia fotodinâmica.

Capítulo 5. Dendrímeros: propriedades e aplicações

5.1. Introdução

Um dos maiores problemas enfrentados atualmente pela indústria farmacêutica é a baixa solubilidade no ambiente aquoso do corpo de muitos fármacos. Frequentemente a eficácia dos fármacos é diminuída por sua inabilidade de conseguir acesso ao local de ação em doses apropriadas. Portanto, esses fármacos podem ser abandonadas, entregues em grandes volumes de soluções aquosas ou etanólicas ou emulsionadas com agentes tensoativos para aumento de sua solubilidade. Porém, todas essas modificações podem resultar em eficácia reduzida ou efeitos colaterais prejudiciais para o paciente [95]. Na procura para solucionar essas barreiras na administração de fármacos muitas abordagens para entregar compostos hidrofóbicos usando carreadores poliméricos, como os dendrímeros, têm sido exploradas [96].

Arquiteturas dendríticas são uma das topologias mais difundidas observadas na natureza em suas escalas micro e macrodimensional. Na escala nanométrica (nível molecular), há relativamente poucos exemplos naturais dessa arquitetura. Os exemplos mais notáveis são o glicogênio e amilopectina, estruturas moleculares hiper-ramificadas utilizadas no armazenamento de energia. No campo de polímeros, a topologia dendrítica é reconhecida como a quarta classe principal de arquitetura macromolecular [97].

A química de polímeros tem sido tradicionalmente focada em polímeros lineares ou macromoléculas lineares com baixa densidade de ramificações. Porém verificou-se que as propriedades de macromoléculas altamente ramificadas podem ser muito diferentes dos polímeros convencionais. A literatura demonstra que a estrutura desses materiais também tem um grande impacto sobre suas aplicações tecnológicas [98].

Atualmente os polímeros com elevada densidade de ramificação são constituídos por quatro subclasses de arquiteturas dendríticas: a) polímeros hiper-ramificados aleatórios; b) polímeros arborescentes (estruturas dendríticas enxertadas - *Dendrigrafts*); c) dendrons; e d) dendrímeros. A disposição dessas subclasses a partir de a) para d), reflete o grau relativo de controle estrutural presente em cada uma dessas arquiteturas dendríticas (Figura 5.1) [97].

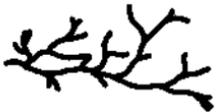
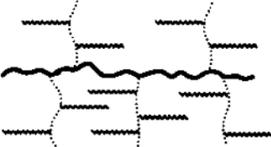
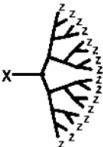
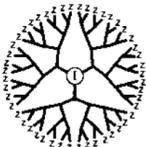
(a)	(b)	(c)	(d)
Estrutura aleatória	Estrutura semicontrolada	Estruturas controladas	
Polímero hiper-ramificado aleatório	<i>Dendigrfts</i>	Dendrons	Dendrímeros
			

Figura 5.1 – Polímeros dendríticos: subclasses da quarta maior nova classe de arquitetura molecular [97].

Dendrons e dendrímeros são os subconjuntos de polímeros dendríticos mais investigados. A palavra dendrímeros é derivado do grego *dendri* (galho de árvore) e *meros* (parte). As duas família de dendrímeros mais amplamente estudadas são: a) tipo Fréchet ou composições poliéter; e b) tipo Tomalia, dendrímeros de poli(amido amina) (PAMAM), que constituem a primeira família de dendrímeros a ser comercializado [97].

5.2. A estrutura dendrítica

Os polímeros dendríticos são macromoléculas globulares ramificadas que possuem uma topologia específica: núcleo, camadas (gerações - unidades repetitivas de ramificações), e grupos terminais periféricos (casca). Os dendrímeros são macromoléculas perfeitamente ramificadas, com sua arquitetura unimolecular e distribuição do peso molecular bem definidos. Essa classe de moléculas são atrativas para utilização como nanocarreadores para aplicações de entrega e solubilização de fármacos [96,99,100]. Estas macromoléculas ramificadas podem ainda ter sua periferia quimicamente modificadas de forma a melhorar sua hidrofiliicidade [95,97].

A síntese de dendrímeros envolve elevado nível de controle das etapas sintéticas envolvidas, difícil de ser atingido nos processos de síntese dos polímeros convencionais o que leva à obtenção de macromoléculas quase monodispersas, de estrutura globular com uma elevada densidade periférica de grupos funcionais.

As unidades repetitivas no dendrímero encontram-se descritas por geração, começando com a molécula do núcleo central descrita por geração 0 (G0), e aumentando a cada adição sucessiva de pontos de ramificação (G1, G2, G3, etc...). Os dendrímeros são geralmente caracterizados pela sua geração terminal de tal modo que um dendrímero G5 refere-se a um

polímero com quatro gerações de pontos de ramificação que emanam a partir de um núcleo central ramificado [101].

É interessante observar que os dendrímeros podem ser vistos como dispositivo de processamento de informação, em nanoescala. Cada componente da arquitetura macromolecular manifesta uma função específica, enquanto que ao mesmo tempo as propriedades dessas nanoestruturas são replicadas de geração em geração. Por exemplo, o núcleo pode ser considerado como o centro de informação, a partir do qual a forma, direcionalidade e multiplicidade são expressas através da ligação covalente das camadas externas. No interior, encontra-se a amplificação da região de ramificação, que define o tipo e volume da cavidade conforme o dendrímero cresce [97].

A multiplicidade das ramificações (pontos de ramificação da unidade de repetição) determina a densidade e grau de amplificação como uma função exponencial da geração (G). A composição interior e volume da cavidade determinam a extensão e natureza das propriedades do conjugado hóspede-hospedeiro que são possíveis dentro de uma particular família e geração de um dendrímero. Finalmente, a superfície é constituído por grupos terminais reativos ou passivos que podem executar várias funções [97].

Com a funcionalização adequada, dendrímeros servem como um modelo de polimerização, uma vez que cada modelo de geração é amplificado e ligado covalentemente ao precursor de geração. Os grupos de superfície podem também funcionar como portas passivas ou reativas controlando a entrada ou saída das moléculas hospedes do interior do dendrímero [97].

As três componentes de arquitetura (núcleo, interior e periferia) determinam as propriedades físicas e químicas, bem como tamanho global, forma e flexibilidade do dendrímero. É importante notar que o diâmetro do dendrímero aumenta linearmente em função das terminações ou com o aumento das gerações, ao passo que o número de grupos funcionais terminais aumentam exponencialmente em função da geração, levando a aglomeração estérica dos grupos terminais. Como consequência os dendrímeros de geração mais baixas (0, 1 e 2) são geralmente estruturas assimétricas, flexíveis e abertas, enquanto que as gerações mais elevadas (gerações 4 e superiores) tornam-se sólidas, esferoides menos deformáveis, elipsoides, ou cilindros dependendo da forma ou direcionalidade do núcleo, e gera uma estrutura fechada como uma membrana [97,98,102].

O aumento da densidade das ramificações com a geração também tem efeitos marcantes na estrutura do dendrímero. Eles são caracterizados pela presença de cavidades internas e por um grande número de grupos terminais reativos (Figura 5.2)[98].

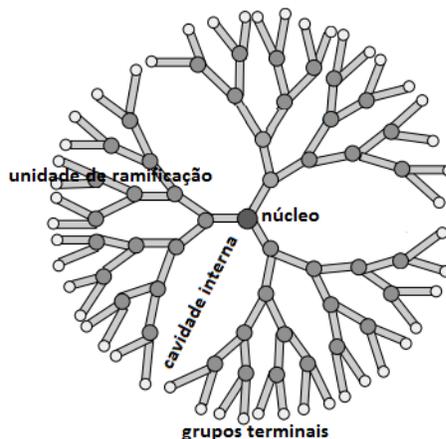


Figura 5.2 - Representação da geração 4 de um dendrímero [98].

5.3. Os métodos de síntese dos dendrímeros

Os dendrímeros podem ser sintetizados por uma de duas estratégias [103]:

1. podem crescer para fora a partir de um núcleo central, um processo conhecido como método divergente, Tomalia e Newkome foram pioneiros nesse método [104,105];
2. podem ser sintetizados a partir da periferia e encerra no núcleo, conhecido como método convergente de Fréchet [106].

No método divergente, o dendrímero cresce para fora a partir de uma molécula de núcleo multifuncional (Figura 5.3-a). O núcleo reage com as moléculas de monômeros contendo um grupo reativo e dois grupos latentes, formando a primeira geração do dendrímero. Então, a nova periferia da molécula é ativada para reação com mais monômeros. O processo é repetido, formando o dendrímero uma camada após a outra [98].

A abordagem divergente é mais adequada para a produção de dendrímeros em escala semi-industrial. Entretanto, podem ocorrer reações secundárias ou incompletas dos grupos terminais que levam a defeitos de estrutura. Para evitar reações secundárias é necessário grande excesso de reagentes, o que pode causar dificuldades na purificação do produto final [98].

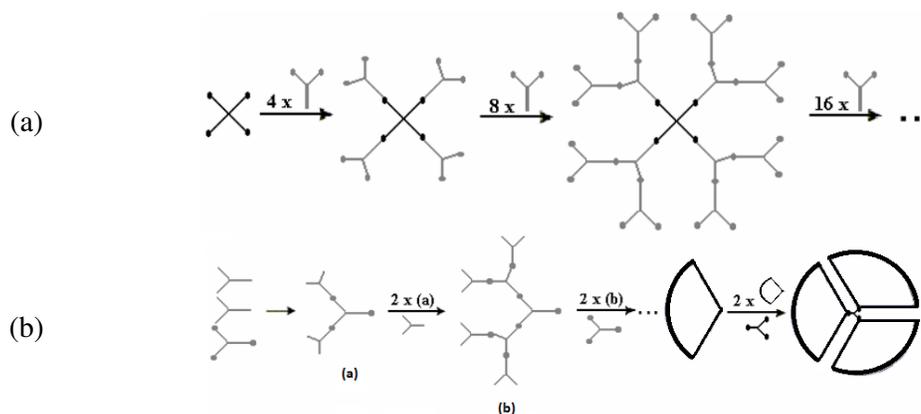


Figura 5.3 – Métodos de crescimento de dendrímeros: (a) divergente e (b) convergente [98].

Os métodos convergentes foram desenvolvidos como uma resposta às deficiências da síntese divergente [98]. Na abordagem convergente, o dendrímero é construído passo a passo, a partir dos grupos terminais e progredindo para dentro. Quando os braços poliméricos ramificados, os dendrons, são grandes o suficiente, eles são ligados a um núcleo multifuncional (Figura 5.3-b). Este método possui como vantagens a maior facilidade na purificação do produto sendo minimizada a ocorrência de defeitos na estrutura dendrítica. A abordagem convergente não permite a formação de altas gerações devido ao impedimento estérico nas reações dos dendrons com o núcleo [98].

De modo geral os métodos convergentes produzem dendrímeros monodispersos. Isso acontece porque o crescimento convergente permite a purificação em cada passo da síntese e elimina os defeitos cumulativos devido aos acoplamentos que falharam. Apropriadamente purificados, dendrímeros produzidos pelo método convergente apresentam elevado grau de simetria [97].

5.4. Aplicações clínicas de dendrímeros

A importância do papel de macromoléculas dendríticas nas terapias antitumorais e diagnóstico por imagem é bem reconhecido pela literatura atual [103,107]. Como as relações entre arquitetura, biocompatibilidade, retenção e entrega (direcionamento preferencial à tecidos alvo) tornaram-se mais claras, vários dendrímeros, especialmente o PAMAM e seus derivados tem sido sintetizados para aplicações na medicina [103,107].

Progressos significativos já foram alcançados nesse século sobre a utilização de dendrímeros para fins terapêuticos e de diagnósticos para o tratamento de várias

enfermidades, incluindo o câncer [103,107]. Nesse sentido, várias formas farmacêuticas foram desenvolvidas a partir de dendrímeros, incluindo a obtenção de sistemas de liberação controlada de agentes antineoplásicos e de contraste para utilização na terapia por captura de nêutrons, terapia fotodinâmica, e terapia fototérmica [103,107].

Os princípios gerais para a concepção de dendrímeros como veículos de entrega estão baseados nas observações gerais de que [103]:

1. dendrímeros carregados negativamente ou neutros são geralmente biocompatíveis, enquanto os carregados positivamente mostram vários graus de toxicidade;
2. a arquitetura do dendrímero tem grande influência sobre a farmacocinética;
3. a introdução do poli(etileno glicol) na estrutura do dendrímero aumenta a solubilidade em água e também aumenta o tamanho do dendrímero, podendo melhorar suas características de retenção e biodistribuição;
4. os agentes terapêuticos podem ser encapsulados na cavidade do dendrímero ou podem ser covalentemente ligados aos grupos periféricos funcionalizados;
5. a fim de direcionar o dendrímero preferencialmente para células cancerosas, receptores específicos podem ser ligados à sua superfície.

Sistemas de entrega de fármacos baseados em polímeros são projetados para melhorar a farmacocinética e biodistribuição de fármacos e/ou proporcionar cinética de liberação controlada para o alvo pretendido. O dendrímero carreador ideal deve exibir alta solubilidade em meio aquoso, capacidade de carregar o fármaco, biodegradabilidade, baixa toxicidade, características favoráveis de retenção e biodistribuição, especificidade, e biodisponibilidade adequada. Em sistemas de entrega de fármacos baseados em dendrímeros, os mesmos podem ser acoplados ao dendrímero de duas formas [103]:

1. encapsulada no interior do dendrímero (Figura 5.4-a); a forma da molécula hospede, da “caixa dendrítica” e o tamanho da cavidade determinam o número de moléculas que podem ser encapsuladas;
2. covalentemente em grupos terminais funcionalizados, para formar pró-fármacos macromoleculares (Figura 5.4-b).

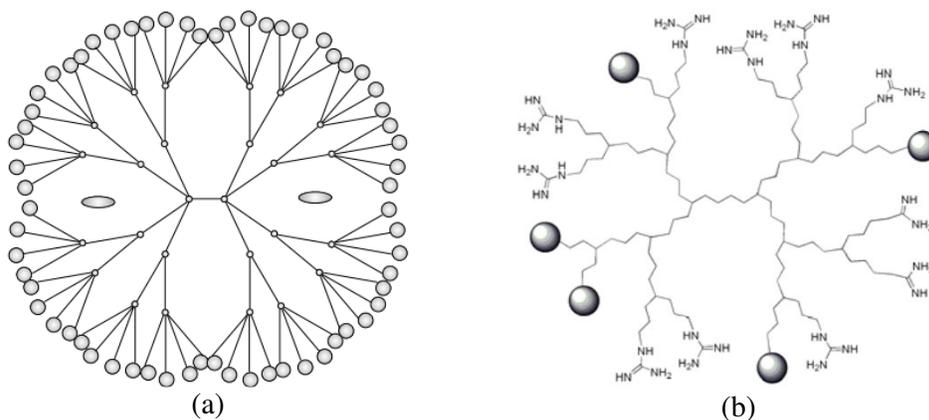


Figura 5.4 – a) Molécula hóspede encapsulada na “caixa dendrítica” [98]; b) molécula hospede ligada covalentemente na periferia do dendrímero [108].

Os dendrímeros conjugados covalentemente podem ser considerados adequados para liberação de fármacos em um sítio específico em condições biológicas, pois são mais estáveis em comparação com os compostos encapsulados, segundo a comparação feita por Patri, et al. (2005) com dendrímeros de PAMAM de geração 5 [109].

Um exemplo do conjugado dendrímero/fármaco é o paclitaxel cuja solubilidade em meio aquoso foi melhorada através de formulações de dendrímeros de poliglicerol, mostrando que não é necessário que o dendrímero tenha um núcleo hidrofóbico para que haja encapsulamento e solubilização de fármacos hidrofóbicos [110].

O conjugado dendrímero-fármaco é altamente capaz de transportar o fármaco com biodisponibilidade suficiente para atingir o objetivo terapêutico. A liberação do fármaco é dependente da ligação do agente terapêutico e o transportador [103].

A entrega de fármacos macromoleculares com propriedades antitumorais usando arquiteturas dendríticas multifuncionais permite a conjugação de fármacos ligando na periferia do dendrímero moléculas como, ácido fólico, anticorpos monoclonais, e peptídeos para entregas cada vez mais específicas. Na oncologia a entrega direcionada dos agentes quimioterapêuticos para as células tumorais se traduz em efeitos colaterais significativamente reduzidos em comparação com a entrega sistêmica utilizada nos tratamentos oncológicos tradicionais, onde tecidos saudáveis como rins, fígado, baço e medula óssea podem acumular níveis tóxicos de fármacos [103].

5.5. Aplicações de dendrímeros na terapia fotodinâmica

Para que a terapia fotodinâmica tenha uma elevada eficiência, o agente PS deve acumular-se preferencialmente nos tecidos tumorais. O uso de dendrímeros como veículo de entrega do fotossensibilizador garante o direcionamento do agente fototerapêutico ao tecido alvo.

As duas estratégias gerais de direcionamento do dendrímero incluem o direcionamento passivo de tecido canceroso e o direcionamento ativo de células tumorais. O direcionamento passivo é geralmente conseguido através do aumento do raio hidrodinâmico do dendrímero, levando a uma acumulação de dendrímero no tecido tumoral através do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (Enhanced Permeability and Retention, EPR) [103].

O efeito EPR é resultado da angiogênese induzida por tumores conduzindo a neovascularização, que é irregular, podendo conter vazamentos, ou defeitos com células endoteliais desorganizadas. A estrutura anatômica dos vasos tumorais apresenta aumento da permeabilidade microvascular em relação aos vasos normais, permitindo a penetração de macromoléculas. Além disso, os tecidos neoplásicos também possuem alta pressão intersticial, que retarda o extravasamento de macromoléculas, como não há sistema linfático para drenagem acontece um acúmulo dos dendrímeros no interior dos tecidos tumorais [111,112].

O direcionamento ativo, ou específico, depende da conjugação de uma ou mais moléculas que são mediadores da interação entre o dendrímero e o receptor, como por exemplo o ácido fólico. Estudos têm mostrado que o conjugado ácido fólico-dendrímero é direcionado preferencialmente a células tumorais, pois estas apresentam grande expressão de receptores de ácido fólico [113,114].

5.6. O políglicerol dendrítico

As características apresentadas pelo dendrímero de políglicerol (PGLD) são favoráveis para utilização como carreador farmacológico. O PGLD é caracterizado pela presença de grupos hidroxilas e ligações éter (Figura 5.5), e é solúvel em água a baixas gerações. É possível transformar e utilizar os grupos hidroxilas funcionais como sítios para imobilização de substâncias de interesse biológico [110]. A baixa citotoxicidade e a aprovação de polímeros ou oligômeros do políglicerol pela FDA (*Food and Drug Administration*) como

emulsificante nas indústrias farmacêutica e alimentícia, fazem do PGDL um polímero bastante promissor para uso no campo da biomedicina [16].

Os dendrímeros de poliglicerol (PGLD) fazem parte de uma classe de materiais versáteis que podem ser sintetizados para gerar arquiteturas moleculares similares às observadas em sistemas biológicos, sendo por isso conhecidos como “proteínas artificiais” [15,16].

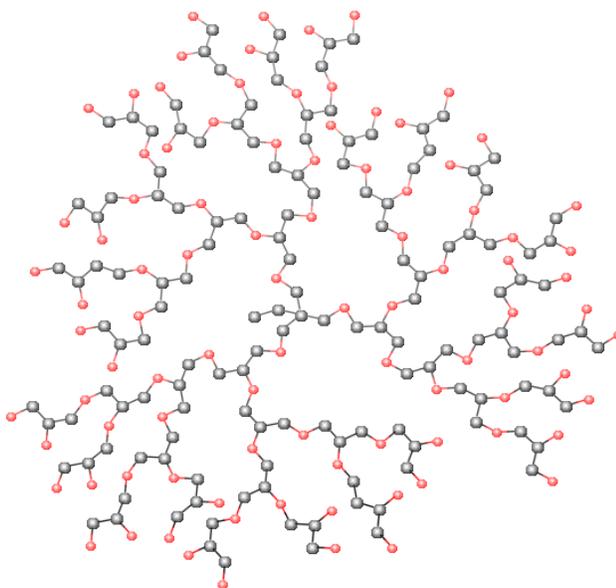


Figura 5.5 – Dendrímero de poliglicerol de geração 4, as esferas vermelhas representam o oxigênio e as pretas o carbono [110].

O PGLD é sintetizado através do método divergente, sendo obtido principalmente de um subproduto do biodiesel, a glicerina, atualmente abundante no Brasil e que tem na produção de dendrímeros da família PGLD, sua reciclagem com viabilidade econômica e ecológica.

A elevada funcionalidade e biocompatibilidade do poliglicerol dendrítico faz desse polímero um promissor transportador para fotossensibilizadores, como a clorofila, fazendo com que a terapia fotodinâmica seja mais eficiente e tenha efeitos colaterais ainda mais reduzidos.

Capítulo 6. O laser como ferramenta para a terapia fotodinâmica

6.1. Introdução

Os lasers são dispositivos que geram e amplificam radiação coerente em frequências nas regiões do espectro infravermelho, visível, ou raio X. Os lasers operam por meio de um princípio geral que originalmente foi inventado em frequências de micro-ondas, onde foi chamado de amplificação de micro-ondas por emissão estimulada de radiação ou ação *maser* (Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation). Quando estendida para frequências óticas isso, naturalmente, torna-se amplificação de luz por emissão estimulada de radiação, ou ação *laser* (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) [115].

Nas áreas de saúde os lasers são comumente aplicados para coagular, vaporizar ou ablacionar tecidos biológico. Lasers para esses fins apresentam alta potência e efeitos térmicos [116]. Entretanto lasers de baixa potência também têm sido utilizados no tratamento de enfermidades. Lasers de baixa potência não provocam aquecimento significativos da pele, são responsáveis pelos efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos [116]. Em terapia fotodinâmica os lasers exerce um papel fundamental para excitar o fotossensibilizador e desencadear as reações que resultarão na destruição de um tumor ou um efeito bactericida.

O laser não tem apenas aplicações médicas, o princípio básico do laser é agora usado em uma enorme variedade de dispositivos que operam em muitas partes do espectro eletromagnético. Existem alguns tipos de laser disponíveis pra uso em pesquisa, comercialmente, aplicações medicas e na indústria [115]. Laser são geralmente descritos pelo meio ativo que é usado para construí-lo, sendo assim os tipos de laser são:

1. Laser de estado sólido – Exemplos: laser Nd:vidro, laser de rubi, Nd: YAG)
2. Lasers de gás – Exemplos: He-Ne, laser CO₂, laser de argônio
3. Lasers químicos – Exemplo: laser de fluoreto de deutério
4. Excimeros – Exemplos: XeCl, XeF, ArF
5. Laser dye (laser de corante) – Exemplos: rodamina, cumarina, verde malaquita

6.2. Emissão espontânea e emissão estimulada

O processo de amplificação ótica que o laser usa pra emitir luz é baseado na emissão estimulada de radiação magnética. Existem várias maneiras de um átomo no estado excitado perder sua energia. A energia pode ser transferida para outro átomo, ou pode ser emitido na forma de luz. Se a energia é emitida em forma de luz, o comprimento de onda da luz emitida corresponde a energia perdida pelo átomo. Existem dois mecanismos através dos quais a luz pode ser emitida; emissão espontânea ou emissão estimulada.

Quando um fóton cuja energia é exatamente o necessário para remover o átomo do seu estado fundamental para o primeiro estado excitado é absorvido, o átomo permanece no estado excitado por um período de tempo conhecido como tempo de vida espontânea o que é característico de cada transição eletrônica em particular [117]. Muitas transições possuem tempo de vida espontânea de nanossegundos ou microssegundos, no entanto tempos de vida mais longos e também mais curtos são conhecidos [117]. Na emissão espontânea o átomo emite espontaneamente o fóton e retorna ao seu estado fundamental, nesse caso o fóton é emitido em uma direção aleatória.

O processo de emissão estimulada (usada no processo de amplificação da luz no laser) para um átomo isolado é ilustrado na Figura 6.1. Um segundo fóton, com exatamente a mesma energia que o fóton absorvido; interage com o átomo excitado e estimula-o para emitir um fóton. Esta emissão pode ocorrer antes que a tempo de vida espontâneo tenha decorrido. O segundo fóton não é absorvido pelo átomo, mas sua presença faz com que o átomo emita radiação eletromagnética. Tal como é indicado na Figura 6.1, a luz é emitida na direção definida pelo fóton estimulante e assim; ambos os fótons possuem a mesma direção. Uma vez que o fóton estimulante tem a mesma energia que o fóton emitido, a luz emitida tem o mesmo comprimento de onda da luz que promove a transição eletrônica. A polarização da luz emitida também é a mesma que a da luz estimulante além de possuir a mesma fase [117,118].

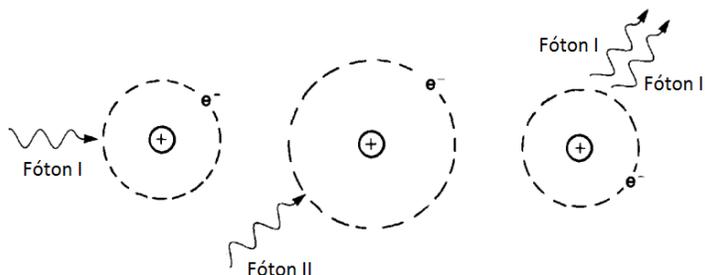


Figura 6.1 – Um segundo fóton pode estimular o átomo a emitir em um tempo menor que o tempo de vida espontâneo [117].

6.3. Propriedades do laser

Devido às suas características óticas, muitas das aplicações do laser, seja na medicina ou na indústria devem-se à sua monocromaticidade, colimação e coerência [117]. Quanto à monocromaticidade, o com largura de banda muito menor que de outras fontes de luz. Desse modo, o feixe de luz do laser tem praticamente a mesma cor, ou seja, pode ser considerado um feixe monocromático.

Ao mesmo tempo, o laser tem um elevado grau de direcionalidade. Todas as ondas produzidas por um laser é capaz de percorrer grandes distâncias sem que seu diâmetro seja significativamente alterado. A divergência encontrada na luz dos lasers é muito pequena, isso é resultado da exigência de que a luz deve fazer muitas viagens de ida e volta do ressonador do laser (cavidade ótica formada por dois espelhos contrapostos), antes de surgir através do espelho parcialmente transmissor. Apenas os raios alinhados com a linha central do ressonador pode fazer o número desejado de ciclos, e esses raios alinhados divergem apenas ligeiramente quando emergem (Figura 6.2).



Figura 6.2 – A luz do laser faz muitas viagens de ida e volta entre os espelhos, devido a isso emerge com uma divergência muito pequena [117].

As características feixe de luz monocromático e direcionalidade juntamente com a coexistência de fase das ondas (todas as ondas dos fótons que compõe o feixe estão em fase), são combinadas em um único termo descritivo: coerência. Coerência é o que difere a luz do laser da luz de qualquer outra fonte.

Quanto à sua energia, a radiação do laser é classificada como não ionizante. A radiação ionizante é definida como a radiação composta de partículas ou fótons de diferentes energias que podem liberar um elétron de um átomo ou molécula. Ao interagir com compostos orgânicos e outras pequenas moléculas do corpo, a radiação ionizante (raios γ , partículas α e β , ultravioleta (UV), raios-X, irradiação de nêutrons rápidos, e contaminação com partículas radioativas, como por exemplo, urânio), dependendo da sua energia produz radicais livres que podem danificar as moléculas dos tecidos. A maior parte da luz UV é

classificada como energia não ionizante, mas as energias mais altas do espectro UV (150nm) poderiam ser classificadas como ionizantes [119].

A radiação não-ionizante é aquela na qual a energia não é o suficiente para arrancar um elétron de um átomo ou molécula, podendo ocorrer a excitação do átomo, onde o elétron é levado para um estado de maior energia, mas não é ejetado do átomo [117].

Quanto à potência, o laser pode ser classificado em laser de alta ou baixa potência. Em cirurgias o laser de alta potência (> 400W) é usado apenas quando efeitos térmicos são exigidos para causar a destruição celular através da fotocoagulação, queima, liquefação, e vaporização de tecidos biológicos [120]. Os lasers de baixa potência (< 500 mW [121]) são utilizados quando são exigidos para o tratamento clínico efeitos: fotofísicos (pode provocar alterações na membrana tanto na transmissão de impulsos nervosos, quanto na variação do potencial da membrana mitocondrial [122]); fotoquímico (pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio [122]); e fotobiológicos (pode estimular síntese colágeno e proliferação celular [123]). Nesses três tipos de aplicação os efeitos térmicos são insignificantes.

6.4. Áreas da medicina nas quais o laser pode ser empregado

Os lasers aparecem em todos os tamanhos (Figura 6.3), desde os minúsculos lasers de diodo até lasers militares e de pesquisa imensos que podem preencher até 3 andares de um edifício [117]. Assim, dependendo de sua constituição quanto à composição do semicondutor utilizado em sua fabricação, lasers diferentes podem produzir radiação eletromagnética de diferentes comprimentos de onda, logo; diferentes cores de luz. Alguns se situam na região visível do espectro eletromagnético, outros estão na região UV e até raio X. Alguns exemplos de lasers estão listados na Tabela 6.1.



(a)



(b)

Figura 6.3 – Exemplo de tipos de laser: (a) laser para cirurgia dentária [124]; (b) laser cirúrgico de CO₂ [125].

Tabela 6.1 – Alguns lasers comerciais [117].

Laser	Comprimento de onda	Faixa de potencia média
Dióxido de carbono	10,6 μm	Miliwatts a dezenas de kilowatts
*Nd:YAG	1,06 μm	Miliwatts a centenas de watts
Nd:vidro	1,06 μm	Apenas pulsada
Cr:rubi	694,3 nm (visível)	Apenas pulsada
Hélio-neônio	632,8 nm (visível)	Microwatts a dezenas de miliwatts
Argônio	514,5 nm (visível)	Miliwatts a dezenas de wats
	488,0 nm (visível)	Miliwatts a watts
Fluoreto de criptônio	248,0 nm	Miliwatts a centenas de wats

* Granada de ítrio e alumínio dopado com neodímio.

Na medicina, o uso do laser tem proporcionado o desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas a exemplo do laser de dióxido de carbono utilizado como um bisturi que proporcionam cauterização ao mesmo tempo em que a cirurgia é realizada [117]. Algumas cirurgias que causavam intenso sangramento eram impossíveis de realizar antes do advento do laser.

Em cirurgias oftálmicas o laser é especialmente útil, pois o feixe pode passar através da pupila do olho, podendo “soldar”, cortar ou cauterizar o tecido dentro do olho. Antes do laser, qualquer procedimento no interior do olho exigia corte aberto do globo ocular. Um

exemplo é a técnica LASIK (laser-assisted in situ keratomileusis) que corrige a miopia tornando a superfície da córnea mais plana, reduzindo o tecido do estroma e mantendo a córnea periférica inalterada [126].

O laser de rubi Q-switched (QSR) pode ser usado para despigmentação da pele, no tratamento de vitiligo. O feixe QSR é capaz de destruir seletivamente a melanina e estruturas que contém a melanina na pele, com risco mínimo de formação de cicatrizes [127].

Embora a TFD se baseie na utilização do laser, a necessidade de ativar o agente PS com luz de comprimento de onda e intensidade adequados para o tratamento clínico em qualquer região do corpo em curtos períodos de tempo ainda continua sendo uma limitação [128].

A fonte de radiação eletromagnética é uma das bases da TFD e sua aplicação e dosimetria são um dos fatores principais que definem o sucesso ou a toxicidade do tratamento clínico [129]. Uma boa fonte de radiação é aquela que fornece a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do fotossensibilizador, sem efeitos térmicos significativos. Em geral tem-se empregado lasers do estado sólido de Nd: YAG. Como alternativa mais barata os lasers de diodo tem sido utilizados. Já existem lasers de diodo que cobrem praticamente todo o espectro visível e infravermelho próximo, o que atende uma grande parte da TFD quanto à ativação dos fotossensibilizadores [33].

Lasers de argônio e corante têm sido utilizados no tratamento de doenças pela TFD. O sistema de laser argônio/corante geralmente é capaz de fornecer potências da ordem de 1 a 7 W e comprimento de onda de 630 nm [128]. Estes sistemas eram grandes, normalmente montados em um banco ótico e eram imóveis. Apesar de complicados foram pioneiros na administração da luz em TFD para o tratamento de tumores. Fornecem potência e flexibilidade necessária para os primeiros estudos que envolveram fibra ótica em feixe simples, ou divisão do feixe principal em vários feixes, com diferentes saídas para a dosimetria indicada em cada caso [128].

Lasers de corante são lasers sintonizáveis, estes precisam ser excitados por outras fontes como outros lasers (laser de bombeio) ou lâmpadas. Vários tipos de fontes são utilizados como, por exemplo, lasers de diodo, de nitrogênio e de íons, sendo o laser de argônio um exemplo deste último. Um amplificador é usado frequentemente em conjunto com o oscilador sintonizável. É mais eficiente gerar um sinal cuidadosamente sintonizado no

oscilador e depois aumentar esse sinal no amplificador do que produzir uma saída de alta energia num único passo a partir de um oscilador sozinho [117].

Outro laser de grande interesse para aplicações clínicas foi o laser de vapor de ouro e o de cobre. O laser de vapor de ouro gera um comprimento de onda de 627.8 nm com potência suficiente para utilizá-lo em TFD, mas com saída com pulso de frequência de repetição de 5 a 15 kHz [130]. Esse sistema não requer acoplamento de um laser de corante para gerar a potência necessária para sua utilização na TFD. Além disso, possibilita um grau de portabilidade por não precisar de alimentação elétrica especializada, nem água para resfriamento. No entanto é um sistema caro, pois necessita de ouro para manter a potência. O laser de vapor de cobre é menos dispendioso, contudo possui apenas 2 comprimentos de onda de saída (511 e 578 nm) acarretando na necessidade de acoplar um módulo de laser de corante para gerar emissão na parte vermelha do espectro. A grande desvantagem dos lasers de vapor metálico é exigir um período longo de aquecimento e resfriamento, o que dificulta seu uso na prática clínica [128].

O laser de vapor de ouro e o laser de vapor de cobre são lasers a gás. O meio ativo de um laser de gás é um gás em um tubo selado para isolá-lo do ambiente. Quando o laser é desligado o ouro ou o cobre condensam dentro do tubo, e quando aplicado a descarga elétrica que excita o laser o metal é aquecido e vaporizado [117].

O próximo grande avanço na tecnologia laser para TFD veio com a criação do sistema de combinação de laser KTP: YAG/corante [128], em que KTP é a sigla usada para Potassium Titanyl Phosphate (KTiOPO_4). Este laser opera em 1064 nm com frequência dupla, permitindo a utilização com uma série rápida de baixos pulsos de energia que se comportam como lasers de onda contínua (25 Hz), cujo feixe tem 532 nm. Esse comprimento de onda foi distribuído através de fibras óticas conectadas a um laser de corante, que foi capaz de bombear o laser com comprimento de onda de 630 nm, produzindo luz pulsada. Algumas das principais vantagens desses sistemas são a portabilidade (embora limitado devido ao tamanho, peso e necessidade de água para resfriamento), capacidade de ser ajustado (também limitado, pois não era apenas um ajuste que pode ser feito pelo usuário) e facilidade de uso, sendo essa uma característica marcante, pois possibilitou o primeiro sistema laser para TFD que permitiu, além das melhorias já citadas, o movimento independente do laser de corante e o sistema KTP [128].

No início desse século a empresa Diomed Inc. (Andover, MA) obteve aprovação da FDA de seus lasers de diodo (630 nm) para utilização na ativação do fotossensibilizador Photofrin no tratamento de neoplasias malignas do esôfago e pulmão. Esse sistema de laser possuía características da nova geração de sistemas que entraram no campo da medicina e foi um notável avanço em tecnologia para TFD. O sistema é compacto suas vantagens era a utilização de energia 120 V e um sistema de refrigeração a ar. O projeto se assemelhava a uma impressora de computador (2 W), conseguindo assim um peso leve e facilmente transportável. Esse sistema é fácil de usar, possui um programa de software simples, que permite ao clínico a escolha do intervalo dosimétrico mais adequado para o paciente. A Biolitec (Longmeadow, MA) também produziu um sistema de lasers de diodo de 652 nm para ativação do fotossensibilizador Foscan, que também é um sistema compacto e fácil de usar. Lasers de diodo são geralmente menos dispendiosos para adquirir e manter, além de proporcionar excelente potência de saída durante longos períodos de tempo [128].

O laser de diodo cujo meio ativo é um semicondutor, está ilustrado na Figura 6.4. Nessa figura é mostrado todo o “pacote”, mas o próprio laser é apenas o pequeno bloco cristalino com um fio ligado à sua parte superior. O laser é formado pela junção de dois tipos diferentes de semicondutores, e a luz sai da extremidade do bloco, diretamente a partir da junção [117].

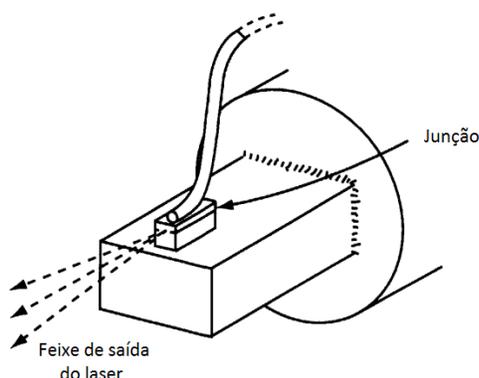


Figura 6.4 – Esquema simplificado de um laser de diodo [117].

Existem dois tipos fundamentais de semicondutores: tipo p e tipo n. Em um semicondutor do tipo n existe elétrons extra que são os portadores de carga, e em semicondutores p existem buracos adicionais que são os portadores de carga. Em um laser de diodo, a ação do laser acontece na junção de uma material dopado tipo n com um material dopado tipo p. Os fótons de uma laser semicondutor são criados quando um elétron perde

energia quando combinado com um buraco. Quando uma junção é formada acontece uma “avalanche” inicial de fótons como cargas móveis que se movem através da junção se combinam com cargas opostas. Entretanto é um processo rápido e para prorrogá-lo é necessário injetar cargas móveis adicionais, ou seja, uma corrente elétrica através da junção. Ao se fazer isso, cria-se uma condição de estado estacionário em que os fótons estão continuamente sendo emitidos a partir da junção [117]. Para um maior detalhamento do funcionamento do laser de diodo e de outros lasers citados neste texto veja referência [117].

A eficácia da clínica da terapia fotodinâmica depende do fornecimento de adequado de luz e o fotossensibilizador no tecido alvo. Métodos de entrega ideal e controle de distribuição de luz no tecido são complexos e não compreendidos em sua totalidade. As complexidades técnicas para determinação adequada de dosimetria e entrega de luz no tecido biológico, são áreas altamente especializadas e devem ser considerados no contexto de cada aplicação. Entretanto, o sucesso da TFD na prática clínica continua dependente do desenvolvimento de novas tecnologias do laser, para que haja mais dispositivos cada vez mais simples, baratos e eficientes.

Capítulo 7. Materiais e Métodos

7.1. Síntese do PGLD

No presente trabalho a rota de obtenção do dendrímero PGLD foi efetuada a partir da síntese de Williamson modificada pela utilização de um catalisador de transferência de fase [16]. Nesse caso, para a síntese de famílias de PGLD de geração zero a quatro ($G = 0-4$), um processo iterativo de seis etapas onde a alilação de um núcleo de poliglicerol seguido da dihidroxilação catalítica com óxido de N-metilmorfolina da ligação alílica foi adotado. Sob condições de transferência de fase a reação de alilação permitiu a formação quantitativa do dendrímero com bons rendimentos, próximo a 80%, reduzindo assim, o número de defeitos na cadeia macromolecular (Figura 7.1). O PGLD, produto final, foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel. A Figura 7.1 ilustra o processo de obtenção do PGLD de gerações 0-2. Os reagentes utilizados foram de procedência Merck, Vetec e Sigma-Aldrich P.A. e foram utilizados sem tratamento prévio.

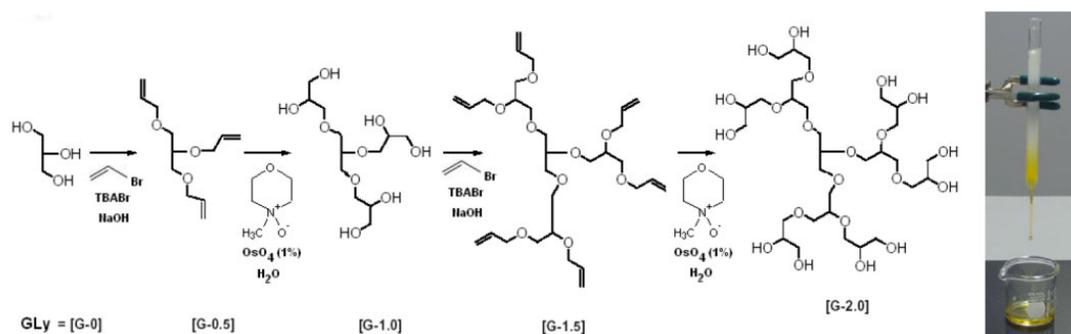


Figura 7.1- Ilustração do processo de síntese do PGLD utilizando a rota sintética de Williamson modificada. Gly = glicerol, TBABr = Brometo de tetrabutil amônio. À direita é ilustrada a purificação cromatográfica do produto obtido.

A pureza dos PGLD's ($G=0, 2$ e 4) foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O rendimento do processo de síntese foi de 88%, tendo os PGLD's obtidos as seguintes características espectroscópicas (Bruker 400 MHz, CSIC/Madri-Espanha): $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, D_2O , deslocamentos (δ , ppm): 4,8 (OH); 4,04 ($\text{OCH}_2\text{-CH-CH}_2$); 3,95-3,40 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$). $^{13}\text{C-NMR}$, 75 MHz, D_2O , deslocamentos (δ , ppm): 62,9 ($\text{CH}_2\text{-OH}$, unidade terminal); 82,0-81,5; 80,6-79,8; 74,7-73,9; 73,8-72,2; 71,8-70,7; 64,7; 63,1 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$, poliéter). Rendimento: 81,5%.

7.2. Síntese e caracterização físico-química do conjugado PGLD-Chl-a

A imobilização da clorofila a no PGLD (G=3) foi efetuada através do método de Steglich em reação de esterificação catalisada por N,N-Diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) [131]. A 10 mL de uma solução de PGLD em dimetilformamida (DMF) 0,01mM foi adicionado Chl-a ((extraída de espinafre, Sigma-Aldrich, 0,64 mM)) previamente defitilada e N,N-Diciclo-hexilcarbodiimida (DCC, 0,64 mM) e 4-Dimethylaminopyridine (DMAP). O sistema foi mantido sob agitação magnética por 5 dias a -4 °C. A solução coloidal resultante foi dialisada por 3 dias contra água destilada para a remoção do DMF e materiais não reagidos em membranas de 12-14 kDa de limites de exclusão por 24 horas a -4°C. Após a diálise, as amostras foram liofilizadas e armazenadas em geladeira (-4°C). A Figura 7.2 ilustra as etapas utilizadas na obtenção do conjugado PGLD-Chl-a. Rendimento: 65%.

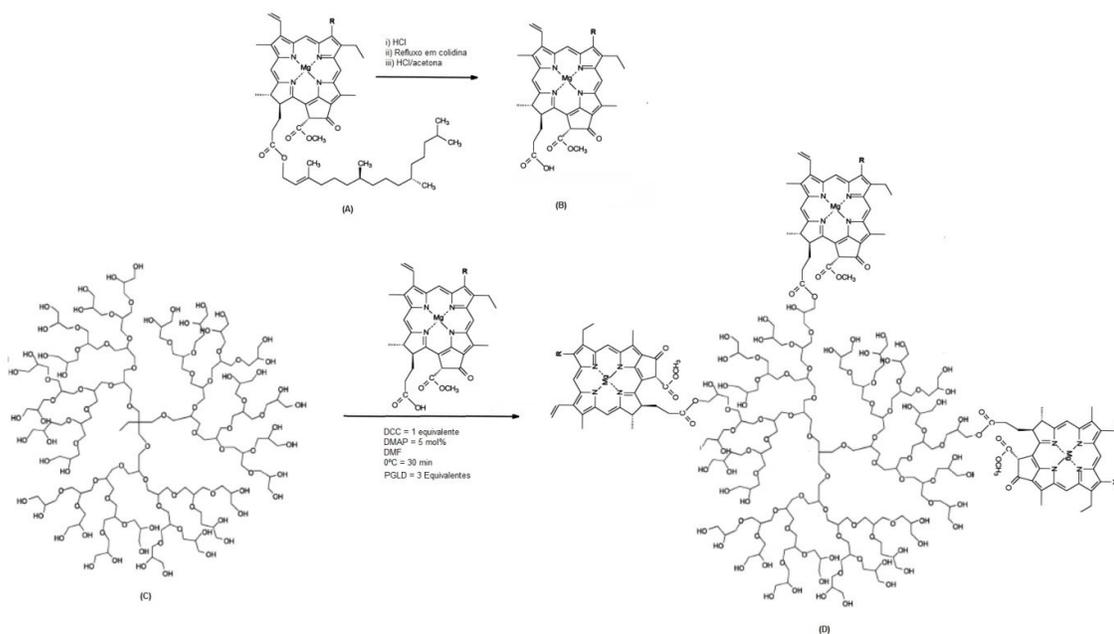


Figura 7.2 - Ilustração do processo de síntese do conjugado PGLD-Chl-a através do método de Steglich em reação de esterificação catalisada por N,N-Diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e 4-Dimethylaminopyridine (DMAP).

O conjugado PGLD-Chl-a foi analisado por cromatografia de camada fina (CCF), análise térmica (TGA, DSC), espectroscopia no infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR) e espectroscopia eletrônica (UV-Vis).

Na cromatografia em camada fina (CCF) usou-se como fase estacionária cromatoplasca de sílica gel GF254 (MERCK); tamanho aproximado 5x25 cm e espessura 0,25 mm. O solvente utilizado para o conjugado PGLD/Chl-a foi o dimetilsulfóxido (DMSO). A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetato de etila:metanol na proporção 2:8 (v/v). Os cromatogramas foram revelados por ação vapores de iodo.

A quantidade de Chl-a incorporada no PGLD foi determinada por espectroscopia UV-Vis foi efetuada em um espectrofotômetro UV-Vis (Varian, Cary 50) de acordo com metodologia estabelecido pela literatura [132,133]. Assim, para a determinação da quantidade de Chl-a incorporada ao PGLD foram feitas leituras a 663,6 nm, 646,3 nm e 750 nm contra um branco contendo somente PGLD. As quantidades de clorofila a foram calculadas a partir das leituras das absorvências através da Equação 7.1 [132,133].

$$m_{\text{Chl-a/gPGLD}} = 13,71 \cdot A_{663,6-750} - 2,85 A_{646,6-750} \quad 7.1$$

Os espectros na região do infravermelho do conjugado PGLD/Chl-a foram obtidos na região de 4000 a 400 cm^{-1} , no Centro de Estudos e Inovação em Biomateriais Biofuncionais Avançados da UNIFEI.

A estabilidade térmica do conjugado PGLD/Chl-a foi avaliada através da análise termogravimétrica um equipamento Mettler TA 4000 equipado com uma microbalança M3 com capacidade máxima para 150 mg e sensibilidade de 1 mg e; forno TG50 capaz de operar até 1.000 °C, controlado por um microprocessador TC-11. Utilizou-se a razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, atmosfera dinâmica de nitrogênio de 150 mL.min⁻¹ e cadinho de α -alumina. A temperatura inicial do aquecimento foi de 25 °C e a temperatura final foi se 500 °C. As massas utilizadas no experimento situou-se entre 20-30 mg.

A temperatura de transição vítrea (T_g) do conjugado PGLD/Chl-a foi avaliada através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) utilizando um termoanalisador Shimadzu DSC-60. Na análise por DSC utilizou-se atmosfera de nitrogênio, sob fluxo de 300 mL/min. Utilizaram-se amostras de cerca de 2,8-3,0 mg sendo a temperatura inicial igual a -130 °C e a temperatura final igual a 30 °C. Todas as amostras foram inicialmente aquecidas e depois

resfriadas na mesma velocidade (10 °C/min) para eliminar a história térmica do material. Nesse caso, para interpretação da Tg considerou-se a 2ª corrida térmica.

7.2.1. Simulação computacional das propriedades eletrônicas do conjugado PGLD-Chl-a

Uma das etapas no desenvolvimento de um novo fármaco é o aperfeiçoamento do novo composto. Nessa etapa são utilizadas técnicas de química computacional aplicadas ao desenho dos fármacos, em especial o modelo QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) é de grande utilidade [134]. Os recursos tecnológicos de hardware e software evolui constantemente, o que tem contribuído com o desenvolvimento de diversas técnicas para cálculo de propriedades moleculares. Computacionalmente pode-se examinar diversos compostos em 2D e 3D, e também quantificar a correlação entre estrutura e atividade das moléculas, possibilitando prever tecnicamente a atividade biológica dos compostos sintetizados. Na descoberta de medicamentos, uso eficaz de química computacional encurta o ciclo de desenvolvimento de novos fármacos e fornece as empresas farmacêuticas uma vantagem competitiva com tempos de descobertas mais rápidos e custos reduzidos [135].

A otimização da geometria molecular foi realizada através do método semi-empírico PM3 com critério de convergência 1.0 kcal/mol/Ångstrom. O cálculo das estruturas eletrônicas foi feito segundo o método *ab initio* DFT/6-31-G, sendo 6-31-G as funções de base utilizadas. Para tanto, foi utilizado o funcional B3LYP. O coeficiente de partição octanol-água foi calculado através dos valores de log P empregando o método de contribuição atômica.

7.3. Estudo de bioatividade e citotoxicidade

O estudo de bioatividade e citotoxicidade do PGLD-Chl-a contra carcinomas de cabeça e pescoço (OSCC-09) foi realizado no laboratório do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob a supervisão do Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior com o apoio da aluna de doutorado Renata Moura. Os seguintes materiais e equipamentos foram gentilmente cedidos pelo departamento de Estomatologia:

Cultura de células

1. Fluxo laminar
2. Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral OSCC-09 (Oral Squamous Cell Carcinoma)
3. Meio de cultura do tipo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
4. Soro fetal bovino
5. Solução PBS (Phosphate Buffer Solution – Solução de Tampão Fosfato, pH 7,4 – Sigma)
6. Tripsina-EDTA (0,125% de tripsina e 0,02% de EDTA – Gibco, USA)
7. Centrifuga Excelsa II, Mod. 206 BL

Contagem de células e terapia fotodinâmica

1. Câmara de Neubauer (Newbauer Improved Brigh-Line, Optik Labor)
2. Azul Trypan (Sigma)
3. Placa de cultura de 96 poços, na cor preta com fundo chato e transparente
4. Laser (MMOptics®, São Carlos), de comprimento de onda 670 nm e energia 4,5 J/cm², potência 25 mW

Teste de viabilidade celular

1. MTS (sal de tetrazólio - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H- tetrazolium))
2. Leitor de ELISA Biotek ELX 800

7.3.1. Preparo da linhagem celular para cultura

Inicialmente, a câmara de fluxo laminar foi esterilizada por luz ultravioleta durante 40 minutos e todo o procedimento foi realizado dentro do fluxo laminar. O criotubo foi retirado do nitrogênio líquido e descongelado em banho-maria a 37 °C. Após transferência do conteúdo do criotubo para um tubo de centrifugação acrescentou-se 2 mL de meio de cultura e, então, foi levado para centrifugar por 5 minutos a 1300 rpm, para formar um precipitado de células. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido até que não houvesse mais grumos. Subsequentemente o mesmo foi transferido para garrafa de cultura onde o meio de cultivo celular foi acrescentado. O meio de cultura celular foi preparado com meio de cultura

do tipo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) somado a 10% de soro fetal bovino. A placa foi colocada em estufa de CO₂ (5%) a 37°C, com ¼ de volta do frasco aberto.

Após 24h o meio foi retirado e as células lavadas com solução tampão salina-fosfato (PBS) cujo pH é 7,4. Em seguida, a solução de lavagem foi descartada e mais uma vez foi colocado o meio de cultura. Novamente após 24h, o meio de cultura foi retirado, a placa lavada com PBS, e então foi colocado tripsina para provocar o destacamento das células do fundo da garrafa de cultura. Tal destacamento foi acompanhado pelo microscópio a cada 5 minutos (Figura 7.3), a maior parte desse tempo a garrafa ficou na estufa a 37 °C, e então foi acrescentado o meio de cultivo, colocou-se as células e o meio no tubo para serem centrifugados por 5 minutos a 1300 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado com 1 mL de solução PBS, para dissolução total dos grumos.

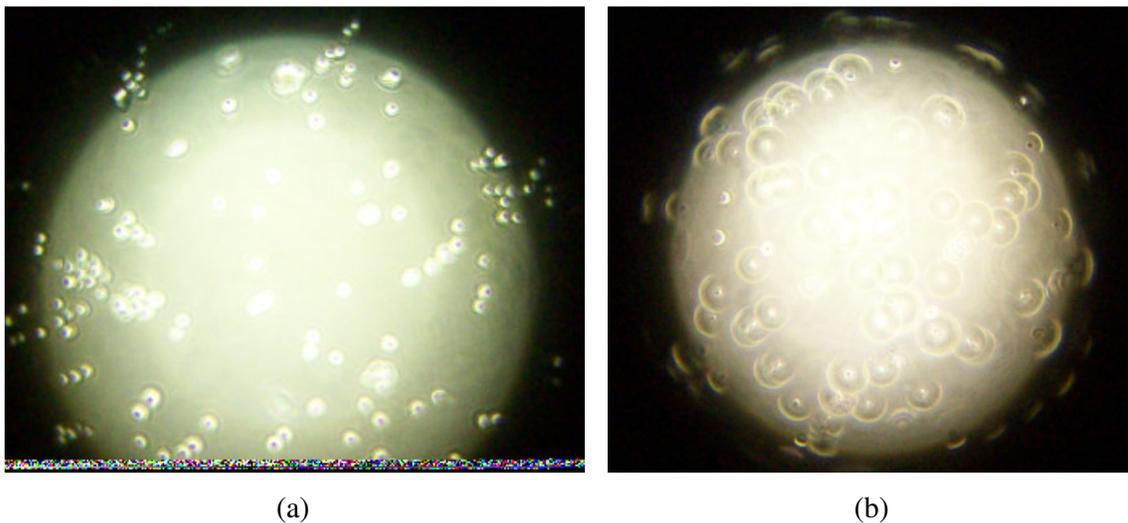


Figura 7.3 – Destacamento de células do fundo da garrafa de cultura: (a) células ainda fixas no fundo da garrafa, (b) células destacadas do fundo da garrafa de cultura.

7.3.2. Avaliação da citotoxicidade

Foi retirado 10 µL da suspensão, acrescentado 80 µL de meio de cultura (DMEM adicionado de 10% de soro fetal bovino), e 10 µL de azul de Trypan. Depois de homogeneizado, foi aplicado a uma câmara de Neubauer para realização da contagem de células. A suspensão celular encontrada nesse processo foi de $6,25 \times 10^5$ células por mL, sendo adequado para este ensaio. A suspensão foi repicada para uma placa de cultura de 96 poços, na cor preta com fundo chato e transparente. Foram utilizados 12 poços, para 4 grupos experimentais e suas respectivas triplicatas. Esperou-se 24h para adesão das células ao fundo

da placa e em seguida iniciou-se a irradiação com laser. O equipamento laser utilizado foi o modelo Photon Laser III (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos/SP). O laser utilizado possui como meio ativo o Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), comprimento de onda de 660 nm e potência de (25 mW). A potência foi aferida antes de cada procedimento experimental. O experimento foi dividido em grupos, descritos a seguir:

Grupo I = Controle (apenas as células).

Grupo II = Células com adição de PGLD G4

Grupo II = Células adicionadas ao conjugado PGLD-Chl-a no escuro.

Grupo III = Células adicionadas PGLD-Chl-a tratadas com laser (terapia fotodinâmica).

Grupo IV = Células tratadas somente com laser.

A Figura 7.4 mostra a aplicação do laser na placa nos devidos grupos. Para que o ensaio de citotoxicidade pelo método de MTS fosse iniciado, o MTS foi adicionado aos poços, e a placa levada em estufa a 37 °C. Após 3h a placa foi levada para o espectrofotômetro leitor de ELISA Biotek ELX 800, onde a leitura da absorbância foi efetuada. Foram utilizados mais 3 poços apenas com MTS para a leitura do branco.

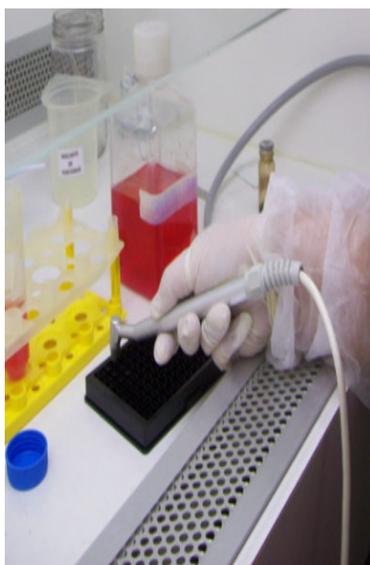


Figura 7.4 – Aplicação do laser nos grupos selecionados.

7.3.3. Ensaio-TUNEL

O protocolo de exposição das células OSCC-09 ao PGLD-Chl-a na TFD utilizado o teste de TUNEL (*Terminal dUTP Nick-End Labeling*) foi semelhante ao anteriormente descrito para os ensaios de citotoxicidade. As células foram inicialmente cultivadas em meio DMEM “Dulbecco's modified Eagle's medium” associado ao meio F12 (na proporção 1:1) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Depois de subcultivadas, ao ocuparem 70% do frasco de cultura (subconfluência) aproximadamente 20×10^4 células foram plaqueadas em lamínulas de 18 mm de diâmetro acomodadas em placa de 12 poços. Após 24 horas do plaqueamento, foi realizado o tratamento simultâneo em 4 grupos:

- I) Controle, sem qualquer aplicação de PGLD-Chl-a
- II) Tratamento com PGLD-Chl-a no escuro
- III) Tratamento com PGLD-Chl-a com irradiação laser por 3 min
- IV) Tratamento com PGLD-Chl-a com irradiação laser por 10 min.

Após a TFD as lamínulas foram lavadas com PBS e procedeu-se a fixação com formoldeido a 4% (v/v) por 25 minutos a 4°C. Depois da lavagem com PBS as lamínulas foram incubadas com 0,2% de Triton X por 5 minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se em seguida à utilização do DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System apoptosis test (Promega, Madison, WI). O próximo passo depois de nova lavagem foi a incubação com 25 µL do Equilibration Buffer (componente do kit). As lamínulas foram então incubadas com a enzima recombinante terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT) utilizando-se o rTdT incubation Buffer que compõe o kit. As lamínulas foram mantidas a 37°C em câmara úmida na ausência de luz por 1 hora. Após esse período as lamínulas ficaram por 15 minutos em contato com a substancia SCC presente no kit diluída em água MiliQ (1:10). Após a lavagem com PBS as lamínulas então foram montadas com Vectashield. As laminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Capítulo 8. Resultados e Discussão

8.1. Caracterização do conjugado PGLD-Chla

8.1.1. Imobilização do Chl-a no PGLD

A incorporação da Chl-a no PGLD em função do número de gerações está apresentado na Figura 8.1.

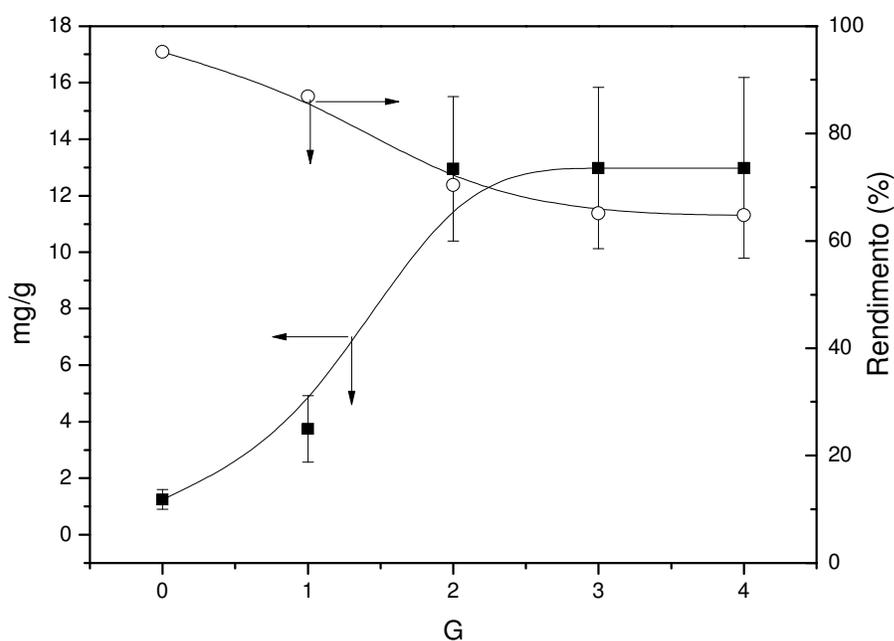


Figura 8.1 – Incorporação da Chl-a no PGLD em função do número de gerações do dendrímero (G).

Os resultados obtidos (Fig. 8.1) demonstram que a quantidade de Chl-a incorporada ao PGLD aumenta significativamente com a geração do dendrímero, saturando, entretanto para $G = 2$. Por outro lado, o rendimento da reação de acoplamento químico da Chl-a ao PGLD diminui à medida que G aumenta. A saturação observada no processo de incorporação da Chl-a e a diminuição de G se deve provavelmente ao efeito de impedimento estérico devido à elevada densidade de grupos funcionais (hidroxilas) na periferia do PGLD que aumenta proporcionalmente a G .

8.1.2. Cromatografia de camada delgada

A cromatografia de camada delgada (CCD) é um método de separação físico-químico, baseado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que acontece devido as diferentes interações dos componentes entre duas fases imiscíveis; uma fase móvel e outra estacionária. Este método foi aplicado com o objetivo de confirmar o acoplamento químico entre o PGLD G4 e a clorofila a.

As cromatoplasas foram desenvolvidas em cubas de vidro que continham como eluente o acetato de etila e metanol, na proporção 2:8 (v/v), num percurso de aproximadamente 5 cm, em um desenvolvimento unidimensional, ascendente simples. O tempo de eluição ocorreu em torno de 5 minutos. A Figura 8.2-a mostra as cromatoplasas já reveladas com iodo. Através delas foi possível calcular o fator de retenção (R_f) das amostras de PGLD, Chl-a e PGLD-Chl-a. O R_f das amostras está representado na Figura 8.2-b.

As amostras de PGLD e clorofila, puros, foram usadas como referência. O valor do R_f aumenta ligeiramente do PGLD G0 (0,70) para os PGLD's G2 e G4 (0,72). O R_f da clorofila é um pouco mais baixo que o dos PGLD's (0,64). Já para o PGLD-Chl-a o R_f é consideravelmente menor (0,50). Como pode ser observado na Figura 8.2-a, onde está o PGLD-Chl-a, não são observadas manchas que indiquem separação das moléculas. Caso elas estivessem apenas "misturadas" haveria uma mancha referente ao PGLD e outra da clorofila, dado que os materiais possuem R_f diferentes. Nesse caso ocorreu apenas uma mancha, e obteve-se um R_f bastante diferente do R_f das moléculas de referência, indicando que as moléculas estão de fato ligadas quimicamente.

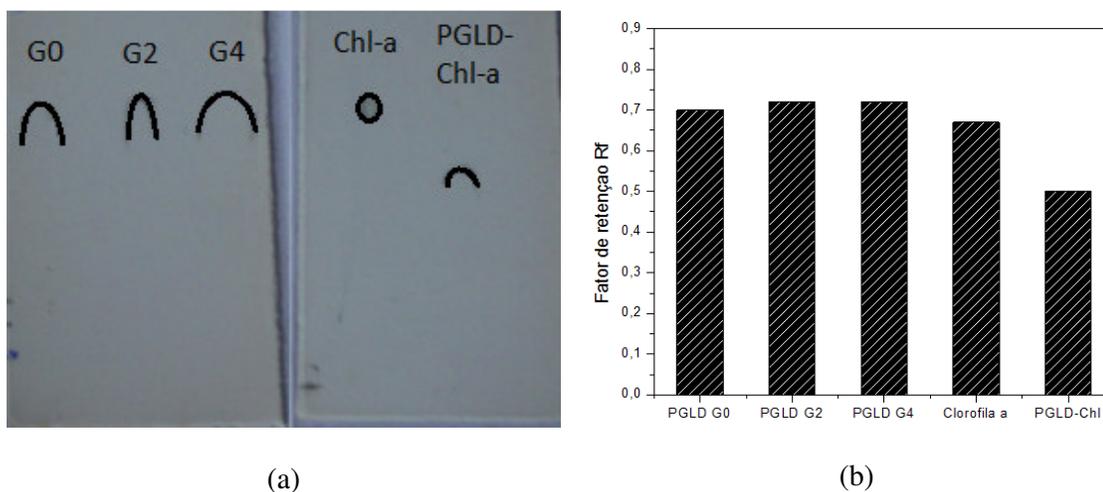


Figura 8.2 – (a) CCD dos PGLD's G0, G2 e G4, PGLD-Chl-a e Clorofila a; (b) valores de R_f das amostras.

8.1.3. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras de PGLD G0-G4, clorofila *a* e PGLD-Chl-*a* na faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} , com as amostras puras são apresentados nas Figuras 8.3 a 8.5. Os resultados obtidos exibem bandas características para as vibrações de estiramento O-H (3305 cm^{-1}), vibração assimétrica de CH_3CH_2 ($2930\text{-}2879 \text{ cm}^{-1}$), deformação angular de CH_2 (1415 cm^{-1}), estiramento e deformação axial de C-O (1329 cm^{-1} e 1210 cm^{-1}), estiramento C-C (1108 cm^{-1}) e estiramento C-O de ligação éter (1032 cm^{-1}) [136].

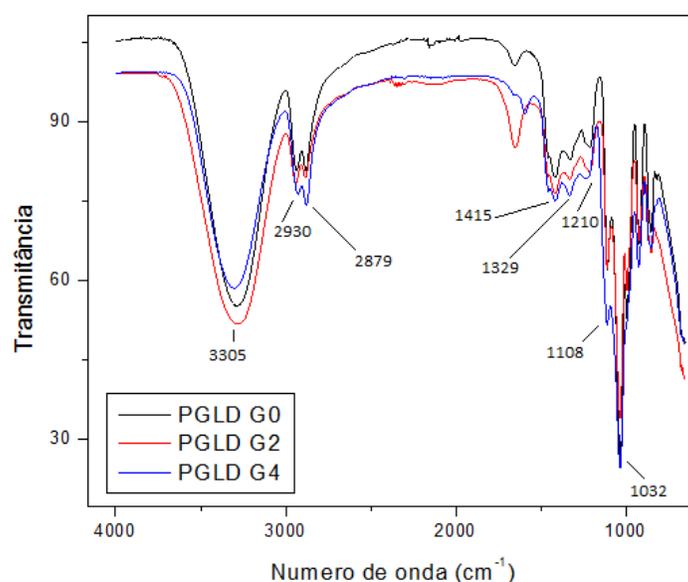


Figura 8.3 – Espectroscopia FTIR do PGLD G0 (preto), PGLD G2 (vermelho), PGLD G4 (azul). Os valores destacados no gráfico são referentes ao PGLD G4.

O espectro da Figura 8.3 mostra que as bandas de absorção são as mesmas para as diferentes gerações do PGLD, fato que já era esperado, pois com o aumento das gerações apenas aumenta o número de ramificações, mas nenhum grupo funcional diferente do que já estão presentes nas gerações G0 a G4.

A Figura 8.4 mostra o espectro de absorção FTIR da clorofila *a*, através do qual foi feita a atribuição às principais bandas observadas no espectro infravermelho (Tabela 8.1). A interpretação dos espectros de infravermelho da clorofila *a* baseou-se principalmente no trabalho de Goodwin [137]. A região de maior importância é a região da carbonila onde a maioria das bandas de absorção dos ligantes são independentes do íon metálico (magnésio) no anel pirrólico [138].

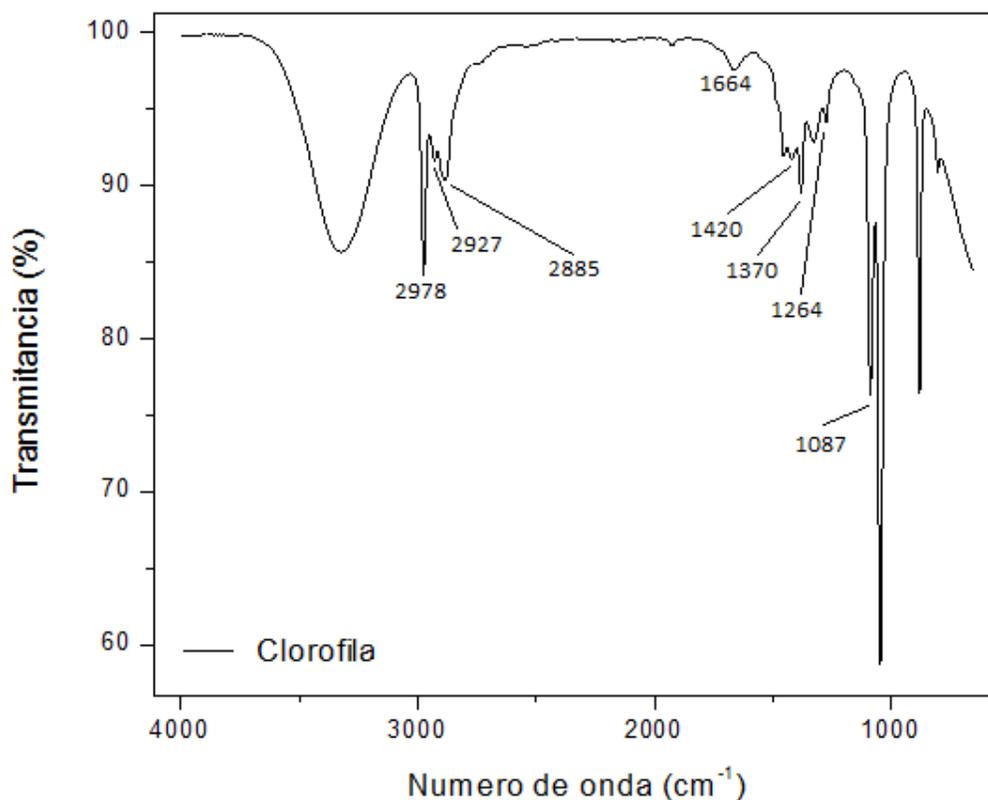
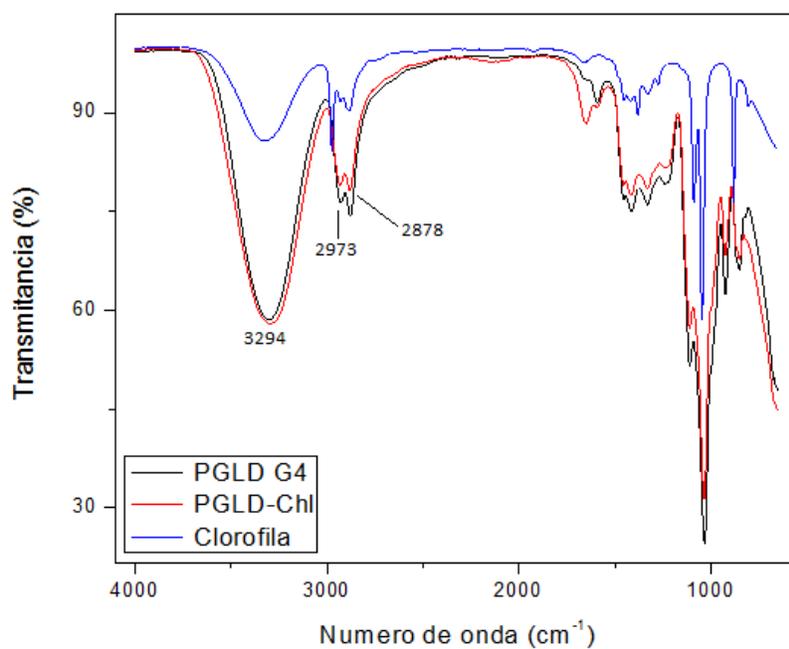


Figura 8.4 – Espectro de absorção FTIR da Clorofila *a*

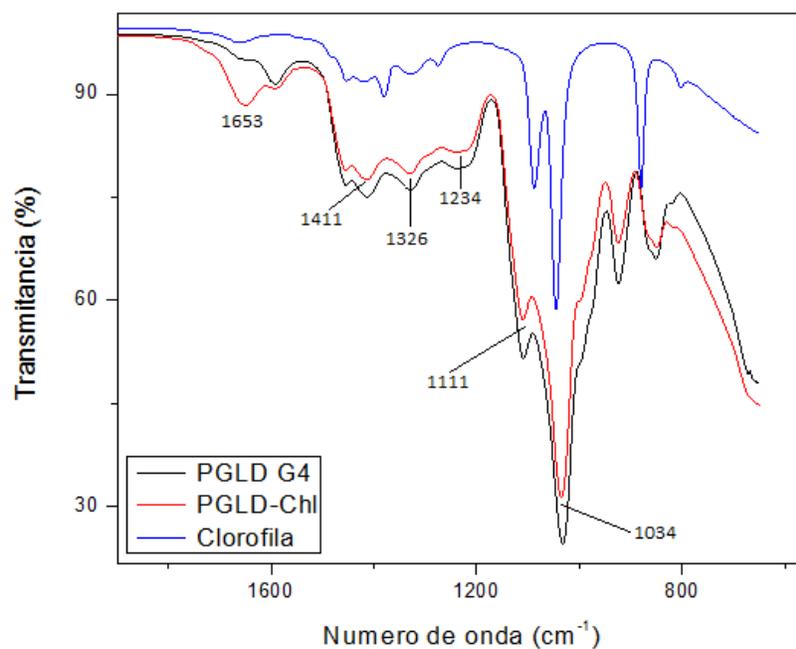
Tabela 8.1 – Atribuição de bandas de absorção FTIR da clorofila *a* [138].

Número de onda	Atribuição
2978	Estiramento C-H
2927	Estiramento C-H
2885	Estiramento C-H
1664	Estiramento C=O
1420	Deformação assimétrica e simétrica CH ₃ -CH ₂
1370	Estiramento C-N (anel pirrólico)
1264	Estiramento C-O
1087	Estiramento C-C (anel pirrólico)
1036	Estiramento C-O de éter

Na Figura 8.5 são mostrados os espectros de absorção do PGLD G4, Chl_a e PGLD-Chl_a. Observa-se modificações significativas nas bandas de absorção quando há o acoplamento da clorofila ao PGLD G4. A Tabela 8.2 mostra a atribuição das principais bandas de absorção do PGLD-Chl_a [138].



(a)



(b)

Figura 8.5 – (a) Espectro de absorção FTIR do PGLD-Chl (vermelho), Clorofila a (azul), PGLD G4 (preto); (b) zoom do espectro na faixa de número de onda de 1860 a 600 cm⁻¹.

O espectro do PGLD-Chl-a indica alterações significativas no espectro vibracional do PGLD após imobilização da clorofila na superfície dendrítica. No PGLD-Chl-a a banda em 1653 cm⁻¹ que é característica da clorofila é acentuada. A banda em aproximadamente 2930

cm^{-1} presente tanto na clorofila quanto no PGLD foi suprimida, e prevalece a banda em 2973 cm^{-1} que está presente apenas na clorofila. Também não aparece no PGLD-Chl-a a banda de absorção da clorofila a 1370 cm^{-1} , enquanto que a banda correspondente ao C-O (éter) aparece deslocada para 1234 cm^{-1} .

Tabela 8.2 – Atribuição de bandas de absorção FTIR do PGLD-Chl

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3294	Estiramento O-H
2973 e 2878	Vibração assimétrica CH_3CH_2
1653	Estiramento C=O
1411	Deformação angular CH_2
1326	Estiramento C-O
1234	Deformação axial C-O
1111	Estiramento C-C
1034	Estiramento C-O de éter

8.1.4. Espectroscopia Eletrônica (UV-Vis)

O resultado da análise de espectroscopia UV-Vis está representado na Figura 8.6 que mostra os espectros para as diferentes gerações do PGLD, a atribuição de bandas de absorção encontra-se na Tabela 8.3.

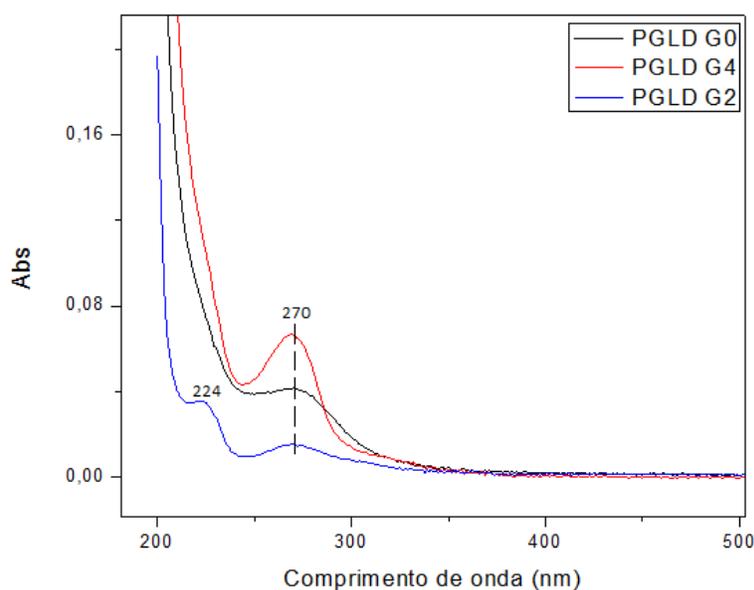


Figura 8.6 - Espectro de absorção UV vis de PGLD: GO (preto), G2 (vermelho) e G4 (azul).

Tabela 8.3 - Atribuição de bandas para o PGLD nas gerações G0, G2 e G4 [139]

	Comprimento de onda (nm)	Atribuição
G0 (2mL-1L)	270	-OH-CH ₂ -CH ₂ -O-C-
	224	-COH
G4 (5mg-mL)	270	-OH-CH ₂ -CH ₂ -O-C-
G2 (2mg-mL)	270	-OH-CH ₂ -CH ₂ -O-C-
	224	-COH

Os espectros eletrônicos revelam que os dendrímeros exibem bandas de absorção na região do espectro UV-Vis. Todas as gerações de PGLD são caracterizadas pela existência de grupos -OH na periferia da macromolécula dendrítica, e ligações éter do tipo CH₂-O-C.

A luz UV provoca excitação do elétron a partir do maior orbital molecular de mais alta energia (HOMO) para o orbital de mais baixa energia (LUMO). A quantidade de energia necessária para excitar o elétron é a diferença de energia entre esses orbitais, quanto menor a energia necessária para excitar o elétron maior será o comprimento de onda apresentado no espectro. Assim pode-se observar na Tabela 7.1 que os grupos -OH - CH₂ - CH₂ - O - C - tem comprimento de onda maior em comparação com o grupo -COH. Esse fato pode ser explicado através das ligações das moléculas, a transição do grupo -COH é $n \rightarrow \sigma^*$ (onde n é o orbital HOMO e σ o orbital LUMO) que possui alta energia de transição e, conseqüentemente, apresenta uma banda de absorção em comprimentos de onda menores.

O espectro de absorção da clorofila a, do PGLD G4, e do PGLD acoplado a clorofila a (PGLD-Chl-a) estão representados na Figura 8.7-a. As clorofilas apresentam um circuito fechado de ligações duplas conjugadas que lhes permitem absorver luz, sendo suas principais bandas de absorção no espectro visível (Figura 8.7-a em vermelho): uma na região do vermelho correspondente ao primeiro estado excitado (666 nm); e outra no azul que corresponde ao segundo estado excitado (436 nm), que são conhecidos como banda de Soret e banda Q respectivamente (Figura 8.7-b). De acordo com Gouterman [12], essas bandas tem origem na transição singlete π - π^* entre os orbitais HOMO e LUMO [86,91]. Esses estados são originários a partir da excitação dos elétrons dos orbitais do nitrogênio não ligado dos anéis pirrol aos orbitais excitados do macrociclo [13,86]. Através da Figura 8.7-a (em azul) é possível observar o acoplamento da clorofila a ao dendrímero devido ao aparecimento das bandas de absorção da clorofila nas bandas de absorção do dendrímero.

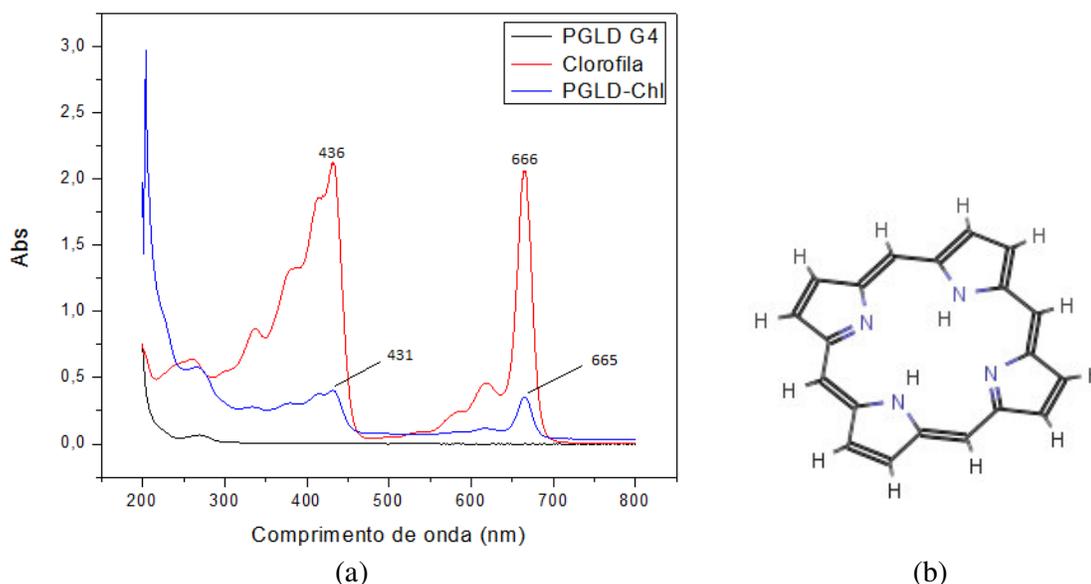


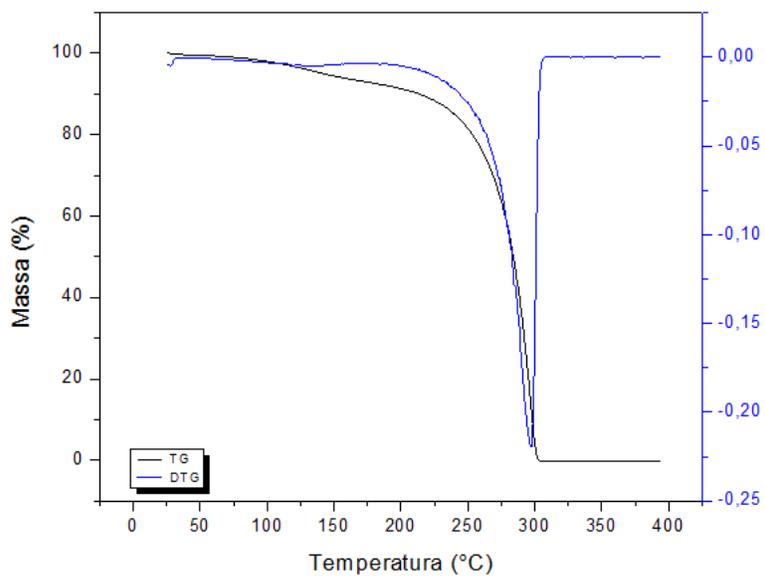
Figura 8.7 - (a.) Espectro de absorção UV vis de PGLD G4 (vermelho), PGLD-Chl (preto) e clorofila *a* (azul); (b.) Estrutura que permite que a clorofila absorva luz nas bandas de Soret e a banda Q.

O espectro UV-Vis indica a adequação do sistema PGLD-Chl-a para utilização em terapia fotodinâmica, pois, uma vez que a Chl-a absorve a 666 nm e o comprimento de onda do laser utilizado é de 670 nm. Logo, o laser fornece energia na região de máxima absorção da clorofila, o que garante a eficiência da aplicação do laser na terapia fotodinâmica. Ao mesmo tempo, deve ser observado que a conjugação com o PGLD não interfere na absorção da clorofila o que sugere a preservação do anel porfirínico no processo de imobilização.

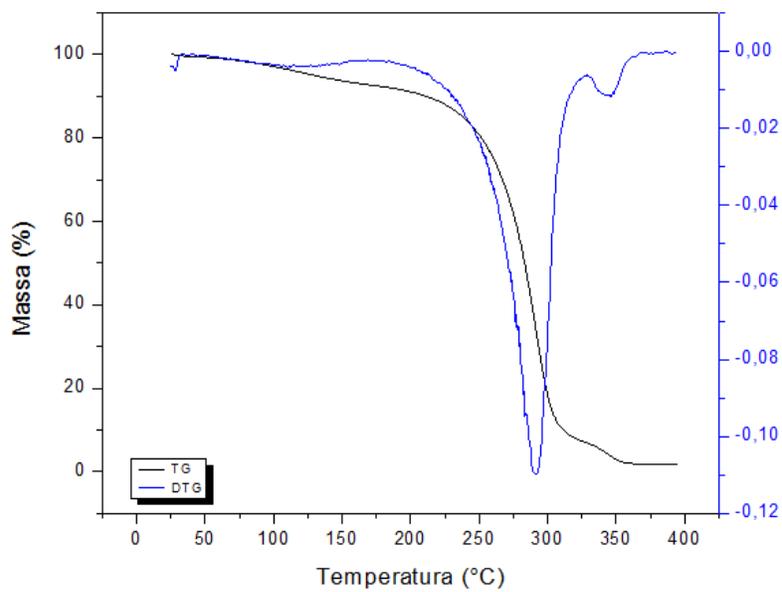
8.1.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas TG/DTG do PGLD (G=0-4) e PGLD-Chl-a em atmosférica dinâmica de N₂ são apresentadas na Figura 8.8. O PGLD apresenta grupos OH na periferia do dendrímero e grupos OH secundários no interior da macromolécula cuja densidade aumenta proporcionalmente ao número de geração podendo resultar em um maior impedimento estérico intramolecular o que poderia conferir uma maior estabilidade térmica à estrutura dendrítica.

O estudo cinético de decomposição térmica do PGLD através da termogravimetria (TG) pode ser uma ferramenta útil para a estimativa do tempo de meia vida do dendrímero nas condições da TFD, assim como avaliar os parâmetros cinéticos envolvidos em uma fotodegradação ou potência dissipada do laser.



(a)



(b)

Figura 8.8 – Curva TG e DTG de composição do (a) PGLD G0; (b) PGLD G2.

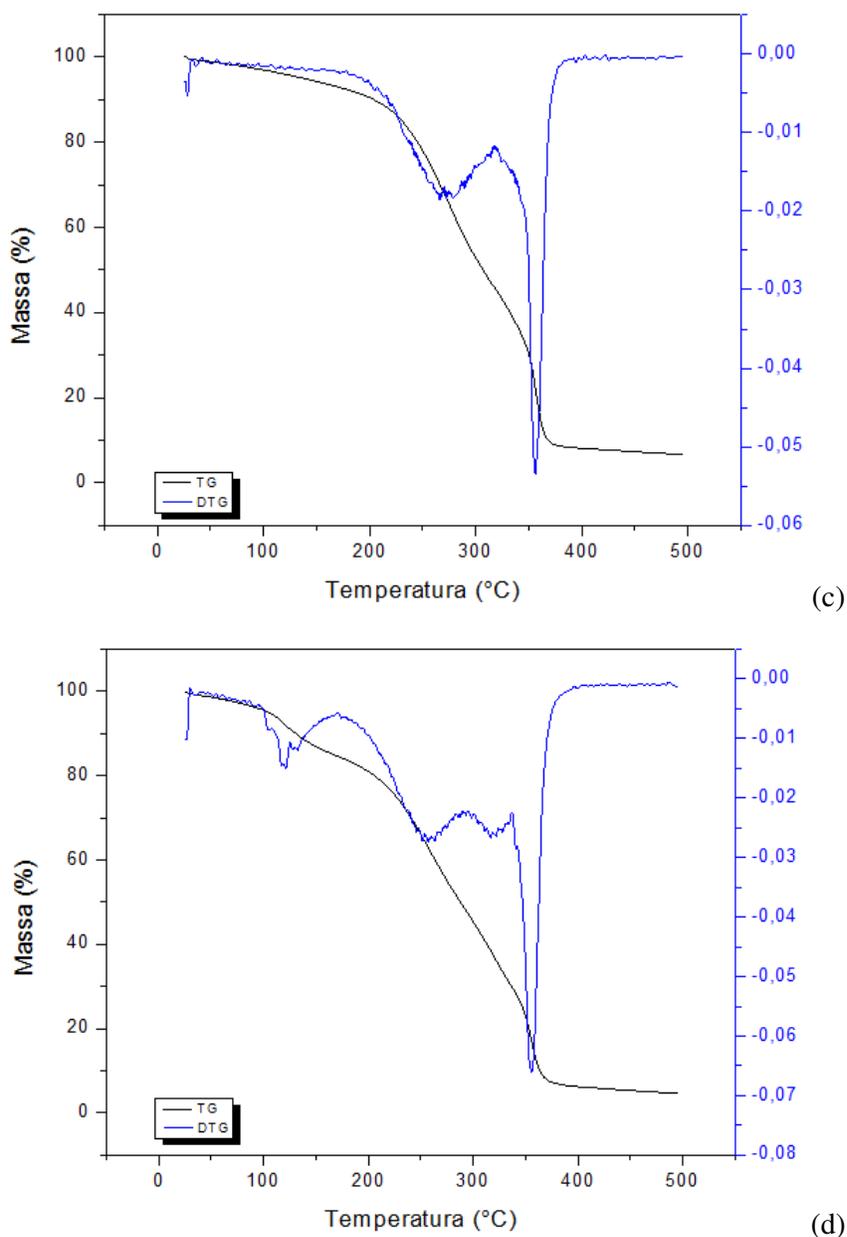


Figura 8.8 – Curva TG e DTG de composição do (c) PGLD G4, e (d) PGLD-Chl-a.

As curvas TG mostram que os PGLD's G0, G2 e G4 apresentam, inicialmente, perda de cerca de 10% de massa no intervalo de 25 a 190 °C, correspondente à água aprisionada na estrutura do dendrímero (cavidade ou por ligação de hidrogênio). A perda de massa para o PGLD-Chl-a é de cerca de 5% e acontece no intervalo de 25 a 90 °C.

Como pode ser observado na Figura 8.8-a, o dendrímero PGLD G0 é termicamente estável até aproximadamente 250 °C e a decomposição térmica ocorre em apenas 1 evento com perda de massa total próxima a 100%. Por outro lado os dendrímeros PGLD G2 e G4 são

estáveis termicamente até aproximadamente 230 °C e a decomposição térmica ocorre em dois eventos.

A Figura 8.8-b indica que o primeiro evento no PGLD G2 se processa com cinética rápida iniciando em aproximadamente 225 °C com perda de massa próxima a 80%. O segundo evento ocorre de forma mais lenta e gradativa entre 300 e 350 °C e a perda de massa é próxima a 10%. Observa-se um teor de resíduo de aproximadamente 1% que pode ser devido à formação parcial de carbono elementar durante a segunda etapa de decomposição.

As curvas TG e DTG do dendrímero PGLD G4 são ilustradas na Figura 8.8-c. As curvas indicam que o PGLD G4 mantém sua estabilidade até temperaturas próximas a 250 °C e sua decomposição acontece em dois eventos. O primeiro evento acontece gradativamente e é mais lento com início próximo a 200 °C e a perda de massa é de aproximadamente 50%. O segundo evento tem cinética rápida e acontece entre 300 e 350 °C, com perda de massa de 30%. Observou-se para o PGLD G4 um teor de resíduo de aproximadamente 10% que é referente à formação parcial de carbono elementar durante a segunda etapa de decomposição térmica do material.

O PGLD-Chl-a apresenta diferenças significativas em seu comportamento térmico relativamente ao PGLD puro. A Figura 8.8-d mostra que a degradação térmica desse material acontece em quatro eventos, e sua estabilidade térmica se mantém até 90 °C aproximadamente. O primeiro evento tem cinética rápida, acontece entre 90 e 140 °C e causa perda de cerca de 15% de massa. O segundo evento acontece gradual e mais lento, na faixa de temperatura entre 200 e 290 °C. A cinética do terceiro evento é pouco lenta, com perda de massa de 25% e acontece entre as temperaturas de 290 e 340 °C. O quarto evento acontece no intervalo aproximado de 340 a 400 °C, com perda de 20% de massa. Os dois últimos intervalos são atribuídos à formação e decomposição de subprodutos formados durante a degradação do PGLD-Chl-a. Também é possível observar um teor de resíduo de aproximadamente 5% referente a formação parcial de carbono elementar durante a decomposição do material.

A Figura 8.9-a mostra o espectro FTIR do resíduo contido cadinho após a análise térmica do PGLD-Chl-a e também uma foto desse resíduo (Fig. 8.9-b).

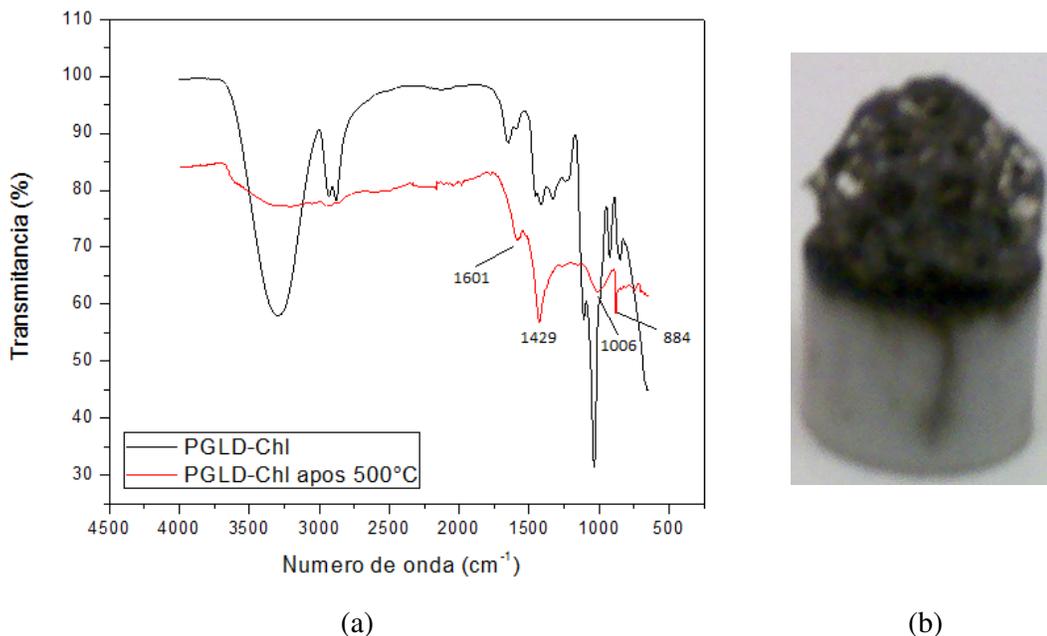


Figura 8.9 – (a) Espectro FTIR do PGLD-Chl antes da análise termogravimétrica (preto) e após a análise TG (vermelho); (b) Foto do resíduo após a análise TG.

Observam-se que a banda de absorção C-OH sofreram significativa redução de intensidade. Por outro lado, as bandas de absorção ao estiramento C=C em 1601 cm^{-1} , dobramento =CH₂ em 1429 cm^{-1} , torção =CH₂ em 1006 cm^{-1} , e por fim dobramento =CH₂ em 884 cm^{-1} referente a terminação insaturada foram significativamente intensificadas [140].

Em uma comparação entre as curvas TG/DTG das três gerações do PGLD e do PGLD-Chl-a, (Figura 8.10) observa-se a semelhança entre as curvas do PGLD G4 e do PGLD-Chl-a, destacando as alterações na estabilidade térmica do material causada pelo acoplamento da clorofila ao dendrímero.

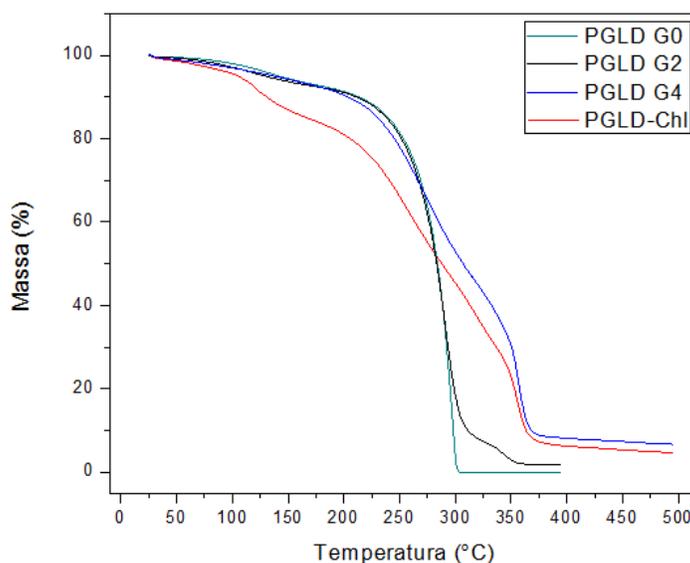


Figura 8.10 – Comparação entre as gerações do PGLD e PGLD-Chl.

Para o estudo da cinética de decomposição térmica por TG foi aplicado neste trabalho o método de Kissinger [141]. Nesse caso se considera que o fluxo de calor consumido pela amostra é diretamente proporcional à massa do PGLD que é volatilizada, e que também pode ser detectado mais eficientemente pela curva DTA, cujo pico indica efetivamente a condição de máxima taxa de volatilização da amostra. Durante o tratamento térmico do PGLD, considera-se que a taxa de sua decomposição térmica é diretamente proporcional ao fluxo térmico recebido pela amostra, sendo o calor de decomposição função da temperatura de operação. Admitindo-se que durante o tratamento térmico dos dendrímeros PGLD's só ocorra volatilização, a taxa de volatilização será diretamente proporcional ao fluxo térmico recebido pela amostra, sendo o calor de volatilização função da temperatura de operação.

Considerando o modelo de Kissinger [141], a taxa de degradação térmica do PGLD pode ser descrita através da Equação (8.1):

$$\frac{d\alpha}{dt} = Ae^{\left(-\frac{E}{RT}\right)}(1 - \alpha)^n \quad (8.1)$$

sendo n a ordem da reação, α a fração mássica volatilizada, T a temperatura, E é a energia de ativação para a reação de degradação térmica, e R é a constante dos gases.

Diferenciando-se a Eq. (8.1), para uma dada taxa constante de aquecimento β , a degradação máxima se dará em uma correspondente temperatura T_m [142]:

$$\frac{E\beta}{R(T_m)^2} = An(1-x)_m^{(n-1)} e^{-\frac{E}{RT_m}} \quad (8.2)$$

sendo $(1-x)_m$ é a fração mássica residual, β é uma constante de aquecimento, T a temperatura absoluta, E é a energia de ativação para a reação de degradação térmica, R é a constante dos gases, T_m é a temperatura referente à taxa máxima de perda de massa e corresponde à temperatura do pico DTG, visto que nessa temperatura ocorre a máxima taxa de variação de massa do PGLD durante o aquecimento.

A linearização da Eq. (8.2) fornece:

$$\ln \frac{\beta}{(T_m)^2} = -\frac{E}{R} \times \frac{1}{T_m} + \ln\left(A \frac{R}{E}\right) \quad (8.3)$$

A Eq. (8.3) é uma equação de reta que expressa valores de $\ln\beta/(T_m)^2$ em função de $1/T_m$. Portanto, foram feitas curvas DTG em três taxas de aquecimento (β) distintas, 10, 15 e 20 °C/min, que forneceram as respectivas temperaturas relativas à taxa de conversão máxima (T_m). Os valores foram colocados na forma de um gráfico $\ln(\beta/T_m)^2$ versus $(1/T_m)$ e, com auxílio do software TA 72 determinou-se o coeficiente angular, que propiciou o cálculo da energia de ativação (E) para a degradação térmica do PGLD de diferentes gerações.

Os resultados obtidos para o cálculo de E para os dendrímeros PGLD's G0, G2 e G4 são apresentados na Figura 8.11. Os resultados permitem concluir que, em ambiente inerte, o dendrímero PGLD G0 apresenta uma estabilidade térmica significativamente maior que o PGLD/G2 e PGLD/G4. Uma vez que o PGLD/G4 é mais volumoso, é de se esperar que a mobilidade das ramificações ficasse restrita devido ao impedimento estérico [143]. É o impedimento estérico que justifica o fato de que com o aumento da geração do dendrímero e a incorporação de Chl-a a energia de ativação diminui (Figura 8.11), favorecida nesse caso por um maior impedimento estérico e conseqüente diminuição nas interações intermoleculares do dendrímero.

É importante salientar que a energia de ativação calculada não é a verdadeira, mas sim uma energia de ativação aparente, pois considerou-se que a velocidade de decomposição por unidade de área de interface é constante, o que não é rigorosamente verdadeiro. Os fatores termodinâmicos relacionam-se com as condições de equilíbrio a qualquer temperatura enquanto que nos fatores cinéticos a ênfase é sobre a velocidade de reação. Uma vez que no estudo de análise térmica os dendrímeros apresentam-se como um líquido de alta viscosidade,

no fornecimento de calor ao sistema é possível que a transição ocorra parcialmente para uma fase gasosa. Desta maneira a análise da curva TG isotérmica fornece somente uma relação matemática e não identifica necessariamente o modelo de Arrhenius. Para uma análise mais precisa da energia de ativação do sistema será necessário investigar a influência na forma e tamanho da área interfacial na reação de decomposição térmica.

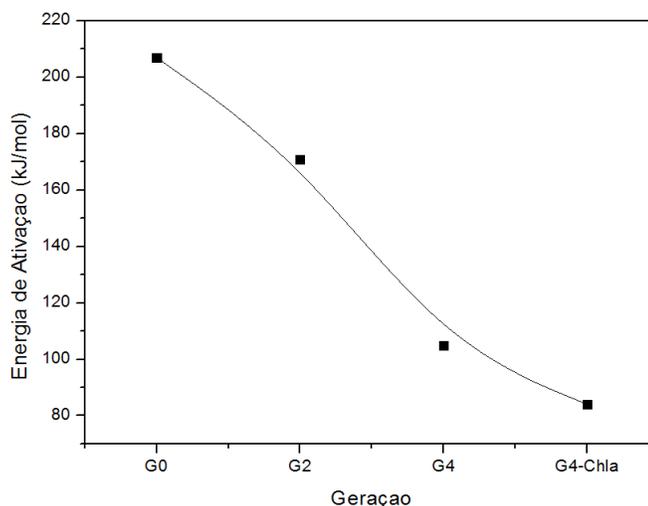


Figura 8.11 – Energia de ativação dos dendrímeros PGLD's em função do número de gerações.

8.1.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O equipamento DSC utilizado nesse trabalho utiliza a modalidade de compensação de fluxo de calor. Nesse caso, a amostra e a referência são colocadas em cadinhos idênticos, localizados sobre um termoeletrico de “constantan”, e aquecidos por uma única fonte de calor. O calor é transferido através do disco para ambas, amostra e referência. O fluxo de calor diferencial entre os dois é controlado por termopares conectados abaixo dos cadinhos. Assim, a diferença no fluxo de calor da amostra e da referência é diretamente proporcional à diferença de potência das junções dos dois termopares. A apresentação dos resultados no DSC de compensação de potência é adotada a convenção termodinâmica com eventos endotérmicos (variação de entalpia menor que zero, $\Delta H > 0$) caracterizados por picos ascendentes nas curvas DSC, enquanto que os eventos exotérmicos ($\Delta H < 0$) os eventos são representados nas curvas DSC por picos descendentes [144].

Com a diminuição acentuada da temperatura de um sistema macromolecular o movimento conformacional se restringe ao máximo, impedindo o movimento dos seguimentos de cadeia, tornado seus movimentos mais lentos até perderem a flexibilidade num estado de “congelamento” (estado vítreo). Essa fronteira é chamada de temperatura de transição vítrea (T_g)(Figura 8.12).

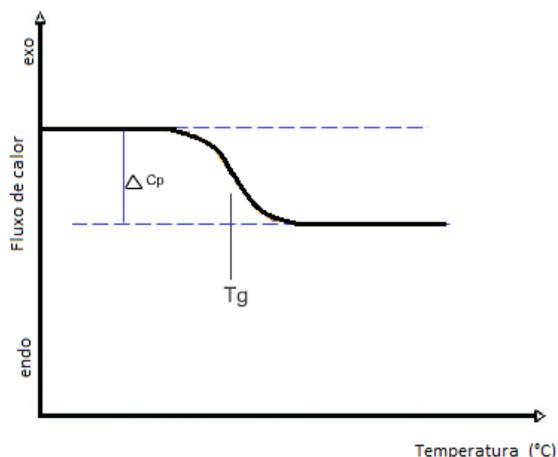


Figura 8.12 – Curva DSC de determinação de T_g [145].

Em temperaturas inferiores à T_g não há variação na fração dos espaços disponíveis, assim a fração de volume livre permanece a mesma. Em geral a temperatura de transição vítrea aumenta com o peso molecular [146]. O aumento da T_g do dendrímero reflete a presença de uma estrutura mais rígida [147].

Em dendrímeros de PGLD o fornecimento inicial de calor leva ao enfraquecimento das ligações de hidrogênio, facilitando assim uma maior movimentação entre as cadeias poliméricas umas em relação às outras. Dessa forma, quanto mais volumoso for o dendrímero maior será sua temperatura de transição vítrea, pois a mobilidade das cadeias será reduzida.

Existem muitos fatores que influenciam a T_g tal como a razão de resfriamento, uma razão menor leva a uma temperatura T_g mais baixa [148]. A T_g também é dependente da natureza dos grupos terminais, com o aumento da polaridade a T_g também aumenta. Outros fatores que influenciam a T_g são rigidez, tamanho das cadeias, e efeitos estéricos dos grupos terminais [149].

A T_g de um polímero é geralmente associada a fenômenos cooperativos de relaxamento através de grandes movimentos segmentares e sua origem reológica ou termodinâmica está bem estabelecida. Para um polímero linear de alto peso molecular, as

extremidades das cadeias tem um papel menor da transição vítrea. Uma vez que polímeros hiper-ramificados e dendríticos não tem suas cadeias amplamente emaranhadas, a transição vítrea pode ter origem a partir de um fenômeno diferente daquele de polímeros lineares, nesse caso, a contribuição dos grupos terminais torna-se significativo. Tem-se sugerido que o comportamento destes polímeros é baseado em alterações conformacionais e o grau de associação do polímero em diferentes tamanhos (gerações).

Na tentativa de compreender o relaxamento térmico de dendrímeros, a teoria de volume livre de terminação de cadeia modificada, com consideração do volume ocupado por um grande número de pontas de cadeia foi proposto para explicar a T_g dependente do peso molecular [150].

Nesse trabalho, a análise DSC foi feita com o objetivo de encontrar a temperatura de transição vítrea (T_g) dos dendrímeros de poliglicerol. Todas as amostras foram aquecidas e em seguida resfriadas, para eliminar a história térmica do material sendo considerado somente a segunda “corrida” térmica. Os resultados são apresentados na Figura 8.13.

Não foram observados eventos endotérmicos ou exotérmicos associados a fenômenos de cristalização ou fusão, indicando que o PGLD, independente do número de gerações é essencialmente amorfo [143]. A temperatura de transição vítrea foi encontrada utilizando o ponto médio da descontinuidade da curva que representa a transição vítrea [146]. A T_g encontrada para todas as gerações de PGLD e para o PGLD-Chl-a está abaixo da temperatura ambiente (25°C) (Tabela 8.4), o que indica que as diferentes gerações do PGLD pode ser utilizado como carreador de fármaco na temperatura ambiente e também no interior do corpo humano.

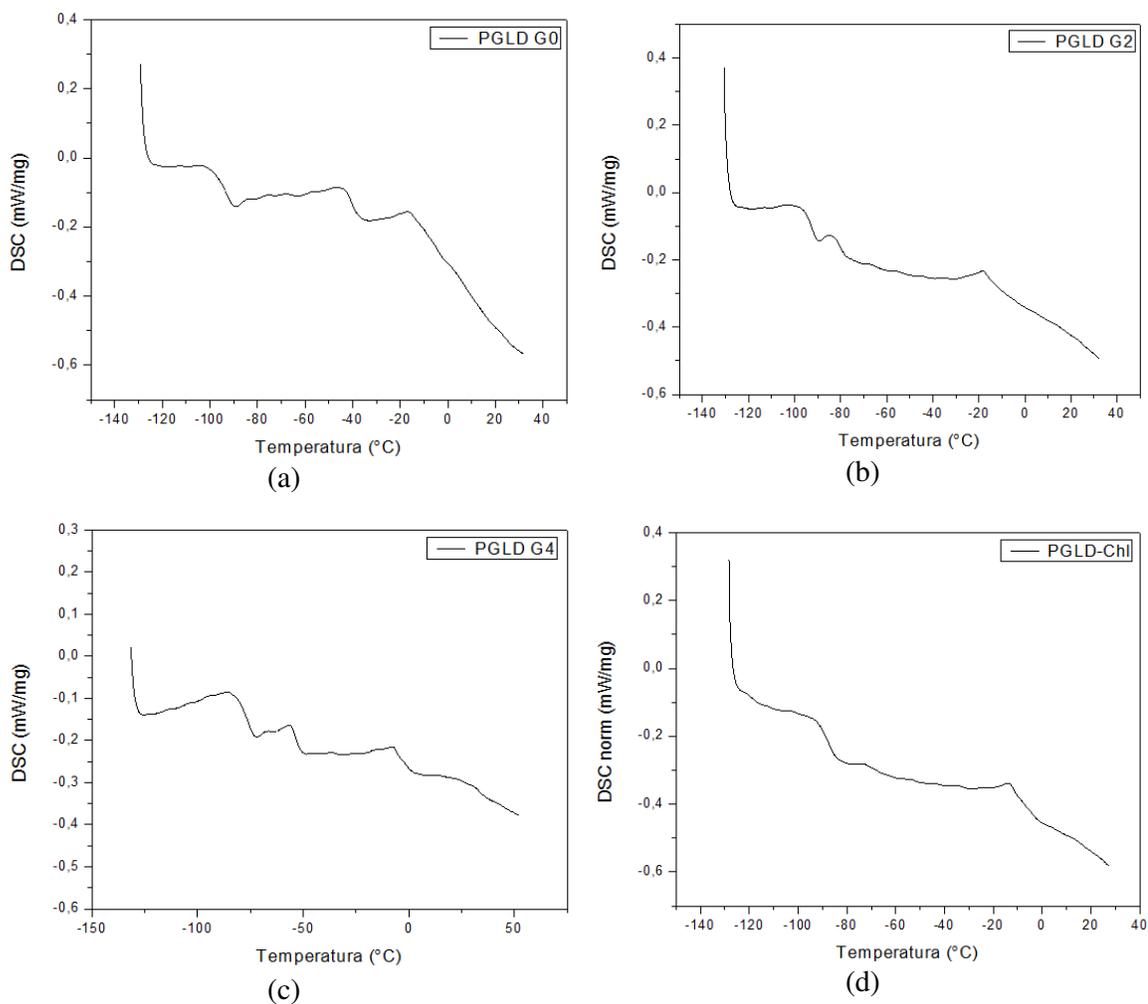


Figura 8.13 – Curva DSC normalizada do segundo aquecimento do poliglicerol, com razão de aquecimento de 10°C/min, sendo (a) PGLD G0; (b) PGLD G2; (c) PGLD G4; e (d) PGLD-Chl.

Tabela 8.4 – Valores encontrados para temperatura de transição vítrea das diferentes amostras do PGLD.

PGLD	G0	G2	G4	PGLD-Chl
Tg (°C)	-95	-93	-77	-88

O aumento da Tg em cada geração (Figura 8.14-b) pode ser explicado através do aumento do volume hidrodinâmico do dendrímero diminuindo a mobilidade das cadeias devido ao impedimento estérico. No entanto, a Tg do PGLD-Chl-a é menor que a do PGLD G4 puro. Este resultado sugere que a clorofila quando acoplada ao PGLD proporciona um volume hidrodinâmico maior de rotação. Volume hidrodinâmico é o tamanho que a macromolécula assume em solução (Figura 8.15-a). O volume livre também interfere na Tg de um dendrímero. Volume livre é a somatória do volume das cavidades presentes entre as

ramificações, cada cavidade é chamada de volume livre local [151]. A Figura 8.15-b traz uma comparação entre o volume livre do PGLD G3 e G4. Note que com aumento da geração o espaço entre as cadeias diminui, diminuindo o volume livre. Na comparação desses dendrímeros, pode-se concluir que um aumento no volume livre leva a uma Tg inferior [143].

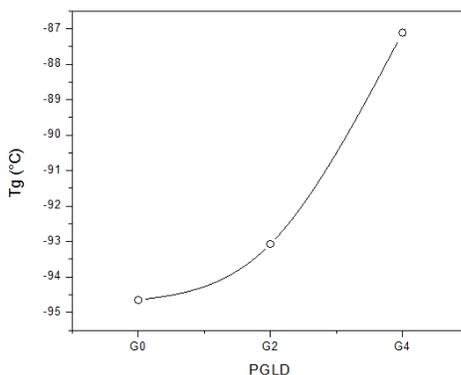


Figura 8.14 – Relação entre Tg e a geração do dendrímero de poliglicerol.

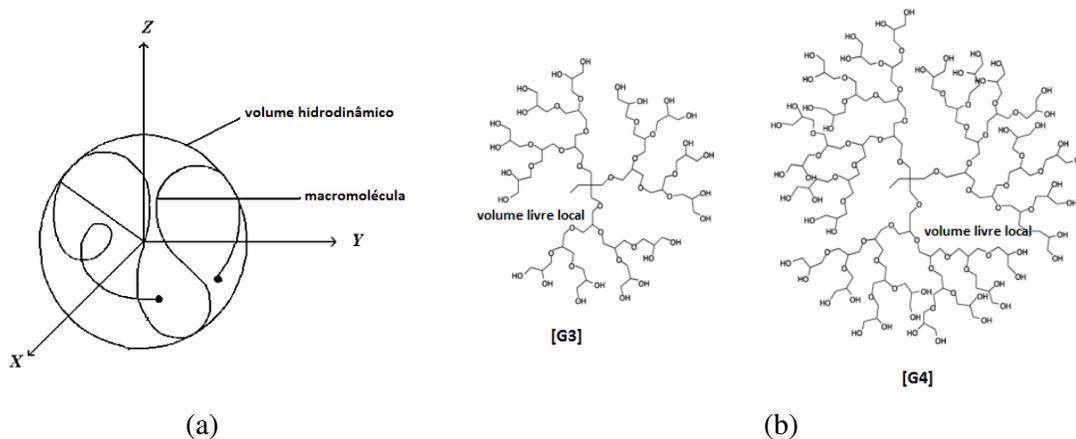


Figura 8.15 – (a) Exemplo de volume hidrodinâmico de macromolécula (neste caso é um polímero linear) [152]; (b) exemplo de volume livre local em moléculas de poliglicerol dendrítico nas gerações G3 e G4 [96].

8.1.7. Simulação computacional do conjugado PGLD-Chl-a

Os métodos computacionais são utilizados como uma ferramenta no planejamento, descoberta, elucidação da estrutura molecular, eletrônica, processos químicos e biológicos das moléculas. Neste trabalho a otimização da geometria das moléculas de PGLD G4, PGLD-Chl-a e clorofila foi feita pelo método semi-empírico PM3. Este método foi escolhido porque é robusto e vantajoso para obter informações química e conformacional de dendrímeros [153].

A equação diferencial de Schrödinger (Equação 8.4) tem na sua resolução a avaliação de um grande número de integrais. Em métodos *ab initio*, o número de integrais cresce aproximadamente com a quarta potência do número de funções de base, podendo chegar a alguns milhões até mesmo para moléculas pequenas. Já em métodos quânticos semi-empíricos, para reduzir os custos computacionais e o tempo, um grande número dessas integrais é negligenciado. Para que fosse permitida a eliminação do cálculo dessas integrais foram introduzidos parâmetros empíricos ou previamente calculados na resolução da equação de Schrödinger. Assim os métodos semi-empíricos só podem ser aplicados a sistemas que contém os elementos para os quais foram desenvolvidos esses parâmetros [154].

$$\left[\frac{-\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right] \psi = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi \quad 8.4$$

O método PM3, que foi utilizado nesse trabalho, possui funções de onda parametrizadas para os elementos H, Na, K, Rb, Zn, Hg, Al, C, Si, Ge, Sn, N, P, O, S, F, Cl, Br, I, Be, Mg, Cd, Ga, In, Tl, As, Sb, Bi, Se e Te. A parametrização para este método foi desenvolvida para reproduzir uma série de dados experimentais, incluindo geometrias de equilíbrio, calores de formação, momentos de dipolo e energias de ionização [154]. Os métodos semi-empíricos são ainda incomparáveis com qualquer método *ab initio*, no entanto é um método suficiente para uma visão qualitativa [155].

O cálculo das estruturas eletrônicas foi realizado utilizando o método *ab initio* DFT/6-31-G em que 6-31G são as funções de base utilizadas. Ao utilizar a teoria do funcional de densidade (DFT - density functional theory), ao invés da função de onda considera-se a densidade eletrônica. Dessa maneira, a energia total do sistema (E) é escrita como um funcional de densidade. O sucesso dessa abordagem depende da qualidade do funcional de correlação e troca. Neste trabalho foi utilizado o funcional B3LYP, devido à qualidade de seus resultados, particularmente para moléculas orgânicas [156].

Cada fórmula molecular pode representar um grande número de isômeros moleculares. Cada isômero é um mínimo local na superfície de energia potencial, formado pela soma das energias eletrônica e de repulsão entre os núcleos em função das coordenadas de todos os núcleos. O ponto em que uma geometria na qual a derivada da energia com respeito a todos os deslocamentos dos núcleos é igual a zero, é chamado de ponto estacionário. Um ponto estacionário onde todos os deslocamentos implicam um aumento na energia é chamado de mínimo local, contudo caso corresponda ao isômero mais estável, é então chamado de mínimo

global. Uma estrutura de transição, cuja coordenada é chamada de coordenada de reação, é que uma determinada mudança de coordenada em particular implica em um decréscimo na energia total em duas direções. Este processo de determinação de pontos estacionários é chamado de otimização de geometria.

As geometrias das moléculas de PGLD G4, Clorofila *a* e PGLD-Chl foram otimizadas, utilizando-se o critério de convergência 1.0 kcal/mol/Ångstrom. A estrutura inicial para a otimização do PGLD G4 e da clorofila foi preparada totalmente plana e as ramificações foram colocadas cuidadosamente o mais distante possível umas das outras, para que não houvesse sobreposição. Para otimizar o PGLD-Chl-a a estrutura inicial utilizada foi as estruturas do PGLD G4 e da clorofila, já otimizadas, colocadas frente a frente, de forma a facilitar o cálculo da estrutura final. As Figuras 8.16, 8.17 e 8.18 mostram as estruturas otimizadas pelo método PM3, onde se encontra diferentes posições de cada molécula, para melhor visualização.

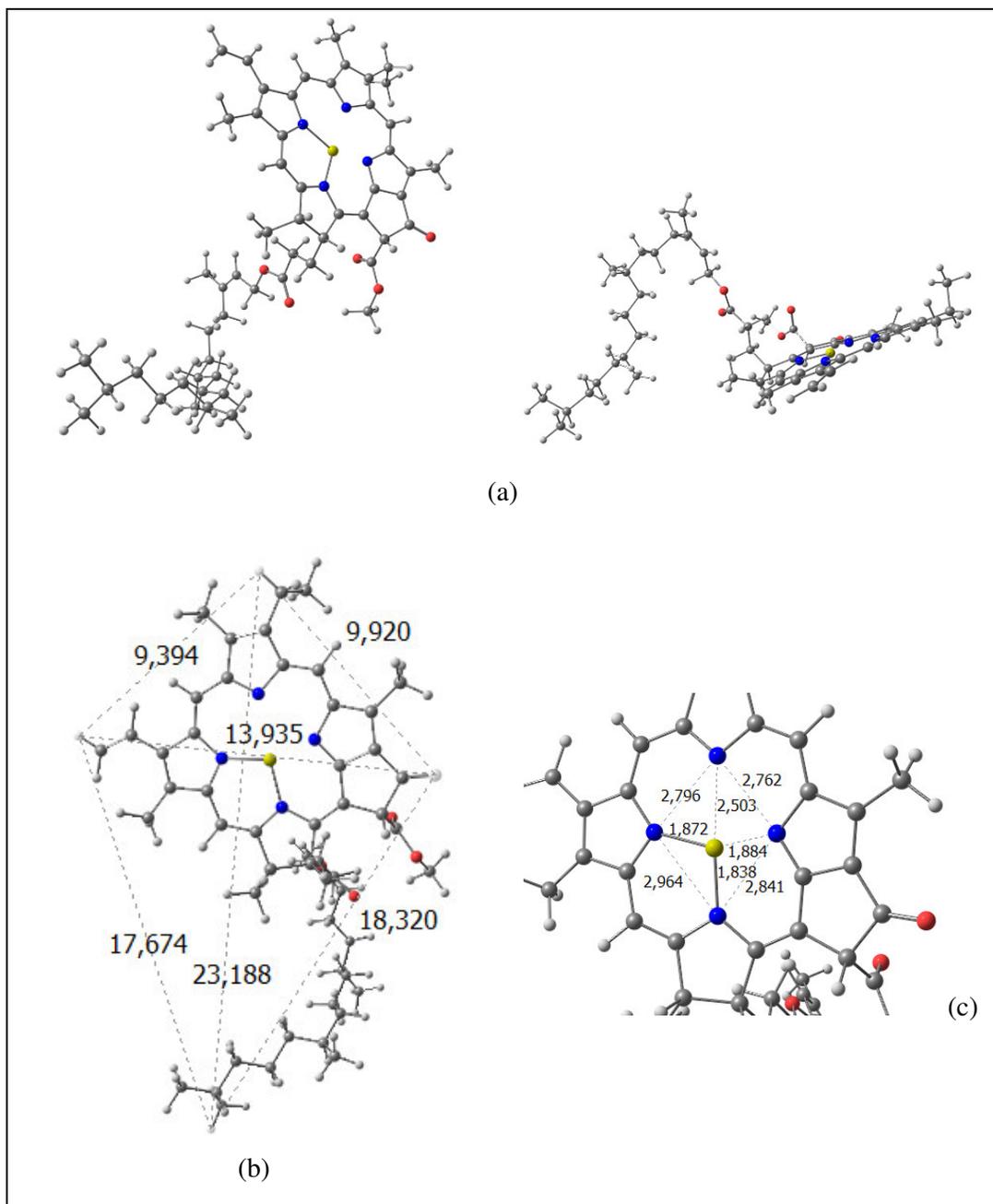


Figura 8.16 – Estrutura otimizada da Clorofila *a* pelo método PM3 de dois ângulos diferentes (a), destaque para as distâncias (em angstroms) das extremidades da molécula (b) e de seu centro (c).

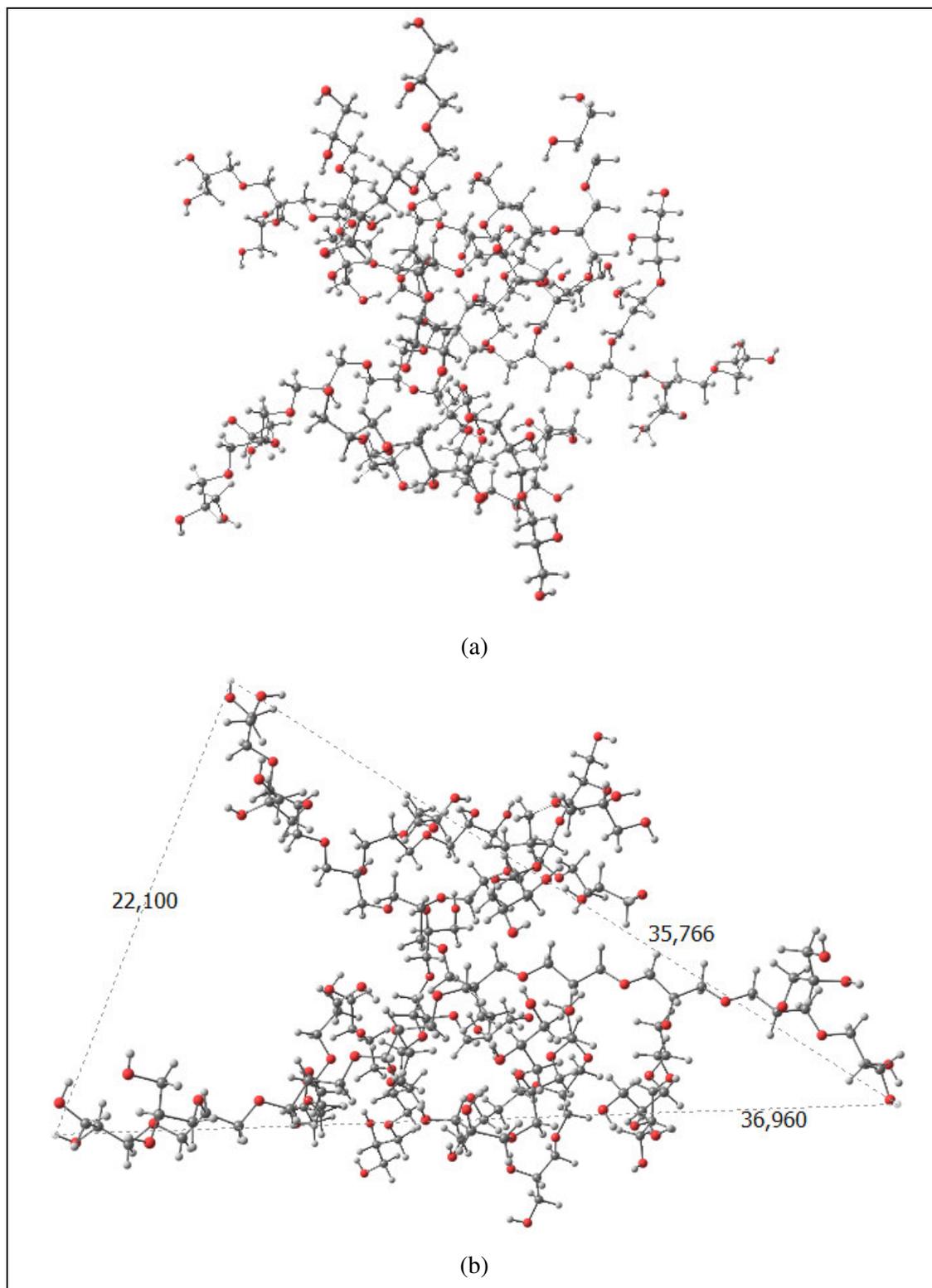


Figura 8.17 – (a) Estrutura do PGLD de quarta geração, otimizada pelo método PM3 (b) PGLD G4 visto de outro ângulo com destaque para distância (em angstroms) dos extremos da molécula.

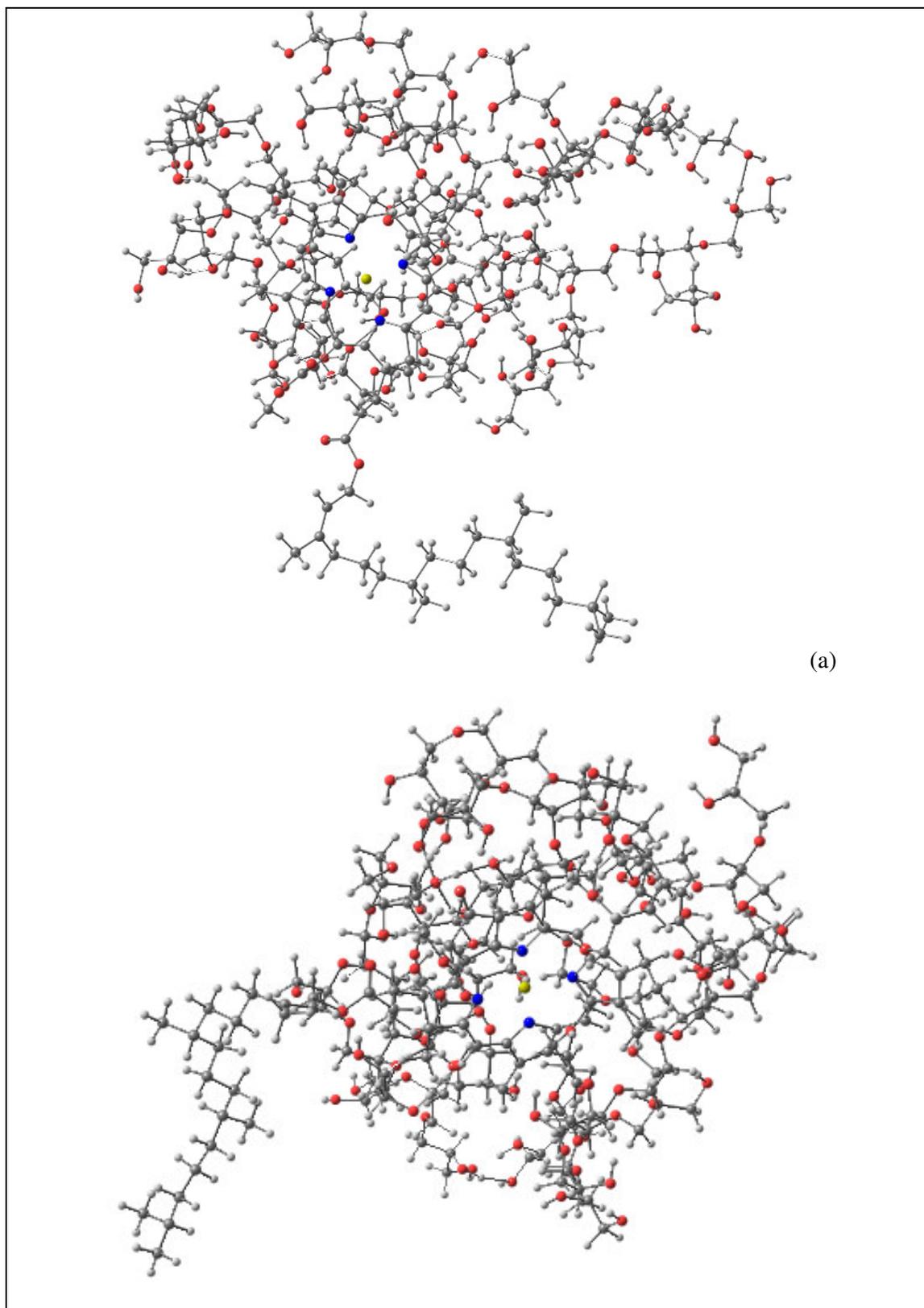


Figura 8.18 – Estrutura otimizada do PGLD-Chl-a pelo método PM3 vista por dois ângulos diferentes (a);

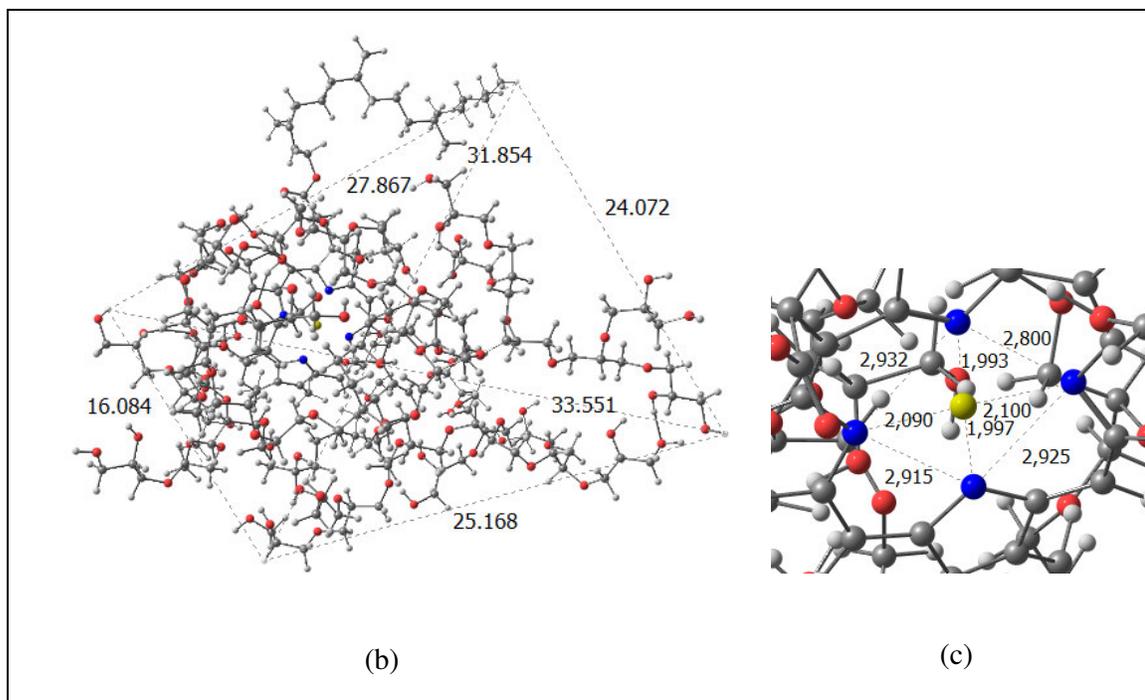


Figura 8.18 – Estrutura otimizada do PGLD-Chl-a pelo método PM3 com destaque para as distâncias (em angstroms) das extremidades da molécula (b) e do centro referente à estrutura da clorofila no interior do PGLD (c).

De acordo com vários estudos experimentais da estrutura, o átomo de magnésio é centrado no anel porfirínico [157–159]. Entretanto em uma verificação da otimização da geometria da clorofila a no vácuo nota-se que o átomo de Mg não está no centro do anel porfirínico, já que a distância entre o Mg e os átomos de nitrogênio variam entre 1,838 a 2,503 Å (Figura 8.16-c). No entanto, quando a clorofila é acoplada ao PGLD essa diferença entre os átomos de N e o de Mg é menor, variando entre 1,993 a 2,100 Å (Figura 8.18-c), sugerindo que a deformação do anel porfirínico é menor quando a clorofila está ligada ao PGLD. Essa distorção no anel porfirínico pode ser consequência de uma parametrização inadequada para o átomo de Mg, pois efeitos estruturais não simétricos são previstos quando é utilizado a parametrização do método PM3 [159].

A distribuição orbital molecular e as respectivas energias dos orbitais de fronteira foram calculadas e estão representadas nas Figuras 8.19, 8.20 e 8.21. As energias dos orbitais HOMO e LUMO estão resumidas na Tabela 8.5. Observa-se que os valores encontrados para o *band-gap* de energia tem concordância satisfatória com os resultados de espectroscopia eletrônica experimentais (UV), apresentando cerca de 30% de erro em relação aos valores medidos experimentalmente.

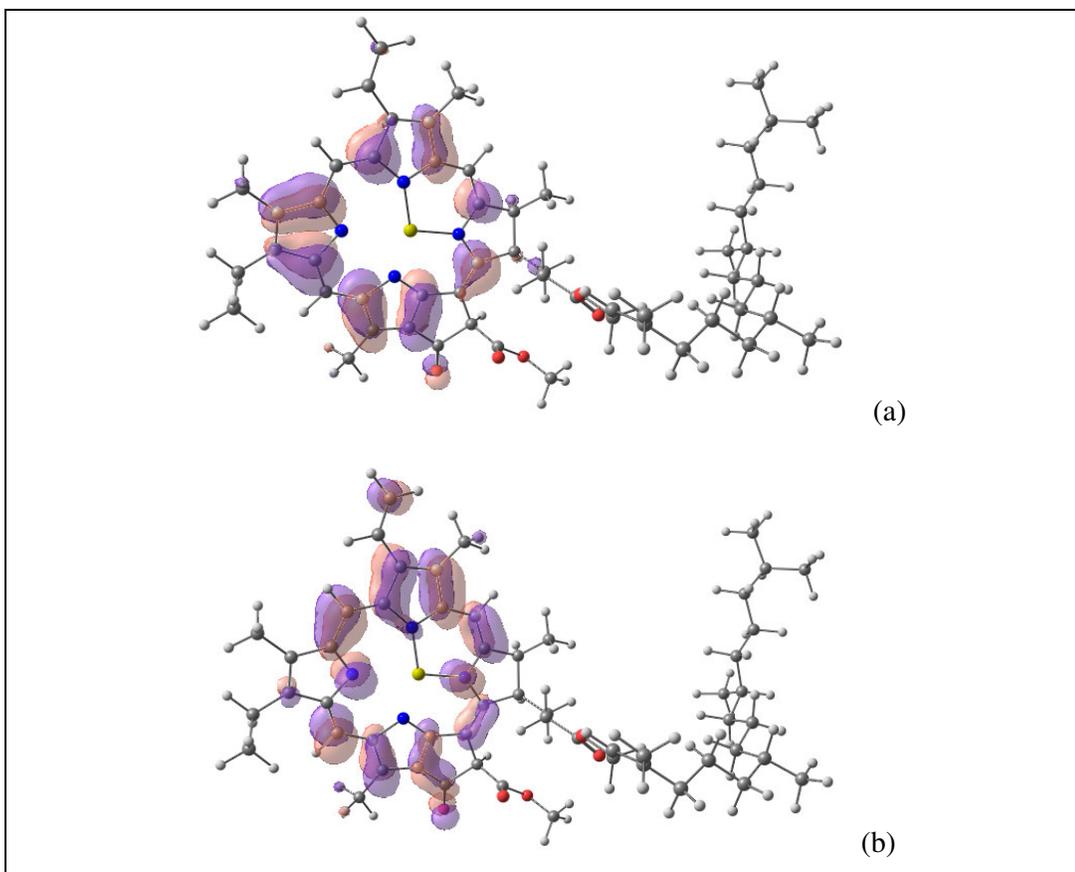


Figura 8.19 - Representação dos orbitais HOMO (a.) e LUMO (b.) para a molécula de clorofila *a*. As esferas cinzas representam o átomo de carbono, as brancas o hidrogênio, vermelhas o oxigênio e amarela o magnésio.

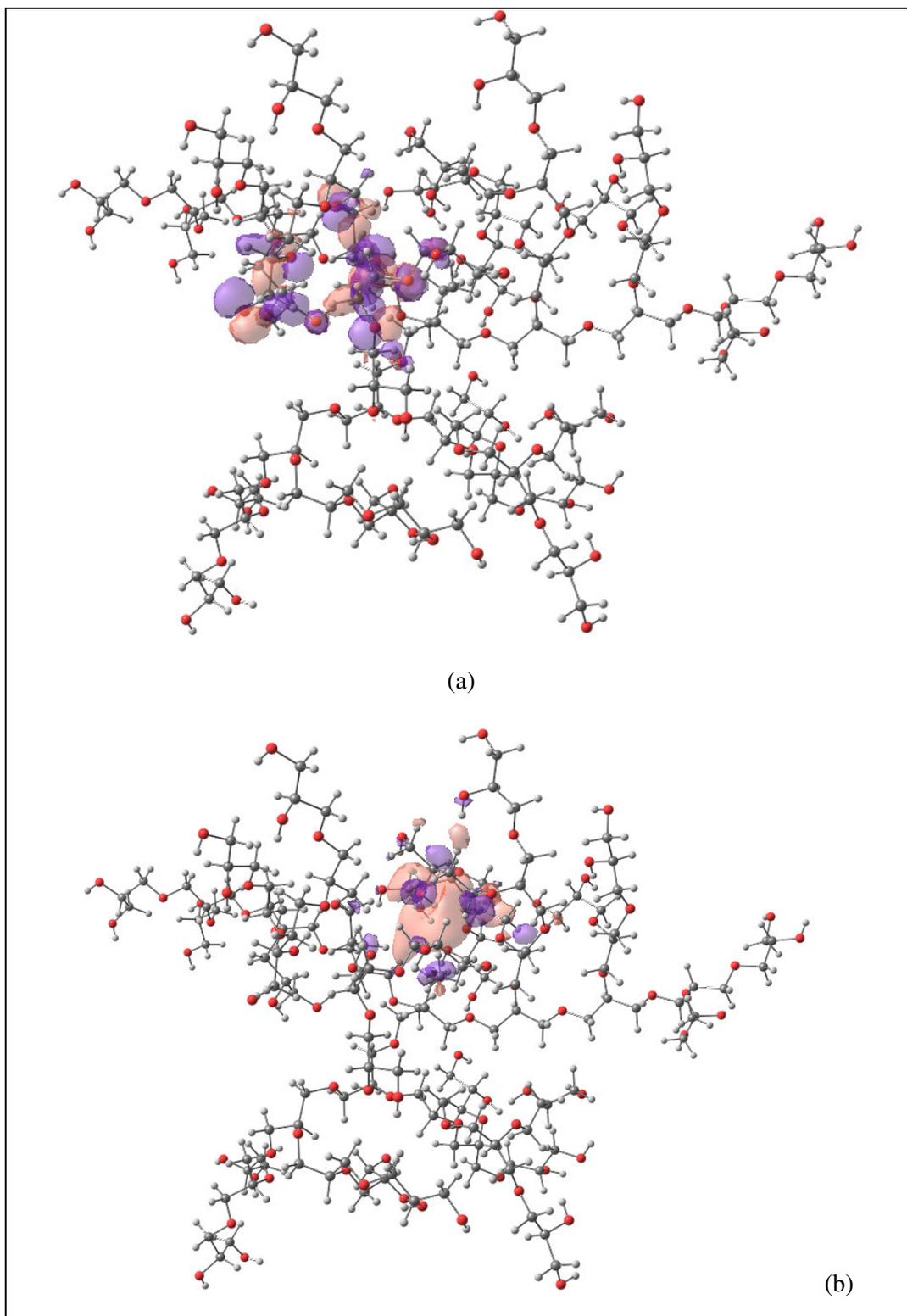


Figura 8.20 - Representação dos orbitais HOMO (a) e LUMO (b) para a molécula de PGLD de quarta geração. As esferas cinzas representam o átomo de carbono, as brancas o hidrogênio, e as vermelhas o oxigênio.

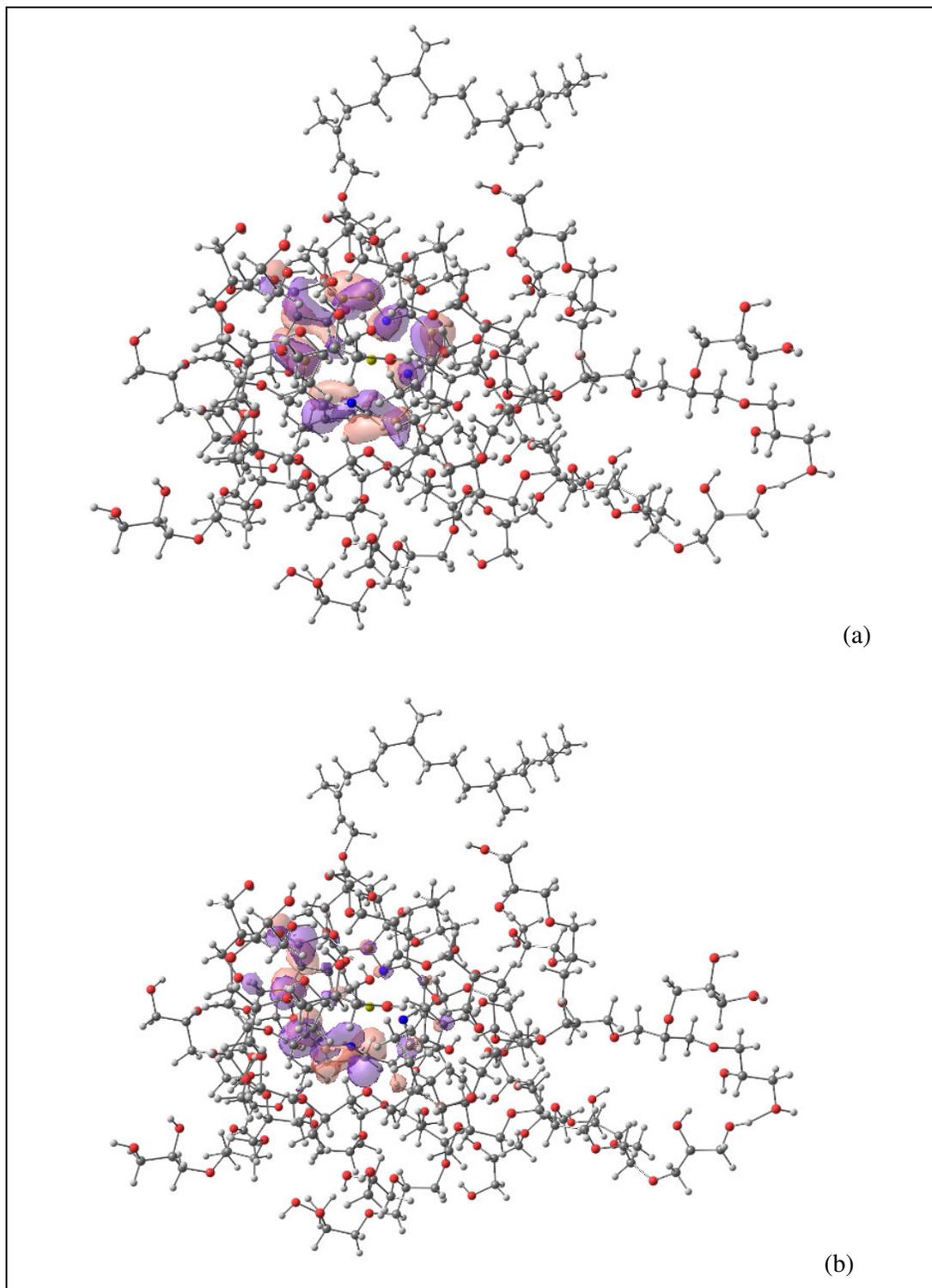


Figura 8.21 - Representação dos orbitais HOMO (a) e LUMO (b) para a molécula de PGLD-Chl-a. As esferas cinzas representam o átomo de carbono, as brancas o hidrogênio, vermelhas o oxigênio e amarela o magnésio.

Tabela 8.5 – Valores obtidos pelo cálculo teórico dos orbitais HOMO e LUMO utilizando o método DFT.

	HOMO	LUMO	Gap de energia (eV)	Comprimento de onda correspondente (nm)	Valor experimental (nm)	Erro
PGLD G4	-6,46	0,26	6,72	184	270	32%
Clorofila <i>a</i>	-4,97	-2,51	2,46	504	666	24%
PGLD-Chl-a	-2,70	-0,11	2,59	478	666	28%

As clorofilas absorvem luz na região visível e as bandas registradas são provenientes das transições eletrônicas π - π^* no anel porfirínico. Nesta simulação consideraremos apenas a transição na região do vermelho (banda Q) da transição S_0 - S_1 . A diferença de energia HOMO-LUMO da clorofila foi 2,46 eV, o que corresponde a um comprimento de onda de 504 nm. Este cálculo apresenta um erro em relação ao medido experimentalmente de 24%. O PGLD na geração 4 apresenta diferença de energia HOMO-LUMO de 6,72 eV, o que corresponde ao comprimento de onda de 184 nm atribuído a absorção da -OH-CH₂-CH₂-O-C- tendo um erro de 32% em relação ao valor experimental (270 nm). Os erros encontrados são aceitáveis, pois o cálculo teórico considera as moléculas no vácuo o que não acontece na medida experimental.

O PGLD-Chl-a absorve luz na mesma faixa de comprimento de onda que a clorofila pura. A diferença de energia HOMO-LUMO experimentalmente se mantém a mesma (666 nm), contudo o cálculo teórico mostra uma pequena alteração, sendo que o valor da diferença de energia HOMO-LUMO do PGLD-Chl-a é menor que a da clorofila pura. De acordo com a Figura 8.21 o orbital HOMO do PGLD-Chl-a se mantém ao redor do anel porfirínico, enquanto que o orbital LUMO apresenta um deslocamento para fora do anel. Este resultado é significativo, pois além do resultado teórico estar em acordo com o obtido experimentalmente, aponta também que o PGLD não altera significativamente (quando ligado à clorofila) a absorção da luz pela clorofila no intervalo de interesse da terapia fotodinâmica, destacando mais uma das vantagens do uso do PGLD como carreador da clorofila.

O mapa de potencial eletrostático (Figuras 8.22, 8.23 e 8.24) indica as regiões que possuem mais elétrons (região negativa) e as que possuem menos elétrons (região positiva). Nota-se que no PGDL (Figura 8.22) as extremidades, onde estão os grupos COH, são

negativas (em azul). Na clorofila *a* (Figura 8.23) também é possível ver regiões negativas onde estão localizados os agrupamentos C=O. Isso acontece, pois o oxigênio é mais eletronegativo que o carbono atraindo a densidade de elétrons do carbono, tornando-se mais eletrofílico. As regiões positivas (em vermelho) no PGLD correspondem ao grupamento éter (C-O-C), enquanto que na clorofila se destaca como região positiva o centro do anel porfirínico, nos arredores do magnésio.

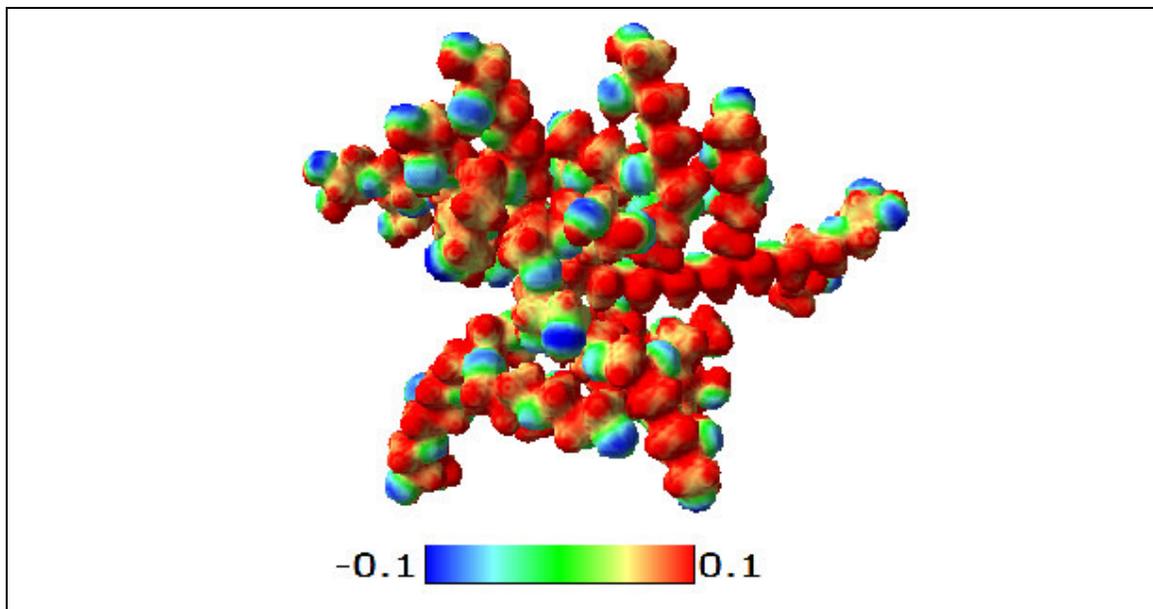


Figura 8.22 – Mapa de potencial eletrostático do PGLD G0

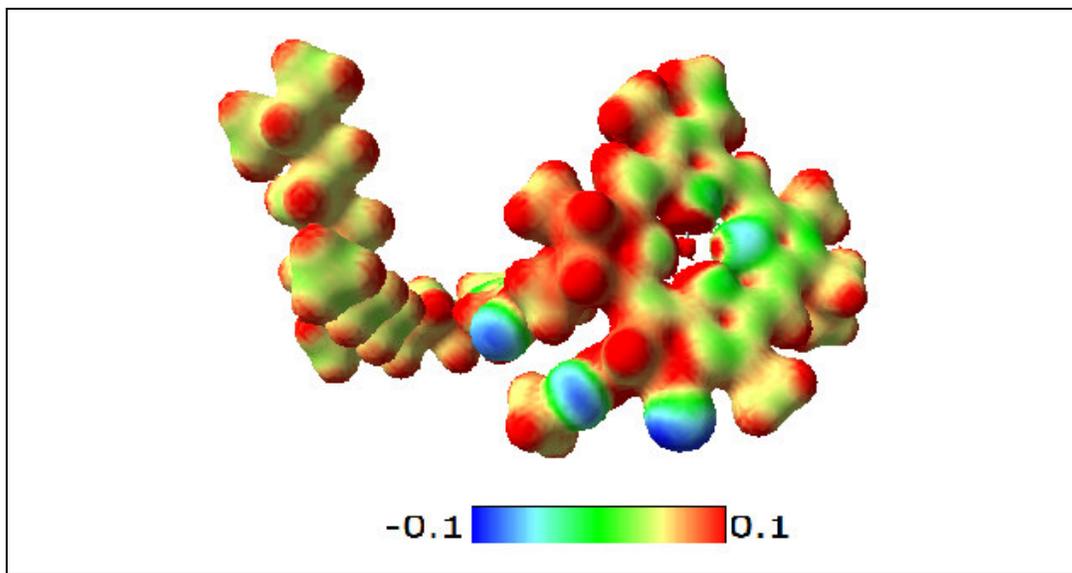


Figura 8.23 – Mapa de potencial eletrostático da clorofila *a*.

Após a ligação com o PGLD o centro da clorofila torna-se quase totalmente neutro (verde) (Figura 8.24). De uma maneira geral no PGLD-Chl as áreas positivas encontram-se na periferia da molécula onde se encontra as terminações OH, exceto na extensão referente à cauda da clorofila que permanece neutra, e no centro da molécula estão as regiões negativas e neutras.

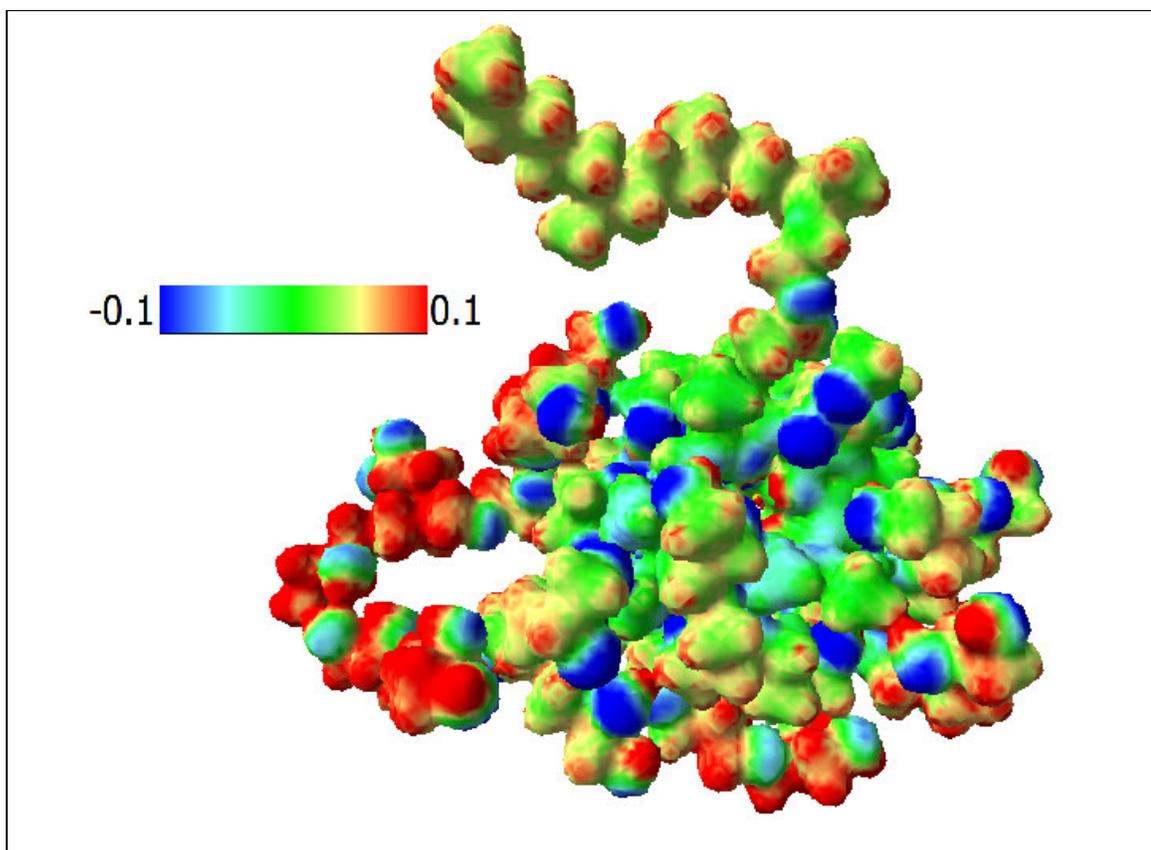


Figura 8.24 – Mapa de potencial eletrostático do PGLD-Chl

A equação 8.5 é a razão entre as concentrações estabelecidas nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando essa é dissolvida em um sistema de duas fases, sendo uma orgânica e a outra aquosa. A essa razão dá-se o nome de coeficiente de partição, este está relacionado à mudança de energia livre causada pela substância sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema [160].

$$P = \frac{[organica]}{[aquosa]} \quad (8.5)$$

O logaritmo do coeficiente de partição 1-octanol/água ($\log P$) é amplamente usado em vários modelos QSAR para prever as propriedades farmacêuticas de moléculas. Em química

medicinal há um contínuo interesse no desenvolvimento de métodos de obtenção do log P com base na estrutura molecular [161]. Os mecanismos de absorção, distribuição e atividade intrínseca estão diretamente relacionados com a resposta biológica de compostos bioativos. A hidrofobicidade regula os processos de absorção e distribuição dos compostos, tendo em vista a necessidade de que se dissolvam e atravessem membranas biológicas que formam tecidos e sistemas multi-compartimentados dos seres vivos, com a finalidade de atingir seus sítios de ação [162].

Por conveniência é utilizado o logaritmo do coeficiente de partição 1-octanol/água ($\log p$) é o mais utilizado [163]. É uma medida de hidrofobicidade molecular, usado para avaliar propriedades biológicas relevantes para a ação de fármacos, tais como solubilidade lipídica, distribuição nos tecidos, ligação a um receptor, metabolismo e biodisponibilidade. Hansch [164] foi pioneiro no uso extensivo desse parâmetro no desenvolvimento de variáveis para equações da relação estrutura-atividade quantitativa (quantitative structure-activity relationship, QSAR) [165]. Este método é parametrizado para sistemas orgânicos com variedade de heteroátomos.

O 1-Octanol é uma escolha natural como solvente hidrofóbico devido a sua semelhança físico-química com lipídios e de seu parâmetro de solubilidade próximo ao da membrana biológica (como a pele), sua disponibilidade, facilidade de uso, e também por conter uma cadeia alquila saturada apolar e grupo hidroxila polar com capacidade de agir como doador ou aceptor de ligação de hidrogênio [165,166].

Neste trabalho os valores de log P foram calculados empregando o método de contribuição atômica. Essa técnica foi escolhida por apresentar melhores resultados para moléculas com mais de 45 átomos [165,167].

Para cada molécula o coeficiente de partição octanol/água P pode prever a habilidade da molécula difundir-se em biomembranas. Se $P < 1$, então $\log P < 0$, nesse caso a molécula terá tendências hidrofílicas, quanto menor for o log P mais hidrofílica será a molécula. Por outro lado se $P > 1$, logo $\log P > 0$, então a molécula será lipofílica, quanto maior o log P, mais hidrofóbica será a molécula. A Tabela 8.6 traz os valores do log P para clorofila *a*, PGLD G4, e PGLD-Chl-*a*. Observa-se que a clorofila *a* apesar de ser uma excelente candidata a fotossensibilizador em terapia fotodinâmica é altamente hidrofóbica. Na literatura os valores encontrados para os tipos de clorofila são maiores que zero [168], este estudo está em concordância com a literatura, pois o log P encontrado para a clorofila na simulação

computacional foi de 18,16, evidenciando seu caráter hidrofóbico, o que pode acarretar no fenômeno de agregação. Este fenômeno é prejudicial para a terapia fotodinâmica, pois pode reduzir sua capacidade de absorver luz e diminuir o tempo de vida e rendimento quântico do estado tripleto excitado, tornando necessário o uso de um carreador para transportá-la até as células alvo.

Nesse caso o PGLD apresenta-se como um bom carreador, pois é hidrofílico, $\log P = -24,18$. Como esperado a ligação entre a clorofila e o PGLD resulta em uma molécula também hidrofílica, $\log P = -48,73$.

Tabela 8.6 – Valores obtidos do coeficiente de partição octanol-água.

PGLD G4	-24,18
Clorofila <i>a</i>	18,16
PGLD-Chl	-48,73

Este resultado é favorável para terapia fotodinâmica, pois a ligação entre as moléculas não afeta as características de absorção da clorofila e, possivelmente, poderá ser transportada até as células tumorais fazendo com que se acumule preferencialmente nos tecidos alvo.

8.2. Estudo de bioatividade e citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado em todos os quatro grupos de células (descrito no capítulo 6). O método é baseado na avaliação quantitativa de células vivas (denominadas de viáveis), após a exposição das células de carcinoma de cabeça e pescoço (OSCC-09) ao PGLD e/ou PGLD-Chl-a as placas de Elisa foram submetidas ao laser continuamente por um período de 3 minutos, de forma pontual com a abertura da ponteira laser situada 2 mm acima do micropoço. A irradiação ocorreu no escuro e em câmara de fluxo laminar. Após a irradiação com laser, as células foram incubadas com o corante supravital (MTS). O MTS é biorreduzido pelas células a um produto solúvel no meio de cultura e, então, foi realizada a análise espectrofotométrica do corante incorporado. A quantidade de MTS é diretamente proporcional ao número de células vivas [169]. Dessa forma, quanto maior for o número de células vivas mais escuro será o meio de cultura e maior será a absorvência.

O resultado obtido no primeiro estudo de viabilidade celular está ilustrado na Figura 8.25, que representa a absorbância (ordenada) \times grupos de tratamento das células (abscissa).

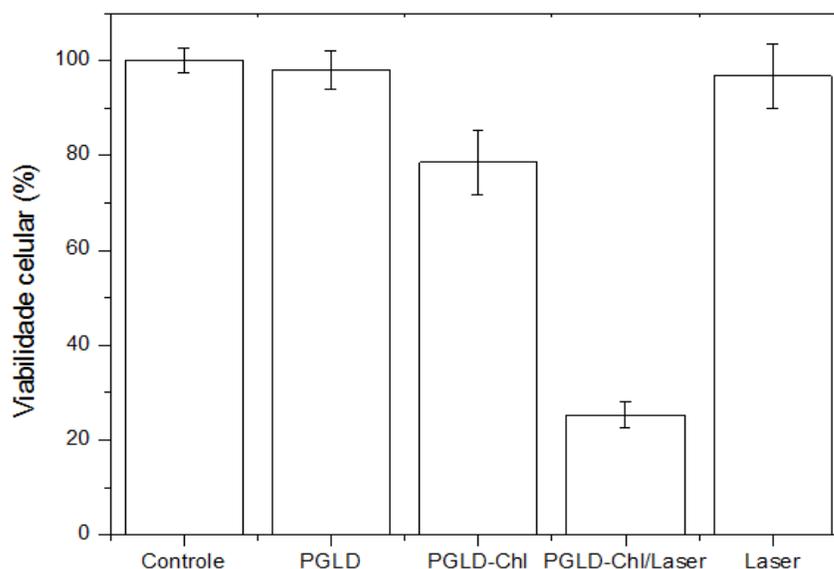


Figura 8.25 - Viabilidade das células OSCC-09 avaliada pelo ensaio de MTS, após 3 horas do tratamento. Os dados de densidade ótica (viabilidade celular) foram obtidos em quadruplicata para o tempo experimental de cada grupo e representados como média \pm erro padrão da média.

Através da análise da Figura 8.25 pode-se notar que a maior sobrevivência de células está nos grupos “controle”, “PGLD” e “laser”, nenhum dos dois grupos foram tratados com PGLD-Chl-a. No entanto o grupo “PGLD-Chl” que foi tratado com PGLD-Chl-a apresenta absorvância reduzida, e também o grupo “PGLD-Chl/laser” revela uma absorvância ainda mais reduzida, o que implica em uma grande quantidade de células mortas, evidenciando a eficácia da terapia fotodinâmica em células da linhagem OSCC-09.

Um segundo ensaio foi realizado com intuito de validar a influência da concentração de PGLD-Chl-a na eficiência do tratamento. O resultado deste ensaio está ilustrado na Figura 8.26, onde também pode-se diferenciar a eficiência do PGLD-Chl-a com e sem a aplicação do laser.

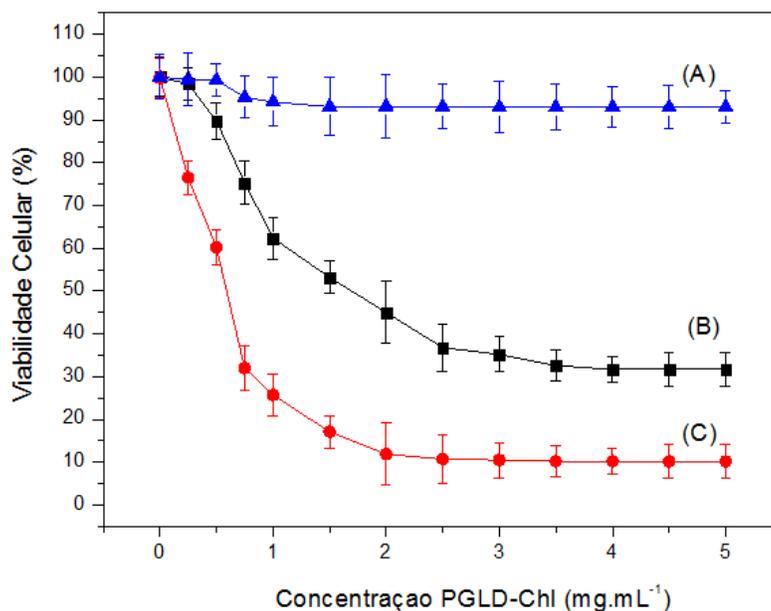


Figura 8.26 – Influência da concentração do PGLD-Chl na viabilidade celular considerando-se o tempo de irradiação: 3 min (B) e 10 min (C). Em (A) representa-se o grupo controle (escuro).

Através da análise da Figura 8.26 pode-se observar que quanto maior a concentração do PGLD-Chl-a menor é a sobrevivência das células, mais uma vez indicando que a eficiência do tratamento é diretamente proporcional à concentração de PGLD-Chl-a. Também nota-se a diminuição da sobrevivência no grupo de células em que o laser foi aplicado. Assim com apenas três minutos de aplicação do laser já acontece a redução das células viáveis em relação ao tratamento sem o laser, e uma redução ainda maior com dez minutos de aplicação do laser, comprovando que eficiência da terapia é dependente da aplicação do laser.

A apoptose é um mecanismo de morte celular presente nas neoplasias malignas e tem sido frequentemente associada à progressão tumoral. Vários agentes quimioterápicos são desenvolvidos atualmente para induzir a morte celular por apoptose no tratamento do câncer [170,171].

É fato reconhecido pela literatura que a TFD pode induzir a morte celular por apoptose ou necrose, ou uma combinação desses dois mecanismos [172–174].

Com a finalidade específica de se avaliar a presença de células SCC9 em apoptose foi utilizado o método TUNEL. Nessa técnica, a quebra do DNA presente no processo de apoptose, origina fragmentos de DNA que podem ser identificados por marcação das terminações 3'-OH livres, através de uma reação enzimática que catalisa a incorporação de nucleotídeos modificados (marcados com fluoresceína). Foram realizados três réplicas do ensaio de TUNEL. Em cada análise, foram contabilizados os núcleos TUNEL-positivos, num total de 90 células. A microscopia de fluorescência foi utilizada na análise do teste de TUNEL, uma vez que a marcação com DAPI permitiu relacionar quantitativamente a morfologia nuclear com os sinais positivos de apoptose. A percentagem de células apoptóticas foi calculada considerando-se a razão entre o número de células com núcleos apoptóticos e o número de células totais. Os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 8.27 e 8.28.

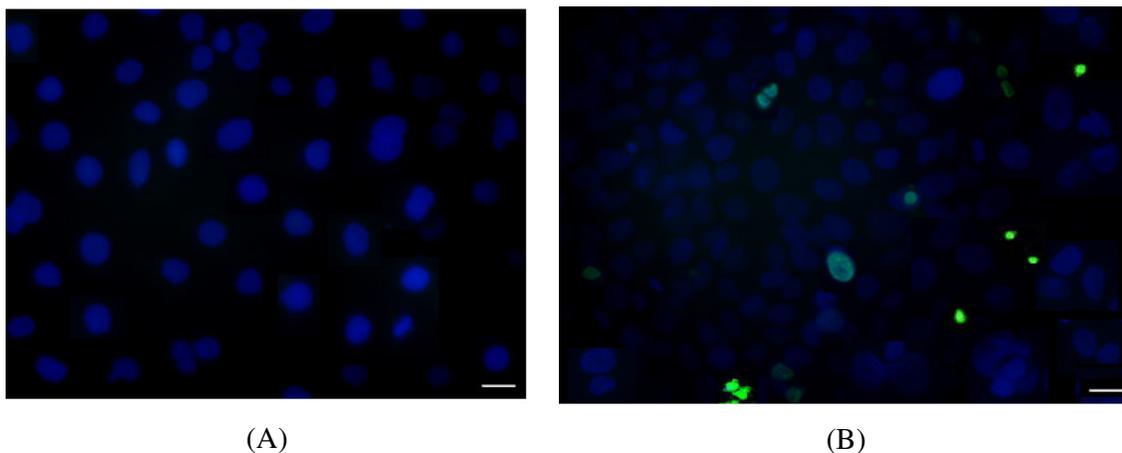


Figura 8.27- Análise de marcação TUNEL-positiva (fluorescência verde) de fragmentos nucleares correspondentes a corpos apoptóticos no grupo controle, PGLD-Chl no escuro (A) e após exposição ao laser por 3 minutos (B). As células viáveis estão em azul. Barra de escala=10 μ m.

O aumento da percentagem de núcleos apoptóticos com a dose de PGLD-Chl-a e o tempo de exposição ao laser está ilustrado na Figura 8.27. Pode ser observado que a percentagem de sinais apoptóticos nas células após irradiação com o laser foi significativamente mais elevada do que nas células aderentes.

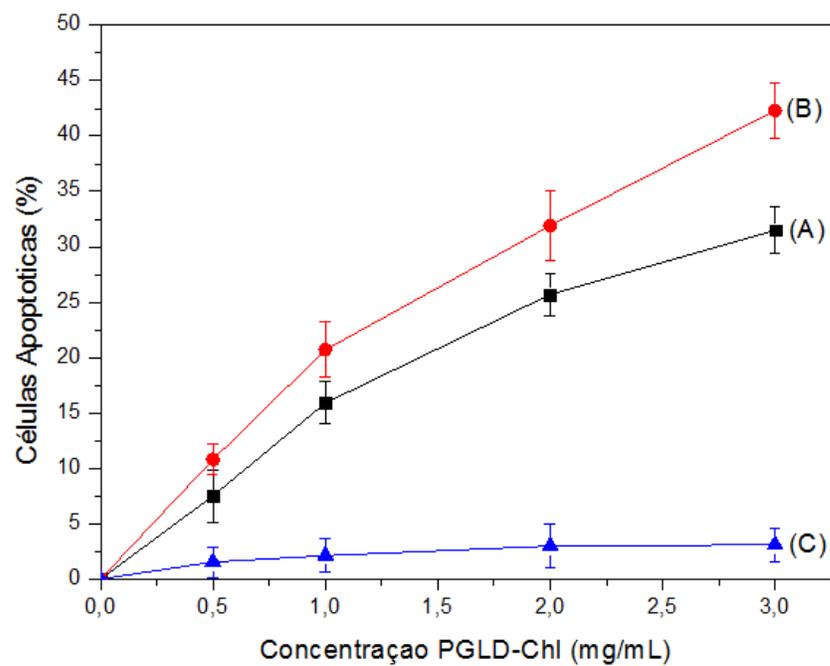


Figura 8.28. Relação entre a porcentagem de células apoptóticas e a concentração de PGLD-Chl-a considerando a irradiação com laser por 3 min (A) e 10 min (B). O grupo controle, células contendo PGLD-Chl-a no escuro são representadas em (C).

Capítulo 9. Conclusões

Neste trabalho foi realizado o estudo das propriedades físico-químicas e biológicas dos dendrímero de PGLD-Chl-a, buscando identifica-lo como agente fotossensibilizador para a terapia fotodinâmica. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a) Os métodos físico-químicos de análise indicaram que o acoplamento químico entre a clorofila e o PGLD foi atingido com sucesso em um nível bom de rendimento.
- b) O acoplamento da clorofila ao PGLD não altera significativamente suas características óticas, mantendo a absorção em aproximadamente 660nm, considerado adequado para a “janela fototerapêutica” da TFD.
- c) Os resultados da análise térmica indicaram que a estabilidade térmica do sistema PGLD-Chl-a é significativamente superior à temperatura corpórea, permitindo sua utilização com segurança na TFD, levando em consideração a potência dissipada pelo laser.
- d) A temperatura de transição vítrea do conjugado PGLD-Chl-a está muito abaixo da temperatura ambiente, indicando que o material poderia ser utilizado em formulações injetáveis.
- e) Os estudos de simulação computacional apontam que o PGLD-Chl-a é uma molécula hidrofílica, ideal para o direcionamento do conjugado para as células alvo. Tais características são adequadas para a TFD uma vez que diminui os efeitos colaterais associados à solubilidade do fotossensibilizador.
- f) Os ensaios *in vitro* indicaram que o sistema PGLD-Chl-a apresentou atividade citotóxica significativa contra linhagens celulares de carcinoma epidermóide de língua humano (SCC9).
- g) Os resultados das análises físico-química e biológica sugerem que o conjugado PGLD-Chl-a pode contribuir para a TFD de carcinomas epidermóide de cabeça e pescoço (SCC9) atuando como um eficiente fotossensibilizador. Entretanto, estudos posteriores são necessários com o objetivo de se avaliar a nível molecular a atuação do PGLD-Chl-a na redução/eliminação do tumor.

Capítulo 10. Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o sistema PGLD-Chl-a apresenta grandes perspectivas interessantes quanto à sua utilização no tratamento de carcinomas da cavidade oral e pescoço. Entretanto, para que a inativação fotodinâmica possa ser utilizada com sucesso, estudos são necessários para aperfeiçoar o processo a fotoinativação pelo PGLD-Chl-a. Essas investigações poderão indicar a escolha adequada do tipo de forma tópica e local, tempo em contato com os tecidos do paciente, a fim de não comprometer suas células normais. Para tanto, as seguintes perspectivas podem ser apontadas:

- 1) A utilização da TFD envolve necessariamente a padronização de protocolos clínicos e experimentais, estabelecendo condições ideais para a aplicação do agente fotossensibilizador no paciente. Nesse caso, é necessário validar-se a concentração do fotossensibilizador, dose de luz e seu fracionamento, intervalo de tempo entre a administração do agente fotossensibilizador e a iluminação. Sob esse aspecto, é importante, como perspectiva futura; avaliar a eficiência do sistema PGLD-Chl-a sob as perspectivas de validação anteriormente apontadas.
- 2) Apesar de ser uma terapia local, a TFD envolvendo o laser de baixa potência pode gerar alterações sistêmicas e promover variações significativas dos valores das proteínas séricas. Portanto, é importante estudar a influência das proteínas séricas na atividade fotodinâmica do sistema PGLD-Chl-a.
- 3) Atualmente a relação entre a inflamação crônica e o aparecimento do câncer é comprovado por vários trabalhos científicos. Por sua vez, os processos inflamatórios aumentam a permeabilidade capilar, causando a diminuição dos níveis da albumina sérica, alterando a permeabilidade vascular. Sob esse aspecto, é importante o estudo da influência da albumina na eficiência da TFD com o sistema PGLD-Chl-a.
- 4) Alguns trabalhos envolvendo a irradiação de pacientes portadores de artrite reumatoide com laser de baixa potência sugerem a formação de complexos imunes através da agregação plaquetária. Torna-se necessário, portanto; o estudo da influência da TFD utilizando o sistema PGLD-Chl-a sobre os níveis de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) avaliando a possibilidade de modulação imune do sistema biológico pela ação de ambos, laser e PGLD-Chl-a.
- 5) A resistência celular após o tratamento do câncer é um fator crítico devido a alterações genéticas específicas que surgem nas células neoplásicas após o

tratamento da neoplasia. Vários estudos foram realizados com o objetivo de se esclarecer os mecanismos celulares e genéticos envolvidos através das características citotóxicas induzidas pela TFD. Relatos sobre a utilização da TFD no tratamento de tumores de mama apontam que após a terapia ocorreu um aumento significativo da resistência celular acompanhado de um aumento do volume celular, aumento de fibroblasto, diferenças na adesão celular e na capacidade da célula de sofrer metástase. Uma vez que a TFD induz altos níveis de citotoxicidade, é esperado que essa terapia apresente um impacto significativo no padrão da expressão gênica. Ao mesmo tempo, é pouco conhecida a atividade gênica global em tumores, particularmente quando o stress oxidativo torna-se excessivo, como no caso da TFD. Sob esse aspecto, é importante desenvolver estudos futuros a respeito de alterações na expressão de genes/proteínas críticas pertencentes a vias metabólicas específicas nos tecidos submetidos a TFD com intuito de descobrir marcadores relacionados com recidiva tumoral.

- 6) Desenvolver estudos sobre os mecanismos celulares da TFD com PGLD-Chl-a pela associação das técnicas PCR- quantitativo em tempo real, imunohistoquímica e análise morfológica do tecido.
- 7) Investigar os mecanismos e as alterações nos componentes das vias apoptóticas induzidas pela TFD do sistema PGLD-Chl-a.

Referências Bibliográficas

- [1] **Estimativa 2012 Incidência de cancer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 6 jul. 2012.
- [2] LEE, W.-Y. et al. Photoactivation of pheophorbide a induces a mitochondrial-mediated apoptosis in Jurkat leukaemia cells. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 75, n. 3, p. 119–26, doi:10.1016/j.jphotobiol.2004.05.005, 2004.
- [3] BABILAS, P. et al. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 26, n. 3, p. 118–32, doi:10.1111/j.1600-0781.2010.00507.x, 2010.
- [4] WAINWRIGHT, M. “Safe” photoantimicrobials for skin and soft-tissue infections. **International journal of antimicrobial agents**, v. 36, n. 1, p. 14–8, doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.03.002, 2010.
- [5] WAINWRIGHT, M. e BAPTISTA, M. S. The application of photosensitisers to tropical pathogens in the blood supply. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 8, n. 3, p. 240–8, doi:10.1016/j.pdpdt.2011.04.001, 2011.
- [6] AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–81, doi:10.3322/caac.20114, 2011.
- [7] SACZKO, J. et al. The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. **Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society**, v. 43, n. 3, p. 129–32, 2005.
- [8] KUDINOVA, N. V. e BEREZOV, T. T. Photodynamic therapy of cancer: Search for ideal photosensitizer. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 95–103, doi:10.1134/S1990750810010129, 2010.
- [9] FERREIRA, J. **Análise Da Necrose Em Tecidos Normais Fotossensibilizados Pós Terapia Fotodinâmica - Estudo In Vivo**. Universidade de São Paulo - [S.l.]. 2003.
- [10] PERVAIZ, S. e OLIVO, M. *Frontiers in Research Review : Cutting-Edge Molecular Approaches to Therapeutics*. n. October 2005, p. 551–556, 2006.
- [11] SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869–80, 2000.
- [12] GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 6, p. 138–163, doi:10.1016/0022-2852(61)90236-3, 1961.
- [13] PALE, V. **Improving the optical properties of chlorophyll aggregates with supramolecular design**. Aalto University - School of Electrical Engineering - [S.l.]. 2011.

- [14] PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 2, p. 259–68, doi:10.1007/s10103-008-0539-1, 2009.
- [15] SILVA, A. R. P. Da. **Estudo Das Propriedades Bioquímicas De Sistemas Poliméricos Arborescentes Pglid-Aas Para O Tratamento Do Câncer**. Universidade Federal de Itajuba - [S.l.]. 2008.
- [16] MOURA, R. M. **Avaliação Do Potencial Citotóxico E Antitumoral Do Dendrímero De Políglicerol Salicilado Em Diferentes Linhagens Celulares**. Universidade Federal de Itajuba - [S.l.]. 2011.
- [17] LEITE, J. F. **Propriedades Hemocompatíveis Do Dendrímero Bioativo De Políglicerol Conjugado Com Estreptoquinase**. UNiversidade Federal de Itajuba - [S.l.]. 2008.
- [18] LICHTENTHALER, H. K. et al. Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 25, n. 4, p. 297–308, doi:10.1007/BF01214643, 1986.
- [19] LICHTENTHALER, H. K. et al. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. **Photosynthesis Research**, v. 2, n. 2, p. 115–141, doi:10.1007/BF00028752, 1981.
- [20] SEYBOLD, A. e EGGLE, K. Light field and leaf pigments I. **Planta**, v. 26, p. 491–515, 1970.
- [21] KRAUSE, G. H. e WEIS, E. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. **Photosynthesis Research**, v. 5, n. 2, p. 139–157, doi:10.1007/BF00028527, 1984.
- [22] KRAUSE, G. H. e WEIS, E. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 313–349, doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.001525, 1991.
- [23] **Instituto Nacional do Câncer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 5 jul. 2013.
- [24] **As 20 doenças que mais matam no Brasil**. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/brasil/noticias/as-20-doencas-que-mais-matam-no-brasil#1>>. Acesso em: 6 jul. 2013.
- [25] **Instituto Nacional do Câncer - Tratamento do câncer de boca**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324>. Acesso em: 8 nov. 2013.
- [26] VOLPATO, L. E. R. et al. Mucosite bucal rádio e quimioinduzida. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 4, p. 562–568, doi:10.1590/S0034-72992007000400017, 2007.
- [27] SILVA, R. C. Da. **Avaliação Da Eficiência Fotodinâmica De Fotossensibilizadores Com Aplicação Em Terapia Fotodinâmica**. Universidade de São Paulo - [S.l.]. 2007.

- [28] CUTSEM, E. VAN e ARENDS, J. The causes and consequences of cancer-associated malnutrition. **European journal of oncology nursing : the official journal of European Oncology Nursing Society**, v. 9 Suppl 2, p. S51–63, doi:10.1016/j.ejon.2005.09.007, 2005.
- [29] IVANA GRIVICICH; ANDRÉA REGNER; ADRIANA BRONDANI DA ROCHA. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.
- [30] ZIEGLER, U. Morphological Features of Cell Death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 124–128, doi:10.1152/nips.01519.2004, 2004.
- [31] TRIESSCHEIJN, M. et al. Photodynamic therapy in oncology. **The oncologist**, v. 11, n. 9, p. 1034–44, doi:10.1634/theoncologist.11-9-1034, 2006.
- [32] SETÚBAL, C. A. **Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica**. Universidade Federal do Paraná - [S.l.]. 2007.
- [33] MACHADO, A. E. da H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial De Aplicação E Perspectivas. **QUÍMICA NOVA**, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- [34] USUDA, J. et al. Photodynamic Therapy (PDT) for Lung Cancers. v. 1, n. 5, p. 6–7, 2006.
- [35] ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27–42, doi:10.1016/S1572-1000(04)00007-9, 2004.
- [36] BRAICHOTTE, D. R. et al. Optimizing light dosimetry in photodynamic therapy of early stage carcinomas of the esophagus using fluorescence spectroscopy. **Lasers in surgery and medicine**, v. 19, n. 3, p. 340–6, doi:10.1002/(SICI)1096-9101(1996)19:3<340::AID-LSM10>3.0.CO;2-8, 1996.
- [37] PRASAD, P. N. **Introduction to Biophotonics**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [38] KANO, A. et al. Tumor delivery of Photofrin® by PLL-g-PEG for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 1, n. 1, p. 27–42, doi:10.1016/j.jconrel.2013.02.016, 2013.
- [39] GOLDSTEIN, J. L. et al. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. **Annual review of cell biology**, v. 1, p. 1–39, doi:10.1146/annurev.cb.01.110185.000245, 1985.
- [40] HAMBLIN, M. R. e LUKE NEWMAN, E. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–8, doi:10.1016/S1011-1344(94)80018-9, 1994.
- [41] VALEUR, B. **Molecular Fluorescence**. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. v. 8

- [42] SANTOS, L. C. **Fotodegradação De Polímeros Solúveis Em Água E Moléculas Modelo Via Processos Oxidativos Avançados**. Universidade de São Paulo - [S.l.]. 2008.
- [43] CAL, L. R. **Síntese de bisporfirinas contendo o espaçador 2,2'-bipiridina: modelos na elaboração de sensores luminescentes de íons metálicos**. Universidade de São Paulo - [S.l.]. 2008.
- [44] MOORE, W. J. **Físico-Química**. São Paulo: Edgar Blucher, 1976. p. 496
- [45] SOUZA, C. F. De. **Desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos para determinação de picoxistrobina e piraclostrobina por cromatografia eletrocínica capilar micelar e de enrofloxacina por fosforimetria em temperatura ambiente**. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - [S.l.]. 2008.
- [46] MOAN, J. et al. Photobleaching Of Protoporphyrin Ix In Cells Incubated With 5-Aminolevulinic Acid. **International Journal of Cancer**, v. 70, n. 1, p. 90–97, 1997.
- [47] GRECCO, C. **Avaliação Da Resposta Fotodinâmica Em Fígado Normal De Ratos Utilizando Fonte De Luz Pulsada No Regime De Femtossegundos**. Universidade de São Paulo - [S.l.]. 2009.
- [48] KESSEL, D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. **Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 1, n. 11, p. 837–40, 2002.
- [49] BONNETT, R. e BERENBAUM, M. C. HPD - a study of its components and their properties. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 160, p. 241–50, 1983.
- [50] BONNETT, R. et al. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. **The Biochemical journal**, v. 261, n. 1, p. 277–80, 1989.
- [51] KANO, A. et al. Tumor delivery of Photofrin® by PLL-g-PEG for photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, p. 253–262, doi:10.1016/j.jconrel.2013.02.016, 2013.
- [52] BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 19, doi:10.1039/cs9952400019, 1995.
- [53] MANG, T. S. Dosimetric concepts for PDT. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 5, n. 3, p. 217–23, doi:10.1016/j.pdpdt.2008.09.006, 2008.
- [54] MORGAN, A. R. et al. New photosensitizers for photodynamic therapy: combined effect of metalloporphyrin derivatives and light on transplantable bladder tumors. **Cancer research**, v. 48, n. 1, p. 194–8, 1988.
- [55] O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M. e BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic

therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053–74, doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x, 2009.

[56] NATAL, A. M. D. **Influência Do Ph Na Interação Do Photofrin®, Photogem® E Photosan® Com Dmpc E Lipoproteína De Baixa Densidade**. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - [S.l.]. 2006.

[57] OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1–18, doi:10.1016/S1011-1344(96)07428-3, 1997.

[58] FOOTE, C. S. Definition Of Type I And Type Ii Photosensitized Oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659–659, doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x, 1991.

[59] BERGAMINI, C. et al. Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 14, p. 1611–1626, doi:10.2174/1381612043384664, 2004.

[60] SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M. e LIER, J. E. VAN. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. **Methods in enzymology**, v. 319, p. 376–400, 2000.

[61] HALLIWELL, B. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. **Medical biology**, v. 62, n. 2, p. 71–7, 1984.

[62] GIL, V. M. S. **Orbitais Em Atomos E Moleculas**. [S.l: s.n.], 1996.

[63] ITO, T. Cellular And Subcellular Mechanisms Of Photodynamic Action: The O₂ Hypothesis As A Driving Force In Recent Research. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, n. 4-5, p. 493–506, doi:10.1111/j.1751-1097.1978.tb06957.x, 1978.

[64] DEROSA, M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233-234, p. 351–371, doi:10.1016/S0010-8545(02)00034-6, 2002.

[65] A. KAROTKI, M. KRUK, M. DROBIZHEV, A. REBANE, E. NICKEL, C. W. S. Efficient singlet oxygen generation upon two-photon excitation of new porphyrin with enhanced nonlinear absorption. **IEEE Journal of In Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 7, 2001.

[66] JUZENIENE, A.; NIELSEN, K. P. e MOAN, J. Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 7–28, doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v25.i1-2.20, 2006.

[67] NIEDRE, M.; PATTERSON, M. S. e WILSON, B. C. Direct Near-infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic Therapy in Cells In Vitro and Tissues In Vivo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 4, p. 382–391, doi:10.1562/0031-8655(2002)0750382DNILDO2.0.CO2, 2002.

[68] EVENSEN, J. F. The use of porphyrins and non-ionizing radiation for treatment of cancer. **Acta oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 34, n. 8, p. 1103–10, 1995.

- [69] KONOPKA, K. e GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal of dental research**, v. 86, n. 8, p. 694–707, 2007.
- [70] HENDERSON, B. W. e DOUGHERTY, T. J. How Does Photodynamic Therapy Work? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145–157, doi:10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x, 1992.
- [71] NIEMZ, Gm. H. **Laser–tissue interactions: fundamentals and applications, 2nd Edition**. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2004. v. 42
- [72] CASTANO, A. P.;; DEMIDOVA, T. N. e HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4, 2004.
- [73] CASTANO, A. P.;; DEMIDOVA, T. N. e HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4, 2004.
- [74] **PHOTODYNAMIC THERAPY DOSIMETRY: A Task Group Report Of The General Medical Physics Committee Of The Science Council**. [S.l.]: American Association of Physicists in Medicine by Medical Physics Publishing, 2005.
- [75] WILSON, B. D. Photodynamic Therapy for the Treatment of Basal Cell Carcinoma. **Archives of Dermatology**, v. 128, n. 12, p. 1597, doi:10.1001/archderm.1992.04530010035004, 1992.
- [76] MOSELEY, H. Total effective fluence: a useful concept in photodynamic therapy. **Lasers In Medical Science**, v. 11, n. 2, p. 139–143, doi:10.1007/BF02133211, 1996.
- [77] SOARES, R. R. da S. **Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. Universidade Estadual de Maringá - [S.l.]. 2006.
- [78] STEELE, C. C. Recent Progress in Determining the Chemical Structure of Chlorophyll. **Chemical Reviews**, v. 20, n. 1, p. 1–39, doi:10.1021/cr60065a001, 1937.
- [79] WILLOWS, R. D. et al. Structure of Chlorophyll f. **Organic letters**, n. 7, p. 2012–2014, doi:10.1021/ol400327j, 2013.
- [80] STREIT, N. M. et al. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.
- [81] VANZ, G. **Preparação E Caracterização De Filmes De Blendas De Quitosana/Poli(Álcool Vinílico) Incorporados Com Clorofilina Cúprica De Sódio**. Universidade Federal de Santa Catarina - [S.l.]. 2010.
- [82] BEVILAQUA, R. C. A. **Modelagem Molecular de Nanotubos de Carbono e Porfirinas como Nanosensores de Gases: uma abordagem de primeiros princípios**. Centro Universitário Franciscano de Santa Maria-RS - [S.l.]. 2010.

- [83] SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 11, p. 361–371, doi:10.1016/S0924-2244(02)00182-6, 2002.
- [84] MOREIRA, L. M. et al. Influência de diferentes sistemas de solvente água-etanol sobre as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila α . **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 258–262, doi:10.1590/S0100-40422010000200005, 2010.
- [85] LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 227–242, doi:10.1590/S1516-93322003000300003, 2003.
- [86] BJÖRN, L. O. et al. A viewpoint: why chlorophyll a? **Photosynthesis research**, v. 99, n. 2, p. 85–98, doi:10.1007/s11120-008-9395-x, 2009.
- [87] GIOVANNETTI, R. **The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins**. University of Camerino - [S.l.]. [S.d.].
- [88] MINORIN, T. S. **Estudo comparativo da oxigenação de hidrocarbonetos com ferroclorinas e ferroporfirinas como catalisadores em meio homogêneo e heterogeneizados**. Univerisade de São Paulo - [S.l.]. 2008.
- [89] STRACHAN, J. et al. Rational Synthesis of Meso-Substituted Chlorin Building Blocks. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 65, n. 10, p. 3160–3172, doi:10.1021/jo991942t, 2000.
- [90] WEISS, C.; KOBAYASHI, H. e GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 16, n. 2, p. 415–450, doi:10.1016/0022-2852(65)90132-3, 1965.
- [91] HOUSSIER, C. e SAUER, K. Circular dichroism and magnetic circular dichroism of the chlorophyll and protochlorophyll pigments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 92, n. 4, p. 779–791, doi:10.1021/ja00707a007, 1970.
- [92] GEROLA, A. P. **Estudos Físico-Químicos de Derivados de Clorofila em Sistemas Homogêneos e Micro-Heterogêneos: Aspectos Fotofísicos, Fotodinâmicos e Fotoinativantes sobre Micro- Organismos**. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - [S.l.]. 2010.
- [93] VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. 1 edition ed. [S.l.]: Wiley-VCH, 2001. v. 8
- [94] BRODY, S. S. e RABINOWITCH, E. Excitation lifetime of photosynthetic pigments in vitro and in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 125, n. 3247, p. 555, 1957.
- [95] TÜRK, H. et al. Water-soluble dendritic core-shell-type architectures based on polyglycerol for solubilization of hydrophobic drugs. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 13, n. 15, p. 4187–96, doi:10.1002/chem.200601337, 2007.

- [96] GUPTA, U. et al. Dendrimers: novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 3, p. 649–58, doi:10.1021/bm050802s, 2006.
- [97] TOMALIA, D. A. Birth of a New Macromolecular Architecture: Dendrimers as Quantized Building Blocks for Nanoscale Synthetic Organic Chemistry. **Aldrichimica Acta**, v. 37, n. 2, 2004.
- [98] KLAJNERT, B. e BRYSEWSKA, M. Dendrimers: properties and applications. **Acta biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 199–208, 2001.
- [99] LIU, M.; KONO, K. e FRÉCHET, J. M. Water-soluble dendritic unimolecular micelles: their potential as drug delivery agents. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 65, n. 1-2, p. 121–31, 2000.
- [100] KOJIMA, C. et al. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs. **Bioconjugate chemistry**, v. 11, n. 6, p. 910–7, 2000.
- [101] SVENSON, S. e TOMALIA, D. A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 102–115, doi:10.1016/j.addr.2012.09.030, 2012.
- [102] CAMINATI, G.; TURRO, N. J. e TOMALIA, D. A. Photophysical investigation of starburst dendrimers and their interactions with anionic and cationic surfactants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 23, p. 8515–8522, doi:10.1021/ja00179a041, 1990.
- [103] WOLINSKY, J. B. e GRINSTAFF, M. W. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 9, p. 1037–55, doi:10.1016/j.addr.2008.02.012, 2008.
- [104] TOMALIA, D. A. et al. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. **Macromolecules**, v. 19, n. 9, p. 2466–2468, doi:10.1021/ma00163a029, 1986.
- [105] NEWKOME, G. R. et al. Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2003–2004, doi:10.1021/jo00211a052, 1985.
- [106] HAWKER, C. J. e FRECHET, J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 21, p. 7638–7647, doi:10.1021/ja00177a027, 1990.
- [107] ALLEN, T. M. e CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science (New York, N.Y.)**, v. 303, n. 5665, p. 1818–22, doi:10.1126/science.1095833, 2004.
- [108] BONDUELLE, C. V. e GILLIES, E. R. Dendritic Guanidines as Efficient Analogues of Cell Penetrating Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 3, p. 636–666, doi:10.3390/ph3030636, 2010.

- [109] PATRI, A. K.; KUKOWSKA-LATALLO, J. F. e BAKER, J. R. **Targeted drug delivery with dendrimers: comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex.** *Advanced drug delivery reviews*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16290254>>, 2005.
- [110] OOYA, T. et al. Self-assembly of cholesterol-hydrotropic dendrimer conjugates into micelle-like structure: Preparation and hydrotropic solubilization of paclitaxel. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 6, n. 5, p. 452–456, doi:10.1016/j.stam.2005.01.006, 2005.
- [111] BLAU, L.; FARINA, R. e CHIN, M. Pró-Fármaco Ativado Por Enzima, Uma Estratégia Promissora Na Quimioterapia. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1307–1317, 2006.
- [112] IYER, A. K. et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug discovery today**, v. 11, n. 17-18, p. 812–8, doi:10.1016/j.drudis.2006.07.005, 2006.
- [113] QUINTANA, A. et al. Design and Function of a Dendrimer-Based Therapeutic Nanodevice Targeted to Tumor Cells Through the Folate Receptor. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 9, p. 1310–1316, 2002.
- [114] KONO, K.; LIU, M. e FRÉCHET, J. M. J. Design of Dendritic Macromolecules Containing Folate or Methotrexate Residues. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 1115–1121, doi:10.1021/bc990082k, 1999.
- [115] SIEGMAN, A. E. **Lasers**. Primeira ed. [S.l.]: University Science Books, 1986.
- [116] RIBEIRO, M. S. **Interação Da Radiação Laser Linearmente Polarizada De Baixa Intensidade Com Tecidos Vivos: Efeitos Na Aceleração De Cicatrização Tissular Em Lesões De Pele.** Universidade de São Paulo - [S.l.]. 2000.
- [117] HITZ, C. B.; EWING, J. e HECHT, J. **Introduction to Laser Technology**. 3. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2004.
- [118] HAKEN, H. **Laser Light Dynamics**. Primeira ed. [S.l.]: North Holland, 1986.
- [119] RENDIC, S. e PETER GUENGERICH, F. Summary of Information on the Effects of Ionizing and Non-ionizing Radiation on Cytochrome P450 and Other Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 6, p. 787–814, doi:10.2174/138920012800840356, 2012.
- [120] DALLAN, L. A. O. e OLIVEIRA, S. A. De. Cirurgia de revascularização transmiocárdica a laser de CO₂. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 15, n. 2, p. 89–104, 2000.
- [121] ENWEMEKA, C. S. et al. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. **Photomedicine and laser surgery**, v. 22, n. 4, p. 323–9, doi:10.1089/1549541041797841, 2004.

[122] FARIAS, V. H. A. **Análise da ação do Laser de Baixa Potência em pacientes com Dor Muscular portadores de Desordens Temporomandibulares empregando a Eletromiografia.** Universidade do Vale do Paraíba - [S.l.]. 2005.

[123] POTRICH, J. W. **Efeito da Irradiação Laser GaAlAs na Atividade Enzimática.** UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA - [S.l.]. 2008.

[124] **Dental surgical laser.** Disponível em: <<http://www.medicalexpo.com/prod/fondental/dental-surgical-lasers-67874-481366.html>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

[125] **Surgical CO2 laser.** Disponível em: <<http://www.medicalexpo.com/prod/kls-martin-group/surgical-co2-lasers-69026-446172.html>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

[126] QUEIRÓS, A. et al. Effect of pupil size on corneal aberrations before and after standard laser in situ keratomileusis, custom laser in situ keratomileusis, and corneal refractive therapy. **American journal of ophthalmology**, v. 150, n. 1, p. 97–109.e1, doi:10.1016/j.ajo.2010.02.003, 2010.

[127] NJOO, M. D.; VODEGEL, R. M. e WESTERHOF, W. Depigmentation therapy in vitiligo universalis with topical 4-methoxyphenol and the Q-switched ruby laser. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 5, p. 760–769, doi:10.1067/mjd.2000.103813, 2000.

[128] MANG, T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 43–48, doi:10.1016/S1572-1000(04)00012-2, 2004.

[129] ALLISON, R. R. et al. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy--state of the art review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 5, n. 1, p. 19–28, doi:10.1016/j.pdpdt.2008.02.001, 2008.

[130] PANJEHPOUR, M.; OVERHOLT, B. F. e HAYDEK, J. M. Light sources and delivery devices for photodynamic therapy in the gastrointestinal tract. **Gastrointestinal endoscopy clinics of North America**, v. 10, n. 3, p. 513–32, 2000.

[131] NEISES, B. e STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 17, n. 7, p. 522–524, doi:10.1002/anie.197805221, 1978.

[132] PORRA, R. J.; THOMPSON, W. a. e KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384–394, doi:10.1016/S0005-2728(89)80347-0, 1989.

[133] WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2, 1994.

[134] BARREIRO, E. J. e FRAGA, C. A. M. A QUESTÃO DA INOVAÇÃO EM FÁRMACOS NO BRASIL: PROPOSTA DE CRIAÇÃO DO PROGRAMA NACIONAL DE FÁRMACOS (PRONFAR). **Química Nova**, v. 28, p. 56–63, 2005.

[135] **Computational Chemistry for Drug Discovery and Materials Research**. Disponível em: <<http://www.sgi.com/solutions/research/chemistry.html>>. Acesso em: 17 nov. 2013.

[136] COATES, J. **Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach**. [S.l.]: J. Wiley & Sons, Ltd., 2000. p. 10815–10837

[137] GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. 2. ed. Londres: Academic Press, 1965.

[138] DIKIO, E. D. e ISABIRYE, D. A. Isolation Of Chlorophyll A From Spinach Leaves. **Chemical Society of Ethiopia**, v. 22, n. 2, p. 301–304, 2008.

[139] **UV-visible spectroscopy**. Disponível em: <http://www.kayelaby.npl.co.uk/chemistry/3_8/3_8_7.html>. Acesso em: 9 jul. 2013.

[140] **FTIR Interpretation**. Disponível em: <<http://www.corrosionlab.com/facilities/ftir-interpretation.htm>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

[141] KISSINGER, H. E. Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1702–1706, doi:10.1021/ac60131a045, 1957.

[142] KISSINGER, H. E. Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1702–1706, doi:10.1021/ac60131a045, 1957.

[143] ZHANG, B. et al. The steric effect of aromatic pendant groups and electrical bistability in π -stacked polymers for memory devices. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 14, n. 13, p. 4640–50, doi:10.1039/c2cp23953a, 2012.

[144] IONASHIRO, M. **Giolito: Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Giz Editorial, 2005.

[145] **Análise Instrumental Aplicada a Dendrímeros**. Disponível em: <http://chasqueweb.ufrgs.br/~ruth.santana/analise_instrumental/aula2l.html>. Acesso em: 12 nov. 2013.

[146] MILLER, T. M. et al. Synthesis and characterization of a series of monodisperse, 1,3,5-phenylene-based hydrocarbon dendrimers including C276H186 and their fluorinated analogs. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 3, p. 1018–1025, doi:10.1021/ja00029a034, 1992.

[147] BOSMAN, A. W. **Dendrimers in Action Structure, Dynamics, and Functionalization of Poly(propylene imine) Dendrimers**. Technische Universiteit Eindhoven - [S.l.]. 1999.

- [148] MACOLLUNCO, O. S. C. **Estudo das Propriedades Dinâmicas e Estruturais do Gálio Líquido Super-Resfriado através de Simulações Atomísticas**. Universidade Estadual de Campinas - [S.l.]. 2011.
- [149] GAO, C. e YAN, D. Hyperbranched polymers: from synthesis to applications. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 3, p. 183–275, doi:10.1016/j.progpolymsci.2003.12.002, 2004.
- [150] KIM, Y. H. e BECKERBAUER, R. Role of End Groups on the Glass Transition of Hyperbranched Polyphenylene and Triphenylbenzene Derivatives. **Macromolecules**, v. 27, n. 7, p. 1968–1971, doi:10.1021/ma00085a048, 1994.
- [151] DALL'AGNOL, F. F. **Universidade de São Paulo Instituto de Física de São Carlos Departamento de Física e Ciência dos Materiais Estudo da Influência do Volume Livre Sobre os Índices**. Universidade de São Paulo - [S.l.]. 2003.
- [152] LUCAS, E. F.;; SOARES, B. G. e MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. . [S.l.]: e-papers, 2001.
- [153] HOURANI, R.;; KAKKAR, A. e WHITEHEAD, M. a. Theoretical investigation of 3,5-dihydroxybenzylalcohol based dendrimer generations 1–5 using Molecular Mechanics (MM+) method and the PM3 Semi-Empirical Molecular Orbital Theory. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 807, n. 1-3, p. 101–107, doi:10.1016/j.theochem.2006.12.022, 2007.
- [154] ANNA, S. et al. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução Resumo Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 1, 2009.
- [155] SUENDO, V. et al. Ab initio calculation of UV-Vis absorption spectra of a single molecule chlorophyll a: Comparison study between RHF / CIS , TDDFT , and semi-empirical methods. v. XX, n. X, p. 1–17, [S.d.].
- [156] HEERDT, G. e MORGON, N. H. Validação Computacional De Métodos Compostos No Estudo De Propriedades Moleculares. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 868–873, 2011.
- [157] CHOW, H.;; SERLIN, R. e STROUSE, C. E. Crystal and molecular structure and absolute configuration of ethyl chlorophyllide a-dihydrate. Model for the different spectral forms of chlorophyll a. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 25, p. 7230–7237, doi:10.1021/ja00858a006, 1975.
- [158] BARKIGIA, K. M. et al. Models of photosynthetic chromophores: molecular structure of the bacteriochlorin (2,3,12,13-tetrahydro-5,10,15,20-tetraphenylporphinato)(pyridine)zinc(II). **Inorganic Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 2233–2236, doi:10.1021/ic00009a052, 1991.
- [159] LINNANTO, J. e KORPPI-TOMMOLA, J. Quantum chemical simulation of excited states of chlorophylls, bacteriochlorophylls and their complexes. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 8, n. 6, p. 663–87, doi:10.1039/b513086g, 2006.

- [160] TAVARES, L. C. QSAR: A Abordagem De Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2004.
- [161] SOUZA, E. S. et al. Estimating the octanol/water partition coefficient for aliphatic organic compounds using semi-empirical electrotopological index. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 10, p. 7250–64, doi:10.3390/ijms12107250, 2011.
- [162] VALENTINO, M. F. N. **Estudo Teórico da Relação Estrutura Atividade da Piperina e Seus Análogos à Inibição do Citocromo P450 Hepático**. Universidade Estadual de Goiás - [S.l.]. 2010.
- [163] HONORIO, T. da S. **Predição Da Biodisponibilidade E Correlação In Vitro – In Vivo Por Simulação Computacional De Diferentes Estudos De Dissolução Com Efavirenz**. Universidade Federal do Rio de Janeiro - [S.l.]. 2012.
- [164] HANSCH, C. Quantitative structure-activity relationships and the unnamed science. **Accounts of Chemical Research**, v. 26, n. 4, p. 147–153, doi:10.1021/ar00028a003, 1993.
- [165] GHOSE, A. K.;; VISWANADHAN, V. N. e WENDOLOSKI, J. J. Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods : An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods. v. 5639, n. 98, p. 3762–3772, 1998.
- [166] LI, S. et al. IV-IVC considerations in the development of immediate-release oral dosage form. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 94, n. 7, p. 1396–417, doi:10.1002/jps.20378, 2005.
- [167] KATRITZKY, A. et al. Structurally diverse quantitative structure--property relationship correlations of technologically relevant physical properties. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 40, n. 1, p. 1–18, 2000.
- [168] GEROLA, A. P. et al. Properties of chlorophyll and derivatives in homogeneous and microheterogeneous systems. **The journal of physical chemistry. B**, v. 115, n. 22, p. 7364–73, doi:10.1021/jp201278b, 2011.
- [169] TADDEI, E. B. et al. Ensaio de Citotoxicidade e Influência do Tratamento de Solubilização na Microestrutura da Liga Ti-35Nb-7Zr-5Ta para Potenciais Aplicações Ortopédicas. **Revista Matéria**, v. 5, n. 1992, p. 120–127, 2007.
- [170] NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 810–6, doi:10.1038/35037747, 2000.
- [171] LIU, Q. A. e HENGARTNER, M. O. The Molecular Mechanism of Programmed Cell Death in *C. elegans*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 887, n. 1, p. 92–104, doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07925.x, 2006.
- [172] OLEINICK, N. L.;; MORRIS, R. L. e BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1–21, doi:10.1039/b108586g, 2002.

[173] NOWIS, D. et al. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 339–352, 2005.

[174] BORTOLETTO, R. et al. Mitochondrial membrane potential after low-power laser irradiation. **Lasers in medical science**, v. 18, n. 4, p. 204–6, doi:10.1007/s10103-003-0281-7, 2004.