

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

**TESSA MARTINS DE CARVALHO CARNEIRO**

**POLIÉTERES ARBORESCENTES OTICAMENTE ATIVOS PARA A TERAPIA  
FOTODINÂMICA**

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

**TESSA MARTINS DE CARVALHO CARNEIRO**

**POLIÉTERES ARBORESCENTES OTICAMENTE ATIVOS PARA A TERAPIA  
FOTODINÂMICA**

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.

Itajubá  
2014

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

**TESSA MARTINS DE CARVALHO CARNEIRO**

**POLIÉTERES ARBORESCENTES OTICAMENTE ATIVOS PARA A TERAPIA  
FOTODINÂMICA**

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.**

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Alvaro A. A de Queiroz (Orientador)

Prof. Dr. Nirtonr Cristi Silva Vieira

Prof. Dr. Maurício Frota Saraiva

Itajubá

2014

*“A Química, dada sua essência, sua habilidade em criar e a beleza de seus objetos é, a um só tempo, uma arte e uma ciência. De fato, a Química molda novos mundos, que não existiriam antes que as mãos do químico os tivessem modelado, da mesma maneira que as mãos do escultor transforma seu trabalho em arte.”*

*Jean-Marie Lehn*

## Agradecimentos

Agradeço,

A Deus, por ter me dado a competência e as chances para chegar até aqui.

À Mônica, minha mãe, querida que me motiva a cada ligação e demonstração de carinho. Que me ajuda e me dá forças nos momentos difíceis e de dúvida. Obrigada por tudo mãe!

Ao meu orientador, Alvaro, pela paciência, por compartilhar sua sabedoria e principalmente pela motivação na e disposição para a continuidade de minha carreira.

Ao Zeus, meu amor, pela paciência infinita com os momentos de ausência ou stress. Pelo constante incentivo aos meus estudos e minha carreira.

À Luciana, companheira de trabalho, estudos, choros e risadas... Obrigada Lu, Você ajudou a tornar a jornada mais fácil!

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior, pela realização dos ensaios biológicos e á aluna de doutorado Renata Moura, por ter me recebido e auxiliado tão atenciosamente durante a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr . Marcelo Gonçalves Vivas pelos ensaios de absorção fotônica e auxílio no estudo das propriedades óticas não lineares.

À Bárbara, prima querida e bióloga, que com tanta paciência me ajudou a entender a biologia celular.

Aos amigos do laboratório de biomateriais da UNIFEI, pela amizade e por cada contribuição com este trabalho.

E finalmente a CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido.

## Sumário

Agradecimentos .....	iv
Índice de Figuras .....	viii
Índice de Tabelas .....	xi
Índice de Abreviações .....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
PREFÁCIO .....	xvi
CAPÍTULO 1 .....	1
1.1    Estado da Arte quanto à aplicação dos dendrímeros na medicina .....	1
1.1.1    Química supramolecular e suas aplicações na medicina .....	3
1.2    Dendrímero PGLD: um poliéter como supramolécula .....	10
1.2.1    Síntese de Dendrímeros .....	13
CAPÍTULO 2 - A TERAPIA FOTODINÂMICA .....	16
2.1    INTRODUÇÃO .....	16
2.2    Fundamentos da terapia fotodinâmica .....	17
2.2.1    Características do agente fotossensibilizador .....	18
2.2.2    Características da fonte de luz .....	19
2.3    O oxigênio molecular e a geração das espécies reativas de oxigênio .....	21
2.4    Transições eletrônicas e propriedades fotossensibilizadoras de moléculas na terapia fotodinâmica .....	22
2.5    A interação da luz com o tecido biológico .....	27
2.6    Rodamina B: características eletrônicas .....	28
CAPÍTULO 3 – CONCEITOS FUNDAMENTAIS SOBRE O CÂNCER .....	33
3.1    Introdução .....	33

3.2	A proliferação celular e o surgimento do câncer .....	33
3.3	Mecanismos de destruição do tumor pela terapia fotodinâmica.....	38
3.3.1	Morte celular por apoptose .....	40
3.3.2	Morte celular por necrose .....	41
CAPÍTULO 4 - OBJETIVOS .....		43
CAPÍTULO 5 – MATERIAIS E MÉTODOS .....		44
5.1	. Síntese e caracterização do PGLD .....	44
5.2	Síntese e caracterização do conjugado PGLD-g-RhB .....	53
5.2.1	Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	54
5.2.2	Análise por espectroscopia eletrônica (UV/Vis) e vibracional (FTIR) .....	55
5.2.3	Análise térmica (TG e DSC) .....	55
5.2.4	Absorção de dois fótons .....	56
5.2.5	Variação da hidrofobicidade.....	57
5.3	Ensaio Bioquímicos.....	57
5.3.1	Preparo da linhagem celular para cultura .....	58
5.3.2	Avaliação da citotoxicidade.....	59
5.3.3	Ensaio TUNEL .....	61
5.3.4	Determinação da atividade hemolítica .....	62
CAPÍTULO 6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....		63
6.1	Caracterização do conjugado PGLD-g-RhB.....	63
6.1.1	Imobilização da RhB no PGLD.....	63
6.1.2	Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	63
6.1.3	Espectroscopia eletrônica (UV-Vis).....	65
6.1.4	Análise termogravimétrica .....	67
6.1.5	Análise da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) .....	72
6.1.6	Análise das propriedades hidrofóbicas do PGLD.....	76
6.1.7	Análise das propriedades óticas não-lineares do PGLD-g-RhB.....	77
6.2	Análises bioquímicas do conjugado PGLD-g-RhB .....	80
6.2.1	Análise da citotoxicidade e fotoatividade.....	80
6.2.2	Ensaio de TUNEL .....	83
6.2.3	Determinação da atividade hemolítica .....	85
CAPÍTULO 7- CONCLUSÕES .....		87
CAPÍTULO 8– PERSPECTIVAS FUTURAS .....		88
CAPÍTULO 9 – REFERÊNCIAS .....		90





## Índice de Figuras

Figura 1.1 Representação das diferentes estruturas poliméricas que podem atuar como supramoléculas. ....	5
Figura 1.2 Representação geral de um surfactante. ....	6
Figura 1.3 Representações estruturais do corte da seção transversal das micelas circular (a) e reversa (b). ....	6
Figura 1.4 Representação estrutural da bicamada fosfolipídica. ....	7
Figura 1.5 Estrutura do PAMAM de geração 2 (G2), ilustrando a progressão do número de gerações do interior (núcleo) para a periferia. ....	9
Figura 1.6 Crescimento de dendrímeros de acordo com seu número de geração. Núcleo oligomérico em G0, primeira geração (G1) com apenas uma nova camada de monômeros, segunda geração (G2) com duas camadas de monômeros, terceira geração, (G3) com 3 camadas e quarta geração, (G4) com quatro camadas de monômeros acopladas. ....	11
Figura 1.7 Estrutura do PGLD de segunda geração. ....	12
Figura 1.8 Representação dos métodos da síntese de dendrímeros. ....	14
Figura 2.1. Esquema do tratamento de tumores através da TFD. ....	17
Figura 2.2. Estrutura do Photofrin®, agente fotossensibilizador de primeira geração e comercializado para o tratamento de pacientes com câncer. ....	19
Figura 2.3. Transição eletrônica entre os estados HOMO-LUMO. ....	23
Figura 2.4. Transições eletrônicas entre os estados HOMO-LUMO em função da funcionalidade presente na molécula. ....	23
Figura 2.5. Diagrama de Jablonski descrevendo as mudanças nos estados eletrônicos moleculares associados com a TFD. ....	26
Figura 2.6. Interação da luz laser com os tecidos biológicos: Reflexão, refração e absorção. ....	27
Figura 2.7. Estrutura molecular da RhB. ....	28
Figura 2.8. Estrutura da RhB: cation, (a) $RhB^+$ ; (b) zwitterion $RhB^\pm$ (b) ....	30
Figura 2.9. Espectros de absorção e emissão da RhB em etanol na concentração $10^{-4}$ M. Excitação foi efetuada a 510 nm. ....	31
Figura 3.1. Ciclo completo da celular de reprodução celular, representando a interfase em G1, S e G2 e seguido da mitose. ....	34
Figura 3.2. Representação dos centrossomos interligando microtubulos do fuso mitótico. ....	36

Figura 3.3. Mecanismos celulares ativados através ta TFD. Apoptose, necrose, destruição da microvasculatura que irriga as células e reposta imune gerada através do processo de inflamação. ....	39
Figura 3.4. Características morfológicas da apoptose e da necrose .....	40
Figura 5.1. Ilustração no da reação de obtenção núcleo oligomérico de PGL-10.....	44
Figura 5.2, Relação entre massa molecular (MM) e o número de desidratações (n) envolvidas no processo de oligomerização do glicerol.....	46
Figura 5.3. Espectro de ESI-MS obtido para o PGL-10.....	47
Figura 5.4. Ilustração do processo de síntese dos PGLD G = 1, 2, 3 e 4 . ....	48
Figura 5.5. Perfil cromatográfico CLAE do PGLD (G3) e dependência entre $t_r$ e o número de geração do PGLD. ....	49
Figura 5.6. Espectro RMN- $H^1$ e RMN- $C^{13}$ do PGLD.....	50
Figura 5.7 Análise por GPC dos dendrímeros.....	51
Figura 5.8 Equipamento para GPC da Waters, modelo 510, utilizado nesse trabalho.....	52
Figura 5.9 Ilustração do processo de síntese do PGLD utilizando a rota sintética de Williamson modificada e acoplamento de RhB na periferia do dendrímero. ....	54
Figura 5.10 Ilustração do ensaio de citotoxicidade com a aplicação de laser nos grupos selecionados.....	60
Figura 6.1. Incorporação da RhB no PGLD em função do número de gerações do dendrímero .....	63
Figura 6.2. Placas cromatográficas CCD para o PGLD (G= 0, 2 e 4) e PGLD-g-RhB (G = 0,2,4). ....	64
Figura 6.3. Comparação de RF para o PGLD (G = 0,2 e 4), PGLD-g-RhB e RhB obtidos na análise por CCD. ....	65
Figura 6.4. Espectro eletrônico (UV-Vis) do PGLD, PGLD-g-RhB e RhB .....	66
Figura 6.5. Análise termogravimétrica (TGA) dos dendrímeros PGLD G0, PGLD G2 e PGLD G4 (C) em atmosfera dinâmica de N <sub>2</sub> e velocidade de aquecimento de 10 °C/min. Em (D) está ilustrado as sobreposições das curvas TGA. ....	68
Figura 6.6. Análise termogravimétrica (TGA) dos conjugados PGLD-g-RhB de gerações: G0 , PGLD G2 e PGLD G4.....	69
Figura 6.7. Energia de ativação para a reação de degrada dos PGLD's em função do número de gerações. PGLD puro e PGLD-g-RhB. ....	71

Figura 6.8. Curva da temperatura em função da energia (entalpia) de um polímero .....	72
Figura 6.9. Curva DSC normalizadas do segundo aquecimento do PGLD, com razão de aquecimento de 10°C/min, sendo PGLD G0; PGLD G2; PGLD G4. ....	74
Figura 6.10. Curva DSC normalizadas do segundo aquecimento do PGLD-g-RhB.....	75
Figura 6.11. (A) Espectro de fluorescência do pireno na presença de solução etanólica de diferentes gerações do sistema PGLD/Rhb (G0, G2 e G4), (B) Relação entre $I_b/I_a$ para diferentes gerações do sistema PGLD-g-RhB.....	77
Figura 6.12. Espectro de absorção linear do PGLD G4 ( linha tracejada) e do PGLD-g-RhB (G4) em solução etanólica de concentração 10 <sup>-2</sup> mM. ....	78
Figura 6.13. Curvas obtidas a partir da técnica de varredura-Z para o PGLD-g-RhB em etanol a 700 nm e 750 nm. ....	79
Figura 6.14. Sinal de fluorescência induzida por processo de dois-fótons em função da potência do laser (escala log-log) para PGLD/Rhb em 700 nm. E a regressão linear. ....	79
Figura 6.15. Dependência entre a intensidade de fluorescência e o tempo para RhB (quadrados) e PGLD-g-RhB (círculos) obtidos utilizando laser com pulsos de 70 picossegundos e excitação em 532 nm. ....	80
Figura 6.16. Viabilidade das células OSCC-09 avaliado pelo ensaio de MTS. O símbolo * e (*) representam a irradiação com laser .....	81
Figura 6.17. Influência da concentração do PGLD-g-RhB (G = 4) na viabilidade celular. ....	82
Figura 6.18. Análise de marcação TUNEL-positiva (fluorescência verde) de fragmentos nucleares correspondentes a corpos apoptóticos no grupo controle: PGLD-g-RhB no escuro (A,B) e após exposição ao laser por 10 minutos (C,D). As células viáveis estão em azul. Barra de escala=10µm .....	84
Figura 6.19. Relação entre a porcentagem de células apoptóticas e a concentração de PGLD-g-RhB.....	85
Figura 6.20. Estudo da indução à hemólise pelo PGLD-g-RhB. Utilizaram-se como controle positivo o vidro e controle negativo o silicone de grau médico (Silicone GM). ....	86

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Propriedades dos PGLD's de $G = 1-4$ .....	51
--	----

## Índice de Abreviações

- 2PA – ABSORÇÃO DE 2 FÓTONS
- CCD – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
- CCDC – CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA COMPARATIVA
- Cdk – CINASES DEPENDENTES DE CICLINAS
- CLAE – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
- CLOA – COMBINAÇÃO LINEAR DOS ORBITAIS ATÔMICOS
- C<sub>p</sub> - CAPACIDADE CALORÍFICA
- DMEM – DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM
- DMF DIMETILFORMAMIDA
- DMSO – DIMETILSULFÓXIDO
- DSC – CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL
- DTGA – DERIVADA DA TG
- EM – ESPECTRO DE MASSAS
- EROS – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
- FTIR – ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADAS DE FOURIER
- G0 – DENDRÍMERO DE GERAÇÃO ZERO
- G1 – DENDRÍMERO DE PRIMEIRA GERAÇÃO
- G2 – DENDRÍMERO DE SEGUNDA GERAÇÃO
- G4 – DENDRÍMERO DE QUARTA GERAÇÃO
- GPC - CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL
- HOMO – ORBITAL OCUPADO DE MAIS ALTA ENERGIA
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER
- LUMO – ORBITAL DESOCUPADO DE MAIS BAIXA ENERGIA
- OM – ORBITAIS MOLECULARES
- OSCC – ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA
- PEG – POLI(ETILENOGLICOL)
- PDT – TERAPIA FOTODINÂMICA
- PGL-10 – NÚCLEO OLIGOMÉRICO DE DECAGLICEROL
- PGLD – DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL

PGLD-g-RhB – SISTEMA FORMADO DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL CONTENDO A RODAMINA B ACOPLADA

PS – AGENTE FOTOSSENSIBILIZADOR

Rf – FATOR DE RETENÇÃO

RhB – RODAMINA B

S<sub>0</sub> – ESTADO FUNDAMENTAL DA MATÉRIA

S<sub>1</sub> – ESTADO EXCITADO SINGLETE DA MATÉRIA

T<sub>1</sub> – ESTADO TRIPLETE EXCITADO DA MATÉRIA

SIDA – SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

TG – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

T<sub>g</sub> – TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA

TGA – CURVA GERADA PELA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

UV/Vis – ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

YAG – YTRIUM-ALUMINIUM-GARNET

## RESUMO

A terapia fotodinâmica é uma terapia clínica emergente para o tratamento de câncer. Este trabalho trata do desenvolvimento de novos fotossensibilizadores para a terapia fotodinâmica, os quais podem ser otimizados através de um conjunto único de características físico-químicas, necessário para um agente clínico ideal. Atualmente já existem alguns relatos de novos agentes e alguns agentes fotossensibilizadores comerciais. Esses entretanto possuem inúmeras limitações, tal como a baixa solubilidade, biocompatibilidade e fotoestabilidade.

O presente estudo teve como objetivo específico analisar as propriedades físico-químicas e biológicas do dendrímero de poliglicerol (PGLD) como sistema transportador de rodamina B (RhB). PGLD de gerações (G) 0, 2 e 4 foi sintetizado pelo método divergente utilizando-se a rota sintética de Williamson onde uma sequência catalítica repetitiva de alilação e di-hidroxilação foi adotada. O PGLD foi oxidado utilizando-se TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina). Após ativação do PGLD oxidado com *N*-hidroxi-succinamida (NHS)/(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (EDC) RhB foi imobilizada covalentemente na macromolécula dendrítica. O sistema PGLD-g-RhB 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), cromatográficas (cromatografia de camada delgada-CCD). Os processos de absorção multifotônica (absorção de dois fótons) no PGLD-g-RhB foi estudado utilizando a técnica de Varredura-Z com pulsos ultracurtos. Os espectros de emissão de fluorescência do PGLD/-g-RhB utilizando pireno como sonda molecular indicaram um aumento na hidrofobicidade do PGLD-g-RhB com o aumento do número de gerações. As propriedades biocompatíveis do PGLD-g-RhB foram avaliadas quanto às suas citotoxicidade e hemocompatibilidade. O estudo da citotoxicidade e atividade fotodinâmica do PGLD-g-RhB foi efetuado utilizando linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral SCC9 em ensaios *in vitro*. As técnicas físico-químicas de análise indicaram que o acoplamento químico entre a RhB e o PGLD foi atingido com sucesso. As avaliações citotóxicas e de hemocompatibilidade indicaram que o PGLD-g-RhB possui propriedades adequadas para utilização *in vivo*. O ensaio de TUNEL sugere que o sistema PGLD-g-RhB parece atuar como um eficiente fotossensibilizador na TFD de carcinomas epidermoide de cabeça e pescoço (SCC9), causando a morte celular por apoptose.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica; Dendrímero de poliglicerol, Rodamina, Carcinoma de cabeça e pescoço.

## ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is an emerging clinical treatment cancerous therapy. This has brought about the development of new photosensitizers (PS) agents for PDT that can be optimized for the unique set of photophysical characteristics that are required for a successful clinical agent. There are many reported or commercially available photosensitizers (PS), but most have limitations, such as low solubility, photostability and biocompatible properties. In this study, we have introduced the polyglycerol dendrimer (PGLD) as a carrier system for rhodamine B (RhB). PGLD in generations (G) 0, 2 and 4 was synthesized by divergent method using Williamson synthesis, where a repetitive sequence of allylation and catalytic dihydroxylation was adopted. The PGLD was oxidized by using TEMPO (N-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine). After activation, the PGLD oxidized with N-hydroxy-succinimidyl (NHS) / (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) (EDC) RhB was covalently immobilized on dendritic macromolecule. The conjugate PGLD-g-RhB system was characterized by spectroscopy (Fourier transform infrared spectroscopy - FTIR and ultraviolet-visible spectroscopy - UV/Vis), thermal analysis (thermogravimetric analysis - TG, differential scanning calorimetry - DSC) and chromatography (thin-layer chromatography CCD). The multiphoton absorption process (two photon absorption) of PGLD- g -RhB was studied using the open aperture Z - scan technique. The fluorescence emission spectra of PGLD -g- RhB by using pyrene as molecular probe suggested an increase in the hydrophobicity of the conjugate according to the increase in generation number. The biocompatible properties of PGLD- g -RhB were evaluated using cytotoxicity and hemocompatibility assays. PGLD-g-RhB cytotoxicity and photodynamic activity assays were conducted using oral squamous cell carcinoma SCC9 (OSCC9) cell lines. The cytotoxicity and hemocompatibility assays indicated that PGLD-g-RhB shows appropriate properties for in vivo use. The TUNEL assay suggests that PGLD-g-RhB system acts as an efficient photosensitizer in PDT of OSCC9 carcinoma cells, causing cell death by apoptosis.

**Keywords:** Photodynamic therapy, Polyglycerol dendrimer, Rhodamine, head and neck carcinoma.



## PREFÁCIO

---

Esta dissertação aborda a utilização do dendrímero de poliglicerol (PGLD) como sistema transportador da RhB para utilização na terapia fotodinâmica. Seu conteúdo está dividido em oito capítulos.

No Capítulo 1 são apresentados os conteúdos da dissertação e o Estado da Arte quanto à aplicação dos dendrímeros, também chamadas de macromoléculas arborescentes, na biomedicina. Uma especial ênfase foi dada ao dendrímero de poliglicerol (PGLD), principal tema desse trabalho. Devido às interações moleculares aditivas e cooperativas entre as macromoléculas arborescentes e os sistemas biológicos, uma breve discussão a respeito da química supramolecular dos dendrímeros é apresentada nesse capítulo.

O Capítulo 2 discute os conceitos fundamentais sobre a terapia fotodinâmica e as principais características da RhB (RhB), o agente fotossensibilizador selecionado para esse trabalho em associação com o PGLD.

O Capítulo 3 apresenta os conceitos fundamentais do câncer, bem como sua incidência.

Os objetivos e as justificativas para a elaboração dos estudos relativos à esse trabalho são apresentados no Capítulo 4.

Uma descrição detalhada da metodologia experimental, tais como síntese do PGLD, associação com a RhB bem como caracterizações físico-químicas e ensaios bioquímicos são apresentados no Capítulo 5.

No Capítulo 6 são apresentados os resultados obtidos e sua discussão e, no Capítulo 7 as conclusões desta dissertação são elaboradas com base nos resultados encontrados.

Nos Capítulos 8 e 9 são apresentadas as perspectivas futuras e as referências bibliográficas, respectivamente.

# CAPÍTULO 1

---

## **1.1 Estado da Arte quanto à aplicação dos dendrímeros na medicina**

A terapia fotodinâmica (TFD) é atualmente o tratamento mais moderno utilizado no combate ao câncer de pele (Carcinoma Basocelular superficial, Carcinoma Espinocelular e Queratoses actínicas múltiplas) e mucosas em estado inicial (PENROSE, 2011). Recentemente, a técnica TFD tem sido estudada também para o tratamento de câncer em órgãos internos, onde o tratamento clínico é feito utilizando-se de uma fibra ótica (VOGL, 2004; BOWN, 2002).

A explosão de conhecimentos gerados através da nanotecnologia tem beneficiado especialmente a TFD uma vez que técnicas de encapsulamento de fotossensibilizadores e a produção de nanopartículas tem fortalecido o desenvolvimento de procedimentos clínicos promissores para o tratamento de lesões pré-cancerosas e para o câncer de pele não-melanoma, como o carcinoma espinocelular, agressivo e potencialmente metastático (WANG, 2004).

A medicina é atualmente uma área interdisciplinar onde as ciências exatas e biológicas, convergem para a nanomedicina. O objetivo final é o desenvolvimento de tratamentos mais modernos onde a síntese de novos materiais se torna uma necessidade crescente e constante para aplicação das novas técnicas que são desenvolvidas. Sob este aspecto a medicina contemporânea é marcada por um crescimento em escala logarítmica na criação de materiais com propriedades que suportem as novas tecnologias desenvolvidas na medicina, tanto clínica como diagnóstica.

É fato reconhecido pela literatura especializada que macromoléculas sintéticas denominadas polímeros revolucionaram a medicina. Uma ampla classe de macromoléculas sintéticas têm sido utilizadas para a fabricação de biomateriais, visando a interação com tecidos ou órgãos biológicos ou até mesmo a sua substituição. Uma grande parte dos materiais utilizados na medicina são polímeros (LOSCO, 2000), macromoléculas de origem sintética ou natural que apresentam um grande número de sistemas

supramoleculares, ou seja, possuem a capacidade de especificar o grupo alvo para a interação da macromolécula.

Dentre os polímeros utilizados no projeto de biomateriais os sistemas macromoleculares arborescentes tem atraído a atenção de pesquisadores da nanomedicina pelo fato de possuírem dimensões da ordem de 1-100 nm, estrutura tridimensional (3-D) similar à de proteínas globulares e elevada funcionalidade de grupos químicos em sua periferia (TOMALIA, 2005). Ao mesmo tempo, as macromoléculas com estrutura dendrítica podem ser projetadas de forma a possuírem cavidades espacialmente definidas possuindo assim, domínios hidrofílicos ou hidrofóbicos, ligantes ou sítios de coordenação do tipo ácido-base que podem contribuir no transporte de moléculas bioativas e nanopartículas vetorizadas que se constituem atualmente em uma poderosa terapia para o tratamento do câncer (ASTHANA, ET AL, 2005; KANG, ET AL, 2010; REN, 2010; KARMAKAR, 2007).

Similarmente às proteínas, os dendrímeros são formados através de ligações covalentes entre unidades méricas denominadas de dendrons. A maioria das ligações covalentes nos dendrímeros permite as rotações entre os átomos que elas conectam permitindo em princípio que o dendrímero assuma diversas conformações possíveis (GORMAN, 2000; SERGEY, 2008). Entretanto, as ligações não covalentes tais como as ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações eletrostáticas restringem o número de conformações das macromoléculas arborescentes (MAITI, 2005; BÁNYAI, 2013; PASUPATHY, 2008).

As propriedades físico-químicas dos dendrímeros resultam das propriedades físico-químicas dos dendrons e dos grupos funcionais em sua periferia. Essas propriedades são inerentes às elevadas complexidades estruturais dessas macromoléculas. A estrutura tridimensional dos dendrímeros é constituída de várias cavidades, apresentando uma grande variação em suas propriedades espaciais e físico-químicas, conferidas pelo caráter volumétrico e eletrostático associados ao número de gerações da macromolécula arborescente (LOSCO, 2000).

A diversidade topológica dos dendrímeros quanto à presença de cavidades e interações inter/intramoleculares permite sua interação no nível de formação de compostos de coordenação com os mais diversos tipos de compostos de interesse da medicina de maneira altamente específica. A interação entre um dendrímero e seus ligantes específicos é fortemente dependente das propriedades topológicas de ambos, hospedeiro (dendrímero)

e do ligante, sendo necessário um elevado grau de complementaridade para que a formação de compostos de coordenação possa ocorrer (LEWIS, 2013; WATKINS, 1997).

Os dendrímeros possuem uma química de coordenação rica pela versatilidade de modos de coordenação que podem apresentar, podendo atuar como ligantes neutros, aniônicos ou catiônicos (LEWIS, 2013; WATKINS, 1997). A diversidade topológica dos dendrímeros tem propiciado novos elementos de estudo para o desenvolvimento de sistemas transportadores de quimioterápicos ou agentes de imagem ao nível da química supramolecular (ZENG, 1997; ZIMMERMAN, 2001). As interações entre as estruturas arborescentes e seus ligantes resultam de interações moleculares aditivas e cooperativas (SCHNEIDER, 2011) e apresentam elevada significância para o desenvolvimento de novos procedimentos para a TFD.

### **1.1.1 Química supramolecular e suas aplicações na medicina**

A química supramolecular surge na década de 60 com os trabalhos de Pedersen e Cram, ela foi inicialmente desenvolvida por Jean-Marie Lehn no século XVIII e estendeu seus estudos nessa área para o entendimento sobre a base molecular de "reconhecimento" das moléculas e a maneira pela qual uma molécula receptora reconhece e se liga seletivamente a um substrato (LEHN, 1987). Os estudos de Lehn permitiram o desenvolvimento de um novo campo da química, hoje conhecido como química supramolecular (LOSCO, 2000).

Atualmente, observam-se vários estudos sobre a química supramolecular (DALGARNO, 2010), matéria que pode ser descrita como a química que vai além da molécula (LEHN, 1987). A química supramolecular relaciona as diferentes subunidades de grupos moleculares, unindo diferentes sistemas através das ligações intermoleculares e suas interações em sistemas mais complexos, tais como sistemas biológicos. Esses sistemas resultam na associação de duas ou mais espécies químicas, as quais são mantidas unidas por ligações secundárias não covalentes, como a ligações de hidrogênio, interações coulombianas e de van der Waals. Os níveis de organização estrutural em supramoléculas vão da molécula como estrutura primária até o empacotamento cristalino, que é a estrutura terciária (BALZANI, 1996; LEHN, 1995).

A essência da química supramolecular é a capacidade de reconhecimento entre substrato e receptor, devido à respostas a sinais químicos (ARAKI, 2007). Na prática, a distinção entre as moléculas grandes e espécies supramoleculares podem basear-se no grau

de interação entre os subsistemas eletrônicos das unidades componentes. Quando a energia de interação entre as subunidades é pequena em comparação com outros parâmetros relevantes de energia, o sistema pode ser definido como uma espécie supramolecular (AIDA, 2012).

O processo de sinalização celular na superfície de materiais sintéticos biocompatíveis, ou o reconhecimento de sinais celulares por estas estruturas, proporciona hoje inúmeras oportunidades para auxiliar no tratamento de doenças e melhorar a qualidade de vida para a sociedade (FAN, 2012; BRUNSEN, 2012). Quando estas estruturas artificiais tem a finalidade de serem colocadas no corpo humano, eles devem cumprir com sua função no meio biológico e, em seguida, se biodegradar em nutrientes ou ser excretados de forma segura.

Ao nível supramolecular, um dendrímero poderia ser considerado como um conjunto moléculas unidas covalentemente e ao mesmo tempo exibindo sinais múltiplos de receptores celulares altamente direcionados e ainda assim ser composto por unidades méricas (dendrons) solúveis em água (AIDA, 2012). Além disso, o dendrímero também poderia ser reconstruído pela célula para se ajustar a geometria exigida pelo organismo biológico por ruptura e reformação *in situ* de suas ligações não covalentes (TOMALIA, 1999).

A capacidade de reconhecimento das supramoléculas faz com que estas sejam consideradas inteligentes, pois possuem uma seletividade por seus receptores apresentando funcionalidade (ARAKI, 2007). Devido à esta funcionalidade as supramoléculas representam um grande avanço para a medicina, já que existe a possibilidade de sintetizar-se novas moléculas que interajam com células e tecidos de maneira específica (LEHN 1995; LEHN 1993). Tal especificidade da molécula por seu alvo possibilita um aumento na eficácia do tratamento clínico, já que se poderia produzir moléculas específicas para o tipo de células a serem tratadas, sem que os demais tecidos do organismo fossem atingidos. Estas moléculas sintéticas podem ser usadas de forma a transportar fármacos para sua liberação apenas em seu grupo alvo específico, ou apenas acumular-se no tecido tumoral. Nesse sentido inúmeras macromoléculas sintéticas têm sido utilizadas para a fabricação de biomateriais, visando à interação com tecidos ou órgãos biológicos ou até mesmo a sua substituição (BARTH, 1994).

Atualmente, grande parte dos materiais utilizados ao nível supramolecular são ftalocianinas, moléculas inorgânicas ou polímeros (MA, 2012). Este último pode ser

utilizado em suas diversas configurações, tais como micelas (ECKELMANN, 2012) (Figura 1.1-A), dendrímeros (GOSHEN, 2013) (Figura 1.1-B) e lipossomas (Figura 1.1-C). Quanto aos dendrímeros, a literatura tem destacado sua aplicação na obtenção de imunoconjugados (MA, 2012), contrastes radiológicos (CARMO, 2007), tratamento do câncer (WIENER, 1994) e liberação controlada de fármacos (ECKELMANN, 2012) (GOSHEN, 2013) (OLIVEIRA, 2011) (CARMO, 2007) (WIENER, 1994).

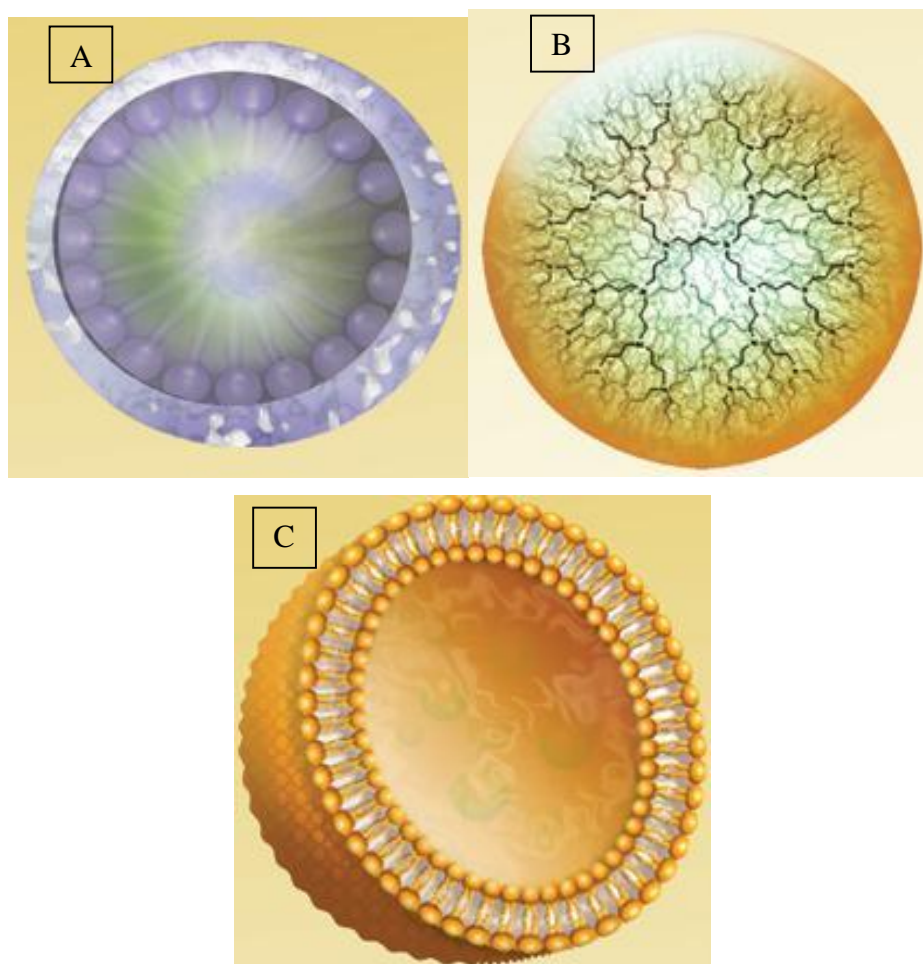


Figura 1.1 Representação das diferentes estruturas poliméricas que podem atuar como supramoléculas. Micelas (A), Dendrímeros (B) e Lipossomas (C) (Adaptado de NANOMEDICINA, 2012)

Ao longo dos anos, alguns sistemas se consolidaram como supramoléculas bastante interessantes para utilização na biomedicina destacando-se os dendrímeros, sistemas micelares (NAGAI, 2006) e as lipossomas (SHAW, 1992).

As micelas são construídas através de moléculas que possuem uma cabeça polar e uma cauda apolar, os chamados surfactantes (Figura 1.2). Quando em solução os surfactantes possuem diferentes maneiras de se agrupar, de modo a diminuir a entropia do sistema. Dentre os modos de agrupamento dos surfactantes, as micelas são bastante conhecidas e

podem configurar-se como micelas esféricas ou inversas, de acordo com a polaridade do solvente e com as proporções cabeça/cauda.

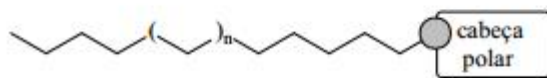


Figura 1.2 Representação geral de um surfactante (THOMPSON, 2012).

Em solventes polares, tal como água, e conseqüentemente o sangue formam-se micelas circulares onde a cabeça polar fica a mostra e as caudas voltadas para dentro, como mostra a Figura 1.3 (a). Em solventes apolares formam-se as chamadas micelas invertidas, onde a cauda apolar volta-se para fora, como mostrado na figura 1.3 (b). (NAGAI, 2006)

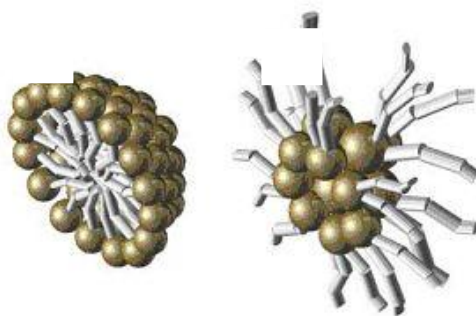


Figura 1.3 Representações estruturais do corte da seção transversal das micelas circular (a) e reversa (b). (TEMPLETON, 2013)

A utilização das micelas na biomedicina é bastante explorada para o encapsulamento e transporte de fármacos, no encapsulamento de DNA para terapia gênica e no transporte de corantes para a utilização em ressonância magnética ou de moléculas fotossensíveis para a TFD.

As lipossomas (Figura 1.1 - C) assemelham-se às micelas em sua estrutura, pois são estruturas coloidais, vesículas esféricas compostas por bicamadas lipídicas e um núcleo aquoso. Devido a sua composição, estas são muito estudadas como modelo de membranas celulares, já que estas são formadas por membranas fosfolipídicas (JAMISON, 2007).

Nas lipossomas, os componentes das camadas fosfolipídicas podem ser variados de acordo com a necessidade de interação, o que lhes confere uma grande versatilidade. Além disso, essas supramoléculas possuem a capacidade de incorporar tanto estruturas hidrofílicas quanto hidrofóbicas. Estas características conferem às lipossomas boas propriedades como sistemas transportadores de fármacos para liberação controlada ou DNA (BATISTA, 2007). O transporte de DNA (ácido desoxirribonucleico) possui um interesse particular para a terapia gênica, com a finalidade de promover o transporte de genes isolados para sítios específicos, atuando como vetores de transferência gênica. Além da capacidade de especificar o local onde o gene será liberado, os lipossomas garantem a integridade do DNA durante o transporte, através dos diferentes tecidos biológicos (GILLIES, 2005). Alguns exemplos de doenças para as quais já se estuda o tratamento através da reposição de genes são o câncer e algumas doenças infecciosas tais como o HIV. (SILVA, 2004) (NANCE, 2002)

Apesar das semelhanças estruturais e em algumas propriedades físico-químicas, as lipossomas diferem das micelas pela presença de uma bicamada lipídica, que forma uma camada polar no interior da lipossoma gerando um núcleo composto por água (PATIL, 2005). A Figura 1.4 mostra a bicamada fosfolipídica (A), bem como a representação estrutural (B), onde pode-se notar a camada polar no interior dos lipossomas.

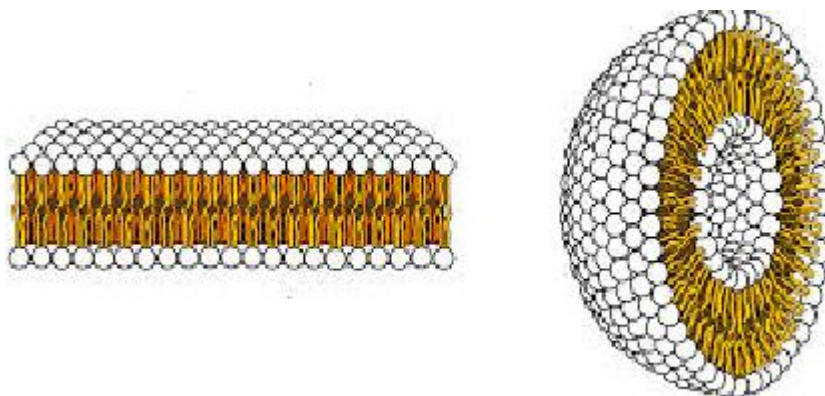


Figura 1.4 Representação estrutural da bicamada fosfolipídica (A) pela qual as lipossomas são compostas e do corte transversal de uma lipossoma(B), onde pode-se observar uma camada apolar em seu interior. (ANTUNES, 2007)

Atualmente a química supramolecular de dendrímeros já é bem conhecida. Vários estudos tem voltado sua atenção para o entendimento dessas estruturas com os sistemas biológicos (MAMMEN, 1998; KLAJNERT, 2003; GIEHM, 2008; HEEGAARD, 2007).



O termo dendrímero, que vem das palavras gregas dendron e mero, que significam respectivamente árvore e fração, descreve a arquitetura de uma classe de polímeros que são formadas por um núcleo, a qual se ligam os “ramos” do dendrímero (Figura 1.1-D). Com sua estrutura globular e altamente ramificada, os dendrímeros lembram a copa de uma árvore e seus galhos e por este motivo são chamadas a de moléculas arborescentes (LIMA, 2012). Estas moléculas além de altamente ramificadas são quase totalmente simétricas, apresentando, portanto, um mesmo tipo de interação em praticamente todos os ângulos (BOAS, 2004) (isomolecularidade). Além disso, eles são capazes da biomimetização, caracterizada pela capacidade de “imitar” estruturas biológicas, a exemplo das proteínas. Apesar de serem altamente ramificados, estes apresentam cavidades internas, capazes de carregar moléculas “hospedeiras” consigo e por este motivo são tão interessantes no transporte de fármacos e outras moléculas.

Outra propriedade importante dos dendrímeros é a possibilidade de reconfiguração de sua estrutura externa, através do acoplamento de novas moléculas á sua última camada. Por esta importante propriedade essas moléculas são conhecidas como os blocos fundamentais da química (TOMALIA, 2003).

Entre os dendrímeros (Figura 1.1-B) o PAMAM (Poliamidoamina) (ESFAND, 2001) - (Figura 1.5) foi o primeiro a se destacar como supramolécula com fins medicinais, tendo a capacidade de biomimetização com diferentes organelas celulares, dependendo de seu número de geração. Atualmente, novas famílias de dendrímeros tem se destacado por suas aplicações na biomedicina, a exemplo dos dendrímeros de poliglicerol (MOURA, 2011; SILVA, 2008).

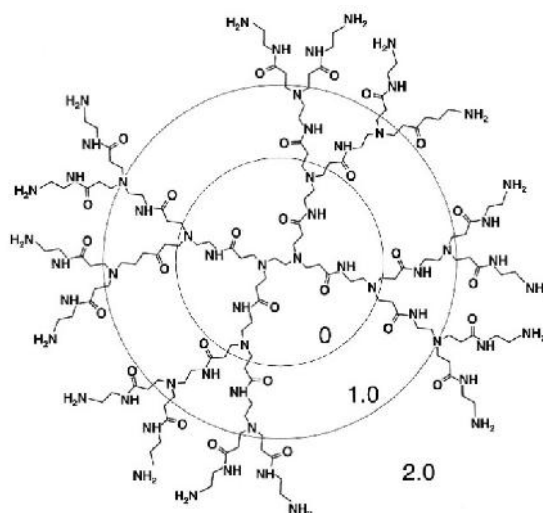


Figura 1.5 Estrutura do PAMAM de geração 2 (G2), ilustrando a progressão do número de gerações do interior (núcleo) para a periferia (SUPATTAPONE, 1999).

Em todas as modalidades de tratamento clínico, as moléculas a serem entregues a órgãos ou tecidos específicos são encapsuladas nas cavidades ou ligadas aos dendrímeros através de forças do tipo ligação de hidrogênio, van der Waals ou eletrostáticas. A liberação da molécula bioativa pode ocorrer através de estímulos físicos, (luz, ultrassom, mecânico, variação de temperatura ou pressão), químicos (variação do pH ou força iônica do meio) ou biológicos (na presença de enzimas). Estes estímulos são capazes de promover certas mudanças estruturais, como por exemplo, a desestabilização de uma micela através da mudança de pH ou a força iônica do microambiente. No caso das supramoléculas carregarem moléculas fotossensíveis a aplicação de luz no local de acúmulo do carreador é capaz de promover a liberação de energia, através de transições eletrônicas potencializando assim a TFD (GUPTA, 2002; GRAINNER, 2010).

O dendrímero de poliglicerol (PGLD) de gerações 0-4 (G0-G4), apresenta boas propriedades hemocompatíveis, características atraentes para sua utilização como sistema carreador de quimioterápicos para o tratamento do câncer (SILVA, 2008; LEITE, 2008). As propriedades biológicas, peculiares ao PGLD, são explicadas pelos grupos OH terminais e grupos OH secundários no interior da macromolécula, abrem grande leque de aplicações, que vão desde simples veículo até a exploração farmacológica no projeto de reservatórios moleculares para o transporte de quimioterápicos (MOURA, 2011). Além disso, corrobora o fato do PGLD ser um material obtido principalmente de um subproduto da produção do biodiesel, a glicerina, atualmente abundante em nosso país e que tem na

produção de dendrímeros da família do PGLD, sua reciclagem com viabilidade econômica e ecológica.

Recentemente, estudos demonstraram o bom desempenho do PGLD como sistemas transportadores de agentes fotossensibilizantes para utilização na TFD (MILITÃO, 2013). Nesses sistemas, as moléculas bioativas na forma não dissociada presentes nas cavidades do dendrímero apresentam-se como espécies que podem ser capazes de se difundir e atravessar as barreiras lipofílicas da pele, o que pode ser muito interessante para sua aplicação na TFD para o tratamento do câncer de pele, a neoplasia mais frequente no Brasil.

## **1.2 Dendrímero PGLD: um poliéter como supramolécula**

A função éter se caracteriza pela presença de um átomo de oxigênio ligado a dois, diferentes átomos de carbono. Assim os poliéteres são formados a partir de monômeros que se unem através da ligação éter. Normalmente o acoplamento entre os monômeros de um poliéter se dá exatamente no local onde se encontra o oxigênio (normalmente sob a forma de uma hidroxila) (ENCICLOPÉDIA BRITÂNICA, 2013). Sendo um dendrímero um polímero altamente ramificado, a densidade de pontos de junção aumenta consideravelmente, quando comparado à seu homólogo linear.

Um poliéter arborescente é um dendrímero que apresenta uma alta densidade de grupamentos éter em sua estrutura, bem como a presença de hidroxilas em suas extremidades terminais. A geração do poliéter arborescente é definida pelo número de camadas de monômeros que o compõem. A geração zero (G0) é composta apenas pelo núcleo oligomérico de poliglicerol. A geração um (G1) apresenta além do núcleo, uma camada do monômero e assim a geração do dendrímero aumenta de acordo com que o número de camadas aumenta. Ao incluir uma nova camada de monômeros cada ramificação recebe duas novas ramificações. Dessa maneira, a cada geração o número de ramificações terminais dobra, de modo que a cada geração o dendrímero se torna cada vez mais ramificado (BOAS, 2004). A Figura 1.6 ilustra este crescimento controlado dos dendrímeros a cada geração. Devido a este alto número de ramificações terminais, que aumentam a cada geração, os dendrímeros de poliéteres apresentam também uma alta densidade de hidroxilas terminais, que permitem uma reconfiguração das características físico-químicas da periferia do dendrímero através do acoplamento de novas moléculas.

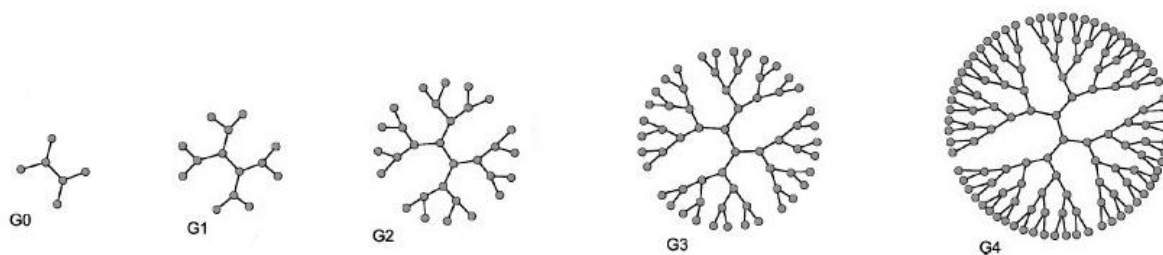


Figura 1.6 Crescimento de dendrímeros de acordo com seu número de geração. Núcleo oligomérico em G0, primeira geração (G1) com apenas uma nova camada de monômeros, segunda geração (G2) com duas camadas de monômeros, terceira geração, (G3) com 3 camadas e quarta geração, (G4) com quatro camadas de monômeros acopladas. Adaptado de (SVENSON, 2012)

Com o aumento do número de geração o diâmetro das macromoléculas arborescentes tende a aumentar de forma linear e a cada geração sua forma tende a ser mais globular, característica que favorece a biomimetização das proteínas globulares. Normalmente, a partir da quarta geração os dendrímeros são moléculas esféricas bastante densas, o que confere aos mesmos a capacidade de polidispersão, isomolecularidade e alta solubilidade, devido à sua periferia altamente polar (KAJANERT, 2011).

Quando comparado com polímeros lineares, os dendrímeros apresentam a vantagem de possuir uma viscosidade intrínseca menor, que aumenta geralmente até a quarta geração, enquanto que em polímeros lineares esta propriedade física aumenta de acordo com o aumento da massa molecular da molécula (KLAJNERT, 2001). Por seu tamanho e forma, os dendrímeros possuem grande capacidade de biomimetização com enzimas e alguma organelas celulares. A princípio, pode-se dizer que como uma grande vantagem para o tratamento clínico, os dendrímeros apresentam uma grande capacidade de selecionar as células tumorais como um alvo preferencial para sua acumulação. Esta seleção é possível devido ao aumento da permeabilidade dos vasos do tumor ao dendrímero e da limitação da drenagem linfática (MAEDA, 1989). Combinados, esses fatores levam à acumulação seletiva da macromolécula arborescente no tecido tumoral. Essa propriedade única dos dendrímeros, quando comparado com polímeros lineares, torna as macromoléculas arborescentes muito interessantes para o desenvolvimento de sistemas de entrega vetorizada de fármacos para o tratamento do câncer. (AIDA, 2012; WIERNWR, 1994).

A síntese de dendrímeros de poliglicerol tem apenas cerca de uma década e foi descoberta por Haag e colaboradores, na universidade de Berlin. Apesar disso, estas estruturas arborescentes vêm se mostrando amplamente úteis na medicina (HAAG, 2000).

O dendrímero de poliglicerol (Figura 1.7) é um poliéter de estrutura arborescente, solúvel em água que se caracteriza pelo grande volume de hidroxilas terminais, presentes em sua superfície, pois cada uma das suas ramificações termina em uma hidroxila. Estas características o tornam particularmente interessante para o acoplamento de compostos bioativos e marcadores celulares, através de uma nova etapa sintética, favorecidas pela presença das hidroxilas nas terminações do dendrímero. Outro fator que torna o dendrímero de poliglicerol altamente atraente para a produção de compostos de utilização biomédica é a baixa toxicidade do poliglicerol, o que levou à utilização deste polímero como emulsificante e substituinte de gorduras na indústria farmacêutica e alimentícia. (FDA, 2013).

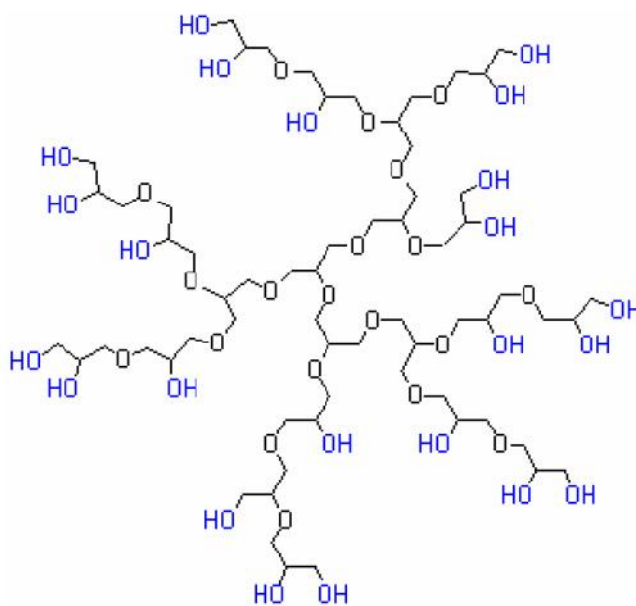


Figura 01.7 Estrutura do PGLD de segunda geração (RODRIGUES,2001)

O PGLD tem seu esqueleto semelhante ao PEG, possuindo inúmeras aplicações na medicina, podendo ser citadas suas propriedades anti-inflamatórias antitrombóticas de seus derivados sulfatados (FRENETTE, 1996) e as propriedades anti-inflamatórias e antitumorais dos dendrímeros salicilados (MOURA, 2011). Outra aplicação dos bioconjugados de poliglicerol na medicina é a fixação da enzima glucose oxidase em sua

superfície para a montagem de biossensores para a quantificação dos níveis de glicose no sangue (FERNANDES, 2009).

Recentemente o grupo de biomateriais da Universidade federal de Itajubá comprovou que estas macromoléculas têm a capacidade de se acumular preferencialmente em células tumorais, aumentando ainda mais a importância de tal molécula para o uso medicinal (MOURA, 2011).

### **1.2.1 Síntese de Dendrímeros**

A síntese de dendrímeros surge a partir de uma evolução da síntese de polímeros conhecida até o século XIX. Antes deste período, a síntese radicalar era de difícil controle levando à obtenção de polímeros muito polidispersos e de natureza estatística. Durante o século XX, surgem os processos de proteção e desproteção de Merrifield, as reações em cadeia via polimerase e a polimerização iônica (FRÉCHET, 2000). Estas descobertas tornaram possível o desenvolvimento de processos racionais de síntese de polímeros permitindo a obtenção de macromoléculas arborescentes com elevada isomolecularidade e um alto controle do processo de síntese (TWYMAN,1999; ESFAND,1996; FRÉCHET, 2000; TOMALIA, 2003).

Considerando a síntese de dendrímeros dois tipos de rotas são mais comumente utilizados, a divergente (Figura 1.8 A) e a convergente (Figura 1.8 B) (KLAJNERT, 2001). A primeira rota, utilizada inicialmente, tem o crescimento do dendrímero propagando-se do núcleo para a superfície. Este núcleo deve ser um bloco multifuncional onde uma nova unidade de ramificação se ligará a cada um de seus grupos reativos. Assim, a cada etapa, as novas unidades funcionais se acoplam a unidades funcionais da camada anterior, construindo uma estrutura arborescente com crescimento exponencial, conforme o esquema de síntese, ilustrado na Figura 1.6. Este tipo de abordagem sintética, entretanto, envolve um grande número de reações, pois para que o crescimento ocorra dessa maneira é necessário um novo passo para o acoplamento de cada geração, além da ativação das unidades funcionais da camada anterior. Este grande número de reações de acoplamento e a ativação das unidades funcionais acarreta o uso de um grande número de etapas de purificação o que leva à um rendimento muito pequeno e inviável industrialmente. Outro problema encontrado são os defeitos na estrutura arborescente, causados pelo crescimento

exponencial, onde a completa funcionalização de cada camada não pode ser assegurada com precisão (MONTANARI,1998; HAHN, 2000 ). Apesar destes problemas, o processo divergente de síntese permite a obtenção de dendrímeros com elevado número de geração e, conseqüentemente, alta massa molecular (TWYMAN, 1999).

Mais tarde, como uma nova alternativa de rota sintética, Craig Hawker, Athena Phillipides, e Jean Frechet propuseram a síntese convergente, na qual o dendrímero é construído do que será sua periferia, para o núcleo (FRÉCHET, 2001). O princípio básico para a síntese convergente é a formação das ramificações dos dendrímeros, os chamados dendrons, através de reações com um menor número de sítios reativos (HOWKER, 1990). Estes dendrons são posteriormente ligados a um núcleo polifuncional, que os conecta, formando a estrutura arborescente, conforme ilustrado na Figura 1.8. Com este tipo de síntese é possível se alcançar um alto grau de monodispersão, minimizando ao mesmo tempo a formação de defeitos na estrutura, devido ao maior controle e menor número de sítios reativos em cada passo durante a construção dos dendron. (LIMA, 2012).

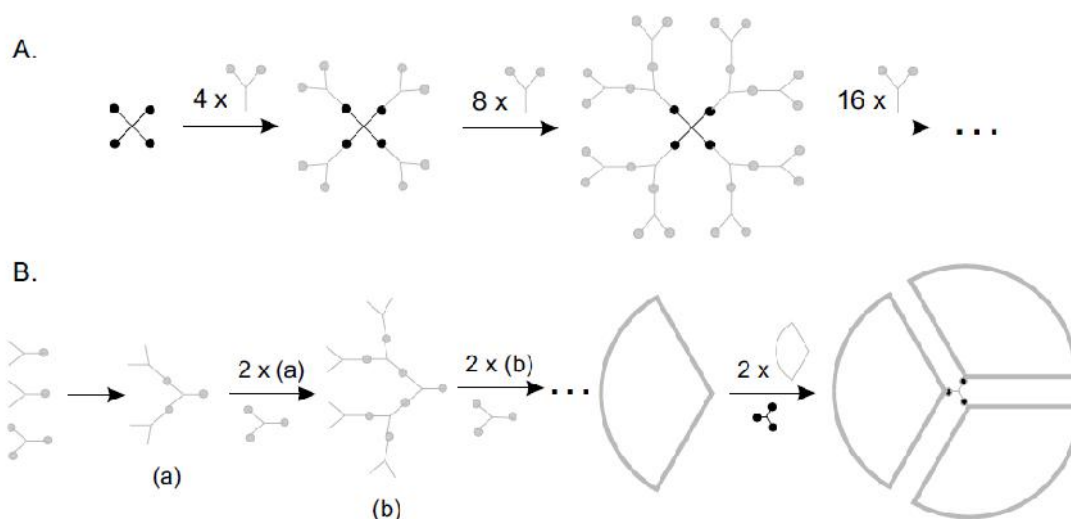


Figura 01.8 Representação dos métodos da síntese de dendrímeros: (A) método divergente, (B) Método convergente. (KLAJNERT, 2001).

Nesse trabalho, optou-se pelo método de síntese divergente do dendrímero PGLD. A escolha dessa rota deve-se em parte pela fonte disponível do reagente para formação do núcleo oligomérico inicial, a glicerina (propanotriol 1,2,3). A utilização da glicerina permite o desenvolvimento de sistemas macromoleculares arborescente de elevado valor agregado, utilizando matéria prima de fonte renovável, oriunda da produção do biodiesel no Brasil. O biodiesel é obtido através da reação de transesterificação de óleos vegetais com alcoóis, gerando ésteres metílicos ou etílicos e glicerina. A glicerina gerada como

subproduto é atualmente o principal obstáculo para a viabilização comercial do biodiesel uma vez que não há mercado para absorver todo o volume de glicerina a ser gerada (FAIRBANKS, 2009).



## CAPÍTULO 2 - A TERAPIA FOTODINÂMICA

---

### 2.1 INTRODUÇÃO

Apesar de ser uma técnica relativamente nova para a medicina ocidental, a TFD vem sendo bastante estudada com alternativa para o tratamento diferentes de diferentes doenças e traumas. É fato conhecido que esse tipo de terapia é muito útil na recuperação de pacientes que sofreram um trauma físico, no estímulo de crescimento de tecidos e atualmente tem se mostrado de grande utilidade no tratamento de tumores malignos (WIENER, 1994; NAGAI, 2006; SHAW, 1992).

Os primeiros estudos da TFD foram relatados por Raab no ano de 1900. (GILLIES, 2005) Com seus experimentos, Raab descobriu que culturas celulares não eram capazes de sobreviver quando expostas corantes de acridina e posteriormente à luz, mas sobreviviam quando expostas aos mesmos corantes e mantidas no escuro. Provando assim a fototoxicidade deste corante e dando início aos estudos do que mais tarde veio a ser chamado de TFD (DANIELL, 1991).

Em 1903 Tappenier e Jesionek foram pioneiros na utilização desta técnica para o tratamento do câncer em humanos, estudo no qual eliminaram totalmente um tumor facial de um humano, ainda sem saber explicar o motivo de tal cura (TAPPENIER, 1903). Foi só em 1976 que o oxigênio singleto, gerado através da transferência de energia entre o agente fotossensibilizador (PS) no estado excitado e o oxigênio molecular, foi responsabilizado pela toxicidade da TFD em meio celular.

Atualmente a TFD é uma técnica amplamente estudada no tratamento do câncer, já que se trata de uma terapia local, não invasiva e que dispensa cirurgias, deixando o paciente menos debilitado e dando ao mesmo uma melhor capacidade de recuperação da doença (BOIY, 2011; KURWA, 1999). Quando comparado aos tratamentos de primeira escolha para a cura do câncer, tal como a radioterapia, a quimioterapia e as cirurgias de remoção de tumor, a TFD apresenta como principais vantagens a diminuição dos efeitos colaterais pós-tratamento, a regeneração do tecido sadio lesado após um curto período de tempo e ausência de efeito tóxico cumulativo. A ausência de cicatrizes e a falta da necessidade da internação do paciente por um longo período de tempo, são algumas das vantagens da TFD

quando comparada aos tratamentos comuns, tais como quimioterapia, radioterapia e as técnicas cirúrgicas (CHATTERJEE, 2008).

## 2.2 Fundamentos da terapia fotodinâmica

A TFD é um tratamento não invasivo, que atualmente tem se mostrado eficiente no tratamento de tumores malignos devido às inúmeras vantagens e a relação positiva entre custo e benefício envolvida no tratamento (MACHADO, 2000). Neste tipo de tratamento, aplica-se um agente fotossensibilizador, no local a ser tratado, ou por via sistêmica e após algum tempo faz-se a aplicação de uma luz, geralmente um laser de comprimentos de onda em entre 500 e 800 nm no local da existência do tumor (Figura 2.1).

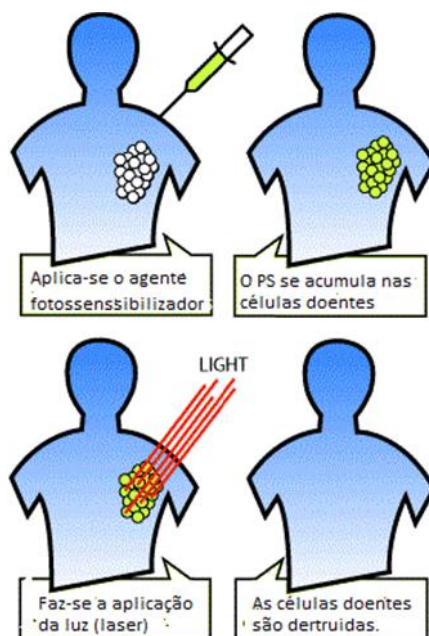


Figura 2.1. Esquema do tratamento de tumores através da TFD (Adaptado de PHOTODYNAMIC THERAPY).

A TFD necessita de três agentes igualmente importantes: A fonte de luz, o agente fotossensibilizador (PS) e o oxigênio molecular tecidual. A combinação desses três fatores leva à emissão de fótons pelo agente fotossensibilizador, estes fótons em contato com o oxigênio molecular geram espécies reativas de oxigênio (EROS), que são tóxicas ao tecido celular, levando-as à morte (CHATERJEE, 2008).

### 2.2.1 Características do agente fotossensibilizador

Os PS são compostos sensíveis à luz, que ao serem irradiados com um feixe de luz monocromático de comprimento de onda adequado, são excitados a um nível energético mais alto e desencadeiam um processo que resultará na morte celular (PASZKO, 2011).

Visando um tratamento fotodinâmico eficiente, alguns fatores importantes devem ser considerados na escolha do PS, pois, além das células tumorais a TFD tem a capacidade de levar as células sadias à morte. Além disso, os PS absorvem a luz visível, portanto a luz solar é capaz de excita-los desencadeando o processo da terapia. Assim caso a excreção do agente seja demorada, este precisaria ficar por um longo tempo ao abrigo da luz. Tendo estas considerações em vista, o agente PS escolhido deve atender a algumas características físico-químicas (MOAN, 1990):

- (a) O tempo de retenção pelo organismo, após o tratamento, deve ser curto;
- (b) Deve haver uma acumulação preferencial no tecido doente, quando comparado ao sadio;
- (c) Ter baixa citotoxicidade quando no escuro;
- (d) Absorver radiação eletromagnética na faixa visível (entre 500 e 700 nm preferencialmente), gerando grande quantidade de espécies reativas (SIMPLICIO, 2002).

Conceitualmente, os PS são divididos em primeira, segunda e terceira geração. O PS de primeira geração caracterizou-se por ser uma mistura de hematoporfirinas oligoméricas, onde o principal representante desta classe e o primeiro a ser aprovado para a TFD foi o Photofrin<sup>®</sup> (Figura 2.2). Este PS de primeira geração, entretanto possui uma absorção em menor comprimento de onda do que a desejável, prejudicando a eficácia do tratamento, exigindo que altas doses do PS sejam administradas para que se tenha o efeito desejado.

Um problema comumente encontrado na TFD é a demora da excreção do OS de primeira geração pelo organismo, dessa maneira o paciente necessita ficar ao abrigo da luz solar durante um longo período. Além disso, o photofrin<sup>®</sup> possui uma mistura de diferentes compostos, afetando a reprodutibilidade do tratamento e a seletividade do fármaco pelas células tumorais (LONGO, 2011). Tendo em vista tais adversidades a busca de novas alternativas levou ao desenvolvimento dos PS de segunda geração, compostos quimicamente puros, de boa absorção na faixa do visível e alto índice de geração de espécies reativas. Apesar desses agentes fotossensibilizadores representarem um grande

avanço nas pesquisas sobre a TFD o tratamento de tumores malignos, eles apresentam como desvantagem a falta de seletividade pelas células tumorais quando comparadas às células saudáveis, o que instigou os pesquisadores a buscar os Chamados PS de terceira geração (CASTANO, 2006).

Além do Photofrin<sup>®</sup>, já existem outros agentes fotossensibilizadores comerciais e usados em TFD, a exemplo do photosan (MILLER, 1991). Estes são agentes de segunda geração e se mostram mais eficientes que os de primeira geração, entretanto apresentam ainda uma baixa seletividade pelas células tumorais, confirmando, portanto a necessidade da busca por PS mais seletivos (MATHIAS, 2012; ALLISON, 2004).

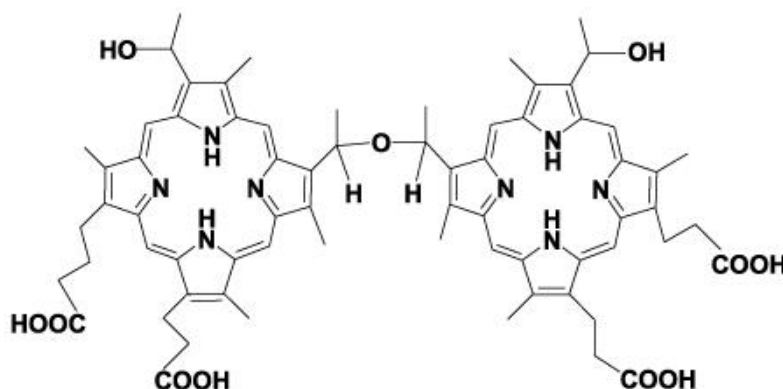


Figura 2.2. Estrutura do Photofrin<sup>®</sup>, agente fotossensibilizador de primeira geração e comercializado para o tratamento de pacientes com câncer. (MACHADO, 2000)

### 2.2.2 Características da fonte de luz

A fonte de luz para a TFD é um laser de baixa potência. A luz laser caracteriza-se por ser uma luz monocromática e possui um feixe direcional. A palavra laser é uma abreviação para *light amplification by stimulated emission of radiation*, (amplificação de luz através emissão estimulada de radiação) nome que deve ao seu funcionamento. O funcionamento de um laser dá-se por três elementos essenciais: o meio, que é o material onde ocorre a emissão de fótons, a fonte de excitação que emite o primeiro fóton no comprimento de onda adequado e dois espelhos que refletem a energia luminosa de volta ao meio, a fim de iniciar uma nova excitação dos elétrons deste (RENICH, 1996).

O comprimento de onda no qual um laser emite depende do material com o qual o meio é feito, existem inúmeros meios sólidos, líquidos ou gasosos. Como meios sólidos

podemos citar YAG (Yttrium-aluminium-garnet) e o rubi, como meios líquidos temos alguns corantes que emitem energia luminosa e como meios gasosos He-Ne e CO<sub>2</sub>, são os mais utilizados (ALMEIDA-LOPES, 1999).

A geração da luz laser baseia-se na emissão de radiação na forma de fótons. Quando a fonte de excitação emite um primeiro fóton de comprimento de onda adequado ao material a ser estimulado (meio), um primeiro elétron deste meio se eleva a um maior nível de energia e ao voltar para seu estado fundamental emite um fóton na mesma frequência em que foi estimulado, como um efeito cascata este fóton pode excitar um novo elétron, e novo fóton é emitido e assim cria-se uma cadeia, onde vários fótons de luz são emitidos. Este fato é chamado de emissão estimulada (ALMEIDA-LOPES, 1999; BAGNATO, 2001).

Os feixes de luz laser são coerentes, ou seja, toda a energia emitida possui um mesmo comprimento de onda. Por este motivo, a luz emitida é monocromática. Outra característica importante do laser, que não é encontrada na luz comum é a unidirecionalidade de seus fótons, que viajam sempre na mesma direção, permitindo que haja uma grande quantidade de energia incidida em um pequeno espaço de matéria (BAGNATO, 2001).

Levando em consideração a quantidade de energia incidida em um mesmo espaço, podem-se caracterizar os lasers como de alta ou baixa potência (HALLYDAY, 2007). Ambos os lasers podem ser usados na medicina moderna. Os lasers de alta potência incidem uma energia suficientemente alta para causar vaporização, necrose do tecido biológico e coagulação e por estes motivos são também conhecidos como lasers cirúrgicos, utilizados com a finalidade de produzir cortes ou coagular e cauterizar tecidos, durante algumas cirurgias, tais como oculares, (AHMED, 2013) oncológicas (GONZALEZ, 2012) e odontológicas (KILINIC, 2001).

Por sua vez, o laser de baixa potência ou laser terapêutico, é capaz de incidir uma potência entre 30 e 100 mW e, sendo assim, não possui capacidade de aquecimento e não é capaz de vaporizar ou necrosar o tecido biológico, entretanto, é hoje um dos mais estudados para diversas terapias, como o estímulo de músculos após lesões, (FRATEZI, 2011) o estímulo do crescimento de tecidos (WIERNER, 1994) e mais recentemente este grupo de laser tem sido associado a moléculas fotossensíveis, com a finalidade de investigar a possibilidade do tratamento de câncer, através da TFD (LINS, 2011; CHEM, 2005; DAVILA, 2011).

## 2.3 O oxigênio molecular e a geração das espécies reativas de oxigênio

A TFD parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com o PS e oxigênio tecidual resultam em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização das células neoplásicas. Ao iniciar-se a aplicação do laser, o agente PS em seu estado fundamental ( $S_0$ ), absorve um fóton proveniente da fonte de luz. Ao absorver energia o PS passa de seu estado  $S_0$  ao seu estado excitado singlete ( $S_1$ ). Este estado é, entretanto, energeticamente menos favorável (possui maior energia) do que o estado  $S_0$ , assim há um rápido decaimento ao estado fundamental, com a emissão de energia na forma de luz (fluorescência) ou calor (HIKARU, 2010).

As espécies reativas de oxigênio são formadas através de dois tipos de reação, Tipo I e Tipo II. As reações de Tipo I consistem na foto-oxidação por radicais, onde o PS em seu estado triplete excitado ( $T_1$ ) reage com outro substrato, transferindo elétrons e gerando radicais livres ( $R^\bullet$  ou  $R^+$ ). Estes radicais livres, por não estarem em sua conformação mais estável, são altamente reativas e interagem rapidamente com o oxigênio molecular gerando as espécies reativas do oxigênio (EROS) tais como ânions superóxidos ou radicais hidroxilas.

Nas reações de Tipo II o PS em seu estado triplete transfere energia na forma de um fóton para o oxigênio molecular à sua volta, formando o oxigênio singlete, outra espécie reativa do oxigênio (HIKARU, 2010).

Em TFD a reação Tipo II é a predominante e sendo o oxigênio singlete altamente reativo, ele é capaz de reagir com os componentes moleculares à sua volta, sendo, portanto, altamente citotóxico. Devido à essa alta reatividade, o tempo de meia vida do oxigênio singlete é muito curto, (da ordem de  $10^{-6}$  s) e sua mobilidade é muito restrita (RONSEIN, 2006). Dessa maneira essas espécies reativas de oxigênio vão afetar os tecidos mais próximos ao local onde são gerados e por este motivo o agente PS deve se acumular preferencialmente nas células tumorais, ou o tratamento não surtirá o efeito desejado, que é a morte das células doentes, afetando o menor número possível de células sadias. (PERUSSI, 2007) As reações tipo I e II, da geração de radicais estão ilustradas na seção 2.4, para um melhor entendimento desses mecanismos.

## 2.4 Transições eletrônicas e propriedades fotossensibilizadoras de moléculas na terapia fotodinâmica

A fim de se entender as propriedades fotossensibilizadoras das moléculas na TFD, é necessária a compreensão da dinâmica envolvida nas transições eletrônicas responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio.

De acordo com a mecânica quântica, as moléculas são formadas através da combinação linear de orbitais atômicos (CLOA) que cercam os núcleos constituintes da molécula. Nesse caso, CLOA refere-se à soma ponderada dos orbitais atômicos participantes e pode ser obtida se fazendo a adição ou a subtração das funções de onda ( ) correspondentes aos orbitais atômicos que se superpõem (ATKINS, 2006):

$$\psi = C_A \psi_A + C_B \psi_B \quad (2.1)$$

Sendo  $\psi$  a base fixa, isto é, os orbitais atômicos dos quais o orbital molecular (OM) é formado e consiste de duas orbitais atômicas, um do átomo A e o outro do átomo B,  $C$  é um coeficiente que na combinação linear mostra a extensão da contribuição de cada orbital atômico para o orbital molecular (OM). Os coeficientes  $C$  podem ser iguais ou diferentes, positivos ou negativos, dependendo dos orbitais e suas energias. À medida que os átomos se aproximam, seus orbitais se sobrepõem, como resultado, os OM são formados.

Quanto à distribuição de energia, a formação de moléculas deve seguir o princípio da exclusão de Pauli e a regra de Hund. Dessa maneira, o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) é o orbital molecular que, de acordo com o princípio de construção do diagrama de níveis de energia para a molécula, é o último a ser ocupado. Por sua vez, o orbital molecular vazio de mais baixa energia (LUMO) é o próximo orbital molecular de maior energia (ATKINS, 2006).

Quando uma molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital ocupado para um orbital desocupado de mais alta energia. Nesse caso, a transição mais provável é do orbital HOMO para o LUMO (Figura 2.3).

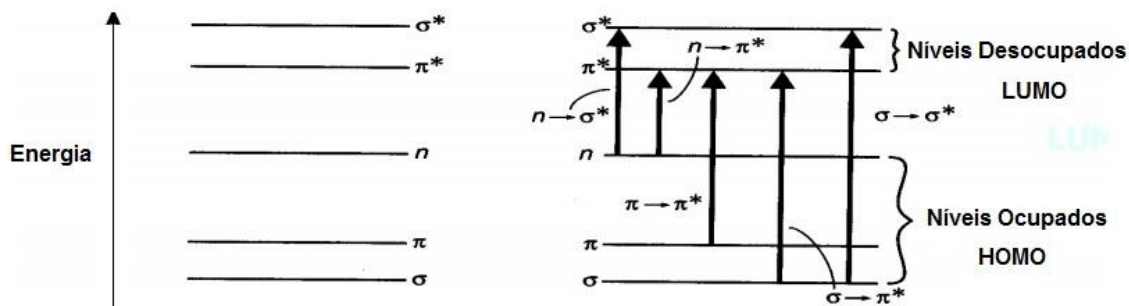


Figura 2.3. Transição eletrônica entre os estados HOMO-LUMO.

O processo de excitação é quantizado, ou seja, a energia da radiação eletromagnética absorvida é exatamente igual à diferença de energia entre os 2 estados (GILBERT, 1991). Na maioria das moléculas a energia envolvida na transição eletrônica,  $\Delta E$ , varia entre 125 e 650 kJ/mol. Embora nem todas as transições possíveis sejam observadas (regras de seleção), algumas transições proibidas ( $n \rightarrow \pi^*$ ) podem ser observadas. A Figura 2.4 resume as principais transições eletrônicas em função do grupo funcional presente na molécula.

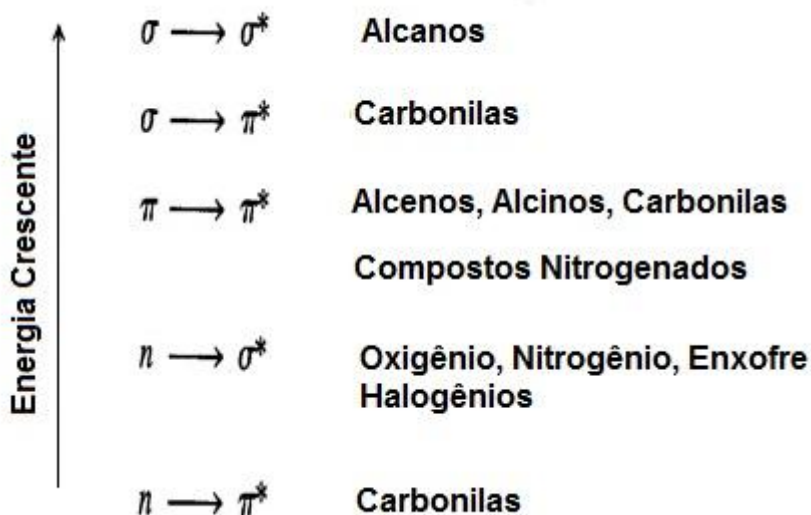


Figura 2.4. Transições eletrônicas entre os estados HOMO-LUMO em função da funcionalidade presente na molécula.



A energia dos orbitais de fronteira pode ser definida por:

$$UE = E_{LUMO} - E_{HOMO} = \frac{\hbar^2}{8mL^2} (n_{LUMO}^2 - n_{HOMO}^2) \quad (Eq. 2.1)$$

No estado fundamental, uma molécula com  $N$   $\pi$  elétrons poderá possuir  $N/2$  níveis LUMO ( $n_{LUMO}$ ) e os níveis HOMO vazios.

A energia necessária para a transição eletrônica pode ser calculada através da relação de Planck:

$$E_2 - E_1 = \hbar\epsilon = \frac{hc}{\lambda} \quad (Eq. 2.2)$$

Sendo  $E_2 - E_1 = E_{LUMO} - E_{HOMO}$ ;  $h$  é a constante de Planck =  $6,62 \cdot 10^{-34}$  J.s;  $\nu$  é a frequência da radiação eletromagnética e  $c$  é a velocidade da luz no vácuo.

Dessa forma, para que ocorra a transição eletrônica |HOMO-LUMO| o elétron precisa receber exatamente este pacote de energia (ATKINS, 2006). Quando isso acontece, a molécula, inicialmente em seu estado fundamental singlete ( $S_0$ ) passa a um estado singlete excitado ( $S_1, S_2 \dots S_i$ ), de maior energia e menos estável. A tendência para esta molécula é voltar ao seu estado fundamental, processo conhecido como relaxamento, que pode ocorrer de diferentes maneiras (TACELOSKY, 2012). Podem ocorrer transições radiativas, tais como a fluorescência e a fosforescência ou não radiativas, como o decaimento e o cruzamento intersistema, que ocorre com a geração de um estado tripleto ( $T_1$ ). O diagrama de Jablonski (Figura 2.5) mostra os tipos de excitação e relaxação durante o decaimento dos elétrons (GILBERT, 1991).

A fluorescência é o processo no qual há uma transição proibida  $S_1 \rightarrow S_0$ . Neste processo a energia é emitida na forma de radiação luminosa, ou seja, um fóton. Nota-se que neste processo o elétron parte de um orbital excitado de mesma multiplicidade, promovendo uma transição rápida.

A fosforescência ocorre quando há um decaimento  $T_1 \rightarrow S_0$ , este é, assim como a fluorescência, um decaimento radiativo, onde há a emissão de um fóton de maneira mais lenta do que no primeiro processo, justamente por se tratar de uma transferência entre estado de multiplicidade diferente (GUILLET, 1985).

Os relaxamentos não radiativos, ou seja, sem a emissão de fótons ocorrem com maior frequência. O decaimento não radiativo, pode aparecer tanto numa transição  $S_1 \rightarrow S_0$ , quanto numa transição  $T_1 \rightarrow S_0$ . No caso da primeira, há apenas o decaimento rápido entre os dois estados, com a emissão da energia ( $h\nu$ ). No segundo há uma transição de menor energia e mais lenta, para um novo estado excitado ( $T_1$ ), dessa maneira há rapidamente uma nova transição, seja pelo processo de fosforescência ou pela transferência de energia, processo chamado de cruzamento intersistema (HIKARU, 2010).

Para a TFD o processo de relaxação por transferência de energia é o mais importante, pois dele partem os principais mecanismos de formação de espécies EROS, o mecanismo tipo I e principalmente o tipo II. (PERUSSI, 2007)

A energia da luz de um comprimento de onda específico é absorvido pelo PS, que excita a molécula a partir de um estado singleto fundamental ( $S_0$ ) para um estado de singleto excitado ( $S_1$ ), mais energético. Uma vez neste estado excitado, a molécula tende retornar a um estado fundamental através de fluorescência ou decaimento não radioativo, ou pode ainda fazer um cruzamento intersistemas, que introduz um estado excitado tripleto ( $T_1$ ). Oxigênio molecular existe em um estado fundamental tripleto, e assim uma transferência de energia pode ocorrer entre o estado tripleto do fotossensibilizador e o oxigênio molecular. Esta transferência de energia resulta na geração de oxigênio singleto (TACELOSKY, 2012).

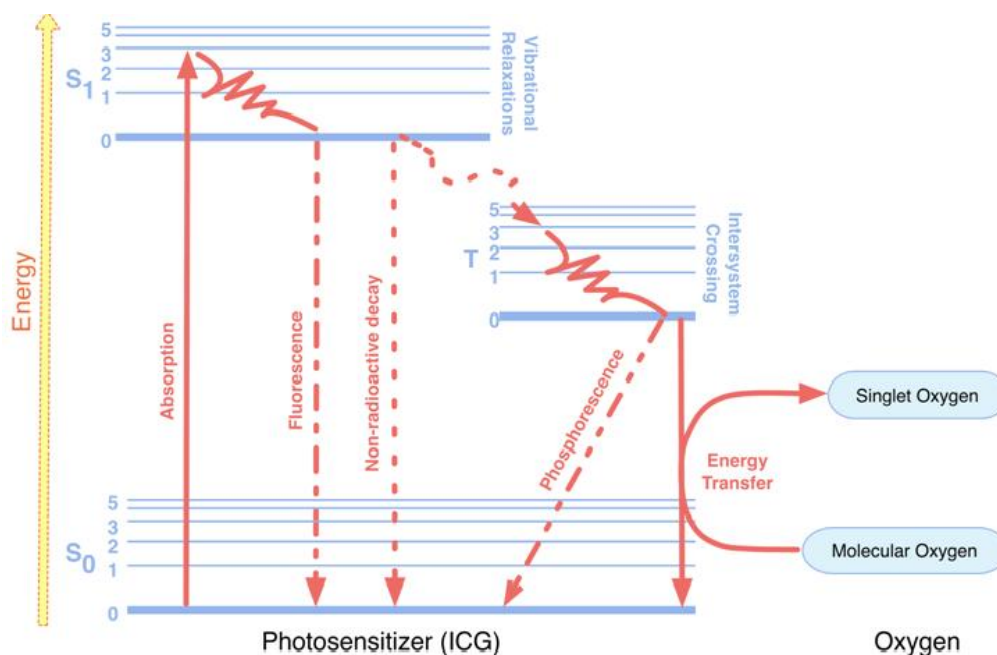
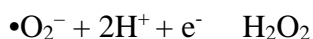
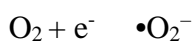
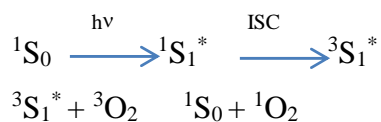


Figura 2.5. Diagrama de Jablonski descrevendo as mudanças nos estados eletrônicos moleculares associados com a TFD (TACELOSKY, 2012).

As reações do tipo I, como discutido anteriormente, são caracterizadas pela formação de radicais livres ( $\bullet\text{OH}$  e  $\text{OH}^-$ ) através da transferência de elétron entre o PS no estado triplete excitado e o oxigênio molecular, formando o ânion-radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). O mecanismo envolvido nessa reação ocorre de acordo com o mecanismo ilustrado a seguir (PERUSSI, 2007):



As reações do tipo II, são as mais frequentes na TFD, onde há a transferência da energia do PS, que volta ao seu estado fundamental, para o oxigênio molecular, promovendo-o a um estado singleto ( $^1\text{O}_2$ ), altamente reativo e capaz de interagir com inúmeros componentes celulares, sendo portanto, altamente citotóxicos. A reação de formação do oxigênio no estado singleto é dada por (PERUSSI, 2007):



## 2.5 A interação da luz com o tecido biológico

Toda luz que é incidida em um material pode interagir com o mesmo de quatro maneiras distintas: Reflexão, refração, dispersão e absorção (HALLIDAY, 2007; RENICH, 2006).

A incidência do laser sobre os tecidos biológicos leva à um processo de interação que envolve a soma dos fenômenos reflexão, refração e absorção. Parte da energia é absorvida, entretanto, parte dela se prede sendo refletida ou espalhada. A Figura 2.6 ilustra este processo de interação (RENISCH, 2006).

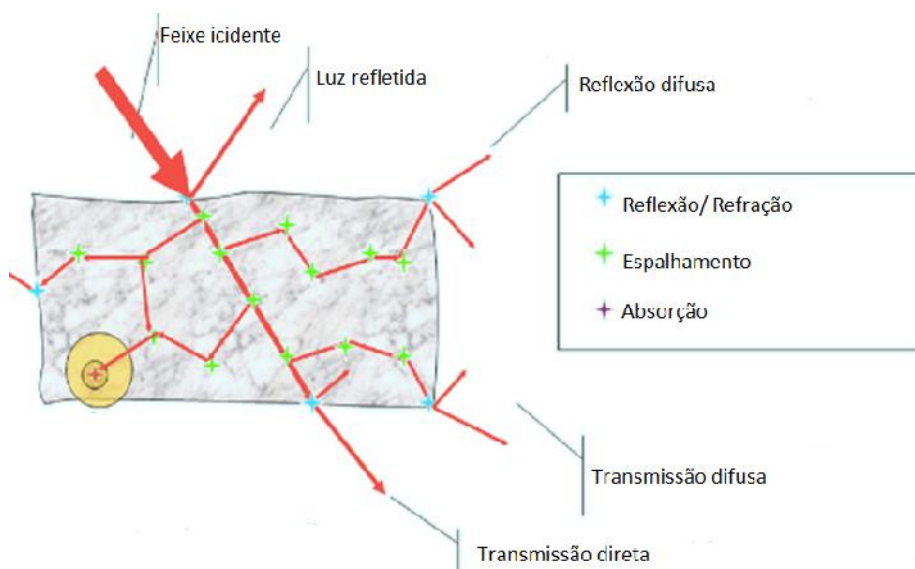


Figura 2.6. Interação da luz laser com os tecidos biológicos: Reflexão, refração e absorção. (RENICH, 2006)

É fato conhecido que a coerência é uma das principais propriedades do laser, porém ao penetrar no tecido biológico essa propriedade se perde nos primeiros extratos da pele. Isso ocorre devido a grande variedade de estruturas celulares que compõem o tecido biológico. O fato de o tecido biológico ser heterogêneo quanto à sua composição, possuindo variabilidade nos índices refrativos; pode desencadear reflexões internas à medida que a luz é absorvida e dispersada. Provocando alargamento espacial do feixe e perda de coerência, o que diminui o efeito da radiação. Apesar disso, a luz é absorvida em tecidos superficiais e profundos podendo gerar alterações metabólicas a nível celular

(KARU, 1995; OSHIRO, 1991). Ao mesmo tempo, moléculas com capacidade de absorção de luz presentes no tecido biológico podem amplificar a interação com o laser. Os cromóforos, moléculas fotorreativas com capacidade de absorção de luz, tais como a hemoglobina e a melanina absorvem luz na faixa visível do espectro. Os aminoácidos presentes na estrutura primária das proteínas absorvem na região do espectro ultravioleta. Por outro lado, os ácidos nucleicos apresentam absorção na região do espectro infravermelho (THOMAS, 1999; SCHMID, 2001; BAXTER, 1997).

De modo geral, quando o laser incide no tecido biológico, tem-se uma perda na intensidade da luz à medida que o órgão a ser tratado se distancia da superfície do corpo. Neste sentido, há um significativo volume de trabalhos que estudam a fibra ótica como meio de viabilizar o tratamento com a TFD em órgãos internos, garantindo que a potência incidida seja a mesma que o laser irradia, e consequentemente certificando a eficácia do tratamento (ZAMADAR, 2011).

## 2.6 Rodamina B: características eletrônicas

A RhB ou Cloreto(o-carboxifenil)-6-(dietilamino)-3H-xanteno-3-ilideno é um composto da família dos xantenos (Figura 2.9). De modo geral, as rodaminas são corantes muito utilizados na fabricação de laser de corante (laser dye) onde em muitos casos atingem 50% de eficiência na conversão de energia (MAHASIN, 2011; SRINIVAS, 2003;).

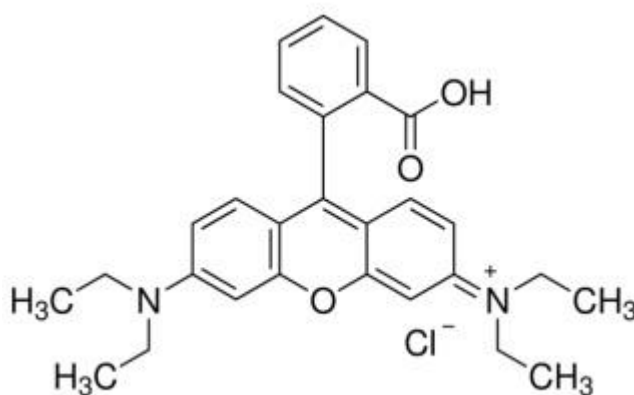


Figura 2.7. Estrutura molecular da RhB.

(Adaptado de PASHA,2007)

Em solução, a RhB pode existir em sua forma protonada, zwitterionica ou na forma incolor da lactona (Figura 2.10). O pKa de equilíbrio entre a forma zwitterionica e catiônica da RhB é aproximadamente 3.2 (ARBELOA, 1981). As conformações catiônicas existem em soluções ácidas, as zwitteriônicas em soluções básicas e a conformação lactônica existe somente em solventes não polares ou polares apróticos. Ambas as formas, catiônicas e zwitteriônicas podem existir em solventes polares (SETIAWAN, 2010; KARPIUK; 1994).

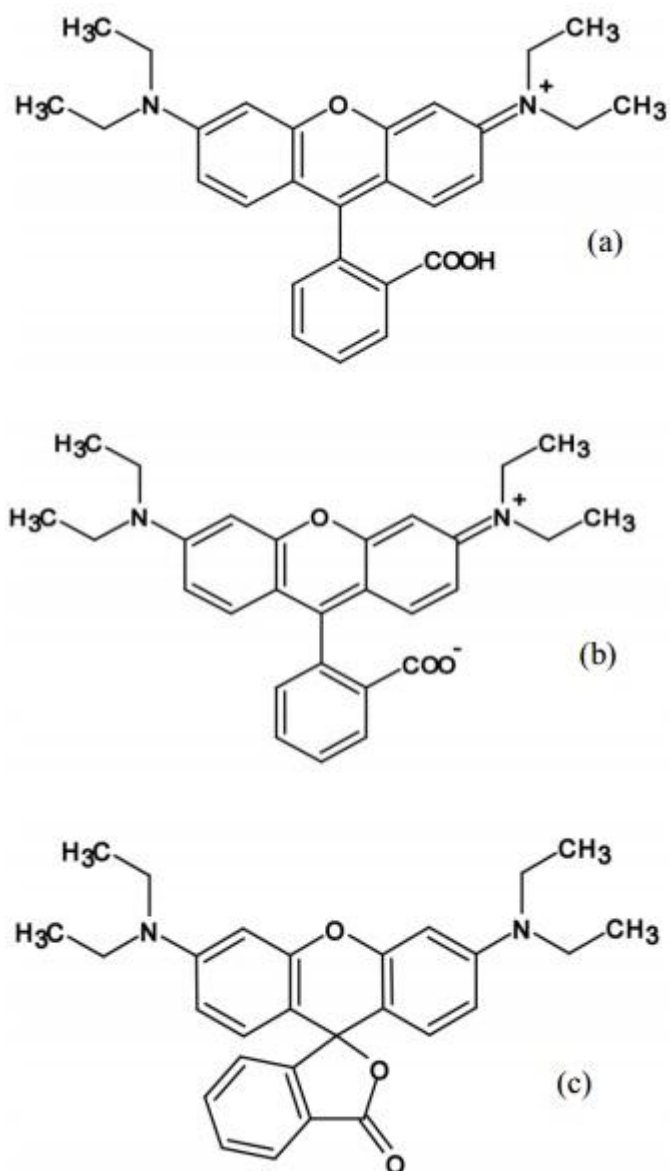


Figura 2.8. Estrutura da RhB: cation, (a) RhB<sup>+</sup>; (b) zwitterion RhB<sup>±</sup> (b)

(Adaptado de ARBELOA, 1981).

Os espectros de absorção e emissão da RhB são mostrados na Figura 2.11. O espectro eletrônico mostra que a RhB possui uma larga banda de absorção na região do visível, tendo um pico bem definido em 557 nm, correspondente as transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  do orbital ligante HOMO para o orbital antiligante LUMO ao longo da maior dimensão do sistema conjugado. O ombro observado em aproximadamente 514 nm corresponde à estrutura dimérica da RhB (CAI, 2001).

As bandas de absorção abaixo de 450 nm representam as transições das estruturas mesoméricas com unidades de conjugação mais curtas e se originam de transições de  $n \rightarrow \pi^*$  do orbital molecular HOMO para o LUMO (ALIG, 2007).

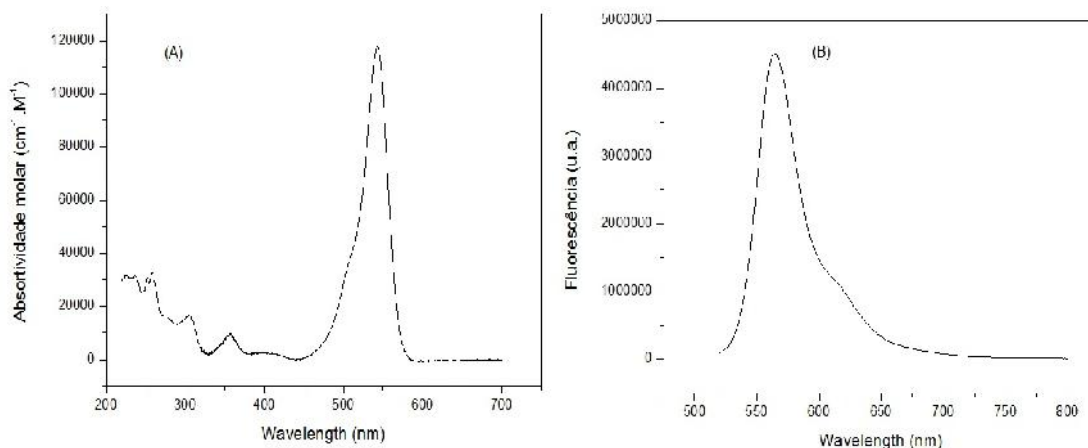


Figura 2.9. Espectros de absorção (A) e emissão (B) da RhB em etanol na concentração  $10^{-4}$  M. Excitação foi efetuada a 510 nm. O espectro de absorção foi realizado em equipamento UV-Vis da Varian, modelo Cary 50. As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Hitachi F-4500. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Os corantes baseados em rodaminas são compostos orgânicos de grande interesse biotecnológico, devido a suas possíveis aplicações em diversos setores da biomedicina (BEIJA, 2009; HIROTATSU, 2001; CAI, 2001; SILVA, 2009). No caso particular do corante RhB, sua característica de absorver e emitir luz está associada à cadeia de átomos com ligações simples e duplas alternadas, a qual é chamada de grupo cromóforo. Nesse caso, a RhB exibe bandas de absorção e fluorescência largas de modo que a fluorescência é deslocada para comprimentos de onda maiores em relação à banda de absorção, formando uma espécie de imagem especular da banda de absorção devido ao princípio de Franck-Condon (PENZKOFÉ, 1987).

Embora algumas rodaminas apresentem toxicidade e mutagenicidade significativas devido principalmente devido à presença de cargas positivas em sua estrutura (NESTMANN, 1979), a RhB no potencial hidrogeniônico fisiológico (pH 7,0) está na sua forma zwitteriônica (carga líquida neutra) (NESTMANN, 1979; ZHAN, 2008).

Atualmente sabe-se que as membranas de células tumorais geralmente possuem carga negativa, devido à elevada expressão de moléculas aniônicas a exemplo da



fosfatidilserina. Por outro lado, as células normais exibem principalmente fosfolípidos zwitteriônicos neutros (BERKOVIC, 2002; ZWAAL, 2007). Sob esse aspecto, a estrutura zwitteriônica da RhB no pH fisiológico poderá contribuir para a toxicidade seletiva do conjugado PGLD-RhB às células neoplásicas.

## **CAPÍTULO 3 – CONCEITOS FUNDAMENTAIS SOBRE O CÂNCER**

---

### **3.1 Introdução**

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, essa enfermidade é vista hoje como um dos principais problemas de saúde mundial, já que este nome pode ser usado para cerca de 100 doenças diferentes, que se caracterizam pelo crescimento desordenado das células de tecidos e órgãos (MOURA, 2011; CÂNCER, 2007). Este crescimento celular anômalo forma tumores malignos que podem se alojar em diferentes partes vitais do corpo humano, tais como boca, nariz, útero, esôfago, intestino e estômago (CÂNCER, 2007).

Segundo o INCA, em 2012 estimava-se que surgissem cerca de 520 mil novos casos no Brasil, Os casos em referência podem se divididos de acordo com o sexo e sua prevalência sendo que em 2012 os casos de câncer de mama, próstata e da cavidade oral foram os de maior incidência, segundo este mesmo instituto (INCA - ESTIMATIVA PARA O CANCER EM 2012, 2007).

Acredita-se que o câncer tem origem em um processo de múltiplas etapas, originados em uma única célula e dependendo do tipo de célula que dá origem ao tumor, pode ser classificado em sarcoma, carcinoma, linfoma, tumor de células germinativas ou blastoma (SPENCER, 2003).

O termo neoplasia denomina esta alteração no crescimento da célula que sofreu mutação, e irá se reproduzir excessivamente, alterando os mecanismos homeostáticos comuns nos tecidos, prejudicando a proliferação das células comuns e muitas vezes resultando na morte das células sadias (SPENCER, 2003).

### **3.2 A proliferação celular e o surgimento do câncer**

A reprodução celular pode se dar por mitose ou por meiose (ALBERTS, 2002). Na primeira, são geradas células diploides, idênticas à original (célula mãe) e na segunda; são geradas células haploides, ou seja, com a metade dos cromossomos da célula mãe. Como

o câncer tem origem durante a divisão mitótica apenas esse tipo de divisão será discutido durante este trabalho.

A primeira fase da replicação celular é a interfase, que é composta por três momentos: G1, S e G2 e esta é seguida pela mitose. A Figura 3.2 ilustra o ciclo de reprodução celular em A as fases da mitose em B (ALBERTS, 2002). G1 e G2, são intervalos de tempo entre a mitose e a síntese, que permitem que a célula monitore as condições internas e externas para que cada uma das fases possa ocorrer em condições ideais.

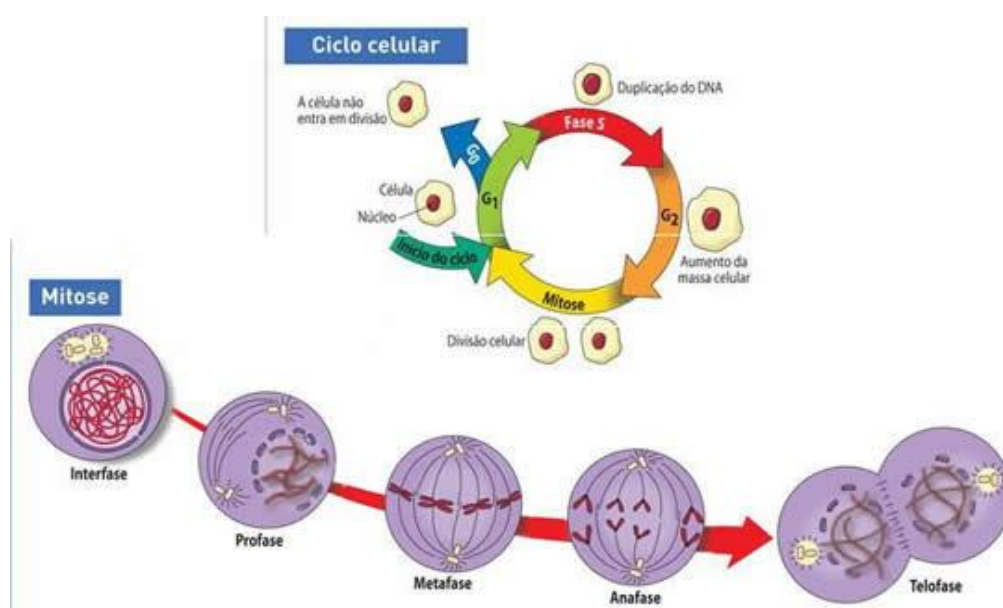


Figura 3.1. (A) ciclo completo da celular de reprodução celular, representando a interfase em G1, S e G2 e seguido da mitose. (B) representação das fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e da configuração na qual os cromossomos se encontram em cada uma delas (Adaptado de ALBERTS, 2002).

O monitoramento das condições celulares em cada etapa do ciclo é feito por proteínas reguladoras (cinases dependentes de ciclina (Cdk) e ciclina), que serão descritas com cada fase do ciclo de reprodução celular (ALBERTS, 2002).

A fase G1 ou Gap 1, é a fase entre a mitose e a síntese, neste momento a célula monitora se as condições intra e extracelulares são favoráveis à replicação, caso alguma condição seja desfavorável a célula entra em um estado chamado de G0, onde não há a multiplicação. Se as condições são as desejáveis ocorre o ponto de restrição, que marca o início da replicação celular. O início da divisão celular é marcado pela formação do complexo S-

ciclina/Cdk, esse complexo, que dura por toda fase S estimula a replicação cromossômica (JUNQUEIRA, 2005).

Por sua vez, a fase S, recebe este nome por ser a etapa onde ocorre a síntese do DNA, que compõe os cromossomos. Nesta fase há a duplicação dos cromossomos, onde cada um deles recebe uma cópia idêntica. Para que o ambiente na célula filha seja igual ao da célula mãe, todos os componentes celulares devem ser replicados, assim, ainda durante esta etapa os componentes proteicos e o centrôssomo também são duplicados. A replicação do DNA é iniciada pela S/Cdk, entretanto, é necessário que haja um controle para que a réplica do DNA não seja feita mais de uma vez por ciclo. Assim a S/Cdk desencadeia também a formação de complexos de pré-replicativo (pré RC), ainda durante G1. Posteriormente, no início da fase S forma-se o complexo de pré- iniciação, responsável por desenrolar a fita de DNA (Figueiredo, 2004).

A fase G2 ou Gap 2 é onde a ocorre o aumento do volume celular, para que ocorra a mitose. Nesta fase há a formação do complexo M-ciclina/Cdk (M-Cdk), que dá início à mitose. A mitose divide-se em 4 Fases: Prófase, metáfase, Anáfase e telófase (JUNQUEIRA, 2005).

A prófase é a fase onde ocorre o início da condensação dos cromossomos duplicados na síntese, pois ao final desta, as longas cadeias de DNA (cromatídeos irmãs), encontram-se ainda emaranhadas, elas começam então a se separar e se condensar até formarem curtas cadeias cilíndricas. A fim de promover a separação das cromatídeos irmãs (para que haja a divisão celular) a M-Cdk induz a criação do fuso, um arranjo bipolar formado por microtubulos, que será responsável por esta separação durante a anáfase. Estes fusos, entretanto, se formam no citoplasma celular e são separados das cromatídeos irmãs por uma barreira constituída por duas membranas, chamadas de envelope nuclear, que se desfaz em pequenas vesículas, marcando o final da prófase (LEHNINGER, 2000).

É na metáfase onde as cromatídeos se ligam ao fuso mitótico na sua região equatorial. O fuso é composto por microtubulos interpolares, cujos polos negativos ficam apontadas para as extremidades polares, que terminam em cada um dos dois centrôssomos presentes no citoplasma. Os polos positivos se aproximam, na região equatorial do fuso, formando regiões positivas nesta faixa (Figura 3.3) (ALBERTS, 2002). Outro tipo de microtubulos presente no fuso são os microtubulos do cintecoro, que se ligam ao cintecoro (estrutura proteica formada no centro do cromossomo), separando as cromatídeos irmãs e prendendo-as na região equatorial da célula.

Na Anáfase ocorre um encurtamento do fuso do cintecoro, separando as cromatóides e formando dois cromossomos filhos idênticos. Nessa fase, as proteínas motoras exercem uma força e fazem que os fusos encurtem em direção ao aos polos negativos, fazendo com que os cromossomos se separem ocupando as extremidades opostas na célula.

A fase final da divisão celular é a telófase. Nesta etapa os cromossomos chegam aos polos negativos e as cromatóides irmãs se separam do fuso, que se desfaz. Ao final da mitose as ciclinas são destruídas, o que inativa as Cdks, um novo ivólucro (núcleo filho) é montado em volta de cada cromatóides irmã, separando-as completamente. Marcando o final da mitose (FIGUEIREDO, 2004).

Ao final da mitose, a célula já foi duplicada, os cromossomos já foram devidamente separados e novos núcleos construídos, restando apenas a separação de cada uma das células filhas. Isso ocorre no evento chamado citocinese, que divide o citoplasma (LEHNINGER, 2000; CAMPBELL, 2000; POLLOCK, 2006).

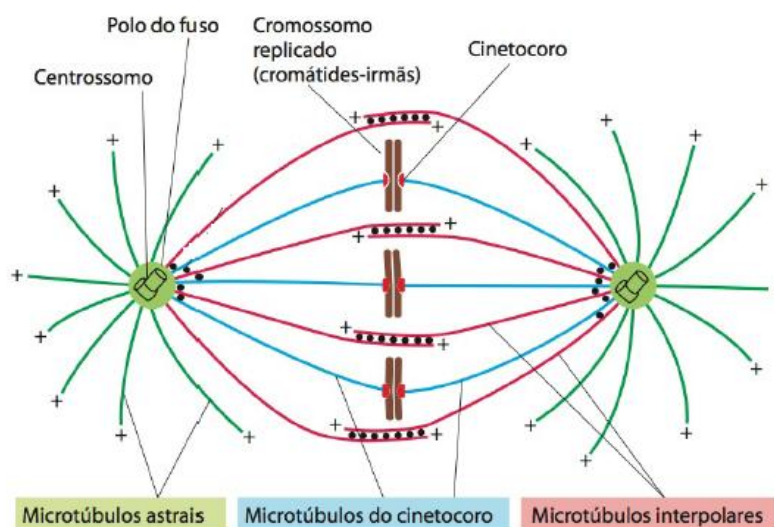


Figura 3.2. Representação dos centrosomos interligando microtubulos do fuso mitótico, apresentando os microtubulos astrais (verde), do cinetocoro (azul) e interpolares (vermelho) e suas polaridades, bem como as cromatóides irmãs ligadas pelo cinetocoro à região equatorial do fuso do cintecoro (ALBERTS, 2002).

O processo de formação do tumor recebe o nome de carcinogênese e pode ser dividido em 3 estágios: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é onde ocorre a

mutação genérica, que resulta nos oncogenes. A etapa de promoção é onde as células que sofreram a iniciação começam a se transformar em neoplásticas, iniciando a proliferação das células que passaram pela iniciação. A terceira e última etapa é a progressão, onde há um crescimento da massa tumoral e a evolução do tumor até a metástase (CAMPBELL, 2000; BOWMAN, POLLOCK, 2006).

Quando ocorre um erro genético e uma célula filha desenvolve uma mutação, todo seu DNA será copiado e suas células filhas receberão o mesmo erro. No caso do câncer, essa mutação desencadeia uma reprodução celular anômala, que normalmente leva as células à morte por apoptose.

As proteínas reguladoras do ciclo de reprodução celular tem a função de garantir que a célula não se reproduza até que o erro seja corrigido, entretanto, algumas vezes este controle falha ou é inibido pelas células mutantes, causando a proliferação celular desordenada (POLLOCK, 2006). Os genes responsáveis por produzir ou inibir a produção das proteínas que ativam cada fase do ciclo celular são chamadas proto-oncogenes e oncogenes supressores, respectivamente (LOPES, 2002). Quando estes sofrem algum tipo de mutação eles tornam-se oncogenes, levando à produção exagerada das proteínas iniciadoras do ciclo ou à inibição da produção das proteínas supressoras, resultando em um descontrole da replicação celular (POLLOCK, 2006; BOWMAN, 2000).

Existem duas rotas diferentes pelas quais o câncer pode se desenvolver. Em um primeiro momento, uma proteína reguladora que tem a função de iniciar o ciclo de reprodução está hiperativa e em uma segunda rota uma proteína inibidora está inativa. Em ambos os casos o resultado seria o crescimento celular rápido e desordenado, que caracteriza crescimento de tumores (RIVOIRE, 2000).

Para que um tumor seja considerado maligno, além de possuir um fator de crescimento alto, as células tumorais devem ignorar as restrições impostas pelo meio externo, principalmente pelas células vizinhas, que não são mutantes (INCA, s.d.). Dentre os fatores que podem gerar tais mutações estão a radiação, as mutações cromossômicas, os agentes quimioterápicos e as infecções virais, sendo este último fator o primeiro a ser descoberto em 1909.

Dependendo da proteína reguladora e da parte do ciclo que é afetado, a célula perde diferentes funções tais como a programação da morte celular (apoptose), o controle do número de vezes que a célula já se dividiu, a capacidade da célula de avaliar as condições

externas antes da replicação e o controle na replicação dos cromossomos (ALBERTS, 2002).

Atualmente a literatura aponta a proteína p53, uma proteína plasmática de peso molecular igual 53 kDa como o mais importante gene TP53, um importante gene formador do câncer, sendo denominado de “guardião do gene” humano (SIDRANSKY, 1996). O gene p TP53 é considerado na literatura um gene supressor de tumor, ou seja; quando sofre mutações o TP53 exerce um efeito negativo dominante induzindo o câncer, atuando como um oncogene (FINLAY, 1989).

A grande importância clínica do gene TP53 reside no fato de que um grande número de publicações relatam seu papel no funcionamento celular normal e neoplásico envolvendo praticamente todos os tipos de células. Sua alteração em vários tipos de câncer já foi relatada na literatura destacando-se as leucemias, linfomas, tumores da mama, carcinomas de pulmão, gastrointestinais, tumores ósseos e de pele (JOHNSON, 1998; BATES, 1999; MOORE, 1992; STOKLOSA, 2005; SARASIN, 2003; TORNALETTI, 1993).

### **3.3 Mecanismos de destruição do tumor pela terapia fotodinâmica**

Quando é feito o tratamento de um tumor com a TFD é induzido como resposta uma mistura de morte celular por apoptose e necrose, o que é incomum para agentes citotóxicos, que usualmente matam apenas por apoptose (SCHEFFER, 2003). Para maior especificidade do tratamento a apoptose mostra-se mais interessante para a TFD, pois não apresenta uma resposta inflamatória e ao mesmo tempo evita uma possível inflamação de células sadias adjacentes (CASTANO, 2005). Além destes dois mecanismos principais, uma característica importante da TFD é sua capacidade de ativação do sistema imune por células tumorais remanescentes (GUERRA, 2007).

Quando se inicia o tratamento e há a geração de EROS, inicia-se a morte celular por necrose ou apoptose, devido a reação das EROS com os componentes celulares, tais como a membrana celular, enzimas, DNA e fosfolipídios (WEN; GARG, 2004). Com a lesão e posterior destruição do sistema de irrigação celular, a célula tumoral é privada

também de nutrientes e oxigênio, contribuindo com o processo de morte celular (CASTANO,2006). A Figura 3.4 ilustra os processos celulares desencadeados pela TFD.

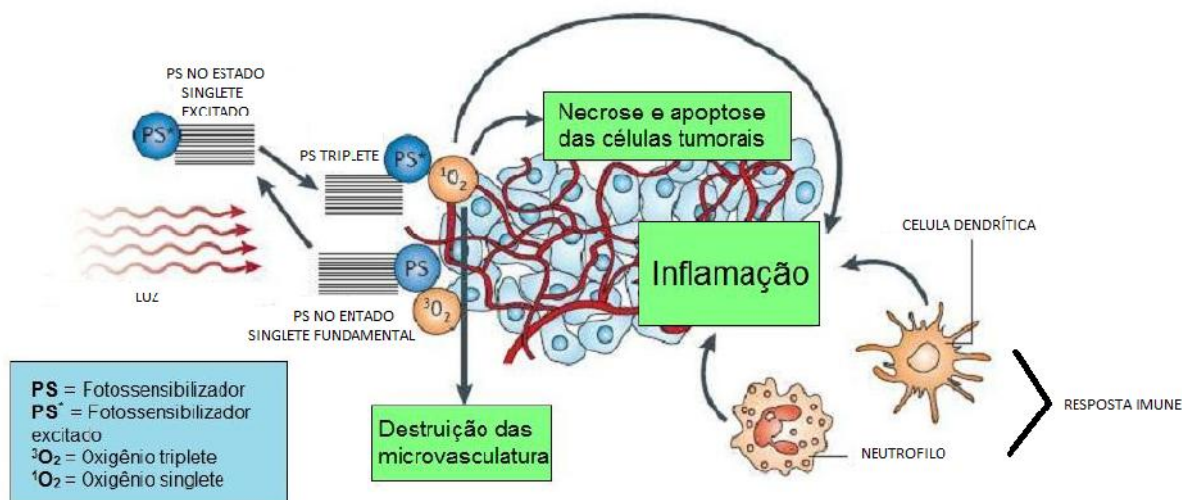


Figura 3.3. Mecanismos celulares ativados através da TFD. Apoptose, necrose, destruição da microvasculatura que irriga as células e resposta imune gerada através do processo de inflamação (Adaptado de CASTANO, 2006).

A morte celular por necrose é um processo passivo e catabólico de morte celular patológica, que geralmente ocorre em resposta a fatores tóxicos externos, tais como inflamação, lesão isquêmica ou tóxica (ALBERTS, 2002). Em contraste, a apoptose é uma via de morte ativa, metabólica, geneticamente codificada e selecionada evolutivamente. A morte celular por apoptose ocorre, quer sob condições fisiológicas ou patológicas (WU, M; DING, HF; FISHER, DE, 2001). Na Figura 3.5, pode-se observar as características morfológicas da célula durante o processo de necrose e apoptose.



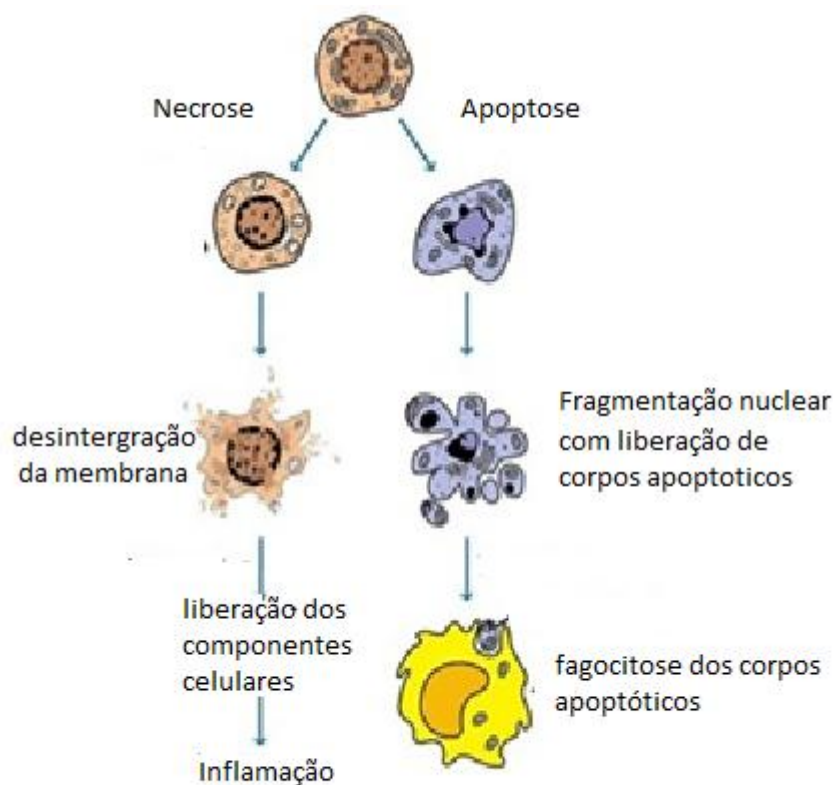


Figura 3.4. Características morfológicas da apoptose e da necrose (BERKLEY, 2009).

### 3.3.1 Morte celular por apoptose

Termo derivado do grego antigo significa “queda ou caída” e se refere à caída das pétalas das flores ou das folhas das árvores durante o outono. Esta analogia salienta que a morte da matéria viva é parte integrante e necessária do ciclo da vida dos organismos (LEIST, 2001). A palavra foi descrita pela primeira vez por John Kerr em 1970 e refere-se à característica morfológica de formação de "corpos apoptóticos" a partir de uma célula (LAWEN, 2003).

A apoptose caracteriza-se pela morte celular programada e é um processo natural e essencial no corpo humano, imprescindível para a eliminação de células desnecessárias e/ou defeituosas. Geneticamente programado, este processo abrange uma série de alterações morfológicas e bioquímicas no citoplasma, membrana plasmática e no núcleo, sendo induzidos como resposta a estímulos intra e extracelulares (GRIVICICH, 2007).

Os processos apoptóticos são de importância biológica generalizada, estando envolvidos, por exemplo, no desenvolvimento, diferenciação, proliferação/homeostase, regulação e função do sistema imunológico e na eliminação de células prejudiciais.

A apoptose, também exerce um papel oposto à mitose na manutenção de populações celulares. Estima-se que diariamente, cerca de 1.000 células morrem em um ser humano adulto para garantir a homeostase dos tecidos e estima-se que, dentro de um ano típico, a massa celular que uma pessoa perde por morte celular é quase equivalente à totalidade do seu peso corporal (SCHEFFER, 2003). A morte celular por apoptose desempenha um papel importante nos processos dinâmicos, tais como remodelação tecidual e respostas ao estresse (WU, 2001).

A apoptose é também um mecanismo de proteção. O excesso de morte celular pode contribuir para a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), doenças neurodegenerativas como Alzheimer e síndromes de Parkinson e lesões isquêmicas tais como enfarte do miocárdio. Entretanto a falta da mesma podem levar ao câncer, infecção viral persistente, ou desordens autoimunes (WU, 2001).

Uma família evolutivamente conservada de proteases de cisteína, chamado caspases, é responsável pela maioria das alterações morfológicas observadas durante a apoptose (ELLIS, 1991). Esta ação sucede de forma relativamente rápida, ocorrendo uma retração da célula, causando a perda de aderência com as células vizinhas e a matriz extracelular. As organelas celulares mantêm a sua morfologia característica, exceto pelas mitocôndrias, que podem apresentar, às vezes, uma ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação, agrupando-se junto à membrana nuclear, onde esta permanece intacta. Logo após, a membrana celular forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se reduz a fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e se rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER, 2004).

### **3.3.2 Morte celular por necrose**

O termo necrose foi usado pela primeira vez por morfologistas para se referir a uma série de alterações que acompanham a morte celular, principalmente resultando da ação de

enzimas de degradação em células letalmente feridas (WILLERSON, 1977). Células necróticas são incapazes de manter a integridade da membrana e seus conteúdos muitas vezes escapam do interior da célula, gerando um processo inflamatório, diferentemente da apoptose.

Morfologicamente, a necrose é bastante diferente da apoptose "clássica". Durante a necrose, inicialmente as células incham, em seguida as membranas plasmáticas se colapsam e as células são rapidamente lisadas. Características bioquímicas da apoptose, como a ativação de proteases específicas (caspases) e fragmentação de DNA oligonucleosomal são geralmente ausente em células necróticas (PROSKURYAKOV, 2003).

Apesar da ideia de que a necrose é uma forma descontrolada de morte celular, vários estudos sugerem que esta afirmação pode não ser verdadeira. Pelo contrário, parece que a morte celular por necrose pode ser um evento regulado que contribui para o desenvolvimento e para a manutenção da homeostase do organismo (ZONG, 2006).

Uma vantagem evolutiva conferida por necrose é que ela permite as células de recrutar ativamente uma resposta defensiva ou reparativa a regiões de organismos multicelulares, que tenham sofrido danos ou invasão (ZONG, 2006).

Pode-se afirmar que a morte celular necrótica não é o resultado de uma cascata de sinalização bem descrita, mas sim, a consequência da extensa interligação entre vários acontecimentos bioquímicos e moleculares, em diferentes níveis celulares (FESTJENS, 2006).

Finalmente, a última etapa da destruição celular por necrose é a ativação de proteases. Em diversos modelos de necrose, esta destruição é executado por caspases, entretanto, em muitos casos a inibição destas caspases durante tensões pode provocar necrose ao invés de suprimir. (PROSKURYAKOV, 2003).

## CAPÍTULO 4 - OBJETIVOS

---

A TFD tem demonstrado resultados promissores no combate às neoplasias malignas e seu sucesso está associado, entre outros fatores, à seleção de um fotossensibilizador adequado.

A utilização da RhB como agente PS está associado às suas propriedades fotoquímicas quanto ao rendimento quântico na geração de espécies EROS e ao mesmo tempo sua seletividade inerente para as células tumorais.

A ligação covalente da RhB ao dendrímero PGLD constitui uma técnica para otimizar o tratamento do câncer através da vetorização do agente PS visando melhorar sua seletividade e acumulação no tecido tumoral.

O objetivo principal deste trabalho consiste na avaliação das propriedades físico-químicas e bioquímicas do conjugado PGLD-g-RhB (g = enxerto ou ligação covalente). Neste sentido, os seguintes objetivos específicos dessa dissertação foram definidos:

- (a) Investigar a possibilidade de desenvolvimento de novos sistemas macromoleculares para aplicação clínica da TFD, visando a obtenção de novos fármacos com propriedades biocompatíveis.
- (b) Desenvolver metodologia de acoplamento químico entre PGLD e RhB com o propósito de se desenvolver macromoléculas arborescentes anfifílicas, cuja polaridade possa ser alterada pela adição de cadeias laterais.
- (c) Avaliar as propriedades espectroscópicas (eletrônica e vibracional) do sistema PGLD-g-RhB.
- (d) Efetuar a caracterização óptica via processo de absorção de 2 fótons do PGLD-g-RhB.
- (e) Analisar a estabilidade térmica do PGLD-g-RhB.
- (f) Estudar em condições *in-vitro* a citotoxicidade contra células de mamífero do PGLD-g-RhB.
- (g) Identificar a propriedade físico-química coeficiente de partição óleo-água do sistema do PGLD-g-RhB.
- (h) Avaliar a efetividade da TFD com o sistema PGLD-g-RhB em células da linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral (OSCC-09).

## CAPÍTULO 5 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Síntese e caracterização do PGLD

Para a síntese do PGLD foi utilizado um núcleo oligomérico de poliglicerol (PGL). O núcleo oligomérico utilizado para a síntese foi preparado a partir da eterificação da glicerina sob aquecimento (230°C), utilizando o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,34% m/m) como catalizador em atmosfera de nitrogênio sob pressão de 50 mmHg e destilação azeotrópica da água reacional obtendo-se o núcleo oligomérico de decaglicerol ou poliglicerina (PGL-10). O mecanismo da oligoeterificação segue um mecanismo de reação de Williamson onde o glicerol sofre desprotonação em meio alcalino (WILLIANSO, 1850; GERMAIN, 1949; ASPINALL, 1997). O rendimento da reação foi maximizado conduzindo a reação em duas fases, sendo a primeira rica em glicerol (contendo o catalisador alcalino) e a segunda contendo olefina, formando poliéteres que podem ser facilmente separados (PAGLIARO, 2007; SILVA, 2008).

A purificação do PGL-10 obtido foi feita através da destilação azeotrópica da glicerina não reagida, com tolueno sob pressão de 10 mmHg (p.e. = 85 °C). A reação de eterificação do glicerol para obtenção do PGL-10 está ilustrada na Figura 5.1.

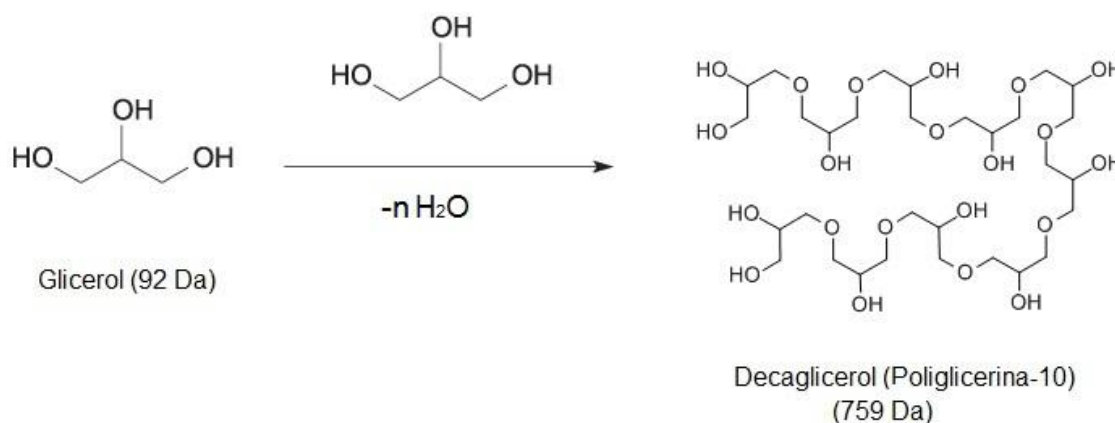


Figura 5.1. Ilustração no da reação de obtenção núcleo oligomérico de PGL-10. O índice n representa o número de moléculas de água removidas durante a reação. Para  $n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$  e  $9$ ; os oligômeros formados são: diglicerol, triglicerol, tetraglicerol, penta pentaglicerol, hexaglicerol, heptaglicerol, octaglicerol, nonaglicerol e decaglicerol; respectivamente.

O índice de hidroxila ( $N_{OH}$ ) do PGL-10 foi determinado após acetilação do polímero (0,5-0,6 g) com 10 mL de uma solução de anidrido acético/piridina (1:9). Após refluxo por 30 minutos a solução resultante foi titulada com KOH 1,0 M utilizando-se fenolftaleína como indicador. O  $N_{OH}$  foi calculado de acordo com a Equação 5.1 (UNITED STATE PHARMACOPEIA, 1985):

$$N_{OH} = \frac{V_2 - V_1 \times 56,1}{m} + N_A \quad (5.1)$$

sendo  $N_{OH}$  o índice de hidroxila (mgNaOH/g de polímero),  $V_1$  o volume de KOH utilizado na titulação da prova “branca”,  $V_2$  o volume de KOH utilizado na titulação da amostra,  $m$  a massa de PGL-10 empregada e 56,1 representa o equivalente-grama do KOH.  $N_A$  representa o número (ou índice) de acidez da amostra.

O  $N_{OH}$  pode ser utilizado para determinar o nível de avanço do processo de eterificação do glicerol, estando relacionado com sua massa molecular (MM) e funcionalidade (F) através da Equação (5.2):

$$MM = \frac{F \times 56,1}{N_A + N_{OH}} \quad (5.2)$$

Sendo  $N_A$  o número de acidez. Por sua vez, F representa o número de hidroxilas por mol de PGL-10.

A determinação de  $N_A$  foi efetuada após a titulação de 0,2 g de PGL-10 previamente dissolvido em mistura de água/etanol (2:1) com solução padronizada de KOH 0,05 M, utilizando-se fenolftaleína como indicador até aparecimento de coloração rosa. Todas as medidas foram determinadas em triplicata e o cálculo de  $N_A$  foi efetuado através da Equação 5.3 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1985):

$$N_A = \frac{V_{KOH} \times 0,1 \times 56,1}{m} \quad (5.3)$$

Sendo  $N_A$  [mg KOH/g PGL-10] o número de acidez,  $V_{KOH}$  [L] é o volume de solução de KOH utilizada na titulação, 0,1 é a normalidade da solução de KOH, 56,1 representa o equivalente-grama do KOH e  $m$  a massa da amostra.

A relação entre a perda de água e a evolução da massa molecular dos oligômeros de glicerol está representada na Figura 5.2. A massa de água removida durante o processo de esterificação do glicerol foi determinada em separador Dean-Stark. Observa-se uma boa relação linear entre a quantidade de água removida durante o processo de desidratação ( $n$ ) e a evolução da massa molecular do poliéter (MM), sendo observado um coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,999 ( $MM \text{ (Da)} = 75,51n + 90,18$ ).

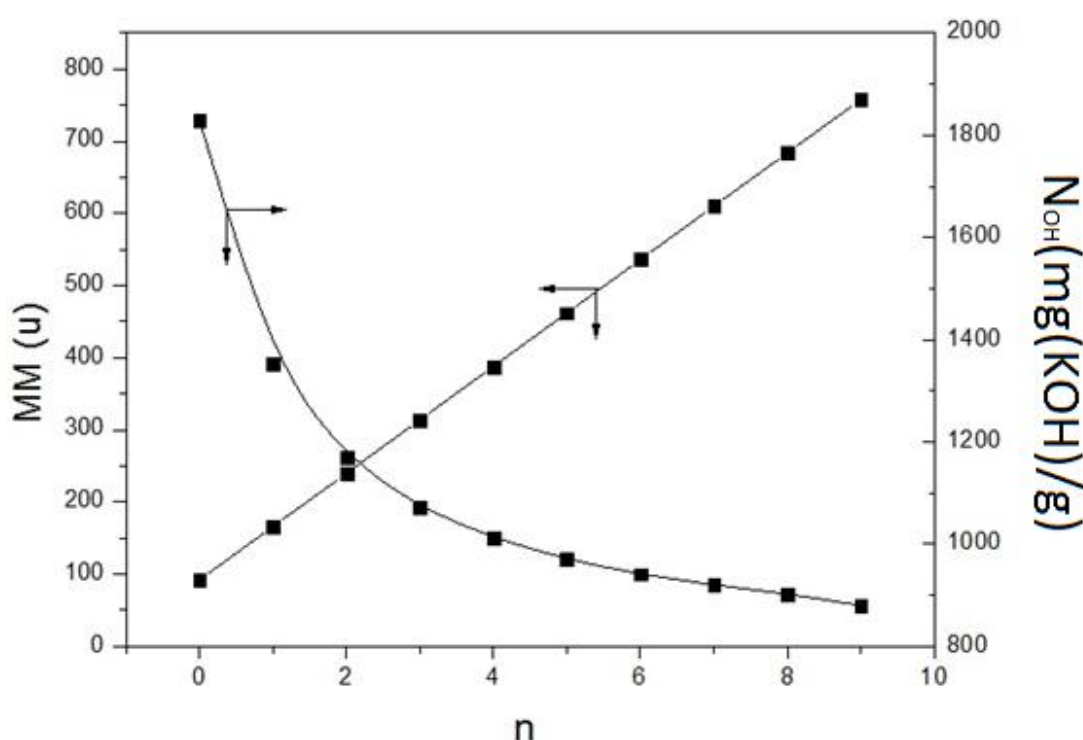


Figura 5.2, Relação entre massa molecular (MM) e o número de desidratações ( $n$ ) envolvidas no processo de oligomerização do glicerol.

A Figura 5.2 também apresenta os resultados de  $N_{OH}$  em função de  $n$ . Foi observada uma redução de  $N_{OH}$  inerente ao processo de esterificação, sendo que para o PGL-10 o valor de  $N_{OH}$  determinado foi igual a 895,1 mg(KOH)/g, equivalente à um número hidroxilas igual a 12 e MM de 762,1 g/mol.

A Figura 5.3 ilustra o espectro de massa (EM) do PGL-10. Uma quantidade de aproximadamente 10 mg de amostra foi solubilizada em 10 mL de solução água:metanol

(1:1) sendo adicionado 0,1% de hidróxido de amônio. Os espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS foram adquiridos no modo negativo, num espectrômetro de massa Q-TOF2 Micromass (Manchester, UK). Para as análises por, 2-5  $\mu\text{L}$  de solução contendo o PGL-10 foi diluída em 200  $\mu\text{L}$  de uma solução 50:50:0.1 (v/v/v) de água:metanol:ácido fórmico. As amostras foram introduzidas na fonte de ESI a um fluxo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Tanto nas análises por MS como nas análises por MS/MS a resolução do analisador de massa de tempo de voo (TOF) foi estimada em aproximadamente 10.000. A voltagem do cone foi de 35 V e a voltagem aplicada no capilar foi de 3 kV. A temperatura da fonte foi ajustada para 80 °C e a temperatura de dessolvatação foi de 150 °C. Os espectros de MS/MS foram obtidos utilizando argônio como gás de colisão, estando as energias de colisão situadas entre os 20 e 45 eV. Os resultados foram processados utilizando o software MassLynx.

A análise do EM permite a identificação dos íons de massa referente ao PGL-10, pois a massa molar do glicerol é 92 u. Uma vez que a cada etapa de desidratação 1 mol de glicerol (massa molar 92 u) é incorporado após a perda de uma molécula de água, se terá a massa molecular de 166 Da para o diglicerol. O processo de eterificação para formação do PGL-10 leva à perda de 162 Da de água, o que fornece uma massa molar para o PGL-10 igual a 758 u. A análise dos espectros de massa de ESI-MS revelou um valor de  $m/z$  igual a 757,3, correspondente ao [PGL-10 – H].

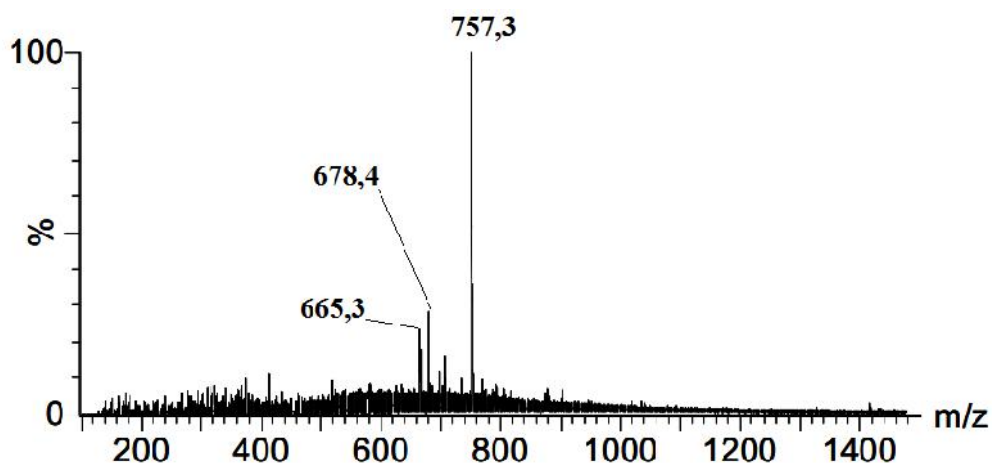


Figura 5.3. Espectro de ESI-MS obtido para o PGL-10.



Os dendrímeros PGLD's de gerações (G) 0, 2 e 4 foram sintetizado pelo método divergente seguindo-se uma sequência catalítica repetitiva de alilação e di-hidroxilação a partir do núcleo de PGL-10, seguindo metodologia adaptada da literatura (HAAG, 2001, MOURA, 2011; STUMBÉ, 2001; JAYARAMAN, 1998; SUNDER, 1998; SUNDER, 1999; SUNDER 2000). A Figura 5.4 ilustra o processo de obtenção do PGLD a partir do núcleo de PGL-10.

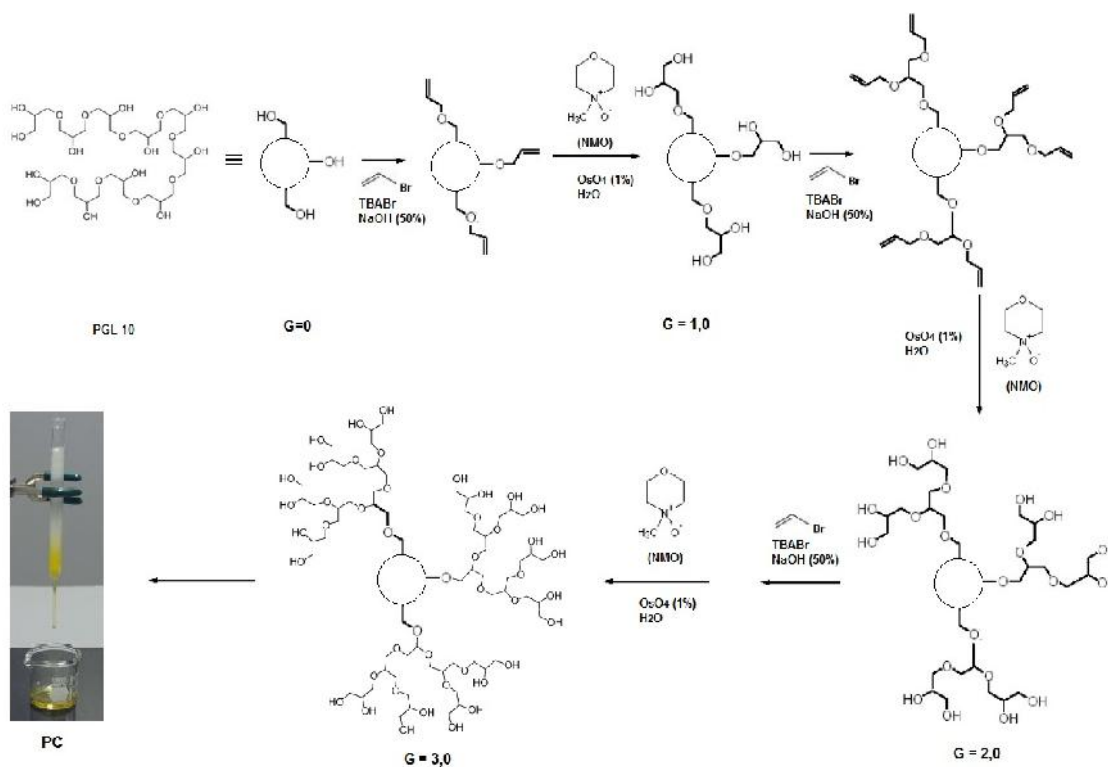


Figura 5.4. Ilustração do processo de síntese dos PGLD G = 1, 2, 3 e 4 utilizando a rota sintética adaptada de Williamson. TBABr = Brometo de tetrabutil amônio, NMO = N-óxido de N-metil morfolina, OsO<sub>4</sub> = tetróxido de ósmio (solução aquosa), PC = purificação cromatográfica.

A pureza dos PGLD's (G = 0, 2 e 4) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi observado o tempos de retenção ( $t_R$ ) de 28,6 min. para o PGLD de geração 3 (G = 3,0) (Figura 5.5-A). A dependência de  $t_R$  em função de G está ilustrado na Figura 5.5-B. Os valores do tempo de retenção neste sistema de análise (filtração em gel) estão diretamente relacionados com o tamanho molecular do composto que está sendo analisado, portanto, o PGLD de maior G apresentará a filtração mais lenta por ser a molécula maior. O melhor ajuste na análise da dependência de  $t_R$  em função de G indicou ser o exponencial (Fig. 5.5-B).

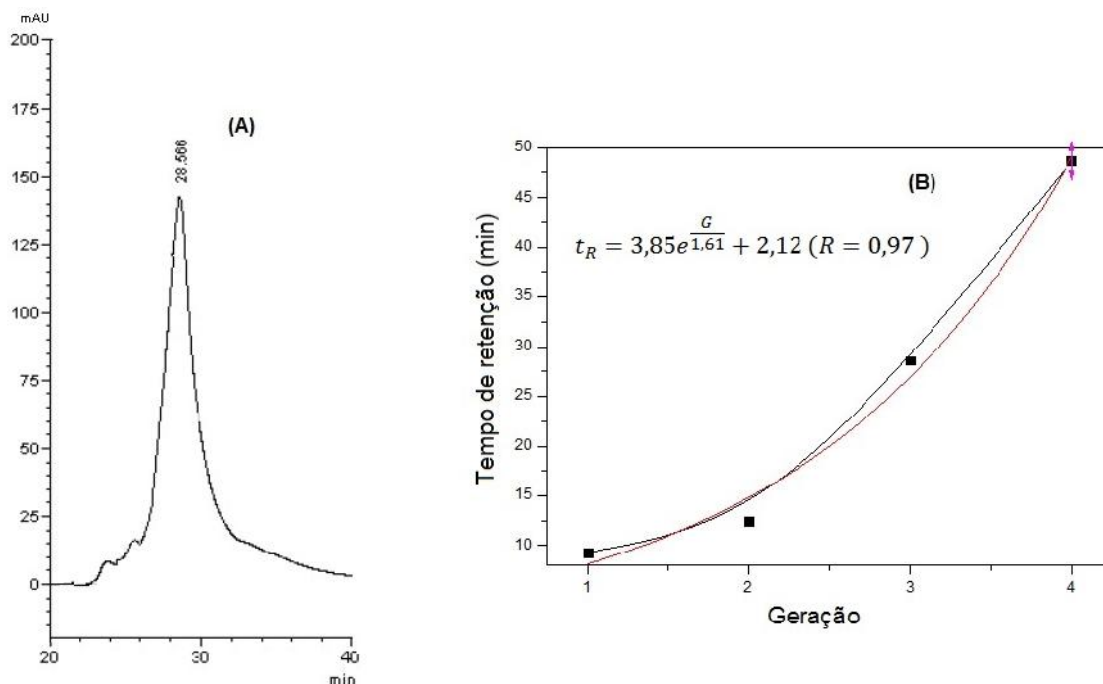


Figura 5.5. Perfil cromatográfico CLAE do PGLD (G3) (A) e dependência entre  $t_R$  e o número de geração do PGLD (B).

O rendimento do processo de síntese foi de 88% ( $G=3,0$ ), tendo os PGLD's obtidos as seguintes características espectroscópicas (os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Bruker ARX300 a 300 MHz e 75 MHz, respectivamente): RMN-H (Figura 5.6-A, 300 MHz,  $D_2O$ ), deslocamentos ( , ppm): 4,8 (OH); 4,04 ( $CH_2-OH$ ;  $CH-OH$ ;  $CH_2-O-CH_2$ ;  $CHO-CH_2$ ); RMN- $^{13}C$  (Figura 5.6-B, 75 MHz,  $D_2O$ ), deslocamentos ( , ppm): 64-64 ( $CH-CH_2-O-CH_2$ ) 70-75 ( $CH-OH$ ;  $O-CH_2$ ;  $CH_2-OH$ ) E 80( $CHO-CH_2$ ). Os sinais obtidos na espectroscopia de RMN estão em boa concordância com os valores da literatura (HAAG, 2001, MOURA, 2011; STUMBÉ, 2001; JAYARAMAN, 1998; SUNDER, 1998; SUNDER, 1999; SUNDER 2000).

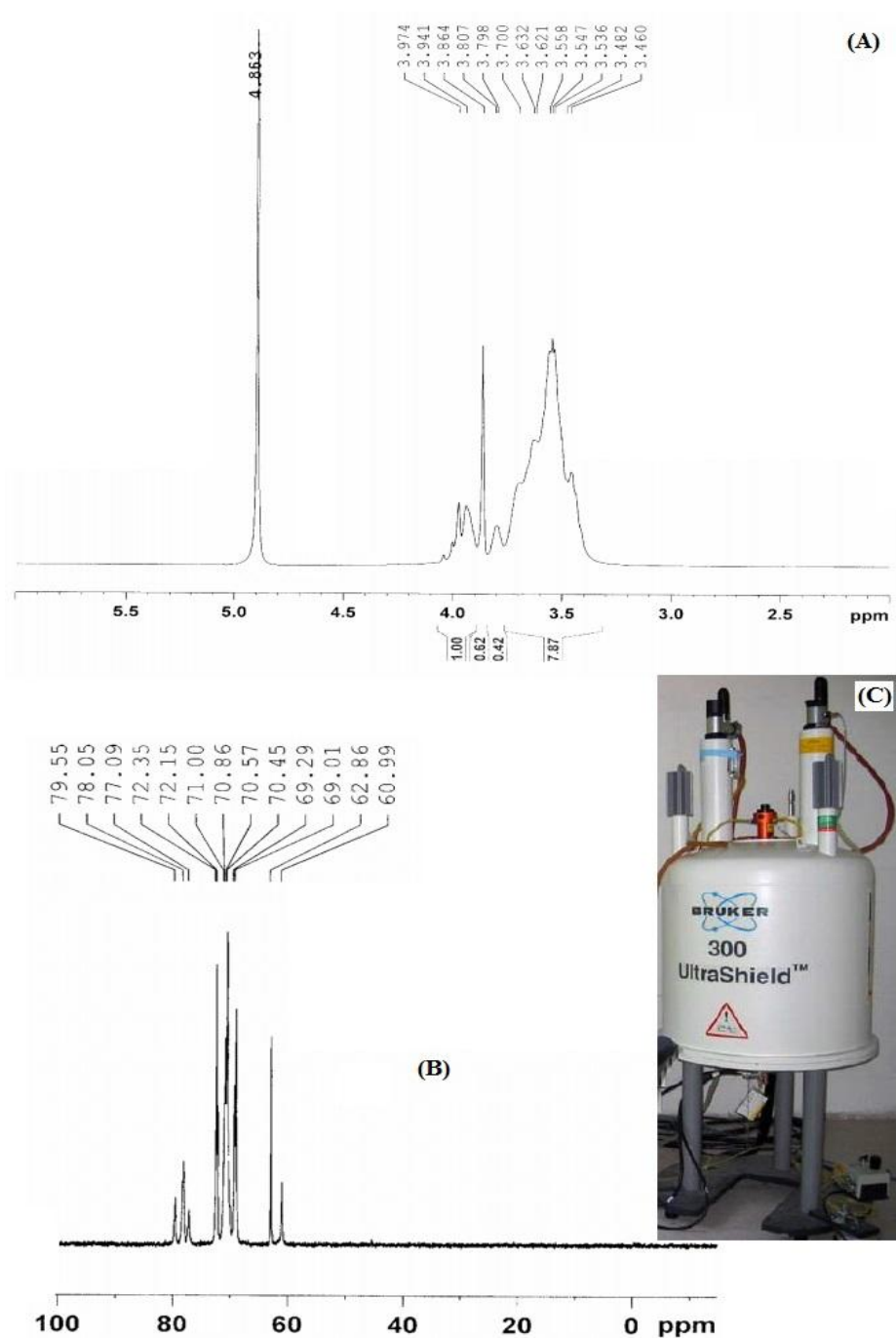


Figura 5.6. Espectro RMN- $^1\text{H}$  (A) e RMN- $^{13}\text{C}$  (B) do PGLD sintetizado nesse trabalho. Solvente  $\text{D}_2\text{O}$ , temperatura:  $25^\circ\text{C}$ . Em (C) é ilustrado o equipamento de RMN (ICTP/CSIC-Madri, Espanha) utilizado nesse trabalho.

As massas moleculares das macromoléculas arborescentes foram determinadas por cromatografia de permeação em gel (GPC). Na análise por GPC (Figura 5.7) utilizou-se como eluente dimetilformamida (DMF) contendo 0,2% (m/m) de LiBr (fluxo de 1,0 mL/min, 550 psi). Como padrões internos para preparo da curva de calibração foram

utilizados poli(etileno glicol) (PEG) de massas moleculares de 194 Da, 960 Da, 4,2 kDa, 18,6 kDa e 450 kDa para construção da curva de calibração. O sistema analítico utilizado consistiu de um cromatógrafo HPLC 510 da Waters equipado com detector de índice de refração modelo 2414. Foram utilizadas colunas PLgel acoplada em série (10 kÅ + 1 kÅ + 0,1 kÅ) com tamanho de partículas de 5 µm. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL. A aquisição e tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados com software SW da Waters Breeze 3.3. A Figura 5.8 ilustra o HPLC utilizado nesse trabalho.

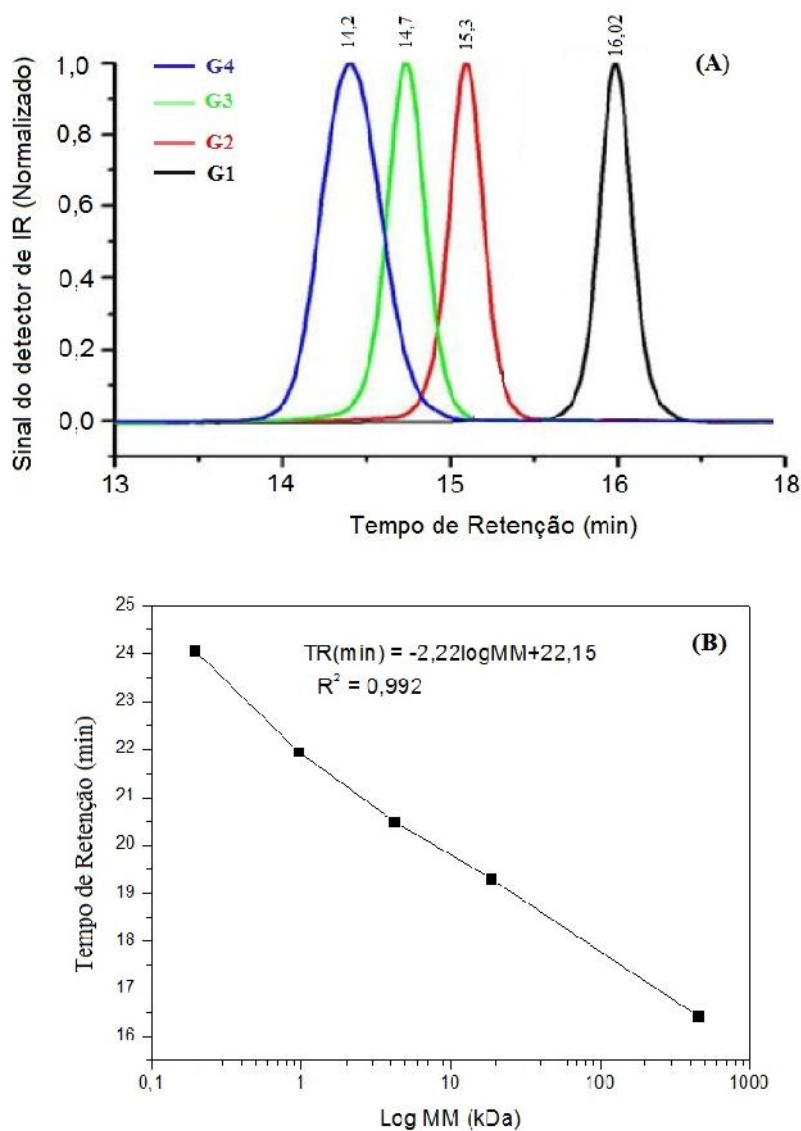


Figura 5.7 Análise por GPC dos dendrímeros PGLD. MM = massa molecular, IR = índice de refração, TR = Tempo de retenção.



Figura 5.8 Equipamento para GPC da Waters, modelo 510, utilizado nesse trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União-SP/SP.

Nesse trabalho PGLD's com massas moleculares entre 579 Da e 3,8 kDa e baixo índice de polidispersão foram obtidos conforme a rota sintética anteriormente descrita. As macromoléculas arborescentes foram obtidas com bons rendimentos (74-92%). As propriedades dos PGLD's obtidos estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1- Propriedades dos PGLD's de G = 1-4, sintetizados nesse trabalho.

PGLD - G	MM <sub>teórica</sub> (Da)	MM <sub>w,GPC</sub> <sup>a</sup> (Da)	PDI	Rendimento (%)	Nº OH Terminais	Solubilidade em PBS pH 7,4 <sup>b</sup>
1	394	579	1,02	92	06	Solúvel
2	816	1224	1,09	92	12	Solúvel
3	1689	2309	1,12	88	24	Solúvel
4	3507	3764	1,17	74	48	Insolúvel

<sup>a</sup>Determinado por GPC. PDI = Índice de polidispersão =  $M_w/M_n$ . <sup>b</sup>PBS = Solução tampão salina (0,9% m/m) fosfato 50 mM, pH 7,4.

## 5.2 Síntese e caracterização do conjugado PGLD-g-RhB

Para a imobilização da RhB, as hidroxilas terminais do PGLD ( $G = 3,0$ ) foram inicialmente oxidadas a grupos aldeídos utilizando-se o *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) como agente oxidante. Inicialmente uma solução aquosa contendo 0,1 mmol de TEMPO, 4,5 mmol NaBr e 5,5 mmol de NaClO foi preparada. O pH da solução foi ajustado para 10 com HCl 1 M. Em seguida, 3,0 g de PGLD foi adicionado à um balão de fundo redondo de 10 mL de capacidade. A solução TEMPO foi adicionada e o sistema foi agitado magneticamente por 10 minutos à temperatura ambiente (25 °C). A reação de oxidação foi terminada por adição de etanol. O dendrímero de PGLD carboxilado (PGLD-COOH) foi dialisado utilizando uma grande quantidade de água destilada (1L) para remoção do excesso de reagente TEMPO e os subprodutos resultantes da reação, seguido de liofilização.

Para a reação de imobilização da RhB, a macromolécula arborescente carboxilada (PGLD-COOH) foi ativada utilizando-se EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida)/*N*-hidroxi-succinamida (NHS). O PGLD-COOH foi adicionado à uma solução de EDC 0,2M/NHS 0,4 M (1:1) preparada em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 4,8 por 30 minutos à 4°C sob agitação magnética, seguido de diálise e liofilização. Cerca de 2,0 g de PGLD-COOH ativado por EDC/NHS foi adicionado à uma solução tampão de carbonato 0,1 M (pH 9,6) contendo RhB-NH<sub>2</sub> (C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich) na concentração de 0,1 mM e mantido sob agitação magnética por 24 h à temperatura ambiente (25 °C). A reação foi conduzida no escuro (os frascos foram cobertos com papel alumínio). Após diálise com tampão carbonato 0,1 M (pH 9,6) e água destilada para separação da RhB não ligada e subprodutos da reação o PGLD-g-RhB foi liofilizado.

A quantidade de RhB imobilizada no PGLD foi quantificada por CLAE utilizando uma coluna de separação do tipo C18 e como fase móvel uma mistura de acetonitrila:H<sub>2</sub>O na proporção 70:30 v/v na velocidade de fluxo de 1,2 mL/min. A Figura 5.8 ilustra o processo de síntese do PGLD-g-RhB.

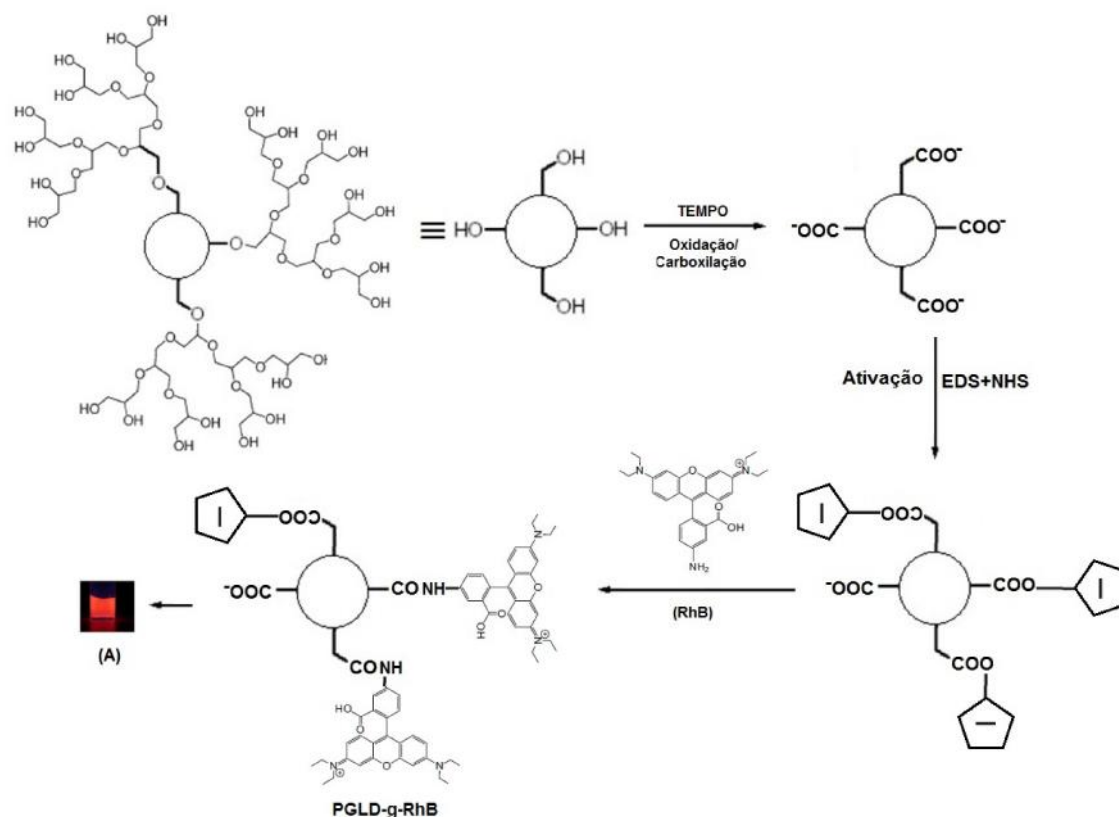


Figura 5.9 Ilustração do processo de síntese do PGLD utilizando a rota sintética de Williamson modificada e acoplamento de RhB na periferia do dendrímero. Em (A) é observada a fluorescência do PGLD-g-RhB quando submetido à luz ultra-violeta (365 nm).

A reação de acoplamento da RhB no PGLD foi acompanhada através da cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC) e CLAE. Foram utilizadas amostras de PGLD nas gerações 0, 2 e 4, puras e acopladas à RhB, assim como a RhB pura. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e a CCDC foi realizada utilizando como fase fixa cromatoplaças de sílica gel GF254 (MERCK) e utilizou-se como fase móvel a mistura etanol/acetato de etila na proporção 8:2 (V/V). Os valores de  $R_F$  foram determinados em cubas de desenvolvimento a 25 °C. Após o desenvolvimento das placas, estas foram secas e reveladas com iodo.

### 5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de separação clássica e bastante simples, muito utilizada para identificar os componentes em uma mistura. Foram utilizadas amostras de PGLD nas gerações 0, 2 e 4, PGLD-g-RhB e RhB. As amostras foram solubilizadas em DMSO e a cromatografia foi feita em placa de sílica (Merck),

utilizando-se como fase móvel a mistura etanol/acetato de etila na proporção 8:2. As amostras foram colocadas a cerca de 0.5 cm da base da placa cromatográfica, que foi então colocada no eluente (fase móvel). A eluição do solvente, feita em cuba cromatográfica, foi até cerca de 0.5 cm do final da placa. Após a eluição a placa foi retirada da cuba e revelada em iodo.

Para o cálculo do fator de retenção ( $R_F$ ) foram medidas a distância percorrida pelo solvente ( $D_{fm}$ ) e a distância percorrida pelas amostras ( $D_{am}$ ). O  $R_F$  pode ser calculado utilizando a Equação 5.4.

$$R_f = D_{am}/D_{fm} \quad (\text{Eq 5.4.})$$

### **5.2.2 Análise por espectroscopia eletrônica (UV/Vis) e vibracional (FTIR)**

Os espectros eletrônicos de amostras de PGLD nas gerações (G) 1, 2, 4, PGLD-g-RhB e RhB foram obtidos em espectrofotômetro UV-Vis Varian, modelo Cary 50. Os resultados obtidos foram tratados pelo software Carry WinUV, apresentando como resultado a curva característica de cada amostra. As amostras foram diluídas em água destilada nas concentrações de 2 mg/mL para o PGLD e 2 µg/mL para as amostras de PGLD-g-RhB. As análises foram efetuadas à temperatura ambiente (25°C).

Os espectros na região do infravermelho do conjugado PGLD-g-RhB foram obtidos em região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , no Centro de Estudos e Inovação em Biomateriais Biofuncionais Avançados da UNIFEI. Amostras de PGLD nas gerações (G) 0,2, 4, PGLD-g-RhB e RhB foram analisadas em um espectrofotômetro modelo Spectrum™ 100, da marca Perkin-Elmer. As amostras foram adicionadas diretamente no cristal de ZnSe do aparelho sem a necessidade de preparo prévio da amostra em KBr. A atribuição das bandas de absorção no IR foi efetuado através da utilização do software Spectrum, em um computador acoplado ao espectrofotômetro com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ . As análises foram feitas à temperatura ambiente (25°C).

### **5.2.3 Análise térmica (TG e DSC)**



A estabilidade térmica do conjugado PGLD-g-RhB 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 1mg 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, atmosfera dinâmica de nitrogênio de 150 mL.min<sup>-1</sup> e cadinho de -alumina. A temperatura inicial do aquecimento foi de 25 °C e a temperatura final foi de 500 °C. As massas utilizadas no experimento situou-se entre 20-30 mg.

A temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) do conjugado PGLD-g-RhB 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 300mL/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 T<sub>g</sub> considerou-se a 2ª corrida térmica.

#### **5.2.4 Absorção de dois fótons**

As propriedades não lineares do bioconjugado PGLD-g-RhB foram estudadas em colaboração com o Prof. Marcelo Gonçalves Vivas no Laboratório de Fotônica do Instituto de Física de São Carlos sob a coordenação do Prof. Dr. Cleber Renato Mendonça.

Com a finalidade de analisar as propriedades óticas do sistema PGLD-RhB foram estudados os espectros de absorção de dois fótons através da técnica de varredura-Z (SHEIKBAHAE, 1990), além do estudo do tempo de duração de sua fluorescência.

As amostras de PGLD-g-RhB foram preparadas soluções em etanol na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. As soluções foram colocadas em cubetas de sílica de caminho ótico de 2 mm, próprias para medidas em ótica não linear. As medidas óticas foram estudadas utilizando-se pulsos de laser de 120 fs em 775 nm liberados por um sistema amplificador ótico paramétrico operando à uma velocidade de repetição de 1 kHz. As medições de varredura-Z foram realizadas com intensidades variando de 50 a 100 GW/cm<sup>2</sup> (15 a 80 nJ/pulso), com intervalos de tamanho da cintura do feixe variando de 16 a 19 μm (OLIVEIRA, 2005).

O mesmo sistema de laser foi utilizado para excitar a fluorescência de amostras, a qual foi coletada perpendicularmente à excitação através de uma fibra óptica ligada a um espectrofotômetro Cary 17, que mediu a relação de intensidade entre a fluorescência e a intensidade de irradiação de luz em 700 nm. O tempo de duração da fluorescência foi medido em um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55 utilizando o segundo harmônico de um laser de Nd:YAG com 70 fs de duração de pulso. O segundo harmônico foi focado em um cristal de  $\beta$ -Borato de Bário (BBO) para gerar 266 nm. O feixe de 266 nm foi focado na amostra de PGLD-g-RhB com uma lente de comprimento focal,  $f = 12$  cm. O sinal de fluorescência foi coletado perpendicularmente ao feixe de excitação por uma fibra óptica posicionada próximo ao spot fluorescente. A aquisição de sinal foi feita por um fotodetector de silicone com um tempo de rise de aproximadamente 0,5 ns e posteriormente analisado com o auxílio de um osciloscópio digital (5 GS/s). O tempo de fluorescência foi determinado por deconvolução das curvas de decaimento utilizando funções exponenciais. O sistema ótico utilizado permite medidas de tempo de decaimento de fluorescência da ordem de 0,5 ns com precisão de aproximadamente 0,2 ns (SNARE, 1982).

### **5.2.5 Variação da hidrofobicidade**

Para o estudo da variação da hidrofobicidade dos PGLD's G0, G2 e G4 utilizou-se pireno como sonda molecular. Para a análise, foram adicionados 2,0 mL de solução etanólica contendo pireno na concentração de  $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  a 0,5 g de cada geração de dendrímero. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos usando o comprimento de onda de excitação de 337 nm em espectrofluorímetro Hitachi, modelo F-4500 (lâmpada de Xe, 150 W)

## **5.3 Ensaio Bioquímicos**

Os ensaios bioquímicos (bioatividade FTD e citotoxicidade) do PGLD-g-RhB contra carcinomas de cabeça e pescoço (OSCC-09) foram realizados 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. Os seguintes materiais e equipamentos estiveram à disposição durante os ensaios bioquímicos:

1. Linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide oral OSCC-09 (Oral Squamous Cell Carcinoma)
2. Meio de cultura do tipo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
3. Soro fetal bovino
4. Soro PBS (Phosphate Buffer Solution – Solução de Tampão Fosfato, pH 7,4 – Sigma)
5. Tripsina-EDTA (0,125% de tripsina e 0,02% de EDTA – Gibco, USA)
6. Azul Trypan (Sigma)
7. MTS (sal de tetrazólio - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H- tetrazolium))
8. Fluxo laminar
9. Centrifuga Excelsa II, Mod. 206 BL
10. Câmara de Neubauer (Newbauer Improved Brighth-Line, Optik Labor)
11. Laser (MMOptics®, São Carlos), de comprimento de onda 670 nm e energia 4,5J/cm<sup>2</sup>, potência 25mW
12. Placa de cultura de 96 poços, na cor preta com fundo chato e transparente
13. Leitor de ELISA Biotek ELX 800

A seguir são descritas as técnicas desenvolvidas para as análises biológicas bioatividade FTD e citotoxicidade.

### **5.3.1 Preparo da linhagem celular para cultura**

A fim de avaliar a toxicidade de PGLD-g-RhB com TFD, frente a células tumorais o tratamento *in vitro* foi feito em células tumorais de cabeça e pescoço da linhagem OSCC 09. O tratamento foi feito em capela de fluxo laminar e seu procedimento está descrito a seguir.

Para garantir que o tratamento seja feito em células saudáveis, as células, que se encontravam inicialmente congeladas são cultivadas nos dias anteriores ao tratamento. Para tanto: O criotubo, contendo as células congeladas foi retirado do nitrogênio líquido e colocado em banho-maria a 37° C. O conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo de centrifugação onde foram acrescentados 2 mL de meio de cultura DMEM, o tubo foi então

levado à centrifuga a 1300 rpm, durante 5 minutos, a fim de precipitar as células. O sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspendido até que não houvesse mais grumos no fundo do tubo, o conteúdo ressuspendido foi transferido para garrafa de cultura onde o meio de cultivo e soro fetal bovino foram acrescentados. A placa foi colocada na estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C, com ¼ de volta do frasco aberto. Após 48 h de crescimento, a sub-confluência foi atingida e as células então foram retiradas da garrafa adicionando-se tripsina para provocar o destacamento das células do fundo da garrafa, acompanhando-se o processo pelo microscópio a cada 5 minutos. Quando todas as células se encontravam destacadas da parede da garrafa, adicionou-se meio DEMEN e centrifugou-se por 5 minutos a 1300 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido com 1 mL, para dissolução total dos grumos.

Com a finalidade de fazer a contagem das células, foram retirados 10 µL da suspensão, na qual acrescentou-se 80 µL de meio de cultivo, além de 10 µL de azul de Trypan. Após a homogeneização, transferiu-se para a câmara de Neubauer para fazer a contagem utilizando as seguintes fórmulas:

Para contagem de quadrantes externos

$$n = \frac{X \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{4} \quad (5.5)$$

Para contagem do quadrante central

$$n = \frac{X \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{2} \quad (5.6)$$

Sendo X é o número de células viáveis na placa e n o número de células total em solução.

Após o crescimento, as células foram utilizadas para os ensaios de citotoxicidade e TUNEL, descritos nas sessões 5.3.2 e 5.3.3.

### **5.3.2 Avaliação da citotoxicidade**

Para a avaliação da citotoxicidade, foram retirados 10 µL da suspensão celular anteriormente preparada, adicionou-se 80µL de meio de cultura (DMEM adicionado de 10% de soro fetal bovino), e 10µL 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 24 h 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 670 nm e potência de (60 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 OSCC 09).

Grupo II = Células OSCC 09 em meio contendo PGLD G3

Grupo III = Células OSCC 09 em meio contendo o conjugado PGLD-g-RhB no escuro.

Grupo IV = Células OSCC 09 em meio contendo PGLD-g-RhB tratadas com laser (TFD).

Grupo V = Células OSCC 09 tratadas somente com laser.

A Figura 5.9 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 5.10 Ilustração do ensaio de citotoxicidade com a aplicação de laser nos grupos selecionados.

### 5.3.3 Ensaio TUNEL

O protocolo de exposição das células OSCC-09 ao PGLD-RhB na TFD utilizando 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  $20 \times 10^4$  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-g-RhB.
- II) Tratamento com PGLD-g-RhB no escuro.
- III) Tratamento com PGLD-g-RhB com irradiação laser por 3 min.
- IV) Tratamento com PGLD-g-RhB 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 substância SCC presente no kit diluída em água MiliQ (1:10). Após a lavagem com PBS as lamínulas então foram montadas com Vectashield. As lamínulas foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### 5.3.4 Determinação da atividade hemolítica

Os ensaios de hemólise determinam o grau de lise das células vermelhas do sangue e a liberação da hemoglobina causada pelos artefatos, materiais e/ou seus extratos *in vitro*. É um importante teste de triagem da hemocompatibilidade de um material sintético onde é refletida a fragilidade da membrana do eritrócito (célula vermelha) em contato com o material (MALINAUSKAS, 1997; HENKELMAN, 2009).

O PGLD-g-RhB foi avaliado quanto à sua capacidade de hemólise (destruição dos eritrócitos com liberação de hemoglobina) por meio do método de contato direto. Hemácias humanas foram coletadas previamente ao ensaio e diluídas em solução de Alsever (glicose 100 mM, citrato de sódio 30 mM, NaCl 70 mM, pH 6,0) na proporção 1:3 e mantidas a 4 °C. As hemácias foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4. O número de células foi determinado de modo indireto pela liberação da hemoglobina na lise em água destilada. Após a última lavagem, 100 µL do sedimento de hemácias foram adicionados a 900 µL de PBS pH 7,4. Em seguida, 100 µL dessa nova suspensão foram adicionados a 1.400 µL de água destilada para rompimento das células. As densidades óticas foram lidas a 415 nm, 450 nm e 380 nm. O cálculo da densidade ótica (DO) foi considerado como sendo igual a  $(2 \times 415) - (450 + 380)$  (HARBOE, 1959). Uma curva de calibração de densidade ótica versus concentração de hemoglobina foi obtida

A atividade hemolítica do PGLD-g-RhB foi determinado após incubação do conjugado com solução tampão PBS, pH 7,4 em tubos contendo cerca de  $3 \times 10^6$  hemácias. Após incubação por 30 minutos a 37 °C os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 500x para sedimentar as hemácias não rompidas. A hemoglobina liberada no sobrenadante foi lida a 414 nm. Para os cálculos de porcentagem de lise, a quantidade total de hemoglobina liberada foi obtida provocando-se a lise da mesma quantidade de hemácias com 10 µL de solução de Triton X-100 a 0,25 %. Foi utilizado um branco com tubos que continham somente as hemácias e tampão para o controle da lise espontânea, subtraída dos resultados. A lise espontânea de todos os experimentos realizados se situou em torno de 4,7%. Silicone grau médico adquirido no comércio local foi utilizado como comparação.

## CAPÍTULO 6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização do conjugado PGLD-g-RhB

#### 6.1.1 Imobilização da RhB no PGLD

A quantidade de RhB imobilizada no PGLD foi acompanhada por CLAE, sendo os resultados obtidos mostrados na Figura 6.1. A quantidade de RhB incorporada ao PGLD aumenta significativamente com a geração do dendrímero, saturando, entretanto para  $G = 3$ . Por outro lado, o rendimento da reação de acoplamento químico da RhB ao PGLD diminui à medida que  $G$  aumenta. A saturação observada no processo de incorporação da RhB 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  $G$ .

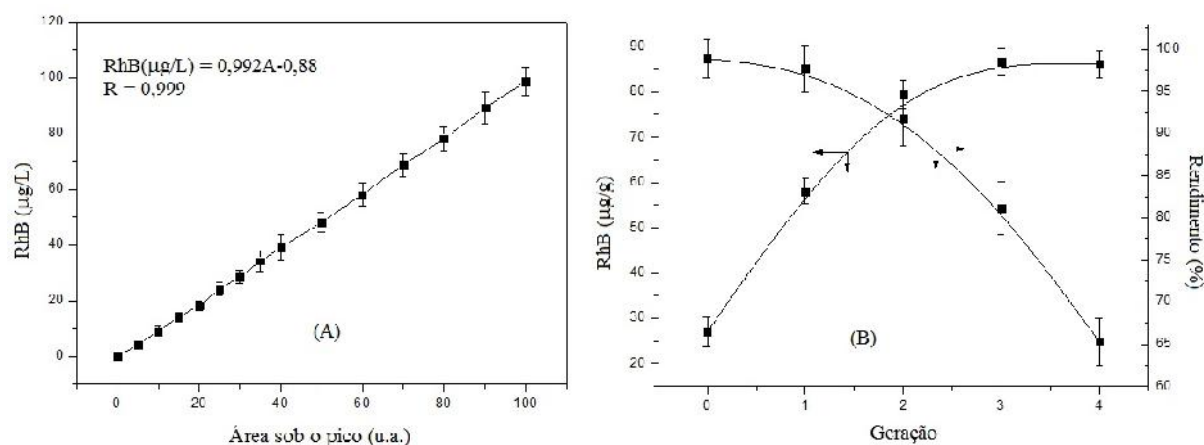


Figura 6.1. Incorporação da RhB no PGLD em função do número de gerações do dendrímero ( $G$ ).

#### 6.1.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Com a finalidade de se avaliar a possível existência de RhB não acoplada ao PGLD após o processo, foram feitas análises cromatográficas por CCD. A técnica 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 fase, estacionária.



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 6.2 mostra as cromatoplasas já reveladas com iodo. Através delas foi possível calcular o fator de retenção ( $R_F$ ) das amostras de PGLD (G= 0,2,4), RhB e PGLD-g-RhB (para as gerações 0,2,4). O  $R_F$  das amostras está representado na Figura 6.3.

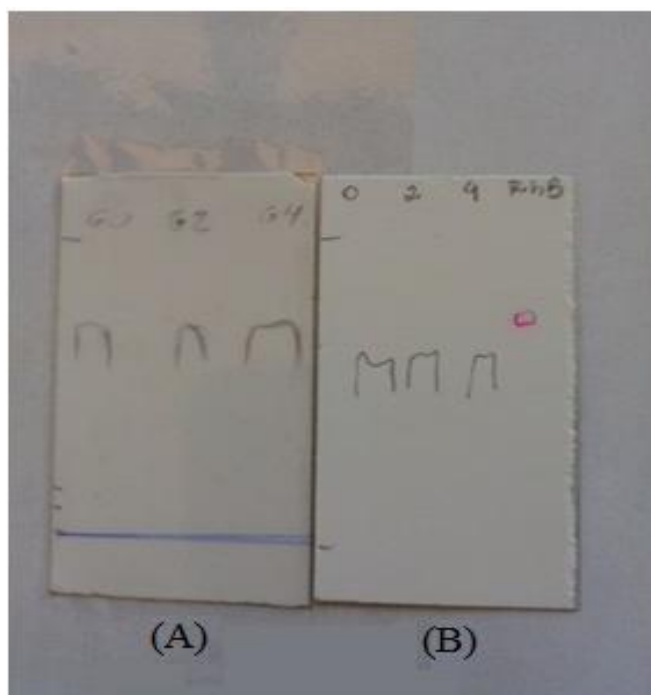


Figura 6.2. Placas cromatográficas CCD para o PGLD (G= 0, 2 e 4) (A) e PGLD-g-RhB (G = 0,2,4) (B).

Para o cálculo do fator de retenção ( $R_F$ ) foram medidas as distâncias entre o local de aplicação e o local onde a fase móvel parou de correr, além da distancia entre o ponto de aplicação das amostras e o local onde elas pararam de correr. O  $R_F$  pode ser calculado utilizando a Equação 6.1.

$$R_F = \frac{D_{Am}}{D_{Fm}} \quad (Eq\ 6.1)$$

Sendo  $D_{Am}$  a distância percorrida pela amostra e  $D_{Fm}$  a distância percorrida pela fase móvel

A Figura 6.3 mostra que não houve uma alteração significativa no  $R_F$  do PGLD antes e após a imobilização da RhB. Entretanto, observa-se uma diferença significativa entre o  $R_F$  do PGLD (aproximadamente 0,7) e o  $R_F$  da RhB (aproximadamente 0,89), indicando a ausência de RhB livre nas amostras, já que pode-se notar que apenas uma mancha foi gerada após a corrida com mesmo  $R_f$  que o dendrímero puro.

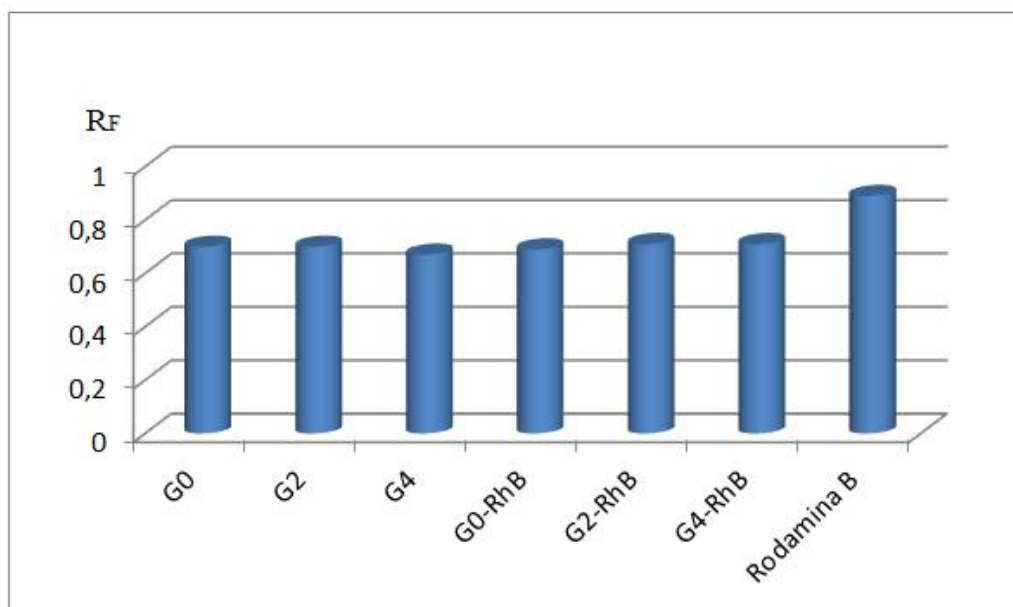


Figura 6.3. Comparação de  $R_F$  para o PGLD ( $G = 0,2$  e  $4$ ), PGLD-g-RhB e RhB obtidos na análise por CCD.

### 6.1.3 Espectroscopia eletrônica (UV-Vis)

Os espectros UV-Vis para o PGLD e, PGLD-g-RhB estão representados na Figura 6.6. A análise dos espectros eletrônicos revela a absorção relativa aos grupos OH da macromolécula arborescente, e ligações éter  $\text{CH}_2\text{-O-CH-CH}_2\text{-}$ . A luz UV provoca excitação do elétron a partir do maior orbital ocupado (HOMO) para o menor orbital desocupado (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. O  $\lambda_{\text{max}}$  observado na

Figura 6.6 (A) pode ser associado às transições eletrônicas  $n \rightarrow \sigma^*$  no poliéter arborescente (n é o orbital HOMO e  $\sigma^*$  o orbital LUMO).

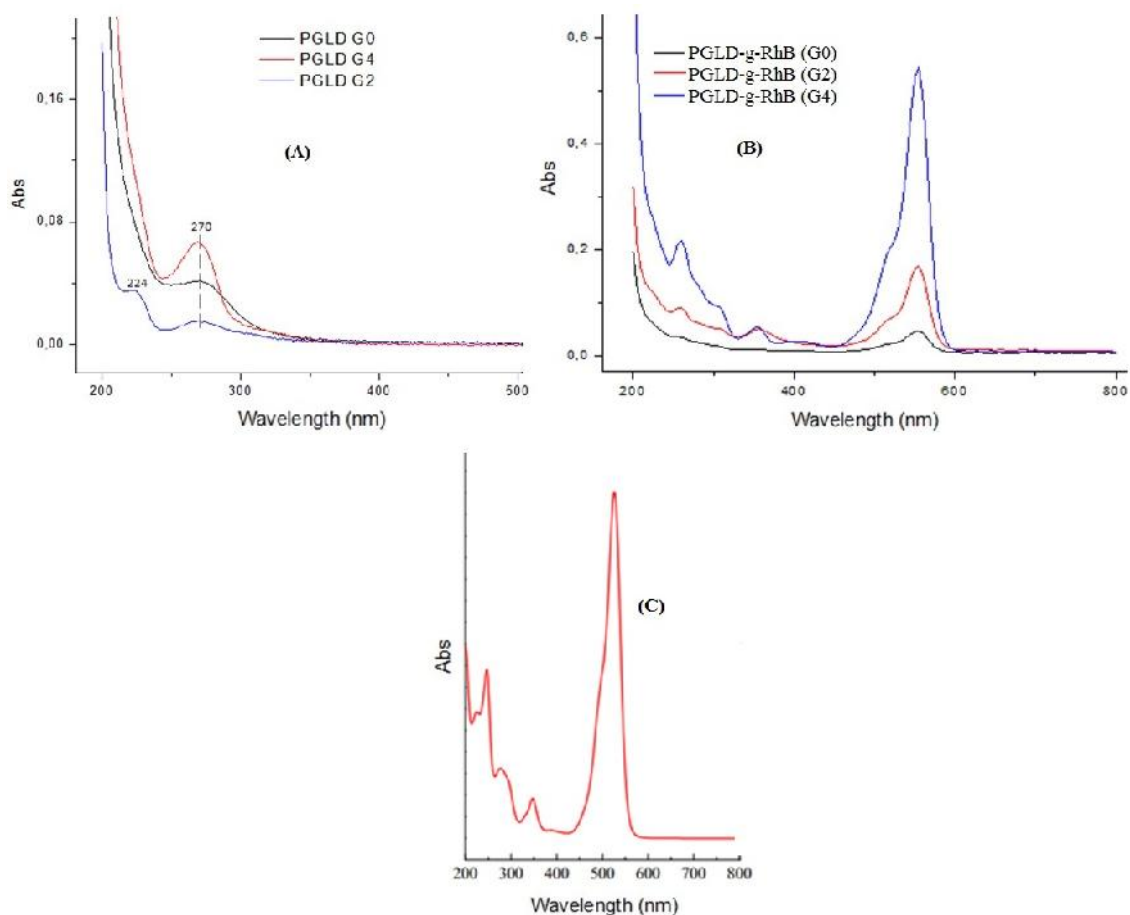


Figura 6.4. Espectro eletrônico (UV-Vis) do PGLD (A), PGLD-g-RhB (B) e RhB (C). Os espectros foram obtidos na concentração de 20 mg de PGLD-g-RhB dissolvidos em 10 mL de água destilada.

A Figura 6.6 (B) mostra o espectro UV-Vis do conjugado PGLD-g-RhB. Observa-se um novo pico em cerca de 550 nm, atribuído à ligação  $C=N^+$  da RhB, que tem transição eletrônica  $n \rightarrow \sigma^*$ , sendo o orbital n o HOMO e o orbital  $\sigma^*$  o LUMO (MCMURRY, 2005; SILVERSTEIN 1979). A figura 6.5 (C) mostra o espectro característico da RhB e sua absorção característica em  $\lambda_{max}$  a aproximadamente 517 nm. O acoplamento da RhB na macromolécula arborescente causa portanto um deslocamento no  $\lambda_{max}$ .

### 6.1.4 Análise termogravimétrica

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

As curvas TG/DTG do PGLD (G=0, 2 e 4) em atmosférica dinâmica de N<sub>2</sub> são apresentadas na Figura 6.7. O PGLD apresenta não somente grupos OH na periferia da macromolécula arborescente, mas também grupos OH secundários no interior da macromolécula cuja densidade aumenta proporcionalmente ao número de geração do PGLD, resultando em um maior o número de ligações de hidrogênio intramolecular o que poderia conferir uma maior estabilidade térmica à estrutura dendrítica.

A análise da Figura 6.7 mostra que a estabilidade térmica do PGLD aumenta significativamente em função de G sendo observado a partir da curva DTGA (derivada de TG) que o número de etapas de decomposição aumenta com o número de gerações da macromolécula arborescente. A curva TGA do PGLD G4 exibe uma massa residual de cerca de 10%, provavelmente resultante da condensação intramolecular de grupos OH secundários durante o aquecimento da amostra e formação de um composto mais estável.

O PGLD-g-RhB apresenta diferenças significativas em seu comportamento térmico relativamente ao PGLD puro. A Figura 6.8 (C) mostra que a degradação do PGLD-g-RhB (G=4) ocorre em três eventos. O primeiro evento ocorre entre 25 °C e 200°C com uma cinética lenta e perda de massa de aproximadamente 20%. Esta etapa ocorre provavelmente devido à perda de água pelo material. O segundo evento acontece gradual e mais lento, na faixa de temperatura entre 200 e 300°C, com perda de massa igual a 20%. O terceiro evento acontece no intervalo de temperatura de aproximadamente 300 a 400°C, com perda de 90% de massa. Os dois últimos intervalos são atribuídos à formação e decomposição de subprodutos formados durante a degradação do PGLD-g-RhB. Também é possível observar um teor de resíduo de aproximadamente 5% referente à formação parcial de carbono elementar durante a decomposição do material.

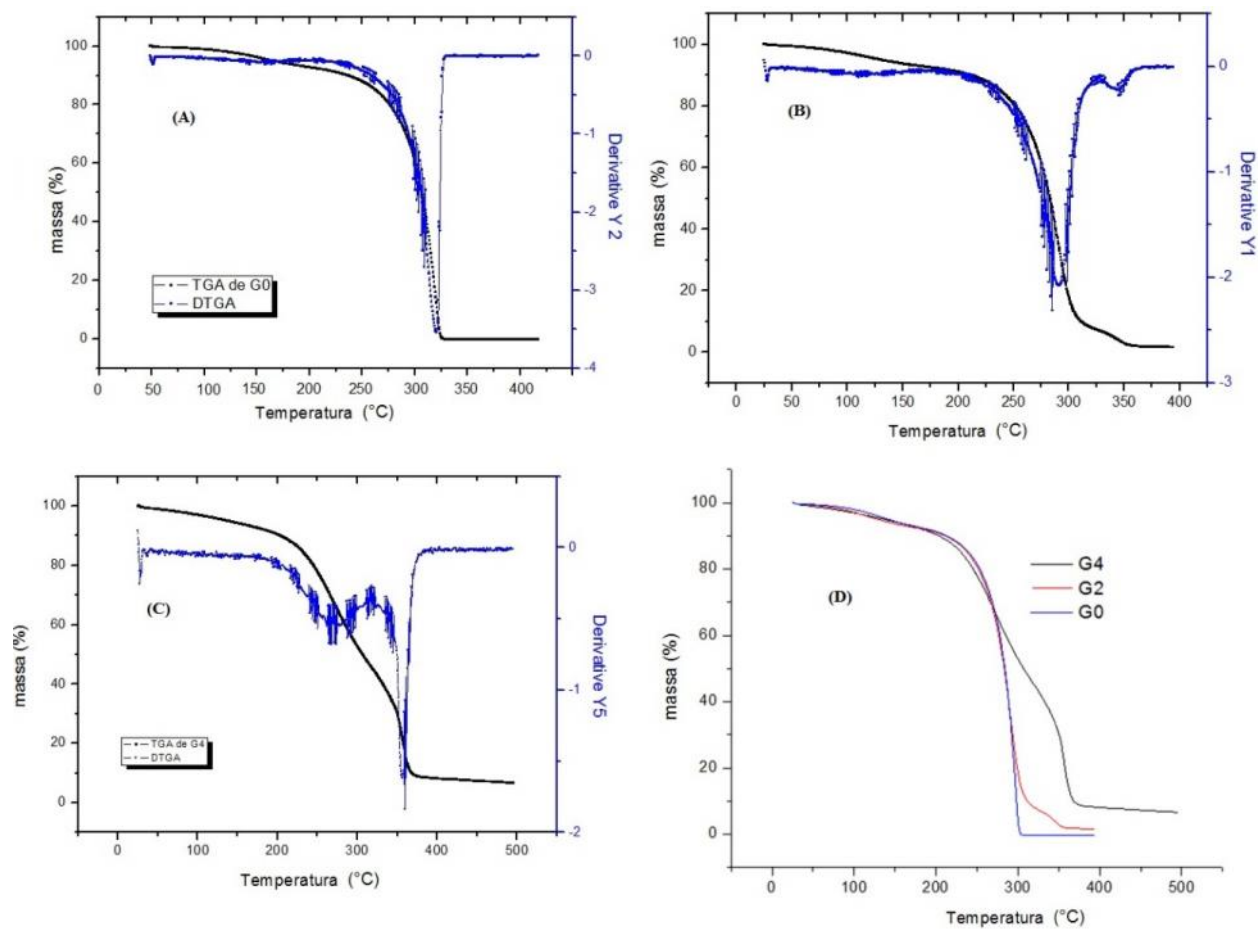


Figura 6.5. Análise termogravimétrica (TGA) dos dendrímeros PGLD G0 (A), PGLD G2 (B) e PGLD G4 (C) em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> e velocidade de aquecimento de 10 °C/min. Em (D) está ilustrado as sobreposições das curvas TGA.

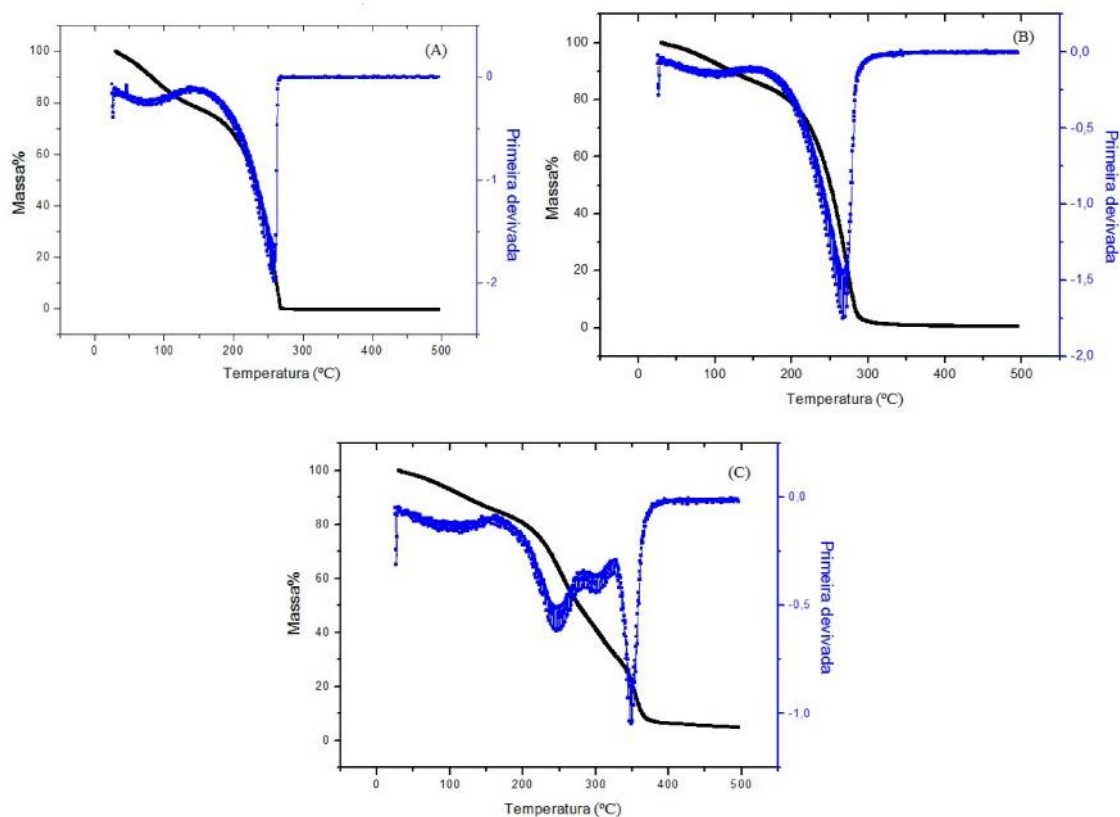


Figura 6.6. Análise termogravimétrica (TGA) dos conjugados PGLD-g-RhB de gerações: G0 (A), PGLD G2 (B) e PGLD G4 (C) em atmosfera dinâmica de  $N_2$  e velocidade de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Para o estudo da cinética de decomposição térmica por TG foi aplicado neste trabalho o método de Kissinger (KISSINGER, 1957). Nesse caso se considera que o fluxo de calor consumido pela amostra é diretamente proporcional à massa da macromolécula arborescente que é volatilizada, e que também pode ser detectado mais eficientemente pela curva DTGA, 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 ocorra somente a 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 (KISSINGER, 1957), a taxa de degradação térmica do PGLD pode ser descrita através da Equação (6.3):

$$\frac{d\alpha}{dt} = Ae^{\left(-\frac{E}{RT}\right)}(1 - \alpha)^n \quad (\text{Eq. 6.2})$$

sendo  $n$  a ordem da reação e  $\alpha$  a fração mássica volatilizada.

Diferenciando-se a Equação (6.2), para uma dada taxa constante de aquecimento  $\beta$ , a degradação máxima se dará em uma correspondente temperatura  $T_m$  (KISSINGER, 1957):

$$\frac{E\beta}{R(T_m)^2} = An(1 - x)_m^{(n-1)} e^{\frac{E}{RT_m}} \quad (\text{Eq. 6.3})$$

sendo  $(1-x)_m$  é a fração mássica residual,  $\beta$  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. (6.3) fornece:

$$\ln \frac{\beta}{(T_m)^2} = -\frac{E}{R} \times \frac{1}{T_m} + \ln \frac{A}{E} \quad (\text{Eq. 6.4})$$

A Eq. 6.4 representa uma equação de reta que expressa valores de  $\ln \beta / (T_m)^2$  em função de  $1/T_m$ . Portanto, foram feitas curvas DTGA em três taxas de aquecimento ( $\beta$ ) distintas, 10, 15 e 20 °C/min, que forneceram as respectivas temperaturas relativas à taxa de conversão máxima ( $T_m$ ). Os valores foram plotados num gráfico de  $\ln(\beta / (T_m)^2)$  versus  $(1/T_m)$  e, com auxílio do software TA 72 determinou-se o coeficiente angular, que propiciou o cálculo da energia de ativação ( $E_A$ ) para a degradação térmica do PGLD de diferentes gerações.

Os resultados obtidos para o cálculo de  $E_A$  para os dendrímeros PGLD's G0, G2 e G4 são apresentados na Figura 6.9. 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 fique restrita devido ao impedimento estérico.

Por sua vez, a incorporação de RhB à estrutura arborescente levam à um aumento de  $E_A$  (Figura 6.9). O incremento na  $E_A$  com a incorporação de RhB na estrutura arborescente pode ser devido à uma intensificação nas ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares favorecidas pela estrutura protonada da RhB..

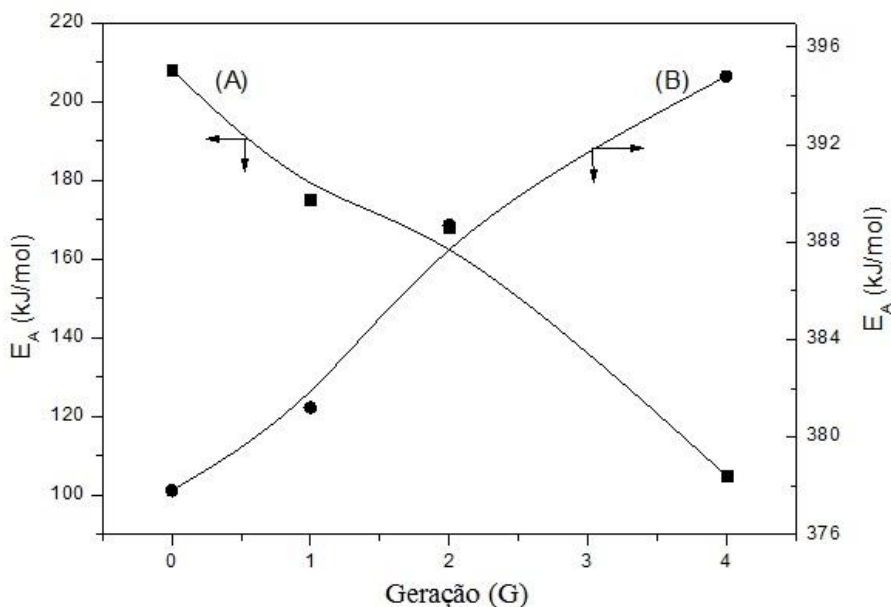


Figura 6.7. Energia de ativação para a reação de degradação dos PGLD's em função do número de gerações. PGLD puro (A) e PGLD-g-RhB (B).

É importante salientar que a  $E_A$  calculada representa uma energia de ativação aparente, pois se considerou que a velocidade de decomposição por unidade de área de interface é constante, o que não é rigorosamente verdadeiro (MEZINGER, 1969; IONASHIRO, 2005). 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.



### 6.1.5 Análise da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ )

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de um polímero é a temperatura em que passa a existir uma restrição dos movimentos conformacionais da molécula, impedindo os segmentos de cadeia de se movimentarem. Pode-se dizer, portanto que a molécula está em um estado vítreo, onde as diferentes conformações das moléculas estão separadas por uma barreira de potencial. A  $T_g$  e a conformação do polímero no estado viscoso e no estado vítreo estão ilustradas na Figura 6.10. Alguns fatores que influenciam a  $T_g$  são a força das ligações intermoleculares nos polímeros, a possibilidade dos grupos de moverem na cadeia (rotação), o tamanho da cadeia polimérica e a pureza dos polímeros. A transição vítrea em polímeros se caracteriza por uma variação endotérmica na curva de calorimetria exploratória diferencial (DSC), devido à variação da capacidade calorífica ( $C_p$ ) do material (TAGER,1972).

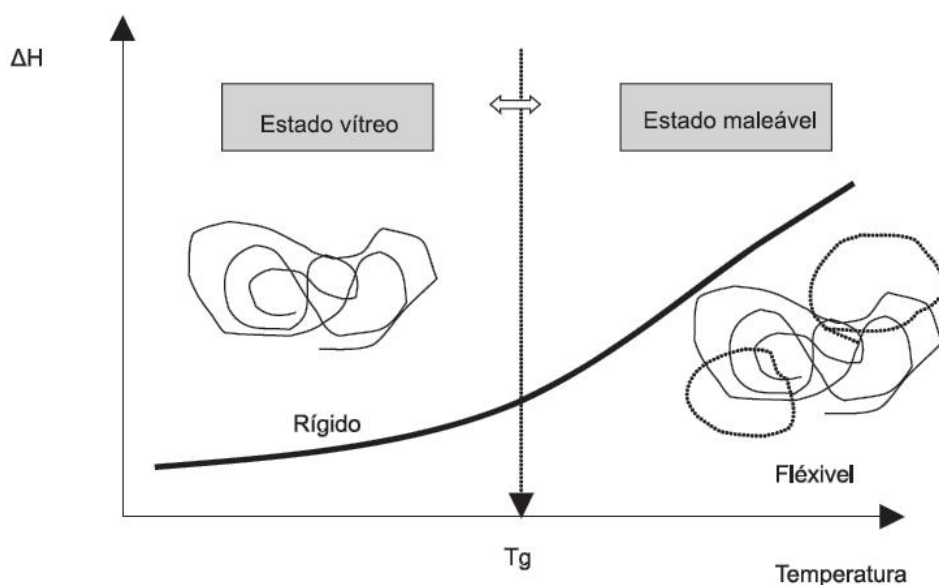


Figura 6.8. Curva da temperatura em função da energia (entalpia) de um polímero, ilustrando a transição vítrea ( $T_g$ ) e o comportamento do polímero nos estados vítreo e viscoso, ou seja, antes e depois da  $T_g$ . Adaptado de (LOPES, 2005)

Com a diminuição acentuada da temperatura de um sistema macromolecular o movimento conformacional se restringe ao máximo, impedindo o movimento dos segmentos de cadeia, tornando 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 6.10). 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 e o aumento da  $T_g$  do dendrímero reflete a presença de uma estrutura mais rígida (CALLISTER, 2002).

É de se esperar que 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  $T_g$ , pois a mobilidade molecular será significativamente reduzida.

Existem muitos fatores que influenciam a  $T_g$  tal como a razão de resfriamento. Assim, uma razão menor leva a uma temperatura  $T_g$  mais baixa. 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 (NIELSEN, 1994).

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 na 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 significativa. Tem-se sugerido que o comportamento destes polímeros é baseado em alterações conformacionais e o grau de associação do polímero em diferentes tamanhos (gerações) (VILLALOBOS, 1991).

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 (VILLALOBOS, 1991).

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 da  $T_g$  do PGLD são apresentados na Figura 6.11.

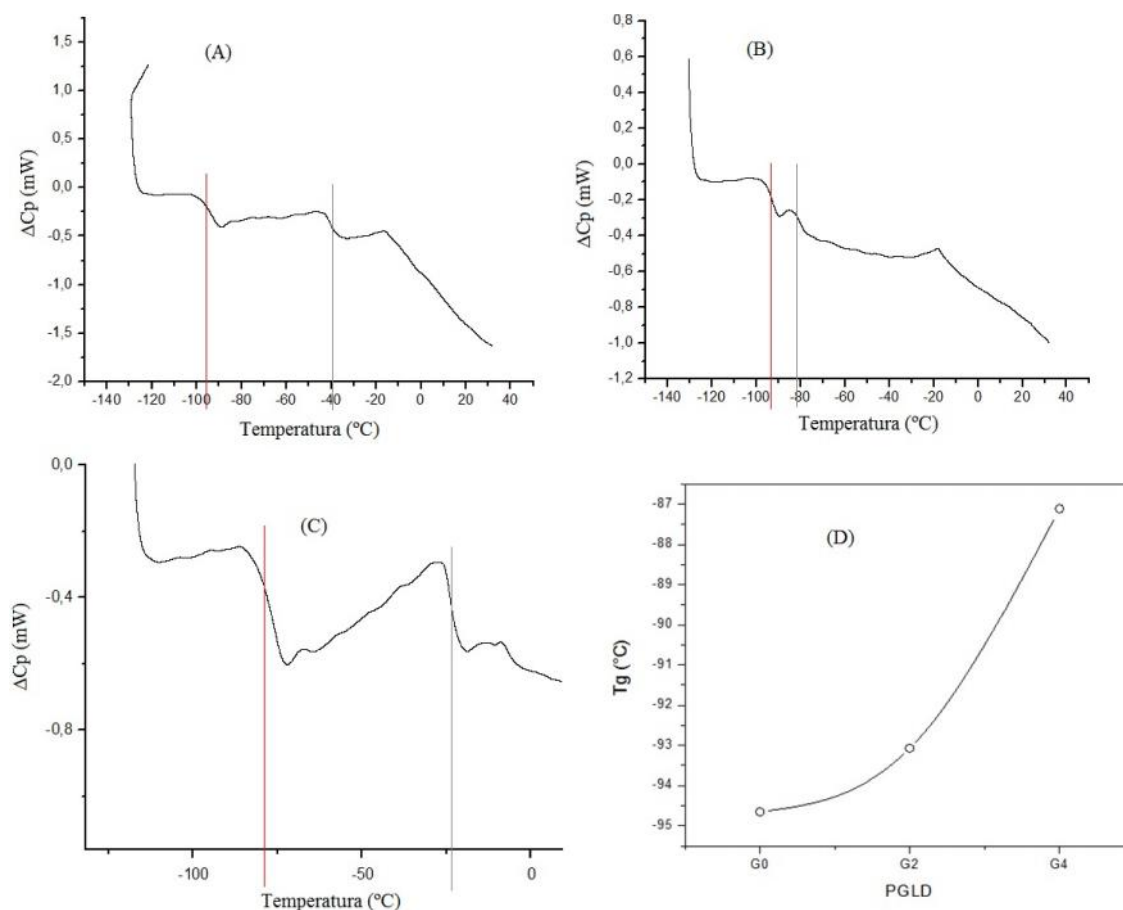


Figura 6.9. Curva DSC normalizadas do segundo aquecimento do PGLD, com razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , sendo (A) PGLD G0; (B) PGLD G2; (C) PGLD G4. Em (D) é mostrado graficamente a relação entre  $T_g$  e G.

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 (KIM, 1994). A temperatura de transição vítrea foi encontrada utilizando o ponto médio da descontinuidade da curva que representa a transição vítrea (KIM, 1994). A  $T_g$  encontrada para todas as gerações de PGLD está abaixo da temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ), o que indica que as diferentes gerações do PGLD pode ser utilizado como carreador de fármaco na temperatura fisiológica ( $37^{\circ}\text{C}$ ) sem que ocorram transições de fase.

A Figura 6.12 mostra o comportamento da  $T_g$  após a incorporação da RhB na estrutura do PGLD ( $G=0,2,4$ ). Pode-se notar que de acordo com o aumento de G há um aumento significativo na  $T_g$ . O aumento na  $T_g$  já era esperado, uma vez que o aumento de G proporciona um aumento na entropia do PGLD.

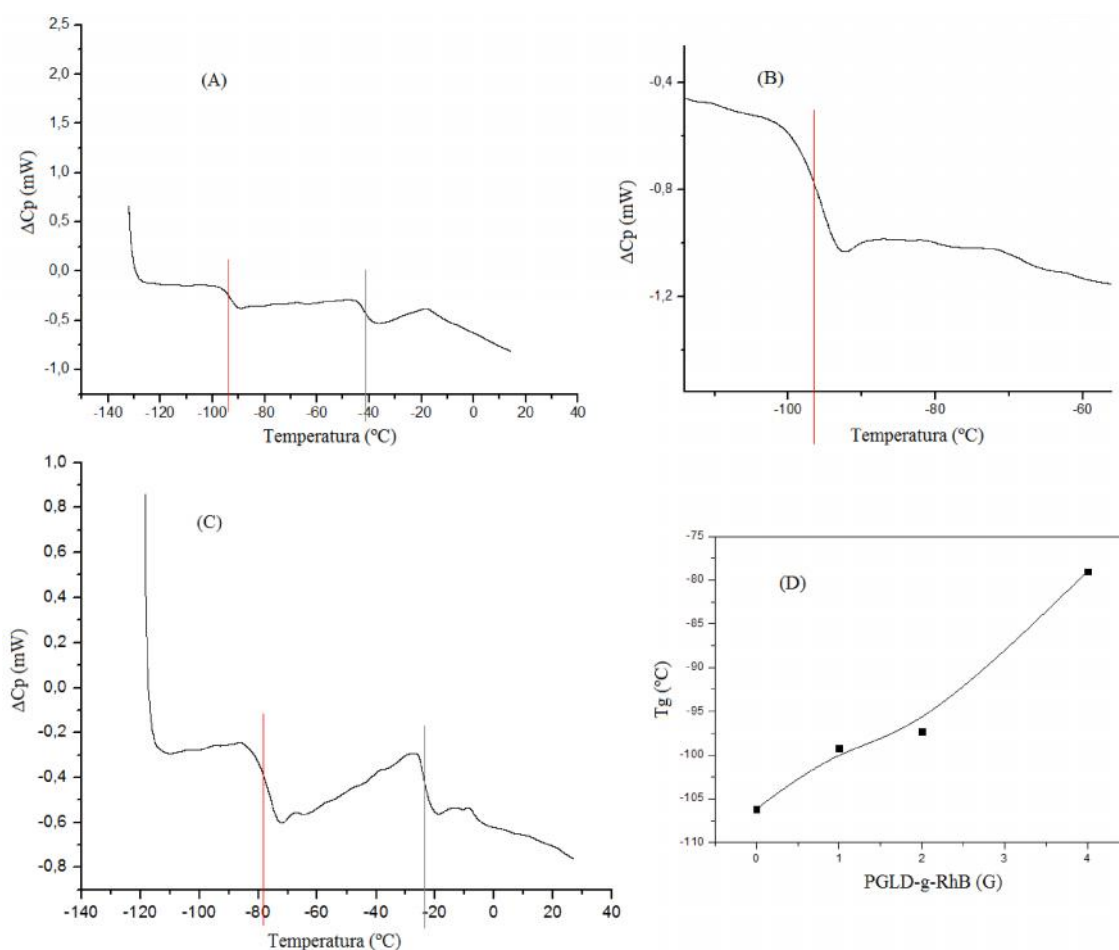


Figura 6.10. Curva DSC normalizadas do segundo aquecimento do PGLD-g-RhB, com razão de aquecimento de 10°C/min, sendo (A) PGLD-g-RhB G0; (B) PGLD-g-RhB G2; (C) PGLD-g-RhB G4. Em (D) é mostrado graficamente a relação entre  $T_g$  e G para os sistemas PGLD-g-RhB.

Com este aumento da entropia a energia de ativação para que haja a paralisação completa dos movimentos da cadeia molecular aumenta, precisando-se assim de uma maior energia térmica para possibilitar as mudanças conformacionais nas diferentes gerações do dendrímero. Isso pode ser comprovado pela equação 6.5, onde comprovamos que à pressão constante se aumentarmos a capacidade calorífica do dendrímero, com uma maior entropia, a temperatura também deve aumentar. (ATKINS, 2006)

$$C_p = T \left( \frac{\partial S}{\partial T} \right)_P \quad (\text{Eq 6.5})$$

sendo  $C_p$  a capacidade calorífica da molécula,  $T$  a temperatura do sistema,  $P$  a pressão do sistema e  $\frac{\partial S}{\partial T}$  é a variação de entropia do sistema em função da temperatura.

O aumento na entropia do sistema ocorre devido ao efeito estérico, que aumenta de acordo com o aumento da geração do dendrímero. O efeito estérico ocorre quando há uma proximidade física de grupamentos volumosos dentro da molécula, quando tais grupos se aproximam há uma repulsão entre os mesmos, fazendo com que a molécula busque uma nova conformação que é energeticamente menos estável do que a inicial. Pode-se dizer que hidroxilas são grupamentos volumosos e a rodamina ainda mais volumosa do que a primeira. Dessa maneira, quando se acopla novas camadas ao dendrímero, (aumento do número de geração) há um aumento do impedimento estérico, mostrando que o aumento do raio da molécula é menor do que o necessário para a estabilização da mesma em sua conformação energeticamente mais favorável. Este fato explica o aumento de  $T_g$  à medida que  $G$  aumenta.

### 6.1.6 Análise das propriedades hidrofóbicas do PGLD

É fato conhecido que os mecanismos de absorção, distribuição e atividade intrínseca de um fármaco estão diretamente relacionados com a resposta biológica dos compostos Bioativos (ROBERTS, 1996). 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 locais de ação (SHELLOCK, 1999). A análise da hidrofobicidade molecular pode ser usada para avaliar as propriedades biológicas relevantes para a ação de fármacos, tais como solubilidade lipídica, biodistribuição, ligação a receptores, metabolismo e biodisponibilidade. Nesse trabalho, a hidrofobicidade do PGLD e PGLD-g-RhB foi estudado utilizando-se como sonda molecular o pireno. A fluorescência do pireno é fortemente influenciada pela polaridade do microambiente que o cerca, sendo assim ele permite estudar a hidrofobicidade deste microambiente.

A variação da intensidade de fluorescência do pireno é relativamente mais baixa na banda em 382 nm ( $I_b$ ), gerada pela transição proibida  $S_1^{v=0} \rightarrow S_0^{v=2}$ , do que na banda em 372 nm ( $I_a$ ), gerada por uma transição  $S_1^{=0} \rightarrow S_0^{=0}$ , onde se observa uma grande variação na sua intensidade. Logo, a relação entre as intensidades dessas bandas de fluorescência ( $I_a/I_b$ )

pode nos fornecer a variação da polaridade do microambiente. A Figura 6.13 mostra o as curvas geradas pela fluorescência do pireno com o sistema PGLD-g-RhB ( $G = 0,2,4$ ) (A) e a relação entre os picos em 372 e 382nm ( $I_b/I_a$ ) (B).

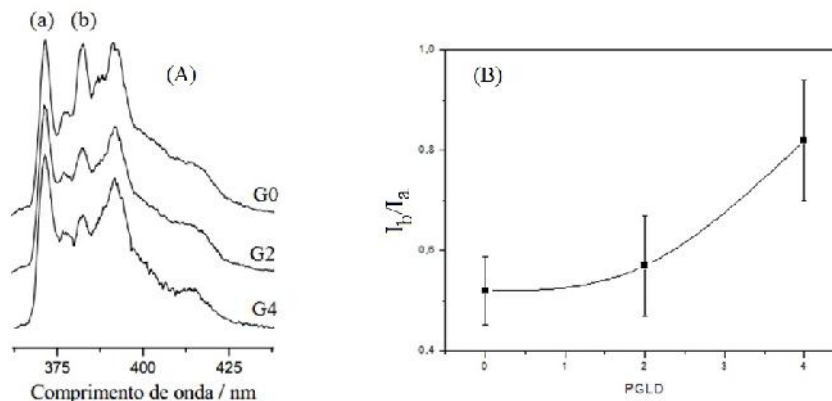


Figura 6.11. (A) Espectro de fluorescência do pireno na presença de solução etanólica de diferentes gerações do sistema PGLD/Rhb (G0, G2 e G4), (B) Relação entre  $I_b/I_a$  para diferentes gerações do sistema PGLD-g-RhB.

A influência da polaridade sobre a banda em 372 nm pode ser explicada considerando que no estado eletrônico excitado, as interações do pireno com uma matriz mais polar provoca uma redução da simetria local e conseqüentemente um aumento da intensidade das transições proibidas por simetria.

Na Figura 6.13 (B) pode-se notar que à medida que a geração do dendrímero aumenta a relação  $I_b/I_a$  aumenta, significando que a polaridade do sistema PGLD-g-RhB diminui com o aumento do número de geração do dendrímero, mostrando portanto uma hidrofobicidade crescente de acordo com o aumento da geração do sistema.

### 6.1.7 Análise das propriedades óticas não-lineares do PGLD-g-RhB

A eficiência da TFD tem sido limitada pela natureza hidrofóbica dos agentes PS, que apresenta reduzidas penetração através de tumores e permeação nas camadas da pele nos casos de aplicação tópica, respectivamente. A RhB apresenta caráter essencialmente hidrofílico e por isso, para uma penetração adequada no tumor durante o tratamento através da TFD torna-se necessário sua inclusão em um sistema transportador parcialmente hidrofóbico à exemplo do PGLD G4. A principal vantagem desse sistema está em sua

capacidade de modificar consideravelmente a penetração intracelular da RhB no tecido biológico uma vez que tende a ser internalizado pelo núcleo celular (MOURA, 2011).

A Figura 6.14 mostra o espectro de absorção linear do PGLD G4 ( linha tracejada) e do PGLD-g-RhB (G4) (linha contínua) em solução etanólica de concentração  $10^{-2}$  mM. Pode-se notar que o PGLD é totalmente transparente em comprimentos de onda maiores do que 350 nm, enquanto o sistema conjugado PGLD-g-RhB, apresenta bandas de absorção de mais baixa energia entre 470 nm e 570 nm correspondente à transição  $\pi-\pi^*$  do estado fundamental para o primeiro estado excitado ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), característico da RhB (MCMURRY, 2005).

Também pode ser observado na Figura 6.14 o espectro de fotoluminescência do PGLD-g-RhB, exibindo uma forte banda de emissão entre 530 nm e 650 nm com uma banda de máxima absorção a 563 nm.

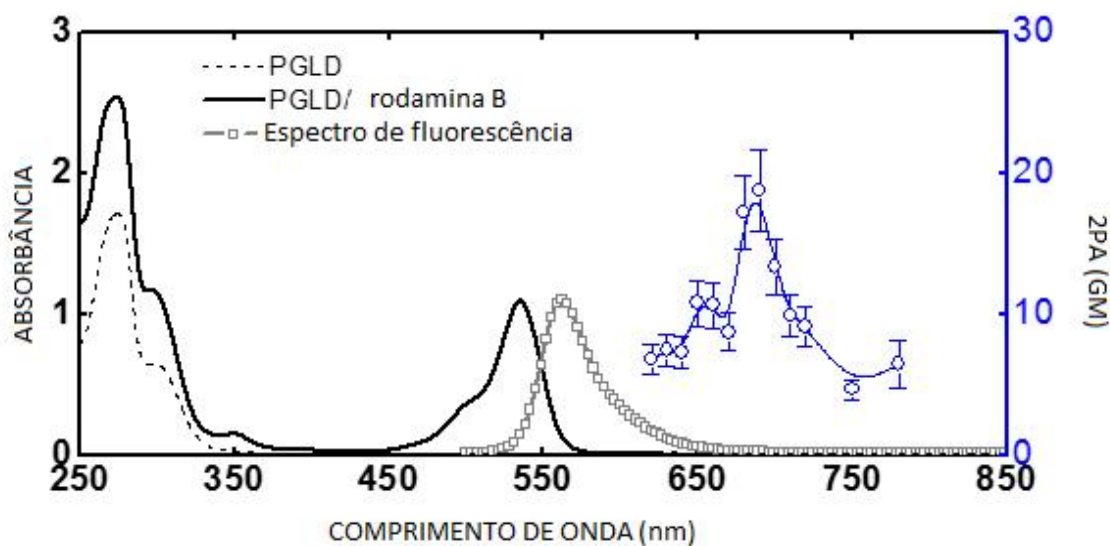


Figura 6.12. Espectro de absorção linear do PGLD G4 ( linha tracejada) e do PGLD-g-RhB (G4) (linha contínua) em solução etanólica de concentração  $10^{-2}$  mM. A linha contínua, os quadrados e os círculos mostram a absorção linear, a fluorescência e a absorção de 2 fótons do conjugado PGLD-g-RhB, respectivamente. A linha tracejada mostra a absorção linear para o PGLD G4.

A Figura 6.15 exibe o espectro de absorção de 2 fótons (2PA) do conjugado PGLD-g-RhB, obtido pela técnica de varredura-Z. O decaimento da transmitância normalizada na posição Z indica um processo de 2PA, visto que a excitação ocorre de maneira não ressonante.

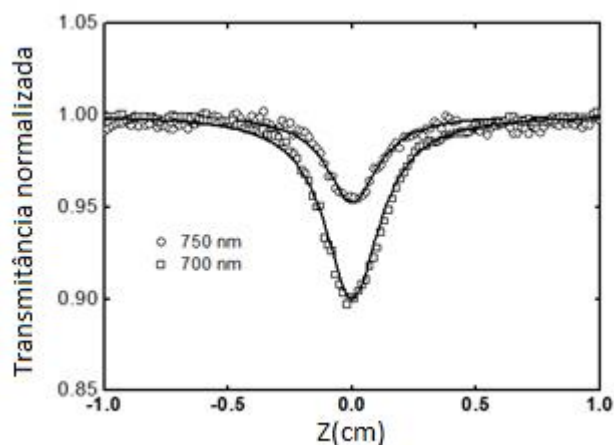


Figura 6.13. Curvas obtidas a partir da técnica de varredura-Z para o PGLD-g-RhB em etanol a 700 nm (quadrados) e 750 nm (círculos).

A Figura 6.16-(A) mostra a dependência da intensidade de fluorescência como uma função da excitação pelo laser a 700 nm. O resultado observado confirma a natureza de dois-fótons de um processo óptico não linear. Na Figura 6.16 (B) observam-se os espectros de fluorescência excitada via absorção de dois fótons em 700 nm.

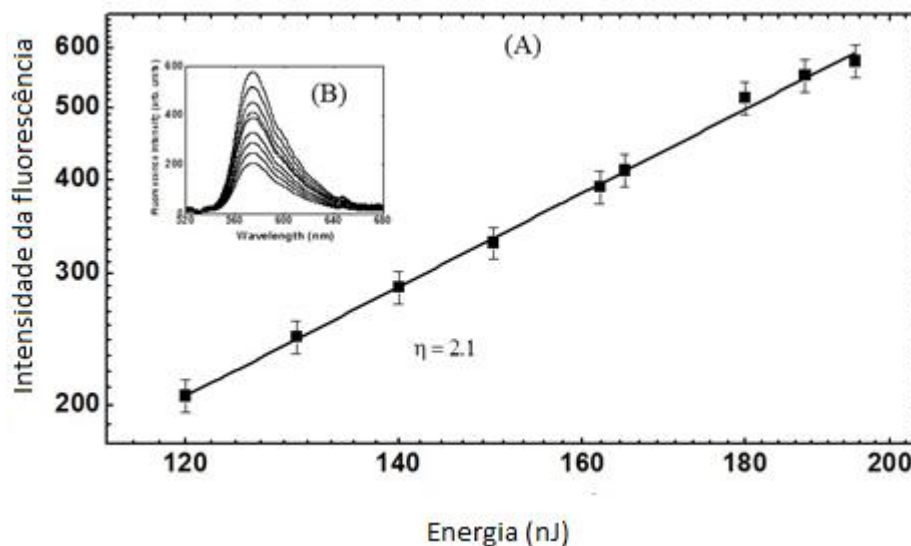


Figura 6.14. Sinal de fluorescência induzida por processo de dois-fótons em função da potência do laser (escala log-log) para PGLD/RhB em 700 nm (B). E a regressão linear, com uma inclinação igual a 2,1 em (A).



A medida do tempo de vida de fluorescência para RhB e PGLD-g-RhB está representado na Figura 6.17. Foram utilizados pulsos de laser de 70 ps em 532 nm. A Figura 6.17 mostra o decaimento do sinal de fluorescência deconvoluídos para RhB (representados pelos quadrados) e PGLD-g-RhB (representados por círculos) bem como os tempos de vida obtidas por ajuste dos dados com uma função mono-exponencial. O tempo de vida de fluorescência para RhB em etanol é cerca de 2,5 ns, enquanto que para o PGLD-RhB obteve-se o tempo de vida de 3,7 ns. O tempo de vida de fluorescência para a RhB está em bom acordo com dados observados na literatura utilizando diferentes técnicas experimentais de medida (CORREA, 2007). O tempo de vida de fluorescência da PGLD-g-RhB é maior do que a observada para RhB, o que indica que de fato, existe uma ligação química entre o PGLD e RhB no conjugado PGLD-g-RhB.

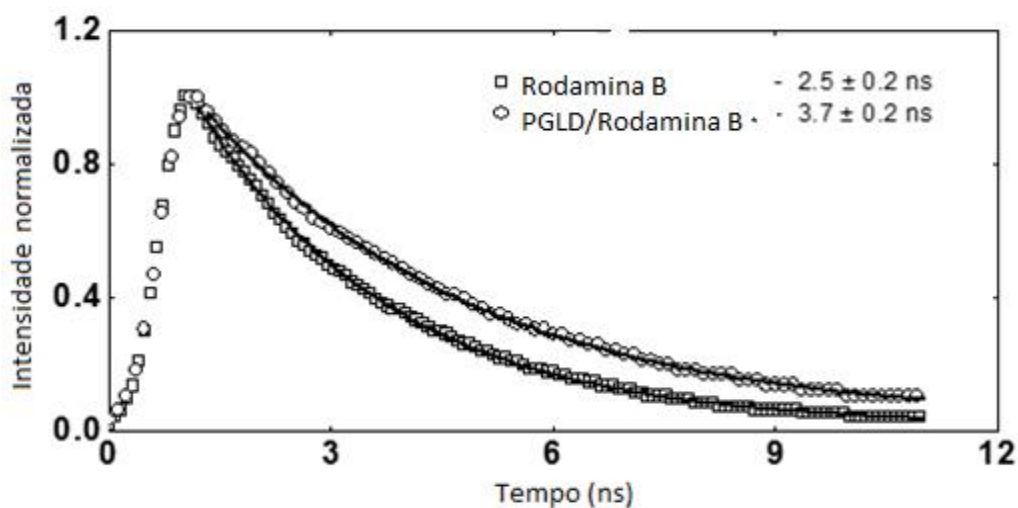


Figura 6.15. Dependência entre a intensidade de fluorescência e o tempo para RhB (quadrados) e PGLD-g-RhB (círculos) obtidos utilizando laser com pulsos de 70 picossegundos e excitação em 532 nm. O tempo de vida de fluorescência foi determinado através do método de deconvolução e uma função exponencial.

## 6.2 Análises bioquímicas do conjugado PGLD-g-RhB

### 6.2.1 Análise da citotoxicidade e fotoatividade

O MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) é um composto que é reduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial, com a

formação de cristais de formazan, solúveis em água. Para a análise da viabilidade celular, pode-se utilizar o teste do MTS, onde se incuba as células a serem testadas com o composto de tetrazólio analisando-se o número de células viáveis através da lei de Lambert-Beer uma vez que o formazan apresenta máximo de absorção a 490 nm e, nesse caso; a absorbância será proporcional ao número de células metabolicamente ativas.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado nos grupos de células denominados de controle (apenas células OSCC-09) (I), células OSCC-09 incubadas apenas com PGLD (II), células OSCC-09 incubadas com PGLD-g-RhB no escuro (III), células OSCC-09 incubadas com PGLD-g-RhB e à TFD (IV) e células OSCC-09 submetidas ao laser. As placas de Elisa correspondente ao Grupo IV foram irradiadas nos intervalos de tempo de 3 minutos e 10 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 (CORY, 1991).

Os resultados obtidos para a análise da viabilidade celular estão apresentados na Figura 6.18.

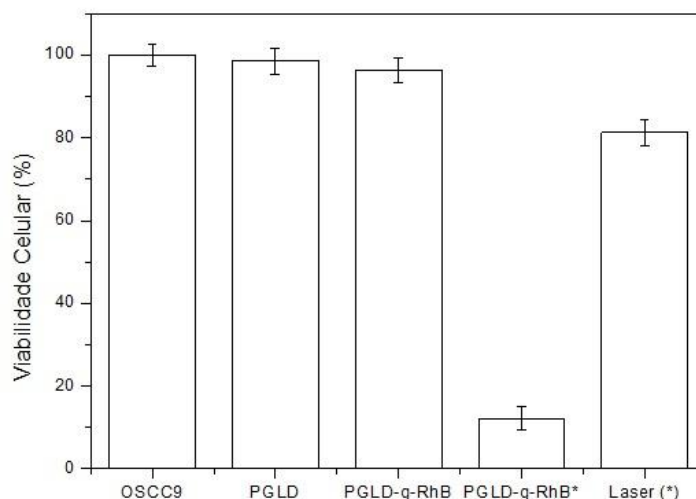


Figura 6.16. Viabilidade das células OSCC-09 avaliado pelo ensaio de MTS. O símbolo \* e (\*) representam a irradiação com laser durante 10 minutos à temperatura ambiente (25 °C). Os resultados representam n = 4 e o PGLD é de G=4.

Através da análise da Figura 6.18 pode-se notar que a maior sobrevivência de células está nos grupos “controle (OSCC9)”, “PGLD”, “PGLD-g-RhB” e “laser”. No entanto o grupo “PGLD-g-RhB\* submetido à TFD revela uma grande quantidade de células mortas, evidenciando um efeito significativo da TFD após incubação das células OSCC9 com PGLD-g-RhB.

Um segundo ensaio foi realizado com intuito de validar a influência da concentração de PGLD-g-RhB na eficiência do tratamento de células OSCC9 por TFD. O resultado deste ensaio está ilustrado na Figura 6.19, onde também se pode diferenciar a eficiência do PGLD-g-RhB com e sem a aplicação do laser.

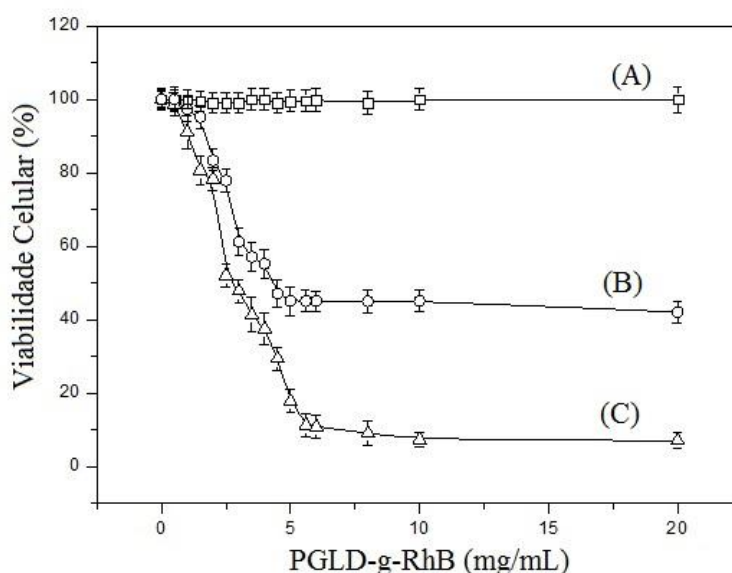


Figura 6.17. Influência da concentração do PGLD-g-RhB (G = 4) na viabilidade celular considerando-se o tempo de irradiação com laser: 3 min (B) e 10 min (C). Em (A) representa-se o grupo controle (escuro).

Através da análise da Figura 6.19 pode-se observar que quanto maior a concentração do PGLD-g-RhB menor é a sobrevivência das células, mais uma vez indicando que a eficiência do tratamento é diretamente proporcional à concentração de PGLD-g-RhB. 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 a eficiência da terapia é dependente da potência do laser dissipada no meio.

### **6.2.2 Ensaio de TUNEL**

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 (GRIVICICH, 2007). É fato reconhecido pela literatura que a TFD pode induzir a morte celular por apoptose ou necrose, ou uma combinação desses dois mecanismos (SCHEFFER, 2003).

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 na Figura 6.20.

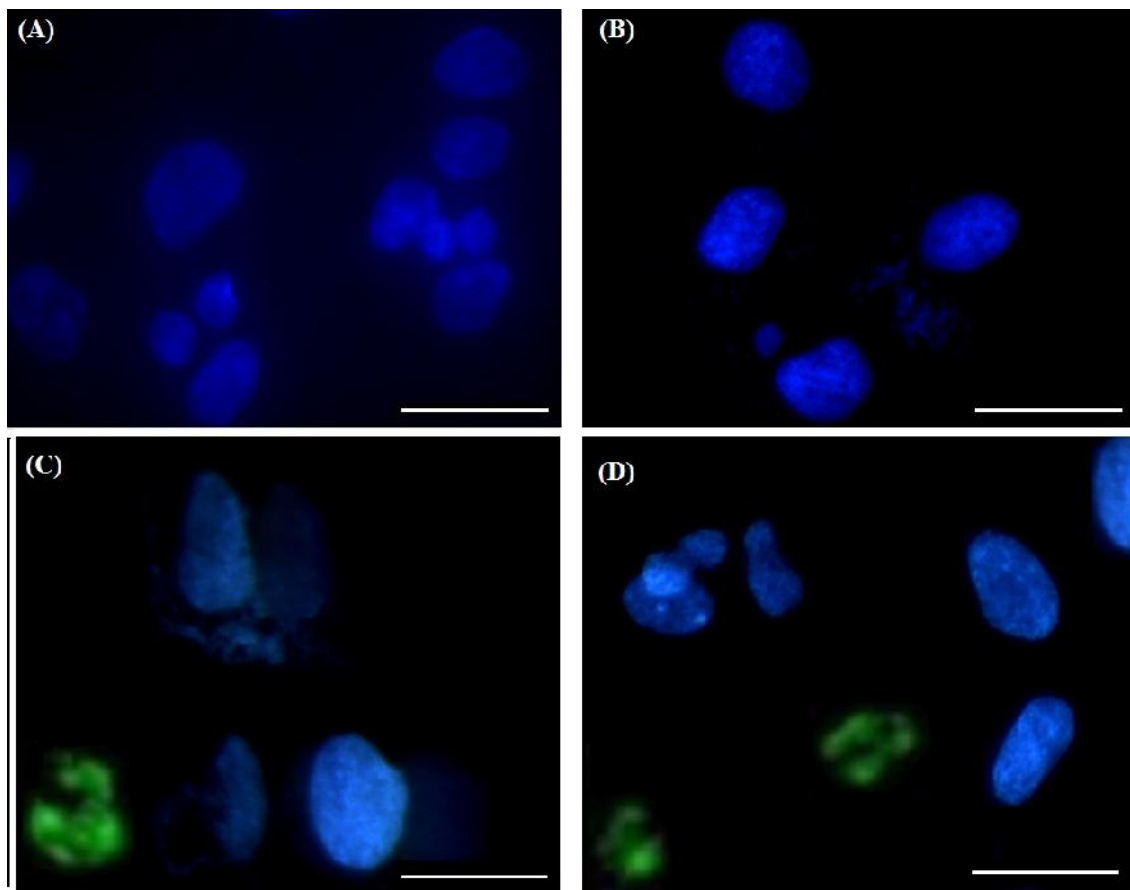


Figura 6.18. Análise de marcação TUNEL-positiva (fluorescência verde) de fragmentos nucleares correspondentes a corpos apoptóticos no grupo controle: PGLD-g-RhB no escuro (A,B) e após exposição ao laser por 10 minutos (C,D). As células viáveis estão em azul. Barra de escala=10 $\mu$ m

O aumento da porcentagem de células apoptóticas com a dose de PGLD-RhB e o tempo de exposição ao laser está ilustrado na Figura 6.21. Pode ser observado que a porcentagem de sinais apoptóticos nas células após irradiação com o laser foi significativamente mais elevada do que no grupo controle.

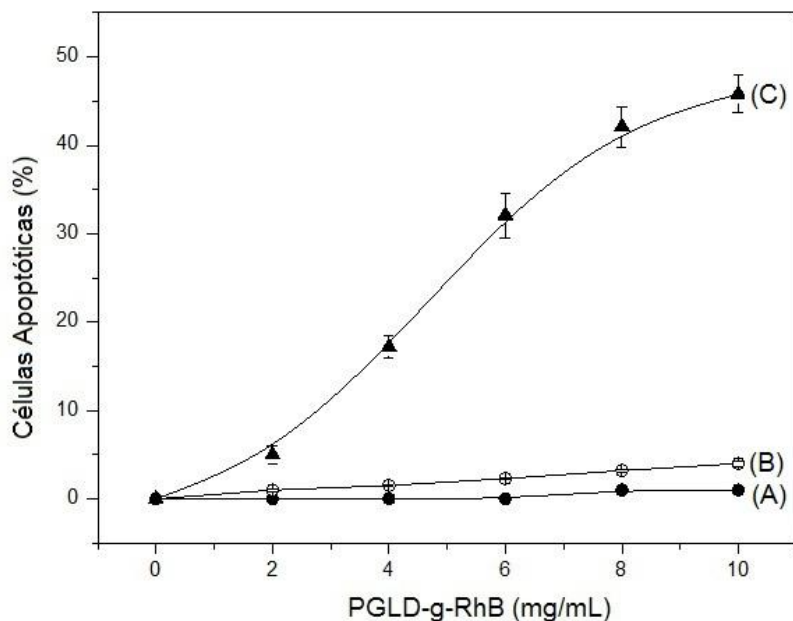


Figura 6.19. Relação entre a porcentagem de células apoptóticas e a concentração de PGLD-g-RhB considerando a irradiação com laser por 3 min (B) e 10 min (C). O grupo controle, células OSCC9 incubadas com PGLD-g-RhB no escuro são representadas em (A).

### 6.2.3 Determinação da atividade hemolítica

As interações entre os biomateriais e o sangue podem induzir a lise dos eritrócitos (ou glóbulos vermelhos). Os eritrócitos são células desprovidas de núcleo e mitocôndrias, o que indica baixa atividade metabólica e, portanto, se comparada com outras células, menor diversidade de biomoléculas em seu citoplasma, sendo seu constituinte principal a hemoglobina (WU, 2010).

A hemoglobina é facilmente identificada e quantificada devido a presença do grupo heme, o qual confere à hemoglobina uma intensa absorção em torno de 540 nm. A membrana plasmática dos eritrócitos é constituída por uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (cerca de 50%) e proteínas (WU, 2010). Portanto, um ensaio importante para avaliação da propriedade hemocompatível de um polímero é a determinação de sua atividade hemolítica.

Os resultados obtidos no ensaio para determinação da atividade hemolítica das superfícies poliméricas estão apresentados na Figura 6.22. Utilizou-se o vidro como controle positivo (FENN, 1922)

O PGLD-g-RhB apresentou atividade hemolítica inferior a 3%, o que permite a classificação do conjugado como não hemolítico (American Society of Testing and Materials, 2000).

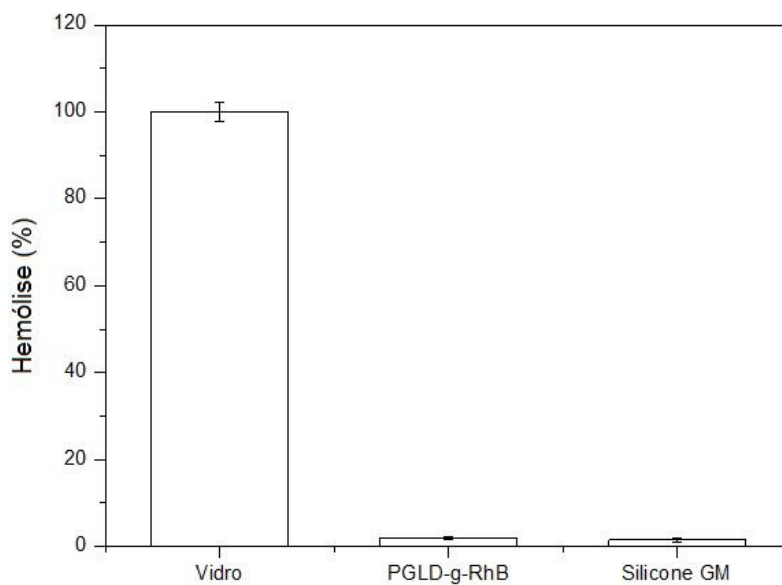


Figura 6.20. Estudo da indução à hemólise pelo PGLD-g-RhB. Utilizaram-se como controle positivo o vidro e controle negativo o silicone de grau médico (Silicone GM).

## CAPÍTULO 7- CONCLUSÕES

---

Nesse trabalho, foi sintetizado o conjugado PGLD-g-RhB de forma a se obter um agente fotossensibilizador mais solúvel e biocompatível para utilização na TFD. As principais conclusões obtidas são sintetizadas a seguir:

(1) O conjugado PGLD-g-RhB foi sintetizado e caracterizado com sucesso por técnicas espectroscópicas (NMR, FTIR, UV-Vis, Varredura-Z) e térmicas (TGA, DSC). Por intermédio dos resultados obtidos das análises espectroscópicas e térmicas comprovou-se a reação de acoplamento entre a RhB e o PGLD.

(2) As técnicas de análise térmica (TGA, DSC) demonstraram que o conjugado PGLD-g-RhB possui estabilidade térmica satisfatória para utilização na TFD.

(3) A utilização do pireno como sonda hidrofóbica indicou que a hidrofobicidade do PGLD aumenta com o número de gerações da macromolécula arborescente.

(4) O conjugado apresentou características não citotóxicas, portanto; biocompatíveis e adequadas para utilização em processos clínicos da TFD.

(5) O ensaio com células OSCC9 indicou que o conjugado PGLD-g-RhB apresenta resposta dependente da concentração do conjugado apresentando maior sensibilidade para o tempo de irradiação (com laser) de 10 min. Esse dado comprova que a eficiência da terapia TFD utilizando o conjugado PGLD-g-RhB é dependente da potência do laser dissipada no meio.

(6) O ensaio de TUNEL demonstrou que o PGLD-g-RhB atua sobre as células OSCC9 causando morte celular por apoptose durante a TFD.

(7) O PGLD-g-RhB apresentou atividade hemolítica inferior a 3%, o que permite a classificação do conjugado como não hemolítico.



## CAPÍTULO 8– PERSPECTIVAS FUTURAS

---

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a utilização do sistema PGLD-g-RhB apresenta propriedades físico-químicas e biológicas muito promissoras para sua utilização no tratamento de carcinomas da cavidade oral e pescoço através da TFD. Entretanto, para que esse material possa ser utilizado com sucesso, estudos são necessários de modo a aprofundar o conhecimento sobre a atuação do PGLD-g-RhB como agente PS. 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 analisar o efeito da concentração do PGLD-g-RhB, dose e taxa de dose de irradiação, fracionamento e o intervalo de tempo entre a administração do agente fotossensibilizador e o início da iluminação.
- 2) Apesar de ser uma terapêutica 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-g-RhB.
- 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-g-RhB.
- 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-g-RhB sobre os níveis de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) avaliando a possibilidade de modulação imune do sistema biológico pela ação de ambos, laser e PGLD-g-RhB.

- 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 se desenvolver estudos futuros a respeito de alterações na expressão de genes/proteínas críticas pertencentes a vias metabólicas específicas nos tecidos submetidos a TFD com PGLD-g-RhB no intuito de descobrir possíveis marcadores relacionados com recidiva tumoral.
- 6) Compreender o comportamento do sistema PGLD-g-RhB no organismo em condições *in-vivo*, realizando medidas de fluorescência no tecido biológico e fluídos metabólicos (sangue e urina).
- 7) Investigar os processos de morte celular por meio de ferramentas imunoistoquímicas como TUNEL e Caspase 3.
- 8) Estudar as possíveis alterações dos mecanismos imunológicos após a realização da TFD com o PGLD-g-RhB e verificar a sua possível influência nos resultados clínicos do tratamento.
- 9) Analisar a biodistribuição do PGLD-g-RhB em condições *in vivo* utilizando a tomografia por emissão de pósitrons (PET).

## REFERÊNCIAS

---

Ahmed, K; Khan, A, N; Rauf,A; Gul, A; Aslam, M; Design and development of laser eye protection filter, *Journal of Physics: Conference Series*, V 439, P 1-4, 2013.

Aida, T.; Meijer, W.; Stupp, S. I. Functional Supramolecular Polymers. *Science*, v.335, n.6070, p.813-817, 2012.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.

Alexandra Rodrigues Pereira da Silva. Estudo das Propriedades Bioquímicas do Sistema Arborecente PGLD-AAS para o tratamento do Câncer.. 2008. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.

Alig, A, R. G; Gourdon, D; Israelachvili, J. K. *Properties of confined and sheared Rhodamine B films studied by SFA-FECO spectroscopy*. *J. Phys. Chem. B*, V. 111, P. 95, 2007.

Allison, R. R; Downie, G. H; Cuenca, R.; Hu, X; Childs, C. J. H; Dibata, C. H. Photosensitizers in clinical pdt. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 1, p. 27-42, 2004.

Almeida-lobes, I.; et al. The use low level laser therapy for wound healing: clinical study. In: annual meeting- lasers in surgery and medicine, proceedings; eua, 1999.

American Society of Testing and Materials, "Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials," ASTM756- 00, ASTM International, Conshohocken, Pa, USA, 2000.

ANTUNES, C. Lipossomas e as suas aplicações na actualidade., 14 jul. 2007. Disponível em: <<http://quimicaparatodosuevora.blogspot.com.br/2011/01/lipossomas-e-as-suas-aplicacoes-na.html>>. Acesso em: 2013 nov. 22.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. *Química Nova*, v.30, n.6, p.1484-1490, 2007

Arbeloa I. L, Ojeda P. R. Molecular forms of rhodamine B. *Chem Phys Lett* V.79, P.347–350, 1981.

Aspinall, H. C; Nicholas Greeves, Wai-Man Lee, Edward G. McIver, Peter M. Smith. An improved Williamson etherification of hindered alcohols promoted by 15-crown-5 and sodium hydride. *Tetrahedron Letters* V.38, n 26, P. 4679–4682, 1997.

Asthana ,A.,et al, Poly (amidoamine) (pamam) dendritic nanostructures for controlled site specific delivery of acidic anti-inflammatory active ingredient, *AAPS PharmSciTech*. V. 6, n. 3, p. E536-42, 2005.

ATKINS, P.W.; JONES, Loretta. *Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

Bagnato, V. S; *Fundamentos da luz laser, Física na escola*, V 2, n 2, P4-9, 2001.

BALZANI, V.; SCANDORA, F.; REINHOUDT, D. N. Photochemical and photofisical devices. *Elsielver*, v.10, p.687-694, 1996.

Bányai I., Kéri M., Nagy Z., Berka M., Balogh L. P., Self-diffusion of water and poly(amidoamine) dendrimers in dilute aqueous. *Soft Matter*, 9(5), 1645-1655, 2013.

Barth, R. F.; Adams, D. M.; Soloway, A. H.; Alam, F.; Darby, M. V. Boronated starburst dendrímer: monoclonal antibody immunoconjugates: evaluation as a potential delivery system for neutron capture therapy. *Bioconjugate Chem.*, v.5, p.58-66, 1994.

Bates S, Vousden KH. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*.55

: 28-3, 1999.

Batista, C. M; Carvalho, C. M. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Brasilia jour.pharmaceutical sciences*. V.43, n. 2, p 167-179, 2007.

Beija, M; Afonso, C. A. M; Martinho, J. M. G. Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.*, v. 38, p. 2410–2433, 2009.

Berkovic, D; Sievers, S; Haase, D. Eduard A.M. Fleer, Claudia Binder. Effects of hexadecylphosphocholine on phosphatidylcholine and phosphatidylserine metabolism in human lymphoma cells. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, Vol. 2: 85–92, 2002.

BOAS, U.; HEEGAARD, P. M. Dendrimers in drug research. *Chem Rev. Soc.*, v.33, p.43-63, 2004.

Boiy, A; Roelands, R; Witte, P. A. M. Photodynamic therapy using topically applied hypericin: comparative effect with methy-aminolevulinic acid on uv induced skin tumour. *Jour. Of photochemistry and photobiology*. V. 102, p. 123-131, 2011.

Bowman, T; Garcia, R; Turkson, j; Jove, R; STAT3 in oncogenesis; *Oncogene*; v 19, p 2474-2488, 2000.

Bown, S. G; Rogowska, A. Z; Whitelaw, D. E; Lees, W. R; Lovat, L. B; Ripley, P; Jones, L; Wyld, V; Gillams, A; Hatfield, A. W. “Photodynamic therapy for cancer of the pancreas,” *Gut* V.50, P. 549 –557, 2002.

Brunsen, A. Proton and calcium-gated ionic mesochannels: phosphate-bearing polymer brushes hosted in mesoporous thin films as biomimetic interfacial architectures. v.28 n:7 p.3583 -3592 , 2012.

Cai, S. X. Design and synthesis of Rhodamine 110 derivative and Caspase-3 substrate for enzyme and cell-based fluorescent assay. *J. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, p. 39-42, 2001.

Callister Jr., W. D. *Ciência e engenharia de materiais: Uma introdução*. LTC, 5ed., cap 2, 2002.

Campbell, Mary K. *Bioquímica*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Câncer, disponível em, [www.inca.gov.gov.br](http://www.inca.gov.gov.br). Acessado em 08/11/12.

Castano, A. P; Mroz, P; Hamblin, M.R; Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, *Nat Rev Cancer*. 2006 July V 6, P 535–545, 2011.

Chatterjee, d.k.; fong, l.s.; zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 1627- 1637, 2008.

Correa, D.S., et al., Z-scan theoretical analysis for three-, four- and five-photon absorption. *Optics Communications*, V.277 n.2, p. 440-445, 2007.

CORY, A. H., T. C. OWEN, J. A. BARLTROP & J. G. CORY. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communication*, v. 3, n. 7, p.207-12, 1991.

Dalgarno, S. J. *Supramolecular chemistry*. *Annu. Rep. Prog. Chem.*, v. 106, P. 197-215, 2010

Davila, M. L; Photodynamic therapy, *Gastrointest Endoscopy Clin N Am*; V 21, p 67–79, 2011.

Eckelmann, J.; Dethlefs, C.; Brammer, S.; Do an, A.; Uphoff, A.; Lüning, U. Second-generation supramolecular dendrimer with a defined structure due to orthogonal binding. *Chem. Eur. Journal*, v.18, n.27, p.8498-8507, 2012

Ellis, R.E.; Yuan, J.Y.; Horvitz, H.R.; Mechanisms and functions of cell death, *Annu. Rev. Cell Biol.* V. 7, P. 663-698, 1991.

Enciclopedia britânica, Disponível em: <http://global.britannica-com.ez38.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/468501/polyether>. Acessado em 26/07/2013

Esfand, R. Synthesis, complexation and pharmaceutical applications of tetradirectional of ascade dendrimers. *Pharm.sci.* 2: 1-3, 1996.

Esfand, F.; Tomalia, D. A. Poly(amidoamine) PAMAM dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *DDT*, v.6, n.8, 2001.

Estimativa do câncer em 2012. Disponível em [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). Acessado em 08/11/12.

Fairbanks, M. Glicerina: Crescimento do Biodiesel Provoca Inundação no Mercado de Glicerina, Incentivando a Descobrir Novas Aplicações. *Revista Química e Derivados*. No. 487, 2009. Acessado em <http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/GlicerinaQuim&Deriv.pdf>

Fan,H; Hub, Q; Xue,J; Liangc, W; Tang, G; Yange, W. In vivo treatment of tumors using host-guest conjugated nanoparticles functionalized with doxorubicin and therapeutic gene Ptrail; *Biomaterials*, v. 33, p.1428-1436, 2012.

FDA; Disponível em <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.854> , acesso em 01/04/2013 .

Fenn WO. Hmolysis of erythrocytes in contact with glass. *J Exp Med.* V. 31, p.271-86, 1922.

Festjens, N.; Berghe, T.V.; Vandenabeele, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response, *Biochimica et Biophysica Acta*, V. 1757, P. 1371-1387, 2006.

Fratezi, J. y; Cervical spine fusion utilizing silicated calcium phosphate bone graft substitute (SICAP) *Columna*, V 10, p 144, 2011.

Fréchet, j.m.j. designing dendrimers for drug delivery. *Phar.scstechnol. Today* V. P.393-401, 2000.

Fréchet JMJ, Tomalia DA, Wiley J, Sons I. *Dendrimers and other dendritic polymers*: Wiley New York; 2001

Fernandes, E. G. R.; Queiroz, A. A. A.; A bioconjugated polyglycerol dendrimer with glucose sensing properties. *Journal of materials science. Materials in medicine*, v.20 n2 p.473 -479, 2009.

Franz-Xaver Schmid, *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. Encyclopedia of Life Sciences*, p. 1-4, 2001. Acessado em: <http://www.life.illinois.edu/biochem/455/Lab%20exercises/Photometry/spectrophotometry.pdf>.

Figueiredo, A; Barroso, j. M; Oliveira, M. M. *Guia Prático de Biologia Celular*, Lisboa, 11<sup>a</sup> ed. 2004

Finlay, C. A; Hinds, F. W; Levine, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, V. 57, n7, p. 1083-1093, 1989.

Frenette, P.S; Wagner, D.D. Adhesion molecules—Part II: Blood vessels and blood cels. *New Engl J Med*, p.335-343, 1996.

George J. Thomas. Raman spectroscopy of protein and nucleic acid assemblies. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* V. 28 P. 1–27, 1999.



Giehm L; Christensen C; Boas U; Heegaard P. A. H; Otzen D. E. Dendrimers destabilize proteins in a generation-dependent manner involving electrostatic interactions. *Biopolymers* V. 89 P. 522–529, 2008;

Gilbert, A.; Baggott, J. In: *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1991**.

Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. *Dendrimers And Dendritic Polymers In Drug Delivery*. Ddt, v.10, p.35-43, 2005.

Gonzalez-Marquez, L; Juan P. Rodrigo ; Llorente, J. L; Alvarez-Marcos, C ;Diaz, J. P; Suarez, C; Transoral CO2 laser surgery for supraglottic câncer, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, V269, p2081–2086, 2012.

Gorman, C.B; Smith. J.C. Effect of repeat unit flexibility on dendrimer conformation as studied by atomistic molecular dynamics simulations. *Polymer*. V. 41, P. 675–683, 2001.

Haag, R.; Sunder, A.; Stumbé, J.-F. An approach to glycerol dendrimers and pseudo-dendritic polyglycerols, *J. Am. Chem. Soc.*, V. 122, P. 2954-2955, 2000.

GOSHEN, M. K. Drug-loaded nanoparticles and supramolecular nanotubes formed from a volatile microemulsion with bile salt derivatives. *Physical chemistry chemical physics*, v.15, p.6016, 2013.

Grainger, S.; El-Sayed, M. E. H. *Stimuli-Sensitive Particles for Drug Delivery*. S.-S. P. F. D. *Biologically-responsive Hybrid Biomaterials: A Reference for Material Scientists and Bioengineers*. 1. ed. [S.l.]: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2010. p. 171-189

Grivicich, I.; Regner, A.; Rocha A.B.; Morte Celular por Apoptose, *Rev. Bras. de Cancerologia*. V. 53, N. 3, P. 335-343, 2007.

Guerra AN, Gavala ML, Chung HS, Bertics PJ. Nucleotide receptor signalling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signal*. v.3 p.39-51, 2007

Guillet J.; Polymer Photophysics and Photochemistry an Introduction to the Study Photoprocess in Macromolecules, Cambridge University Press, 1985

Gupta, P.; Vermani, K.; Garg, S. Hidrigels: from controlled release to pH-responsive drugdelivery.. *Drug Discov.* , v.7, n.10, p.569-579, 2002.

Haag, R.; Sunder, A.; Stumbé, J.-F. An approach to glycerol dendrimers and pseudo-dendritic polyglycerols, *J. Am. Chem. Soc.*, v.122, p.2954-2955, 2000.

Hahn, U; Vögtle, F; Nierengarten, J. F; Synthetic Strategies towards Fullerene-Rich Dendrimer Assemblies, 2000

Halliday, D; Resnik, R; Fundamento de física, ótica e física moderna, LTC, 8a ed. v. 4, p. 17 - 23 ,2007.

Harboe. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry, *Scand. Clin. Lab. Invest.*;11:66-70, 1959.

Heegaard P. M. H; Boas U; Otzen D. E. Dendrimer effects on peptide and protein fibrillation. *Macromol Biosci* V.7, P.1047–1059, 2007.

Henkelman S, Rakhorst G, Blanton J, van Oeveren W. Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials. *Materials Science & Engineering C – Biomimetic and Supramolecular Systems*; V.29 p.1650-1654, 2009.

Hikaru, K.; Kobayashi, T.; Suzuki, T.; Ichimura, T.; Excited state dynamics of 6-aza-2-thiotymine and 2 thiothymine: Highly efficient intersystem crossing and singlet oxygen photossensitization. *J. phys. Chem.*, v. 114, p. 8782-8789, 2010.

Hirotsu, K. Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on the Rhodamine Chromophore. *J. Anal. Chem.*, v.73, p.1967-1973, 2001.

INCA. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322). Acessado em 15/03/2013.

Ionashiro, M. *Giólito: Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial Calorimetria Exploratória Diferencial*. São Paulo: Giz Editorial, 2005.

JAMISON, A. C.; LEE, T. R.; PARK, H. H. Rise of the nanomachine: the evolution of a revolution in medicine. *Nanomedicine.*, v.2, n.4, p.425-430, 2007.

Janderson Freitas Leite. *Propriedades Hemocompatíveis do Dendrímero Bioativo de Poliglicerol Conjugado com Estreptoquinase*. 2008. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, . Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.

Jayaraman, M; Fréchet, J. M. J. A Convergent Route to Novel Aliphatic Polyether Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.*, V. 120, n 49, p. 12996–12997, 1998

Johnson, A. S; Couto, C. G; Weghorst, C. M. Mutation of the p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. *Carcinogenesis* vol.19 no.1 pp.213–217, 1998.

Junqueira; Carneiro. *Biologia Celular e Molecular*. 8a Edição. Guanabara Koogan, 2005.

Kang C, et al, Evaluation of folate-PAMAM for the delivery of antisense oligonucleotides to rat C6 glioma cells in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. (2010 May), V. 93 , n. 2, p. 585-94, 2010.

Karmakar S, et al. Combination of all- trans retinoic acid and taxol regressed glioblastoma T98G xenografts in nude mice. *Apoptosis*, V.12,n.11, p. 2077-87, 2007.

Karpiuk, J; Grabowski, Z .R; Schryver, F. C. D. Photophysics of the Lactone Form of Rhodamine 101. *J. Phys. Chem*. V.98, P.3247-3256, 1994.

Karu T.; Pyatibrat L.; Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol* V.27, P.219-223, 1995.

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

Klajnert B; Stanislawska L; Bryszewska M; Palecz B. Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. *BBA-Proteins Proteomics* 1648: 115–126, 2006.

Klajnert, B; Bryszewska, M; Dendrimers: properties and applications; *Acta Biochim Pol*, v 48, p 199-208, 2001

Kilinc, E; Rothrock, J; Migliorati, E; Drukteinis, S; Roshkind, D. M.; Bradley, P; Potential surface alteration effects of laser-assisted periodontal surgery on existing dental restorations, *Quintessence international*, v 43 , p 387 -395, 2012.

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, 1994.

Kurwa, H. A; Barlow, R, J. The role of photodynamic therapy in dermatology. *Clinical and experimental dermatology*. V. 24 p. 143- 148, 1999.

Lehn, J. M. *Supramolecular Chemistry–Concepts and Perspectives*; VCH: Weinheim, 1995.

Lehn, J. M. *Supramolecular chemistry*. *SCIENCE*. v. 260, p 1762-1763, 1993.

Lehn, J. M. *Supramolecular Chemistry – Scope and perspectives molecules - Supermolecules - Molecular Devices*. Disponível em [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1987/lehn-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/lehn-lecture.html), acessado em 25/ 02/2012.

Lehninger, a. L; cox, m. M. N; Priciples of biochemistry, 3th ed, New york W.H Freeman and companny, 2000.

Lawen, A.; Apoptosis – an introduction, BioEssays. V. 25, P. 888-896, 2003.

Lewis, T; Ganesan, V. Interactions between Grafted Cationic Dendrimers and Anionic Bilayer Membranes. J. Phys. Chem. B. V. 117 (33), P. 9806–9820, 2013.

LIMA, C. R. O.; RABELO, R. E.; VULCANI, V. A. S.; CARDOSO, L. D.; SOUSA, N. L. M.; DE MOURA, V. M. B. D. P53 gene: major mutations in neoplasias and anticancer gene therapy Gene p53: principais mutações em neoplasias e terapia gênica anticâncer. Ciencia rural, v.42, n.5, p.845, 2012.

Lins, R. D. A. U; Dantas, E. M; Lucena, K. C. R; Garcia, A. F. G; Silva, J. S.P; Aplicação de laser de baixa potência na cicatrização de feridas, Odontol. Clín.-Cient, v2, p 511-516, 2011.

Longo, J.P.F. ;Lozzi, S. P. ; Azevedo, R.B.; Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica review; Rev Gaúcha Odontologica. v.5 p 51-57, 2011

Lopes, A. A; Oliveira, A. M; Prado, C.B. Principais genes que participam da formação de tumores. BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA. V.2, n. 2, 2002.

Lopes, C.M; Lobo, J. M. S; Costa, P; Formas farmacêuticas de liberação modificada: Polímeros hidrofílicos; revista brasileira de ciências farmacêuticas, V41, 2, p 143-154, 2005.

LOSCO, P.; ENGELMANN, F. M.; WINNISCHOFER, H.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Preparação e propriedades espectroscópicas e eletroquímicas de uma porfirina ligada a quatro complexos de tris-bipiridina rutênio (ii). XXII Reunião anual do SBQ, Poços de Caldas, v.1, p.QI67, 2000.

LIMA, C. R. O.; RABELO, R. E.; VULCANI, V. A. S.; CARDOSO, L. D.; SOUSA, N. L. M.; DE MOURA, V. M. B. D. P53 gene: major mutations in neoplasias and anticancer gene therapy

Gene p53: principais mutações em neoplasias e terapia gênica anticâncer. *Ciencia rural*, v.42, n.5, p.845, 2012.

Luciana Veríssimo Militão. Análise físico-química e fotodinâmica de clorofila em dendrímeros de poliglicerol. 2013. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.

Ma, D.; Zhang, H. B.; Tu, K.; Zhang, L. M. Novel supramolecular hydrogel/ micelle composite for co-delivery of anticancer drug and growth factor. *Soft Matter*, v.8, n.13, p.3665-3672, 2012.

Machado, A. E. H; terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas; *Química nova* V 23, p 237-243,2000.

Maeda, H; Matsumura, Y. Tumoritropic and limphotropic principles of macromolecular drugs. *Critical reviews in therapeutic drug carrier system*; v. 6, p.193-210, 1993.

Mathias O; Senge Dr. rer. Nat; mTHPC — A drug on its way from second to third generation photosensitizer?, V 9, n2, p 170-179, 2012.

Maiti P. K., Ça in T., Lin S-T., Goddard III W. A., Effect of solvent and pH on the structure of PAMAM dendrimers. *Macromolecules*, 38(3), 979-991, 2005.

Mahasin F. Al-Kadhemy, Israa F. Alsharuee, Ali Abid D. Al-Zuky. Analysis of the Effect of the Concentration of Rhodamine B in Ethanol on the Fluorescence Spectrum Using the "Gauss Mod" Function. *Journal of Physical Science*, Vol. 22(2), 77–86, 2011.

Malinauskas, R.A.. Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. *Artificial Organs*;21:1255-1267, 1997.

Mammen M; Choi S.K; Whitesides G. M. Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew V.* 37, P. 2755–2794, 1998.

Mcmurry, J. *Química orgânica combo*; 6<sup>a</sup> ed. Cengage Learning, 2005.

MENZINGER, M. E WOLFGANG, R. The Meaning and Use of the Arrhenius Activation Energy. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 8, n. 6, p. 438–444, 1969.

Miller, K; Reich, E; Rück, A; Hautmann, H. Photodynamic therapy of bladder cancer —uptake and phototoxicity of photosan in vitro. *Urological Research.* V. 19, n. 6, p. 353-356, 1991.

MOAN, J. Properties for optimal PDT sensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B*, v. 3/4, p. 521-4, 1990.

Montanari, M. L. C; Montanari, C. A; Veloso, D. P. Sistemas transportadores de drogas. *Química nova*, V 21, p 470-476, 1998.

Nagai, Y.; Unsworth, L. D.; Koutsopoulos, S.; Zhang, S. Slow release of molecules in self-assembling peptide nanofiber scaffold. *J. Control. Release*, v.115, n.1, p.18-25, 2006.

Nance, N. Terapia gênica. *Ciência e saúde coletiva*, v.7, p.109-116, 2002.

NANOMEDICINA. Nanopartículas, 2012. Disponível em: <<http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/nanopartículas/>>. Acessado em: 20 jul. 2013.

Nestmann, E. R; Douglas, J. R; Matula, T. I; Grant, C. E; Kowbel, D, J. Mutagenic Activity of Rhodamine Dyes and Their Impurities as Detected by Mutation Induction in Neilsen, L. E.; Landen, R. F.; “Mechanical Properties of polymers and composites”; 2<sup>a</sup> Ed; Neilsen, L. E.; Landen, R. F.; “Mechanical Properties of polymers and composites”; 2<sup>a</sup> Ed; Marcel Dekker, Inc.; 1994

Salmonella and DMA Damage in Chinese Hamster Ovary Cells. *Cancer Research* 39, 4412-17, 1979.

Oliveira, S.L., et al., *Perylene derivatives with large two-photon-absorption cross-sections for application in optical limiting and upconversion lasing*. *Advanced Materials*, 2005. 17(15): p. 1890-1893.

OLIVEIRA, V.; PEREIRA, M. N.; BRANDÃO, H. M.; BRANDÃO, M. A. F.; GATTAZ, W. F.; RAPOSO, M. R. B. Carbon nanotubes applied in neuroscience: prospects and challenges. *Revista de psiquiatria clinica*, v.38, n.5, p.201-207, 2011.

OSHIRO, T. Low reactive-level laser therapy practical application. Chichester: John Wiley & sons; V. p. 2-10, 1991.

Pagliaro, M., Ciriminna, R.; Kimura H., Rossi, Michele., Pina C, *From Glycerol to Value-Added Products*, *Angewandte Chemie International Edition*, v.46, p.4434 - 4440, 2007.

Pasha, Chand; Narayana, B.. A facile spectrophotometric method for the determination of hypochlorite using rhodamine B. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 18, n. 1, p. 2007.

Pasupathy, K; Suek, N. W; Lyons, J, L; Ching, J; Jones, A; Lu, Q; Lamb, M, K; Kea, P. C. Single-Molecule Dendrimer-Hydrocarbon Interaction. *Open Nanosci. J.*, V. 2, P. 47-53, 2008.

PATIL, S. D.; RHODES, D. G.; BURGESS, D. J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, v.7, n.1, p.E61-E77, 2005.

Paszko, E; Ehrhardt, C; Senge, M, O; Kelleher, D, P; Reynolds, J, P; Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, V 8, P 14-29, 2011.

Penrose, C.; Shim-Chang, H. Photodynamic therapy for the treatment of cutaneous sarcoidosis: A case study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.64, n.2, p.AB46, 2011.



A. Penzkofe R And W . Leupache R. Fluorescence behavior of highly concentrated rhodamine 6G solutions. Journal of Luminescence 37: 61-72, 1987.

Perussi, J. R.; Inativação fotodinâmica de microrganismos. quím. Nova v.30 n.4 p.998-994, 2007.

Photodynamic therapy. Disponível em: [http://www.neuros.net/en/photodynamic\\_therapy.php](http://www.neuros.net/en/photodynamic_therapy.php), Acessado em 21/12/2012.

Pollock, R. E. Manual de Oncologia Clínica. 8ª ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, p 10, 2006

Proskuryakov, S.Y.; Konoplyannikov, A.G.; Gabai, V.L.; Necrosis: a specific form of programmed cell death?, Experimental Cell Research, V. 283, P 1-16, 2003.

Refração da luz Disponível em: [http://www.mundoeducacao.com/upload/conteud\\_legenda/60edf20086a2f8dc15f346b98326f82a.jpg](http://www.mundoeducacao.com/upload/conteud_legenda/60edf20086a2f8dc15f346b98326f82a.jpg), Acessado em 15/03/2013

Ren Y, et al. Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro. J Biomater Sci Polym Ed. Vol. 21 , n.3, pp: 303-14, 2010.

Renata Mendes Moura. Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do dendrimer de poliglicerol salicilado em diferentes linhagens celulares. 2011. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.

Renisch, L ; Laser physics and tissue interaction. Laser applications in otolaryngology, Otolaryngol clin. north am; V 29, p 893-915, 1996.

Rivoire, W. A; Capp, E; Corleta, H. V; Silva, I, B; bases biomoleculares da oncogênese cervical, Revista Brasileira de Cancerologia, v 47, p179-84,2001

Roberts, J.C., Bhalgat, M.K., Zera, R.T. Preliminary biological evaluation of polyaminoamine (PAMAM) Starburst TM dendrimers. J. Biomed. Material Res. V.30, p.53-65, 1996.

Ronsein, G; Miyamoto, S; Bechara, E; Di Mascio, P. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para Detecção e implicações biológicas. Quim. Nova, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006

Sarasin, A; Mari, G. G. p53 Review Article- TP53 Mutations in Human Skin Cancers. Human Mutation V. 21, p. 217-228, 2003.

Sergey V. Lyulin, Anatolij A. Darinskii, Alexey V. Lyulin. Energetic and conformational aspects of dendrimer overcharging by linear polyelectrolytes Phys. Rev. E 78, 041801 (2008).

SILVA, M. B. A.; LUCENA, L. S.; BARBOSA, M. C. Complexation in polyelectrolyte Solution withdivalent surfactants. Physica A, v.331, p.42-50, 2004.

Silva, L. L; Donnici, C. L; Ayala, J. D; Freitas, C. H; Moreira, R. M; Pinto, A. M. F. Traçadores: o uso de agentes químicos para estudos hidrológicos, ambientais, petroquímicos e biológicos. Quim. Nova, V. 32, n 6, p. 1576-1585, 2009.

Srinivas, N. M.K; Rao, S. V; Rao, D. N. Saturable and reverse saturable absorption of Rhodamine B in methanol and water. J. Opt. Soc. Am. B. V. 20, P.2470-79, 2003.

Rhodamine B: A Systemic Fluorescent Marker for Studying Mountain Beavers (*Aplodontia rufa*) and other Animals. Northwest Science, V. 57, n. 1, p. 16-21, 1983.

Schneider C. P, Shukla D, Trout B. L. Effects of Solute-Solute Interactions on Protein Stability Studied Using Various Counterions and Dendrimers, 2011.

Setiawan, D; Kazaryan, A; Martoprawiro, M. A; Filatov. M. A first principles study of fluorescence quenching in rhodamine B dimers: how can quenching occur in dimeric species? *Phys. Chem. Chem. Phys.*, V.12, P.11238–11244, 2010.

Sheikbahae, M., et al., *Sensitive Measurement of Optical Nonlinearities Using a Single Beam*. *Ieee Journal of Quantum Electronics*, v.26, n.4 p. 760-769, 1990.

Sidransky, D; Hollstein, M. Clinical implications of the p53 gene. *Annu. Rev. Med.* V.47, p.285–301, 1996.

Silverstein, R. M. - Webster, F. X. - Kiemle, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 1ª ed.. LTC, 1979.

Snare, M.J., et al., *The photophysics of RhB-B*. *Journal of Photochemistry*, V. 18, n.4, p. 335-346, 1982.

Spencer, R.A; Johnston, E,G. *Oncologia*, primeira ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003

Steven C. Zimmerman, Laurence J. Lawless. *Supramolecular Chemistry of Dendrimers*. *Topics in Current Chemistry*, Vol. 217: 96-120, 2001.

Stoklosa T, Golab J. Prospects for p53-based cancer therapy. *Acta Biochim Pol.* V. 52, p. 321-328, 20005.

Stumbé, J. F.; Sunder, A.; Haag, R., Pseudo-Dendrimers as an Alternative to Perfect Dendrimers: A General Concept, *Poly. Mat. Sci. Eng.* V. 84, P. 1023-1024, 2001.

Scheffer, S. R.; Nave, H.; Korangy, F.; Schlote, K; Pabst, R; Jaffee, E. M; Manns, M. P; Greten, T.F; Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response *in vivo*. *Int. J. Cancer*: V. 103, p. 205–211, 2003.

Shellock F and Kanal E. Safety of magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. v. 10, p. 477-484, 1999.

SHAW, D. J. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. 4. ed. [S.l.]: Elsevier Science Lt, 1992. p. 84-93.

Shizhong Wang, Ruomei Gao, Feimeng Zhou and Matthias Selke. Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy. *J. Mater. Chem.*, V.14: P. 487-493, 2004.

Simplicio, F, I; Maionchi, F; Hioka, N; Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos, *química nova*, V 25, P 801-807, 2002.

Sunder, A.; Quincy, M.-F.; Mülhaupt, R., Frey, H. Hyperverzweigte Polyetherpolyole mit flüssigkristallinen Eigenschaften, *Angew. Chem.*, V. 111, p. 3107, 2001

Sunder, A., Hanselmann, R., Frey, H., Mülhaupt, R., Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization, *Macromolecules*, V. 32, p. 4240-4246, 1999.

Sunder, A., Mülhaupt, R., Haag, R., Frey, H., Chiral Hyperbranched Dendron-Analogs, *Macromolecules*, V. 33, p. 253-254, 2000.

Supattapone, S.; Nguyen, H. B.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Scott, M. R. Elimination Of Prions By Branched Polyamines And Implications For Therapeutics. *Pnas*, V.96, N.25, 1999.

Tacelosky, T. M.; Creecy, A. E.; Shanmugavelandy, S. S.; Smith, J. P.; Claxton, D. F.; Adair, J. H.; Calcium Phosphosilicate Nanoparticles for Imaging and Photodynamic Therapy of Cancer, *Discovery medicine*, 2012.

Tappenier, H.; Jesionek; Therapeutische versuche mit fluoreszierenden Stoffe. *A. Muench. Med. Wochschr.* v. 1, p.2042, 1903

TEMPLETON, G. Scientists build the first carbon nanotube computer, change computing world forever, 26 set. 2013. Disponível em: <<http://www.extremetech.com/extreme/167421-scientists-build-the-first-carbon-nanotube-computer-change-computing-world-forever>>. Acesso em: 30 set. 2013.

The United States Pharmacopeia. Rockville (USA), USP Convention, NF XXI edition. P. 1200-01, 1985.

Thompson, M. A. Understanding and optimisation of non-conventional emulsions. University of Hull. Hull. 2012.

Thor A. D; Moore D. H; Edgerton S. M, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. J Natl Cancer Inst. V. 84, p. 845-855, 1992

Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A. Strabust dendrimers: molecular level control of size, shape, surface chemistry topology and flexibility from atoms to macroscopic matter. Angew chemical international, v.29, p.138-175, 1999.

Tomalia, D. A. Structure control within poly(amidoamine) dendrimers: size, shape and regio-chemical mimicry of globular proteins. Tetrahedron, v.59, p.3799-3813, 2003.

Tomalia DA, Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. Prog. Polym. Sci. v. 30, P. 294–324, 2005.

Tornaletti, S; Rozek, D; Pfeifer, G. P. The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. Oncogene, V. 8, p. 2051- 57, 1993.

Twyman, L.J.; The synthesis of water-soluble dendrimers and their application as possible drug delivery systems. Tetrahedron lett. 40: 1743-46, 1999

Villalobos, M. A.; Hamielec, A. E.; Wood, P. E. Kinetic model for short-cycle bulk styrene polymerization through bifunctional initiators. *Journal of applied polymer science*. V. 42, p 629-641, 1991.

Vogl, T. J.; Eichler, K.; Mack, M. G.; Zangos, S.; Herzog, C.; Thalhammer, A.; Engelmann, K. "Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology," *Eur. Radiol.* V.14, P.1063–1073, 2004.

Zamadar, M.; Ghosh, G.; Mahendran, A.; Minnis, M.; Krufft, B.I.; Ghogare, A.;  
99

Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty.; identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Research* v. 36, p 2326 - 2335, 1976. FDA; Disponível em <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.854> , acesso em 01/04/2013 .

Zeng, F.; Zimmerman, S. C.; *Dendrimers in Supramolecular Chemistry: From Molecular Recognition to Self-Assembly*. *Chem. Rev.*, 1997, 97(5), pp 1681–1712

Ziegler, U.; Groscurth, P.; Morphological features of cell death, *News Physiol Sci*. V.19, P. 124-128, 2004.

Zong, W.X.; Thompson, C.B.; Necrotic death as a cell fate, *Genes & Development*, V20. P 1-15, 2006.

Zwaal, R. F. A P. Comfurius, E. M. Bevers. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*,

Xin-Qi Zhan, Zhen-Hua Qian, Hong Zheng, Bing-Yuan Su, Zhi Lan, Jin-Gou Xu. Rhodamine thiospirolactone. Highly selective and sensitive reversible sensing of Hg(II). *Chem. Commun.*, 1859–1861, 2008.

Werner, E. G. G; Farenhorst, E. Preparation of glycidyl polyethers of polyhydric aromatic alcohols. UNITED STATES PATENT OFFICE, 2,467,171, 1949.

Watkins, D. M; Sayed-Sweet, Y. Klimash, J.W; Turro, N. J; Tomalia, D. A. Dendrimers with Hydrophobic Cores and the Formation of Supramolecular Dendrimer-Surfactant Assemblies. *Langmuir*, V.13, P.3136-3141, 1997.

Wen, J.J.; Garg, N. Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma Cruzi* infection. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 37, p. 2072-2081, 2004.

Wiener, E. C.; Brechbiel, M. W.; Brothers, H.; Magin, R. L.; Gansow, O. A.; Tomalia, D. A.; Lanterbur, P. C. Dendrimer-based metal-chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magn.Reson.Med*, v.31, p.1-8, 1994.

Willerson D Jr, Aaberg TM, Reeser FH. Necrotizing vaso-occlusive retinitis. *Am J Ophthalmol*. V. 84, n.2, p. 209-191, 1977.

Williamson, A. Theory of aetherification. *Phylosophical Magazine* V.37, p 350-356, 1850.

Wu Y, Huang YX, Kang LL, Wu ZJ, Luo M. Effect of pH on molecular constitution and distribution of hemoglobin in living erythrocyte. *Biopolymers*. V.93, n.4, p.348-54, 2010.

Wu, M.; Ding, H.F.; Fisher, D.E.; Apoptosis: Molecular Mechanisms, *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001.